サノフィ株式会社

リルザブルチニブ

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.6 毒性試験の概要文

Total number of pages: 127

目　　次

2.6.6 毒性試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 8

図　目　次 11

略号と用語の定義 12

1　　まとめ 15

2　　単回投与毒性試験 22

2.1　　げっ歯類 22

2.1.1　　ラットを用いた単回経口投与毒性試験 22

2.2　　非げっ歯類 23

2.2.1　　ビーグル犬を用いた単回経口投与毒性試験 23

3　　反復投与毒性試験（サポート的 TK 評価を含む） 24

3.1　　げっ歯類 24

3.1.1　　ラットを用いた 13 日間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 24

3.1.2　　ラットを用いた探索的 2 週間経口投与用量設定毒性試験 26

3.1.3　　ラットを用いた 1 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 27

3.1.4　　ラットを用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 29

3.1.5　　ラットを用いた 6 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 32

3.2　　非げっ歯類 37

3.2.1　　ビーグル犬を用いた探索的 2 週間経口投与用量設定試験 37

3.2.2 ビーグル犬を用いた 20 日間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 38
3.2.3 ビーグル犬を用いた 1 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 40
3.2.4 ビーグル犬を用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 42
3.2.5 ビーグル犬を用いた探索的 12 週間カプセル経口投与ブリッジング試験 45
3.2.6 ビーグル犬を用いた 9 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 46

4 遺伝毒性試験 51

4.1 In vitro 非哺乳類細胞系 51
4.2 ヒト末梢血リンパ球を用いる in vitro 哺乳類染色体異常試験 51
4.3 ラットを用いる in vivo 小核試験 52

5 がん原性試験 53

5.1 マウス 53
5.1.1 TgHRAS マウスを用いた 1 又は 3 日間経口投与用量設定試験 53
5.1.2 TgHRAS マウスを用いた探索的 14 日間経口投与用量設定試験 54
5.1.3 TgHRAS マウスを用いた 1 か月間経口投与用量設定試験 54
5.1.4 TgHRAS マウスを用いた 1 か月間経口投与用量設定試験 56
5.1.5 TgHRAS マウスを用いた 6 か月間経口投与がん原性試験 58
5.2 ラット 60
5.2.1 ラットを用いた 2 年間経口投与がん原性試験 60

6 生殖発生毒性試験 67

6.1 ラットを用いた経口投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 67
6.2 胚・胎児発生に関する試験 68
6.2.1 ラット 68
6.2.1.1 ラットを用いた強制経口投与による探索的胚・胎児発生に関する用量設定試験 68
6.2.1.2 ラットを用いた強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験 69
6.2.2 ウサギ 71

6.2.2.1 非妊娠ウサギを用いた探索的 7 日間経口投与毒性試験 71
6.2.2.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する探索的強制経口投与用量設定試験 72
6.2.2.3 ウサギを用いた強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験 73

6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 75

6.3.1 ラットを用いた強制経口投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 75

6.4 幼若動物を用いた試験 77

6.4.1 幼若ラットを用いた探索的 25 日間強制経口投与毒性試験 77

7 局所刺激性試験 79

8 その他の毒性試験 80

8.1 抗原性試験 80

8.2 免疫毒性試験 80

8.3 機序解明試験 80

8.4 薬物乱用傾向の評価 80

8.4.1 [redacted] in vitro 薬理モデルを用いたリルザブルチニブ及びチオシアネートの評価 80

8.4.2 既知の乱用薬物に対するリルザブルチニブ及びチオールの構造的類似性 81

8.4.3 非臨床データ 82

8.4.4 結論 83

8.5 代謝物 83

8.5.1 PRN834 83

8.5.2 PRN618 83

8.5.3 チオシアネート 84

8.5.3.1 単回投与毒性 85

8.5.3.2 反復投与毒性 85

8.5.3.3 遺伝毒性 86

8.5.3.4 がん原性 86

8.5.3.5 生殖発生毒性 86

8.6 実際及び潜在的な変異原性不純物の評価 87

8.6.1 変異原性試験 90

8.6.1.1 PRN834（PRN834/D92-E、RA16735340） 91

8.6.1.2 PRN834-A4（RA16732596） 91

8.6.1.3 PRN835（PRN835.2HCl、RA16894765A） 91

8.6.1.4 PRN835-EDCI 付加物（PRN1319）及び PRN3220 91

8.6.1.5 PRN862（RA16846619） 91

8.6.1.6 PRN1418（RA16740747） 93

8.6.1.7 PRN2960（RA16740781） 93

8.6.1.8 PRN3222（RA16741043） 93

8.6.1.9 PRN3232（RA16911927） 93

8.6.1.10 PRN3590（RA16787051） 93

8.6.1.11 PRN3612（RA17025194） 94

8.6.1.12 PRN3767（RA16740866） 94

8.6.1.13 PRN4361 94

8.7 原薬不純物の安全性確認 94

8.7.1 ラットを用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験 96

8.7.2 不純物 98

8.7.2.1 PRN834 99

8.7.2.2 PRN2960（RA16740781） 100

8.7.2.3 PRN1253（RA16732764） 100

8.7.2.4 PRN1418（RA16740747） 100

8.7.2.5 PRN2468 101

8.7.2.6 PRN835（PRN835.2HCl、RA16894765A） 102

8.7.2.7 PRN3232（RA16911927） 103

8.7.2.8 PRN3612（RA17025194） 104

8.7.2.9 PRN3222（RA16741043） 105

8.7.2.10 PRN3767（RA16740866） 105

8.7.2.11 PRN3590（RA16787051） 106

8.8 ニトロソアミンのリスク評価 106

8.9 探究的毒性試験 107

8.9.1 ラット脳の探索的病理学的検査 107

8.9.2 ラットを用いた 3 日間経口投与神経毒性試験 107

8.9.3 ラットを用いた 3 日間経口又は空腸内投与神経毒性試験 109

8.9.4 リルザブルチニブ関連の肝臓酵素誘導の探索的トランスクリプトームプロファイリング 112

8.10 光毒性試験 113

8.10.1 BALB/c 3T3 細胞を用いたリルザブルチニブの探索的光毒性試験 113

8.10.2 BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いたニュートラルレッド取込み光毒性試験 114

9 考察及び結論 116

9.1 一般毒性 116

9.1.1 脳 116

9.1.2 消化管 117

9.1.3 肝臓 117

9.1.4 リンパ系組織 117

9.1.5 その他の所見 118

9.2 遺伝毒性 118

9.3 がん原性 118

9.4 生殖発生毒性 119

9.5 その他の毒性 120

9.5.1 免疫毒性 120

9.5.2 薬物乱用性評価 120

9.5.3 代謝物 121

9.5.4 潜在的変異原性不純物の評価 121

9.5.5 原薬不純物の安全性確認 121

9.5.6 潜在的ニトロソアミンリスク評価 121

9.5.7 探究的毒性 121

9.5.8 光毒性 122

9.5.9 結論 122

参 考 文 献 123

表 目 次

表 1 - Rilzabrutinib Toxicology Program 16
表 2 - Summary of rilzabrutinib exposure in repeat-dose GLP studies in the rat and dog 19
表 3 - 13-Day repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters 26
表 4 - Exploratory 2-week repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters 27
表 5 - 1-Month repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters 29
表 6 - 3-Month repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters 31
表 7 - 6-Month repeat-dose study in rats: Main compound-related findings 34
表 8 - 6-Month repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters 36
表 9 - Exploratory 2-week repeat-dose study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters 38
表 10 - 20-Day oral toxicity study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters 39
表 11 - 1-Month repeat-dose study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters 41
表 12 - 3-Month toxicity study in dogs: Summary of unscheduled euthanasia 42
表 13 - 3-Month toxicity study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters 44
表 14 - 12-Week repeat-dose study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters 45
表 15 - Mean rilzabrutinib AUC_{last} in dogs: Comparison of capsule and oral gavage administration 46
表 16 - 9-Month repeat-dose study in dogs: Main compound-related findings 48
表 17 - 9-Month repeat-dose dog study: Summary of toxicokinetic parameters 49
表 18 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of rilzabrutinib TK parameters 55
表 19 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN618 TK parameters 55
表 20 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN834 TK parameters 56
表 21 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of rilzabrutinib TK parameters 57
表 22 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN618 TK parameters 57
表 23 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN834 TK parameters 58

表 24 - 6-Month study in TgHRAS mice: Summary of rilzabrutinib TK parameters 59

表 25 - 6-Month study in TgHRAS mice: Summary of PRN618 TK parameters 60

表 26 - 6-Month study in TgHRAS mice: Summary of PRN834 TK parameters 60

表 27 - Rat carcinogenicity study: Incidence of rilzabrutinib-related neoplastic findings and associated target tissue changes in male rats 62

表 28 - Rat carcinogenicity study: Incidence of rilzabrutinib-related non-neoplastic findings 64

表 29 - Rat carcinogenicity study: Summary of rilzabrutinib TK parameters 64

表 30 - Rat carcinogenicity study: Summary of PRN618 TK parameters 65

表 31 - Rat carcinogenicity study: Summary of PRN834 TK parameters 65

表 32 - Exploratory rat embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters 69

表 33 - Rat embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters 70

表 34 - Exploratory 7-day toxicity study in rabbits: Summary of toxicokinetic parameters 71

表 35 - Exploratory rabbit embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters 73

表 36 - Rabbit embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters 74

表 37 - Exploratory juvenile toxicity study: Mortality 77

表 38 - Exploratory juvenile toxicity study: Summary of rilzabrutinib TK parameters 78

表 39 - Overview of ICH M7(R2) classification of rilzabrutinib impurities 88

表 40 - Mutagenicity summary of rilzabrutinib impurities with structural alert that warranted an in vitro mutagenicity study 90

表 41 - Margins for specified impurities in rilzabrutinib drug substance lots used in the GLP repeat-dose toxicity studies in rats 95

表 42 - Genotoxicity studies for rilzabrutinib impurities with a predicted daily intake of ≥1 mg 96

表 43 - 3-Month toxicity study in rats: Summary of rilzabrutinib-related microscopic findings at terminal necropsy 98

表 44 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN1418 TK parameters 101

表 45 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN835 TK parameters 103

表 46 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN3232 TK parameters 104

表 47 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN3612 TK parameters 105

表 48 - 3-Day oral neurotoxicity study in rats: Brain microscopic findings 108

表 49 - 3-Day oral neurotoxicity study in rats: Summary of toxicokinetic parameters 109

表 50 - 3-Day oral or intra-jejunal neurotoxicity study in rats: Brain IBA-1 findings 111

表 51 - 3-Day oral or intra-jejunal neurotoxicity study in rats: Summary of toxicokinetic parameters 112

表 52 - NRU phototoxicity assay: Definitive Assay results 115

図　目　次

図 1 - Tanimoto Similarity Index of Rilzabrutinib and Thiocyanate 82

略号と用語の定義

6TG	6-チオグアニン（6-thioguanine）
ALP	アルカリホスファターゼ（Alkaline phosphatase）
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ（Alanine aminotransferase）
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間（Activated partial thromboplastin time）
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（Aspartate aminotransferase）
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve）
AUC_{0-24}	投与開始（時間 0）から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours）
AUC_{0-t}	投与開始（時間 0）から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to time t [h]）
AUC_{inf}	投与開始（時間 0）から無限大時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity）
AUC_{last}	投与開始（時間 0）から最終濃度測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration）
BID	1 日 2 回（Twice a day）
BTK	ブルトン型チロシンキナーゼ（Bruton’s tyrosine kinase）
C_{max}	最高血漿中濃度（Maximum plasma concentration）
$C_{max,ss}$	定常状態の最高血漿中濃度（Maximum steady-state plasma concentration）
CP	シクロホスファミド（Cyclophosphamide）
CVO	脳室周囲器官（Circumventricular organ）
DIPNA	N-ニトロソジイソプロピルアミン（N-nitroso-di-isopropylamine）
DMSO	ジメチルスルホキシド（Dimethyl sulfoxide）
DNA	デオキシリボ核酸（Deoxyribonucleic acid）
DP	製剤（Drug product）
DS	原薬（Drug substance）
eCAC	エグゼクティブがん原性評価委員会（Executive Carcinogenicity Assessment Committee）
ECG	心電図（Electrocardiogram）
ECHA	欧州化学機関（European Chemicals Agency）
EIPNA	N-ニトロソエチルイソプロピルアミン（N-nitroso-etyl-isopropylamine）
EPA	米国環境保護局（Environmental Protection Agency）

GFAP	グリア線維性酸性タンパク（Glial fibrillary acidic protein）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
GST	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（Glutathione-S-transferase）
H&E	ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin and eosin）
HPBL	ヒト末梢血リンパ球（Human peripheral blood lymphocyte）
hprt	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase）
IBA-1	イオン化カルシウム結合アダプター分子 1（Ionized calcium-binding adaptor molecule 1）
IC_{50}	50%阻害濃度（Inhibitory concentration 50% [concentration causing half-maximal inhibition]）
ICH	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonization）
IHC	免疫組織化学的（染色）（Immunohistochemical）
IHC	免疫組織化学（Immunohistochemistry）
IJ	空腸内（Intra-jejunal）
KCN	シアン化カリウム（Potassium cyanide）
KSCN	カリウムチオシアネート（Potassium thiocyanate）
M/P	代謝物／未変化体比（Metabolite to parent ratio）
MEI	ミクロソーム酵素誘導剤（Microsomal enzyme inducer）
MF	突然変異頻度（Mutation frequencies）
MN	小核（Micronuclei）
MN PCE	小核を有する多染性赤血球（Micronucleated PCE）
MNT	小核試験（Micronucleus test）
MPE	平均光作用（Mean photo effect）
MTD	最大耐量（Maximum tolerated dose）
NDEA	N-ニトロソジエチルアミン（N-nitroso-diethylamine）
NK	ナチュラルキラー（Natural killer）
NOAEL	無毒性量（No-observed-adverse-effect level）
NOGEL	無遺伝毒性量（No-observed-genotoxic-effect level）
NPYR	N-ニトロソピロリジン（N-nitroso-pyrrolidine）
OD	光学密度（Optical density）
OECD	経済協力開発機構（Organization for Economic Cooperation and Development）
PCE	多染性赤血球（Polychromatic erythrocyte）
PIF	光刺激係数（Photo irritation factor）
PK	薬物動態（Pharmacokinetic）
PR	P 波開始から QRS 複合波開始までの時間（Time from the beginning of the P wave to the beginning of the QRS complex）

QT	Q 波開始から T 波終了までの時間（The time between the start of the Q wave and the end of the T wave）
QTc	補正 QT 間隔（Corrected QT interval）
RS	相対生存率（Relative survival）
S9	Aroclor™ 1254 あるいは β-ナフトフラボン／フェノバルビタール誘導ラット肝 S9 画分（代謝活性化系）（Aroclor ™ 1254 or β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9 [metabolic activation system]）
SCN	チオシアネート（Thiocyanate）
STP	米国毒性病理学会（Society of Toxicologic Pathology）
SULT	スルホトランスフェラーゼ（Sulfotransferase）
TBIL	総ビリルビン（Total bilirubin）
TgHRAS	CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic（日本語の対訳なし）
TK	トキシコキネティクス（Toxicokinetics）
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間（First time to reach C_{max}）
[redacted]	[redacted]
TSH	甲状腺刺激ホルモン（Thyroid stimulating hormone）
UGT	ウリジングルクロノシルトランスフェラーゼ（Uridine glucuronosyltransferase）
UV	紫外線（Ultraviolet）
v	容積（Volume）
w	重量（Weight）
WBC	白血球（White blood cell）

1　まとめ

リルザブルチニブは可逆的な共有結合性のブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）阻害薬である。リルザブルチニブの試験の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用状況を、本Moduleに提示し（表1に要約）、更なるデータをModule 2.6.7 毒性試験概要表 [表 2.6.7.1]に示す。

リルザブルチニブは、BTKを阻害することにより、B細胞受容体及びFc受容体のシグナル伝達を阻害する。リルザブルチニブの毒性試験は、いずれもGLP規制に従って実施したが、例外はTgHRAS（CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic）マウス、ラット及びイヌを用いた探索的14日間用量設定毒性試験、非妊娠ウサギを用いた探索的7日間毒性試験、イヌを用いた探索的12週間経口カプセル投与ブリッジング試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する探索的用量設定試験、並びにBALB/c 3T3細胞を用いた探索的in vitro光毒性試験であった。

リルザブルチニブの非臨床開発プログラムでは、マウス、ラット、ウサギ及びイヌを用いて毒性を評価した。毒性試験の動物種（マウス、ラット及びイヌ）を選択した理由として、これらの動物種は対応する種類の試験で標準的に使用されており、確固とした背景データが利用可能である。胚・胎児発生に関する試験の非げっ歯類動物種としてウサギを選択した理由は、この動物種の感受性が高いことである。

2試験を除く全ての試験でリルザブルチニブの遊離塩基を使用した理由は、これが市販製剤（DP）に使用される原薬（DS）の型だからである。GLP適用のラット13日間反復投与毒性試験及びイヌ20日間反復投与毒性試験では、市販DPには使用されていないリルザブルチニブのビスメシラート塩を使用した。特に記載しない限り、ラット、ウサギ及びイヌを用いた in vivo 強制経口投与試験では、媒体としてクエン酸水溶液（無水クエン酸）を使用した。リルザブルチニブをイヌにカプセル投与したときの媒体は [redacted]（[redacted]）であった。トランスジェニックマウスを用いた試験の媒体は0.5%メチルセルロースであった。ジメチルスルホキシド（DMSO）を、in vitro遺伝毒性試験では溶媒として、in vitro光毒性試験では希釈剤として使用した。

予定臨床投与経路は経口であることから、GLP適用のin vivo試験は、いずれも経口投与経路を用いて実施した。重要な単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験は、いずれもGLP規制（21 CFR Part 58）及び試験実施国のGLP規制を遵守し、経済協力開発機構（OECD）データ相互受入れ制度の GLP モニタリングプログラムに参加する試験施設で、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに従って実施された。GLP適用であるがGLPに完全には準拠していない部分、及びGLP非適用試験については、確立された試験施設の標準業務手順書に従って実施した。

リルザブルチニブの毒性試験プログラムの概要を表1及び[表 2.6.7.1]に示す。

表 1 - Rilzabrutinib Toxicology Program

Study Type and Duration	GLP	Route of Administration	Species (Strain)	Doses administered (mg/kg/day)	Study Report Number
Single-dose toxicity					
Single-dose toxicity	Yes	PO [a]	Rat (Wistar)	50, 150, 500	DVR0178
Single-dose toxicity	Yes	PO	Dog (Beagle)	50, 150, 500	DVR0179
Repeat-dose toxicity					
13-day [b]	Yes	PO	Rat (Wistar)	M: 150, 500, 1000 F: 50, 150, 500	DVR0175
2-week	No	PO	Rat (Wistar)	50, 150, 500	DVR0172
1-month	Yes	PO	Rat (Wistar)	50, 150, 500	DVR0174
3-month	Yes	PO	Rat (Wistar)	50, 150, 500	DVR0207
6-month	Yes	PO	Rat (Wistar)	15, 50, 150, 300	DVR0376
7-day	No	PO	Rabbit (NZW)	50, 150, 500	DVR0300
2-week	No	PO	Dog (Beagle)	50, 150, 500	DVR0173
20-day [b]	Yes	PO	Dog (Beagle)	30, 100, 300	DVR0168
1-month	Yes	PO	Dog (Beagle)	30, 100, 300	DVR0184
12-week	No	PO (capsule)	Dog (Beagle)	30, 50	DVR0301
3-month	Yes	PO	Dog (Beagle)	30, 100, 300	DVR0206
9-month	Yes	PO (capsule)	Dog (Beagle)	15, 30, 50	DVR0377
Genotoxicity					
Reverse mutation assay	Yes	In vitro incubation	*S.typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, and TA1537 and *E.coli* WP2 uvrA	6.7, 10, 33, 67, 100, 333, 667, 1000, 333, and 5000 µg/plate ± S9	DVR0169
Chromosome aberration	Yes	In vitro incubation	HPBL	4 h (w/o S9): 5, 15, 30, 60, 70, 80, 100 and 125 µg/mL 20 h (w/o S9): 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, and 15 µg/mL 4 h (w/ S9): 15, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, and 80 µg/mL	DVR0170
In vivo micronucleus	Yes	PO	Rat (Sprague Dawley)	M: 500, 1000, 2000 F: 375, 750, 1500	DVR0185
Carcinogenicity					
1- or 3-day	Yes	PO	Mouse (TgHRAS)	M: 500, 1000, 1500 F: 100, 300, 1000	DVR0454
14-day	No	PO	Mouse (TgHRAS)	30, 100, 300, 600	DVR0385
1-month	Yes	PO	Mouse (TgHRAS)	100, 300, 600	DVR0407

Study Type and Duration	GLP	Route of Administration	Species (Strain)	Doses administered (mg/kg/day)	Study Report Number
6-month bioassay	Yes	PO	Mouse (TgHRAS)	30, 100, 300	1281-20014
2-year bioassay	Yes	PO	Rat (Wistar)	M: 10, 30, 100 F: 5, 15, 50	1281-18051
Reproductive and Developmental Toxicity					
Fertility	Yes	PO	Rat (Wistar)	50, 150, 300	DVR0380
Embryo-fetal development range-finding	No	PO	Rat (Sprague Dawley)	50, 150, 500	DVR0298
Embryo-fetal development range-finding	No	PO	Rabbit (NZW)	50, 100, 150	DVR0299
Embryo-fetal development	Yes	PO	Rat (Wistar)	50, 150, 300	DVR0378
Embryo-fetal development	Yes	PO	Rabbit (NZW)	10, 30, 100	DVR0379
Pre- and post-natal development	Yes	PO	Rat (Sprague Dawley)	50, 150, 300	DVR0492
Juvenile toxicity	No	PO	Rat (Wistar)	30, 100, 200, 300, 1000	JUP0024
Other Toxicity					
3-day Neurotoxicity	Yes	PO	Rat (Wistar)	50, 150, 500	DVR0302
3-day Neurotoxicity	Yes	PO, IJ	Rat (Wistar)	PO: 50, 150, 500 IJ: 75, 150	DVR0312
Transcriptomic profiling	No	In vitro	Liver spheroids (human, rat)	0.3, 3, 9 µmol/L; thiocyanate 100 µmol/L	MCT0292
In vitro phototoxicity	No	In vitro	3T3 fibroblasts	0.0091 to 150 µmol/L	DVR0374
In vitro phototoxicity	Yes	In vitro	3T3 fibroblasts	1.02, 1.77, 3.15, 5.6, 10, 17.7, 31.6, and 56.2 µg/mL	PHV0082
Impurity mutagenicity evaluation	No	In silico	NA	NA	MAR0248
Impurity mutagenicity evaluation	Yes	A total of 12 bacterial reverse mutation assays and 1 in vitro L5158Y gene mutation assay were performed. [c]			
Impurity qualification	Yes	A total of 1 bacterial reverse mutation assays, 8 in vitro human lymphocyte micronucleus assays [d], and 4 rat micronucleus and alkaline comet assays were performed.			

Study Type and Duration	GLP	Route of Administration	Species (Strain)	Doses administered (mg/kg/day)	Study Report Number

Abbreviations: DS: Drug substance; F: Female; GLP: Good laboratory practice; HPBL: Human peripheral blood lymphocytes; IJ: Intra-jejunal; M: Male; NA: Not applicable; NZW: New Zealand White; PO: Per os (oral); Wistar: Wistar Han

Except as indicated, the test article used in all studies was rilzabrutinib free base.

a Unless otherwise noted, test article was administered by gavage.

b Test article was the bis mesylate salt of rilzabrutinib, which is not the commercial form; the study is considered non-pivotal

c In addition, 2 exploratory bacterial reverse mutation assays were performed.

d In addition, impurities were present in the rilzabrutinib batch that was used in the in vivo micronucleus assay for the DS.

ラット単回投与毒性試験では、500 mg/kg 群の雌に、可逆的な軽微から軽度の好中球浸潤（近傍の脳実質への軽微な浸潤を伴う）が髄膜及び血管周囲腔に認められたことから、無毒性量（NOAEL）は雄で 500 mg/kg、雌で 150 mg/kg と判断された。イヌ単回投与毒性試験の NOAEL は、検討した最高用量の 500 mg/kg であった。

反復投与毒性試験を、最長でラットでは 6 か月、イヌでは 9 か月の期間で実施した。ラットにおける主要毒性標的器官は、副腎、脳、十二指腸、食道、肝臓、肺、胃、胸腺及び子宮であった。イヌで特定された主要毒性標的器官は、肝臓、リンパ系組織（頸部及び腸間膜リンパ節、パイエル板、胸腺）及び胃であった。ラット及びイヌを用いた 1 か月間反復投与毒性試験における NOAEL は、それぞれ検討した最高用量の 500 及び 300 mg/kg/日と判断された。ラット 3 か月間反復投与毒性試験の NOAEL は 150 mg/kg/日と判断された。イヌ 3 か月間反復強制経口投与毒性試験の NOAEL は、100 mg/kg/日以上で雌雄に 20%以上の体重減少、摂餌量減少、人道的安楽殺及び病理組織学的変化が認められたことから、雄では 30 mg/kg/日であった。雌イヌでは 30 mg/kg/日群の雌 1 匹で約 20%の体重減少がみられ、栄養補助及び休薬日が必要になったことから、NOAEL を決定できなかったが、30 m/kg/日群の雌の全身曝露量は雄と同程度であった。

ラット 6 か月間反復投与毒性試験の NOAEL は、観察された所見の性質及び重症度に基づくと、雌では 50 mg/kg/日、雄では 150 mg/kg/日であった。所見の内訳は、雌では 150 mg/kg/日以上、雄では 300 mg/kg/日で認められた被験物質関連の死亡及び脳の好中球性炎症であった。ゼラチンカプセルの経口投与によるイヌ 9 か月間反復投与毒性試験の NOAEL は、50 mg/kg/日で死亡、体重及び摂餌量の減少、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の増加、並びに病理組織学的所見が認められたことから、30 mg/kg/日であった。

ラット単回投与毒性試験で 500 mg/kg 群の脳にリルザブルチニブ関連の病理組織学的所見が認められたことから、ラット及びイヌの反復投与毒性試験では、対照群及び被験物質投与群の脳について、イオン化カルシウム結合アダプター分子 1（IBA-1）染色（小膠細胞細胞密度）、グリア線維性酸性タンパク（GFAP）染色（星状膠細胞）、ビルショウスキー染色（神経変性）及び／又はフルオロジェード染色（神経変性）を実施した。小膠細胞分布パターンの変化を反映した IBA-1 発現のリルザブルチニブに関連した変化（軽微から軽度）が、ラットで媒体対照と比較してみられたが、イヌでは

認められなかった。3 日間神経毒性試験においてリルザブルチニブを 500 mg/kg/日までの用量で経口投与したラットでは、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色、GFAP 染色、ビルショウスキー染色又はフルオロジェード B 染色を施した脳切片に、神経変性及び細胞変化は認められなかった。その結果、ラットにおける脳室周囲 IBA-1 染色増加は、毒性ではないと考えられた。リルザブルチニブの経口投与後に脳の好中球浸潤がみられたが、浸潤部位の神経細胞、神経細胞支持細胞及び血管系には関連する変化は認められなかった。3 日間神経毒性試験において、リルザブルチニブを 150 mg/kg/日までの用量で空腸内（IJ）投与して得られた曝露量は経口投与と同程度であったにもかかわらず、好中球浸潤は認められず、IBA-1 染色は経口投与と比較してより低頻度でその程度はより低かった。

ラット及びイヌを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の NOAEL でのリルザブルチニブの曝露量の要約を表 2 に示す。

表 2 - Summary of rilzabrutinib exposure in repeat-dose GLP studies in the rat and dog

Study	Sex	NOAEL (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (ng•h/mL)
1-month oral toxicity rat (DVR0174)	M	500	2350	23200
	F		4270	39900
3-month oral toxicity rat (DVR0207)	M	150	1400	8450
	F		3220	17000
6-month oral toxicity rat (DVR0376)	M	150	454	6170
	F	50	616	4960
1-month oral toxicity dog (DVR0184)	M	300	1440	4550
	F		1380	7480
3-month oral toxicity dog (DVR0206)	M	30	592	1070
	F	<30	484 *a*	1040 *a*
9-month oral toxicity dog (DVR0377)	M	30	257	689
	F		339	751

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; NOAEL: No-observed-adverse-effect level

a The female NOAEL was <30 mg/kg/day; C_{max} and AUC values are from 30 mg/kg/day.

遺伝毒性試験の標準バッテリー（ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球［HPBL］を用いる染色体異常試験、並びに in vivo ラット骨髄小核試験［MNT］）により、リルザブルチニブには変異原性及び染色体異常誘発能はないと判定された。

リルザブルチニブの発がん性を、TgHRAS ヘミ接合マウス及び Wistar Han ラットを用いて評価した。トランスジェニックマウスを用いた 6 か月間試験では、検討した最高用量である 300 mg/kg/日までの用量で、生存期間及び新生物発現率にリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。ラット 2 年間試験では、リルザブルチニブに関連した生存期間の変化は認められなかった。100 mg/kg/日群の雄で、甲状腺腫瘍（濾胞細胞腺腫／癌）及び膵臓腫瘍（島細胞腺腫）の発現率上昇が認められた。

雄では 30 mg/kg/日以下、雌では 50 mg/kg/日以下の用量で、ラットにおけるリルザブルチニブの発がん性はないと結論された。甲状腺腫瘍に関する外部専門家の結論によると、ラットにおける腫瘍誘導は、肝臓での第 II 相ウリジングルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT）酵素誘導による甲状腺ホルモン秩序の障害に一致するものであった。UGT 酵素誘導の結果として、甲状腺刺激ホルモン（TSH）増加によりラットの甲状腺濾胞細胞が慢性的に刺激されて過形成（前腫瘍性変化）が誘発され、最終的に濾胞腫瘍が形成される。これはラットにおける非遺伝毒性的な発がんメカニズムであり、ヒトへの関連性はないと考えられる。膵島細胞腺腫はラットで普通にみられる加齢性の腫瘍であり、自然発生的な加齢性の所見として発現した可能性がある。さらに、リルザブルチニブ投与群の雄ラットで認められた膵臓の線維化及び炎症は、ラットにおける自然発生的な背景変化で、この動物種での BTK 阻害薬の影響として報告されており、背景所見の悪化傾向を示している可能性がある。他の動物種では類似した変化は認められなかった。全体として、今回の試験で認められた膵臓腺腫の軽度の発現率上昇は、ラットにおける自然発生的背景変化の悪化に二次的に関連している可能性があり、ヒトへの関連性の可能性は低い。したがって、検討した最高用量である 100 mg/kg/日（雄）及び 50 mg/kg/日（雌）までの用量で、ヒトへの関連性がある腫瘍は発現しなかったと考えられる。

リルザブルチニブは、検討した最高用量である 300 mg/kg/日までの用量で、雌雄のラットの受胎能及び生殖能を障害しなかった。

胚・胎児発生への影響を、ラット及びウサギを用いて評価した。ラットを用いた胚・胎児発生に関する探索的用量設定試験において、リルザブルチニブの 500 mg/kg/日の用量で、着床後胚胎児死亡率及び早期吸収率の上昇並びに胎児体重減少が認められた。胎児の外表変化（全身浮腫）、内臓変化（尿生殖器変化）及び骨格変化（骨化遅延）が 500 mg/kg/日で認められた。ウサギを用いた胚・胎児発生に関する探索的用量設定試験では、おそらく観察された母動物毒性に関連する早期吸収率の軽度の上昇が、150 mg/kg/日で認められた。胎児内臓異常が 50 mg/kg/日以上（心血管系）及び 150 mg/kg/日（腎臓）で認められた。

最終的な試験では、いずれの動物種においても、リルザブルチニブに関連した外表、内臓及び骨格の異常及び変異はみられず、胎児骨化部位数の平均値にも変化は認められなかった。ラットでの胚・胎児発生に関する NOAEL は検討した最高用量の 300 mg/kg/日であったが、300 mg/kg/日で平均母動物体重増加量及び摂餌量の減少が認められたことから、母動物毒性に関する NOAEL は 150 mg/kg/日と判断された。ウサギでの胚・胎児発生に関する NOAEL は検討した最高用量の 100 mg/kg/日であり、100 mg/kg/日で平均母動物体重増加量及び摂餌量の減少が認められたことから、母動物毒性に関する NOAEL は 30 mg/kg/日と判断された。

出生前及び出生後の発生への影響を、ラットを用いて評価した。F_0 親動物の全身毒性に関する NOAEL は、150 mg/kg/日以上で体重及び摂餌量の減少が認められたことから 50 mg/kg/日と判断された。F_1 出生児で離乳前期間中に平均体重及び体重増加量の毒性変化、並びに対応する一般状態の変化が 300 mg/kg/日で認められたことから、F_1 新生児／発達毒性に関する NOAEL は 150 mg/kg/日と判断された。F_1 出生児では離乳後に毒性変化は認められなかったことから、F_1 親動物の全身毒性及び生殖毒性、並びに F_2 胚毒性に関する NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日であった。

幼若ラットを用いた探索的用量設定試験を実施した。100 mg/kg/日以上で死亡及び一般状態の変化が認められたことから、NOAEL は 30 mg/kg/日と判断された。

リルザブルチニブを経口又は IJ 投与したときの脳における被験物質関連の病理組織学的所見を特徴づけるため、ラットを用いた 2 つの 3 日間神経毒性試験を実施した。3 日間経口投与神経毒性試験では、好中球浸潤が雄は 500 mg/kg/日、雌は 150 mg/kg/日以上の用量でみられ、それに伴って脳室周囲 IBA-1 発現上昇が 150 mg/kg/日以上で認められた。3 日間経口及び IJ 投与神経毒性試験では、脳における好中球浸潤が 500 mg/kg/日で、一過性の脳室周囲 IBA-1 発現上昇が 150 mg/kg/日以上で、それぞれ認められた。いずれの試験においても、リルザブルチニブに関連した神経変性性の病理組織学的所見は認められなかった。

In vitro 光毒性試験（3T3 ニュートラルレッド取込み試験）を実施したが、光毒性は認められなかった。

リルザブルチニブの免疫毒性試験は実施しなかった。免疫毒性評価項目（血液学的検査、免疫フェノタイピング［フローサイトメトリー］、組織の病理組織学的検査など）を、ラット及びイヌを用いた GLP 適用の反復投与毒性試験で評価した。毒性試験で認められたリルザブルチニブ関連のリンパ系組織の変化は、回復性がみられ、重症度が低かったことから、更なる非臨床免疫毒性試験は必要ないと考えられた。

いずれの毒性試験においても、薬物乱用傾向に関連する所見は認められなかったことから、薬物乱用傾向試験は必要なかった。

毒性試験で使用した DP のバッチ及び品質は、臨床試験で使用したバッチを代表するものであった。ICH M7(R2) (1)に従って実際及び潜在的な変異原性不純物の評価を実施したところ、DS に関連する明らかなヒトへの変異原性リスクはないと結論された。変異原性不純物は、製造工程を通して許容限度未満になるまで効果的にパージされる（Module 3、DS の項、小節 3.2.S.3.2 不純物）。DS（適切な場合は DP）の不純物は、ICH Q3A(R2) (2)に従った一般毒性試験及び遺伝毒性試験において適切に、提案中の規格設定濃度（Module 3）における安全性が確認された。

代謝物分析により、マウス、ラット及びヒトを含む様々な動物種間で、代謝経路は質的に類似していることが明らかになった。これらのデータをまとめると、ヒトにおける主要な循環血中代謝物 PRN4400（チオシアネート）は非臨床動物種でも認められることが示された。

上記のデータを総合すると、免疫性血小板減少症の治療を目的としたリルザブルチニブの提案中の登録が支持される。

2　単回投与毒性試験

2.1　げっ歯類

2.1.1　ラットを用いた単回経口投与毒性試験

Wistar Han ラット（1 群雌雄各 10 匹、7～11 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg の用量で単回強制経口投与した（DVR0178 試験 [表 2.6.7.5]）。1 群雌雄各 5 匹を、投与の 2 日後（3 日目、終了時安楽殺）及び 14 日後（15 日目、回復期間安楽殺）に剖検した。別の雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 6 匹（リルザブルチニブ群）のラットをおき、トキシコキネティクス（TK）評価用の血液検体を 1 日目に採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、体重変化、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。また、脳組織にフルオロジェード B 染色（神経変性の検出）及び IBA-1 免疫組織化学（IHC）（小膠細胞の検出）を施して検査した。TK 評価用に血液検体を採取した。

全てのラットが計画剖検時まで生存した。一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、剖検及び器官重量において、リルザブルチニブに関連した毒性変化は認められなかった。

リルザブルチニブに関連した病理組織学的所見は雌のみで認められ、その所見は、500 mg/kg 群の雌 5 匹中 4 匹での、近傍の神経網（脳実質）への軽微な浸潤を伴った、髄膜及び血管周囲腔の可逆的な好中球浸潤（軽微から軽度）であった。0 及び 500 mg/kg 群の雌の脳をフルオロジェード B 染色したところ、神経変性性変化は認められなかった。IBA-1 IHC による検査で、脳の脳室（側脳室及び第三脳室）周囲領域の小膠細胞分布パターンに、媒体対照群と比較した被験物質関連の差が認められた。IBA-1 発現パターンの差が、雌で 150 mg/kg 以上、雄で 500 mg/kg に認められた。IBA-1 発現の差は、投与後回復期間中に回復性のエビデンスを示した。小膠細胞分布の変化は毒性ではないと考えられた。

全身曝露量（最高血漿中濃度［C_{max}］及び投与開始［時間 0］から最終濃度測定可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積［AUC_{last}］）に性差が認められ、雌の曝露量は雄の約 2.0～4.1 倍であった。50、150 及び 500 mg/kg の用量での 1 日目におけるリルザブルチニブの平均 C_{max} 値は、雄でそれぞれ 345、828 及び 812 ng/mL、雌でそれぞれ 1400、2300 及び 3350 ng/mL であった。50、150 及び 500 mg/kg の用量での 1 日目におけるリルザブルチニブの平均 AUC_{last} 値は、雄でそれぞれ 1070、5860 及び 10300 ng•h/mL、雌でそれぞれ 3510、11900 及び 32000 ng•h/mL であった。

500 mg/kg 群の雄及び 150 mg/kg 以下の群の雌では、リルザブルチニブに関連した毒性所見は認められなかった。

2.2 非げっ歯類

2.2.1 ビーグル犬を用いた単回経口投与毒性試験

ビーグル犬（1 群雌雄各 5 匹、7～11 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg の用量で単回強制経口投与した（DVR0179 試験 [表 2.6.7.5]）。1 群雌雄各 3 匹を投与 2 日後に剖検し（3 日目、終了時安楽殺）、残りの 1 群雌雄各 2 匹を投与 14 日後に剖検した（15 日目、回復期間安楽殺）。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、体重変化、摂餌量、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。TK 評価のため、1 日目に血液検体を採取した。

死亡は認められなかった。リルザブルチニブに関連した嘔吐が、大多数のイヌ（雄 15 匹中 12 匹、雌 15 匹中 13 匹）で投与 15～60 分後に認められたが、毒性ではないと考えられた。体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査及び血液生化学的検査）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査では、リルザブルチニブに関連した変化は認められなかった。

150 mg/kg 以上で全身曝露量に性差が認められ、雌の曝露量の方が高かった。50、150 及び 500 mg/kg 群での 1 日目における平均 C_{max} 値は、雄で 566、485 及び 606 ng/mL、雌で 448、1990 及び 998 ng/mL であった。50、150 及び 500 mg/kg 群での 1 日目における平均 AUC_{last} 値は、雄で 1460、1250 及び 1770 ng•h/mL、雌で 902、8580 及び 6120 ng•h/mL であった。リルザブルチニブの血漿中曝露量は、評価した用量範囲を通して、用量比を下回って増加した。

500 mg/kg までの用量で、リルザブルチニブに関連した毒性所見は認められなかった。

3　反復投与毒性試験（サポート的 TK 評価を含む）

3.1　げっ歯類

3.1.1　ラットを用いた 13 日間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ビスメシラート塩は DS として開発されておらず、リルザブルチニブの臨床試験で使用する予定がなかったため、この試験は重要な試験以外の試験と判断される。この試験で認められた毒性の性質は、ほぼメシラート含量及び酸性の pH に帰するものであった。リルザブルチニブの遊離塩基では、同様の毒性は認められていない。

Wistar Han ラット（1 群雌雄各 10 匹、9～10 週齢）に、リルザブルチニブのビスメシラート塩を、雄には 0（媒体対照）、150、500 又は 1000 mg/kg/日、雌には 0、50、150 又は 500 mg/kg/日の用量で、28 日間強制経口投与する計画であった（DVR0175 試験 [表 2.6.7.6]）。死亡が認められたため、生存する 1000 mg/kg/日群の雄及び 500 mg/kg/日群の雌の全例を、それぞれ 5 及び 6 日目に安楽殺し、対照群並びに低及び中用量群の投与期間を 13 日に短縮した。投与回数は、対照群、50 mg/kg/日群（雌）、150 mg/kg/日群（雌雄）及び 500 mg/kg/日群（雄）では 13 回、1000 mg/kg/日群（雄）では 3 回、500 mg/kg/日群（雌）では 5 回であった。別の 1 群雌雄各 5 匹のラットを最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性を検討した。高用量群では回復性を評価しなかった。さらに別の雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 9 匹からなる 3 群のラット（リルザブルチニブ群）をおき、1 及び 13 日目に TK 評価用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。脳の IBA-1 IHC（小膠細胞の検出）を、対照群、中用量群（雄は 500 mg/kg/日、雌は 150 mg/kg/日）及び高用量群（雄は 1000 mg/kg/日、雌は 500 mg/kg/日）のラットで投与期間終了時に、中用量群のラットで回復期間終了時に、それぞれ実施した。

死亡／病的状態が、500 mg/kg/日群（雄 1 匹、雌 6 匹）及び 1000 mg/kg/日群（雄 13 匹）で認められた。500 mg/kg/日では、主試験の雌 1 匹で 4 日目に、主試験の雌 2 匹及び TK 用雌 1 匹で 5 日目に、TK 用雌 2 匹で 6 日目に、それぞれ死亡が発見され、TK 用雄 1 匹で 10 日目に死亡が発見された。1000 mg/kg/日では、主試験の雄 3 匹及び TK 用雄 1 匹で 3 日目に、主試験の雄 3 匹及び TK 用雄 4 匹で 4 日目に、それぞれ死亡が発見され、主試験の雄 2 匹が 4 日目に瀕死安楽殺に至った。

雄におけるリルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、鼻／鼻孔周囲の汚れが 150 mg/kg/日以上で、削痩が 500 mg/kg/日で、毛繕い低下、クラックル音（呼吸時）、体表湿潤及び立毛が 500 mg/kg/日以上で、脱水、冷触感、努力性呼吸／呼吸困難、活動性低下及び口周囲湿潤が 1000 mg/kg/日で、それぞれ認められた。雌におけるリルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、

クラックル音（呼吸時）及び鼻／鼻孔周囲の汚れが 150 mg/kg/日以上で、脱水、毛繕い低下、体表湿潤、削痩及び立毛が 500 mg/kg/日で、それぞれ認められた。回復期間中、毛繕い低下及び体表湿潤が 500 mg/kg/日群の雄でみられたが、雌では所見が認められなかった。50 mg/kg/日群の雌では、一般状態の変化は認められなかった。一過性の体重減少（-8%）が 500 mg/kg/日群の雄で認められた。一過性の摂餌量減少が、500 mg/kg/日群の雄（-25%）及び 150 mg/kg/日群の雌（-9%）で認められた。

500 mg/kg/日群の雄でのリン濃度増加を除いて、リルザブルチニブに関連した臨床検査パラメータの変化は認められなかった。

出血及び／又はうっ血に関連する肉眼所見の赤色巣又は変色（メシラート塩に固有の所見）が、死亡又は安楽殺に至った高用量群のラットの多くで、多数の組織に認められた。雄は 500 mg/kg/日以上、雌は 500 mg/kg/日で、多くは白色巣と記載された所見が胃の非腺胃部に認められた。高用量群の多数例及び 500 mg/kg/日群の雄の少数例で、胃の出血、炎症及び潰瘍形成がみられ、その多くは非腺胃部粘膜に認められた。非腺胃部粘膜の扁平上皮過形成／上皮増殖も認められた。胃の変化は被験物質関連の刺激作用に一致していた。

雄におけるリルザブルチニブ関連の器官重量の変化として、肝臓及び精巣の重量増加が 150 mg/kg/日以上で、脾臓及び胸腺の重量減少が 500 mg/kg/日以上で、甲状腺重量増加が 1000 mg/kg/日で、それぞれ認められた。雌では、肝臓及び甲状腺の重量増加並びに胸腺重量減少が 500 mg/kg/日で認められた。回復期間終了時には、被験物質関連の器官重量の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的変化の多くは、試験の 1 週目に死亡又は安楽殺に至った高用量群のラットで認められた。高用量群で認められた更なる変化の内訳は、死亡した雌 2 匹での脳髄膜、脈絡叢及び脳実質の好中球性炎症（軽微）、副腎皮質のうっ血／出血（雌雄各 1 匹では限局性変性／壊死）、雄 2 匹での精巣上体の精子減少及び細胞残屑を伴った軽微から軽度の精細管変性、胸骨骨髄の赤血球系細胞減少、心筋線維変性／壊死の発現率上昇、肝臓の変化である軽微な小葉中心性肝細胞肥大（500 mg/kg/日群の雄 1 匹でも認められた）、軽度の門脈周囲空胞化（雄 6 匹）、変性／壊死（雄 2 匹）及び急性炎症（雄 2 匹）であった。高用量群で認められたリンパ系組織の変化の内訳は、リンパ節の可染小体マクロファージ増加、並びにパイエル板、脾臓の白脾髄、胸腺皮質及び胸腺髄質のリンパ球減少であった。500 mg/kg/日群の雄で、胸腺の皮質及び髄質のリンパ球減少、並びに脾臓の白脾髄のリンパ球減少が認められた。リルザブルチニブ関連の病理組織学的変化は、いずれも回復期間終了時には認められなかった。

IBA-1 の免疫組織化学的染色（IHC）により、側脳室及び第三脳室における軽微から軽度の小膠細胞増加が、中及び高用量群の雌雄で認められた。染色パターンにより、回復期間中の回復性が示された。小膠細胞発現の変化は毒性ではないと判断されたことから、低用量群の雌雄での評価は実施しなかった。

TK パラメータを表 3 に要約する。

表 3 - 13-Day repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib [a] (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 13	Day 1	Day 13
50	F	1420	1520	4650	4000
150	M	986	1480	8760	7260
	F	2010	3020	10200	13400
500	M	897	2900	11800	28500
	F	2930	ND	31400	ND
1000	M	1030	ND	16900	ND

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; ND: No data

a Bis mesylate salt form

死亡、体重減少及び病理組織学的所見に基づくと、リルザブルチニブのビスメシラート塩の NOAEL は 150 mg/kg/日と判断された。この用量での 13 日目の C_{max} 及び AUC_{last} は、雄でそれぞれ 1480 ng/mL 及び 7260 ng•h/mL、雌でそれぞれ 3020 ng/mL 及び 13400 ng•h/mL であった。

3.1.2 ラットを用いた探索的 2 週間経口投与用量設定毒性試験

Wistar Han ラット（1 群雌雄各 5 匹、6～8 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg/日の用量で 14 日間強制経口投与した（DVR0172 試験 [表 2.6.7.6]）。別の雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 6 匹（リルザブルチニブ群）のラットをおき、1 及び 14 日目にリルザブルチニブの TK 評価用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。また、脳組織については、フルオロジェード B 染色（神経変性の検出）及び IBA-1 IHC 発現（小膠細胞の検出）による評価も実施した。

リルザブルチニブに関連する死亡は認められなかった。雌におけるリルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、毛繕い低下が 150 mg/kg/日以上で、鼻／鼻孔及び口周囲の汚れ及び湿潤、並びに脱水が 500 mg/kg/日で、それぞれ認められた。雄では一般状態の変化は認められなかった。体重増加量及び摂餌量が一過性に減少したことによる体重減少が、試験 1 週目に 500 mg/kg/日群の雌で認められた。雄では、被験物質関連の体重及び摂餌量の変化は認められなかった。

臨床検査及びフローサイトメトリーのパラメータには、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。被験物質関連の器官重量の変化として、脾臓及び胸腺の重量減少が 500 mg/kg/日群の雄で、肝臓重量の増加が 500 mg/kg/日群の雌雄で、それぞれ認められた。

被験物質関連の病理組織学的所見として、肝細胞肥大（軽微、びまん性）が 500 mg/kg/日で認められた。500 mg/kg/日群の雄での更なる病理組織学的所見として、リンパ球減少が脾臓の白脾髄（軽微）及び胸腺皮質（軽微）に認められた。リルザブルチニブ関連の IBA-1 染色増加が、雌は 150 mg/kg/日以上、雄は 500 mg/kg/日で、側脳室及び第三脳室（雄：軽微から軽度、雌：軽微から中等度）に、150 mg/kg/日群の雌 1 匹で神経網（軽微、びまん性）に、それぞれ認められた。H&E 及びフルオロジェード B 染色した脳切片において、神経変性性変化の所見は認められなかった。小膠細胞発現の変化は毒性ではないと考えられた。

TK パラメータを表 4 に要約する。14 日目におけるリルザブルチニブの全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は、1 日目の値と比較して 2 倍未満の増加を示した。性差が認められ、雌の曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は、おおむね雄の 2.1～4.5 倍であった。

表 4 - Exploratory 2-week repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 14	Day 1	Day 14
50	M	183	357	487	965
	F	737	829	2170	2160
150	M	314	666	2680	3620
	F	1190	1400	6360	10300
500	M	628	1060	6290	10200
	F	1930	3210	19900	37900

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

以上、観察されたリルザブルチニブ関連の変化は一過性で、重症度が軽微であったことから、評価した最高用量の 500 mg/kg/日は限界用量ではないと考えられた。500 mg/kg/日での 14 日目の C_{max} は雄で 1060 ng/mL、雌で 3210 ng/mL、AUC_{last} は雄で 10200 ng•h/mL、雌で 37900 ng•h/mL であった。

3.1.3 ラットを用いた 1 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Wistar Han ラット（1 群雌雄各 10 匹、8～9 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg/日の用量で、28 日間（雄）及び 29 日間（雌）、強制経口投与した（DVR0174 試験 [表 2.6.7.7 A]）。別の 1 群雌雄各 5 匹のラットを最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性評価用とした。さらに別の雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 9 匹（リルザブルチニブ群）のラットをおき、1 及び 26 日目にリルザブルチニブの TK 評価用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖

検、器官重量及び病理組織学的検査とした。また、脳について、フルオロジェードB染色（神経変性の検出）及びIBA-1 IHC発現（小膠細胞の検出）による評価を実施した。

リルザブルチニブ関連の死亡及び一般状態の変化は認められなかった。被験物質関連の体重増加量減少（雄：-17%、雌：-31%）が500 mg/kg/日で認められた。一過性の摂餌量減少が500 mg/kg/日で認められた。

リルザブルチニブ関連の眼科学的所見は認められなかった。

血液学的検査パラメータには、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブに関連した活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）短縮が150 mg/kg/日以上で雌にみられたが、回復性試験群では認められなかった。150 mg/kg/日での変化は小さく対照範囲内であり、500 mg/kg/日での平均変化は雌1匹に起因するもので、著しい血液学的変化は認められなかったことから、APTTの変化は毒性ではないと考えられた。無機リンの可逆的増加が500 mg/kg/日で認められた。尿検査パラメータには被験物質関連の変化は認められなかった。総Tリンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーTリンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性Tリンパ球（$CD3^+CD8a^+$）、B細胞（$CD3^-CD45RA^+$）及びナチュラルキラー（NK）細胞（$CD3^-CD161a^+$）には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。器官重量の変化（絶対及び補正）として、肝臓重量増加が雄は150 mg/kg/日以上、雌は500 mg/kg/日で認められた。肝臓重量増加に伴う病理組織学的所見として、肝細胞肥大（軽微）が500 mg/kg/日で一部のラットに認められた。更なる器官重量の変化として、精巣上体及び脾臓の重量減少、並びに腎臓重量の増加が500 mg/kg/日でみられたが、関連する病理組織学的所見は認められなかったことから、毒性ではないと考えられた。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見が肝臓、頸部リンパ節及び胸腺に認められた。所見として、雄は150 mg/kg/日以上、雌は500 mg/kg/日で小葉中心性肝細胞肥大（軽微）が認められた。500 mg/kg/日では、頸部リンパ節の濾胞数減少（軽微から軽度）及び胸腺の可染小体マクロファージ数増加（雄）が認められた。回復期間終了時に病理組織学的変化は認められなかった。

側脳室及び第三脳室周囲のリルザブルチニブに関連したIBA-1 IHC発現上昇（軽微から軽度）が、雄は150 mg/kg/日以上、雌は50 mg/kg/日以上で、投与期間終了時に認められた。500 mg/kg/日群の雌5匹では、視交叉又はその近傍における髄膜に軽微なIBA-1発現上昇が認められた。脳室周囲のIBA-1発現の分布は側脳室周囲では均等ではなく、その発現は脳室の外側面（脳室上衣下胚層）でより顕著であった。回復期間終了時には同様のIBA-1変化は認められなかった。投与期間及び回復期間の終了時にH&E及びフルオロジェードB染色した脳切片では、リルザブルチニブ関連の炎症及び神経変性性変化は認められなかった。小膠細胞発現の変化は毒性ではないと考えられた。

TKパラメータを表5に要約する。50～500 mg/kg/日の用量範囲全体で、リルザブルチニブのC_{max}は用量比を下回って増加したのに対し、AUC_{last}値はおおむね用量に比例して増加した。50、150及び500 mg/kg/日群の1日目の平均C_{max}到達時間（t_{max}）値は、雄でそれぞれ0.50、1.0及び1.0時間、雌でそれぞれ0.50、1.0及び0.50時間であった。50、150及び500 mg/kg/日群の26日目の平均t_{max}値は、雄でそれぞれ0.50、1.0及び1.0時間、雌でそれぞれ0.50、0.50及び1.0時間であった。雌のC_{max}は雄

の 1.7～3.1 倍であり、雌の AUC_{last} は雄の 1.7～2.7 倍であったことから、リルザブルチニブの曝露量には明らかな性差が認められた。

表 5 - 1-Month repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 26	Day 1	Day 26
50	M	464	602	1350	1540
	F	796	1650	2650	3490
150	M	659	1450	4990	5420
	F	1970	3460	12400	13600
500	M	1020	2350	12200	23200
	F	3190	4270	27900	39900

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

以上、リルザブルチニブを Wistar Han ラットに 4 週間連日強制経口投与したときの NOAEL は 500 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 26 日目の C_{max} 値は雄で 2350 ng/mL、雌で 4270 ng/mL であり、AUC_{last} 値は雄で 23200 ng•h/mL、雌で 39900 ng•h/mL であった。

3.1.4 ラットを用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Wistar Han ラット（1 群雌雄各 10 匹、7 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg/日の用量で、91 日間（雄）及び 92 日間（雌）、強制経口投与した（DVR0207 試験 [表 2.6.7.7 B]）。別の 1 群雌雄各 5 匹を最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性評価用とした。さらに別の雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 12 匹（リルザブルチニブ群）のラットをおき、1 及び 91/92 日目にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用の血液検体を採取した。リルザブルチニブ TK 群では、1 群雌雄各 3 匹の余剰ラットを含めて投与を開始し、被験物質曝露量を求めるための検体を 1 及び 2 日目に採取した後、動物を間引いて 1 群雌雄各 9 匹とした。ラットがん原性試験でリルザブルチニブ関連の甲状腺濾胞細胞腺腫／癌の発現率上昇がみられた後（5.2.1 項、1281-18051 試験 [表 2.6.7.10 A]）、この試験で採取した全ての甲状腺組織について更なる病理組織学的検査を実施し、最終報告書改訂版に含まれる追加報告書に詳述した（DVR0376 試験 [表 2.6.7.7 C]）。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。また、脳について、フルオロジェード B 染色（神経変性の検出）、ビルショウスキー銀染色（軸索、樹状突起及びその他のニューロフィラメント含有神経細胞突起の視覚化）、IBA-1 IHC 発現（小膠細胞の検出）及び GFAP IHC 発現（星状膠細胞の検出）

による評価を実施した。投与期間終了時に安楽殺した 0 及び 500 mg/kg/日群のラットから採取した脊髄も、フルオロジェード B 染色を用いて評価した。

リルザブルチニブ関連の死亡は認められなかった。一般状態の変化は、50 mg/kg/日以上での口及び鼻孔周囲の湿潤又は汚れのみであった。500 mg/kg/日群の雌雄で体重増加量減少がみられたため、投与期間終了時の体重には、対照群と比較して、雄で約 26%、雌で約 11%の減少が認められた。500 mg/kg/日で一過性の摂餌量減少が認められた。

リルザブルチニブ関連の眼科学的所見は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。リルザブルチニブ関連の APTT 短縮が雄は 150 mg/kg/日以上、雌は 500 mg/kg/日で認められたが、いずれの値も対照範囲内であった。唯一のリルザブルチニブ関連の血液生化学的変化として、無機リン増加が雄は 150 mg/kg/日以上、雌は 500 mg/kg/日で認められたが、対照範囲内であったことから生理的に重要でないと考えられた。尿検査パラメータにはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

雌の総 T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8a^+$）、B 細胞（$CD3^-CD45RA^+$）及び NK 細胞（$CD3^-CD161a^+$）には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。フローサイトメトリーパラメータには、リルザブルチニブ投与の影響は認められなかった。投与終了時に雄から採取した検体は、悪天候により発送が遅れたため分析できなかった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。器官重量（絶対及び／又は補正）の変化として、150 mg/kg/日以上で肝臓重量増加が、150 mg/kg/日以上（雌）で腎臓重量増加が、500 mg/kg/日で胸腺重量減少が、それぞれ認められた。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見が、500 mg/kg/日群の雄で副腎（空胞化、軽微）及び肝臓（肝細胞肥大）に、500 mg/kg/日群の雌で胸腺の皮質及び髄質（リンパ球減少、軽微）に、それぞれ認められた。リルザブルチニブ関連の肺の変化として、肺胞マクロファージ増加が 500 mg/kg/日で、肺胞腔及び細気管支内の粘液が 500 mg/kg/日群の雌 2 匹で、それぞれ認められた。細気管支内に粘液がみられたこれらの雌では、いずれも粘膜乳頭状過形成も認められ、500 mg/kg/日群の雄 1 匹では細気管支粘膜乳頭状過形成はみられたが、細気管支内粘液は認められなかった。回復期間終了時には病理組織学的所見は認められなかった。

対照群及びリルザブルチニブ投与群の全ての主試験例及び回復性試験例から採取した甲状腺を再検討した結果、被験物質関連の所見は、500 mg/kg/日群の主試験例の雌（10 匹中 7 匹）における可逆的なびまん性濾胞細胞肥大（軽微）のみであると判断された。この所見は毒性ではないと考えられた。

被験物質関連の脳の病理組織学的所見として、雌は 50 mg/kg/日以上、雄は 150 mg/kg/日以上で、IBA-1 発現上昇（軽微から軽度）が側脳室にみられ、第三脳室及び第四脳室周囲、並びに／又は視交叉近傍でより軽度に認められた。500 mg/kg/日での脳室周囲の IBA-1 発現の分布は側脳室周囲では均等ではなく、IBA-1 発現は脳室の外側面（脳室上衣下胚層）でより顕著であった。脳の脳室周囲領域での GFAP 発現（星状膠細胞数）上昇が、雌は 50 mg/kg/日以上、雄は 150 mg/kg/日以上で認められた。500 mg/kg/日群の雌 1 匹で、ごく少数の好中球が、髄膜及び神経網の血管周囲に認められた。回

復期間終了時に、50 mg/kg/日では IBA-1 及び GFAP の発現はみられなかったが、脳室周囲の IBA-1 発現（軽微）が 150 mg/kg/日群の雌 1 匹及び 500 mg/kg/日群の雄 1 匹に、脳室周囲 GFAP 発現（軽微）が、雌は 150 mg/kg/日以上、雄は 500 mg/kg/日で認められた。脳及び脊髄のフルオロジェード B 染色切片は、壊死性ニューロンに関して陰性であった。IBA-1 及び GFAP の発現は過剰ではなく、IBA-1 発現には回復性が認められ、H&E 染色、フルオロジェード B 染色及びビルショウスキー銀染色で炎症及び神経変性性の変化は認められなかったことから、IBA-1 及び GFAP の発現におけるリルザブルチニブ関連の変化は毒性ではないと考えられた。

TK パラメータを表 6 に要約する。50～500 mg/kg/日の用量範囲で、リルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の C_{max} 及び AUC_{last} は用量比を下回って増加したのに対し、AUC_{last} 値はおおむね用量に比例して増加した。1 日目の 50、150 及び 500 mg/kg/日でのリルザブルチニブの平均 t_{max} 値は、雄でそれぞれ 0.50、0.25 及び 1.0 時間、雌でそれぞれ 0.50、0.5 及び 0.50 時間であった。91/92 日目の 50、150 及び 500 mg/kg/日での平均 t_{max} 値は、雄でそれぞれ 0.50、1.0 及び 0.5 時間、雌でそれぞれ 0.50、0.50 及び 0.5 時間であった。全ての用量で、雌雄のラットにおける 91/92 日目のリルザブルチニブの血漿中 C_{max} 値は、1 日目の値と比較して 2.3 倍以内、AUC_{last} 値は 2.2 倍以内であった。全ての用量で、雌雄のラットにおける 91/92 日目の PRN618 の血漿中 C_{max} 値は、1 日目と比較して 3.7 倍以内、AUC_{last} 値は 2.5 倍以内であった。全ての用量で、雌雄における 91/92 日目の PRN834 の血漿中 C_{max} 値は、1 日目と比較して 1.9 倍以内、AUC_{last} 値は 2.4 倍以内であった。リルザブルチニブの曝露量には明らかな性差があり、雌では雄と比較して C_{max} が 2.1～3.8 倍、AUC_{last} が 1.4～3.7 倍であった。PRN618 及び PRN834 の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は雌の方が雄より高かった。

表 6 - 3-Month repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters

Dose (mg/kg/day)	**50**		**150**		**500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
			AUC_{last} (ng•h/mL)			
Rilzabrutinib						
Day 1	970	3580	4030	9270	9930	23800
Day 37	1480	3420	7780	13400	20300	32300
Day 91/92	2170	3120	8450	17000	21300	34700
PRN618						
Day 1	269	632	1270	1310	2370	2650
Day 37	434	546	1330	1450	3290	5910
Day 91/92	659	662	1730	2360	3050	6600
PRN834						
Day 1	855	3660	3540	10500	11200	19300
Day 37	1570	3390	5680	13500	16100	20600
Day 91/92	2060	4370	6650	17800	15200	24700

Dose (mg/kg/day)	50		150		500	
	C_{max} (ng/mL)					
Rilzabrutinib						
Day 1	553	1150	707	2310	1010	3100
Day 37	641	2190	952	2270	1760	4890
Day 91/92	715	2690	1400	3220	2350	5730
PRN618						
Day 1	82.0	92.0	114	172	192	206
Day 37	105	165	197	197	251	623
Day 91/92	137	189	303	282	342	764
PRN834						
Day 1	245	548	397	722	641	965
Day 37	347	722	582	1010	1340	1750
Day 91/92	450	600	745	1260	1070	1560

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

以上、リルザブルチニブを Wistar Han ラットに連日 13 週間強制経口投与したときの NOAEL は 150 mg/kg/日と判断された。500 mg/kg/日での肺の器官重量変化及び病理組織学的所見は毒性と考えられた。NOAEL での 91/92 日目の C_{max} 及び AUC_{last} 値は、雄でそれぞれ 1400 ng/mL 及び 8450 ng•h/mL、雌でそれぞれ 3220 ng/mL 及び 17000 ng•h/mL であった。

3.1.5 ラットを用いた 6 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

Wistar Han ラット（1 群雌雄各 15 匹、7 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、15、50、150 又は 300 mg/kg/日の用量で、183 日間（雄）及び 184 日間（雌）強制経口投与した（DVR0376 試験 [表 2.6.7.7 C]）。別の 1 群雌雄各 5 匹のラットを最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性評価用とした。さらに別の雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 9 匹（リルザブルチニブ群）のラットを、リルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用とし、1、89 及び 182 日目に血液検体を採取した。ラットがん原性試験でリルザブルチニブ関連の甲状腺濾胞細胞腺腫／癌の発現率上昇がみられた後（5.2.1 項、1281-18051 試験 [表 2.6.7.10 A]）、全ての甲状腺組織について更なる病理組織学的検査を実施し、最終報告書改訂版に含まれる追加報告書に詳述した（DVR0376 試験 [表 2.6.7.7 C]）。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。投与期間終了時及び投与期間中の途中剖検時に 0 及び 300 mg/kg/日群のラットから採取した脳について、フルオロジェード B 染色（神経変性の検出）及びビルショウスキー銀染色（軸索、樹状突起及びその他のニューロフィラメント含有神経細胞突起の視

覚化）、IBA-1 IHC 発現（小膠細胞の検出）及び GFAP IHC 発現（星状膠細胞の検出）による評価を実施した。また、投与期間終了時に 50 及び 150 mg/kg/日群から採取した脳について、IBA-1 及び GFAP 発現を用いた評価を実施した。

リルザブルチニブ関連の死亡が主試験の 6 匹で認められた。150 mg/kg/日群の雌 3 匹で、それぞれ 105 日目（4F165）、110 日目（4F179）及び 112 日目（4F168）に死亡が発見された。300 mg/kg/日群の雄 1 匹（5M081）で 173 日目に死亡が発見され、300 mg/kg/日群の雌 1 匹（5F185）が 182 日目に瀕死安楽殺に至り、300 mg/kg/日群の雌 1 匹（5F193）で 158 日目に死亡が発見された。150 mg/kg/日群の雌 1 匹（4F168）の死亡はリルザブルチニブに起因するものであり、死因は、脳実質近傍の軽度の好中球性炎症を伴う脳髄膜の中等度の混合細胞性炎症と関連していた可能性があるが、所見の片側分布が局部的な血管損傷に一致していたことから、確信をもってこの関連性を判断することはできなかった。他の 5 匹（4F165、4F179、5M081、5F185、5F193）の死亡はリルザブルチニブ関連と考えられたが、死因は不明であり、器官との関連はなく、4F168 でみられたような病理組織学的所見は認められなかった。

一般状態の変化として、息切れ及び口周囲湿潤が 300 mg/kg/日群の雄にみられ、呼吸時クラックル音が死亡した 300 mg/kg/日群の雄 1 匹で認められた。300 mg/kg/日群の雌 1 匹では、瀕死安楽殺の前に、一般状態の変化として、ケージ内赤色物、呼吸困難、口周囲赤色汚れ及び蒼白が認められた。150 mg/kg/日群の雌 1 匹では、死亡が発見される前に一般状態の変化として呼吸困難、口周囲赤色汚れ、蒼白及び活動性低下がみられ、回復期間終了後の計画剖検時まで生存した別の雌 1 匹では、活動性低下及び脱水が認められた。回復期間中に一般状態の変化は認められなかった。リルザブルチニブ関連の体重変化は認められなかった。統計学的有意差のない被験物質関連の体重増加量減少が、雄（-10%）及び雌（-11%）で認められた。

リルザブルチニブ関連の一貫した摂餌量の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の眼科学的所見は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の臨床検査パラメータの変化は認められなかった。

総 T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8a^+$）、B 細胞（$CD3^-CD45RA^+$）及び NK 細胞（$CD3^-CD161a^+$）を含む免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）パラメータには、リルザブルチニブに関連する変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は 4 匹の雌の途中死亡例（2 匹は 150 mg/kg/日、2 匹は 300 mg/kg/日）で消化管のみにみられ、所見は胃（拡張、腺胃及び非腺胃［前胃］粘膜の暗色部位）、食道（変色）及び十二指腸（暗色化部位）に認められた。暗色化の所見に伴って、軽度から顕著な出血が認められた。

器官重量（絶対及び補正）の変化として、重量増加が肝臓（50 mg/kg/日以上の群の雄、300 mg/kg/日群の雌）、腎臓（150 mg/kg/日以上）、甲状腺（300 mg/kg/日群の雄）、副腎及び子宮（300 mg/kg/日群の雌）に認められた。肝臓重量増加のみに、関連する病理組織学的所見（軽微な肝細胞肥大）が認められた。回復期間終了時には器官重量の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見が、脳、胃（腺胃及び非腺胃）、食道、十二指腸及び肝臓に認められた。脳の病理組織学的所見として、髄膜の混合細胞性炎症（軽微から中等度）が150 mg/kg/日（雄1匹、雌1匹）及び300 mg/kg/日（雌2匹）で、血管周囲混合細胞性炎症（軽微）が150 mg/kg/日（雌2匹）で、神経網に及ぶ好中球性炎症（軽微から軽度）が150 mg/kg/日（雌1匹）及び300 mg/kg/日（雌1匹）で、それぞれ認められた。これらの変化は回復期間終了時には認められなかった。

対照動物でみられた小膠細胞（IBA-1発現）の分布と比較して、リルザブルチニブ関連のIBA-1発現上昇（軽微から軽度）が、雌は50 mg/kg/日以上、雄は150 mg/kg/日以上で、側脳室の外側面周囲に認められ、第三脳室及び第四脳室の外側面周囲でもより軽度に認められた。脳室周囲で増加した小膠細胞（IBA-1発現）は、側脳室の外側面上の脳室上衣下胚層（予備細胞）帯にみられる小膠細胞の数及び／サイズの増加によるものであり、まれに脳室周囲全体に及ぶ場合もあった。脳の同じ部位、特に側脳室の外側面で、GFAP（星状膠細胞）発現上昇が認められた。IBA-1及びGFAPの発現上昇は、50 mg/kg/日以下の群の雄及び15 mg/kg/日群の雌には認められなかった。回復期間終了時に、IBA-1及びGFAP発現の部分的回復が認められた。H&E染色、フルオロジェードB染色及びビルショウスキー銀染色では、神経変性性変化は認められなかった。IBA-1及びGFAP発現が低度で、部分的回復性が認められたことから、小膠細胞及び星状膠細胞の変化は毒性ではないと考えられた。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見である胃の出血（軽微から中等度）が、雌は150 mg/kg/日以上、雄は300 mg/kg/日で認められた。これらの動物の一部では、食道及び／又は十二指腸の出血（中等度）も認められた。胃の出血は、腺胃筋層を中心として認められた。また、混合細胞性炎症（軽微から軽度）が150 mg/kg/日以上で雌に認められた。いずれの動物においても、出血（軽微から軽度）は最急性ないし急性であった。回復期間終了時には、胃、食道及び十二指腸の出血及び炎症は認められなかった。

被験物質関連の肝臓の所見である可逆的な肝細胞肥大（軽微）が、雄で50 mg/kg/日以上、雌で300 mg/kg/日に認められた。肝臓の肥大は毒性ではないと考えられた。

対照群及びリルザブルチニブ投与群の全ての主試験例及び回復性試験例から採取した甲状腺を再検討した結果、被験物質関連の所見は、50 mg/kg/日群の主試験例の雄（15匹中1匹）及び300 mg/kg/日群の主試験例の雌（15匹中4匹）における可逆的なびまん性濾胞細胞肥大（軽微）のみと判断された。この所見は毒性ではないと考えられた。

この試験における主要な被験物質関連の所見の要約を表7に示す。

表 7 - 6-Month repeat-dose study in rats: Main compound-related findings

Parameter	Main compound-related findings
Mortality	150 mg/kg/day: 3 F
	300 mg/kg/day: 1 M / 2 F

Parameter	Main compound-related findings
Clinical signs	150 mg/kg/day (F): decreased activity; dehydration ≥150 mg/kg/day (F): dyspnea; red staining around mouth; pallor 300 mg/kg/day: gasping (M); wetness around mouth (M); crackles during breathing (M); red material in cage (F)
Body weight	No findings
Food consumption	No findings
Ophthalmology	No findings
Clinical Pathology	**Hematology**: No findings **Coagulation**: No findings **Serum chemistry**: No findings **Urinalysis**: No findings
Immunophenotyping (flow cytometry)	No findings
Macroscopic	**Stomach** (distended; dark areas in the glandular and non-glandular mucosae); **Esophagus** (discoloration); **Duodenum** (dark areas of discoloration)
Organ weights	Increased liver (≥50 mg/kg/day males; 300 mg/kg/day F); increased kidney (≥150 mg/kg/day); thyroid (300 mg/kg/day M), increased adrenal gland, liver, and uterus (300 mg/kg/day F)
Microscopic	**Brain** (mixed cell inflammation of the meninges) for 150 mg/kg/day (M/F) and 300 mg/kg/day (F) and (neutrophilic inflammation of the neuropil) for ≥150 mg/kg/day (F), reversed during recovery; **Duodenum** (hemorrhage) for 300 mg/kg/day (F), reversed during recovery; **Esophagus** (hemorrhage) for 150 mg/kg/day (F), reversed during recovery; **Liver** (hepatocyte hypertrophy) for ≥50 mg/kg/day (M) and 300 mg/kg/day (F), reversed during recovery; **Stomach-glandular**: (hemorrhage, mixed cell inflammation) for ≥150 mg/kg/day (F) and (neutrophilic inflammation) for 300 mg/kg/day (F), reversed during recovery; **Stomach-non-glandular** (hemorrhage) for ≥150 mg/kg/day (F), reversed during recovery; **Thyroid** (follicular cell hypertrophy) for 50 mg/kg/day (M) and 300 mg/kg/day (F), reversed during recovery.
Brain stains *a*	**IBA-1** and **GFAP expression**: increased staining around lateral and 3rd and 4th ventricles for ≥50 mg/kg/day (F) and ≥150 mg/kg/day (M) Fluoro-Jade: No change Bielschowsky silver: No change

Abbreviations: F: Female; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; IBA-1: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1; M: Male

a IBA-1 expression detects microglial cells; GFAP expression detects astrocytes; Fluoro-Jade staining detects degenerating neurons; Bielschowsky silver stain examines neurite (mainly axon) integrity

TK パラメータを表 8 に要約する。TK データによると、リルザブルチニブを単回又は反復投与したときの全身曝露量の増加は用量依存的であったが、リルザブルチニブ又は代謝物（PRN618 及び PRN834）の C_{max} 及び投与開始（時間 0）から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-24}）の増加は、15 mg/kg/日から 300 mg/kg/日にかけて厳密には用量に比例しなかった。6 か月間の反復投与後に、リルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の一貫した蓄積は、ほとんど又は全く認められなかった。リルザブルチニブ及び PRN834 の曝露量には性差がみられ、雌の曝露量は雄より高かったが、PRN618 では性差は認められなかった。代謝物／未変化体比（M/P）に基づくと、リルザブル

チニブは控えめに代謝されて PRN618 となり、より大規模に代謝されて PRN834 となる。いずれの代謝物の M/P にも、用量増加又は反復投与による顕著な変化は認められなかった。

表 8 - 6-Month repeat-dose study in rats: Summary of toxicokinetic parameters

Dose (mg/kg/day)	15		50		150		300	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
				AUC_{last} (ng•h/mL)				
Rilzabrutinib								
Day 1	299	810	1300	4060	3390	14000	9530	25600
Day 89	404	909	2710	6620	5730	17600	12800	29900
Day 182	394	721	2060	5760	6860	14100	17800	27200
PRN618								
Day 1	42.8	72.6	232	313	1730	1220	1920	2350
Day 89	93.8	106	554	703	1280	1730	2140	3410
Day 182	181	153	574	766	1460	1660	2850	3950
PRN834								
Day 1	266	555	1210	3200	3980	11200	7310	18800
Day 89	423	877	2430	6140	5240	14200	10900	22100
Day 182	701	838	2140	4960	6170	12900	13700	20300
				C_{max} (ng/mL)				
Rilzabrutinib								
Day 1	109	313	458	1520	599	3190	1040	2690
Day 89	168	258	383	1600	808	3500	1570	5770
Day 182	258	304	606	2010	1170	3440	2300	4950
PRN618								
Day 1	11.3	27.4	45.7	117	122	139	144	196
Day 89	43.5	25.7	74.1	137	151	212	223	537
Day 182	77.2	38.8	122	190	202	267	403	665
PRN834								
Day 1	61.5	159	185	382	370	755	475	1050
Day 89	87.4	156	255	467	490	1080	945	1570
Day 182	132	178	289	616	454	1270	1360	1830

Abbreviations: AUC_{last} Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

以上、リルザブルチニブを Wistar Han ラットに連日 6 か月間強制経口投与したときの NOAEL は、高用量での死亡及び脳の病理組織学的所見（炎症）に基づき、雄で 150 mg/kg/日、雌で 50 mg/kg/日と判断された。IBA-1 及び GFAP 発現に関する無影響量は、雄では 50 mg/kg/日、雌では 15 mg/kg/日

であった。NOAEL での 182 日目の C_{max} 値は、雄で 1170 ng/mL、雌で 2010 ng/mL であった。NOAEL での 182 日目の AUC_{last} 値は、雄で 6860 ng•h/mL、雌で 5760 ng•h/mL であった。

3.2 非げっ歯類

3.2.1 ビーグル犬を用いた探索的 2 週間経口投与用量設定試験

ビーグル犬（1 群雌雄各 1 匹、8～10 か月齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg/日の用量で 14 日間強制経口投与した（DVR0173 試験 [表 2.6.7.6]）。全ての動物から 1 及び 14 日目に TK 解析用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、摂餌量、体重、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、心電図（ECG）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

リルザブルチニブ関連の死亡はみられず、一般状態の変化として、嘔吐及び糞便異常（軟便、下痢）が 50 mg/kg/日以上で認められた。14 日目までに、体重減少が 500 mg/kg/日群の雄（-6%）、150 mg/kg/日群の雌（-12%）及び 500 mg/kg/日群の雌（-28%）で認められた。1 日当たりの摂餌量の減少が認められたのは、150 mg/kg/日群の雌（-25%以下）及び 500 mg/kg/日群の雌（-50%以下）のみであった。500 mg/kg/日群の雌では、摂餌量減少が進行して 6～8 日目及び 10 日目には完全な無摂餌に至り、対応する身体検査所見として削痩が 13 日目に認められた。そのため、このイヌには 11～14 日目に栄養補助食品の缶詰を与えた。

血液学的検査及び血液生化学的検査で、リルザブルチニブ関連の変化が認められた。血液凝固検査及び免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）のパラメータには、被験物質関連の変化は認められなかった。リルザブルチニブ関連の血液学的変化として、網状赤血球数減少が 150 mg/kg/日以上の群の雌で、ヘマトクリット増加（57%）が 500 mg/kg/日群の雌で、それぞれ認められた。この所見は、持続的嘔吐による二次的な脱水に一致していた。また、赤血球数、ヘモグロビン、血小板数、白血球（WBC）数及び好中球数の増加が、500 mg/kg/日群の雌で認められた。血液生化学的変化として、アルカリホスファターゼ（ALP）及び ALT の濃度増加が 500 mg/kg/日群の雄で認められた。雌では、ALT 増加が 150 mg/kg/日以上でみられ、ALP 及び AST 濃度の増加、クレアチニン減少、並びに総ビリルビン（TBIL）増加が 500 mg/kg/日で認められた。

第 2 度房室ブロック、P 波開始から QRS 複合波開始までの時間（PR）延長及び Q 波開始から T 波終了までの時間（QT）/補正 QT 間隔（QTc）延長が、13 日目に 500 mg/kg/日群の雌で認められた。特筆すべきこととして、このイヌでは著しい体重減少がみられたが、これが観察された ECG の変化に果たした役割は不明であった。他の全てのイヌでは、試験を通して洞調律が維持された。心室性不整脈は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。

病理組織学的所見として、胸腺皮質の萎縮が 50 mg/kg/日群の雄（軽微）、150 mg/kg/日群の雌（軽微）及び 500 mg/kg/日群の雌雄（軽度から中等度）に、パイエル板の細胞密度低下が 150 mg/kg/日群

の雌（軽度）及び 500 mg/kg/日群の雌雄（軽度から中等度）に、それぞれ認められたのみであった。これらの所見はストレス反応による二次的変化であった可能性がある。

TK パラメータを表 9 に要約する。

表 9 - Exploratory 2-week repeat-dose study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 14	Day 1	Day 14
50	M	189	158	420	418
	F	272	199	382	317
150	M	486	815	1190	2420
	F	1440	849	7790	2130
500	M	681	3560	3570	11800
	F	4400	4160	62100	35700

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

以上、摂餌量減少及び体重減少に基づき、500 mg/kg/日は限界用量と判断され、NOAEL は 150 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 14 日目の C_{max} 及び AUC_{last} 値は、雄でそれぞれ 815 ng/mL 及び 2420 ng•h/mL、雌でそれぞれ 849 ng/mL 及び 2130 ng•h/mL であった。

3.2.2 ビーグル犬を用いた 20 日間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ビーグル犬（1 群雌雄各 3 匹、11～12 か月齢）に、リルザブルチニブのビスメシラート塩を、0（媒体対照）、30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で、20 日間（雄）及び 21 日間（雌）強制経口投与した（DVR0168 試験 [表 2.6.7.6]）。別の 1 群雌雄各 2 匹のイヌを最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性評価用とした。全ての動物から 1 及び 14 日目に TK 解析用の血液検体を採取した。

当初、この試験は 28 日間の反復投与として設計されたが、同時に実施したラット 2 週間反復投与毒性試験で毒性が認められたため（3.1.1 項、DVR0175 試験 [表 2.6.7.6]）、投与期間を 20 日間に短縮した。ここで検討したリルザブルチニブのビスメシラート塩は DS として開発されておらず、リルザブルチニブの臨床試験で使用する予定がないため、この試験は重要な試験以外の試験と考えられる。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、ECG、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。0 及び 300 mg/kg/日群から採取した脳組織について、投与期間終了時に IBA-1 IHC 発現を評価した。

リルザブルチニブ関連の死亡は発現せず、一般状態の変化として嘔吐及び糞便異常（軟便及び／又は下痢）が 30 mg/kg/日以上で認められた。平均体重及び平均摂餌量には、被験物質関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の ECG 変化は認められなかった。

血液学的検査及び血液凝固検査のパラメータには、被験物質関連の変化は認められなかった。

血液生化学的変化として、ALT 及び AST の増加が認められた。増加は 100 mg/kg/日以上で雄にみられ、統計学的に有意であったのは 300 mg/kg/日群の雄での 4 倍の ALT 増加のみであったが、毒性ではないと考えられた。回復期間終了時には変化は認められなかった。300 mg/kg/日群の雌で、投与期間終了時に平均 ALP の軽度の増加（1.8 倍）が認められた。この変化は回復期間終了時には認められなかった。

免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）及び尿検査のパラメータには、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

肉眼所見及び器官重量の変化は認められなかった。

病理組織学的所見として、肝細胞の単細胞壊死（軽度）が 300 mg/kg/日群の雄で、パイエル板の細胞密度低下（軽微から中等度）が 100 mg/kg/日以上の群の雄及び 300 mg/kg/日群の雌で、それぞれ認められたが、これらの変化は毒性ではないと考えられた。回復期間終了時には病理組織学的所見は認められなかった。脳での IBA-1 発現にはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブの t_{max} 値には用量依存性が認められなかった。30～300 mg/kg/日の用量範囲で、血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）はおおむね用量比を下回って増加した。リルザブルチニブの消失半減期は、用量及び反復投与に伴って延長した。一貫した性差は認められなかった。

TK パラメータを表 10 に要約する。

表 10 - 20-Day oral toxicity study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib [a] (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 14	Day 1	Day 14
30	M	227	291	641	690
	F	284	286	734	822
100	M	1670	935	7180	3110
	F	706	772	1310	2080
300	M	1040	1150	7480	4920
	F	2050	1490	9370	5580

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

a Bis mesylate salt form

以上、リルザブルチニブのビスメシラート塩をイヌに連日 20 日間強制経口投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 14 日目の C_{max} 及び AUC_{last} 値は、雄でそれぞれ 1150 ng/mL 及び 4920 ng•h/mL、雌でそれぞれ 1490 ng/mL 及び 5580 ng•h/mL であった。

3.2.3　ビーグル犬を用いた 1 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ビーグル犬（1 群雌雄各 3 匹、9～10 か月齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で、28 日間（雄）又は 29 日間（雌）、強制経口投与した（DVR0184 試験 [表 2.6.7.7 D]）。別の 1 群雌雄各 2 匹のイヌを最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性評価用とした。全ての動物から 1 及び 25 日目に TK 解析用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、ECG、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。投与期間終了時に 0 及び 300 mg/kg/日群から採取した脳組織について、IBA-1 IHC 発現（小膠細胞の検出）及びフルオロジェード B 染色（神経変性の検出）による評価を実施した。

リルザブルチニブ関連の死亡は発現せず、一般状態の変化として、嘔吐及び糞便異常が 30 mg/kg/日以上で、流涎が 300 mg/kg/日群の雄で、それぞれ認められた。嘔吐の発現率は被験物質関連かつ用量依存的であったが、電解質、摂餌量及びヘマトクリットの変化がみられなかったことから、糞便異常及び嘔吐はいずれも毒性ではないと考えられた。平均体重及び摂餌量には、被験物質関連の変化は認められなかった。

100 mg/kg/日以下では、リルザブルチニブ関連の眼科学的変化は認められなかった。300 mg/kg/日では、雌 1 匹で右眼の眼底にオレンジ色の反射病巣がみられ、別の雌 1 匹で両眼の視神経乳頭周囲に小型のオレンジ色病巣が認められた。これらの変化は回復期間後にも認められた。いずれの雌にも関連する病理組織学的所見は認められなかったことから、これらの眼科学的変化は毒性ではないと考えられた。

ECG パラメータにはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

尿検査及び血液凝固検査のパラメータには、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。リルザブルチニブ投与に関連した網状赤血球数減少が、全ての用量で雌雄に認められた。他にはリルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。網状赤血球数減少には用量依存性がなく、他の血液学的変化を伴わず、関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、これらの変化は毒性ではないと考えられた。300 mg/kg/日群の一部の雄で ALP、ALT 及び AST 値が増加したが、統計学的有意差は認められなかった。一部の雌で ALT 値がわずかに増加し、300 mg/kg/日群の雌で 23 日目の平均 ALT 値に対照群と比較して統計学的有意差が認められた。300 mg/kg/日群の雄での酵素値（ALP、ALT 及び AST）増加の多くは 1 匹のイヌ（4M20）に起因し、このイヌでは投与期間中及び回復期間後に著しい酵素値増加が認められた。他のイヌでは AST 値増加は認められなかった。これらの変化はリルザブルチニブ関連と考えられたが、ALP、ALT 及び AST 値の変化に伴う病理組織学的変化は認められなかったことから、毒性ではないと考えられた。

総 T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8^+$）及び B 細胞（$CD3^-CD21^+$）には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ投与に関連する異常な肉眼所見は認められなかった。リルザブルチニブ関連の可能性がある器官重量の変化として、脳重量（絶対及び補正）増加が 300 mg/kg/日群の雄にみられたが、それに伴う病理組織学的変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の可能性がある病理組織学的変化が、胸腺、パイエル板、肝臓及び骨髄にみられたが、その性質又は重症度に基づくと、いずれの所見も毒性ではないと考えられた。所見として、胸腺及びパイエル板の細胞密度低下（軽微から中等度）が 100 mg/kg/日以上で、肝臓のグリコーゲン型空胞（軽微から中等度）が 30 mg/kg/日以上で、骨髄細胞密度低下（軽微から軽度）が 100 mg/kg/日群の雄 1 匹及び 100 mg/kg/日以上の群の雌（各用量で 1 匹ずつ）で、それぞれ認められた。フルオロジェード B 染色及び IBA-1 発現により評価した脳組織において、対照群と高用量群で差は認められなかった。100 mg/kg/日群の雌 1 匹で認められた肝臓の空胞化を除いて、病理組織学的変化は完全又は部分的に回復した。

TK パラメータを表 11 に要約する。30～300 mg/kg/日の用量範囲で、リルザブルチニブの C_{max} 及び AUC_{last} は用量比を下回って増加したが、例外として 25 日目の雌の AUC_{last} 値は用量に比例して増加した。30、100 及び 300 mg/kg/日での平均 t_{max} 値は、1 日目には雄でそれぞれ 0.25、0.4 及び 0.4 時間、雌でそれぞれ 0.6、2.0 及び 0.25 時間であり、25 日目には雄でそれぞれ 0.25、1.4 及び 0.55 時間、雌でそれぞれ 0.45、0.35 及び 0.6 時間であった。全体として、曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）の性差は認められなかった。C_{max} 蓄積比は雄で 0.96～2.5 倍、雌で 0.85～1.6 倍であった。AUC_{last} 蓄積比は雄で 1.0～2.9 倍、雌で 0.46～3.1 倍であった。

表 11 - 1-Month repeat-dose study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters

Dose (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 25	Day 1	Day 25
30	M	533	514	845	870
	F	570	485	1100	942
100	M	996	1500	2150	5040
	F	916	1450	7030	3210
300	M	581	1440	1580	4550
	F	1010	1380	2450	7480

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

以上、イヌにリルザブルチニブを連日 28 日間以上強制経口投与したときの NOAEL は検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 25 日目の C_{max} 及び AUC_{last} は、雄でそれぞれ 1440 ng/mL 及び 4550 ng•h/mL、雌でそれぞれ 1380 ng/mL 及び 7480 ng•h/mL であった。

3.2.4　ビーグル犬を用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ビーグル犬（1 群雌雄各 3 匹、9～10 か月齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で、13 週間強制経口投与した（DVR0206 試験 [表 2.6.7.7 E]）。別の 1 群雌雄各 2 匹のイヌを最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性評価用とした。全ての動物から 1、37 及び 91/92 日目に、リルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 解析用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、ECG、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。0、100 及び 300 mg/kg/日群から採取した脳組織について、IBA-1 IHC 発現（小膠細胞の検出）及びフルオロジェード B 染色（神経変性の検出）による評価を実施した。

途中安楽殺の要約を表 12 に詳述する。投与期間中、100 mg/kg/日群の雌雄各 1 匹、300 mg/kg/日群の雄全例及び 300 mg/kg/日群の雌 3 匹が瀕死状態と判断されたため、人道面を考慮して安楽殺した。安楽殺に関して考慮したことは、持続的摂餌量減少、顕著な体重減少（約-20%）、栄養補助への反応欠如及び休薬日への無反応などであった。途中安楽殺に至ったいずれのイヌにおいても、リルザブルチニブに関連した体重及び摂餌量の減少以外には、臨床検査及び病理学的検査のいずれのパラメータにも、特定の被験物質関連の変化は認められなかった。

表 12 - 3-Month toxicity study in dogs: Summary of unscheduled euthanasia

Dose (mg/kg/day)	Sex	Animal No.	Day of euthanasia
100	M	3M14	59
	F	3F33	34
300	M	4M16	50
	M	4M17	38
	M	4M18	66
	M	4M19	50
	M	4M20	52
	F	4F36	50
	F	4F38	27
	F	4F40	38

Abbreviations: F: Female; M: Male

リルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、高頻度かつ用量依存的な糞便異常（下痢）及び嘔吐の所見が、30 mg/kg/日以上で認められた。被験物質関連かつ用量依存的な体重減少が、100 mg/kg/日以上で雄に、30 mg/kg/日以上で雌に、それぞれ認められた。

また、体重減少が 0 mg/kg/日群の雄 2 匹及び 30 mg/kg/日群の雌 1 匹でみられたため、これらの動物には栄養補助を行った。対照群で体重減少がみられたことから、投与群での減少がリルザブルチニブのみに起因するものか又は媒体（クエン酸）とリルザブルチニブの組合せによるものかは明らかでない。リルザブルチニブ関連の摂餌量減少が、300 mg/kg/日で雄に、100 mg/kg/日以上で雌に、それぞれ認められた。

リルザブルチニブ関連の眼科学的所見及び ECG パラメータ（定性的、定量的）の変化は認められなかった。

血液学的検査、血液凝固検査及び尿検査では、いずれのパラメータにもリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。血液生化学的変化として、ALT 及び AST 濃度増加が、100 mg/kg/日以上で 85/86 日目に認められた。また、TBIL 値増加が、100 mg/kg/日以上の群の雌で 86 日目に認められた。いずれの血液生化学的変化にも関連する病理組織学的変化はみられなかったことから、毒性ではないと考えられた。血液生化学的所見には回復性が認められた。

総 T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8a^+$）及び B リンパ球（$CD3^-CD21^+$）を含む免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）パラメータのいずれにおいても、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

被験物質関連の肉眼所見は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の器官重量の変化として、脾臓及び胸腺の重量減少が 100 mg/kg/日以上で雌に認められた。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的変化が、肝臓及びリンパ系組織に認められた。肝臓の所見として、単細胞壊死増加（軽微）が 100 mg/kg/日（雄 1 匹）及び 300 mg/kg/日（雌）にみられ、小葉中心性肝細胞空胞化（グリコーゲン蓄積に一致）及びクッパー細胞内褐色色素が 100 mg/kg/日（雌雄各 1 匹）及び 300 mg/kg/日で認められた。

30 mg/kg/日以上で、リンパ系組織の変化（リンパ球減少）が、リンパ節の胚中心、腸のパイエル板及び胸腺に認められた。30 mg/kg/日での病理組織学的所見は、軽微な重症度、低い発現率及び／又は対照群での発現により、毒性ではないと考えられた。病理組織学的変化（100 mg/kg/日群の雌 1 匹での単発的で軽微な小葉中心性肝細胞空胞化を除く）は、いずれも回復期間終了時に回復が認められた。

IBA-1 IHC 発現にはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。0、100 及び 300 mg/kg/日群の多数例で、少数の IBA-1 陽性細胞（軽微）が、脳内の様々な部位（小脳、脳梁、髄質）で限局性にみられたが、IBA-1 発現部位には一貫した被験物質関連の変化は認められなかった。フルオロジェード B 染色のパターン及び強度には、対照群と比較してリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

TK パラメータを表 13 に要約する。リルザブルチニブ及び PRN618 の平均 t_{max} 値には、用量又は投与日数との関連は認められなかった。全体として、リルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は、30～300 mg/kg/日の用量範囲で用量比を下回って増加した。リルザ

ブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は全体として雌の方が雄より高く、1 日目と比較した 91/92 日目の値の増加は、おおむね 2.2 倍以下であった。

表 13 - 3-Month toxicity study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters

Dose (mg/kg/day)	30		100		300	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
			AUC_{last} (ng•h/mL)			
Rilzabrutinib						
Day 1	985	821	1500	5530	2170	12100
Day 37	1350	903	3230	6160	14700	4190
Day 91/92	1070	1040	1980	4410	ND	7350
PRN618						
Day 1	1130	1150	1400	5490	2710	8910
Day 37	1940	1270	3370	6660	14700	5190
Day 91/92	1360	1740	3120	5520	ND	7860
PRN834						
Day 1	997	1590	2030	6530	3940	14900
Day 37	1660	1430	6340	13400	29100	9380
Day 91/92	1370	1710	3860	7170	ND	11400
			C_{max} (ng/mL)			
Rilzabrutinib						
Day 1	575	365	441	1280	718	1730
Day 37	591	444	844	918	2480	1140
Day 91/92	592	484	736	1670	ND	1780
PRN618						
Day 1	401	273	286	800	452	871
Day 37	481	364	537	636	1380	749
Day 91/92	414	491	491	845	ND	858
PRN834						
Day 1	166	215	249	592	411	1270
Day 37	234	196	761	1070	2130	1090
Day 91/92	192	242	433	686	ND	923

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; ND: No data

以上、リルザブルチニブをイヌに連日 13 週間強制経口投与したときの NOAEL は、雄では 30 mg/kg/日と判断されたが、雌では決定できなかった。リルザブルチニブに関連した 20%以上の体重減少、栄養補助及び休薬日を必要とする摂餌量減少、人道的安楽殺及び／又は病理組織学的変化が、

雄では 100 mg/kg/日以上、雌では 30 mg/kg/日以上で認められた。雄の NOAEL での 91/92 日目の C_{max} 及び AUC_{last} 値は、それぞれ 592 ng/mL 及び 1070 ng•h/mL であった。

3.2.5 ビーグル犬を用いた探索的 12 週間カプセル経口投与ブリッジング試験

この試験の目的は、リルザブルチニブをカプセルで投与したときの忍容性及び全身曝露量を、先に実施したイヌ 3 か月間試験（3.2.4 項、DVR0206 試験 [表 2.6.7.7 E]）で強制経口投与により得られた忍容性及び曝露量と比較することであった。この比較を用いて、9 か月間反復投与毒性試験（3.2.6 項、DVR0377 試験 [表 2.6.7.7 F]）での投与方法を決定することとした。ビーグル犬（1 群雌雄各 4 匹、11～16 か月齢）に、カプセルに充填したリルザブルチニブの遊離塩基を、30 又は 50 mg/kg/日の用量で 12 週間経口投与した（DVR0301 試験 [表 2.6.7.6]）。この試験の媒体として、[redacted]を 1：1：3（w:w:w）の比率で使用した。全ての動物から、TK 解析用の血液検体を 1、55 及び 83 日目に採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量及び臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査）とした。

リルザブルチニブ関連の死亡は発現しなかった。散発的な一般状態の変化として、嘔吐が雄は 50 mg/kg/日、雌は 30 mg/kg/日以上で、糞便異常（全体／下痢）が 30 mg/kg/日以上で、流涎増加が 50 mg/kg/日で、それぞれ認められた。

50 mg/kg/日群の雌 2 匹で、試験前体重と比較したリルザブルチニブ関連の体重減少（-15%～-18%）が認められた。摂餌量減少が 50 mg/kg/日群の雌 1 匹で認められた。

被験物質関連の血液学的変化は、30 mg/kg/日以上での WBC 数及び絶対好酸球数増加、並びに 30 mg/kg/日以上の群の雌での絶対好中球数及び単球数増加のみであった。リルザブルチニブ関連の血液学的変化は、いずれも対照範囲内であった。リルザブルチニブ関連の ALT 増加が 50 mg/kg/日で認められた。

TK パラメータを表 14 に要約する。リルザブルチニブへの全身曝露が単回及び反復経口投与後に認められた。30～50 mg/kg/日の用量範囲での t_{max} 値は 2 時間未満であり、用量依存性が認められた。全体として、血漿中 C_{max} 及び AUC_{last} 値は、雄では用量比を下回って増加したが、雌では用量比を上回って増加した。84 日目の値を 1 日目の値と比較すると、リルザブルチニブの血漿中曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）の増加はおおむね 2 倍未満であった。

表 14 - 12-Week repeat-dose study in dogs: Summary of toxicokinetic parameters

Dose (mg/kg/day)	30		50	
Sex	M	F	M	F
	AUC_{last} (ng•h/mL)			
Day 1	1690	1100	2030	3820
Day 56	1880	1240	3030	5420
Day 84	3000	1080	2860	5640

Dose (mg/kg/day)	30		50	
	C_{max} (ng/mL)			
Day 1	583	383	601	1190
Day 56	793	498	1100	1420
Day 84	1310	430	858	1570

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

リルザブルチニブを 13 週間強制経口投与（DVR0206 試験 [表 2.6.7.7 E]）又は 12 週間カプセル投与（DVR0301 試験 [表 2.6.7.6]）したときの平均 AUC_{last} 値を表 15 に要約する。リルザブルチニブを強制経口投与した 3 か月間反復投与毒性試験（DVR0206 試験 [表 2.6.7.7 E]）と比較して、リルザブルチニブを 30 及び 50 mg/kg/日の用量でカプセル投与したときの曝露量（AUC_{last}）は、30 及び 100 mg/kg/日の用量で強制経口投与したときの値と同程度であった。カプセルを用いたリルザブルチニブの投与に伴って、嘔吐及び糞便異常（下痢、粘液便、軟便）がみられたが、嘔吐及び糞便異常の発現率は、3 か月間反復投与毒性試験（DVR0206 試験 [表 2.6.7.7 E]）でリルザブルチニブを強制経口投与したときと比較して低下した。また、重度の体重減少による途中安楽殺がなかったことから、カプセル DP の忍容性は液体 DP より良好であることが示された。

表 15 - Mean rilzabrutinib AUC_{last} in dogs: Comparison of capsule and oral gavage administration

Study	Dose (mg/kg/day) [a]			
	30	50	100	300
3-month oral gavage (DVR0206) [b]	1028	ND	3802	8102 [c]
12-Week capsule (DVR0301) [d]	1665	3800	ND	ND

Abbreviation: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; ND: No data; TK: Toxicokinetics

a AUC values (ng•h/mL) were determined by combining the AUC_{last} mean values (male and female) of all sampling periods within each respective study.

b DVR0206: TK sampling periods: Days 1, 37, and 91/92

c No data available for Day 91/92 males.

d DVR0301: TK sampling periods: Days 1, 56, and 84

3.2.6 ビーグル犬を用いた 9 か月間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

ビーグル犬（1 群雌雄各 5 匹、7～8 か月齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、カプセルを用いて 0（媒体対照）、15、30 又は 50 mg/kg/日の用量で 274 日間（雄）及び 275 日間（雌）経口投与した（DVR0377 試験 [表 2.6.7.7 F]）。この試験の媒体として、[redacted] を 1：1：3（w:w:w）の比率で使用した。別の 1 群雌雄各 3 匹のイヌを最終投与後 4 週間飼育し、被験物質関連の変化がみられた場合の回復性評価用とした。全ての動物から 1、127 及び 273 日目にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 解析用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、ECG、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。0 及び 50 mg/kg/日群のイヌから採取した脳組織について、IBA-1 IHC 発現（小膠細胞の検出）を評価した。

50 mg/kg/日群の雄 1 匹（4M30）で過剰な体重減少（-20%超）、食欲不振及び身体状態悪化が認められたため、53 日目に人道的配慮により安楽殺した。病理組織学的所見として、肝細胞空胞化（中等度）及びクッパー細胞色素（軽度）が認められた。この安楽殺の結果として、50 mg/kg/日群では雄 2 匹のみが回復性試験に割り当てられた。

毒性ではないと考えられたリルザブルチニブ関連の用量依存的な一般状態の変化が、全ての群で認められた。一般状態の変化として、糞便異常、嘔吐及び皮膚紅斑（雌で耳に局所的にみられたが、リルザブルチニブ関連ではないと考えられた）が認められた。回復期間中はリルザブルチニブ関連の一般状態の変化は認められなかった。

投与期間終了時に、平均体重減少が 50 mg/kg/日群の雄（-9%）及び雌（-18%）で認められ、これらの動物の一部（雄 4 匹、雌 3 匹）に対しては、栄養補助を投与期間中に 1 回以上実施した。
30 mg/kg/日以下では群平均体重の差は認められなかった。回復期間中に全ての被験物質投与群で体重増加が認められたが、50 mg/kg/日では引き続き低値であった。50 mg/kg/日で投与期間中に平均摂餌量減少が認められた。30 mg/kg/日以下の用量では摂餌量の一貫した差は認められなかった。回復期間中の平均摂餌量は、雄では対照群と同程度であったが、雌では引き続き減少が認められた。

眼科学的検査及び ECG パラメータ（定性的、定量的）には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

血液学的検査、血液凝固検査及び尿検査のパラメータには、被験物質関連の変化は認められなかった。

血液生化学的変化として、ALT 及び AST 値の増加が 50 mg/kg/日で認められた。AST 及び ALT の増加に伴って病理組織学的所見が認められたため、毒性と考えられた。15 mg/kg/日以上で雌に ALP 値増加がみられたが、ALP 値の変化は背景対照値を超えるものではなかった。グルコース値の減少が 50 mg/kg/日で雌に認められた。回復期間後には差が認められなかったことから、これらの変化の回復性が示された。

総 T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8a^+$）及び B リンパ球（$CD3^-CD21^+$）を含む免疫フェノタイピング（フローサイトメトリー）パラメータには、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見及び器官重量の変化は認められなかった。

病理組織学的所見として、肝臓のクッパー細胞肥大（軽微から軽度）が雌は 30 mg/kg/日以上、雄は 50 mg/kg/日で、クッパー細胞色素増加（雌雄とも軽微から軽度）が 50 mg/kg/日で、それぞれ認められた。胃の粘膜萎縮を伴った上皮内リンパ球増加（軽度）が、50 mg/kg/日で雄に認められた。回復期間終了時に、クッパー細胞色素を除く全ての病理組織学的所見は回復していた。

IBA-1 IHC の発現及び脳内分布には、0 mg/kg/日群と 50 mg/kg/日群の間でリルザブルチニブ関連の差は認められなかった。限局性 IBA-1 発現の頻度増加が 50 mg/kg/日で雄にみられたが、重症度は対照と同程度であり、限局性発現の部位はランダムで、脳内のいかなる特定の部位との関連も認められなかった。したがって、限局性 IBA-1 発現は被験物質関連ではないと考えられた。

この試験における主要な被験物質関連の所見の要約を表 16 に示す。

表 16 - 9-Month repeat-dose study in dogs: Main compound-related findings

Parameter	Main compound-related findings
Mortality	50 mg/kg/day: 1 M
Clinical signs	≥15 mg/kg/day: stool changes, emesis, and skin erythema (noted focally on the ear and not considered rilzabrutinib-related in female).
Body weight	50 mg/kg/day: decreased male (-9%) and female (-18%) mean body weights
Food consumption	50 mg/kg/day: decreased
ECG	No findings
Ophthalmology	No findings
Clinical Pathology	**Hematology**: No findings
	Coagulation: No findings
	Serum chemistry: ≥15 mg/kg/day: increased ALP (F); 50 mg/kg/day: increased ALT (M/F), increased AST (M/F), and decreased glucose (F), reversed during recovery.
	Urinalysis: No findings
Immunophenotyping (flow cytometry)	No findings
Macroscopic	No findings
Organ weights	No findings
Microscopic	**Liver** (Kupffer cell hypertrophy) for ≥30 mg/kg/day (F) and 50 mg/kg/day (M), reversed during recovery and (increased Kupffer cell pigment) for 50 mg/kg/day (M/F), did not reverse; **Stomach** (increased intraepithelial lymphocytes with mucosal atrophy) for 50 mg/kg/day (M), reversed during recovery.
Brain stains [a]	**IBA-1 expression**: no findings

Abbreviations: ALP: Alkaline phosphatase; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ECG: Electrocardiogram; F: Female; IBA-1: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1; M: Male

a IBA-1 expression detects microglial cells

TK パラメータを表 17 に要約する。リルザブルチニブの単回及び反復投与後に用量依存的な全身曝露量増加がみられ、雌雄の t_{max} 値は、1 日目には 0.84～1.4 時間、127 日目には 0.94～3.3 時間、273 日目には 0.94～2.9 時間であった。全体として、リルザブルチニブの平均 C_{max} 及び AUC_{last} の増加には一貫した用量比例性はみられず、1、127 及び 273 日目の用量比例性には 15～50 mg/kg/日の用量でばらつきが認められた。9 か月間反復投与後に、リルザブルチニブ及び代謝物 PRN618 の蓄積はほとんど又は全く認められなかった。30 及び 50 mg/kg/日で代謝物 PRN834 が蓄積した可能性があり、雌雄での蓄積比は、127 日目には 0.89～1.8、273 日目には 0.86～2.1 であった。全体として、リルザブ

ルチニブの平均 C_{max} 及び AUC_{last} は雌の方が雄より高く、15 mg/kg/日では 2 倍以上、30 及び 50 mg/kg/日では 1.1～1.9 倍の差が認められた。M/P に基づくと、リルザブルチニブはイヌで大幅に代謝されて PRN618 及び PRN834 になる。いずれの代謝物の M/P にも、用量増加又は反復投与による顕著な変化は認められなかった。

表 17 - 9-Month repeat-dose dog study: Summary of toxicokinetic parameters

Dose (mg/kg/day)	**15**		**30**		**50**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
			AUC_{last} (ng•h/mL)			
Rilzabrutinib						
Day 1	482	1070	889	1370	2370 [a]	2370
Day 127	239	495	613	1470	1540	3230
Day 273	248	377	689	751	2410	3250
PRN618						
Day 1	529	828	1060	1350	1660	1890
Day 127	364	651	985	1390	1950	3260
Day 273	280	484	952	1100	2750	3240
PRN834						
Day 1	555	692	1090	1720	3350	2740
Day 127	509	613	1540	1970	4170	5020
Day 273	686	596	1950	1680	6310	5760
			C_{max} (ng/mL)			
Rilzabrutinib						
Day 1	257	559	360	558	806 [a]	817
Day 127	97.8	257	236	688	514	1090
Day 273	65.7	202	257	339	593	940
PRN618						
Day 1	148	294	273	358	331	368
Day 127	77.8	191	186	356	324	578
Day 273	45.0	134	199	245	393	500
PRN834						
Day 1	96.3	107	175	272	478	410
Day 127	76.8	97.4	197	275	512	646
Day 273	80.5	95.2	242	251	708	685

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

a The 50 mg/kg/day male Day 1 C_{max} and AUC_{last} values includes the male (4M30) that was euthanized on Day 53. Male 4M30 C_{max} and AUC_{last} values were 2090 ng/mL and 5410 h.ng/mL, respectively.

以上、リルザブルチニブをイヌに 9 か月間、カプセルを用いて経口投与したときの NOAEL は、50 mg/kg/日でリルザブルチニブ関連の人道的安楽殺、体重減少及び病理組織学的所見が認められたため、30 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 273 日目におけるリルザブルチニブの C_{max} 及び AUC_{last} 値は、雄でそれぞれ 257 ng/mL 及び 689 ng•h/mL、雌でそれぞれ 339 ng/mL 及び 751 ng•h/mL であった。

4 遺伝毒性試験

リルザブルチニブについて、遺伝毒性試験の標準バッテリー（2 つの in vitro 試験及び 1 つの in vivo 試験）を実施した。試験の内訳は、ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）、HPBL を用いる染色体異常試験、並びに in vivo ラット骨髄 MNT であった。In vitro 試験には 2 つの独立した実験が含まれ、Aroclor™ 1254 誘導ラット肝 S9 画分（S9）から調製したミクロソーム酵素の存在下及び非存在下で実施した。リルザブルチニブは 3 試験のいずれにおいても陰性であった。

4.1 In vitro 非哺乳類細胞系

Ames 試験でのリルザブルチニブの遊離塩基の評価を、ネズミチフス菌の菌株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537、並びに大腸菌の菌株 WP2 uvrA を用いて、S9 の存在下及び非存在下で実施した（DVR0169 試験 [表 2.6.7.8 A]）。試験はプレート法を用いて 2 つの相で実施した。第 1 相（予備的毒性試験）を用いて、変異原性試験での用量範囲を設定した。第 2 相（変異原性試験）を用いて、被験物質の変異原性の有無を評価した。溶媒として DMSO を使用した。

予備的毒性試験を、6.7、10、33、67、100、333、667、1000、3333 及び 5000 µg/プレートの用量で実施した。沈殿が 1000 µg/プレート以上（大腸菌）又は 3333 µg/プレート以上（ネズミチフス菌）で認められた。背景細菌叢毒性は認められなかったが、多くの試験条件下において、3333 又は 5000 µg/プレートで復帰変異コロニー数の減少が認められた。毒性試験の所見に基づき、変異原性試験での最高用量は 5000 µg/プレートとした。

変異原性試験では、S9 活性化の存在下及び非存在下で、いずれの試験菌株にも陽性の変異原性反応は認められなかった。評価した用量は 15、50、150、500、1500 及び 5000 µg/プレートであった。沈殿が 1500 µg/プレート以上で認められた。背景菌叢毒性はみられなかったが、一部の試験条件下では、復帰変異コロニー数減少が 5000 µg/プレートで認められた。陽性及び溶媒対照値は、いずれも許容範囲内であった。

以上、リルザブルチニブは Ames 試験において陰性であった。

4.2 ヒト末梢血リンパ球を用いる in vitro 哺乳類染色体異常試験

HPBL を用いるリルザブルチニブの遊離塩基の染色体異常試験を、S9 の非存在下及び存在下で実施した（DVR0170 試験 [表 2.6.7.8 B]）。

細胞遺伝学試験で検討する用量範囲を決定するため、予備的毒性試験を実施した。予備試験及び染色体異常試験での HPBL の曝露時間は、代謝活性化（S9）非存在下では 4 及び 20 時間、S9 存在下では 4 時間とした。処理開始 20 時間後に全ての細胞を回収した。溶媒として DMSO を使用した。

予備的毒性試験を、リルザブルチニブの 0.05～500 µg/mL の濃度で実施した。高度の毒性（溶媒対照と比較して分裂指数が 50%以上低下）が、S9 非存在下でリルザブルチニブの 150 µg/mL 以上の濃度での 4 時間曝露後に、S9 存在下で 50 µg/mL 以上での 4 時間曝露後に、また S9 非存在下で 15 µg/mL 以上での 20 時間曝露後に、それぞれ認められた。これらの所見に基づき、染色体異常試験で選択した用量範囲は、S9 非存在下の 4 時間曝露では 5～125 µg/mL、S9 存在下の 4 時間曝露では 15～80 µg/mL、S9 非存在下の 20 時間曝露では 2.5～15 µg/mL であった。

染色体異常試験において、高度の毒性が、S9 非存在下の 4 時間曝露では 30 µg/mL 以上で、S9 存在下の 4 時間曝露では 45 µg/mL 以上で、S9 非存在下の 20 時間曝露では 7.5 µg/mL 以上で、それぞれ認められた。各処理条件での最高用量で約 50%の分裂指数低下が得られ、この試験に関する試験法ガイドラインで推奨される用量限界に合致していた。

S9 存在下又は非存在下の処理群で、染色体構造異常又は数的異常（倍数体又は核内倍加細胞）の著しい増加又は用量依存的な増加は認められなかった。溶媒対照及び陽性対照の値は、信頼性のある試験の基準を満たしていた。

リルザブルチニブは、HPBL を用いる in vitro 哺乳類染色体異常試験において、S9 の存在下及び非存在下での染色体構造異常及び数的異常誘発に関して陰性と判断された。

4.3　ラットを用いる in vivo 小核試験

リルザブルチニブの遊離塩基の in vivo 染色体異常誘発能及び／又は分裂装置崩壊作用を、ラット骨髄の多染性赤血球（PCE）における小核（MN）の検出により評価した（DVR0185 試験 [表 2.6.7.9]）。シクロホスファミド（CP、40 mg/kg）を陽性対照とした。被験物質及び／又は対照物質の投与液を強制経口投与した。Sprague Dawley ラット（1 群雌雄各 5 又は 10 匹、6 週齢）に、リルザブルチニブを、雄には 0（媒体対照）、500、1000 又は 2000 mg/kg の用量で、雌には 0（媒体対照）、375、750 又は 1500 mg/kg の用量で、それぞれ強制経口投与した。対照群及び高用量群は 1 群雌雄各 10 匹として 24 又は 48 時間後に骨髄を採取し、低用量、中用量及び CP 群は 1 群雌雄各 5 匹として 24 時間後に骨髄を採取した。別の 1 群雌雄各 3 匹の動物をおき、リルザブルチニブの TK 評価用の血液検体を採取した。

予定された安楽殺の時点で大腿骨骨髄を採取し、骨髄スライドを作製してアクリジンオレンジで染色した。骨髄細胞（1 匹当たり 2000 個の PCE）内の MN（小核を有する PCE、すなわち MnPCE）の有無を顕微鏡下で検査した。被験物質の細胞毒性を示すため、媒体対照群と比較した被験物質群における PCE と総赤血球との比率も算出した。

以上、リルザブルチニブは、雄に 2000 mg/kg、雌に 1500 mg/kg までの用量で経口投与したとき陰性と判断された。雄における 2000 mg/kg での C_{max} 及び AUC_{last} は、それぞれ 11800 ng/mL 及び 60000 ng•h/mL であった。雌における 1500 mg/kg での C_{max} 及び AUC_{last} は、それぞれ 10500 ng/mL 及び 147000 ng•h/mL であった。

5　がん原性試験

TgHRAS マウスを用いた 6 か月間がん原性試験及びラットを用いた 2 年間がん原性試験で使用した用量は、米国 FDA のエグゼクティブがん原性評価委員会（eCAC）による審査を受けた。eCAC は、2018 年 6 月 26 日（5.2.1 項）及び 2020 年 4 月 21 日（5.1.5 項）に開催された委員会の会議で、提案された用量に同意した。

5.1　マウス

5.1.1　TgHRAS マウスを用いた 1 又は 3 日間経口投与用量設定試験

TgHRAS ヘミ接合マウス（1 群雌雄各 12 匹、12～13 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、1 日間（全ての雄及び高用量群の雌）又は 3 日間（媒体対照群、低用量群及び中用量群の雌）、強制経口投与した（DVR0454 試験 [表 2.6.7.10 B]）。雄の用量は 0（媒体対照）、500、1000 又は 1500 mg/kg、雌の用量は 0（媒体対照）、100、300 又は 1000 mg/kg とした。別の雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 39 匹（リルザブルチニブ群）のマウスをおき、1 日目にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用の血液検体を採取した。TK 群に割り当てた動物は、ヘミ接合マウスと野生型（-/-）マウスの混合であった。

検査項目は、生死確認、一般状態観察及び剖検であった。

死亡（死亡発見、瀕死安楽殺）が、2 日目に 500 mg/kg 群の雄（12 匹中 3 匹）、1000 mg/kg 群の雄（12 匹中 9 匹）及び雌（12 匹中 6 匹）、並びに 1500 mg/kg 群の雄（12 匹中 10 匹）で認められた。一般状態の変化として、冷触感及び活動性低下が、雄は 1000 mg/kg 以上、雌は 1000 mg/kg で認められた。これらの一般状態の変化は特異的なものではなく、死が差し迫っていることを示すものであった。

肉眼所見として、1000 mg/kg で肺変色（雌雄各 1 匹）、胃幽門部変形（雌 1 匹）、肝臓変色（雌 2 匹）及び脾臓変色（雌 1 匹）が、1000 mg/kg 以上で肝臓変色（雄）が、1500 mg/kg で膀胱膨満（雄 1 匹）が、それぞれ認められた。

リルザブルチニブを単回投与したときのリルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 のピーク曝露量及び総曝露量は、用量の増加に伴って増加したが、例外として雄マウスで 1000 mg/kg から 1500 mg/kg に用量を上げたときの 1500 mg/kg での曝露量は、500 mg/kg で認められた曝露量より少なかった。1000 mg/kg でのリルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の C_{max} 及び AUC_{0-24} は、雄が雌の 2 倍超であった。

以上、雄は 500 mg/kg 以上、雌は 1000 mg/kg の用量で死亡が認められた。雌では、300 mg/kg 以下の用量でリルザブルチニブ関連の毒性所見は認められなかった。

5.1.2 TgHRAS マウスを用いた探索的 14 日間経口投与用量設定試験

TgHRAS ヘミ接合マウス（1 群雌雄各 6 匹、6 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、30、100、300 又は 600 mg/kg/日の用量で 14 日間強制経口投与した（DVR0385 試験 [表 2.6.7.10 C]）。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）、剖検及び器官重量とした。

リルザブルチニブ関連の死亡は認められなかった。被験物質関連の一般状態の変化、体重の変化及び摂餌量の変化は認められなかった。リルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。被験物質関連の血液生化学的変化は、300 mg/kg/日以上でのコレステロール濃度増加及びトリグリセリド濃度減少のみであったが、変化の性質が軽微であったことから、毒性ではないと考えられた。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。肝臓重量の増加が雄は 100 mg/kg/日以上、雌は 300 mg/kg/日以上で認められたが、毒性ではないと考えられた。

以上、雌雄の TgHRAS マウスに 600 mg/kg/日までの用量で 14 日間投与したときの忍容性は良好であった。

5.1.3 TgHRAS マウスを用いた 1 か月間経口投与用量設定試験

この試験は、TgHRAS マウスを用いた 6 か月間がん原性試験のための用量設定試験であった。TgHRAS ヘミ接合マウス（1 群雌雄各 10 匹、6 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、100、300 又は 600 mg/kg/日の用量で 28 日間（雄）又は 29 日間（雌）強制経口投与した（DVR0407 試験 [表 2.6.7.10 D]）。別の雌雄各 6 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 39 匹（リルザブルチニブ群）のマウスをおき、1 及び 28 日目にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用の血液検体を採取した。TK 群に割り当てた動物は野生型（-/-）マウスであった。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

リルザブルチニブ関連の死亡及び一般状態の変化は認められなかった。体重及び摂餌量には被験物質関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。被験物質関連の血液生化学的変化は、雄は 300 mg/kg/日以上、雌は 100 mg/kg/日以上での血清トリグリセリド減少（軽微）、並びに 600 mg/kg/日での血清コレステロール増加（軽微）のみであった。これらの所見は低度であり、関連する病理組織学的変化が認められなかったことから、毒性ではないと考えられた。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。肝臓重量増加（軽微）が、雄は 600 mg/kg/日、雌は 300 mg/kg/日以上で、腎臓重量増加が 600 mg/kg/日群の雄で、それぞれ認められた。これらの所見は低度であり、関連する病理組織学的変化及び血液生化学的変化がみられなかったことから、毒性ではないと考えられた。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見は、300 mg/kg/日以上での肝細胞グリコーゲン減少（軽微）のみであった。

TK パラメータを表 18（リルザブルチニブ）、表 19（PRN618）及び表 20（PRN834）に要約する。リルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 への全身曝露が、単回及び反復投与後に全ての投与群で認められた。1 及び 28 日目の t_{max} 値は、全ての投与群で 0.25～1 時間であった。100 mg/kg/日と 300 mg/kg/日の用量間では、単回及び反復投与後に、リルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の全身曝露量の用量依存的な増加が認められた。300 mg/kg/日と 600 mg/kg/日の用量間で、曝露量は用量に伴って増加したが、例外は雌での 1 日目のリルザブルチニブの AUC_{0-24}、雄での 28 日目のリルザブルチニブの C_{max} 及び AUC_{0-24}、並びに雄での 28 日目の PRN618 の C_{max} であった。全体として、リルザブルチニブ及び代謝物の曝露量は、雌雄で同程度（2 倍以内）であった。28 日間の反復投与後にリルザブルチニブ及び 2 種類の代謝物の蓄積は認められなかった。しかし、1 日目と 28 日目の間で、曝露量の特筆すべき減少（AUC_{0-24} に基づくと 50%超）が、600 mg/kg/日（雄）でリルザブルチニブに、300 mg/kg/日以上で PRN618 に、300 mg/kg/日（雌）で PRN834 に、それぞれ認められた。AUC_{0-24} の M/P に基づくと、リルザブルチニブの代謝による PRN618 生成は少量にすぎず、代謝による PRN834 生成は大量であった。

表 18 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of rilzabrutinib TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
100	M	7810	7170	31100	19400
	F	8690	7270	24000	28000
300	M	14200	10800	103000	54600
	F	16700	9610	114000	57100
600	M	20300	7460	152000	42700
	F	21000	13500	95200	81000

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

表 19 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN618 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
100	M	522	403	2010	1100
	F	498	238	1500	1050
300	M	985	803	7050	3090
	F	966	421	6270	2000
600	M	1290	703	12200	4150

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng•h/mL)	
	F	1170	711	8480	3480

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

表 20 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN834 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
100	M	1550	1740	9760	7360
	F	1590	1520	7220	6640
300	M	2930	2930	34700	29000
	F	2730	1630	33700	16600
600	M	5010	4050	76800	39500
	F	3800	3100	39100	34800

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

以上、TgHRAS マウスにリルザブルチニブを連日 28 日間強制経口投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 600 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 28 日目におけるリルザブルチニブの C_{max} 及び AUC_{0-24} 曝露量は、雄でそれぞれ 7460 ng/mL 及び 42700 ng•h/mL、雌でそれぞれ 13500 ng/mL 及び 81000 ng•h/mL であった。

5.1.4 TgHRAS マウスを用いた 1 か月間経口投与用量設定試験

TgHRAS マウスを用いた 6 か月間がん原性試験のための 2 番目の用量設定試験を、微粒子化したリルザブルチニブの遊離塩基を用いて実施した。TgHRAS ヘミ接合マウス（1 群雌雄各 10 匹、8 週齢）に、微粒子化したリルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で、28 日間（雄）又は 29 日間（雌）強制経口投与した（DVR0455 試験[表 2.6.7.10 E]）。別の雌雄各 6 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 39 匹（リルザブルチニブ群）のマウスをおき、1 及び 28 日目にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用の血液検体を採取した。TK 群に割り当てた動物は野生型（-/-）マウスであった。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

リルザブルチニブ関連の死亡及び一般状態の変化はみられず、体重及び摂餌量の変化も認められなかった。

軽度の非毒性的なヘモグロビン濃度減少（雌雄）及び平均赤血球ヘモグロビン（雄）減少が、300 mg/kg/日で認められた。被験物質関連の血液学的パラメータの変化は認められなかった。血液生

化学的変化は、300 mg/kg/日での非毒性的なコレステロール濃度増加（対照群の 122 mg/dL に対して 150 mg/dL）のみであった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。病理組織学的変化を伴わない肝臓絶対重量及び肝臓重量体重比の軽度の増加が、300 mg/kg/日で雌に認められた。被験物質関連の病理組織学的所見は認められなかった。

TK パラメータを表 21（リルザブルチニブ）、表 22（PRN618）及び表 23（PRN834）に要約する。1 及び 28 日目の t_{max} 値は、全ての投与群で 0.25～1 時間の範囲であった。1 及び 28 日目におけるリルザブルチニブの複合平均ピーク時曝露量（C_{max}）は、おおむね用量比を下回って増加した。リルザブルチニブの複合平均総曝露量（AUC_{0-24}）は、1 日目にはおおむね用量比を上回って増加したが、28 日目には用量に比例して増加した。1 及び 28 日目の曝露量は、全ての用量を通して雄と雌で同程度（2 倍未満）であった。リルザブルチニブの全身性の蓄積は認められなかった。性差は認められなかった。しかし、28 日目におけるリルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 のピーク時曝露量（C_{max}）及び総曝露量（AUC_{0-24}）は、全体として 1 日目の曝露量より低かった。M/P の値に基づくと、PRN834 は PRN618 より速やかに生成した。

表 21 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of rilzabrutinib TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
30	M	2210	2580	5270	4310
	F	2880	3010	6440	5980
100	M	5560	4300	29100	13700
	F	3910	4300	31900	16500
300	M	13900	6650	82300	30100
	F	14500	7120	89300	49300

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

表 22 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN618 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
30	M	95.7	84.0	329	160
	F	90.4	86.9	472	215
100	M	339	200	1720	658
	F	354	140	2680	610
300	M	952	488	4660	2120
	F	920	359	5230	1900

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng•h/mL)

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

表 23 - 1-Month TgHRAS mouse study: Summary of PRN834 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 28	Day 1	Day 28
30	M	457	279	1820	1140
	F	384	450	1950	1570
100	M	1220	1210	9540	5630
	F	1330	720	10600	4830
300	M	2080	2490	21800	19000
	F	2480	2010	21700	15400

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

以上、TgHRAS マウスに微粒子化したリルザブルチニブを連日 28 日間強制経口投与したときの NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 28 日目におけるリルザブルチニブの C_{max} 及び AUC_{0-24} 曝露量は、雄でそれぞれ 6650 ng/mL 及び 30100 ng•h/mL、雌でそれぞれ 7120 ng/mL 及び 49300 ng•h/mL であった。

5.1.5 TgHRAS マウスを用いた 6 か月間経口投与がん原性試験

リルザブルチニブの発がん性を、TgHRAS ヘミ接合マウスを用いて評価した（1281-20014 試験 [表 2.6.7.10 F]）。1 群雌雄各 25 匹（8 週齢）の動物に、微粒子化したリルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で、26 週間以上強制経口投与した。陽性対照群（雌雄各 10 匹）には、ウレタン 1000 mg/kg を 1、3 及び 5 日目に腹腔内投与し、投与 17 週後に安楽殺した。別の雌雄各 6 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 39 匹（リルザブルチニブ群）のマウスをおき、1 及び 66 日目にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用の血液検体を採取した。TK 群に割り当てた動物は野生型（-/-）マウスであった。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、腫瘤観察、体重、摂餌量、血液学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

生存に対するリルザブルチニブ関連の影響は認められなかった。投与期間終了時のリルザブルチニブ投与群の生存率は、雄で 96%～100%、雌で 92%～100%であり、媒体対照群の生存率（雄で 100%、雌で 88%）と同程度であった。陽性対照群では強い発がん反応がみられた結果、ウレタン投与群の雄の死亡率は 50%となり、これに対して媒体対照群の雄の死亡率は 0%であった。生存率は媒体対照群の雌で 88%、ウレタン投与群の雌で 90%であった。

リルザブルチニブ関連の一般状態の変化及び腫瘤所見はみられず、体重、摂餌量及び血液学的パラメータの変化は認められなかった。

被験物質関連の肉眼所見及び器官重量の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の腫瘍性及び非腫瘍性所見は、検討した最高用量まで認められなかった。ウレタン関連と考えられる腫瘍性所見は、TgHRAS マウスで予想される変化（肺腺腫）に一致していた。

リルザブルチニブの TK パラメータを表 24（リルザブルチニブ）、表 25（PRN618）及び表 26（PRN834）に要約する。リルザブルチニブを単回及び反復経口投与したときのリルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の複合平均ピーク時及び総曝露量は、用量の増加に伴って増加した。1 及び 66 日目の t_{max} 値は、全ての投与群で 0.25～1 時間であった。リルザブルチニブの複合平均ピーク時曝露量（C_{max}）は、1 及び 66 日目におおむね用量比を下回って増加した。リルザブルチニブの複合平均総曝露量（AUC_{last}）は、1 日目にはばらつきのある増加を示したが、66 日目には用量比を下回って増加した。しかし、66 日目におけるリルザブルチニブ、PRN618 及び PRN834 の複合平均ピーク時曝露量（C_{max}）及び総曝露量（AUC_{last}）は、おおむね 1 日目の曝露量と同程度であった。性差は認められなかった。M/P の値に基づくと、PRN834 は PRN618 より速やかに生成した（1 及び 66 日目の複合比範囲は、それぞれ 0.2～0.8 及び 0.02～0.07）。

表 24 - 6-Month study in TgHRAS mice: Summary of rilzabrutinib TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 66	Day 1	Day 66
30	M	3220	3070	8360	8820
	F	3360	3750	7600	10200
100	M	6600	4560	40600	26900
	F	6560	5770	35400	41500
300	M	9000	5920	39000	40300
	F	9030	6080	78800	71100

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

表 25 - 6-Month study in TgHRAS mice: Summary of PRN618 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 66	Day 1	Day 66
30	M	81.2	92.8	255	243
	F	105	77.9	250	195
100	M	231	199	1300	1090
	F	306	156	1280	1280
300	M	485	310	4400	2230
	F	551	245	3730	1950

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

表 26 - 6-Month study in TgHRAS mice: Summary of PRN834 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		Day 1	Day 66	Day 1	Day 66
30	M	421	423	1460	2110
	F	373	479	1360	1610
100	M	1100	975	11900	8610
	F	966	963	10600	9920
300	M	1700	1790	24500	22300
	F	1530	1590	21600	22200

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; TK: Toxicokinetics

以上、TgHRAS マウスでは、検討した最高用量である 300 mg/kg/日までの用量で、リルザブルチニブ関連の生存及び新生物発現率への影響は認められなかった。腫瘍性及び非腫瘍性所見に関する NOAEL は 300 mg/kg/日と判断された。NOAEL での 66 日目における C_{max} 及び AUC_{last} は、雄でそれぞれ 5920 ng/mL 及び 40300 ng•h/mL、雌でそれぞれ 6080 ng/mL 及び 71100 ng•h/mL であった。

5.2 ラット

5.2.1 ラットを用いた 2 年間経口投与がん原性試験

Wistar Han IGS ラットを用いて、リルザブルチニブの発がん性を評価した（1281-18051 試験 [表 2.6.7.10 A]）。ラット（1 群雌雄各 60 匹、7 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、雄には 0（媒体対照）、10、30 又は 100 mg/kg/日、雌には 0、5、15 又は 50 mg/kg/日の用量で、最長 24 か月間強制経口投与した。別の雌雄各 5 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 10 匹（リルザブルチニブ群）

のラットをおき、1、23 及び 176 日目にリルザブルチニブ及び微量代謝物（PRN618 及び PRN834）の TK 評価用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、生存率、一般状態観察（腫瘤観察を含む）、体重、摂餌量、血液学的検査、剖検及び病理組織学的検査とした。

リルザブルチニブ投与群では、それぞれの対照群と比較して、生存率に統計学的有意差は認められなかった。1 群当たり少なくとも雄 47 匹、雌 42 匹が 90 週目まで生存したことで、腫瘍発現率解析結果の解釈において十分な情報が得られた。全体の生存率は、50 mg/kg/日群の雌（45%）が対照群の雌（62%）よりわずかに低かった。この違いを明確に説明するための死因となった特定の病変はみられず、リルザブルチニブ関連の可能性がある特定の病理組織学的変化の発現率及び／又は重症度の上昇も認められなかった。したがって、50 mg/kg/日群の雌における生存率低下は、偶発的であった可能性が高い。

一般状態の変化は、高齢のげっ歯類で認められる典型的な偶発的所見であった。リルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、呼吸クラックル音が 100 mg/kg/日群の雄及び 50 mg/kg/日群の雌でみられ、これに関連して肺葉の暗色化及び出血が少数例で認められた。

リルザブルチニブに関連する以下の体重又は摂餌量の変化が認められた。最終週（714 日目）における 100 mg/kg/日群の雄の体重は、対照群の雄と比較して低値（-7.3%）を示した。投与期間終了時における 100 mg/kg/日群の雄の体重は同時対照群より増加が少なかったが、これは毒性ではないと考えられた。623～630 日目における 100 mg/kg/日群の雄の摂餌量は、対照群の雄と比較して低値（-9.4%）であった。50 mg/kg/日群の雌の摂餌量は、224～231 日目の週の初めから試験終了時まで、対照群の雌より低値を示すことが多かった。

リルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。

肉眼所見が、対照群及び／又は投与群の動物で、甲状腺、子宮、膵臓、腸間膜リンパ節及び肺に認められた。

甲状腺の肉眼所見として、大型化、腫瘤及び変色がみられ、多くの場合、それに関連する病理組織学的所見として、甲状腺新生物及び／又は甲状腺濾胞細胞過形成が認められた。子宮において腫瘤、硬さの異常、子宮角の変形、子宮頸部腫瘤、子宮頸部肥厚、変色、暗色巣、並びに／又は他の様々な腹腔内及び胸腔内組織の大型化がみられ、それに関連する病理組織学的所見として、子宮腺癌及び／又は原発性子宮腺癌の転移が認められた。膵臓の所見として結節及び腫瘤がみられ、それに関連して島細胞腺腫が認められた。腸間膜リンパ節では腫瘤、変色及び／又は大型化がみられ、それに関連して血管肉腫、血管腫及び／又は洞赤血球増加が認められた。肺の所見として白色巣、肺変色、結節及び／又は肺機能不全による肺虚脱がみられ、少数例ではそれに関連する病理組織学的所見として、肺胞肉芽腫様炎症、肺胞慢性炎症及び／又は肺胞マクロファージが認められた。対照群及び投与群の動物におけるその他の肉眼所見には、関連する病理組織学的所見がみられないか、又は雑多で偶発的な腫瘍性及び非腫瘍性の病理組織学的病変との関連が認められた。

リルザブルチニブに関連する可能性がある腫瘍性所見及び関連する標的組織変化が、雄ラットの甲状腺及び膵臓に認められた（表 27）。

表 27 - Rat carcinogenicity study: Incidence of rilzabrutinib-related neoplastic findings and associated target tissue changes in male rats

Organ: Finding		Dose (mg/kg/day)			
		0	10	30	100
Thyroid	Follicular-cell adenoma	7%	(13%)	(12%)	25%
	Follicular-cell carcinoma, multiple	0%	(0%)	(0%)	5%
	Follicular-cell, hyperplasia, focal [a]	5%	25%	18%	12%
Pancreas	Islet-cell adenoma [b]	2%	(5%)	(0%)	12%
	Fibrosis, islet cell(s)	50%	72%	85%	87%

( ): no rilzabrutinib-related change; %: cases/tissues examined in each group

a Potentially related to rilzabrutinib

b Potentially related to rilzabrutinib although an incidental random intergroup distribution of a spontaneous change could not be excluded

甲状腺濾胞細胞腺腫／癌の発現率上昇が 100 mg/kg/日群の雄に認められ、関連する肉眼所見として大型化、腫瘤及び変色が認められた。限局性濾胞細胞過形成の悪化が雄で 10 mg/kg/日以上にみられ、顕著ではなかったが、リルザブルチニブ関連の可能性ありと考えられた。リルザブルチニブの甲状腺に対する影響の科学的及び病理学的レビューがコンサルタント病理学者により実施され(3)、その内容は、今回のラット 2 年間がん原性試験、ラットを用いた 3 及び 6 か月間反復投与毒性試験（3.1.4 項及び 3.1.5 項）で採取した甲状腺の再評価、並びにヒト及びラットの肝臓スフェロイドのトランスクリプトームプロファイリングであった（8.9.4 項、Module 4.2.3.7.7-3 [MCT0292]）。3 及び 6 か月間反復投与毒性試験で、可逆的なリルザブルチニブ関連のびまん性濾胞細胞肥大が、それぞれ 500 及び 300 mg/kg/日群の雌に認められた。肝臓スフェロイドを用いたトランスクリプトーム解析の結果として、リルザブルチニブはラット肝臓スフェロイドにおいて第 I 相及び第 II 相酵素を誘導することが示され、その酵素にはチロキシン（T4）の代謝及び排泄に関与する UGT が含まれていた。対照的に、ヒト肝臓スフェロイドでの UGT 発現に対するリルザブルチニブの影響は極めて低度であった。ラットでは、肝臓における UGT 誘導により T4 の代謝及び排泄が亢進し、その結果として下垂体による TSH 分泌が増加する。TSH によるラット甲状腺の慢性刺激の結果として、高齢のラットで限局性甲状腺濾胞細胞過形成（前腫瘍性病変）及び最終的には甲状腺濾胞腫瘍が形成される。雄ラットは、一般に雌ラットよりこれらの変化が発現しやすい。これはラットにおける非遺伝毒性的な発がんメカニズムであり、ヒトへの関連性はないと考えられる(4)(5)(6)(7)。このことは、フェノバルビタールによるミクロソーム酵素誘導によって誘発されるラット甲状腺腫瘍と同様である。また、ヒト肝臓スフェロイドにおけるリルザブルチニブの UGT 誘導は極めて低度であった。

甲状腺濾胞細胞癌の発現率上昇が 15 mg/kg/日群の雌にみられたが、この所見には用量依存性が認められなかったことから、用量間のランダムなばらつきによるもので、リルザブルチニブとの関連はないと考えられた。

膵島細胞腺腫の軽度の発現率上昇が 100 mg/kg/日群の雄にみられたが、自然発生的変化の偶発的かつランダムな群間分布である可能性は否定できない。膵島細胞腺腫はラットで普通にみられる加齢性の腫瘍であり、自然発生的島細胞新生物は雌より雄で高頻度に認められる(8)。この試験における雄の発現率（12%）は、報告された利用可能な背景対照範囲の上限を超えるものではなかった(8)。ラットにおける膵島細胞の増殖性病変は、限局性過形成、腺腫及び癌の進行性「形態学的及び生物学的連続体」を構成する(9)。この試験でリルザブルチニブの投与を受けた雄ラットにおいて島細胞癌はみられず、限局性過形成はほとんど認められなかった。したがって、申請者は、この試験で認められた膵臓腺腫は自然発生的な加齢性所見の可能性があり、この試験でみられた軽度の発現率上昇は、ラットにおける自然発生的背景変化の悪化に対する二次的変化の可能性があると考える。さらに、リルザブルチニブ投与群の雄ラットで観察された膵臓の線維化及び炎症の所見は、ラットの自然発生的背景変化であり、公表されている BTK 阻害薬の影響と一致するものであった。他の動物種では類似した変化は認められなかった。他の BTK 阻害薬では、臨床使用時の曝露量で雄ラットに類似した所見が認められていることから、BTK 阻害薬による膵臓の変化は動物種特異的かつ性特異的なものと考えられる(10)(11)(12)(13)(14)。病理組織学的変化は対照ラットで報告された自然発生的所見に一致しており、高齢ラットでの一般的な背景所見が被験物質により加速された可能性がある。回復期間後に、膵臓の変化の完全又は部分的な回復性が示された(11)。膵臓への影響に対する感受性は性及び系統に依存しており、Sprague Dawley ラットは Wistar ラットより感受性が高い(10)(11)。BTK 阻害薬による膵臓の病変も、投与期間延長により重症度及び発現率が上昇した(10)。BTK 阻害薬でラットに特異的な違いが生じるメカニズムは、明確には特定されていないが、原発性微小血管傷害が関与している可能性がある(10)(15)。イブルチニブの投与を受けた患者での膵臓機能障害の臨床報告はないことから、ヒトで膵臓毒性が発現する可能性は低い(10)(16)。

腸間膜リンパ節及び子宮にも新生物が認められた。腸間膜リンパ節では、血管腫及び血管肉腫の発現率上昇が 100 mg/kg/日群の雄で認められた。腸間膜リンパ節の血管腫及び血管肉腫は、対照 Wistar ラットで自然発生的に発現することがあり、雌より雄で発現率が高い(17)(18)(19)。全ての投与群の雄における血管腫及び血管肉腫の発現率は、報告されている全体的な背景対照値の範囲内であった。したがって、この所見は偶発的かつランダムな群間のばらつきである可能性が高い。子宮では、腺癌の発現率の軽度の上昇が 50 mg/kg/日群の雌で認められた。子宮腺癌は雌の Wistar Han ラットで自然発生的に発現することがある（発現率は 1.15%～8.0%）(8)(17)(19)(20)。この試験における 50 mg/kg/日群の雌での発現率（10%）は、利用可能な背景対照発現率をわずかに上回っているにすぎないことから、この所見はリルザブルチニブと関連のない自然発生的所見のランダムな群間分布によるものと考えられた。

リルザブルチニブ関連の非腫瘍性所見が腸間膜リンパ節に認められた（表 28）。洞赤血球増加（洞マクロファージ内の様々な赤血球貪食及び／又は色素蓄積を伴ったリンパ節洞内の赤血球集簇）の用量依存的な発現率及び重症度上昇が、雄は 30 mg/kg/日以上、雌は 5 mg/kg/日以上で認められた。このようなリンパ節洞内の赤血球集簇は、ラット（Wistar ラットを含む）における偶発的な非特異的

所見として発現することが知られている(17)(21)。一方、このような腸間膜リンパ節の変化は、BTK阻害薬の既知の薬理作用（血小板凝集に対する標的関連作用）に一致している(22)(23)(24)(25)。

表 28 - Rat carcinogenicity study: Incidence of rilzabrutinib-related non-neoplastic findings

Organ: Finding	Sex	Dose Group [a]			
		Control	Low dose	Mid dose	High dose
Mesenteric lymph node: Erythrocytosis, sinus	M	40%	(34%)	50%	71%
	F	28%	35%	50%	55%

Abbreviations: F: Female; M: Male
( ): no rilzabrutinib-related change; %: cases/tissues examined in each group
a Males: 0, 10, 30 or 100 mg/kg/day; Females: 0, 5, 15, 50 mg/kg/day

対照動物及び投与動物の様々な組織におけるその他の病理組織学的所見は、強制経口投与による二次的な変化又はリルザブルチニブに関連のない偶発的な自然発生的所見と考えられた。2 年間（生涯）連日投与後の脳組織には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の TK パラメータを表 29 に要約する。t_{max} 値は、全ての投与群の雌雄において 0.25～1 時間であった。リルザブルチニブの曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は用量比を上回って増加したが、例外として雄の C_{max} 値は、全体として用量比をわずかに下回って増加した。23 及び 176 日目にわずかな蓄積が認められた。

表 29 - Rat carcinogenicity study: Summary of rilzabrutinib TK parameters

Dose (mg/kg/day)		C_{max} (ng/mL)			AUC_{0-24} (ng•h/mL)		
		Day 1	Day 23	Day 176	Day 1	Day 23	Day 176
Male	10	27.9	54.1	97.2	111	162	263
	30	188	254	404	601	737	978
	100	761	843	690	3910	3280	3670
Female	5	16.7	51.1	83.4	77.2	127	166
	15	251	361	429	771	551	1200
	50	1230	1110	1600	6400	5970	6930

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; TK: Toxicokinetics

表 30 - Rat carcinogenicity study: Summary of PRN618 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)		C_{max} (ng/mL)			AUC_{0-24} (ng•h/mL)		
		Day 1	Day 23	Day 176	Day 1	Day 23	Day 176
Male	10	3.15	10.0	19.2	12.5	34.2	58.2
	30	23.3	37.2	87.9	136	190	294
	100	117	105	134	907	758	989
Female	5	1.66	5.76	8.26	NC	13.1	21.9
	15	13.4	35.3	52.8	67.5	68.4	171
	50	65.3	71.8	124	555	550	826

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; TK: Toxicokinetics

表 31 - Rat carcinogenicity study: Summary of PRN834 TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)		C_{max} (ng/mL)			AUC_{0-24} (ng•h/mL)		
		Day 1	Day 23	Day 176	Day 1	Day 23	Day 176
Male	10	33.7	53.9	87.3	150	200	375
	30	138	156	146	521	707	976
	100	388	398	396	2880	3590	3820
Female	5	37.6	81.8	64.3	152	270	339
	15	150	187	285	688	664	1210
	50	500	631	753	4740	5620	6370

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration; TK: Toxicokinetics

以上、Wistar Han ラットにおいて、雄では 30 mg/kg/日以下、雌では 50 mg/kg/日以下の用量でリルザブルチニブ関連の生存率への影響はみられず、リルザブルチニブには発がん性はないと考えられた。100 mg/kg/日群の雄で、甲状腺腫瘍（濾胞細胞腺腫／癌）及び膵臓腫瘍（島細胞腺腫）の発現率上昇が認められた。

甲状腺腫瘍に関する外部専門家の結論として、発現率上昇は、ラットに特異的なフェノバルビタール様ミクロソーム酵素誘導により甲状腺ホルモンの代謝クリアランスが上昇したことに起因するものであった。それに続く TSH による慢性刺激の結果として、甲状腺の前腫瘍性及び腫瘍性変化が引き起こされる。このメカニズムはヒトへの関連性がないため、患者への安全性上の懸念を示すものではない。ラット及びヒトの肝臓スフェロイド培養を用いたトランスクリプトーム試験で得られたエビデンスにより、この結論が裏付けられた。

膵島細胞腺腫はラットで一般的にみられる加齢性の腫瘍であり、この試験での発現率は利用可能な背景対照を超えるものではなく、リルザブルチニブの島細胞に対する増殖作用を裏付ける他の所見は認められなかった。また、リルザブルチニブ投与群の雄で認められた膵臓の線維化及び炎症はラッ

トの自然発生的背景変化であり、この動物種での BTK 阻害薬による変化としても報告されていることから、背景変化が悪化した可能性があると考えられた。他の動物種では同様の変化は認められなかった。全体として、この試験で観察された膵臓腺腫の軽度の発現率上昇は、ラットにおける自然発生的背景変化の悪化に関連した二次的変化の可能性があり、このメカニズムのヒトへの関連性は低いと考えられる。

利用可能なデータに基づくと、リルザブルチニブを雄及び雌にそれぞれ 100 及び 50 mg/kg/日までの用量で経口投与したところ、ヒトへの関連性があると考えられるリルザブルチニブ関連の腫瘍は認められなかった。176 日目の C_{max} 及び AUC_{0-24} は、100 mg/kg/日群の雄でそれぞれ 690 ng/mL 及び 3670 ng•h/mL、50 mg/kg/日群の雌でそれぞれ 1600 ng/mL 及び 6930 ng•h/mL であった。

6　生殖発生毒性試験

6.1　ラットを用いた経口投与による受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

リルザブルチニブの交尾能、受胎能及び初期胚発生に対する影響の有無を、雌雄の Wistar Han ラットを用いて評価した（DVR0380 試験 [表 2.6.7.12]）。雄（1 群 22 匹、入手時 69 日齢）及び雌（1 群 22 匹、入手時 62 日齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 300 mg/kg/日の用量で強制経口投与した。雄には対照物質又は被験物質を、交配前 28 日間、交配期間中及び安楽殺前日まで、継続して投与した。雌には対照物質又は被験物質を、交配前 15 日間、交配期間中及び妊娠 7 日まで投与した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、性周期判定、交尾確認、帝王切開データ（黄体数、着床数、着床部位の分布、胎盤及び胚の生死）、精子検査（精巣上体の精子濃度及び精子運動能）、生殖能（受胎率、交尾率及び妊娠率）及び器官重量とした。雄は連日 49 日間以上の投与後に剖検し、雌は妊娠 13 日に剖検した。

リルザブルチニブ関連の死亡は認められなかった。唯一の被験物質関連の一般状態の変化は、300 mg/kg/日群の雄における異常呼吸の発現率上昇であった。平均体重減少又は平均体重増加量減少が、300 mg/kg/日で投与第 1 週に認められた。その結果、平均体重増加量減少が交配前期間中に 300 mg/kg/日群の雄（対照群の 73%）及び雌（対照群の 68%）でみられ、投与期間全体（1～57 日目）で 300 mg/kg/日群の雄（対照群の 72%）に認められた。リルザブルチニブ関連の平均摂餌量減少が、300 mg/kg/日で投与第 1 週に認められた。その結果、交配前期間全体で、平均摂餌量減少が 300 mg/kg/日群の雄（対照群の 93%）及び雌（対照群の 92%）に認められた。また、300 mg/kg/日群の母動物で、平均摂餌量減少（対照群の 91%）が妊娠 0～7 日の期間に認められた。

雄の生殖能パラメータ（交尾能、交尾率）及び精子検査パラメータ（精子運動能、精巣上体尾部精子濃度）には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

雌の生殖能（受胎率、妊娠率）、並びに性周期パラメータ、平均妊娠子宮重量及び肉眼所見には、被験物質関連の変化は認められなかった。平均黄体数、着床数、着床前胚死亡率、生存胚数、死亡胚数及び着床後胚死亡率（吸収胚、死亡胚）を含めて、リルザブルチニブ関連の卵巣及び子宮の変化は認められなかった。

器官重量及び器官重量最終体重比には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

以上、一般毒性に関する NOAEL は、リルザブルチニブ関連の体重及び摂餌量の変化に基づき、150 mg/kg/日と判断された。ラットにおける受胎能、生殖能及び初期胚発生に関する NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。

6.2　胚・胎児発生に関する試験

6.2.1　ラット

6.2.1.1　ラットを用いた強制経口投与による探索的胚・胎児発生に関する用量設定試験

妊娠ラットにおけるリルザブルチニブの母動物毒性及び子宮内毒性を検討するため、用量設定試験を実施した（DVR0298 試験 [表 2.6.7.11]）。この試験では、適時交配した雌の Sprague-Dawley [Crl:OFA (SD)]ラット（1 群 10 匹、10～13 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg/日の用量で、妊娠 6 日から妊娠 17 日まで経口投与した。別の 4 匹（媒体対照群）及び 1 群 8 匹（リルザブルチニブ群）の妊娠ラットをおき、妊娠 6 日及び妊娠 17 日にリルザブルチニブの TK 評価用の血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、母動物体重、体重増加量及び摂餌量とした。妊娠 20 日にラットを安楽殺して剖検し、子宮を検査して生存胎児数、死亡胎児数、早期又は後期吸収胚数を求めるとともに、胎児の外表、内臓及び骨格検査を実施した。

リルザブルチニブ関連の死亡は認められなかった。一般状態の変化として、床敷内での異常摂食行動を伴う又は伴わない唾液分泌過多が、妊娠 15 日又は 16 日に 150 mg/kg/日で認められた。500 mg/kg/日での一般状態の変化として、唾液分泌過多、摂餌異常、活動性低下及び立毛が認められた。用量依存的な体重増加量減少が投与期間中（妊娠 6～18 日）に 150 mg/kg/日以上でみられ、その値は対照と比較して、150 mg/kg/日で-16%、500 mg/kg/日で-68%であった。500 mg/kg/日では、体重減少が投与の最初の 3 日間に認められた。被験物質関連の摂餌量減少が、150 mg/kg/日以上で妊娠 6～18 日にみられ、その値は対照と比較して、150 mg/kg/日で-7%、500 mg/kg/日で-36%であった。

黄体数及び着床数には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。150 mg/kg/日以下では、1 腹当たりの生存胎児数、平均妊娠子宮重量及び吸収胚数にリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。500 mg/kg/日では、平均妊娠子宮重量減少、着床後胚胎児死亡率上昇及び早期吸収胚数増加（同時対照群の 1.5 に対してリルザブルチニブ群で 2.9）が認められた結果、平均生存胎児数（9.0）が同時対照群（11.4）と比較して減少した。また、顕著な平均胎児体重減少（対照群の 3.8 g に対して 2.9 g）が 500 mg/kg/日で認められた。胎児の性比にはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

500 mg/kg/日では、1 腹（1 胎児）で外表奇形（全身浮腫）が、5 腹（6 胎児）で内臓奇形が、3 腹（4 胎児）で骨格奇形が、それぞれ認められた。内臓奇形のみられた 4 胎児では尿生殖器系の異常（無腎、腎臓位置異常又は腎臓変形、尿管欠損又は尿管短小及び性腺位置異常など）が認められ、残り 2 胎児では大血管奇形（食道背側大動脈弓又は左鎖骨下動脈など）が認められた。500 mg/kg/日では、平均胎児体重減少に一致して、骨格の一部に骨化遅延（胸椎、胸骨裂）を有する胎児の発現率が上昇した。150 mg/kg/日以下では、外表、内臓及び骨格所見は認められなかった。

TK パラメータを表 32 に要約する。全ての妊娠雌ラットで、リルザブルチニブの経口投与後にリルザブルチニブへの曝露が認められた。リルザブルチニブの t_{max} は、妊娠 6 日には 0.5～1.0 時間、妊

娠 17 日には 0.25～0.5 時間であった。妊娠 6～17 日にリルザブルチニブの蓄積は認められなかった。投与開始（時間 0）から無限大時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{inf}）を指標とするリルザブルチニブの曝露量は、50 mg/kg/日と 150 mg/kg/日の間では用量比を上回って増加し、150 mg/kg/日と 500 mg/kg/日の間では用量比を下回って増加した。

表 32 - Exploratory rat embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)		AUC_{inf} (ng•h/mL)	
	GD6	GD17	GD6	GD17
50	1280	1080	3700	4100
150	2600	2200	15800	15300
500	3010	2760	24300	33500

Abbreviations: AUC_{inf}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity; C_{max}: Maximum plasma concentration; GD: Gestation day

母動物にリルザブルチニブを 500 mg/kg/日の用量で投与したところ、母動物体重増加量及び摂餌量の減少が認められたため、忍容性は良好でなく、最大耐量（MTD）を超えていると判断された。500 mg/kg/日では外表、内臓及び骨格の変化が認められた。母動物毒性及び胚・胎児変化を含む胚・胎児毒性に関する NOAEL は、150 mg/kg/日と判断された。胚・胎児毒性に関する NOAEL での妊娠 17 日における C_{max} 及び AUC_{inf} は、それぞれ 2200 ng/mL 及び 15300 ng•h/mL であった。

6.2.1.2 ラットを用いた強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験

この試験では、妊娠ラットの器官形成期にリルザブルチニブを強制経口投与したときの母動物毒性及び胚・胎児毒性を評価するとともに、リルザブルチニブの TK を検討した（DVR0378 試験 [表 2.6.7.13 A]）。適時交配した雌の Wistar Han ラット（1 群 20 匹、60～70 日齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 300 mg/kg/日の用量で、妊娠 7 日から妊娠 17 日まで経口投与した。交尾確認日を妊娠 0 日とした。別の 3 匹（媒体対照群）及び 1 群 6 匹（リルザブルチニブ群）の妊娠ラットをおき、妊娠 7 日及び妊娠 17 日にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用の血液検体を採取した。

母動物毒性の検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量及び剖検（卵巣、子宮）とした。妊娠 21 日に妊娠ラットを安楽殺して剖検し、胎児の体重測定、性別判定、並びに外表、内臓及び骨格検査を実施した。胎盤重量を測定した。TK 評価用の血液検体を妊娠 7 日及び妊娠 17 日に採取した。

試験期間中、全てのラットが生存した。リルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、異常呼吸音の発現率上昇が 150 mg/kg/日以上で認められた。被験物質関連の平均母動物体重増加量減少が、300 mg/kg/日で妊娠 7～18 日（対照の 72%）及び妊娠 7～21 日（対照の 85%）の区間に認められた。

平均摂餌量減少が、300 mg/kg/日で妊娠 7～18 日（対照の 79%）及び妊娠 7～21 日（対照の 84%）の区間に認められた。

母動物の剖検時にリルザブルチニブ関連の肉眼所見はみられず、黄体数、着床数、着床前及び着床後胚胎児死亡率、同腹児数、生存及び死亡胎児数、早期及び後期吸収胚数、胎児体重、並びに雄の生存胎児の比率の 1 腹当たりの平均値を含む卵巣及び子宮のパラメータには、被験物質関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブに関連した外表、内臓及び骨格の奇形及び変異はみられず、胎児の平均骨化部位数には被験物質関連の変化は認められなかった。

TK パラメータを表 33 に要約する。全ての妊娠雌ラットで、リルザブルチニブの経口投与後にリルザブルチニブへの曝露が認められた。投与開始（時間 0）から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{0-t}）を指標とする曝露量は、妊娠 7 日には用量の増加に伴ってほぼ用量比例的に増加し、妊娠 17 日には用量比を下回って増加した（50 mg/kg/日から 300 mg/kg/日までの 6 倍の用量増加で、曝露量は 4 倍に増加）。C_{max} を指標とする曝露量は、妊娠 7 日及び妊娠 17 日に用量比を下回って増加した（50 mg/kg/日から 300 mg/kg/日までの 6 倍の用量増加で約 1 倍の増加）。

表 33 - Rat embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-t} (ng•h/mL)	
	GD7	GD17	GD7	GD17
Rilzabrutinib				
50	2590	2300	4280	3940
150	3470	2970	10600	18200
300	3390	3260	31200	15800
PRN618				
50	133	97.2	335	367
150	241	207	1010	1450
300	182	239	2760	1830
PRN834				
50	375	341	2060	2380
150	636	1060	5910	9210
300	1090	1160	23100	11600

Abbreviations: AUC_{0-t}: Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to time t (h); C_{max}: Maximum plasma concentration; GD: Gestation day

以上、母動物毒性に関する NOAEL は、体重及び摂餌量の変化に基づき、150 mg/kg/日と判断された。発生毒性に関する NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。母動物の NOAEL での妊娠 17 日の C_{max} 及び AUC_{0-t} は、それぞれ 2970 ng/mL 及び 18200 ng•h/mL であった。

6.2.2 ウサギ

6.2.2.1 非妊娠ウサギを用いた探索的 7 日間経口投与毒性試験

非妊娠ニュージーランドホワイトウサギ（1 群 3 匹、21 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150 又は 500 mg/kg/日の用量で、7 日間強制経口投与した（DVR0300 試験[表 2.6.7.6]）。TK 解析のため、全ての動物から 1 日目に血液検体を採取した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、摂餌量、体重及び剖検とした。TK 評価用の血液検体を採取した。

リルザブルチニブ関連の死亡は認められなかった。被験物質関連の一般状態の変化として、糞排泄量減少が 150 mg/kg/日以上で認められた。対照群で 2.1%の平均体重増加がみられたのに対して、150 mg/kg/日以上では体重減少が認められた（0 日目から 7 日目までの変化率は、150 mg/kg/日で-3.3%、500 mg/kg/日で-12.1%）。対照と比較した用量依存的な平均摂餌量減少（0～7 日目）が、150 mg/kg/日（-44%）及び 500 mg/kg/日（-92%）で認められた。肉眼所見として、非腺胃の褪色巣（1 か所）が 150 mg/kg/日群の雌 1 匹にみられ、腺胃粘膜の暗色巣（1 か所）、腎臓褪色及び肝臓斑紋が 500 mg/kg/日で認められた。

TK パラメータを表 34 に要約する。被験物質投与群のウサギで、リルザブルチニブの反復経口投与後に、リルザブルチニブへの全身曝露が認められた。全体として、リルザブルチニブの曝露量（C_{max} 及び AUC_{last} 値）は、50 mg/kg/日から 150 mg/kg/日にかけては用量比を上回って増加し、150 mg/kg/日から 500 mg/kg/日にかけては用量比を下回って増加した。評価した用量を通して、平均 t_{max} 値は 0.52～1.8 時間であった。

表 34 - Exploratory 7-day toxicity study in rabbits: Summary of toxicokinetic parameters

Dose	Day 0	
	C_{max} (ng/mL)	AUC_{inf} (ng•h/mL)
50	601	635
150	8680	19100
500	9840	68700

Abbreviations: AUC_{inf}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity; C_{max}: Maximum plasma concentration

以上、体重減少及び摂餌量減少の重症度、並びに肉眼所見の肝臓斑紋に基づくと、500 mg/kg/日では MTD を超えていた。その後に実施する予定の妊娠ウサギを用いた用量設定試験で許容可能な母動物毒性がみられる高用量として、150 mg/kg/日が妥当と判断された。150 mg/kg/日での C_{max} 及び AUC_{last} 値は、それぞれ 8680 ng/mL 及び 19100 ng•h/mL であった。

6.2.2.2 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する探索的強制経口投与用量設定試験

妊娠ニュージーランドホワイトウサギを用いた用量設定試験を実施し、リルザブルチニブの毒性及び TK を評価した（DVR0299 試験 [表 2.6.7.11]）。この試験では、適時交配した妊娠ウサギ（1 群 8 匹、18～19 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、100 及び 150 mg/kg/日の用量で、妊娠 6 日から妊娠 19 日まで強制経口投与した。

母動物毒性の検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、体重増加量及び摂餌量とした。妊娠 29 日に妊娠ウサギを安楽殺して剖検し、死亡体重及び妊娠子宮重量を測定した。子宮の検査で、生存及び死亡胎児数、早期及び後期吸収胚数、並びに異常の有無を調べた。卵巣を検査して黄体数を数え、着床数も数えた。生存胎児について、体重測定、性別判定、並びに外表、内臓及び骨格検査を実施した。TK 評価用の血液検体を、妊娠 6 及び 19 日に 1 群 4 匹のウサギから採取した。

全てのウサギが、計画剖検時まで生存した。被験物質関連の一般状態の変化として、糞排泄量減少が 100 mg/kg/日以上で認められた。全てのリルザブルチニブ投与群で、対照群と比較した体重増加量の減少が認められた（50、100 及び 150 mg/kg/日群でそれぞれ-43%、-37%及び-52%）。これは、投与の最初の 3 日間での対照群の平均体重増加量と比較したわずかで用量依存的な平均体重増加量減少にほとんどが起因した。投与期間後に体重の回復が認められた。対照群と比較した摂餌量減少が全てのリルザブルチニブ投与群で認められた（50、100 及び 150 mg/kg/日群でそれぞれ-12%、-9%及び-24%）。この変化は投与の最初の 3 日間に最も顕著であった。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見はみられず、黄体数、着床数及び生存胎児数の変化も認められなかった。

150 mg/kg/日での着床後胚胎児死亡率の上昇（対照の 5.3%と比較して 10.4%）は、早期吸収率（9.4%）が同時対照（2.5%）と比較して上昇したことによるものであった。その結果、150 mg/kg/日での平均生存胎児数（9.6）は同時対照（10.9）と比較して減少したが、それでも平均背景対照値（9.0）と同程度であった。150 mg/kg/日で同時対照と比較した平均妊娠子宮重量減少（-12.6%）が認められたが、それでも平均値は背景対照値と同程度であった。

胎児体重及び胎児性比にはリルザブルチニブの影響は認められなかった。

奇形（外表、内臓及び骨格）が 50 mg/kg/日以上でみられ、50、100 及び 150 mg/kg/日群でそれぞれ 3 腹（3 胎児）、2 腹（3 胎児）及び 3 腹（4 胎児）に認められた。外表奇形（口蓋裂、前足の過屈曲）が、50 及び 100 mg/kg/日でそれぞれ 1 腹（1 胎児）及び 2 腹（2 胎児）に認められた。主要な内臓所見として、心血管系の異常（心臓、大血管）が、50、100 及び 150 mg/kg/日でそれぞれ 1 腹（1 胎児）、1 腹（2 胎児）及び 1 腹（1 胎児）に、腎臓の異常（腎臓の位置異常及び変形、尿管短小）が 150 mg/kg/日で 1 腹（1 胎児）に、それぞれ認められた。骨格奇形（胸骨癒合）が 50 及び 150 mg/kg/日でそれぞれ 1 腹（1 胎児）及び 3 腹（3 胎児）に認められた。

TK パラメータを表 35 に要約する。全ての妊娠雌ウサギで、リルザブルチニブの経口投与後にリルザブルチニブへの曝露が認められた。リルザブルチニブの t_{max} は、妊娠 6 日には 0.25～1.0 時間、妊娠 19 日には 0.25～0.5 時間であった。50 mg/kg/日で、妊娠 6 日から妊娠 19 日にかけてリルザブルチニブのわずかな蓄積が認められた。100 及び 150 mg/kg/日では、妊娠 6 日から妊娠 19 日にかけてリ

ルザブルチニブの蓄積は認められなかった。妊娠 6 及び 19 日におけるリルザブルチニブの全身曝露量（AUC_{inf}）は、50 mg/kg/日から 100 mg/kg/日にかけては用量比を上回って増加し、100 mg/kg/日から 150 mg/kg/日にかけては用量に比例して増加した。

表 35 - Exploratory rabbit embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)		AUC_{inf} (ng•h/mL)	
	GD6	GD19	GD6	GD19
50	945	1820	1050	1760
100	3030	3420	7010	5780
150	3700	3460	8340	8550

Abbreviations: AUC_{inf}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity; C_{max}: Maximum plasma concentration; GD: Gestation day

以上、妊娠ウサギにリルザブルチニブを 50、100 又は 150 mg/kg/日の用量で経口投与したところ、全ての用量で母動物毒性が認められた。150 mg/kg/日では、観察された母動物毒性に関連すると考えられる早期吸収率の不明確な軽度の上昇が認められた。胎児内臓異常が 50 mg/kg/日以上（心血管系）及び 150 mg/kg/日（腎臓）で認められたことから、リルザブルチニブの催奇形性が示唆されたが、異常の発現率は用量依存的に増加しなかったことから、被験物質との関連は不明確であった。母動物毒性に関する NOAEL は 100 mg/kg/日、胚・胎児毒性に関する NOAEL は 50 mg/kg/日以下であった。50 mg/kg/日での妊娠 19 日における母動物の C_{max} 及び AUC_{inf} 値は、それぞれ 3420 ng/mL 及び 5780 ng•h/mL であった。

6.2.2.3 ウサギを用いた強制経口投与による胚・胎児発生に関する試験

この試験では、妊娠ウサギの器官形成期にリルザブルチニブを連日強制経口投与したときの母動物毒性及び胚・胎児毒性を評価するとともに、TK を検討した（DVR0379 試験 [表 2.6.7.13 B]）。この試験では、適時交配した妊娠ニュージーランドホワイトウサギ（1 群 20 匹、4～6 か月齢）に、0（媒体対照）、10、30 及び 100 mg/kg/日の用量で妊娠 7 日から妊娠 19 日まで経口投与した。交尾確認日を妊娠 0 日とした。別の 2 匹（媒体対照群）及び 1 群 3 匹（リルザブルチニブ群）の妊娠ウサギをおき、妊娠 7 日及び妊娠 19 日にリルザブルチニブ、PRN618（微量代謝物）及び PRN834（微量代謝物）の TK 評価用の血液検体を採取した。

母動物毒性の検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、体重増加量及び摂餌量とした。妊娠 29 日に妊娠ウサギを安楽殺して剖検し、妊娠転帰を評価するとともに、死亡体重及び妊娠子宮重量を測定した。子宮の検査で、生存及び死亡胎児数、早期及び後期吸収胚数、並びに異常の有無を調べた。胎盤を検査した。卵巣を検査して黄体数を数え、着床数も数えた。生存胎児について、体重測定、性別判定、並びに外表、内臓及び骨格検査を実施した。

全てのウサギが計画剖検時まで生存し、リルザブルチニブ関連の一般状態の変化は認められなかった。平均母動物体重には、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。被験物質関連の平均母動物体重増加量減少が 100 mg/kg/日で妊娠 7 日から妊娠 13 日まで認められ、その結果、妊娠 7 日から妊娠 20 日までの投与期間中の体重増加量が減少した（対照の 71%）。また、被験物質関連の平均母動物摂餌量減少（対照の 89%）が、100 mg/kg/日で認められた。平均母動物体重増加量及び摂餌量は投与終了後の期間に回復した。

リルザブルチニブ関連の肉眼所見はみられず、胎盤、卵巣及び子宮パラメータのいずれにも変化は認められなかった。

リルザブルチニブに関連した胎児外表、内臓及び骨格の奇形及び変異はみられず、平均胎児骨化部位数に被験物質関連の変化は認められなかった。

TK パラメータを表 36 に要約する。全ての妊娠ウサギで、リルザブルチニブ経口投与後にリルザブルチニブへの曝露が認められた。妊娠 7 及び 19 日におけるリルザブルチニブの t_{max} は、全ての用量で 0.5～0.8 時間であった。妊娠 7 及び 19 日の AUC_{0-t} 及び C_{max} を指標とするリルザブルチニブの曝露量は、用量比を上回って増加した（10 mg/kg/日から 100 mg/kg/日への 10 倍の用量増加に対して、146～416 倍の増加）。10、30 及び 100 mg/kg/日での蓄積比は、それぞれ 3.23、2.94 及び 1.76 であったことから、妊娠 7～19 日の反復経口投与によるリルザブルチニブの蓄積が示唆された。

表 36 - Rabbit embryo-fetal development study: Summary of toxicokinetic parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-t} (ng•h/mL)	
	GD7	GD19	GD7	GD19
Rilzabrutinib				
10	10.7	35.1	9.56	27.3
30	232	340	175	313
100	2240	5110	3980	6920
PRN618				
10	7.59	33.6	7.72	40.5
30	129	188	156	328
100	813	1820	2510	5230
PRN834				
10	28.3	21.1	280	124
30	162	142	1110	903
100	910	1280	6270	6300

Abbreviations: AUC_{0-t}: Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to time t (h); C_{max}: Maximum plasma concentration; GD: Gestation day

以上、妊娠ウサギにリルザブルチニブを 10、30 又は 100 mg/kg/日の用量で器官形成期（妊娠 7～19 日）に経口投与したところ、100 mg/kg/日で母動物の体重増加量及び摂餌量が減少した。母動物毒性及び胚・胎児発生に関する NOAEL は、それぞれ 30 及び 100 mg/kg/日と判断された。母動物毒性に関する NOAEL（30 mg/kg/日）での妊娠 19 日の C_{max} 及び AUC_{0-t} 値は、それぞれ 340 ng/mL 及び 313 ng•h/mL であった。発生に関する NOAEL（100 mg/kg/日）での妊娠 19 日の C_{max} 及び AUC_{0-t} 値は、それぞれ 5110 ng/mL 及び 6920 ng•h/mL であった。

6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

6.3.1 ラットを用いた強制経口投与による出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

この試験では、リルザブルチニブをラットの母動物に着床から離乳まで投与したときの毒性として、妊娠、分娩及び授乳への影響を評価するとともに、F_1 出生児の成長、生存性及び発達に及ぼす影響を評価した。F_1 世代の生殖能も評価した（DVR0492 試験 [表 2.6.7.14]）。この試験では、雌の Sprague Dawley ラット（F_0）（1 群 25 匹、10～12 週齢）に、0（媒体対照）、50、150 又は 300 mg/kg/日の用量で、妊娠 6 日から分娩後 20 日まで経口投与した。交尾確認日を妊娠 0 日とした。繁殖用に選別した F_1 ラット（1 群雌雄各 25 匹）を、生後 120～125 日（雄）又は妊娠 15 日（雌）まで飼育した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、生殖能、分娩、分娩異常（延長又は難産）、死産児数、生存児数、同腹児の生存性及び生存率、性別判定、発達指標（亀頭包皮分離、膣開口）、F_1 の神経行動評価（聴覚性驚愕反応、自発運動量、学習及び記憶［Biel 迷路］）、性周期長、子宮内成長及び生存率、並びに剖検とした。全ての雌を自然分娩させた。同腹児の生後 21 日の離乳まで、母動物を同居させた。

F_0 動物の生存率にはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。300 mg/kg/日群の F_0 雌 1 匹（動物番号 6554）で、分娩後 7 日の投与約 1.5 時間後に死亡が発見されたが、肉眼所見として肺の暗赤色化及び胸腔内白色内容物が認められたことから、投与過誤による死亡と考えられた。150 mg/kg/日群の F_0 雌 1 匹（動物番号 6479）で、体重減少（-24.3%）、並びに一般状態の変化として四肢褪色、呼吸数増加、努力性呼吸、眼周囲赤色物及び／又は糞排泄量減少が分娩後 7～15 日に認められたため、分娩後 15 日に瀕死安楽殺した。肉眼所見として食道穿孔及び胸腔内赤色液が認められたことから、死因は投与過誤と考えられた。150 mg/kg/日群の別の F_0 雌 1 匹（動物番号 6518）で分娩後 1 日に死亡が発見されたが、死亡前に特筆すべき一般状態の変化及び体重変化はみられなかった。また、剖検所見も認められなかった。300 mg/kg/日群の他のラットにはリルザブルチニブ関連の死亡はみられなかったことから、この 1 匹の死亡はリルザブルチニブ関連ではないと考えられた。

リルザブルチニブ関連の変化が、150 mg/kg/日以上で、妊娠中の平均体重、体重増加量及び摂餌量に認められた。平均体重増加量減少及びそれに対応する平均摂餌量減少が妊娠中の投与期間（妊娠 6～20 日）を通してみられた結果、150 mg/kg/日以上の群での平均絶対体重の対照群と比較した減少が、

妊娠 12～20 日（最大で-6.6%）及び妊娠 9～20 日（最大で-11.4%）に認められた。妊娠中の平均体重減少の結果として、分娩後 1～17 日における 300 mg/kg/日群の平均絶対体重は、対照群より少なかった（最大で-10.5%）。また、300 mg/kg/日群の平均摂餌量は、分娩後期間を通して対照群よりわずかに少なかった。

F_0雌において、リルザブルチニブ関連の一般状態の変化はみられず、平均妊娠期間及び分娩への影響も認められなかった。分娩異常の徴候はみられず、被験物質関連の肉眼所見、並びに着床痕数及び説明不能部位数の変化も認められなかった。

平均 F_1出生児数、生存同腹児数、出生時の腹ごとの雄の比率及び生後生存率には、被験物質関連の変化は認められなかった。リルザブルチニブ関連の F_1出生児体重減少が 300 mg/kg/日で認められた。生後 1 日における F_1出生児の平均出生時体重は、対照群より少なかった（雄で-9.0%、雌で-9.3%）。F_1出生児の体重増加量は、離乳前期間（生後 1～21 日）を通して全体的に対照群より少なく、その結果、生後 4～21 日の F_1出生児体重は、最大で対照群と比較して雄で 23.5%、雌で 20.6%少なかった。また、一般状態の変化として、低体長が、対照群で 3 腹の 3 出生児にみられたのと比較して、300 mg/kg/日群では 12 腹の 22 出生児に認められた。300 mg/kg/日での平均 F_1出生児体重及び体重増加量における被験物質関連の変化は、母動物（F_0）へのリルザブルチニブ投与に起因するものであり、毒性と考えられた。

離乳後期間中に、300 mg/kg/日群の F_1出生児の平均体重が対照群と比較して減少した。生後 21 日の F_1出生児の離乳後平均体重は、対照群と比較して雄で 19.0%、雌で 15.8%少なかった。雌雄の F_1出生児の対照群と比較した体重増加量減少は生後 21～28 日にもみられたが、その後の平均体重増加量は対照群と同程度であった。生後 28～70 日における 300 mg/kg/日群の F_1出生児の平均絶対体重は、最大で対照群と比較して雄で 15.4%、雌で 12.4%少なかった。また、亀頭包皮分離及び膣開口達成時の 300 mg/kg/日群における F_1の平均体重は、対照群と比較して雄で 8.2%、雌で 12.3%少なかった。300 mg/kg/日での離乳後平均体重の変化は被験物質関連と考えられ、離乳前期間におけるこの群の出生児体重の変化に起因するものであった。

300 mg/kg/日群の F_1出生児体重は離乳前期間（生後 1～21 日）に減少したが、出生児生存率に母動物（F_0）へのリルザブルチニブ投与の影響は認められなかった。また、F_1の離乳後発達指標（亀頭包皮分離、膣開口）及び神経行動評価（聴覚性驚愕反応、自発運動量、Biel 迷路）には毒性変化は認められなかった。

F_1の生殖能にはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。生殖パラメータの内訳は、雌雄の交尾率（mating index）、雌雄の受胎率、雄の交尾率（copulation index）、雌の妊娠率、性周期長及び交配所要期間とした。

F_1出生児において、母動物（F_0）へのリルザブルチニブ投与に起因すると考えられるリルザブルチニブ関連の肉眼所見は認められなかった。平均黄体数、着床数及び F_2胚の子宮内生存率には、母動物（F_0）へのリルザブルチニブ投与の影響は認められなかった。子宮内パラメータは、着床後胚胎児死亡の平均腹比率及び生存 F_2胚の平均数及び腹比率とした。

以上、母動物（F_0）の全身毒性に関する NOAEL は、150 mg/kg/日以上でリルザブルチニブ関連の体重、体重増加量及び摂餌量の変化がみられたことから 50 mg/kg/日と判断された。F_1 新生児／発生毒性に関する NOAEL は、300 mg/kg/日で被験物質関連の一般状態の変化、並びに体重及び体重増加量の変化がみられたことから 150 mg/kg/日と判断された。F_1 親動物の全身毒性、F_1 の生殖毒性及び F_2 の胚毒性に関する NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。

6.4 幼若動物を用いた試験

性成熟した Wistar ラットを用いた反復投与毒性試験でみられた変化との直接比較を可能にするため、また計画された最終的な幼若動物を用いた毒性試験で使用する用量を設定するため、幼若 Wistar ラットを用いた探索的毒性試験を実施した。

6.4.1 幼若ラットを用いた探索的 25 日間強制経口投与毒性試験

幼若ラットを用いたリルザブルチニブの 25 日間毒性試験を実施した（JUV0024 試験 [表 2.6.7.15]）。この試験（主試験及び TK 相）では、最初は、雌雄の Wistar [Crl:WI(Han)]ラットに、0（媒体対照）、100、300 又は 1000 mg/kg/日の用量で強制経口投与した。しかし、TK 相のラットで単回投与後（生後 10 日）に死亡、毒性及び一般状態の毒性変化がみられたことから、主試験に割り当てられた全てのラット及び残りの未投与 TK 用ラットの用量を、30、100 又は 200 mg/kg/日に減量し、生後 10～34 日に投与した。別の雌雄各 6 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 33 匹（リルザブルチニブ群）のラットをおき、生後 10 及び 34 日にリルザブルチニブの TK 評価用の血液検体を採取した。30、100 及び 200 mg/kg/日で TK 相のラットの数を増やしたため、生後 10 日の TK 検体採取に十分な数のラットが得られた。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、体重増加量、摂餌量、性成熟（雌）及び剖検とした。

主試験及び TK 相におけるリルザブルチニブ関連の死亡を表 37 に詳述する。

表 37 - Exploratory juvenile toxicity study: Mortality

Study Phase	Mortality [a]											
	0		30		100		200		300		1000	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Main	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
TK	0	0	1	0	2	0	6	6	2	2	2	2

Abbreviations: F: Females; M: Male; TK: Toxicokinetics

a Total number: includes animals found dead, unscheduled euthanasia, and missing (presumed cannibalized)

リルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、脱水及び削痩が 100 mg/kg/日以上で、異常呼吸音及び毛繕い低下が 200 mg/kg/日で、それぞれ認められた。

体重、摂餌量、性成熟（雌）及び肉眼所見には、被験物質関連の変化は認められなかった。

TK パラメータを表 38 に要約する。30～200 mg/kg/日群の雌雄のラットの t_{max} は、生後 10 日には 0.267～4 時間、生後 34 日には 0.25～1 時間であった。生後 10 日の雄の C_{max} は、30 mg/kg/日から 100 mg/kg/日にかけては用量に比例して増加したが、100 mg/kg/日から 200 mg/kg/日にかけては用量比を上回って増加した。雌の C_{max} 及び AUC_{last} は、30 mg/kg/日から 200 mg/kg/日にかけて非用量比例的に増加した。生後 34 日の雌の C_{max} は、用量に比例して増加した。雌雄の AUC_{last} は用量に比例して増加した。生後 34 日にリルザブルチニブの蓄積は認められなかった。リルザブルチニブの曝露量には性差が認められ、30～200 mg/kg/日の用量で単回又は反復投与したときの雌の曝露量は最大で雄の 3 倍であった。

表 38 - Exploratory juvenile toxicity study: Summary of rilzabrutinib TK parameters

Rilzabrutinib (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)		AUC_{last} (ng•h/mL)	
		PND 10	PND 34	PND 10	PND 34
30	M	672	419	3730	1190
	F	2270	1130	2570	2020
100	M	1950	1110	14200	3800
	F	2900	2590	22300	9210
200	M	7750	2400	39200	8770
	F	20000	4480	108000	18700

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male; PND: Postnatal day; TK: Toxicokinetics

以上、Wistar Han ラットにリルザブルチニブを連日 25 日間強制経口投与したときの NOAEL は、高用量で死亡及び一般状態の変化がみられたことから、30 mg/kg/日と判断された。NOAEL での生後 34 日の C_{max} 値は、雄で 419 ng/mL、雌で 1130 ng/mL であった。NOAEL での生後 34 日の AUC_{last} 値は、雄で 1190 ng•h/mL、雌で 2020 ng•h/mL であった。

7　局所刺激性試験

局所刺激性試験は実施しなかった。

8　その他の毒性試験

8.1　抗原性試験

抗原性試験は実施しなかった。

8.2　免疫毒性試験

リルザブルチニブの免疫毒性試験は実施しなかった。免疫毒性評価項目（血液学的検査、免疫フェノタイピング［フローサイトメトリー］、解剖病理学的検査など）は、GLP 適用の反復投与毒性試験で評価した。

ラットを用いた 1、3 及び 6 か月間反復投与毒性試験において、総 T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパー T リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8a^+$）、B 細胞（$CD3^-CD45RA^+$）及び NK 細胞（$CD3^-CD161a^+$）には、リルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。リンパ系組織の非毒性的な病理組織学的所見として、1 か月間反復投与毒性試験では頸部リンパ節のリンパ球数減少（軽微から軽度）及び胸腺の可染小体マクロファージ数増加が、3 か月間反復投与毒性試験では胸腺のリンパ球数減少（軽微）が、500 mg/kg/日で認められた。

イヌを用いた 1、3 及び 9 か月間反復投与毒性試験において、総 T リンパ球（$CD3^+$）、ヘルパーT リンパ球（$CD3^+CD4^+$）、細胞傷害性 T リンパ球（$CD3^+CD8a^+$）及び B 細胞（$CD3^-CD21^+$）には、リルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。リンパ系組織および造血組織の可逆的な病理組織学的所見が 1 及び／又は 3 か月間反復投与毒性試験でみられ、その内訳は、胸腺、パイエル板、リンパ節の胚中心及び／又は骨髄の軽微から軽度の細胞密度低下（リンパ球）であり、血液学的検査及びリンパ球部分母集団には影響が認められなかった。これらの病理組織学的所見は、1 か月間反復投与毒性試験では 300 mg/kg/日までの用量で毒性ではないと考えられたのに対し、3 か月間反復投与毒性試験では 100 mg/kg/日以上の用量で毒性と考えられた。9 か月間反復投与毒性試験では高用量の 50 mg/kg/日まで、リンパ系組織及び造血組織の変化は認められなかった。

8.3　機序解明試験

機序解明試験は実施しておらず、本 Module の他の部分でも考察していない。

8.4　薬物乱用傾向の評価

8.4.1　[redacted] in vitro 薬理モデルを用いたリルザブルチニブ及びチオシアネートの評価

様々な細胞又は細胞株に由来する受容体、イオンチャネル及びトランスポーターのパネルに対する放射性リガンド結合アッセイを用いて、リルザブルチニブの 10 µmol/L の濃度での評価を実施した

（DVR0095 試験 [表 2.6.3.1]）。リルザブルチニブは、4 種類の標的に対して制御特異的結合阻害活性を示した。その内訳は、ムスカリン M2 受容体（50.7%）、ニューロキニン NK2 受容体（50.2%）、ナトリウムチャネル部位 2（59.3%）及びドパミントランスポーター（81.8%）であった。本パネルの他の全ての受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する活性は 50%未満であった。In vitro 試験により、げっ歯類、イヌ及びヒトの血漿におけるリルザブルチニブのタンパク結合率は、それぞれ 99%以上、96%及び 97.5%であることが示された（DVR0093 及び DVR0094 試験 [表 2.6.5.6 A]）。遊離型分率を 2.5%と仮定すると、400 mg 1 日 2 回（BID）に対応する C_{max}（205 ng/mL）でのリルザブルチニブの血漿中遊離画分は 5 ng/mL の高い値となる。

検討した濃度（10 µmol/L）は治療濃度を超えているため、本スクリーニングデータから予想される薬理作用はないと考えられる。なぜなら、臨床データによると、C_{max} を指標とする全身曝露量は約 1 µmol/L であり、本アッセイで検討した 10 µmol/L の濃度より一桁低いからである。また、これら 4 種類の標的は中枢神経系で役割を果たすが、リルザブルチニブは血液脳関門を通過しないことが示されている(26)。定量的全身オートラジオグラフィにより組織内分布を評価したところ、有色ラットの脳又は脊髄で検出されたリルザブルチニブは微量であり（C_{max} で 0.6 µg 等量/g 未満）、非有色ラットでこれらの組織に認められたリルザブルチニブの濃度は極めて低い値にすぎなかった（0.20 µg 等量/g 組織未満）（Module 2.6.4 [5.2 項]、Module 4.2.2.5-1 [DVR0159]）。さらに、雌の非有色 Wistar Han ラットにリルザブルチニブを 50 mg/kg の用量で単回経口投与したところ、脳脊髄液中にリルザブルチニブは検出されなかった（Module 2.6.4 [5.3 項]、Module 4.2.2.7-1 [DVR0212]）。したがって、中枢神経系におけるリルザブルチニブの曝露はないことから、[redacted] アッセイで認められたムスカリン M2 受容体、ニューロキニン NK2 受容体、ナトリウム（Na^+）チャネル部位 2 及びドパミントランスポーターへの結合は、臨床的に重要でない。

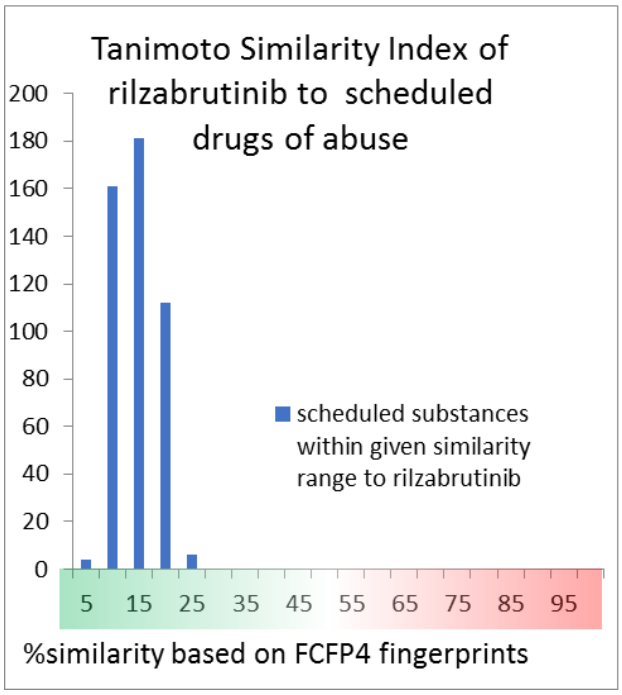
リルザブルチニブの主要代謝物であるチオシアネート（PRN4400 又は RA16689850A と命名）は、ヒト血漿中で検出され、脳透過性を示す(27)。チオシアネートは血清の正常な生理学的構成成分であり、ヒトでの正常濃度は一般に 50～250 µmol/L（3～15 mg/L）である(28)。様々な細胞又は細胞株に由来する受容体、イオンチャネル及びトランスポーターのパネルに対する放射性リガンド結合アッセイを用いて、チオシアネートのスクリーニングを 10 µmol/L の濃度で実施した。中枢神経系に発現し、乱用傾向に関連する受容体及びトランスポーターを含めて、本パネルの全ての受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する活性は 50%未満であった（Module 4.2.1.2-10 [100056422_014-I&I-21]）。

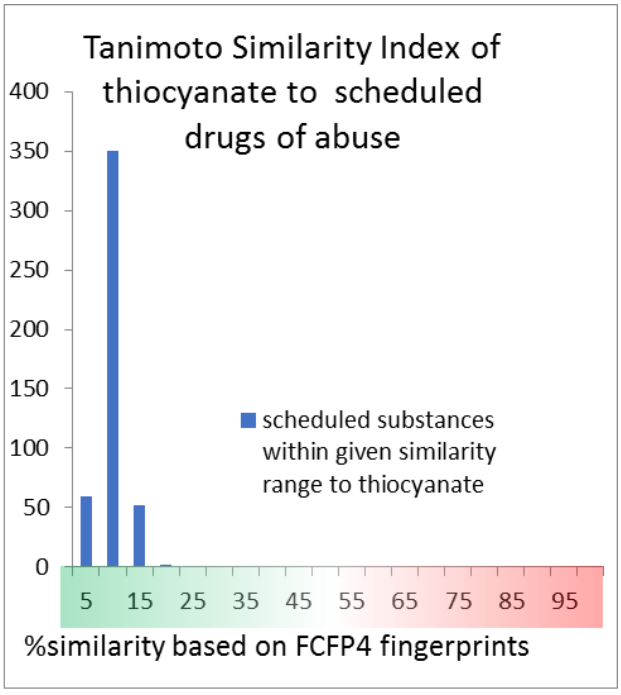
8.4.2 既知の乱用薬物に対するリルザブルチニブ及びチオールの構造的類似性

リルザブルチニブ及び PRN4400（チオシアネート）の分子構造を、2021 年 3 月 12 日までに米国麻薬取締局（DEA）の公表リスト I/II/III/IV/V 項（規制物質のスケジュール(29)）に記載された指定物質と照合して評価した。指定物質の参照データベースには 504 種類の物質が記載されており、それらは更にアヘン／オピエート（100 種類超の物質）、アヘン誘導体（20 種類超の物質）、幻覚剤（50 種類超の物質）、抗うつ剤、鎮静剤（80 種類超の物質）、覚醒剤（30 種類超の物質）、大麻類似薬

（10 種類超の物質）、前駆物質（5 種類超の物質）、ステロイド／筋肉増強剤（50 種類超の物質）及びその他のサブグループに分類される。タニモト係数は、構造類似性を[%]として示す。この係数が高いほど、その化合物は指定物質に類似している。高度の類似性は構造的特徴を共有する割合が大きいことを示しており、乱用傾向を示す可能性があると考えられる。反対に、指定物質との類似性が低い化合物は、乱用に関連する作用機序を共有する確率が低い。一般に、問題となる程度の類似性ありとして受け入れられている係数値は 85%以上である(30)。リルザブルチニブ及びチオシアネートの化学構造を、現在の乱用に関する 504 種類の DEA 指定薬物と比較したところ、リルザブルチニブのタニモト類似性係数は 23%以下であり、類似性は極めて低いことが示された（図 1）。最もスコアの高い物質はオピエートのクラスで認められたが、問題となる特定のモチーフは共有していない。タニモト類似性によると、全ての指定物質は、全体的類似性及び個々の構造的特徴のいずれの観点からもリルザブルチニブとは異なっている。チオシアネートについて算出された全ての類似性は 20%未満であり、擬ハロゲン化合物に対する指定物質の問題となる構造的重複はないことを示している。

図 1 - Tanimoto Similarity Index of Rilzabrutinib and Thiocyanate





8.4.3 非臨床データ

リルザブルチニブの非臨床試験において、乱用性及び離脱のエビデンスは認められなかった。Irwin の変法に基づく機能観察総合評価法では、最高用量を投与したラットにおいても、リルザブルチニブに関連した肉眼行動的、生理的及び神経学的変化は認められなかった（DVR0176 試験 [表 2.6.3.4]）。ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験（それぞれ 3.1 項及び 3.2 項）では、治療時曝

露量及びその数倍の曝露量において、乱用性及び離脱の徴候は認められなかった。トランスジェニックマウスを用いた試験（5.1.3 項 Module 4.2.3.4.2-3 [DIV0407]、5.1.4 項 Module 4.2.3.4.2-4 [DIV0455]及び 5.1.5 項 Module 4.2.3.4.1-2 [1281-20014]）では、行動に関する中枢神経系の徴候は認められなかった。十分な曝露量レベルではラット及びイヌにおいて PRN4400 が生成することがデータで示されていることから、薬物依存性及び乱用性を含めた全体の毒性評価に対するチオシアネートの関与については十分に確認されていると推測される。

8.4.4 結論

リルザブルチニブ及びその主要代謝物である PRN4400（チオシアネート）の分子構造、[redacted]評価、並びに安全性薬理試験及び一般毒性試験での in vivo 評価によると、これらの化合物が薬物乱用性及び依存性を示す可能性はないと考えられる。リルザブルチニブ又はチオシアネートについて、薬物依存性及び乱用のリスクを評価する特定の行動試験は実施していないが、いずれの化合物についても、乱用性又は依存性を示唆するエビデンスはない。

8.5 代謝物

リルザブルチニブはヒトにおいて（主に CYP3A により）高度に代謝されるが、いずれの代謝物も薬理活性にはほとんど寄与しない。現在のデータに基づくと、ヒトに固有の代謝物は特定されていない。

[^{14}C]放射性標識したリルザブルチニブをヒトに投与したとき（Module 5.3.1.1-1 [PRN1008-015]）、リルザブルチニブは血漿中の微量放射性標識成分であり、血漿中総放射能曝露量の 0.760%を占めた。PRN4400（チオシアネート、1.6 µg/mL）は循環血中主要不活性代謝物と特定され、血漿中総放射能曝露量の 94.2%を占めた。また、PRN4400 は安全性に問題ない内因性化合物であり、毒性は文献で十分に特徴づけられている。PRN834 は微量代謝物として特定され、血漿中総放射能曝露量の 1.09%を占めた。PRN618 を含む他の代謝物は、血漿中に微量（1%未満）が認められた。

8.5.1 PRN834

PRN834 はヒトの微量代謝物で、実験動物種（ラット、マウス、イヌ）における代謝物でもあり（Module 2.6.4 [6 項]）、毒性試験で使用した様々なバッチ中に不純物として存在する。PRN834 は、リルザブルチニブのラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験、並びに遺伝毒性試験で十分に特徴づけられている。また、点突然変異を検出する in vitro 試験（8.6.1.1 項）において、PRN834 は遺伝毒性を示さなかった。

8.5.2 PRN618

PRN618 はヒトの微量代謝物で、実験動物種（ラット、マウス、イヌ）における代謝物でもあり（Module 2.6.4 [6 項]）、毒性試験で使用した様々なバッチ中に不純物として存在する。PRN618 は、リルザブルチニブのラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験で十分に特徴づけられている。

8.5.3 チオシアネート

動物対ヒトの代謝物比を、FDA の企業向けガイダンス「医薬品代謝物の安全性試験（2002 年 3 月）」に従って評価した。PRN4400（チオシアネート）はリルザブルチニブの唯一の主要代謝物として特定されており、ヒト血漿中総曝露量の約 94%を占める。リルザブルチニブをラットに反復投与したときの PRN4400 の AUC を求めるため、Wistar Han ラットを用いた 14 日間反復投与薬物動態（PK）試験を実施した（Module 2.6.4 [4.2.1.2 項]、Module 4.2.2.2-5 [1281-21219]）。ラットにおける 500 mg/kg/日の用量での定常状態曝露量を、ヒトにリルザブルチニブを 800 mg の 1 日用量（400 mg BID）で投与したときの曝露量と比較することで、PRN4400 比を推定した（PRN1008-010/DFI17124）。ラット 1 か月間反復投与毒性試験（DVR0174）の NOAEL である 500 mg/kg/日での PRN4400 に関するラット対ヒトの AUC 比は、約 3.6 と推定された（3.1.3 項）。これらのデータによると、PRN4400 はラットにおいて十分な曝露量レベルで生成することから、全体の毒性評価に対する PRN4400 の関与は、リルザブルチニブについて実施したラットの試験で確認されていると考えられる。

Wistar Han ラットを用いた 14 日間反復経口投与 PK 試験（Module 2.6.4 [4.2.1.2 項]、Module 4.2.2.2-5 [1281-21219]）において、リルザブルチニブをラットに 150 又は 500 mg/kg/日の用量で強制経口投与した。定常状態（14 日目、ベースライン補正なし）での雄及び雌の平均 C_{max} 値は、150 mg/kg/日でそれぞれ 3090 及び 2510 ng/mL、500 mg/kg/日でそれぞれ 8020 及び 7160 ng/mL であった。雄及び雌の AUC_{last} 値は、150 mg/kg/日でそれぞれ 96200 及び 51800 ng•h/mL、500 mg/kg/日でそれぞれ 184000 及び 149000 ng•h/mL であった。ラットにおけるこれらの定常状態の PRN4400 曝露量（定常状態の C_{max}［$C_{max,ss}$］平均値）は、免疫性血小板減少症患者に 400 mg BID の用量で反復投与したときの定常状態ヒト曝露量（平均 $C_{max,ss}$ は 4490 ng/mL、Module 5.3.5.2-1 [DFI17124-PRN1008-010]）と比較すると、150 mg/kg/日ではわずかに低く（-37.7%）、500 mg/kg/日では高かった（67%）。また、リルザブルチニブを健康被験者に 400 mg BID の用量で 3 日間投与したときの平均曝露量（平均 C_{max} は 1421 ng/mL）の約 1 倍及び 4.4 倍であった。

チオシアネートは血清の正常な生理学的構成成分であり、ヒトにおける正常濃度は一般に 50～250 µmol/L（3～15 mg/L）である(28)。チオシアネートは、降圧剤（血管拡張剤）NITROPRESS®（ニトロプルシドナトリウム）の主要代謝物でもある。チオシアネートは主に腎臓で消失し、消失半減期は約 3 日である。腎不全では、消失半減期が 2 倍又は 3 倍に延長することがある。チオシアネートは甲状腺によるヨウ素取込みを妨害する。チオシアネートは血清中濃度 1 mmol/L（60 mg/L）で軽度の神経毒性（耳鳴り、縮瞳、反射亢進）を示し、3～4 倍高い濃度（200 mg/L）では生命の危険がある。

「チオシアネートに関する暫定的ピアレビュー毒性値」の論文における米国環境保護局（EPA）の結論では、チオシアネートに経口曝露された場合の敏感な変化として、血圧低下及び甲状腺機能変化が、いずれも利用可能なヒトのデータにより明確に特定されている。しかし、血圧への影響が一般的な用量範囲の 1.3～4.3 mg/kg で報告されているのに対し(31)(32)(33)、甲状腺への影響は健康被験者において 0.19 mg/kg/日の曝露量レベルで発現した(34)。同様の動物試験で甲状腺がチオシアネートの毒

性に対して最も高感度の標的であることが示されているが、動物試験の影響量（15～100 mg/kg の値）は利用可能なヒト試験よりかなり高い。

げっ歯類及び非げっ歯類を用いて実施されたチオシアネートの非臨床安全性試験の文献調査を実施した。その結果を以下に要約する。

8.5.3.1 単回投与毒性

チオシアネートのアンモニウム塩、ナトリウム塩及びカリウム塩について、動物への急性経口投与による 50%致死量がいくつか文献で報告されており、それらはいずれも同じ 300～2000 mg/kg の範囲内である。ナトリウムチオシアネートの最小致死量は動物種により異なるが、経口投与では約 500 mg/kg である(35)。大きな種差はないが、イヌの感受性はより高い可能性がある。

8.5.3.2 反復投与毒性

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験が文献に報告されており、その内訳は、欧州化学機関（ECHA）により報告された GLP 適用のアンモニウムチオシアネートのラットを用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験及び GLP 非適用のイヌを用いた 12 週間反復経口投与毒性試験である(36)。

GLP 適用のラットを用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験は、OECD 408 ガイドライン(37)に従って実施された。この試験では、Wistar ラット（投与開始時 6 週齢）にアンモニウムチオシアネートを 20、100 又は 500 mg/kg/日の用量で連日 92～93 日間強制経口投与したところ、500 mg/kg/日で 5～58 日目に死亡が認められた。500 mg/kg/日での主要な一般状態の変化は、嗜眠、努力性呼吸、蒼白、下痢、非協調運動及び振戦であった。500 mg/kg/日群で体重及び摂餌量の減少が認められた。被験物質関連の血液学的変化（赤血球量パラメータ減少、プロトロンビン時間延長）及び血液生化学的変化（総タンパク、グロブリン、クロール、コレステロール及びカルシウムの減少、並びに尿素、ナトリウム及びアルブミン／グロブリン比の増加）が、100 mg/kg/日で認められた。500 mg/kg/日で、アンモニウムチオシアネート関連の病理組織学的所見が、骨髄（萎縮）、胸腺（皮質萎縮）、脾臓（リンパ組織過形成及び髄外造血）及び精巣（精細管上皮変性）に認められた。更なる病理組織学的所見が、500 mg/kg/日以上で非腺胃（扁平上皮過形成）及び肝臓（肝細胞肥大）に認められた。したがって、この試験の条件下で 20 mg/kg/日は NOAEL と判断された(38)。

ナトリウム又はカリウムチオシアネート（KSCN）を 100 mg/kg/日の用量でイヌに反復経口投与したところ、進行性の体重減少、無気力、頭部下垂、運動失調及び最終的には死亡が認められた。それぞれのイヌにおけるチオシアネートの血中濃度は一貫して高く、200 mg/L を超えていた。死亡動物の病理学的検査では、その死亡を説明できる共通の病変は認められなかった。イヌに 20.8～24.4 mg/kg/日の用量で連日 12 週間（週 5 日）投与したところ、明らかな健康障害は認められなかった(36)。研究者らは、チオシアネートの毒性用量（300 mg/日）をイヌに 3 か月間投与したところ、小球性貧血、血中コレステロール及び血清中総タンパク減少、骨髄及び脾臓の損傷、並びに甲状腺のヨウ素取込み阻害が生じることを示した(39)。

8.5.3.3 遺伝毒性

米国 EPA（2006）(40)により報告された限定的な遺伝毒性データによると、チオシアネートは Ames 試験(41)及びソラマメ根端を用いる染色体異常試験(42)において陰性であった。

ECHA により報告された更なる試験によると、アンモニウムチオシアネートは Ames 試験において陰性であり、ナトリウムチオシアネートは in vitro 染色体異常試験及び in vitro 哺乳類変異原性試験において陰性であった。ECHA によると、これらの試験は適切な OECD 及び欧州連合のプロトコールに従っており、GLP 適用で実施された。したがって、チオシアネートには遺伝毒性はないと考えられる。

8.5.3.4 がん原性

チオシアネートの発がん性を評価した動物データは限られている。しかし、反復投与毒性試験では、チオシアネートに過形成及び／又は前腫瘍性病変を誘導する作用があるとのエビデンスは得られなかった。

研究者らは、離乳した 1 群 18 匹の SHN 雌マウス（乳腺腫瘍の背景発現率が高い系統）に、KSCN を 0、0.1 又は 0.3%の飲水中濃度で 12 週間投与した(43)。米国 EPA（1988）により提示されたアロメトリー式(44)及び原稿中に提示された平均体重を用いると、0、0.1 及び 0.3%群における平均チオシアネート用量は、それぞれ 0、153 及び 457 mg/kg/日であった。被験物質関連の群間差が、体重、体重増加量、性周期パターン、下垂体重量、副腎重量又は卵巣の組織像に認められた。用量依存的な減少が、血清中トリヨードサイロニン（T3）（0.3%群で有意差あり）及び T4（0.1%及び 0.3%群で有意差あり）で報告された。乳腺の終蕾又は小葉-腺房系の発達係数が、0.3%群で有意に低下した。前腫瘍性の乳腺過形成性腺房結節及び乳腺腫瘍の用量依存的な発現率低下が報告され、これらの減少には 0.3%群で統計学的有意差が認められた。

8.5.3.5 生殖発生毒性

チオシアネートは胎盤関門を通過する。チオシアネートの胎児内濃度は、平衡分布状態の母動物内濃度の約 3 分の 1 である。研究によると、ナトリウム SCN（チオシアネート）を 20 mg の用量で静脈内投与しても、胎児への有害な影響はみられず(45)、催奇形性も認められなかった(46)。

妊娠 Wistar ラットを用いて、シアン化カリウム（KCN）及び KSCN への出生前曝露による毒性変化を確認する試験を実施した。雌に KCN（1、3 及び 30 mg/kg/日）又は KSCN（0.8、2.4 及び 24 mg/kg/日）を妊娠 6～20 日に飲水中で投与し、妊娠 20 日に安楽殺した。胎児の骨格及び内臓検査を実施し、TK 用の血液検体を採取した。その結果、様々な実験群での母動物におけるチオシアネート濃度は高かった。生殖パラメータには被験物質関連の変化はみられず、骨格の変化は認められなかった。内臓変化がみられた胎児の数はわずかに増加したが、変化がみられた腹数は増加せず、変化は高用量の KCN（30 mg/kg/日）に曝露された母動物の胎児のみで認められた。

利用可能な文献のレビューに基づくと、チオシアネートに関して安全性上の懸念は認められなかった。

8.6 実際及び潜在的な変異原性不純物の評価

Module 3.2.S DS（3.2.S.3.2 項 不純物）及び Module 3.2.P DP（3.2.P.5.5 項 不純物の特性検討）を参照のこと。

実際及び潜在的な変異原性不純物の評価を、ICH M7(R2) (1)（2023 年 9 月 30 日）に従い、予定臨床用量、臨床投与期間及び治療時の適応を考慮に入れて実施した。変異原性ハザード評価（Module 4.2.3.7.6-1 [MAR0248]、表 39）を実施するため、公表又は社内の変異原性及びがん原性データのデータベース調査を使用するとともに、規制当局の分類及び 2 種類の（定量的）構造活性相関（(Q)SAR）in silico システム（DEREK Nexus［第 6.2.1 版、知識ベースは 2022 年版］及び Leadscope［2022.0.0 版、知識ベースは 2023 年版］）を用いて、潜在的及び実際の不純物の変異原性に関する構造アラートを検討した。

- Cohort of concern から [redacted]種類の不純物が特定された（ニトロサミンのリスク評価、8.8 項）。
- [redacted]種類の不純物がクラス 1（既知の変異原性発がん物質）と特定された。
- [redacted]種類の不純物がクラス 2（既知の変異原性物質）と特定された。
- [redacted]種類の不純物が変異原性に関する構造アラートを示した。さらに、警告構造は DS の構造とは無関係である。これら [redacted]種類の不純物は潜在的変異原性ありと判断され（構造アラートに基づく）、クラス 3 に分類された。[redacted]に基づくと、これらの不純物のリスクが DS にまで及ぶ可能性は極めて低い。したがって、ICH M7(R2) (1)ガイダンスのオプション 4 の管理戦略が適用され、これらの不純物について通常の試験を実施する必要はない。
- [redacted]種類の不純物が変異原性に関する構造アラートを示したが、同じ警告構造はリルザブルチニブにもあり、リルザブルチニブは試験で変異原性を示さなかった。別の [redacted]種類の不純物も変異原性に関する構造アラートを示したが、同じ警告構造は開始物質 PRN861（CAS 番号 [redacted]）にもあり、試験において変異原性は認められなかった。最後に 1 種類の不純物も変異原性に関する構造アラートを示したが、同じ警告構造は PRN4361 にもあり、PRN4361 は試験で変異原性を示さなかった。[redacted]種類の不純物はいずれもクラス 4 に分類され、変異原性はないと判断された。
- [redacted]種類の不純物は変異原性に関する構造アラートを示さないか、又は変異原性若しくは発がん性を示す十分なデータが得られなかった。これら [redacted]種類の不純物はクラス 5 に分類され、変異原性はないと判断された。

In vitro 変異原性試験が必要な構造アラートを有する不純物の遺伝毒性データを表 40 に要約する。社内で実施した変異原性試験の詳細を 8.6.1 項に示す。

今回の変異原性ハザード評価に基づき、既知及び／又は潜在的変異原性不純物が特定された。変異原性不純物は、製造工程を通して効果的にパージされ、許容限度未満になっている。臨床試験用 DS バッチ内の変異原性不純物に関する管理戦略及び関連する分析結果の詳細な情報を Module 3、DS の項、小節 S.3.2 に示す。

以上、利用可能な安全性及び品質データ（Module 3）によると、DS に関連する明らかなヒトへの変異原性リスクはない。

表 39 - Overview of ICH M7(R2) classification of rilzabrutinib impurities

Class 1 and 2		
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
Class 3		
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
Class 4 and 5		
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• PRN835[redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• PRN834[redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• PRN835-[redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• PRN834-[redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• PRN834-[redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• PRN834-[redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [redacted]	• [redacted]	• [redacted]
• [

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- PRN834-[redacted]
- [redacted]
- PRN834-[redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- PRN834-[redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [

表 40 - Mutagenicity summary of rilzabrutinib impurities with structural alert that warranted an in vitro mutagenicity study

Impurity		In Silico Prediction [a]		GLP in vitro Mutagenicity Result
Impurity Identification	RA Code	DEREK	Leadscope	
PRN834 (PRN834/D92-E)	16735340	Negative	Inconclusive	Negative
PRN834-A4	16732596	Negative	Positive	Negative
PRN862	168466419	Negative	Positive	Negative [b]
PRN4361 [c]	-	Positive	Positive	Negative
PRN835 (PRN835.2HCl)	16894765A	Negative	Inconclusive	Negative
PRN2960	16740781	Positive	Inconclusive	Negative
PRN1418	16740747	Positive	Inconclusive	Negative
PRN3232	16911927	Positive	Inconclusive	Negative
PRN3612	17025194	Positive	Negative	Negative
PRN3222	16741043	Negative	Inconclusive	Negative
PRN3767	16740866	Negative	Inconclusive	Negative
PRN3590	16787051	Positive	Inconclusive	Negative
PRN835-EDCI adduct (PRN1319)	-	Negative	Inconclusive	Negative [d]
PRN3220	-	Positive	Inconclusive	Negative [d]

Abbreviations: GLP: Good laboratory practice; hprt: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
-: no RA code

a In silico prediction systems: DEREK Nexus (version 6.2.1 with knowledge base version 2022) and Leadscope (version 2022.0.0 with knowledge base version 2023 models).

b After initially testing positive in a bacterial reverse mutation assay (DVR0521 [表 2.6.7.17 D]) that was not compliant with GLPs and is considered exploratory, a GLP compliant Bacterial Reverse Mutation Assay (HIS2490 [表 2.6.7.17 E]) and a GLP compliant in vitro hprt assay (LYM0377 [表 2.6.7.17 F]) were performed in which the test article tested negative.

c PRN835 analog of PRN4087

d Bacterial reverse mutation assay (DVR0522 [表 2.6.7.17 G]) that was not compliant with GLPs and is considered exploratory. The assay was not repeated since the alerting structure was the same alert as in the drug substance rilzabrutinib which has been tested and is non-mutagenic. These impurities are therefore considered class 4.

8.6.1 変異原性試験

被験物質の変異原性を評価するため、Ames 試験を、プレート法を用いて以下の手順で実施した。ネズミチフス菌の菌株 TA98、TA100、TA1535 及び TA1537、並びに大腸菌の菌株 WP2 uvrA を用いて、β-ナフトフラボン／フェノバルビタール誘導又は Aroclor 誘導ラット肝 S9 mix の存在下及び非存在下（±S9）で試験を実施した。特に記載しない限り、評価した用量は 5、16、50、160、500、1600 及び 5000 µg/プレートとした。処理濃度は最高推奨濃度の 5000 µg/プレートまでとした。最高解析濃度は、沈殿又は毒性により制限された。同時溶媒対照及び陽性対照は許容範囲内であった。DMSO 又は別の適切な添加剤を溶媒として使用した。

8.6.1.1 PRN834（PRN834/D92-E、RA16735340）

PRN834（PRN834/D92-E、RA16735340）の Ames 試験を実施した（HIS2453 試験 [表 2.6.7.17 C]）。最高解析濃度は、沈殿及び毒性（TA98 及び TA1535 +S9）により 1600 µg/プレートに制限された。PRN834 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.2 PRN834-A4（RA16732596）

PRN834-A4（RA16732596）の Ames 試験を実施した（HIS2449 試験 [表 2.6.7.17 B]）。溶媒はアセトニトリル：精製水（1：1）とした。最高解析濃度は、沈殿により 500 µg/プレートに制限された。PRN834-A4 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.3 PRN835（PRN835.2HCl、RA16894765A）

PRN835（PRN835.2HCl、RA16894765A）の Ames 試験を実施した（HIS2472 試験 [表 2.6.7.17 L]）。精製水を溶媒として使用した。毒性が 500 µg/プレート以上又は 1600 µg/プレート以上で認められた。PRN835 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.4 PRN835-EDCI 付加物（PRN1319）及び PRN3220

PRN835-EDCI 付加物（別名 PRN1319）及び PRN3220 は、Ames 試験で陰性であった（DVR0522 試験 [表 2.6.7.17 G]）。この試験は国際的 GLP 規制を適用せずに実施されたことから、探索的なものと判断された。しかし、いずれの不純物の警告構造も、変異原性がないことが示されているリルザブルチニブと同じアラートを示したことから、再試験は実施しなかった。

探索的試験において、PRN835-EDCI 付加物のネズミチフス菌の菌株を用いた評価を 20、50、100、200、500 及び 1000 µg/プレートの濃度で、大腸菌の菌株を用いた評価を 200、500、1000、2000 及び 5000 µg/プレートの濃度で、それぞれ実施した。いずれの試験菌株においても、高用量で細胞毒性が認められた。PRN3220 の評価を 200、500、1000、2000 及び 5000 µg/プレートの濃度で実施した。1000 µg/プレート以上で沈殿が認められた。

8.6.1.5 PRN862（RA16846619）

PRN862（RA16846619）は Ames 試験で陽性であった（DVR0521 試験 [表 2.6.7.17 D]）。しかし、この試験は国際的 GLP 規制を適用せずに実施されたことから、探索的なものと判断された。探索的試験の陽性結果を検証するため、GLP 適用の変異原性試験を 2 試験実施した。すなわち Ames 試験（HIS2490 試験 [表 2.6.7.17 E]、8.6.1.5.1 項）及び in vitro ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（hprt）試験（LYM0377 試験 [表 2.6.7.17 F]、8.6.1.5.2 項）である。いずれの GLP 適用試験においても、確固とした再現性のある陰性結果が認められたため、PRN862 は陰性であり、変異原性はないと判断された。

探索的試験（DVR0521 試験）では、ネズミチフス菌を用いた評価を 50、100、200、400、600、800 及び 1000 µg/プレートの濃度で、大腸菌を用いた評価を 100、200、400、800 及び 1600 µg/プレートの濃度で、それぞれ実施した。いずれの試験菌株においても、高用量で細胞毒性が認められた。

PRN862 は、TA100 において、400、600 及び 800 µg/プレート（+S9）、並びに 400 及び 600 µg/プレート（-S9）の濃度で、同時溶媒対照と比較して 2 倍以上の平均復帰変異コロニー数増加を誘導したと報告された。

8.6.1.5.1 GLP 適用の Ames 試験

PRN862（RA16846619）について先に実施した探索的な Ames 試験（DVR0521 試験 [表 2.6.7.17 D]）において菌株 TA100 で得られた陽性結果を確認するため、また、この探索的試験は国際的 GLP 規制に従っていなかったことから、GLP 適用の Ames 試験（HIS2490 試験 [表 2.6.7.17 E]）を実施した。突然変異実験 1 を全ての試験菌株を用いて実施した。最高解析濃度は毒性により 1600 µg/プレートに制限された。突然変異実験 2 は菌株 TA100 を用いて、200、400、600、800、1000、1200 及び 1400 µg/プレート（-S9）、並びに 400、600、800、1000、1200、1400 及び 1600 µg/プレート（+S9）の濃度で実施した。最高解析濃度は毒性により 1400 µg/プレート（+S9）に制限された。PRN862 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.5.2 GLP 適用の hprt 遺伝子座での in vitro L5178Y 遺伝子突然変異試験

マウスリンフォーマ細胞の hprt 遺伝子座（6-チオグアニン［6TG］耐性）における PRN862 の突然変異誘導能を評価するため、GLP 適用試験を実施した。この試験は、先に実施した探索的な Ames 試験（DVR0521 試験 [表 2.6.7.17 D]）において菌株 TA100 で得られた陽性結果を確認するため、また、この探索的試験は国際的 GLP 規制に従っていなかったため実施した（LYM0377 試験 [表 2.6.7.17 F]）。

予備的細胞毒性用量設定実験及びそれに続く突然変異実験を、それぞれ β-ナフトフラボン／フェノバルビタール誘導ラット肝 S9（S9-mix）の非存在下及び存在下で実施した。各実験で 3 時間処理インキュベーション期間を使用した。DMSO を溶媒として使用した。用量設定実験に基づき、突然変異実験では 20～232.1 µg/mL（±S9）の 12 濃度で試験を実施した。処理 7 日後に生存率及び 6TG 耐性を検討するために解析した最高濃度は 160 µg/mL（-S9）及び 180 µg/mL（+S9）であり、これらの濃度での相対生存率（RS）はそれぞれ 18%及び 5%であった。160 µg/mL と 180 µg/mL（+S9）の間で急勾配の濃度依存的毒性が認められ、RS はそれぞれ 35%及び 5%であったことから、両方の濃度を解析した。

毒性濃度まで試験を実施した結果、解析したいずれの濃度においても、溶媒対照と比較して突然変異頻度（MF）の増加は認められなかった。80 µg/mL（+S9）での MF 値（10^6 生存細胞当たり 9.23 変異体）は、背景溶媒対照範囲を超えていた。この濃度でのデータは、2 つのレプリケートのうち 1 つが技術的過誤により除外されたため、他の 1 つのレプリケートで得られた。しかし、この MF 値は、規制当局の試験法ガイドラインの要件として、自然発生的 MF は一般に生存細胞 10^6 個当たり 5～20 変異体であると述べられていることに一致する。濃度依存的な反応は示されず、統計学的に有意な MF の増加及び統計学的に有意な線形傾向は認められなかったことから、この MF 値は間違った結果で、生物学的重要性はないと考えられた。全体として、これらのデータは、S9-mix の非存在下及び存在下のいずれにおいても、陰性結果の要件を満たしている。

以上、LY5178Y マウスリンフォーマ細胞の hprt 遺伝子座で PRN862 の毒性濃度（160 µg/mL 及び 180 µg/mL）まで検討した結果、突然変異誘導は認められなかった。

8.6.1.6 PRN1418（RA16740747）

PRN1418（RA16740747、[redacted]）について Ames 試験を実施した（HIS2456 試験 [表 2.6.7.17 P]）。菌株 TA1537（±S9）及び菌株 TA1535（+S9）において、1600 µg/プレート以上の濃度で細胞毒性が認められた。残りの菌株／条件での最高解析濃度は、沈殿により 1600 µg/プレートに制限された。PRN1418 は突然変異を誘導しなかった。前述のように、リルザブルチニブは Ames 試験において陰性であった（4.1 項）。

8.6.1.7 PRN2960（RA16740781）

PRN2960（RA16740781）について Ames 試験を実施した（HIS2460 試験 [表 2.6.7.17 V]）。最高解析濃度は、沈殿により 1600 µg/プレートに制限された。PRN2960 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.8 PRN3222（RA16741043）

PRN3222（RA16741043）について Ames 試験を実施した（HIS2461 試験 [表 2.6.7.17 T]）。アセトンを溶媒として使用した。突然変異実験 1 は 160、200、320、500、800、1600、2000 及び 5000 µg/プレート（±S9）の濃度で実施した。最高解析濃度は沈殿により 800 µg/プレートに制限された。突然変異実験 2 は、最初の実験でみられた復帰変異コロニー数増加を検討するため、菌株 TA98 及び WP2 uvrA を用いて、200、300、400、500、600、700、800、1200 及び 1600 µg/プレート（-S9）の濃度で実施した。最高解析濃度は沈殿により 600 µg/プレートに制限された。

突然変異実験 1 において菌株 WP2 uvrA で認められた増加は突然変異実験 2 では再現されなかったことから、正常な生物学的ばらつきによるものであり、変異原性活性のエビデンスではないと考えられた。菌株 TA98 では再現性のある用量反応が認められたが、この増加はいずれの実験においても 2 倍以上の基準を満たさなかった。

以上、PRN3222 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.9 PRN3232（RA16911927）

PRN3232（RA16911927）について Ames 試験を実施した（HIS2473 試験 [表 2.6.7.17 H]）。最高解析濃度は沈殿により 1600 µg/プレートに制限された。PRN3232 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.10 PRN3590（RA16787051）

PRN3590（RA16787051）について Ames 試験を実施した（HIS2462 試験 [表 2.6.7.17 AA]）。アセトンを溶媒として使用した。最高解析濃度は沈殿により 500 µg/プレートに制限された。PRN3590 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.11 PRN3612（RA17025194）

PRN3612（RA17025194）について Ames 試験を実施した（HIS2454 試験 [表 2.6.7.17 W]）。アセトンを溶媒として使用した。最高解析濃度は沈殿により 1600 µg/プレートに制限された。PRN3612 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.12 PRN3767（RA16740866）

PRN3767（RA16740866）について Ames 試験を実施した（HIS2455 試験 [表 2.6.7.17 AE]）。アセトンを溶媒として使用した。最高解析濃度は沈殿により 1600 µg/プレートに制限された。PRN3767 は突然変異を誘導しなかった。

8.6.1.13 PRN4361

PRN4361（PRN4087 の PRN835 アナログ）について Ames 試験を実施した（AG58XF.502ICH.BTL 試験 [表 2.6.7.17 A]）。この試験の予備的毒性試験に基づき、変異原性試験は 5、15、50、150、500、1500 及び 5000 µg/プレートの用量で実施した。500 µg/プレート以上で沈殿が認められた。PRN4361 は突然変異を誘導しなかった。

8.7 原薬不純物の安全性確認

Module 3.2.S DS（3.2.S.3.2 項 不純物）及び Module 3.2.P DP（3.2.P.5.5 項 不純物の特性検討）を参照のこと。

ICH Q3A(R2) (2)に従い、0.15%以上の濃度で存在すると予測される、又は予測 1 日摂取量が 1 mg 以上の DS（適切な場合は DP）中不純物について、一般毒性試験を実施した。予測 1 日摂取量が 1 mg 以上の不純物について遺伝毒性試験を実施した。

毒性試験で使用した DS のバッチ及び品質は、臨床試験用及び／又は市販用バッチに使用した DS バッチを代表するものであった（[表 2.6.7.4]）。一般毒性に関して、表 41 に規定された不純物の安全性確認のため、GLP 適用のラット反復投与毒性試験の NOAEL での不純物曝露量（mg/kg）を、60 kg の患者に治療用量の 800 mg を投与したときの不純物曝露量と比較し、各不純物について提案中の許容基準を考慮に入れた。ラットを用いた重要な反復投与毒性試験で使用したバッチは、[redacted]（1 か月間反復投与毒性試験、3.1.3 項、Module 4.2.3.2-3 [DVR0174]）、[redacted]（3 か月間反復投与毒性試験、3.1.4 項、Module 4.2.3.2-4 [DVR0207]）、[redacted]（3 か月間反復投与毒性試験、8.7.1 項、Module 4.2.3.7.6-2 [TXC1679]）及び[redacted]（6 間反復投与毒性試験、3.1.5 項、Module 4.2.3.2-5 [DVR0376]）であった。NOAEL は、1 か月間反復投与毒性試験では 500 mg/kg/日、3 か月間反復投与毒性試験では 150 mg/kg/日、6 か月間反復投与毒性試験では雄で 150 mg/kg/日、雌で 50 mg/kg/日であった。不純物曝露量（mg/kg）をラットとヒトで比較して用量マージンを算出した。いずれの不純物も用量マージンは 4 以上であり、ICH Q3A(R2) (2)に従って毒性試験で適切に検討されたことから、安全性が確認されたと判断した。

表 41 - Margins for specified impurities in rilzabrutinib drug substance lots used in the GLP repeat-dose toxicity studies in rats

Specified Impurity	≤% DS Acceptance Criterion (DP)	% Level in API Lot for Toxicity Studies	API Lot No.	NOAEL (mg/kg)	Study [a]	Impurity Exposure in Rat (mg/kg)	Impurity Exposure in Human (mg/kg) [c]	Margin
PRN2960	[redacted]	6.96	[redacted]	150	3-month	10.44	0.45	23
PRN1253	[redacted]	0.95	[redacted]	150	3-month	1.43	0.05	27
PRN1418	[redacted]	0.40 [b]	[redacted]	150 (M)	6-month	0.60	0.08	8
PRN1418	[redacted]	0.36	[redacted]	150 (F)	3-month	0.54	0.08	7
PRN2468	[redacted]	0.23	[redacted]	150	3-month	0.35	0.04	9
PRN835	[redacted] [d]	0.74	[redacted]	150	3-month	1.11	0.02	64
PRN3232	[redacted] [d]	0.05	[redacted]	150	3-month	0.08	0.02	4
PRN3612	[redacted]	0.66 [b]	[redacted]	150	3-month	0.99	0.04	25
PRN3222	[redacted]	0.30 [b]	[redacted]	500	1-month	1.5	0.03	45
PRN3767	[redacted]	0.20 [b]	[redacted]	150	3-month	0.30	0.03	9
PRN3590	[redacted]	0.34 [b]	[redacted]	150 (M)	6-month	0.51	0.04	13
PRN3590	[redacted]	0.34 [b]	[redacted]	50 (F)	6-month	0.17	0.04	4

Abbreviations: API: Active pharmaceutical ingredient; DS: Drug substance; DP: Drug product (criterion added if higher than DS and margin calculated based on DP criterion); F: Female; M: Male; UHPLC: Ultra-high-performance liquid chromatography

Note: PRN834 is also a metabolite of rilzabrutinib in humans and laboratory animal species that was well characterized in animal repeat-dose toxicity studies. As such PRN834 is considered qualified as per ICH Q3A(R2) (2).

a Studies cited in this table include the rat 1-month (DVR0174 [表 2.6.7.7 A]), 3-month (DVR0207 [表 2.6.7.7 B]), 3-month (TXC1679 [表 2.6.7.17 AG]), and 6-month (DVR0376 [表 2.6.7.7 C]) GLP toxicity studies.

b % Level in API for toxicity studies are from a re-analysis with the current UHPLC method in 2020. Impurities PRN3222 and PRN3767 are also [redacted] however, no noteworthy increase was noted over time (Module 3). Therefore, the results from the re-analysis with the current UHPLC method were used to calculate dose margins.

c Based on a daily dose of 800 mg rilzabrutinib in a 60 kg person.

d [redacted]

ICH Q3A(R2) (2)に従い、予測 1 日摂取量が 1 mg 以上の全ての不純物についての遺伝毒性評価を、2 つの in vitro 試験、すなわち Ames 試験及び in vitro MNT により実施した（表 42）。In vitro MNT で陽性の結果が得られた不純物については、in vivo COM 試験（in vivo MNT とコメット試験の組合せ）を実施した。

表 42 - Genotoxicity studies for rilzabrutinib impurities with a predicted daily intake of ≥1 mg

Impurity		Impurity Daily intake (mg) [a]	GLP Study Results		
Impurity Identification	RA Code		Ames	In vitro MNT	COM Assay [b]
PRN2960	16740781	27.2	Negative [c]	Negative [d]	NE
PRN1253	16732764	3.2	Negative	Negative	NE
PRN1418	16740747	4.8	Negative [c]	Positive	Negative
PRN835 (PRN835.2HCl)	16894765A	1	Negative [c]	Positive	Negative
PRN3232	16911927	1	Negative [c]	Positive	Negative
PRN3612	17025194	2.4	Negative [c]	Positive	Negative
PRN3222	16741043	2	Negative [c]	Negative	NE
PRN3767	16740866	2	Negative [c]	Negative	NE
PRN3590	16787051	2.4	Negative [c]	Negative	NE

Abbreviations: DS: Drug substance; GLP: Good laboratory practice; MN: Micronucleus; MNT: MN test; NE: Not evaluated

Note: PRN834 is also a metabolite of rilzabrutinib in humans and laboratory animal species that was well characterized in animal repeat-dose toxicity studies. As such PRN834 is considered qualified as per ICH Q3A(R2) (2). [redacted] cannot be synthesized as separate molecule for in vitro testing. [redacted] is a class 4 impurity and was present in the rilzabrutinib batch used in the in vivo MNT for the DS, which was negative for MN induction.

a Calculated as 800 mg rilzabrutinib * impurity specification level

b Combined in vivo micronucleus and comet study

c Refer to Section 8.6.1

d [redacted] was present in batch [redacted] that was used in the in vivo micronucleus assay with rilzabrutinib (see Study DVR0185, [表 2.6.7.9])

以上、提案中の個別規格設定濃度にある不純物（Module 3、3.2.S.4.1 項及び 3.2.P.5.1 項）は、ICH Q3A(R2) (2)に従って適切に安全性が確認されたと考えられる。

8.7.1 ラットを用いた 3 か月間反復経口投与毒性試験

この試験の目的は、不純物（バッチ A 中の 4 種類の不純物及びバッチ B 中の 6 種類の不純物）を添加したリルザブルチニブの遊離塩基の毒性を、不純物を添加しないリルザブルチニブの遊離塩基と比較することであった（TXC1679 試験 [表 2.6.7.17 AG]）。Wistar Han ラット（1 群雌雄各 12 匹、8～9 週齢）に、媒体対照（0 mg/kg）、リルザブルチニブの遊離塩基（150 mg/kg/日）、バッチ A を添加したリルザブルチニブの遊離塩基（150 mg/kg/日）又はバッチ B を添加したリルザブルチニブの遊離塩基（150 mg/kg/日）を 13 週間強制経口投与した。バッチ A で評価された不純物は、PRN835（0.74%）、PRN1253（0.95%）、PRN2960（6.96%）及び PRN4314（0.08%）であった。バッチ B で評価された不純物は、PRN1418（1.3%）、PRN2468（0.51%）、PRN3222（0.48%）、PRN3232（0.35%）、PRN3590（0.56%）及び PRN3767（0.41%）であった。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、臨床検査（血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査）、剖検、器官重量及び病理組織学的検査とした。

試験中に途中死亡が 1 匹認められ、被験物質関連と考えられた。バッチ B 添加群の雌（動物番号 4511）で、10 日目に死亡が発見された。4 及び 9 日目の流涎以外には、死亡前の一般状態の変化は認められなかった。肉眼所見として、脳のゼラチン様変化及び一部の器官（肺、副腎、下顎及び腸間膜リンパ節、卵巣、並びに胸腺）の赤色化がみられたが、これらの変化は死後変化と考えられ、病理組織学的検査で死後変化、出血及び／又はうっ血が認められた。脳のゼラチン様変化に伴って、神経網及び髄膜に軽度の多巣性血管周囲混合細胞浸潤も認められた。この所見がこの動物の死に関与した可能性がある。

被験物質関連の一般状態の変化として、流涎が全ての投与群で認められた。体重、体重増加量及び摂餌量には、被験物質関連の変化は認められなかった。

眼科学的所見は認められなかった。

同様の被験物質関連の血液学的変化が、全ての投与群を通して認められた。変化として、軽度のリンパ球増加（雌雄）、並びに単球、好塩基球、好中球及び／又は好酸球の軽度の増加（特に雌）が認められた。不純物の存在に起因するその他の血液学的所見はみられなかったが、バッチ B 添加群の雌でごく軽度の好中球増加が認められた。赤血球量（赤血球数、ヘマトクリット及びヘモグロビン）の軽微な減少傾向が、投与群の雄に認められた。これらの変化は極めて軽度であり、被験物質との関連は確認できなかったが、病理組織学的検査で雄に認められた膵臓の所見による二次的変化の可能性がある。同様の被験物質関連の血液凝固変化が全ての群を通して認められ、その内容は全ての投与群の雌にみられた軽微なフィブリノゲン濃度上昇であった。これらの変化に伴って WBC 増加がみられ、軽度の炎症過程が示唆された。同様の被験物質関連の血液生化学的変化が全ての投与群を通してみられたが、その変化はトリグリセリドの減少（軽度から中等度）に限定されていた。尿検査パラメータには被験物質関連の変化は認められなかった。

肉眼所見及び器官重量には、被験物質関連の変化は認められなかった。

終了時剖検で、被験物質に関連した脳及び膵臓の病理組織学的所見が、全ての投与群に認められた。それらを表 43 に要約する。膵臓の変化は、BTK 阻害薬に関連したラットでの変化に一致し、形態学的には十分に立証された自然発生的変化(11)と類似しており、主に雄ラットで腺房細胞とランゲルハンス島との境界面に認められた。同様の変化は他の動物種にはみられなかったことから、このメカニズムがヒトで問題となる可能性は低い。膵臓にみられた腺房肥大（軽微）は低度であったため被験物質関連ではなく、自然発生的変化(47)と考えられた。バッチ A 添加群で病理組織学的所見（脳、膵臓）の発現率及び／又は重症度がわずかに上昇したが、毒性学的に重要でないと考えられた。

表 43 - 3-Month toxicity study in rats: Summary of rilzabrutinib-related microscopic findings at terminal necropsy

Tissue/organ	Groups [a]	Rilzabrutinib-related microscopic findings
Brain	2, 3, 4	Infiltration, mononuclear cell, lateral ventricle (minimal) (M/F)
	4	Infiltration, mixed cell, neuropil, meninges (minimal) (1 F)
Pancreas	2, 3, 4	Inflammation, islet of Langerhans/acinar, chronic/chronic active (minimal-moderate) (M)
	2, 3, 4	Pigment (minimal) (M)
	1, 2, 3	Lobular atrophy (minimal-mild) (M)
	1, 3	Lobular mononuclear cell infiltration (minimal-mild) (M)
	1, 3	Lobular fibrosis (minimal-mild) (M)

Abbreviations: F: Female; M: Male

a Group 1: vehicle control; Group 2: rilzabrutinib; Group 3: Spiked Batch A; Group 4: Spiked Batch B

以上、リルザブルチニブをバッチ A 又は B 不純物の非添加又は添加の条件下で連日 13 週間強制経口投与したところ、同様の一般状態の変化（流涎）、血液学的変化（WBC 増加）、脳の病理組織学的所見（側脳室周囲の細胞密度上昇）及び膵臓の病理組織学的所見（雄における慢性活動性炎症、慢性炎症、色素、小葉萎縮、単核細胞浸潤及び／又は線維化）が認められた。バッチ B 不純物を添加したリルザブルチニブを 150 mg/kg/日の用量で投与したところ、雌 1 匹で途中死亡がみられ、剖検時に認められた脳のゼラチン様変化に伴う病理組織学的所見として、多巣性血管周囲混合細胞浸潤（投与終了時安楽殺例の雌にもより低い重症度でみられた）が認められた。

8.7.2 不純物

不純物の安全性を、ICH Q3A(R2) (2)に従って確認した。0.15%以上の濃度で存在すると予測される又は予測 1 日摂取量が 1 mg 以上の不純物について、一般毒性を in vivo で評価した。予測 1 日摂取量が 1 mg 以上の不純物について、in vitro 遺伝毒性試験（変異原性及び MN 誘導）を実施した。In vitro MNT で陽性の結果が得られた不純物については、in vivo COM 試験（in vivo MNT とコメット試験の組合せ）を実施した。

ICH M7(R2) (1)の下での安全性確認の一環として実施した Ames 試験を 8.6.1 項に記載する。

In vitro MNT で被験物質の染色体構造異常及び数的異常誘発能を評価するため、培養 HPBL における MN の頻度を、以下の手順に従って検討した。細胞をフィトヘマグルチニンで刺激し、約 48 時間インキュベートした。β-ナフトフラボン／フェノバルビタール誘導肝 S9-mix による代謝活性化の存在下及び非存在下で、培養を様々な濃度の被験物質に、事前に規定された時間（処理及び回復）曝露した。サイトカラシン B を用いて細胞分裂を抑制した。細胞を調製して染色し、MN を有する二核細胞の比率を求めた。適切な陰性（溶媒）及び陽性対照培養をおいた。解析した被験物質の最高濃度は、細胞毒性又は溶解度に応じて最大で 1 mmol/L とした(1)。

COM 試験を実施する前に、不純物の連日経口投与による探索的 3 日間用量設定実験を、1 群雌雄各 3 匹の Wistar Han ラットを用いて実施した。 検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査（赤血球パラメータ）、解剖病理学的検査（肝臓重量、肉眼観察、肝臓及び消化管の病理組織学的検査）及び TK とした。COM 試験の一環として、別の 3 日間用量設定実験を、Wistar Han ラットを用いて不純物の連日経口投与により実施し、一般状態の毒性変化を評価した。評価した最高用量は、規制（ICH S2[R1]）(48)により推奨される遺伝毒性試験の最高用量である 2000 mg/kg/日とした。

COM 試験では、投与を受けた Wistar Han ラットの骨髄 PCE における不純物の MN 誘導能を評価するとともに、同じラットの肝臓及び十二指腸におけるデオキシリボ核酸（DNA）鎖切断誘導能を、アルカリコメット試験を用いて、以下の手順で評価した。用量は用量設定実験に基づいて設定した。用量設定実験で毒性に性差が認められなかった場合は、雄のみを用いて COM 試験を実施した。媒体は精製水又は精製水中無水クエン酸（0.5 当量 w/v）とした。ラットに不純物を 3 つの異なる用量で連日 3 日間経口投与した。媒体対照群もおいた。別の雌雄各 3 匹のラットを 3 日目の TK 評価用としておいた。コメット試験の陽性対照として、エチルメタンスルホネートを、雌雄各 3 匹のラットに、150 mg/kg/日の用量で連日 3 日間、又は 200 mg/kg/日の用量で 2 回投与した。骨髄（MN 評価用）、並びに肝臓及び十二指腸（コメット解析用）の組織検体を、最終投与の約 1～2 時間後又は 3 時間後に採取した。組織への曝露を、TK、血液生化学的検査及び病理組織学的検査で確認した。以下の基準を満たした場合に、データは妥当性ありと判断された。すなわち、媒体対照データが試験施設での各組織の背景対照データと同程度であること、陽性対照により試験施設の背景対照データと同程度の反応が誘導され、同時媒体対照と比較して統計学的に有意な増加が得られること、十分な数の細胞及び用量が解析されること、また、検討した最高用量が MTD であるか、又は規制（ICH S2(R1)）(48)により推奨される遺伝毒性試験の最高用量（2000 mg/kg/日）であることである。「ヘッジホッグ」（テール内 DNA のほとんど全てにコメットがあり、細胞毒性又は組織の品質不良を示す）は採点せず、30%超の「ヘッジホッグ」を有する動物は、更なる解析から除外した。投与動物の骨髄内の小核を有する PCE の平均頻度（%MN PCE）が同時媒体対照群の平均値と同程度で、試験施設の背景媒体対照データの 95%参照範囲内である場合に、MNT は陰性と判断した。投与動物の肝臓及び十二指腸細胞における平均テール強度（%）が媒体対照値と同程度で、試験施設の背景媒体対照データの 95%参照範囲内である場合に、コメット試験は陰性と判断した。

8.7.2.1 PRN834

PRN834 は、毒性試験に使用した様々なバッチ内に存在する不純物であることに加えて、ヒト及び実験動物（ラット、マウス、イヌ）におけるリルザブルチニブの代謝物でもあり（Module 2.6.4[6 項]）、リルザブルチニブの動物を用いた反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験で十分に特徴づけられている。そのため、PRN834 は ICH Q3A(R2) (2)に従って安全性が確認されていると考えられる。

PRN834 は、ICH M7(R2) (1)の下で実施した Ames 試験において陰性であった（8.6.1.1 項）。

8.7.2.2 PRN2960（RA16740781）

PRN2960 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（TXC1679 試験 [表 2.6.7.17 AG]、8.7.1 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 23 倍であった（表 41）。

PRN2960 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.7 項）。

PRN2960 はリルザブルチニブの in vitro MNT（4.3 項、DVR0185 試験 [表 2.6.7.9]）で使用したバッチ [redacted] 中に存在し、この試験は NM 誘導に関して陰性であった。

8.7.2.3 PRN1253（RA16732764）

PRN1253 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（TXC1679 試験 [表 2.6.7.17 AG]、8.7.1 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 27 倍であった（表 41）。

PRN1253 について in vitro Ames 試験を実施した（HIS2448 試験 [表 2.6.7.17 AC]）。菌株 TA98（+S9）において、最高濃度で復帰変異コロニー数が 1.9 倍に増加した。陽性反応に関する 2 倍の基準は満たさなかったが、この増加の再現性を確認するため、菌株 TA98 を用いた追加実験を、より狭い濃度間隔（500、1000、2000、3000、4000 及び 5000 µg/プレート［+S9］）で実施した。これらの処理後、同時媒体対照の 2 倍以上の復帰変異コロニー数増加は認められなかった。以上、PRN1253 は突然変異を誘導しなかった。

PRN1253 について in vitro MNT を実施した（MNV1633 試験 [表 2.6.7.17 AD]）。培養を、被験物質の 3 又は 4 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（50、150、200 又は 213 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（50、150 又は 213 µg/mL）、-S9 で 24+0 時間（50、150 又は 213 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（50、150 又は 213 µg/mL）であった。DMSO を溶媒として使用した。最高解析濃度は約 1.12 mmol/L であった。検討した最高濃度で 3+21 時間（-S9）後にみられた小規模な MN 頻度増加は、軽度であり（観察された背景溶媒対照範囲を超えず）、2 枚 1 組の培養の 1 枚のみであり、明らかな濃度依存性の変化が認められなかったことから、生物学的意義はないと考えられた。PRN1253 は培養 HPBL において MN を誘導しなかった。

8.7.2.4 PRN1418（RA16740747）

PRN1418（[redacted]）の一般毒性に関する安全性は、雄ラットを用いた 6 か月間反復投与毒性試験（DVR0376 試験 [表 2.6.7.7 C]、3.1.5 項）及び雌ラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（TXC1679 試験 [表 2.6.7.17 AG]、8.7.1 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは、雄で 8 倍、雌で 7 倍であった（表 41）。

PN1418 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.6 項）。

PRN1418 について in vitro MNT を実施した（MNV1637 試験 [表 2.6.7.17 Q]）。培養を、被験物質の 3 又は 4 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（20、38 又は 46 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（実験 1：30、38、46 又は 54 µg/mL、実験 2：10、38、46 又は 50 µg/mL）、-S9 で

24+0 時間（10、15、22.5 又は 30 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（実験 1：5、10、15 又は 22.5 µg/mL、実験 2：5、15、20 又は 22.5 µg/mL）であった。DMSO を溶媒として使用した。最高解析濃度は細胞毒性により制限された。PRN1418 は培養 HPBL において 24+24 時間（-S9）の条件下で MN を誘導し、陽性と判断された。3+21 時間（+S9）の条件下での陽性誘導の弱いエビデンスは 2 回目の実験で確認されなかったことから、1 回目の実験で認められた孤発性の増加は生物学的に重要でないと判断された。PRN1418 は残りの条件下で MN を誘導しなかった。

PRN1418 のラットを用いた探索的用量設定試験を、150、300、500、750 又は 1000 mg/kg/日の用量で実施した（TXP0552 試験 [表 2.6.7.17 S]）。標的組織の変化に基づき、MTD は 500 mg/kg/日と判断された。

PRN1418 について、ラットを用いた in vivo COM 試験を実施した（COM0051 試験 [表 2.6.7.17 R]）。用量設定実験（1 群雌雄各 1～3 匹）を 500、750 又は 1000 mg/kg/日の用量で実施した。MTD は 500 mg/kg/日と判断された。主実験では、1 群雌雄各 5 匹（6～9 週齢）のラットに 125、250 又は 500 mg/kg/日の用量で投与した。十二指腸細胞における平均テール強度増加が、125 mg/kg/日群の雌で、媒体対照群の雌と比較して認められた。しかし、傾向は認められず（p = 0.3971）、群平均テール強度は、媒体対照の背景対照データの分布の 95%管理限界内であった。特筆すべきこととして、群平均テール強度の増加は雌 1 匹での高値の結果であった。PRN1418 の TK パラメータを表 44 に要約する。C_{max} 及び AUC_{0-t} は雌が雄の約 8 倍であった。

表 44 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN1418 TK parameters

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 3	
		C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng•h/mL)
500	M	3080	38500
	F	23800	295000

Abbreviations: AUC_{0-t}: Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to time t(h); C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male
Note: Mean values for C_{max} and AUC

PRN1418 はラット in vivo MNT において染色体構造異常及び数的異常誘発能を示さず、この試験の MTD である 500 mg/kg/日までの用量で肝臓及び十二指腸細胞の DNA 鎖切断を誘導しなかった。

8.7.2.5 PRN2468

PRN2468 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（TXC1679 試験 [表 2.6.7.17 AG]、8.7.1 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 9 倍であった（表 41）。

PRN2468 の予測 1 日摂取量は 1 mg 以上であるが、本不純物は速やかに PRN834 又はリルザブルチニブに変換されるため、in vitro 遺伝毒性試験用に別の分子として合成することはできない（3.2.S.3.2

項 不純物）。変異原性ハザード評価（Module 4.2.3.7.6-1 [MAR0248]）の結論として、PRN2468 は、警告構造が変異原性試験陰性の DS（リルザブルチニブ）と同じアラートを示しているため、クラス 4 の不純物に分類される。また、PRN2468 は、リルザブルチニブの in vivo MNT で使用したバッチ [redacted] 中に存在し（DVR0185 試験 [表 2.6.7.9]）、この試験は MN 誘導に関して陰性であった。

PRN2468 を 0.11%含有するリルザブルチニブを雄及び雌ラットにそれぞれリルザブルチニブとして最大 100 mg/kg/日及び 50 mg/kg/日まで（強制）経口投与した（1281-18051 試験[表 2.6.7.4B]、5.2.1 項）。体重 60 kg のヒトに治療用量 800 mg/日を投与した場合のヒト推定曝露量と比較すると、推定曝露マージンは、雄及び雌についてそれぞれ 2.8 及び 1.4 倍と考えられる。

8.7.2.6 PRN835（PRN835.2HCl、RA16894765A）

PRN835 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（TXC1679 試験 [表 2.6.7.17 AG]、8.7.1 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 64 倍であった（表 41）。

PRN835 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.3 項）。

PRN835 について in vitro MNT を実施した（MNV1651 試験 [表 2.6.7.17 M]）。培養を、被験物質の 3～5 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（20、40 又は 60 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（20、60、70 又は 75 µg/mL）、-S9 で 24+0 時間（5、10、14 又は 18 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（2.5、5、10、14 又は 18 µg/mL）であった。精製水を溶媒として使用した。最高解析濃度は細胞毒性により制限された。PRN835 は培養 HPBL において 24+24 時間（-S9）の条件下で MN を誘導し、陽性と判断された。無遺伝毒性量（NOGEL）は 2.5 µg/mL と判断された。PRN835 は残りの条件下で MN を誘導しなかった。

ラットを用いた PRN835 の探索的用量設定試験を、100、250 又は 500 mg/kg/日の用量で実施した（TXP0586 試験 [表 2.6.7.17 O]）。一般状態の変化に基づき、MTD は 100 mg/kg/日と判断された。

PRN835 のラットを用いた in vivo COM 試験を実施した（COM0056 試験 [表 2.6.7.17 N]）。用量設定実験の用量は 100、200 又は 400 mg/kg/日とした。MTD は 400 mg/kg/日と判断された。2 つの用量設定実験の間で MTD に差が認められた理由は不明であり、異なる試験施設で実施したことによると考えられた。主実験では、1 群 6 匹の雄（7～8 週齢）に 100、200 又は 400 mg/kg/日の用量で投与した。100 及び 400 mg/kg/日の用量での投与後に%MN PCE の増加が認められたが、これは個々の動物での散発的な増加に起因するものであり、各群内で再現性がみられず、用量依存性もなかったことから、生物学的に重要でないと考えられた。400 mg/kg/日での肝臓における群平均テール強度は 95%参照範囲外であったが、観察された範囲内であった。いずれの PRN835 投与群においても、媒体対照群と比較して統計学的に有意なテール強度の増加はみられず、用量依存性のエビデンスも認められなかった。PRN835 の TK パラメータを表 45 に要約する。3 日目の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ は、100 mg/kg/日から 200 mg/kg/日にかけては用量比をわずかに下回って相加し、200 mg/kg/日から 400 mg/kg/日にかけては用量に比例して増加した。

表 45 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN835 TK parameters

Dose (mg/kg/day)	Day 3	
	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng•h/mL)
100	1630	29900
200	2090	37800
400	3150	69400

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration
Mean values for C_{max} and AUC

PRN835 はラット in vivo MNT において染色体構造異常及び数的異常誘発能を示さず、この試験の MTD である 400 mg/kg/日までの用量で肝臓及び十二指腸細胞の DNA 鎖切断を誘導しなかった。

8.7.2.7 PRN3232（RA16911927）

PRN3232 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（TXC1679 試験 [表 2.6.7.17 AG]、8.7.1 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 4 倍であった（表 41）。

PRN3232 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.9 項）。

PRN3232 について in vitro MNT を実施した（MNV1652 試験 [表 2.6.7.17 K]）。培養を、被験物質の 3 又は 4 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（10、25 又は 39 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（10、25 又は 33 µg/mL）、-S9 で 24+0 時間（10、15 又は 24 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（5、10、15 又は 20 µg/mL）であった。DMSO を溶媒として使用した。最高解析濃度は細胞毒性により制限された。PRN3232 は培養 HPBL において 24+24 時間（-S9）の条件下で MN を誘導し、陽性と判断された。NOGEL は 5 µg/mL と判断された。PRN3232 は残りの条件下で MN を誘導しなかった。

ラットを用いた PRN3232 の探索的用量設定試験を、500、1000 又は 2000 mg/kg/日の用量で実施した（TXP0589 試験 [表 2.6.7.17J]）。標的組織の変化に基づき、MTD は 500 mg/kg/日と判断された。

PRN3232 のラットを用いた in vivo COM 試験を実施した（COM0057 試験 [表 2.6.7.17 I]）。

用量設定実験を、MTD と判断された 2000 mg/kg/日の用量で実施した。2 つの用量設定実験間で MTD に違いがみられた理由は、異なる評価項目での評価に関連すると考えられた。COM 試験では 2000 mg/kg/日までの用量で試験の信頼性基準が満たされた。主実験では 1 群雄 6 匹（7～8 週齢）に 500、1000 又は 2000 mg/kg/日の用量で投与した。500 mg/kg/日で個体別のテール強度値が孤発性に 95%参照範囲を上回ったが、この群の他の動物では再現されなかったことから、生物学的に重要でなかった。PRN3232 の TK パラメータを表 46 に要約する。C_{max} 及び AUC_{0-24} は 500 mg/kg/日から 2000 mg/kg/日にかけてわずかに用量比を下回った。

表 46 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN3232 TK parameters

Dose (mg/kg/day)	Day 3	
	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng•h/mL)
500	2300	26300
1000	2650	41100
2000	4470	65000

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration
Mean values for C_{max} and AUC

PRN3232 はラット in vivo MNT において染色体構造異常及び数的異常誘発能を示さず、この種の試験に関する規制当局の最大推奨用量である 2000 mg/kg/日までの用量で肝臓及び十二指腸細胞の DNA 鎖切断を誘導しなかった。

8.7.2.8 PRN3612（RA17025194）

PRN3612 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（DVR0207 試験 [表 2.6.7.7 B]、3.1.4 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 25 倍であった（表 41）。

PRN3612 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.11 項）。

PRN3612 について in vitro MNT を実施した（MNV1635 試験 [表 2.6.7.17 X]）。培養を、被験物質の 3、4 又は 6 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（実験 1：4、5 又は 5.5 µg/mL、実験 2：4、5.5 又は 6.5 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（実験 1：5.5、7 又は 9 µg/mL、実験 2：4、8、8.5 又は 9 µg/mL）、-S9 で 24+0 時間（2.25、3 又は 3.5 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（実験 1：2.5、3 又は 3.5 µg/mL、実験 2：1、2、2.5、3.2、3.3 又は 3.4 µg/mL）であった。アセトンを溶媒として使用した。最高解析濃度は細胞毒性により制限された。PRN3612 は培養 HPBL において 3+21 時間（-S9）、3+21 時間（+S9）及び 24+24 時間（-S9）の条件下で MN を誘導し、陽性と判断された。NOGEL は、3+21 時間（-S9）では 5 µg/mL、3+21 時間（+S9）では 5.5 µg/mL、24+24 時間（-S9）では 1 µg/mL と判断された。PRN3612 は 24+0 時間（-S9）では MN を誘導しなかった。

ラットを用いた PRN3612 の探索的用量設定試験を、500、1000 又は 2000 mg/kg/日の用量で実施した（TXP0555 試験 [表 2.6.7.17 Z]）。MTD は検討した最高用量の 2000 mg/kg/日と判断された。

PRN3612 のラットを用いた in vivo COM 試験を実施した（COM0053 試験 [表 2.6.7.17 Y]）。用量設定実験は、MTD と判断された 2000 mg/kg/日の用量で実施した。主実験では 1 群雄 6 匹（8～9 週齢）に 500、1000 又は 2000 mg/kg/日の用量で投与した。500 及び 1000 mg/kg/日で個体別の%MN PCE が孤発性に 95%参照範囲を上回ったが、観察された範囲内であり、この群の他の動物では再現されなかったことから、生物学的に重要でなかった。2000 mg/kg/日群で個体別のテール強度値が孤発性に背景対照範囲を上回ったが、この群の他の動物では再現されなかったことから、生物学的に重要でな

かった。PRN3612 の TK パラメータを表 47 に要約する。C_{max} 及び AUC_{0-24} は 500 mg/kg/日から 2000 mg/kg/日にかけて用量比を下回った。

表 47 - Rat micronucleus and alkaline comet assay: Summary of PRN3612 TK parameters

Dose (mg/kg/day)	Day 3	
	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-24} (ng•h/mL)
500	403	3950
1000	489	5990
2000	427	5810

Abbreviations: AUC_{0-24}: Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; C_{max}: Maximum plasma concentration
Mean values for C_{max} and AUC

PRN3612 はラット in vivo MNT において染色体構造異常及び数的異常誘発能を示さず、この種の試験に関する規制当局の最大推奨用量である 2000 mg/kg/日までの用量で肝臓及び十二指腸細胞の DNA 鎖切断を誘導しなかった。

8.7.2.9 PRN3222（RA16741043）

PRN3222 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 1 か月間反復投与毒性試験（DVR0714 試験 [表 2.6.7.7 A]、3.1.3 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 45 倍であった（表 41）。

PRN3222 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.8 項）。

PRN3222 について in vitro MNT を実施した（MNV1638 試験 [表 2.6.7.17 U]）。培養を、被験物質の 3 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（95、105 又は 125 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（95、105 又は 125 µg/mL）、-S9 で 24+0 時間（85、95 又は 105 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（85、95 又は 105 µg/mL）であった。アセトンを溶媒として使用した。最高解析濃度は溶解性により制限された。PRN3612 は培養 HPBL において MN を誘導しなかった。

8.7.2.10 PRN3767（RA16740866）

PRN3767 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 3 か月間反復投与毒性試験（DVR0207 試験 [表 2.6.7.7 B]、3.1.4 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは 9 倍であった（表 41）。

PRN3767 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.12 項）。

PRN3767 について in vitro MNT を実施した（MNV1636 試験 [表 2.6.7.17 AF]）。培養を、被験物質の 3 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（40、100 又は 200 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（40、100 又は 200 µg/mL）、-S9 で 24+0 時間（20、100 又は 150 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（5、10 又は 20 µg/mL）であった。アセトンを溶媒として使用した。最高解析濃度は細胞

毒性（24+24 時間、-S9）又は沈殿により制限された。PRN3767 は培養 HPBL において MN を誘導しなかった。

8.7.2.11 PRN3590（RA16787051）

PRN3590 の一般毒性に関する安全性はラットを用いた 6 か月間反復投与毒性試験（DVR0376 試験 [表 2.6.7.7 C]、3.1.5 項）で確認され、予測臨床曝露量に対する用量マージンは雄で 13 倍、雌で 4 倍であった（表 41）。

PRN3590 は in vitro Ames 試験において陰性であった（8.6.1.10 項）。

PRN3590 について in vitro MNT を実施した（MNV1639 試験 [表 2.6.7.17 AB]）。培養を被験物質の 3 又は 4 濃度に曝露した。曝露時間は、-S9 で 3+21 時間（処理+回復）（20、40、80 又は 150 µg/mL）、+S9 で 3+21 時間（20、40、80 又は 150 µg/mL）、-S9 で 24+0 時間（20、40 又は 80 µg/mL）又は-S9 で 24+24 時間（20、40 又は 80 µg/mL）であった。アセトンを溶媒として使用した。最高解析濃度は沈殿により制限された。PRN3590 は培養 HPBL において MN を誘導しなかった。

8.8 ニトロソアミンのリスク評価

ニトロソアミン類の詳細な評価を、Module 3、3.2.S.3.2 項 不純物、小節 8 に示す。

DS 製造工程におけるニトロソアミン類の存在の可能性に関する完全な理論的リスク評価として、合成過程、入手原材料、開始物質、溶媒、試薬、水、回収又は再生された溶媒及び材料、相互汚染、並びに分解産物の評価を実施し、潜在的リスクのあるニトロソアミン類（N-ニトロソジエチルアミン［NDEA］、N-ニトロソジイソプロピルアミン［DIPNA］、N-ニトロソエチルイソプロピルアミン［EIPNA］、N-ニトロソピロリジン［NPYR］、[redacted]、[redacted]、並びに[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]）の有無に関して確認試験を実施した。その結果、DS 中に許容限度の[redacted]%を上回る N-ニトロソアミン類が存在するリスクはないことが示された。

原薬についてニトロソ化アッセイ手順の試験を含めた追加の総合的評価を実施した結果、三級アミンは脆弱で、NDSRI の[redacted]が生成する可能性が示された。原薬の工程及び保存では、このニトロソアミンが生成するリスクは特定されなかった。管理に関するさらなる配慮事項を製剤で確立する。したがって、原薬はリスクがなく、日常的な試験は不要と結論付けられる。

製剤については、[redacted]及び[redacted]を管理するために規格を変更し、[redacted]の規格値を設定する。

8.9 探究的毒性試験

8.9.1 ラット脳の探索的病理学的検査

リルザブルチニブを強制経口又はIJ投与したときのリルザブルチニブの曝露プロファイルを特徴づけるため、探索的PK－薬力学試験を実施した（Module 2.6.4 [4.2.1 項]、Module 4.2.1.2-5 [DVR0219]）。Wistar Hanラット（1群雌4匹、週齢は不明）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、50又は100 mg/kg/日の用量で3日間、強制経口又はIJ投与した。

リルザブルチニブをIJ投与したラットの脳におけるIBA-1発現を顕微鏡を用いて評価し、病理学報告書に詳述した（DVR0219試験 [表 2.6.5.4 A]）。側脳室の脳室周囲部位におけるIBA-1発現増加（軽微）が、100 mg/kg/日群の雌1匹に認められた。脳室外側面上のIBA-1発現は、内側面と比較して軽度の増加が認められた。小脳（髄質を伴う）において、IBA-1発現の増加は認められなかった。50 mg/kg/日の用量でIJ投与したラットでは、IBA-1発現の増加は認められなかった。

8.9.2 ラットを用いた3日間経口投与神経毒性試験

この試験は、リルザブルチニブによる脳の急性神経変性性変化の有無を評価するために実施した。Wistar Hanラット（1群雌雄各20匹、10週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、0（媒体対照）、50、150又は500 mg/kg/日の用量で3日間強制経口投与した（DVR0302試験 [表 2.6.7.17 AH]）。別の雌雄各3匹（媒体対照群）及び1群雌雄各6匹（リルザブルチニブ群）のラットをおき、リルザブルチニブのTK評価用の血液検体を3日目に採取した。最終投与の12、24、48及び72時間後に、1群雌雄各5匹のラットを剖検した。

検査項目は、生死確認、一般状態観察、体重、摂餌量、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）、TK、剖検、脳重量及び脳の病理組織学的検査とした。

投与期間終了時に、米国毒性病理学会（STP）による公表方針説明書(49)の推奨に従い、脳の切片を作製した。脳切片に、H&E染色、フルオロジェードB染色（神経変性の検出）、ビルショウスキー銀染色（軸索、樹状突起及びその他のニューロフィラメント含有神経細胞突起の視覚化）、IBA-1 IHC（小膠細胞の検出）及びGFAP IHC（星状膠細胞の検出）を施した。

リルザブルチニブ関連の死亡は発現しなかった。被験物質関連の一般状態の変化は、500 mg/kg/日群の雌における脱水、毛繕い低下、並びに身体及び／又は口の汚れのみであった。500 mg/kg/日群の雌のみで、対照群と比較した体重増加量減少（-3.9 g対5.9 g）が48時間の時点に認められた。摂餌量減少が、雄は500 mg/kg/日、雌は150 mg/kg/日以上で認められた。

500 mg/kg/日でのリルザブルチニブ関連の血液学的変化として、リンパ球数、好塩基球数、単球数及び大型非染色細胞数の増加を伴ったWBC数増加（雌雄）、並びに網状赤血球数減少（雌雄）が認められた。500 mg/kg/日での被験物質関連の血液生化学的変化として、ALT（雌雄）、AST（雌）及びTBIL（雌）の増加、並びに総コレステロール（雌雄）及び血中尿素窒素（雌）の減少が認められた。全体として、リン増加がリルザブルチニブ投与群で認められた。臨床検査パラメータの変化は毒性ではないと考えられた。

剖検時に肉眼所見は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の脳重量の変化は認められなかった。

各時点での脳の病理組織学的所見の発現率を表 48 に要約する。リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見として、神経網に及ぶ場合も散見された髄膜の好中球浸潤（軽微から軽度）が雄は 500 mg/kg/日、雌は 150 mg/kg/日以上で、脳室の外側面（脳室上衣下胚層の部位）周囲の脳室周囲 IBA-1 発現上昇（軽微から軽度）が 150 mg/kg/日以上（雌雄）で、それぞれ認められた。IBA-1 染色増加は側脳室周囲が最も顕著であったが、第三及び第四脳室周囲及び中脳水道にも認められた。小膠細胞はこれらの部位に均等に分布していたことから、発現に特定のパターンは認められなかった。

脳室周囲 IBA-1 発現に加えて、一部のラットでは IBA-1 陽性細胞数の軽微な増加（対照と比較して）がみられ、その分布は脳全体を通して均等であり、その特徴は神経網におけるびまん性 IBA-1 発現上昇であった。

試験計画書の要件ではなかったが、H&E 染色した脳室周囲器官（CVO）を検査したところ、全例ではないが十分な数の動物に CVO が存在したことから、CVO には対照群と比較したリルザブルチニブ関連の変化はないと結論された。また、神経細胞、神経細胞支持細胞及び血管の形態学的変化は認められなかった。脳のフルオロジェード B 染色及びビルショウスキー銀染色、並びに GFAP 発現には、リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見は認められなかった。

表 48 - 3-Day oral neurotoxicity study in rats: Brain microscopic findings

Dose (mg/kg/day)	Lesion	Post-dose (h) [a]							
		12		24		48		72	
		M	F	M	F	M	F	M	F
150	Neutrophilic infiltration	-	2	-	2	-	-	-	-
	IBA-1 periventricular	1	5	1	5	3	5	-	1
	IBA-1 diffuse, neuropil	-	-	-	-	-	-	-	1
500	Neutrophilic infiltration	1	3	2	1	1	-	1	-
	IBA-1 periventricular	5	5	5	5	5	5	5	5
	IBA-1 diffuse, neuropil	1	2	1	3	1	1	1	2

Abbreviations: F: Female; IBA-1: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1; M: Male
a 5 rats/sex/time point
-: no remarkable findings

TK パラメータを表 49 に要約する。全ての被験物質投与ラットで、リルザブルチニブの反復経口投与後に、リルザブルチニブへの全身曝露のエビデンスが認められた。リルザブルチニブの平均 t_{max} 値は、雄で 0.5 時間、雌で 0.5～1 時間であった。全体として、平均 C_{max} は 50 mg/kg/日から 500 mg/kg/日にかけて用量比を下回って増加したが、平均 AUC_{last} は用量比を上回って増加した。リルザブルチニブの血漿中曝露量は雌の方が雄より高かった（C_{max} は 1.9～3.7 倍、AUC_{last} は 2.4～3.2 倍）。

表 49 - 3-Day oral neurotoxicity study in rats: Summary of toxicokinetic parameters

Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 3	
		C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (ng•h/mL)
50	M	437	1190
	F	1040	3840
150	M	928	5280
	F	1740	12900
500	M	1190	18300
	F	4400	49800

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; M: Male

以上、リルザブルチニブの経口投与の結果として、脳の好中球浸潤が雄は 500 mg/kg/日、雌は 150 mg/kg/日以上で、脳室周囲 IBA-1 発現上昇が 150 mg/kg/日以上で、それぞれ認められた。被験物質に関連した神経変性性の病理組織学的所見は、500 mg/kg/日までの用量で認められなかった。500 mg/kg/日での 3 日目におけるリルザブルチニブの C_{max} 及び AUC_{last} 値は、雄でそれぞれ 1190 ng/mL 及び 18300 ng•h/mL、雌でそれぞれ 4400 ng/mL 及び 49800 ng•h/mL であった。

8.9.3 ラットを用いた 3 日間経口又は空腸内投与神経毒性試験

この試験は、リルザブルチニブを経口又は IJ 投与したときの脳の急性神経変性性変化の有無を評価するために実施した。IJ 投与を行った目的は、胃を迂回して投与したときのリルザブルチニブ関連の脳の病理組織学的変化を評価することであった。Wistar Han ラット（経口投与：1 群雌雄各 24 匹、IJ 投与：1 群雌雄各 18 匹、10～13 週齢）に、リルザブルチニブの遊離塩基を、3 日間にわたり、0（媒体対照）、50、150 若しくは 500 mg/kg/日の用量で強制経口投与、又は 0、75 若しくは 150 mg/kg/日の用量で IJ 投与した（DVR0312 試験 [表 2.6.7.17 AI]）。また、経口投与群及び IJ 投与群のいずれにおいても、雌雄各 3 匹（媒体対照群）及び 1 群雌雄各 6 匹（リルザブルチニブ群）の動物をおき、3 日目にリルザブルチニブの TK 評価用の血液検体を採取した。

最終投与の 12、24、72 及び 168 時間後に、1 群雌雄各 6 匹のラット（経口投与のみ）を剖検した。

検査項目は、一般状態観察、体重、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）、剖検、脳重量（灌流後）及び脳の病理組織学的検査とした。投与期間終了時に、脳を保存するため、麻酔下でラットを灌流（最初：0.9%生理食塩液、ヘパリン及び亜硝酸ナトリウム、固定：10%中性緩衝ホルマリン）した。脳及び前腸間膜／腹腔神経節を採取した。

投与期間終了時に、STP による公表方針説明書(49)の推奨に従い、脳の切片を作製した。脳切片に、H&E 染色、フルオロジェード B 染色（神経変性の検出）、ビルショウスキー銀染色（軸索、樹状突起及びその他のニューロフィラメント含有神経細胞突起の視覚化）、IBA-1 IHC（小膠細胞の検出）及び GFAP IHC（星状膠細胞の検出）を施した。

死亡は認められなかった。リルザブルチニブ関連の一般状態の変化として、脱水、毛繕い低下、並びに身体／及び又は口の汚れが 500 mg/kg/日の経口投与で認められた。被験物質関連の体重減少が、500 mg/kg/日経口投与群の雄（-2.0 g）及び雌（-3.2 g）で認められた。体重増加量減少が、75 及び 150 mg/kg/日 IJ 投与群の雌で認められた（対照群の雌の 7.4 g と比較してそれぞれ 2.3 及び 0.5 g）。

IJ 投与群では、リルザブルチニブ関連の血液学的変化は認められなかった。150 mg/kg/日経口投与群の雌で、WBC 数、リンパ球数、単球数及び赤血球数の軽微な増加が認められた。500 mg/kg/日では、WBC 数、好中球数、リンパ球数、単球数、好塩基球数、大型非染色細胞数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット及び血小板数の軽微な増加、並びに網状赤血球数の軽微な減少が認められた（例外は雌での大型非染色細胞数及び網状赤血球数の変化）。リルザブルチニブ関連の血液生化学的変化は認められなかった。

被験物質関連の肉眼所見は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の脳重量の変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見として、500 mg/kg/日経口投与群で、好中球浸潤（軽微から軽度）が、髄膜で最も高頻度にみられたが、神経網に及ぶ場合も散見された。好中球浸潤が認められたのは、投与の 12 時間後（雄 6 匹中 4 匹、雌 6 匹中 6 匹）、24 時間後（雄 6 匹中 6 匹、雌 6 匹中 4 匹）及び 72 時間後（雄 6 匹中 1 匹、雌 6 匹中 3 匹）であり、投与 168 時間後にはこの所見は認められなかったことから、回復性ありと考えられた。好中球浸潤部位の神経細胞、神経細胞支持細胞及び血管系には、形態学的変化は認められなかった。150 mg/kg/日以下の経口投与群及び 75 mg/kg/日以上の IJ 投与群では、好中球浸潤は認められなかった。

フルオロジェード B 染色、ビルショウスキー銀染色及び GFAP 発現には、リルザブルチニブの経口投与又は IJ 投与に関連した変化は認められなかった。

リルザブルチニブ関連の脳室周囲 IBA-1 発現上昇（軽微から軽度）が、150 mg/kg/日以上で認められた。脳の IBA-1 所見を表 50 に要約する。50 mg/kg/日経口投与群及び 75 mg/kg/日 IJ 投与群で、被験物質関連の IB-1 発現の変化は認められなかった。

表 50 - 3-Day oral or intra-jejunal neurotoxicity study in rats: Brain IBA-1 findings

Route	Dose (mg/kg/day)	Lesion	Post-dose (h) [a]							
			12		24		72		168	
			M	F	M	F	M	F	M	F
PO	150	Increased IBA-1 expression								
		periventricular (minimal to mild)	4	6	4	6	-	1	-	-
		diffuse, neuropil (mild)	-	-	-	-	-	3	-	-
		submeningeal (minimal)	-	-	-	-	-	-	-	-
		foci	-	-	-	-	-	-	-	-
PO	500	Increased IBA-1 expression								
		periventricular (minimal to mild)	6	6	6	6	5	5	-	-
		diffuse, neuropil (minimal to mild)	-	6	2	6	2	6	-	-
		submeningeal (minimal)	5	5	5	6	-	5	-	-
		foci (minimal to mild)	2	1	-	-	1	1	-	-
IJ	75	Increased IBA-1 expression								
		periventricular	-	-	-	-	-	-	ND	ND
IJ	150	Increased IBA-1 expression								
		periventricular (minimal)	1	3	-	3	-	-	ND	ND

Abbreviations: F: Female; IBA-1: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1; IJ: Intra-jejunal; M: Male; ND: No data; PO: Per os (oral)
-: no remarkable findings
a 5 or 6 rats/sex/time point

経口投与ラット及び IJ 投与ラットから採取した CVO、並びに IJ 投与ラットから採取した前腸間膜／腹腔神経節を、H&E 染色して検査した。CVO は全例ではないが十分な数の動物に存在したことから、CVO には対照動物と比較したリルザブルチニブ関連の変化はないと結論された。また、神経節にはリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

TK パラメータを表 51 に要約する。全体として、t_{max} 値は用量及び投与経路に依存せず、いずれの投与経路においても 0.5～3.0 時間の範囲であった。50～500 mg/kg/日の用量範囲で、経口投与後のリルザブルチニブの C_{max} 値は用量比を下回って増加し、AUC_{last} の増加には一貫した用量比例性はみられなかった。IJ 投与後のリルザブルチニブの C_{max} 及び AUC_{last} は用量比を下回って増加した。いずれの投与経路においても曝露量の性差が認められ、雌の曝露量は雄の 2 倍超であった。75 mg/kg/日 IJ 投与群と 150 mg/kg/日経口投与群の曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は同程度であった。

表 51 - 3-Day oral or intra-jejunal neurotoxicity study in rats: Summary of toxicokinetic parameters

Route	Dose (mg/kg/day)	Sex	Day 3	
			C_{max} (ng/mL)	AUC_{last} (ng•h/mL)
PO	50	M	605	2650
		F	1380	3540
	150	M	984	5820
		F	2600	10000
	500	M	1670	29000
		F	5160	69600
IJ	75	M	933	4890
		F	2120	9230
	150	M	1170	7140
		F	2430	15600

Abbreviations: AUC_{last}: Area under the plasma concentration-time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: Maximum plasma concentration; F: Female; IJ: Intrajejunal; M: Male; PO: Per os (oral)

以上、リルザブルチニブの経口投与の結果として、500 mg/kg/日で脳の好中球浸潤がみられ、150 mg/kg/日以上で一過性の脳室周囲 IBA-1 発現上昇が認められた。小膠細胞の細胞密度上昇を示す IBA-1 発現上昇は一過性であり、神経細胞、神経細胞支持細胞及び血管系には関連するその他の病理組織学的変化は認められず、関連する病理学的所見も認められなかった。150 mg/kg/日 IJ 投与群で、一過性の脳室周囲 IBA-1 発現上昇が認められた。リルザブルチニブの経口投与又は IJ 投与による神経変性性の病理組織学的所見は認められなかった。

150 mg/kg/日経口投与での曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は、75 mg/kg/日 IJ 投与と同程度であった。経口投与で神経変性性の所見がみられなかった最高用量（500 mg/kg/日）でのリルザブルチニブの 3 日目の C_{max} 及び AUC_{last} は、雄でそれぞれ 1670 ng/mL 及び 29000 ng•h/mL、雌でそれぞれ 5160 ng/mL 及び 69600 ng•h/mL であった。IJ 投与で神経変性性の所見がみられなかった最高用量（150 mg/kg/日）でのリルザブルチニブの 3 日目の C_{max} 及び AUC_{last} は、雄でそれぞれ 1170 ng/mL 及び 7140 ng•h/mL、雌でそれぞれ 2430 ng/mL 及び 15600 ng•h/mL であった。

8.9.4　リルザブルチニブ関連の肝臓酵素誘導の探索的トランスクリプトームプロファイリング

ヒト及びラットの肝臓スフェロイドを用いた探索的トランスクリプトームプロファイリングを実施し、リルザブルチニブ関連の肝臓酵素誘導をラットとヒトで比較した（Module 4.2.3.7.7-3 [MCT0292]）。ラット 2 年間がん原性試験で、リルザブルチニブ関連の甲状腺濾胞細胞過形成及び腺腫／癌が認められた（5.2.1 項）。これらの所見はげっ歯類に特異的な肝臓酵素誘導のメカニズムに関連しているとの仮説が立てられた(50)(51)(52)。ラット及びヒトの肝臓スフェロイドを、溶媒（0.5%DMSO）、リルザブルチニブ（0.3、3 又は 9 µmol/L）、チオシアネート（PRN4400、100 µmol/L）又はフェノバルビタール（陽性対照、750 µmol/L）で 1、3 又は 7 日間処理した。処理後、

ラット及びヒトの肝臓スフェロイドを用いたリボ核酸シーケンシングにより、全ゲノム転写プロファイルを作成した。

ヒト及びラットの肝臓スフェロイド内でリルザブルチニブ及びフェノバルビタールにより誘導された CYP 遺伝子間には高度の重複がみられ、特に CYP3 ファミリー遺伝子発現への影響が顕著であった。ヒト肝臓スフェロイド内で、CYP3A4 の発現はフェノバルビタールにより 43 倍、リルザブルチニブにより 28 倍にそれぞれ上昇し、ラット肝臓スフェロイド内で、ラットオーソログ Cyp3a1 の発現はフェノバルビタールにより 30 倍、リルザブルチニブにより 119 倍に、それぞれ上昇した。リルザブルチニブは、ヒト及びラットのいずれにおいても、第 I 相代謝の誘導剤となる可能性がある。

ラット肝臓スフェロイドにおいて、リルザブルチニブは広範囲の第 II 相代謝（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ［GST］、スルホトランスフェラーゼ［SULT］及びグルクロノシルトランスフェラーゼ［UGT］）遺伝子を誘導した。これらの第 II 相代謝遺伝子のうち、24 種類はリルザブルチニブにより 7 日後に発現上昇し、その中には T4 代謝酵素 Ugt1a6（3.6 倍に発現上昇）が含まれていた。わずかにより軽度の第 II 相酵素の遺伝子発現への影響がフェノバルビタールで認められ、発現上昇した 13 種類の遺伝子がこのカテゴリー内であった（その全てがリルザブルチニブによっても発現上昇した）。これらのデータは、リルザブルチニブがラットにおいてフェノバルビタール様のミクロソーム酵素誘導剤（MEI）として作用することを示しており、甲状腺ホルモンの消失を亢進させる可能性があると考えられる。

ラットとは対照的に、リルザブルチニブはヒト肝臓スフェロイドにおいて第 II 相代謝遺伝子を誘導しなかった。一方、フェノバルビタールは、ヒト肝臓スフェロイドにおいて 6 種類の異なる UGT を誘導するとともに、数種類の GST 及び SULT 遺伝子を誘導した。これらの結果に基づくと、リルザブルチニブはヒトにおける第 II 相代謝の誘導剤ではないため、ヒトで甲状腺ホルモン消失を変化させる可能性はないと考えられる。

チオシアネートでは、ラット及びヒトの肝臓スフェロイドにおいて、第 I 相又は II 相酵素の遺伝子発現の明らかな変化は認められなかった。

以上、リルザブルチニブで処理したラット肝臓スフェロイドにおける転写プロファイルは、フェノバルビタール様 MEI プロファイルを示し、第 I 相及び第 II 相代謝に関与する複数の遺伝子の誘導が認められ、その中には甲状腺ホルモンの代謝及び消失に関与することが知られる遺伝子も含まれていた。ラット 2 年間がん原性試験（5.2.1 項）でのリルザブルチニブに関連した甲状腺濾胞細胞過形成及び腺腫／癌の発現率上昇は、ヒトへの関連性がないフェノバルビタール様 MEI 作用機序に起因するものであった。

8.10　光毒性試験

8.10.1 BALB/c 3T3 細胞を用いたリルザブルチニブの探索的光毒性試験

BALB/c 3T3 細胞に対するリルザブルチニブの光毒性作用の有無を評価するための探索的光毒性試験を、in vitro 3T3 ニュートラルレッド取込み光毒性試験を用いて実施した（DVR0374 試験 [表

2.6.7.17 AJ]）。リルザブルチニブ、クロルプロマジン（光毒性の陽性対照）及びタモキシフェン（細胞毒性対照）の保存溶液（30 mmol/L）を、DMSO で 4 倍に段階希釈して 8 濃度（150～0.0091 µmol/L）を調製した。3T3 細胞培養をリルザブルチニブとともに 60 分間インキュベートした後、培養を線量 5 J/cm^2 の UVA に曝露するか、又は暗所に室温で 50 分おいた。ニュートラルレッドを培養に 2 時間添加した。50%阻害濃度（IC_{50}）及び光刺激係数（PIF、［IC_{50} (-紫外線［UV］)］/［IC_{50} (+UV)］）を算出した。

リルザブルチニブで処理した UVA 照射及び非照射検体の IC_{50} 値は、それぞれ 41.30 及び 79.84 µmol/L であり、その結果、PIF は 1.93 となった。被験物質の PIF は 2 未満であったため、光毒性はないと予測された。

8.10.2 BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いたニュートラルレッド取込み光毒性試験

BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞に対するリルザブルチニブの光毒性作用の有無を評価するための試験を、in vitro 3T3 ニュートラルレッド取込み光毒性試験を用いて実施した（PHV0082 試験 [表 2.6.7.17 AK]）。この試験では、リルザブルチニブ及び UV 照射に曝露された（+UVR）BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞の生存率を、UV 非照射下（-UVR）でリルザブルチニブに曝露された線維芽細胞の生存率と比較し、RS 低下を求めた。陽性対照はプロメタジン（0.100～178 µg/mL）とした。この試験のデザインは、化学品の試験に関する OECD ガイドライン 432 (53)及び ICH ガイドライン S10「医薬品の光安全性評価ガイドライン」(54)に基づくものであった。

溶解度、pH 及び用量設定試験の結果に基づき、最終的な試験でのリルザブルチニブの濃度を 1.00～56.2 µg/mL に設定した。最終的な試験では、被験物質及び溶媒対照物質を 3%DMSO で希釈した。適用される場合、培養に 5 J/cm^2 の UVA 光、並びに 18、19 及び 23 mJ/cm^2 の UVB 光を約 35～41.5 分間照射するか、又は暗所においた。溶媒及びリルザブルチニブ溶液の光学密度（OD）を 540 nm で測定した。

最終的な試験 1～4 の結果を表 52 に要約する。プロメタジンの UVR 生存率（78%）は基準の 80%超を下回り、最終的な試験 1 及び 2 の平均 OD_{540} 値（それぞれ 0.326 及び 0.309）は基準の 0.400 以上を下回ったことから、これらの最終的な試験は OECD 432 で推奨される試験の許容基準(53)を満たさなかった。また、これらの試験の結果では結論が得られず、PIF は試験 1 及び 2 において光毒性がないことを示し、平均光作用（MPE）は試験 2 のみでの光毒性を示唆していた。そのため、確認のための最終的な試験（試験 3 及び 4）を、同じ濃度の陽性対照及びリルザブルチニブで実施した。

最終的な試験 3 及び 4 では、細胞生存率、OD_{540}、並びにプロメタジンの細胞毒性及び光毒性に関する全ての OECD 432 推奨基準(53)が満たされたことから、これらの試験の正当性が示された。3% DMSO／ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液（DPBS）中のリルザブルチニブの溶解度限界（56.2 µg/mL）までの濃度で試験を実施したところ、UVR 曝露の存在下及び非存在下でリルザブルチニブの IC_{50} が示されたが、PIF 及び MPE の基準によると光毒性は認められなかった。

表 52 - NRU phototoxicity assay: Definitive Assay results

	IC_{50} (µg/mL) -UVR	IC_{50} (µg/mL) +UVR	PIF	MPE	Phototoxic Potential	UVR Survival (%)	Average OD_{540}
Definitive Assays 1 and 2							
Promethazine	91.527	0.612	151.020	0.598	Yes	78	0.504
Rilzabrutinib (Assay 1)	48.857	34.856	1.402	0.144	No	89	0.326
Rilzabrutinib (Assay 2)	49.603	34.454	1.441	0.215	Yes	103	0.309
Definitive Assays 3 and 4							
Promethazine	137.451	1.355	101.583	0.550	Yes	93	0.534
Rilzabrutinib (Assay 3)	39.926	38.661	1.034	-0.008	No	91	0.527
Rilzabrutinib (Assay 4)	42.980	36.272	1.186	0.022	No	95	0.518

Abbreviations: MPE: Mean photo effect; NRU: Neutral red uptake; OD; Optical density; PIF: Photo irritation factor; +UVR: Phototoxicity with UVR exposure; -UVR: Cytotoxicity without UVR exposure

Criterion for phototoxicity: PIF: ≥5.000; MPE: ≥0.150

OECD criteria for assay acceptability is >80% UVR Percent Survival and OD_{540} ≥0.400.

最終的な試験 3 及び 4 の結果に基づき、リルザブルチニブには光毒性はないと考えられた。そのため、更なる光安全性評価は実施しなかった。

9　考察及び結論

リルザブルチニブの非臨床安全性プロファイルを評価するため、ラット及びイヌを用いた単回投与毒性試験、一連のラット及びイヌを用いたそれぞれ最長 6 か月間及び 9 か月間の最終的な反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、トランスジェニックマウス及びラットを用いたがん原性試験、一連の探索的及び最終的なラットを用いた生殖発生毒性試験（受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、胚・胎児発生に関する試験、並びに出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験）及びウサギを用いた生殖発生毒性試験（胚・胎児発生に関する試験）、並びに幼若ラットを用いた探索的な毒性試験を実施した。また、免疫毒性、薬物乱用性、代謝物、不純物（標準及び変異原性）及び光毒性の評価、並びに探究的毒性試験を実施した。

9.1　一般毒性

一般毒性試験において、ラット 6 か月間反復投与毒性試験では 150 mg/kg/日以上、イヌ 9 か月間反復投与毒性試験では 50 mg/kg/日の用量で死亡が発現した。マウス、ラット及びイヌを用いた毒性試験で特定されたリルザブルチニブの遊離塩基の主要毒性標的器官は、副腎（ラット）、骨髄（イヌ）、脳（ラット）、消化管（ラット／イヌ）、頸部／腸間膜リンパ節（ラット／イヌ）、肝臓（ラット／イヌ）、肺（ラット）、パイエル板（イヌ）、脾臓（ラット／イヌ）、胸腺（ラット／イヌ）及び子宮（ラット）であった。

9.1.1　脳

ラットの脳におけるリルザブルチニブ関連の変化として、髄膜及び血管周囲腔の好中球浸潤（軽微から軽度）がみられ、それに伴って、ラット単回及び反復投与毒性試験では 1、3 及び 6 か月後に神経網近傍の好中球浸潤（軽微）が、6 か月後には血管周囲混合細胞性炎症（軽微）が、それぞれ認められた。好中球浸潤及び混合細胞性炎症は、回復期間中に回復した。好中球浸潤部位には、神経細胞、神経細胞支持細胞及び血管系の形態学的変化は認められなかった。1、3 及び 6 か月後に、IBA-1 発現（小膠細胞の細胞密度）上昇（軽微から軽度）が、側脳室、第三及び第四脳室、並びに視交叉近傍に認められた。IBA-1 発現は側脳室周囲に均等に分布せず、脳室の外側面（脳室上衣下胚層）でより顕著に認められた。3 及び 6 か月後の GFAP 発現（星状膠細胞）上昇は IBA-1 発現と同程度であった。リルザブルチニブに関連した IBA-1 及び GFAP の発現上昇は、部分的に回復した。ラットの脳における神経変性及び細胞変化は認められなかった。

イヌにおける IBA-1 発現は 1、3 及び 9 か月後に媒体及びリルザブルチニブ投与動物の両方で認められ、一貫した被験物質関連の変化は認められなかった。

リルザブルチニブに関連した IBA-1 及び GFAP 発現の変化に関する外部専門家(55)の結論によると、これらの変化は反応性膠細胞の存在を示しているが、神経実質に可視的な構造損傷がみられなかったことから、これらの所見は毒性ではない。

9.1.2 消化管

ラットでは、リルザブルチニブ関連の病理組織学的所見である出血が、6 か月後に食道（中等度）、胃（軽微から軽度）及び十二指腸（中等度）で認められた。胃の出血は腺胃筋層を中心として認められた。また、混合細胞性及び好中球性の炎症が腺胃に認められた。回復期間終了時には、胃、食道及び十二指腸の出血及び炎症は認められなかった。

イヌにおける消化管毒性の一般状態の変化は、9 か月後の嘔吐及び糞便異常（下痢、軟便）のみであった。胃の病理組織学的所見として、上皮内リンパ球増加（軽度）が粘膜萎縮を伴って 9 か月後に認められたが、回復期間中に回復した。

9.1.3 肝臓

ラットにおけるリルザブルチニブ関連の肝臓の変化として、肝細胞肥大（軽微で、多くは小葉中心性）が 2 週間、並びに 1、3 及び 6 か月後に認められたが、回復期間中に回復した。ラット肝臓スフェロイド試験でみられたように（8.9.4 項）、リルザブルチニブは第 I 相及び第 II 相代謝に関与する複数の遺伝子を誘導した。肥大は酵素誘導に関連している。

イヌにおける被験物質関連の変化として、空胞化（グリコーゲン蓄積に一致する）が 1 及び 3 か月後に、単細胞壊死（軽微）が 3 ヵ月後に、クッパー細胞色素増加及び肥大が 9 か月後に、それぞれ認められた。トランスアミナーゼ（ALT、AST）値増加が、1、3 及び 9 か月後に認められた。クッパー細胞色素を除いて、リルザブルチニブ関連の肝臓の所見は回復期間中に回復した。

9.1.4 リンパ系組織

ラットにおいて、リルザブルチニブに関連した頸部リンパ節の濾胞数減少（軽微から軽度）が 1 か月後にみられたが、回復期間中に回復した。イヌでは、頸部及び／又は腸間膜リンパ節の胚中心におけるリンパ球数減少が 3 か月後にみられたが、回復期間中に回復した。

ラットでのリルザブルチニブ関連の病理組織学的所見として、胸腺の皮質及び／又は髄質におけるリンパ球減少（軽微から軽度）が 2 週間後及び 3 か月後にみられ、胸腺（雄）の可染小体マクロファージ数増加（軽微から軽度）が 1 か月後に認められた。回復期間終了時には、所見は認められなかった。被験物質関連の胸腺細胞密度低下（軽微から中等度）が、イヌの 2 週間、1 か月間及び 3 か月間反復投与毒性試験で認められた。

リルザブルチニブ関連のラット脾臓重量減少及びそれに関連する病理組織学的所見の白脾髄リンパ球減少（軽微）が、14 日後に認められた。イヌでは、関連する病理組織学的所見を伴わない脾臓重量減少が、3 か月後に認められた。回復期間終了時には脾臓重量増加が認められた。

イヌでは、被験物質に関連したパイエル板のリンパ球細胞密度低下（軽度から中等度）が、2 週間、1 か月間及び 3 か月間反復投与毒性試験で認められた。これらの変化は回復期間中に回復したと考えられた。

イヌでは、回復性のある被験物質関連の骨髄（胸骨）細胞密度低下（軽微から軽度）が、1 か月後に認められた。

9.1.5 その他の所見

ラットで副腎皮質空胞化（軽微）が 3 か月後に認められたが、回復期間中に回復した。

ラットにおけるリルザブルチニブ関連の肺の変化として、肺胞腔及び細気管支内の粘液、細気管支粘膜乳頭状過形成、並びに肺胞マクロファージ増加が、3 か月後に認められた。肺の変化は回復期間終了時には認められなかった。

関連する病理組織学的所見を伴わない被験物質関連の回復性のあるラット子宮重量増加が、6 か月後に認められた。

9.2 遺伝毒性

リルザブルチニブは、2 つの in vitro 遺伝毒性試験（Ames 試験及び HPBL を用いる哺乳類染色体異常試験）及び 1 つの in vivo 遺伝毒性試験（ラット MNT）において、変異原性及び染色体異常誘発能を示さなかった。

9.3 がん原性

リルザブルチニブのがん原性試験を、TgHRAS マウス及び Wistar Han ラットを用いて実施した。マウスの試験では、検討した最高用量の 300 mg/kg/日においても、生存率及び新生物発現率にリルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。

ラットでは、検討した最高用量の 100 mg/kg/日（雄）及び 50 mg/kg/日（雌）においても、リルザブルチニブ関連の生存率の変化は認められなかった。甲状腺腫瘍（濾胞細胞腺腫／癌）及び膵臓腫瘍（島細胞腺腫）の発現率上昇が、100 mg/kg/日群の雄に認められた。ラットにおいて、雄では 30 mg/kg/日以下、雌では 50 mg/kg/日以下の用量で、リルザブルチニブは発がん性を示さないと結論された。

甲状腺腫瘍に関する外部専門家(3)の結論として、ラットにおける甲状腺腫瘍誘導は、肝臓での第 II 相 UGT 酵素誘導による甲状腺ホルモン秩序の障害に一致するものであり、このことはラット肝臓スフェロイドを用いたトランスクリプトームプロファイリングで確認された（8.9.4 項、Module 4.2.3.7.7-3 [MCT0292]）。UGT 酵素誘導の結果として、TSH 増加によりラット甲状腺濾胞細胞が慢性的に刺激されることで（リルザブルチニブのラット 3 及び 6 か月試験で認められた）肥大が引き起こされ、その後、過形成（前腫瘍性変化）及び最終的には濾胞腫瘍形成に至る。これはラットにおける非遺伝毒性的発がんメカニズムであり、ヒトへの関連性はないと考えられる。

膵島細胞腺腫はラットで普通にみられる加齢性の腫瘍であり、観察された発現率は利用可能な背景対照を超えるものではなく、島細胞に対するリルザブルチニブの増殖作用を支持する他の所見は認められなかった。したがって、膵臓腺腫は自然発生的な加齢性所見であり、今回の試験でみられた軽度の発現率上昇は、ラットにおける自然発生的背景変化の悪化による二次的なものである可能性がある。

さらに、リルザブルチニブ群の雄ラットで認められた膵臓の線維化及び炎症の所見は、ラットにおける自然発生的背景変化であり、公表されている BTK 阻害薬の作用に一致するものであった。他の動物種では同様の変化は認められなかった。雄ラットにおける同様の所見が他の BTK 阻害薬の臨床使用時の曝露量で報告されていることから、BTK 阻害薬による膵臓の変化は動物種及び性に特異的と考えられる(10)(11)(12)(13)(14)。病理組織学的変化は対照ラットで報告されている自然発生的所見に一致しており、高齢ラットにおける一般的な背景所見が被験物質に関連して加速した可能性がある。膵臓の変化は、回復期間後に完全又は部分的に回復することが示されている(11)。膵臓への影響に対する感受性は性及びラットの系統に依存しており、Sprague Dawley ラットは Wistar ラットより感受性が高い(10)(11)。BTK 阻害薬による膵臓の病変には、投与期間に伴った重症度及び発現率の上昇も認められる(10)。BTK 阻害薬に関してラットに特異的な違いが生じるメカニズムは明確には特定されていないが、原発性微小血管傷害が関与している可能性がある(10)(15)。イブルチニブの投与を受けた患者での膵臓障害は臨床で報告されていないことから、膵臓毒性がヒトに発現する可能性は低いと考えられる(10)(16)。したがって、検討した最高用量の 100 mg/kg/日（雄）及び 50 mg/kg/日（雌）まで、ヒトへの関連性があると考えられる腫瘍は認められなかった。

9.4　生殖発生毒性

雌雄のラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生試験において、性周期、交尾能、受胎能、精子パラメータ、並びに卵巣及び子宮パラメータを含むいずれの生殖パラメータにも、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。受胎能、生殖能及び初期胚発生に関する NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。

ラットを用いた探索的な胚・胎児発生に関する用量設定試験において、リルザブルチニブを 500 mg/kg/日の用量で投与したところ、母動物での MTD を超えた。着床後胚胎児死亡率及び早期吸収率上昇、並びに胎児体重減少が、500 mg/kg/日で認められた。胎児の外表、内臓及び骨格の変化が、500 mg/kg/日で認められた。150 mg/kg/日以下では奇形は認められなかった。

ウサギを用いた探索的な胚・胎児発生に関する用量設定試験では、観察された母動物毒性に関連する可能性がある軽度の早期吸収率上昇が 150 mg/kg/日で認められた。胎児内臓異常が 50 mg/kg/日以上（心血管系）及び 150 mg/kg/日（腎臓）で認められたことから、リルザブルチニブの催奇形性が示唆されたが、用量依存的な発現率上昇はみられなかったことから、被験物質との関連性は不明確と考えられた。

ラット及びウサギを用いた最終的な胚・胎児発生に関する試験では、リルザブルチニブに関連する胎児発生の変化、並びに胎児の外表、内臓及び骨格の形態変化は認められなかった。ラット及びウサギでの胚・胎児発生に関する NOAEL は、それぞれ検討した最高用量の 300 及び 100 mg/kg/日と判断された。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験では、リルザブルチニブ関連の平均体重、体重増加量及び摂餌量の変化が妊娠期間中に 150 mg/kg/日以上でみられ、体重及び摂餌量減少が授乳期間中に 300 mg/kg/日で認められたことから、母動物（F_0）の全身毒性に関する NOAEL は 50 mg/kg/日と判断された。F_1 新生児／発達毒性に関する NOAEL は 150 mg/kg/日と判断され、F_1 親動物の全身毒性、F_1 の生殖毒性及び F_2 の胚毒性に関する NOAEL は、検討した最高用量の 300 mg/kg/日と判断された。

幼若ラットを用いた探索的毒性試験では、生後 10～34 日に投与を実施した。リルザブルチニブ関連の死亡及び一般状態の変化が、100 mg/kg/日以上で認められた。NOAEL は 30 mg/kg/日と判断された。

9.5 その他の毒性

9.5.1 免疫毒性

リルザブルチニブについて、免疫毒性に特化した試験は実施しなかった。しかし、免疫毒性関連の評価項目（血液学的検査、免疫フェノタイピング［フローサイトメトリー］及び解剖病理学的検査）を、ラット及びイヌを用いた GLP 適用の反復投与毒性試験で評価した。ラット及びイヌの反復投与毒性試験では、血液学的検査及び免疫フェノタイピングで、リルザブルチニブ関連の変化は認められなかった。回復性のある被験物質関連の病理組織学的所見が、ラットでリンパ系組織（頸部リンパ節、胸腺）に、イヌでリンパ系組織及び造血組織（胸腺、パイエル板、リンパ節、骨髄）に、それぞれ認められた。

9.5.2 薬物乱用性評価

リルザブルチニブ及びその主要代謝物である PRN4400（チオシアネート）について、依存性及び乱用性のエビデンスは認められなかった。化学構造、作用機序、薬理作用、毒性及び既存の臨床データによると、既知の乱用薬物との類似性はない。そのため、更なる非臨床試験（自己投与、薬物弁別、退薬など）及びヒトの乱用性に特化した臨床試験は実施しなかった。提案中の治療用量である 400 mg BID で乱用性を示すデータは得られていないことから、乱用による公衆衛生上のリスクはないと予想される。現時点のデータにより、治療適応用量でのリルザブルチニブにはスケジュール分類を適用しないことが支持される。

9.5.3 代謝物

動物及びヒトの代謝物の評価により、ラット、イヌ及びヒトを含む様々な動物種間で、代謝経路は質的に類似していることが明らかになった。これらのデータをまとめると、ヒトにおける重要な循環血中代謝物は非臨床動物種でも認められることが判明した。

9.5.4 潜在的変異原性不純物の評価

実際及び潜在的不純物の変異原性ハザードを、ICH M7(R2) (1)に従い、予定臨床用量、臨床試験の期間及び治療適応を考慮に入れて評価した。変異原性不純物は、製造工程を通して、許容限度未満に効果的にパージされる（Module 3、3.2.S.3.2 項 不純物）。利用可能な安全性及び品質データによると、DS に関連する明らかなヒトへの変異原性リスクはない。

9.5.5 原薬不純物の安全性確認

一般毒性に関する DS（適切な場合は DP）不純物の安全性確認を、ICH Q3A(R2) (2)に従い、0.15%以上の濃度で存在すると予測される、又は 1 日摂取量が 1 mg 以上と予測される不純物について実施した。遺伝毒性評価を、1 日摂取量が 1 mg 以上と予測される不純物について実施した（表 41）。一般毒性に関する安全性確認での用量マージンは、GLP 適用反復投与毒性試験の NOAEL での不純物曝露量（mg/kg）及び 60 kg の患者におけるリルザブルチニブの治療用量 800 mg での不純物の予想曝露量を用い、各不純物に関する提案中の許容基準を考慮に入れて算出した。遺伝毒性評価として、Ames 試験及び in vitro MNT を実施した。In vitro MNT の結果が陽性であった不純物については、in vivo COM 試験（in vivo MNT とコメット試験の組合せ）を実施した。提案中の個別規格設定濃度（Module 3）での不純物は、ICH Q3A(R2) (2)に従って適切に安全性が確認されていると考えられる。

9.5.6 潜在的ニトロソアミンリスク評価

DS 製造工程におけるニトロソアミン類の存在の可能性に関する完全な理論的リスク評価として、合成過程、入手原材料、開始物質、溶媒、試薬、水、回収又は再生された溶媒及び材料、相互汚染、並びに分解産物の評価を実施し、潜在的リスクのあるニトロソアミン類（NDEA、DIPNA、EIPNA、NPYR、[redacted]、[redacted]、並びに[redacted]、[redacted]、[redacted]及び[redacted]）の有無に関して確認試験を実施した。その結果、DS 中に許容限度の[redacted]%を上回るニトロソアミンが存在するリスクはないことが示された。したがって、更なる対策は必要ないと判断された。

9.5.7 探究的毒性

探索的 PK－薬力学試験で、リルザブルチニブをラットに IJ 投与したときの脳における IBA-1 発現を評価した。側脳室の脳室周囲領域における IBA-1 発現上昇（軽微）が、100 mg/kg/日群の雌で認められた。小脳（髄質を伴う）には、IBA-1 発現上昇は認められなかった。

3 日間神経毒性試験でリルザブルチニブを経口投与したときのリルザブルチニブ関連の脳の変化を評価したところ、脳の好中球浸潤が雄は 500 mg/kg/日、雌は 150 mg/kg/日以上の用量でみられ、脳室

周囲 IBA-1 発現上昇が 150 mg/kg/日以上で認められた。500 mg/kg/日までの用量で、被験物質に関連した神経変性性の病理組織学的所見は認められなかった。

3 日間神経毒性試験で、リルザブルチニブを経口又は IJ 投与したときの脳におけるリルザブルチニブ関連の変化を評価した。リルザブルチニブの経口投与の結果として、脳の好中球浸潤が 500 mg/kg/日で、一過性の脳室周囲 IBA-1 発現上昇が 150 mg/kg/日以上で、それぞれ認められた。IBA-1 発現上昇は一過性で、神経細胞、神経細胞支持細胞及び血管系には関連するその他の病理組織学的変化はみられず、関連する病理学的所見も認められなかった。一過性の脳室周囲 IBA-1 発現上昇が、150 mg/kg/日での IJ 投与で認められた。リルザブルチニブを経口又は IJ 投与したとき、リルザブルチニブに関連する神経変性性の病理組織学的所見は認められなかった。

ヒト及びラットの転写プロファイルにおけるリルザブルチニブ関連の変化を、ラット及びヒトの肝臓スフェロイドを用いて評価した。ラット肝臓スフェロイドにおいて、リルザブルチニブはフェノバルビタール様 MEI プロファイルを示し、第 I 相及び第 II 相代謝に関与する複数の遺伝子を誘導した。その中には、甲状腺ホルモンの代謝及び消失に関与することが知られる遺伝子も含まれていた。ヒト肝臓スフェロイドにおいて、リルザブルチニブは第 II 相代謝遺伝子を誘導しなかったことから、甲状腺ホルモン消失を変化させる可能性はないと考えられた。

9.5.8 光毒性

リルザブルチニブは光毒性に関して陰性であった。

9.5.9 結論

リルザブルチニブの非臨床開発プログラムで得られた結果により、免疫性血小板減少症の治療を目的としたリルザブルチニブの臨床での安全性及び登録は支持される。

参 考 文 献

1. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk - M7(R2). Geneva, Switzerland: ICH harmonised tripartite guideline, 2023. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step4_2023_0216_0.pdf
2. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Impurities in new drug substances - Q3A(R2) Geneva, Switzerland: ICH harmonised tripartite guideline, October 2006. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf
3. Rosol TJ. Pathogenesis and interpretation of in vivo and in vitro thyroid effects of rilzabrutinib (SAR444671/PRN1008). Consultant pathologist report - DIV2065. Jul-2022
4. Bartsch R, Brinkmann B, Jahnke G, Laube B, Lohmann R, Michaelsen S, et al. Human relevance of follicular thyroid tumors in rodents caused by non-genotoxic substances. Regul Toxicol Pharmacol. 2018; 98:199-208.
5. FosterJR, Tinwell H, Melching-Kollmuss S. A review of species differences in the control of, and response to, chemical-induced thyroid hormone perturbations leading to thyroid cancer. Arch Toxicol. 2021; 95:807-36.
6. Hollingshead BD, Radi ZA. Human relevance of pharmaceutical drug-induced thyroid tumors in rats, labeling implications, and carcinogenicity study requirements. J Appl Toxicol. 2025; 45:1426-39.
7. Plummer S, Beaumont B, Elcombe M, Wallace S, Wright J, Mcinnes EF, Currie RA, Cowie D. Species differences in phenobarbital-mediated UGT gene induction in rat and human liver microtissues. Toxicol Rep. 2021; 8:155-61.
8. Taylor I, Mowat V. Comparison of longevity and common tumor profiles between Sprague-Dawley and Han Wistar rats. J Toxicol Pathol. 2020;33(3):189-96.
9. Mense MG, Rosol TJ. Endocrine pancreas. In: Boorman’s Pathology of the Rat: Reference and Atlas, 2nd Ed. (Suttie AW, Leininger JR, and Bradley AE, eds.). 2018. Academic Press, San Diego, CA, pp. 695-704.
10. Erickson RI, Schutt LK, Tarrant JM, McDowell M, Liu L, Johnson AR, et al. Bruton's tyrosine kinase small molecule inhibitors induce a distinct pancreatic toxicity in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2017;360(1):226-38.
11. Bhaskaran M, Cornwell PD, Sorden SD, Elwell MR, Russell NR, Pritt ML, et al. Pancreatic effects of a Bruton's tyrosine kinase small-molecule inhibitor in rats are strain-dependent. Toxicol Pathol. 2018;46(4):460-72.

12. Center for Drug Evaluation and Research. Summary Basis of Approval, Ibrutinib. Application number 205552Orig1s000. 2013. available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/205552orig1s000clinpharmr.pdf
13. Center for Drug Evaluation and Research. Summary Basis of Approval, Acalabrutinib. Application number 210259Orig1s000. 2017. Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/210259Orig1s000MultidisciplineR.pdf
14. Crawford JJ, Johnson AR, Misner DL, Belmont LD, Castanedo G, Choy R, et al. Discovery of GDC-0853: A potent, selective, and noncovalent Bruton's tyrosine kinase inhibitor in early clinical development. J Med Chem. 2018;61(6):2227-45.
15. Brenneman KA, Ramaiah SK, Rohde CM, Messing DM, O'Neil SP, Gauthier LM, et al. Mechanistic investigations of test article-induced pancreatic toxicity at the endocrine-exocrine interface in the rat. Toxicol Pathol. 2014;42(1):229-42.
16. Schutt L, Erickson R, Tarrant J, McDowell M, Katewa A, Wang Y, et al. BTK knockout rat model demonstrates rat-specific BTK inhibitor-related pancreatic pathology is on-target and unlikely to be relevant for humans. Presented at 35th Annual Symposium of the Society of Toxicologic Pathology, San Diego, CA, 2016. Abstract 70, page 77.
17. Blankenship B, Eighmy JJ, Hoffmann G, Schroeder M, Sharma AK, Sorden SD. Findings in historical control Harlan RCCHan™: WIST rats from 104-week oral gavage studies. Toxicol Pathol. 2016;44(7):947-61.
18. Reindel JF, Dominick MA, Gough AW. Mesenteric lymph node hemangiomas of Wistar rats. Toxicol Pathol. 1992;20(2):268-73.
19. Weber K. Differences in types and incidence of neoplasms in Wistar Han and Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2017;45(1):64-75.
20. Dunnick JK, Sanders JM, Kissling GE, Johnson CL, Boyle MH, Elmore SA. Environmental chemical exposure may contribute to uterine cancer development: Studies with tetrabromobisphenol A. Toxicol Pathol. 2015;43(4):464-73.
21. Willard-Mack CL, Elmore SA, Hall WC, Harleman J, Kuper CF, Losco P, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse hematolymphoid system. Toxicol Pathol. 2019;47(6):665-783.
22. Chen J, Kinoshita T, Gururaja T, Sukbuntherng J, James D, Lu D, et al. The effects of Bruton’s tyrosine kinase (BTK) inhibitors on collagen-induced platelet aggregation, BTK, and tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma (TEC). Eur J Haematol. 2018;101(5):604-12.
23. Itchaki G, Brown JR. Experience with ibrutinib for first-line use in patients with chronic lymphocytic leukemia. Ther Adv Hematol. 2018;9(1):3-19.
24. Aguilar C. Ibrutinib-related bleeding: pathogenesis, clinical implications and management. Blood Coagul Fibrinolysis. 2018;29(6):481-7.

25. Bye AP, Unsworth AJ, Desborough MJ, Hildyard CAT, Appleby N, Bruce D, et al. Severe platelet dysfunction in NHL patients receiving ibrutinib is absent in patients receiving acalabrutinib. Blood Adv. 2017;1(26):2610-23.
26. Langrish CL, Bradshaw JM, Francesco MR, Owens TD, Xing Y, Shu J, et al. Preclinical efficacy and anti-inflammatory mechanisms of action of the Bruton tyrosine kinase inhibitor rilzabrutinib for immune-mediated disease. J Immunol. 2021;206(7):1454-68.
27. Streicher E, Rall DP, Gaskins JR. Distribution of thiocyanate between plasma and cerebrospinal fluid. Am J Physiol. 1964 Feb;206:251-4
28. Nipride RTU (sodium nitroprusside). Prescribing Information, Section 12.3 (Pharmacokinetics). Revised March, 2017. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209387s000lbl.pdf
29. Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter II, Part 1308, Schedules of Controlled Substances,. Available from: https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-II/part-1308
30. Martin YC, Kofron JL, Traphagen LM. Do structurally similar molecules have similar biological activity? J Med Chem. 2002;45(19):4350-8.
31. Barker MH. The blood cyanates in the treatment of hypertension. J Am Med Assoc. 1936;106(10):762-7.
32. Barker MH, Lindberg HA, Wald MH. Further experiences with thiocyanates. J Am Med Assoc. 1941;117(19):1591-4.
33. Palmer RS, Silver LS, White PD. The clinical use of potassium sulphocyanate in hypertension: A preliminary report of fifty-nine cases. N Engl J Med. 1929;201(15):709-14.
34. Banerjee KK, Marimuthu P, Bhattacharyya P, Chatterjee M. Effect of thiocyanate ingestion through milk on thyroid hormone homeostasis in women. Br J Nutr. 1997;78(5):679-81.
35. Garvin CF. The fatal toxic manifestations of the thiocyanates. J Am Med Assoc. 1939;112(12):1125-7.
36. Anderson RC, Chen KK. Absorption and toxicity of sodium and potassium thiocyanates. J Am Pharm Assoc. 1940;29(4):152-61.
37. OECD (2018), Test No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents, OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264070707-en.
38. ECHA CHEM. Ammonium thiocyanate. CAS # 1762-95-4. https://chem.echa.europa.eu/100.015.614/dossier-view/54972465-9393-4d8d-93b3-ea03fb0c4fcb/IUC5-5ab5977b-4eb7-45e1-8441-864aad5385e0_05c4746e-80d6-4210-b49b-c4fcfa376bde?searchText=ammonium%20thiocyanate
39. Lindberg HA, Wald MH, Barker MH. Observations of the pathologic effects of thiocyanate: An experimental study. Am Heart J. 1941;21(5):605-16.
40. U.S. EPA. Provisional peer reviewed toxicity values for thiocyanates (multiple CASRNs). U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, OH 45268, EPA/690/R-06/023F, 2006. Available from https://cfpub.epa.gov/ncea/pprtv/documents/Thiocyanates.pdf

41. Yamaguchi T. Mutagenicity of isothiocyanates, isocyanates and thioureas on salmonella typhimurium. Agric Biol Chem. 1980;44(12):3017-18.
42. Kihlman BA, Merz T, Swanson CP. Experimentally induced chromosome abberrations in plants. II. The effect of cyanide and other heavy metal complexing agents on the production of chromosome aberrations by x-rays. J Biophys Biochem Cytol. 1957;3(3):381-90.
43. Nagasawa H, Yanai R, Nakajima Y, Namiki H, Kikuyama S, Shiota K. Inhibitory effects of potassium thiocyanate on normal and neoplastic mammary development in female mice. Eur J Cancer. 1980;16(4):473-80.
44. U.S. EPA. Recommendations for and documentation of biological values for use in risk assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268, EPA/600/6-87/008 (NTIS PB88179874), 1988. Available from: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_file_download.cfm?p_download_id=471813&Lab=NCEA
45. Boulos BM, Hanna F, Davis LE, Almond CH. Placental transfer of antipyrine and thiocyanate and their use in determining maternal and fetal body fluids in a maintained pregnancy. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1973;201(1):42-51.
46. Ivankovic, S. Fehlende teratogene Wirkung von Nitroprussidnatrium (NNP) an Wistar-Ratten und Kaninchen [Absence of a teratogenic effect of sodium nitroprusside in wistar rats and rabbits (author's transl)]. Arzneimittelforschung. 1979;29(8):1092-4.
47. Chiu T. Spontaneous hypertrophic foci of pancreatic acinar cells in CD rats. Toxicol Pathol. 1983;11(2):115-9.
48. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use - S2(R1). Geneva, Switzerland: ICH harmonised tripartite guideline, 2011. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/S2%28R1%29%20Guideline.pdf
49. Bolon B, Garman RH, Pardo ID, Jensen K, Sills RC, Roulois A, et al. STP position paper: Recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve, and eye) during nonclinical general toxicity studies. Toxicol Pathol. 2013;41(7):1028-48.
50. Hood A, Hashmi R, Klaassen CD. Effects of microsomal enzyme inducers on thyroid-follicular cell proliferation, hyperplasia, and hypertrophy. Toxicol Appl Pharmacol. 1999;160(2):163-70.
51. Jahnke GD, Choksi NY, Moore JA, Shelby MD. Thyroid toxicants: assessing reproductive health effects. Environ Health Perspect. 2004;112(3):363-8.
52. Dellarco VL, McGregor D, Berry SC, Cohen SM, Boobis AR. Thiazopyr and thyroid disruption: case study within the context of the 2006 IPCS Human Relevance Framework for analysis of a cancer mode of action. Crit Rev Toxicol. 2006;36(10):793-801.
53. OECD (2019), Test No. 432: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test, OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4, Éditions OCDE, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071162-en.

54. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Photosafety evaluation of pharmaceuticals - S10. Geneva, Switzerland: ICH harmonised tripartite guideline, 2013. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/S10_Guideline.pdf
55. Bolon B. What interpretation should be applied to increased peri-ventricular labeling with a microglial cell marker (Iba1) in rats treated orally with the tyrosine kinase inhibitor PRN1008 (rilzabrutinib)? Expert Neuropathology Opinion - EXP0162 (GEMpath). May-2023

サノフィ株式会社

リルザブルチニブ

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.7 毒性試験概要表

Total number of pages: 198

目　　次

2.6.7 毒性試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　毒性試験一覧表 6

2　　トキシコキネティクス試験の一覧表 15

3　　トキシコキネティクス試験成績の一覧 18

4　　毒性試験使用ロット 29

5　　単回投与毒性試験 36

6　　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験 37

7　　反復投与毒性試験 40

8　　In vitro遺伝毒性試験 75

9　　In vivo遺伝毒性試験 79

10　　がん原性試験 82

11　　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験 101

12　　生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 102

13　　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験 106

14　　生殖発生毒性試験－出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 110

15　　幼若動物を用いた試験 116

16　　局所刺激性試験 117

17　　その他の毒性試験 118

表　目　次

表2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program 6
表2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies 15
表2.6.7.3 - Toxicokinetics – overview of toxicokinetics data 18
表2.6.7.4 A - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Former HPLC Method 29
表2.6.7.4 B - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Current UPLC Method 33
表2.6.7.5 - Single-dose toxicity 36
表2.6.7.6 - Repeat-dose toxicity - Nonpivotal studies 37
表2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats 40
表2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats 44
表2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats 49
表2.6.7.7 D - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs 59
表2.6.7.7 E - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs 63
表2.6.7.7 F - Repeat-dose toxicity - 9-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs 69
表2.6.7.8 A - Genotoxicity: in vitro - Bacterial reverse mutation assay 75
表2.6.7.8 B - Genotoxicity: In vitro mammalian chromosome aberration assay in human peripheral blood lymphocytes 77
表2.6.7.9 - Genotoxicity: In vivo micronucleus assay in rats 79
表2.6.7.10 A - Carcinogenicity 82
表2.6.7.10 B - Carcinogenicity 87
表2.6.7.10 C – Carcinogenicity 89
表2.6.7.10 D - Carcinogenicity 91
表2.6.7.10 E - Carcinogenicity 94
表2.6.7.10 F - Carcinogenicity 97
表2.6.7.11 - Reproductive and developmental toxicity - nonpivotal studies - noteworthy findings 101
表2.6.7.12 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation 102
表2.6.7.13 A - Reproductive and developmental toxicity - effects on embryo-fetal development in rats ... 106

表2.6.7.13 B - Reproductive and developmental toxicity - effects on embryo-fetal development in rabbits108

表2.6.7.14 - Reproductive and developmental toxicity - effects on pre- and post-natal development, including maternal function 110

表2.6.7.15 - Studies in juvenile animals 116

表2.6.7.17 A - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN4361) 118

表2.6.7.17 B - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (RA16732596) 120

表2.6.7.17 C - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (RA16735340) 123

表2.6.7.17 D - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN862) 125

表2.6.7.17 E - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN862) 127

表2.6.7.17 F - Other toxicity studies - Impurities - Lymphocyte assay (PRN862) 130

表2.6.7.17 G - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN835-EDCI adduct; PRN3220) 132

表2.6.7.17 H - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3232) 135

表2.6.7.17 I - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN3232) 137

表2.6.7.17 J - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN3232) 139

表2.6.7.17 K - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3232) 140

表2.6.7.17 L - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN835.2HCl) 142

表2.6.7.17 M - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN835.2HCl) 144

表2.6.7.17 N - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN835.2HCl)146

表2.6.7.17 O - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN835.2HCl) 148

表2.6.7.17 P - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN1418) 149

表2.6.7.17 Q - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN1418) 151

表2.6.7.17 R - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN1418) 154

表2.6.7.17 S - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN1418) 156

表2.6.7.17 T - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3222) 157

表2.6.7.17 U - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3222) 160

表2.6.7.17 V - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN2960) 162

表2.6.7.17 W - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3612) 164

表2.6.7.17 X - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3612) 166

表2.6.7.17 Y - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN3612) 169

表2.6.7.17 Z - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN3612) 171

表2.6.7.17 AA - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3590) 172

表2.6.7.17 AB - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3590) 174

表2.6.7.17 AC - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN1253) 176

表2.6.7.17 AD - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN1253) 179

表2.6.7.17 AE - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3767) 181

表2.6.7.17 AF - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3767) 183

表2.6.7.17 AG - Other toxicity studies - Impurities - Repeat-dose toxicity 185

表2.6.7.17 AH - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats 189

表2.6.7.17 AI - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats 192

表2.6.7.17 AJ - Other toxicity studies - Phototoxicity of rilzabrutinib in BALB/c 3T3 cells 197

表2.6.7.17 AK - Other toxicity studies - Phototoxicity - Neutral red uptake phototoxicity assay 198

1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - study program

Test Article: Rilzabrutinib [a]							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg) [b,c]**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Single-Dose Toxicity (Nonpivotal)							
Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	1 day	0, 50, 150 (F), 500 (M)	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0178]	4.2.3.1-1
Dog/Beagle	Oral gavage	1 day	0, 50, 150, 500	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0179]	4.2.3.1-2
Repeat-Dose Toxicity							
Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han) [d]	Oral gavage	13 days	M: 0, 150, 500, 1000 F: 0, 50, 150, 500	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0175]	4.2.3.2-1
Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	2 weeks	0, 50, 150, 500	No	[redacted] Indiana	[DVR0172]	4.2.3.2-2
Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	28 days (M); 29 days (F)	0, 50, 150, 500	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0174]	4.2.3.2-3
Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	13 weeks	0, 50, 150, 500	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0207]	4.2.3.2-4
Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	6 months	0, 15, 50 (F), 150 (M), 300	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0376]	4.2.3.2-5

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c Unless otherwise specified for GLP repeated-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

d The bis mesylate salt of rilzabrutinib was used for these studies.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib [a]							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg) [b,c]**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Repeat-Dose Toxicity (Continued)							
Rabbit/New Zealand White [LAGO:INRA 1077]	Oral gavage	7 days	0, 50, 150, 500	No	[redacted]France	[DVR0300]	4.2.3.2-6
Dog/Beagle	Oral gavage	2 weeks	0, 50, 150, 500	No	[redacted]Indiana	[DVR0173]	4.2.3.2-7
Dog/Beagle [d]	Oral gavage	20 days (M); 21 days (F)	0, 30, 100, 300	Yes	[redacted]Indiana	[DVR0168]	4.2.3.2-8
Dog/Beagle	Oral gavage	28 days (M); 29 days (F)	0, 30, 100, 300	Yes	[redacted]Indiana	[DVR0184]	4.2.3.2-9
Dog/Beagle	Oral capsule	12 weeks	30, 50	No	[redacted]Indiana	[DVR0301]	4.2.3.2-10
Dog/Beagle	Oral gavage	13 weeks	0, 30 (M) [e], 100, 300	Yes	[redacted]Indiana	[DVR0206]	4.2.3.2-11
Dog/Beagle	Oral capsule	9 months	0, 15, 30, 50	Yes	[redacted]Indiana	[DVR0377]	4.2.3.2-12
Genotoxicity							
Salmonella typhimurium/ Escherichia coli	In vitro	48 to 72 h	15-5000 µg/plate	Yes	[redacted]	[DVR0169]	4.2.3.3.1-1
Human peripheral blood lymphocytes	In vitro	4 and 20 h	5-125 µg/mL	Yes	[redacted]	[DVR0170]	4.2.3.3.1-2
Micronucleus assay/ Rat/Sprague-Dawley (Hsd-SD)	Oral gavage	1 day	M: 500, 1000, 2000 [f] F: 375, 750, 1500 [f]	Yes	[redacted]	[DVR0185]	4.2.3.3.2-1

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c Unless otherwise specified for GLP repeated-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

d The bis mesylate salt of rilzabrutinib was used for these studies.

e The NOAEL for females could not be determined based upon body weight loss in one female dog at 30 mg/kg/day.

f See appendix VII of the study report for the single dose range-finding study using 500, 1000, and 2000 mg/kg rilzabrutinib conducted to enable dose selection for the definitive study.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib [a]							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg) [b,c]**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Carcinogenicity							
Mouse/TgHRAS	Oral gavage	1 or 3 days	M: 0, 500, 1000, 1500 F: 0, 100, 300, 1000	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0454]	4.2.3.4.2-1
Mouse/TgHRAS	Oral gavage	14 days	0, 30, 100, 300, 600	No	[redacted] Indiana	[DVR0385]	4.2.3.4.2-2
Mouse/TgHRAS	Oral gavage	28 or 29 days	0, 100, 300, 600	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0407]	4.2.3.4.2-3
Mouse/TgHRAS	Oral gavage	28 days	0, 30, 100, 300	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0455]	4.2.3.4.2-4
Mouse/TgHRAS	Oral gavage	26 weeks	0, 30, 100, 300	Yes	[redacted] Indiana	[1281-20014]	4.2.3.4.1-2
Rat/Wistar Han IGS [Crl:WI(Han)]	Oral gavage	2 years	M: 0, 10, 30, 100 F: 0, 5, 15, 50	Yes	[redacted] Indiana	[1281-18051]	4.2.3.4.1-1
Reproductive and Development Toxicity							
Fertility							
Rat/Wistar [Crl:WI(Han)]	Oral gavage	M: 4 weeks prior to mating through Days 57 to 60 F: 2 weeks prior to mating through Gestation Day 7	0, 50, 150 (general toxicity), 300 (reproductive toxicity)	Yes	[redacted]	[DVR0380]	4.2.3.5.1-1

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c Unless otherwise specified for GLP repeated-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg)** *a,b*	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number** *c*	**Location**
Reproductive and Development Toxicity (Continued)							
Embryo/Fetal Development							
Rat/Sprague-Dawley [Crl:OFA (SD)]	Oral gavage	Gestation Day 6 - 17	0, 50, 150, 500	No	[redacted] France	[DVR0298]	4.2.3.5.2-1
Rabbit/New Zealand White [LAGO:INRA 1077]	Oral gavage	Gestation Day 6 - 19	0, 50, 100, 150	No	[redacted] France	[DVR0299]	4.2.3.5.2-2
Rat/Wistar [Crl:WI(Han)]	Oral gavage	Gestation Day 7 - 17	0, 50, 150 (maternal toxicity), 300 (developmental toxicity)	Yes	[redacted]	[DVR0378]	4.2.3.5.2-3
Rabbit/New Zealand White [Crl:KBL(NZW)]	Oral gavage	Gestation Day 7 - 19	0, 10, 30 (maternal toxicity), 100 (developmental toxicity)	Yes	[redacted]	[DVR0379]	4.2.3.5.2-4
Pre- and Postnatal Development							
Rat/Sprague-Dawley [Crl:CD(SD)]	Oral gavage	Gestation Day 6 -Lactation Day 20	0, 50 (F_0 maternal toxicity), 150 (F_1 neonatal/developmental toxicity), 300 (F_1 parental systemic toxicity, F_1 reproductive toxicity, and F_2 embryonic toxicity)	Yes	[redacted]	[DVR0492]	4.2.3.5.3-1
Juvenile Toxicity							
Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)	Oral gavage	PND10 - PND34	0, 30, 100, 200	No	[redacted]	[JUP0024]	4.2.3.5.4-1

Abbreviations: F: filial; GLP: good laboratory practice; NOAEL: no observed adverse effect level; NZW: New Zealand White; PND: postnatal day; SD: Sprague-Dawley; WI(Han): Wistar Hannover.

a The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

b Unless otherwise specified for GLP repeated-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

c Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Test Article: Dose (mg/kg)**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Local Tolerance							
No studies were performed.							
Other Toxicity Studies							
Impurities							
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	48 to 72 h	PRN4361: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted]	[AG58XF.502ICH.BTL]	4.2.3.7.6-34
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	3 days	PRN834-A4: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2449]	4.2.3.7.6-4
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	3 days	PRN834: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2453]	4.2.3.7.6-3
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	48 h	PRN862: 50-1000 µg/plate *(S. typhimurium)*; 100-1600 µg/plate (*E. coli*)	No [a]	[redacted] China; Sanofi, Frankfurt, Germany	[DVR0521]	4.2.3.7.6-10
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN862: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2490]	4.2.3.7.6-11
Genotoxicity of impurity - L5178Y Mouse lymphoma cells	In vitro	3 h	PRN862: 20-180 µg/mL	Yes	[redacted] England	[LYM0377]	4.2.3.7.6-12
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	48 h	PRN835-EDCI: 20-1000 µg/plate *(S. typhimurium)*; 200-5000 µg/plate (*E. coli*) PRN3220: 200-5000 µg/plate	No [a]	[redacted] China; Sanofi, Frankfurt, Germany	[DVR0522]	4.2.3.7.6-9

Abbreviations: GLP: good laboratory practice.

a Although GLP compliance is claimed by the laboratory, the study was not performed in compliance with international GLP regulations and is considered exploratory.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Test Article: Dose (mg/kg)**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Other Toxicity Studies							
Impurities (Continued)							
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN3232: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2473]	4.2.3.7.6-22
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h ±S9 24+0 h -S9 24+24 h -S9	PRN3232: 10-39 µg/mL	Yes	[redacted] England	[MNV1652]	4.2.3.7.6-23
Genotoxicity of impurity - Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)	Oral gavage	3 days	PRN3232: 0, 500, 1000, 2000	Yes	[redacted] England	[COM0057]	4.2.3.7.6-25
Exploratory toxicity of impurity - Rat/Wistar Han IGS	Oral gavage	3 days	PRN3232: 0, 500, 1000, 2000	No	Sanofi-aventis Recherche & Développement, Cedex, France	[TXP0589]	4.2.3.7.6-24
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN835.2HCl: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2472]	4.2.3.7.6-5
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h 24+0 h 24+24 h	PRN835.2HCl: 2.5-75 µg/mL	Yes	[redacted] England	[MNV1651]	4.2.3.7.6-6
Genotoxicity of impurity - Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)	Oral gavage	3 days	PRN835.2HCl: 0, 100, 200, 400	Yes	[redacted] England	[COM0056]	4.2.3.7.6-8
Exploratory toxicity of impurity - Rat/Wistar Han IGS	Oral gavage	3 days	PRN835.2HCl: 0, 100, 250, 500	No	Sanofi-aventis Recherche & Développement, France	[TXP0586]	4.2.3.7.6-7
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN1418: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2456]	4.2.3.7.6-15

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; WI(Han): Wistar Hannover.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Test Article: Dose (mg/kg)**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Other Toxicity Studies							
Impurities (Continued)							
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h 24+0 h 24+24 h	PRN1418: 5-54 µg/mL	Yes	[redacted] England	[MNV1637]	4.2.3.7.6-16
Genotoxicity of impurity - Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)	Oral gavage	3 days	PRN1418: 0, 125, 250, 500	Yes	[redacted]The Netherlands	[COM0051]	4.2.3.7.6-18
Exploratory toxicity of impurity - Rat/Wistar Han IGS	Oral gavage	3 days	PRN1418: 150, 300, 500, 750, 1000	No	Sanofi-aventis Recherche & Développement, Cedex, France	[TXP0552]	4.2.3.7.6-17
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN3222: 160-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2461]	4.2.3.7.6-20
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h 24+0 h 24+24 h	PRN3222: 95-125 µg/mL (3+21 h); 85-105 (24+0 h, 24+24 h)	Yes	[redacted] England	[MNV1638]	4.2.3.7.6-21
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN2960: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2460]	4.2.3.7.6-19
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN3612: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2454]	4.2.3.7.6-28
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h 24+0 h 24+24 h	PRN3612: 4-9 µg/mL (3+21 h); 2.25-3.5 (24+0 h); 1-3.5 (24+24 h)	Yes	[redacted] England	[MNV1635]	4.2.3.7.6-29
Genotoxicity of impurity - Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)	Oral gavage	3 days	PRN3612: 0, 500, 1000, 2000	Yes	[redacted] England	[COM0053]	4.2.3.7.6-31

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; WI(Han): Wistar Hannover.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Test Article: Dose (mg/kg)**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Other Toxicity Studies							
Impurities (Continued)							
Exploratory toxicity of impurity - Rat/Wistar Han	Oral gavage	3 days	PRN3612: 0, 500, 1000, 2000	No	Sanofi-aventis Recherche & Développement, France	[TXP0555]	4.2.3.7.6-30
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN3590: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2462]	4.2.3.7.6-26
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h 24+0 h 24+24 h	PRN3590: 20-150 µg/mL (3+21 h); 20-80 µg/mL (24+0 h; 24+24 h)	Yes	[redacted] England	[MNV1639]	4.2.3.7.6-27
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN1253: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2448]	4.2.3.7.6-13
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h 24+0 h 24+24 h	PRN1253: 50-213 µg/mL	Yes	[redacted] England	[MNV1633]	4.2.3.7.6-14
Genotoxicity of impurity - *Salmonella typhimurium/ Escherichia coli*	In vitro	72 h	PRN3767: 5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] England	[HIS2455]	4.2.3.7.6-32
Genotoxicity of impurity - Human lymphocyte	In vitro	3+21 h 24+0 h 24+24 h	PRN3767: 40-200 µg/mL (3+21 h); 20-150 µg/mL (24+0 h); 5-20 µg/mL (24+24 h)	Yes	[redacted] England	[MNV1636]	4.2.3.7.6-33
Repeat-dose toxicity of impurity - Rat/Wistar Han	Oral gavage	13 weeks	0, 150 (rilzabrutinib), 150 (rilzabrutinib spiked Batch A), 150 (rilzabrutinib spiked Batch B) [a,b]	Yes	[redacted] France	[TXC1679]	4.2.3.7.6-2

Abbreviations: GLP: good laboratory practice.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

b The free base of rilzabrutinib was used for the study. Rilzabrutinib Batch A or B were spiked with 8 impurities.

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary - overview - study program (Continued)

Test Article: Rilzabrutinib [a]							
Type of Study/ Species/Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg) [b]**	**GLP**	**Testing Facility**	**Study Number**	**Location**
Other Toxicity Studies							
Other							
Repeat dose neurotoxicity - Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral Gavage	3 Days	0, 50, 150, 500	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0302]	4.2.3.7.7-1
Repeat dose neurotoxicity - Rat/Wistar Han (RccHan®:WIST)	Oral Gavage and Intra-Jejunal	3 Days	Oral: 0, 50, 150, 500 Intra-Jejunal: 0, 75, 150	Yes	[redacted] Indiana	[DVR0312]	4.2.3.7.7-2
In Vitro Phototoxicity of rilzabrutinib [a] in Balb/c 3T3 Cells	In Vitro	60-minute incubation with cells prior to radiation exposure	0.009 to 150.00 µM	No	[redacted] China	[DVR0374]	4.2.3.7.7-4
In Vitro Phototoxicity of rilzabrutinib [a] in Balb/c 3T3 Cells	In Vitro	60-minute incubation with cells prior to radiation exposure	1.00 to 56.2 µg/mL	Yes	[redacted]	[PHV0082]	4.2.3.7.7-5

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IGS: Internation Genetic Standardization; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies

Overview of Toxicokinetics Studies					Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)** [b,c]	**GLP**	**Study Number**	**Location**
Extended Single-dose	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 50, 150 (F), 500 (M)	Yes	[DVR0178]	4.2.3.1-1
Extended Single-dose	Dog/Beagle	Oral gavage	0, 50, 150, 500	Yes	[DVR0179]	4.2.3.1-2
1 or 3-day Repeat-dose	Mouse/TgHRAS	Oral gavage	M: 0, 500, 1000, 1500 F: 0, 100, 300, 1000	Yes	[DVR0454]	4.2.3.4.2-1
28/29-day Repeat-dose	Mouse/TgHRAS	Oral gavage	0, 100, 300, 600	Yes	[DVR0407]	4.2.3.4.2-3
28-day Repeat-dose	Mouse/TgHRAS	Oral gavage	0, 30, 100, 300	Yes	[DVR0455]	4.2.3.4.2-4
26-week Carcinogenicity	Mouse/TgHRAS	Oral gavage	0, 30, 100, 300	Yes	[1281-20014]	4.2.3.4.1-2
13-day Repeat-dose [d]	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	M: 0, 150, 500, 1000 F: 0, 50, 150, 500	Yes	[DVR0175]	4.2.3.2-1
2-week Repeat-dose	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 50, 150, 500	No	[DVR0172]	4.2.3.2-2
4-week Repeat-dose	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 50, 150, 500	Yes	[DVR0174]	4.2.3.2-3
13-week Repeat-dose	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 50, 150, 500	Yes	[DVR0207]	4.2.3.2-4
6-month Repeat-dose	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 15, 50 (F), 150 (M), 300	Yes	[DVR0376]	4.2.3.2-5

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; TK: toxicokinetics; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c Unless otherwise specified for GLP repeated-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

d The bis mesylate salt of rilzabrutinib was used for these studies; TK data are not included in 2.6.7.3 since this salt form is not the proposed commercial product.

表 2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies (Continued)

Overview of Toxicokinetics Studies					Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)** [b,c]	**GLP**	**Study Number**	**Location**
2-year Carcinogenicity	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	M: 0, 10, 30, 100 F: 0, 5, 15, 50	Yes	[1281-18051]	4.2.3.4.1-1
7-day Repeat-dose	Rabbit/New Zealand White [LAGO:INRA 1077]	Oral gavage	0, 50, 150, 500	No	[DVR0300]	4.2.3.2-6
2-week Repeat-dose	Dog/Beagle	Oral gavage	0, 50, 150, 500	N	[DVR0173]	4.2.3.2-7
20-day Repeat-dose [d]	Dog/Beagle	Oral gavage	0, 30, 100, 300	Yes	[DVR0168]	4.2.3.2-8
4-week Repeat-dose	Dog/Beagle	Oral gavage	0, 30, 100, 300	Yes	[DVR0184]	4.2.3.2-9
12-week Oral Capsule Bridging Study	Dog/Beagle	Oral capsule	30, 50	No	[DVR0301]	4.2.3.2-10
13-week Repeat-dose	Dog/Beagle	Oral gavage	0, 30 [e], 100, 300	Yes	[DVR0206]	4.2.3.2-11
9-month Repeat-dose	Dog/Beagle	Oral capsule	0, 15, 30, 50	Yes	[DVR0377]	4.2.3.2-12
Genotoxicity: Micronucleus	Rat/Sprague-Dawley (Hsd-SD)	Oral gavage	M: 500, 1000, 2000 F: 375, 750, 1500	Yes	[DVR0185]	4.2.3.3.2-1
Dose Range-finding Embryo-fetal Development	Rat/Sprague-Dawley [Crl:OFA (SD)]	Oral gavage	0, 50, 150, 500	No	[DVR0298]	4.2.3.5.2-1
Dose Range-finding Embryo-fetal Development	Rabbit/New Zealand White [LAGO:INRA 1077]	Oral gavage	0, 50, 100, 150 [f]	No	[DVR0299]	4.2.3.5.2-2

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; TK: toxicokinetics; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c Unless otherwise specified for GLP repeated-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

d The bis mesylate salt of rilzabrutinib was used for these studies; TK data are not included in 2.6.7.3 since this salt form is not the proposed commercial product.

e The NOAEL for males was 30 mg/kg/day. The NOAEL for females could not be determined based upon body weight loss in one female dog at 30 mg/kg/day.

f The NOAEL for maternal toxicity was 100 mg/kg/day, but the NOAEL for embryo-fetal changes could not be determined.

表 2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies (Continued)

Overview of Toxicokinetics Studies					Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg) [b,c]**	**GLP**	**Study Number**	**Location**
Embryo-fetal Development	Rat/Wistar [Crl:WI(Han)]	Oral gavage	0, 50, 150 (maternal toxicity), 300 (developmental)	Yes	[DVR0378]	4.2.3.5.2-3
Embryo-fetal Development	Rabbit/New Zealand White [Crl:KBL(NZW)]	Oral gavage	0, 10, 30 (maternal toxicity), 100 (developmental toxicity)	Yes	[DVR0379]	4.2.3.5.2-4
3-day Oral Neurotoxicity	Rat/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage	0, 50, 150, 500	Yes	[DVR0302]	4.2.3.7.7-1
3-day Oral or Intra-Jejunal Neurotoxicity	Rat/Wistar Han (RccHan®:WIST)	Oral gavage and Intra-jejunal	Oral: 0, 50, 150, 500 Intra-Jejunal: 0, 75, 150	Yes	[DVR0312]	4.2.3.7.7-2

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IGS: International Genetic Standardization; NOAEL: no observed adverse effect level; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c Unless otherwise specified for GLP repeated-dose toxicity, the NOAEL is underlined.

3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – overview of toxicokinetics data

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
5	[1281-18051] (2 years)				139					
10	[DVR0379] (GD 7-19) [d]								27.3	
	[1281-18051] (2 years)			234						
13.3 [e]	[DFI17124 (PRN1008-010)] (clinical trial)									AUC_{last} 703

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; BID: twice a day; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d Study conducted in pregnant females.

e Human dose is based on a clinical dose of 400 mg rilzabrutinib BID (800 mg/day) for a 60 kg adult (the reference body weight in July 2005 FDA Guidance for Industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers); using 50 kg (the low end of the range in the guidance) would yield a human dose of 16 mg/kg/day.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
15	[DVR0376] (6 months) [d]			366	813					
	[DVR0377] (9 months) [e,f]					323	647			
	[1281-18051] (2 years)				1120					

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d AUC_{last} is mean of Days 1, 89, and 182.

e AUC_{last} is mean of Days 1, 127, and 273.

f Dogs in these studies received rilzabrutinib via capsule rather than gavage.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
30	[DVR0379] (GD 7-19) [d]								313	
	[DVR0455] (28 days)	4310	5980							
	[DVR0184] (28/29 days)					870	942			
	[DVR0301] (12 weeks) [e]					3000	1080			
	[DVR0206] (13 weeks) [f]					1070	1040			
	[DVR0377] (9 months) [e,g]					730	1197			
	[1281-20014] (26 weeks)	8820	10200							
	[1281-18051] (2 years)			841						

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; BID: twice a day; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d Study conducted in pregnant females.

e Dogs in these studies received rilzabrutinib via capsule rather than gavage.

f AUC_{last} Day 91/92.

g AUC_{last} is mean of Days 1, 127, and 273.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib[a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
50	[DVR0178] (1 day) [d]			1070	3510					
	[DVR0302] (3 days)			1190	3840					
	[DVR0312] (3 days)			2650	3540					
	[DVR0378] (GD 7-17) [e]				3940					
	[DVR0298] (GD 6-17) [e]				4100					
	[DVR0172] (2 weeks)			965	2160					
	[DVR0174] (28/29 days)			1540	3490					
	[DVR0207] (13 weeks) [f]			2170	3120					
	[DVR0376] (6 months) [g]			2023	5480					

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d AUC_{last} for Day 1.

e Study conducted in pregnant females.

f AUC_{last} Day 91/92.

g AUC_{last} is mean of Days 1, 89, and 182.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib[a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
50	[DVR0300] (7 days)								635*	
	[DVR0299] (GD 6-19) [d]								1760	
	[DVR0179] (1 day) [e]					1460	902			
	[DVR0301] (12 weeks) [f]					2860	5640			
	[DVR0173] (2 weeks)					418	317			
	[DVR0377] (9 months) [f,g]					2107	2950			
	[1281-18051] (2 years)				6930					

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d Study conducted in pregnant females.

e AUC_{last} is Day 37 as all high dose males were euthanized prior to Day 91/92.

f Dogs in these studies received rilzabrutinib via capsule rather than gavage.

g AUC_{last} is mean of Days 1, 127, and 273.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
75	[DVR0312] (3 days) [d]			4890	9230					
100	[DVR0454] (1 day)		34100							
	[DVR0299] (GD 6-19) [e]								5780	
	[DVR0379] (GD 7-19) [e]								6920	
	[DVR0455] (28 days)	13700	16500							
	[DVR0407] (28/29 days)	19400	28000							
	[DVR0184] (28/29 days)					5040	3210			
	[DVR0206] (13 weeks) [f]					1980	4410			
	[1281-20014] (26 weeks)	26900	41500							
	[1281-18051] (2 years)			3910						

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d Rilzabrutinib was administered via intra-jejunal route of administration.

e Study conducted in pregnant females.

f AUC_{last} Day 91/92.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
150	[DVR0178] (1 day) [d]			5860	11900					
	[DVR0302] (3 days)			5280	12900					
	[DVR0312] (3 days)			5820	10000					
	[DVR0312] (3 days) [e]			7140	15600					
	[DVR0378] (GD 7-17) [f]				18200					
	[DVR0298] (GD 6-17) [f]				15300					
	[DVR0172] (2 weeks)			3620	10300					
	[DVR0174] (28/29 days)			5420	13600					

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d AUC_{last} for Day 1.

e Rilzabrutinib was administered via intra-jejunal route of administration.

f Study conducted in pregnant females.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
150	[DVR0207] (13 weeks) [d]			8450	17000					
	[DVR0376] (6 months) [e]			5326	15233					
	[DVR0300] (7 days)								19100*	
	[DVR0299] (GD 6-19) [f]								8550	
	[DVR0179] (1 day) [g]					1250	8580			
	[DVR0173] (2 weeks)					2420	2130			

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d AUC_{last} Day 91/92.

e AUC_{last} is mean of Days 1, 89, and 182.

f Study conducted in pregnant females.

g AUC_{last} for Day 1.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
300	[DVR0454] (1 day)		120000							
	[DVR0378] (GD 7-17) [d]				15800					
	[DVR0455] (28 days)	30100	49300							
	[DVR0407] (28/29 days)	54600	57100							
	[DVR0184] (28/29 days)					4550	7480			
	[DVR0206] (13 weeks) [e]					14700	7350			
	[DVR0376] (6 months) [f]			13377	27567					
	[1281-20014] (26 weeks)	40300	71100							
375	[DVR0185] (1 day)				27800					

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d Study conducted in pregnant females.

e AUC_{last} Day 91/92.

f AUC_{last} is mean of Days 1, 89, and 182.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data									Test Article: Rilzabrutinib [a]		
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]									
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human	
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage			
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F	
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)										
500	[DVR0178] (1 day) [d]			10300	32000						
	[DVR0454] (1 day)	265000									
	[DVR0185] (1 day)			10700							
	[DVR0302] (3 days)			18300	49800						
	[DVR0312] (3 days)			29000	69600						
	[DVR0298] (GD 6-17) [e]				33500						
	[DVR0172] (2 weeks)			10200	37900						
	[DVR0174] (28/29 days)			23200	39900						
	[DVR0207] (13 weeks) [f]			21300	34700						
	[DVR0300] (7 days)								68700*		

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d AUC_{last} for Day 1.

e Study conducted in pregnant females.

f AUC_{last} Day 91/92.

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics - overview of toxicokinetics data (Continued)

Overview of Toxicokinetics Data										Test Article: Rilzabrutinib [a]
		Steady State Rilzabrutinib [a] AUC (ng•h/mL) [b]								
Species		Mouse (TgHRAS)		Rat		Dog		Rabbit		Human
Method of Administration [c]		Oral Gavage		Oral Gavage (Intra-Jejunal where indicated)		Oral Gavage (Capsule where indicated)		Oral Gavage		
Gender (M/F)		M	F	M	F	M	F	M	F	M+F
Dose (mg/kg)	Study No. (Study Dosing Duration)									
500	[DVR0179] (1 day) [d]					1770	6120			
	[DVR0173] (2 weeks)					11800	35700			
600	[DVR0407] (28/29 days)	42700	81000							
750	[DVR0185] (1 day)				30300					
1000	[DVR0185] (1 day)			17600						
	[DVR0454] (1 day)	452000	157000							
1500	[DVR0185] (1 day)				147000					
	[DVR0454] (1 day)	192000								
2000	[DVR0185] (1 day)			60000						

Abbreviations: AUC: area under the plasma-concentration time curve; AUC_{inf}: area under the plasma-concentration time curve from time of dosing to infinity; AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; F: female; GD: gestational day; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b AUC_{last} or AUC_{inf} for rilzabrutinib plasma exposures following single repeated dose administration per study dosing duration, except when indicated by an asterisk (*) in which case AUC is for first day of dosing in a repeat dose study.

c All routes of administration are via oral gavage, except where indicated.

d AUC_{last} for Day 1.

4 毒性試験使用ロット

表 2.6.7.4 A - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Former HPLC Method

Drug Substance																			Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Batch No.	Purity [c] (%)	Impurities (%) [b]														HPLC			Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted]	[redacted]																	[DVR0178]	Rat single-dose
																			[DVR0179]	Dog single-dose
																			[DVR0169]	In vitro bacterial reverse mutation assay
[redacted]	[redacted]	[redacted]																	[DVR0172]	Rat 2-week repeat dose
[redacted]	[redacted]	[redacted]																	[DVR0173]	Dog 2-week repeat dose
[redacted]	[redacted]	[redacted]																	[DVR0175]	Rat 13-day repeat dose
																			[DVR0168]	Dog 20-day repeat dose

Abbreviations: HPLC: high performance liquid chromatography; NA: not applicable; ND: not detected ([redacted]%); NR: not reported ([redacted]%); NT: not tested; RRT: relative retention time; Unk: unknown.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b For the Certificate of Analysis included in the study report, the PRN designation (ID number) may or may not be stated and the RRT values for the impurities may very slightly from the values noted here; these PRN IDs and RRTs align with data in the Drug substance tables in Module 3.

c Sum of rilzabrutinib E and Z isomers.

d Calculated as the sum of all individual impurities listed in the Certificate of Analysis.

e CoA not available.

f [redacted]

表 2.6.7.4 A - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Former HPLC Method (Continued)

Drug Substance				Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Batch No.	Purity c (%)	Impurities (%) [b] HPLC	Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0170]	In vitro mammalian chromosome aberration assay
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0174]	Rat 28-day repeat dose
			[DVR0184]	Dog 28-day repeat dose
			[DVR0185]	Rat In vivo micronucleus-genetic toxicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0207]	Rat 13-week repeat dose
			[DVR0298]	Rat dose range-finding
			[DVR0299]	Rabbit dose range-finding
			[DVR0300]	Rabbit 7-day repeat dose
			[DVR0206]	Dog 13-week repeat dose
			[DVR0377]	Dog 9-month repeat dose

Abbreviations: HPLC: high performance liquid chromatography; NA: not applicable; ND: not detected ([redacted]%); NR: not reported ([redacted]%); RRT: relative retention time.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b For the Certificate of Analysis included in the study report, the PRN designation (ID number) may or may not be stated and the RRT values for the impurities may very slightly from the values noted here; these PRN IDs and RRTs align with data in the Drug substance tables in Module 3.

c Sum of rilzabrutinib E and Z isomers.

d Calculated as the sum of all individual impurities listed in the Certificate of Analysis.

表 2.6.7.4 A - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Former HPLC Method (Continued)

Drug Substance				Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Batch No.	Purity c (%)	Impurities (%) [b] HPLC	Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0376]	Rat 6-month repeat dose
			[DVR0377]	Dog 9-month repeat dose
			[DVR0301]	Dog 12-week capsule
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0301]	Dog 12-week capsule
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0378]	Rat embryo-fetal development
			[DVR0379]	Rabbit embryo-fetal development
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0301]	Dog 12-week capsule
			[DVR0302]	Rat 3-day neurotoxicity (PO)
			[DVR0312]	Rat 3-day neurotoxicity (PO and IJ)
			[DVR0380]	Rat fertility and early embryonic development

Abbreviations: HPLC: high performance liquid chromatography; IJ: intrajejunal; NA: not applicable; ND: not detected ([redacted]%); NR: not reported ([redacted]%); NT: not tested; PO: oral; RRT: relative retention time.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b For the Certificate of Analysis included in the study report, the PRN designation (ID number) may or may not be stated and the RRT values for the impurities may very slightly from the values noted here; these PRN IDs and RRTs align with data in the Drug substance tables in Module 3.

c Sum of rilzabrutinib E and Z isomers.

表 2.6.7.4 A - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Former HPLC Method (Continued)

Drug Substance				Test Article: Rilzabrutinib [a]
Batch No.	Purity c (%)	Impurities (%) [b] HPLC	Study Number	Type of Study
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0492]	Rat pre- and postnatal development
			[DVR0454]	Mouse dose range finding for carc
			[DVR0385]	Mouse dose range finding for carc
			[DVR0455]	Mouse dose range finding for carc
			[1281-20014]	Mouse carc
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0407]	Mouse dose range finding for carc
			[1281-18051]	Rat carc

Abbreviations: carc: carcinogenicity; HPLC: high performance liquid chromatography; NA: not applicable; ND: not detected ([redacted]%); NR: not reported ([redacted]%); RRT: relative retention time.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b For the Certificate of Analysis included in the study report, the PRN designation (ID number) may or may not be stated and the RRT values for the impurities may very slightly from the values noted here; these PRN IDs and RRTs align with data in the Drug substance tables in Module 3.

c Sum of rilzabrutinib E and Z isomers.

表 2.6.7.4 B - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Current UPLC Method

Drug Substance					Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Batch No.	Assay (dry basis) (% w/w)	Impurities (%)			Study Number	Type of Study
			UPLC			
Proposed specifi-cation					NA	NA
b					[DVR0174]	Rat 28-day repeat dose
					[DVR0184]	Dog 28-day Repeat Dose
					[DVR0185]	Rat in vivo micronucleus- genetic toxicity
b					[DVR0207]	Rat 13-week repeat dose
					[DVR0298]	Rat dose range-finding
					[DVR0299]	Rabbit dose range-finding
					[DVR0300]	Rabbit 7-day repeat dose
					[DVR0206]	Dog 13-week repeat dose

Abbreviations: DP: drug product; NA: not applicable; ND: not detected ([redacted]%); NR: not reported ([redacted]%); RRT: relative retention time; UPLC: ultra high performance liquid chromatography.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

b Re-analyzed for impurities by [redacted] with current UPLC method; the batch analysis data are found in Module 3.2.S Drug Substance [Section 3.2.S.4.4].

c Data from original Certificate of Analysis which used HPLC for analysis; for Assay, the value provided is "as is" (% w/w).

d [redacted]

e [redacted]

表 2.6.7.4 B - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Current UPLC Method (Continued)

Drug Substance					Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Batch No.	Assay (dry basis) (% w/w)	Impurities (%)			Study Number	Type of Study
[redacted] [b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0376]	Rat 6-month repeat dose
					[DVR0377]	Dog 9-month repeat dose
					[DVR0301]	Dog 12-week capsule
[redacted] [b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[DVR0492]	Rat pre- and postnatal development
					[DVR0454]	Mouse dose range finding for carc
					[DVR0385]	Mouse dose range finding for carc
					[DVR0455]	Mouse dose range finding for carc
					[1281-20014]	Mouse carc

Abbreviations: carc: carcinogenicity; NA: not applicable; ND: not detected ([redacted]%); NR: not reported ([redacted]%); RRT: relative retention time; UPLC: ultra high performance liquid chromatography.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

b Re-analyzed for impurities by [redacted] with current UPLC method; the batch analysis data are found in Module 3.2.S Drug Substance [Section 3.2.S.4.4].

c Data from original Certificate of Analysis which used HPLC for analysis; for Assay, the value provided is "as is" (% w/w).

d [redacted]

表 2.6.7.4 B - Toxicology drug substance - Batch Analysis Data Obtained with Current UPLC Method (Continued)

Drug Substance					Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Batch No.	Assay (dry basis) (% w/w)	Impurities (%)			Study Number	Type of Study
[redacted] [b]	[redacted] [c]	[redacted] UPLC			[DVR0407]	Mouse dose range finding for carc
					[1281-18051]	Rat carc
[redacted]	[redacted]	[redacted]			[TXC1679]	Rat 3-month Toxicity of impurity
[redacted] [e]	[redacted]	[redacted]				
[redacted]	[redacted]	[redacted]				
[redacted]	[redacted]	[redacted]			[PHV0082]	In vitro phototoxicity

Abbreviations: carc: carcinogenicity; NA: not applicable; ND: not detected ([redacted]%); NR: not reported ([redacted]%); RRT: relative retention time; UPLC: ultra high performance liquid chromatography.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008 or SAR444671.

b Re-analyzed for impurities by [redacted] with current UPLC method; the batch analysis data are found in Module 3.2.S Drug Substance [Section 3.2.S.4.4].

c Data from original Certificate of Analysis which used HPLC for analysis; for Assay, the value provided is "as is" (% w/w).

d [redacted]

e [redacted]

f [redacted]

g [redacted].

h [redacted]

5 単回投与毒性試験

表 2.6.7.5 - Single-dose toxicity

Single-Dose Toxicity					Test Article: Rilzabrutinib [a]		
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Doses (mg/kg)**	**Gender and No. Per Group**	**Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)**	**Approximate Lethal Dose (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rats/Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage (Citric acid anhydrous USP in purified water)	0, 50, 150, 500	10/sex/group (5/sex/group main study; 5/sex/group recovery)	500	>500	150: minimal periventricular IBA-1 staining (F, main and 1 recovery animal) 500: minimal to mild neutrophilic infiltration of the meninges and perivascular spaces, with minimal infiltration of brain parenchyma (F, main study only); minimal increased diffuse IBA-1 positivity throughout the brain parenchyma (F, main study and 1 recovery animal); minimal to mild increased IBA-1 positivity around the lateral and third ventricles (M and F)	[DVR0178] [b]
Dog/ Beagle	Oral gavage (Citric acid anhydrous USP in purified water)	0, 50, 150, 500	5/sex/group (3/sex/group main study; 2/sex/group recovery)	500	>500	≥50: emesis (M and F)	[DVR0179] [c]

Abbreviations: F: female; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; IGS: International Genetic Standardization; M: male; USP: United States Pharmacopeia; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Special features: single dose-extended toxicity study with terminal sacrifice at Day 3 and recovery sacrifice at Day 15; IBA-1 immunohistochemistry for microglia and Fluoro-Jade B staining for necrotic cell bodies in the brain; toxicokinetics (3 or 6/sex/group).

c Special features: single dose-extended toxicity study with terminal sacrifice at Day 3 and recovery sacrifice at Day 15; toxicokinetics.

6 反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.6 - Repeat-dose toxicity - Nonpivotal studies

Repeat-Dose Toxicity		Non-Pivotal Studies				Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Species / Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)** [b]	**Gender and No. per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Wistar Han IGS [Crl:WI(Han)]	Oral Gavage (Citric Acid in water)	2 weeks	0 50 150 500	Main Study: 5/sex/group Toxicokinetics: Vehicle: 3/sex/group Test Article: 6/sex/group	NA	Plasma exposures of rilzabrutinib were higher in F than M. ≥150: unkempt appearance (F); brain - increased periventricular presence of microglia (F) [c] 500: dehydration (F); transient ↓ body weight gain and food consumption (F); liver - minimal diffuse hepatocyte hypertrophy (M and F); spleen and thymus, decreased lymphocytes (M); brain -increased periventricular presence of microglia (M) [c]	[DVR0172]
Rabbit/New Zealand White [LAGO:INRA 1077]	Oral Gavage (Citric Acid in water)	7 days	0 50 150 500	Main Study: 3 nonpregnant females/group	NA	≥150: body weight loss and reduced food consumption; pale focus in nonglandular stomach (1 F) 500: mottled liver; pale kidneys (1 F); dark focus in glandular stomach (1 F) MTD exceeded at 500 mg/kg/day due to severity of effects.	[DVR0300]

Abbreviations: F: female; H&E: hematoxylin and eosin; IGS: International Genetic Standardization; M: male; MTD: maximum tolerated dose; NA: not applicable; NOAEL: no observed adverse effect level; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c No evidence of neurodegenerative changes with H&E and Fluoro-Jade B, microglia cell change was not considered adverse by the Sponsor.

表 2.6.7.6 - Repeat-dose toxicity - nonpivotal studies (Continued)

Repeat-Dose Toxicity		Non-Pivotal Studies				Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Species / Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg)** *b*	**Gender and No. per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Dog/Beagle	Oral Gavage (Citric Acid in water)	2 weeks	0 50 150 500	1/sex/group	NA	≥50: emesis and stool changes (M and F) ≥150: ↓ body weight and food consumption (F); ↓ reticulocyte count (F); ↑ ALT (F) 500: ↓ body weight (M); ↑ Hct, RBC, Hb, associated with dehydration (F); ↑ WBC, neutrophils, platelets (F); ↑ ALT (M); ↑ ALP (M and F); ↑ AST, TBIL (F), ↓ CRE (F); ↓ cellularity of lymphoid organs (e.g. thymus, Peyer's patch, and lymph nodes), uncertain relationship to treatment (M and F); second degree atrioventricular block and prolonged PR interval, QRS duration, and QT/QTc (F); poor clinical condition of F complicates interpretation of findings	[DVR0173]
Dog/Beagle	Oral Capsule ([redacted])	12 weeks	30, 50	4/sex/group	NA	≥30: emesis (F); stool changes (M and F); ↑white blood cell parameters (M and F; non-adverse; values within reference ranges) 50: emesis (M); ↓ body weight and food consumption (F); ↑ ALT (M and F). Capsule formulation better tolerated than liquid formulation	[DVR0301]

Abbreviations: ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; CRE: creatinine; F: female; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; M: male; NA: not applicable; NOAEL: no observed adverse effect level; RBC: red blood cell; TBIL: total bilirubin; TPGS: tocopherol-polyethylene glycol succinate; WBC: white blood cell.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

表 2.6.7.6 - Repeat-dose toxicity - nonpivotal studies (Continued)

Repeat-Dose Toxicity		Non-Pivotal Studies				Test Article: Rilzabrutinib [a]	
Species / Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg) [b]**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Wistar Han IGS [Crl:WI(Han)]	Oral Gavage (Citric Acid in water)	13 days	M: 0, 150, 500, 1000 F: 0, 50, 150, 500	Toxicity: 15/sex/group Toxicokinetics: Vehicle: 3/sex/group Test Article: 9/sex/group	150	500: 1 M and 6 F died starting Day 4 1000: 13 M died or sacrificed moribund starting Day 3 ≥500 (M) and 500 (F): white foci observed grossly in the nonglandular area of the stomach; microscopic changes included hemorrhage, inflammation and ulceration in the stomach, most frequently in the nonglandular mucosa and squamous hyperplasia and epithelial proliferation of nonglandular stomach.	[DVR0175] *c,d*
Dog/Beagle	Oral Gavage (Citric Acid in water)	20 days (M); 21 days (F)	0, 30, 100, 300	Toxicity: 3/sex/group Recovery: 2/sex/group	300	≥30: emesis and stool changes (M and F) ≥100: ↓ body weight (F); ↑ALT (M); ↓ cellularity of Peyer's patches (M) 300: ↑ ALP (F); hepatocyte single cell necrosis (1 M)	[DVR0168] *c,e*

Abbreviations: ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; F: female; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b The free base of rilzabrutinib was used for all studies unless otherwise indicated.

c The bis mesylate salt was used for these studies.

d This study was originally designed for 28 days of dosing; however, the high dose males (1000 mg/kg) and females (500 mg/kg) were sacrificed after Days 5 and 6, respectively, due to toxicity, and the treatment period for the control-, low-, and mid-dose groups was reduced to 13 days. The study is considered non-pivotal as the bis mesylate salt is not the drug substance for the commercial product, and the nature of the toxicities seen in this study are largely attributed to the mesylate content and acidic pH.

e This study was originally designed for 28 days of dosing; however, due to toxicity observed in a concurrent repeat dose study in rats (DVR0175), the treatment duration was reduced to 20 days. The study is considered non-pivotal as the bis mesylate salt is not the drug substance for the commercial product.

7 反復投与毒性試験

表 2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**		
Species/Strain:	Rat/Crl:WI(Han) Wistar Han IGS	**Duration of Dosing:**	Males - 28 days Females - 29 days	**Study No.:**	[DVR0174]	
Initial Age:	8 to 9 weeks	**Duration of Postdose:**	28 days	**Location:**	4.2.3.2-3	
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral gavage; Dose Vol: 10 mL/kg	**GLP Compliance:**	Yes	
Vehicle/Formulation:	Citric acid anhydrous USP in purified water. Concentrations of citric acid in vehicle and test article formulations were 7.2, 0.72, 2.16, and 7.2 mg/mL for the 0, 50, 150, and 500 mg/kg/day dose groups, respectively.					
Special Features:	Special staining of the brain tissue included IBA-1 microglia immunohistochemistry and Fluoro-Jade B staining for necrotic cell bodies.					
NOAEL:	500 mg/kg/day					

Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals	Main Study:	10	10	10	10	10	10	10	10
	Recovery:	5	5	5	5	5	5	5	5
	Toxicokinetics:	3	3	9	9	9	9	9	9
Toxicokinetics									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	1350	2650	4990	12400	12200	27900
	Day 26	0	0	1540	3490	5420	13600	23200	39900
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	464	796	659	1970	1020	3190
	Day 26	0	0	602	1650	1450	3460	2350	4270

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; USP: United States Pharmacopeia; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Noteworthy Findings:									
DIED OR SACRIFICED MORIBUND		-	-	-	-	-	-	-	-
BODY WEIGHT (g) [b]									
Main Study	Day 4	267.0	203.3	-0.3	-0.2	-0.2	-3.2	-3.0	-5.8+
	Day 11	288.3	213.7	0	-1.3	1.3	-4.3*	-6.3+	-11.1+
	Day 18	310.1	220.8	0.2	0.4	1.4	-3.2	-5.1*	-4.6*
	Day 25	330.4	229.3	-3.1	0	0	-4.2	-4.5	-3.7
BODY WEIGHT CHANGE (g) [b]									
Main Study	Days -1 to 25	79.9	34.7	-10.8	-2.6	0.1	-15.0	-17.1	-31.1
FOOD CONSUMPTION (g/day) [b]									
Main Study	Days -1 to 4	21.8	17.7	4.6	1.7	3.2	-4.5	-8.7	-25.4+
	Days 4 to 11	23.2	18.5	5.6	0	3.9	-4.9	-19.8+	-34.1+
	Days 25 to 28/29	22.1	17.3	9.0	-0.6	11.8*	0	-1.4	4.6
WATER CONSUMPTION		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CLINICAL OBSERVATIONS		-	-	-	-	-	-	-	-
OPHTHALMOSCOPY		-	-	-	-	-	-	-	-
HEMATOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NA: not applicable.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

-: no noteworthy findings; * P<0.05; + P<0.01. Dunnett's Test.

表 2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats		**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**							
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
COAGULATION									
Main Study	APTT (seconds)	13.6	15.4	14.9	14.0	13.4	12.9*	13.3	10.8+
FLOW CYTOMETRY (Immunophenotyping)		-	-	-	-	-	-	-	-
CLINICAL CHEMISTRY									
Main Study	Phosphorus (mg/dL)	10.3	9.8	11.2	10.0	11.8	11.0	12.8+	13.0+
URINALYSIS		-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS (g) [b,c]									
Main Study	Epididymides	1.36	NA	-8.1	NA	-7.4	NA	-12.5+	NA
	Kidney	2.16	1.52	1.9	3.9	2.8	3.3	2.3	11.2+
	Liver	8.3	6.06	11.0	-1.7	17.3*	-2.5	30.2+	24.4+
	Spleen	0.6274	0.4983	3.5	-5.7	1.6	-2.6	-12.7*	-4.4
GROSS PATHOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: APTT: activated partial thromboplastin time; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NA: not applicable.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

c Absolute mean organ weight data presented; statistical differences were also noted in relative (to body and/or to brain) weight data.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; + P<0.01. Dunnett's Test.

表 2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats			**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY								
Main Study (N)								
BRAIN								
Fluoro-Jade B staining	-	-	-	-	-	-	-	-
IBA-1 Increased Positivity; Periventricular	0	0	0	1	5	10	8	10
IBA-1 Increased Positivity; Focal; Meninges	0	0	0	0	0	0	0	5
LIVER								
Hypertrophy; Hepatocyte	0	0	0	0	2	0	6	7
LYMPH NODE, CERVICAL								
Decreased, Follicles	0	0	0	0	0	0	6	4
THYMUS								
Increased Tingible Body Macrophages	0	2	0	0	0	0	4	1
Recovery	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

-: no noteworthy findings.

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Species/Strain:	Rat/Crl:WI(Han) Wistar Han IGS	**Duration of Dosing:**	Males - 13 weeks Females - 13 weeks	**Study No.:**	[DVR0207]
Initial Age:	7 weeks	**Duration of Postdose:**	28 days	**Location**	4.2.3.2-4
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral gavage; Dose Vol: 10 mL/kg	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	Citric acid anhydrous USP in purified water. Concentrations of citric acid in vehicle and test article formulations were 7.2, 0.72, 2.16, and 7.2 mg/mL for the 0, 50, 150, 500 mg/kg/day dose groups, respectively.				
Special Features:	In addition to H&E, special staining of the brain tissue included GFAP immunohistochemistry for astrocytes, IBA-1 immunohistochemistry for microglia, Fluoro-Jade B staining for necrotic cell bodies, and Bielschowsky silver stain to visualize axons, dendrites, and other neurofilament-containing neuronal processes.				
NOAEL:	150 mg/kg /day				

Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals	Main Study:	10	10	10	10	10	10	10	10
	Recovery:	5	5	5	5	5	5	5	5
	Toxicokinetics:	3	3	12†	12†	12†	12†	12†	12†
Toxicokinetics									
Rilzabrutinib [a]									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	970	3580	4030	9270	9930	23800
	Day 37	0	0	1480	3420	7780	13400	20300	32300
	Day 91/92	0	0	2170	3120	8450	17000	21300	34700
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	553	1150	707	2310	1010	3100
	Day 37	0	0	641	2190	952	2270	1760	4890
	Day 91/92	0	0	715	2690	1400	3220	2350	5730

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; TK: toxicokinetics; USP: United States Pharmacopeia; WI(Han): Wistar Hannover.

† Culled to 9 TK animals per test article-treated group on Day 3.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**		
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
PRN618									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	269	632	1270	1310	2370	2650
	Day 37	0	0	434	546	1330	1450	3290	5910
	Day 91/92	0	0	659	662	1730	2360	3050	6600
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	82	92	114	172	192	206
	Day 37	0	0	105	165	197	197	251	623
	Day 91/92	0	0	137	189	303	282	342	764
PRN834									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	855	3660	3540	10500	11200	19300
	Day 37	0	0	1570	3390	5680	13500	16100	20600
	Day 91/92	0	0	2060	4370	6650	17800	15200	24700
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	245	548	397	722	641	965
	Day 37	0	0	347	722	582	1010	1340	1750
	Day 91/92	0	0	450	600	745	1260	1070	1560
Noteworthy Findings:									
DIED OR SACRIFICED MORIBUND									
Toxicity Study		0	0	0	0	0	0	0	0
Toxicokinetic Study		0	0	0	0	1^	0	0	0

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

^ Animal found dead on Study Day 41; the direct cause of death was unclear but not likely related to rilzabrutinib.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**		
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
BODY WEIGHT (g) [b]									
Main Study	Day -1	196.1	152.3	0.4	0.1	0.6	-0.1	0.3	-0.4
	Day 13	264.5	181.2	-0.6	0	1.4	-0.6	-6.9*	-5.7
	Day 48	360.0	226.3	-0.6	1.3	-0.3	-2.3	-9.8+	-4.3
	Day 90	412.9	245.1	-0.2	3.2	-3.3	-3.1	-14.4+	-6.0
	Days -1 to 90	213.6	94.4	-1.1	5.3	-7.4	-6.1	-26.1+	-11.1
FOOD CONSUMPTION (g/day) [b]									
Main Study	Days -1 to 6	23.6	17.2	-5.5	1.7	-3.0	-4.7	-14.4+	-27.3+
	Days 6 to 13	24.9	17.7	-1.6	3.4	-1.6	0.6	-10.8+	-10.2+
	Days 83 to 90	24.0	19.0	-2.5	0.5	-6.7	-5.3	-7.5	-12.1+
Recovery	Days 90 to 97	22.8	18.4	-0.9	0.5	-5.3	1.6	14.5*	8.7
WATER CONSUMPTION		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CLINICAL OBSERVATIONS (N)									
Main Study	Mouth-staining around	0	0	1	3	4	5	10	8
	Mouth-wet around	0	0	0	0	1	3	9	7
OPHTHALMOSCOPY		-	-	-	-	-	-	-	-
HEMATOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding; NA: not applicable.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; + P<0.01. Dunnett's Test.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
COAGULATION									
Main Study	APTT (seconds)	15.3	13.2	14.2	12.8	13.2*	14.3	11.9+	10.4*
FLOW CYTOMETRY (Immunophenotyping)		NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
CLINICAL CHEMISTRY									
Main Study	Phosphorus	7.5	9.0	8.6	10.5	9.3*	9.4	12.6+	12.4+
URINALYSIS		-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS (g) [b,c]									
Main Study	Kidney	2.41	1.52	2.5	8.6	7.9	13.8*	0	21.1+
	Liver	9.73	6.25	0.9	4.3	14.5*	7.8	29.0+	36.2+
	Thymus	0.4360	0.4008	3.1	-2.9	7.3	-1.5	-22.4*	-20.5*
Recovery	Thyroid	0.0198	0.0228	8.1	-9.6	11.1	-25.4	37.4*	0.9
GROSS PATHOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-
HISTOPATHOLOGY									
Main Study (N)									
ADRENAL GLANDS	Vacuolation, cortex	1	0	0	NE	0	NE	3	0

Abbreviations: APTT: activated partial thromboplastin time; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding; NE: not evaluated.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; + P<0.01. Dunnett's Test.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

c Absolute mean organ weight data are presented; statistical differences were noted for both absolute and relative (to body and/or to brain) weights.

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY (Continued)									
Main Study (N) (Continued)									
BRAIN	Increased Cellularity, Periventricular	0	0	0	0	0	2	8	6
	Inflammation, Neutrophils, Meninges/Neuropil	0	0	0	0	0	0	0	1
	Fluoro-Jade B staining	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
	Bielschowsky silver staining	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
	GFAP, Increased, Periventricular	0	0	0	7	10	10	10	10
	IBA-1, Increased, Periventricular	0	0	0	8	10	10	10	10
	IBA-1, Increased, Optic Chiasm	0	0	0	0	0	3	7	0
LIVER	Hypertrophy, centrilobular	0	0	0	NE	0	NE	1	0
LUNG	Hyperplasia, Mucosal, Papillary, Bronchiole	0	0	0	0	0	0	1	2
	Hyperplasia, Bronchiolo-alveolar	0	0	0	0	1	0	0	0
	Macrophages, Alveolar	2	2	1	0	1	1	4	9
	Mucus, Intra-alveolar/ bronchiolar	0	0	0	0	0	0	0	2
THYROID	Hypertrophy, follicular cell, diffuse (minimal)	0	0	0	0	0	0	0	7
THYMUS	Decreased lymphocytes, cortex and medulla	0	0	NE	0	NE	0	0	1
Recovery (N)									
BRAIN	GFAP, Increased, Periventricular	0	0	0	0	0	5	5	4
	IBA-1, Increased, Periventricular	0	0	0	0	0	1	1	0

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; N: number of animals with the finding; NE: not evaluated.

-: no noteworthy findings

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Species / Strain:	Rat/Crl:WI(Han) Wistar Han IGS	**Duration of Dosing:**	6 months	**Study No.:**	[DVR0376]
Initial Age:	7 weeks	**Duration of Postdose:**	4 weeks	**Location:**	4.2.3.2-5
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral by gavage	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	Citric Acid Anhydrous USP. Concentrations of citric acid in vehicle and test article formulations were 4.32, 0.72, 0.72, 2.16 and 4.32 mg/mL for the groups receiving 0, 15, 50, 150, and 300 mg/kg/day, respectively.				
NOAEL:	150 mg/kg/day for males and 50 mg/kg/day for females				

Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals	Main Study	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	Recovery	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Toxicokinetic	3	3	9	9	9	9	9	9	9	9
Toxicokinetics											
Rilzabrutinib [a]											
C_{max} (ng/mL)	Day 1	NA	NA	109	313	458	1520	599	3190	1040	2690
	Day 89	NA	NA	168	258	383	1600	808	3500	1570	5770
	Day 182	NA	NA	258	304	606	2010	1170	3440	2300	4950
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	NA	NA	299	810	1300	4060	3390	14000	9530	25600
	Day 89	NA	NA	404	909	2710	6620	5730	17600	12800	29900
	Day 182	NA	NA	394	721	2060	5760	6860	14100	17800	27200

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NA: not applicable; NOAEL: no observed adverse effect level; USP: United States Pharmacopeia; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**				
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
PRN618											
C_{max} (ng/mL)	Day 1	NA	NA	11.3	27.4	45.7	117	122	139	144	196
	Day 89	NA	NA	43.5	25.7	74.1	137	151	212	223	537
	Day 182	NA	NA	77.2	38.8	122	190	202	267	403	665
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	NA	NA	42.8	72.6	232	313	1730	1220	1920	2350
	Day 89	NA	NA	93.8	106	554	703	1280	1730	2140	3410
	Day 182	NA	NA	181	153	574	766	1460	1660	2850	3950
PRN834											
C_{max} (ng/mL)	Day 1	NA	NA	61.5	159	185	382	370	755	475	1050
	Day 89	NA	NA	87.4	156	255	467	490	1080	945	1570
	Day 182	NA	NA	132	178	289	616	454	1270	1360	1830
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	NA	NA	266	555	1210	3200	3980	11200	7310	18800
	Day 89	NA	NA	423	877	2430	6140	5240	14200	10900	22100
	Day 182	NA	NA	701	838	2140	4960	6170	12900	13700	20300

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NA: not applicable.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**				
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Noteworthy Findings:											
DIED OR SACRIFICED MORIBUND											
Toxicity Study		0	0	0	0	0	1 [b]	0	3 (1 [c])	1	2
Toxicokinetic Study		0	0	1	0	1	1	0	0	0	2
BODY WEIGHT (g) [d]											
Main Study	Day 182	463.4	266.0	6.5	-0.5	6.3	3.1	-2.2	-2.7	-6.4	-3.7
	Days 1 to 182	276.4	109.9	11.8*	-0.7	11.6*	9.8	-3.2	-8.0	-9.4	-10.8
Recovery	Day 210	451.5	287.7	17.5*	-5.8	16.0*	-9.0	-0.5	-1.1	0.2	-10.3
FOOD CONSUMPTION		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WATER CONSUMPTION		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NA: not applicable.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01. Dunnett's Test.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b For the animal found dead on Study Day 184 (Animal 3F151), a discolored right ear was determined to be a hemorrhage, but no other gross or microscopic findings were noted. The cause of death in this animal was concluded to be due to procedural stresses and unrelated to the test article.

c For the animal found dead on Study Day 184 (Animal 4F162), no gross or microscopic findings were noted. The cause of death in this animal was concluded to be due to procedural stresses and unrelated to the test article.

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

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**				
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
CLINICAL OBSERVATIONS (N)										
Activity Decreased	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Appears Dehydrated	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Breathing Pattern Labored/Dyspnea	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Cage/Run Material	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Crackles	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
Gasping	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mouth-Staining Around	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Mouth-Wet Around	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Pallor Generalized	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OPHTHALMOSCOPY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HEMATOLOGY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
COAGULATION	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FLOW CYTOMETRY (Immunophenotyping)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

-: no noteworthy findings

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**				
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
CLINICAL CHEMISTRY											
Main Study	Creatinine (mg/dL)	0.49	0.50	0.50	0.51	0.48	0.58	0.43	0.49	0.43*	0.44
	Inorganic Phosphorus (mg/dL)	7.7	6.7	7.8	8.2	7.7	7.3	7.8	7.4	9.9*	10.6**
	Total Bilirubin (mg/dL)	0.02	0.06	0.02	0.04*	0.02	0.04*	0.02	0.03**	0.02	0.03**
	Globulin (g/dL)	2.5	2.6	2.7*	2.5	2.5	2.5	2.5	2.2**	2.4*	2.1**
	Albumin/Globulin Ratio	1.5	1.7	1.5	1.7	1.6	1.8*	1.6	1.9**	1.7**	2.0**
Recovery	AST (U/L)	87	125	81	105	97	86	93	151	100	274**
	Total Protein (g/dL)	6.6	7.2	6.8	6.7	6.8	7.0	6.6	6.3**	6.4	6.6*
	Globulin (g/dL)	2.6	2.5	2.7	2.3	2.7	2.4	2.6	2.1**	2.5	2.1**
URINALYSIS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS (g) [b]											
Main Study	Adrenal Gland	0.063	0.075	0	5.3	1.6	1.3	3.2	9.3	3.2	20.0*
	Kidney	2.473	1.565	1.7	2.2	6.3	8.0	10.6*	10.7*	13.1**	14.2**
	Thymus	0.400	0.301	4.8	5.0	-5.8	-5.6	-5.8	-19.6	-19.3*	-18.6
	Thyroid	0.021	0.019	9.5	5.3	4.8	5.3	9.5	0.0	23.8*	5.3
	Uterus	NA	0.619	NA	12.6	NA	12.0	NA	22.0	NA	33.8

Abbreviations: AST: aspartate aminotransferase; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01. Dunnett's Test.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
GROSS PATHOLOGY											
Early Deaths (N)	Esophagus: Discolored	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Esophagus: Material	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	Kidney: Discolored	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Large Intestine, Cecum: Material	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Liver: Focus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Lung: Discolored	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	Lung: Focus	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
	Small Intestine, Duodenum: Discolored	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Small Intestine, Duodenum: Material	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Spleen: Discolored	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Stomach: Discolored	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Stomach: Distended	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2
	Stomach: Focus	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	Stomach: Material	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Main Study (N)	Lung: Discolored	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	Lung: Focus	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stomach: Focus	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**				
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY											
Main Study (N)											
BRAIN	Meninges-Inflammation, mixed cell										
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Neuropil-Inflammation, neutrophilic										
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Inflammation, mixed cell, perivascular										
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
BRAIN IBA-1	Increased positivity, periventricular										
	Minimal	0	0	0	0	0	10	11	11	9	11
	Mild	0	0	0	0	0	0	1	4	5	4
	Increased positivity, multifocal										
	Minimal	1	0	1	0	0	0	1	1	1	2
	Mild	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Marked	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**					
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY (Continued)											
Main Study (N) (Continued)											
BRAIN, GFAP	Increased positivity, periventricular										
	Minimal	0	0	0	0	0	10	13	14	6	10
	Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	7	2
	Increased positivity, focal										
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	Increased positivity, multifocal										
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
ESOPHAGUS	Inflammation, neutrophilic										
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
FORESTOMACH	Hemorrhage										
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	Marked	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats											**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**		
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	
HISTOPATHOLOGY (Continued)												
Main Study (N) (Continued)												
GLANDULAR STOMACH	Hemorrhage											
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
	Hemorrhage, peracute, focal											
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	
	Inflammation, mixed cell											
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
INTESTINE- SMALL, DUODENUM	Inflammation, neutrophilic											
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	Hemorrhage											
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	Erosion											
	Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 C - Repeat-dose toxicity - 6-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Six-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in rats											**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**15**		**50**		**150**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY (Continued)											
Main Study (N) (Continued)											
LIVER	Necrosis										
	Mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Moderate	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
	Hypertrophy, hepatocyte										
	Minimal	0	0	0	0	2	0	7	1	9	8
THYROID	Hypertrophy, follicular cell, diffuse										
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Recovery (N)											
BRAIN IBA-1	Increased positivity, periventricular										
	Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
	Increased positivity, multifocal										
	Minimal	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
	Mild	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
BRAIN, GFAP	Increased positivity, periventricular										
	Minimal	0	0	0	0	0	1	0	4	5	4

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 D - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	Males - 28 days / Females - 29 days	**Study No.:**	[DVR0184]
Initial Age:	9 to 10 months	**Duration of Postdose:**	28 days	**Location**	4.2.3.2-9
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral gavage; Dose vol: 3 mL/kg	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	Citric Acid Anhydrous USP in purified water. Concentrations of citric acid in vehicle and test article formulations were 31.08, 18.11, 21.47, and 31.08 mg/mL for the 0, 30, 100, and 300 mg/kg/day dose groups, respectively.				
Special Features:	Special staining of the brain tissue included IBA-1 microglia immunohistochemistry and Fluoro-Jade B staining for necrotic cell bodies.				
NOAEL:	300 mg/kg/day				

Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals	Main Study:	3	3	3	3	3	3	3	3
	Recovery:	2	2	2	2	2	2	2	2
Toxicokinetics									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	845	1100	2150	7030	1580	2450
	Day 25	0	0	870	942	5040	3210	4550	7480
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	533	570	996	916	581	1010
	Day 25	0	0	514	486	1500	1450	1440	1380
Noteworthy Findings:									
DIED OR SACRIFICED MORIBUND		-	-	-	-	-	-	-	-
BODY WEIGHT (kg) [b]		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; USP: United States Pharmacopeia.

-: no noteworthy findings

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Although there were no statistically significant effects on the average absolute body weight following administration of rilzabrutinib, individually, several dogs lost weight. One male administered 100 mg/kg/day and one male and one female, administered 300 mg/kg/day, lost weight during the dosing phase and received supplemental food.

表 2.6.7.7 D - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
FOOD CONSUMPTION		-	-	-	-	-	-	-	-
WATER CONSUMPTION		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CLINICAL OBSERVATIONS (N)									
Main Study	Emesis-fluid	0	0	0	0	0	0	2	0
	Emesis-food	0	0	0	0	0	0	3	0
	Emesis-frothy	0	1	5	5	5	5	5	5
	Feces-mucoid diarrhea	0	0	0	1	5	5	2	2
	Feces-soft	0	0	2	3	2	3	4	3
	Feces-watery diarrhea	0	0	3	4	5	5	4	5
	Feces-material, mucous	0	0	1	1	1	3	2	4
	Salivation-increased	0	0	0	0	0	0	3	1
Recovery	Feces-soft	1	0	0	0	1	0	1	0
OPHTHALMOSCOPY									
Main Study	Day 24 (N)	5	5	5	5	5	5	5	5
	Fundus(i)-foci formation, unilateral	0	0	0	0	0	0	0	1
	Fundus(i)-foci formation, bilateral	0	0	0	0	0	0	0	1
Recovery	Day 52 (N)	2	2	2	2	2	2	2	2
	Fundus(i)-foci formation, bilateral	0	0	0	0	0	0	0	1

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding; NA: not applicable.

-: no noteworthy findings

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 D - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs		**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**							
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HEMATOLOGY									
Main study	Reticulocytes (%)	0.70	0.61	0.38*	0.44	0.38*	0.51	0.35*	0.55
COAGULATION		-	-	-	-	-	-	-	-
FLOW CYTOMETRY (Immunophenotyping)		-	-	-	-	-	-	-	-
ELECTROCARDIOGRAMS		-	-	-	-	-	-	-	-
CLINICAL CHEMISTRY		-	-	-	-	-	-	-	-
Main Study	ALP (U/L)	93	93	103	92	109	139*	167	97
	ALT (U/L)	37	31	31	28	43	43	153	71+
Recovery	ALT (U/L)	49	27	30	26	43	83	478	34
URINALYSIS		-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS (g)		-	-	-	-	-	-	-	-
Main Study (N)		3	3	3	3	3	3	3	3
Brain		68.83	71.96	8.0	-18.7*	2.3	-11.9	24.1+	-6.9
Kidney		43.26	35.27	-7.1	-8.6	-11.4	-14.6	-4.6	-18.3
GROSS PATHOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; + P<0.01. Dunnett's Test.

表 2.6.7.7 D - Repeat-dose toxicity - 1-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

One-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY									
Main Study (N)		3	3	3	3	3	3	3	3
BONE MARROW, STERNUM	Decreased Cellularity	0	0	0	0	1	1	0	1
BRAIN	IBA-1 staining	0	0	NE	NE	NE	NE	0	0
	Fluoro-Jade B staining	0	0	NE	NE	NE	NE	0	0
LIVER	Increased Vacuolation; Glycogen-type; Centrilobular	1	0	3	2	1	3	3	3
PEYER'S PATCH	Decreased Cellularity; Lymphocyte	0	0	0	0	2	1	3	1
Recovery (N)		2	2	2	2	2	2	2	2
BONE MARROW, STERNUM	Decreased Cellularity	0	0	0	0	0	0	1	0
	Increased Pigment	0	0	0	0	0	0	1	0
THYMUS	Decreased Cellularity; Lymphocyte	0	1	0	0	2	1	2	2

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; N: number of animals with the finding; NE: not evaluated.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 E - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Species/Strain:	Dog/Beagle	**Duration of Dosing:**	Males - 13 weeks / Females - 13 weeks	**Study No.:**	[DVR0206]
Initial Age:	9 to 10 months	**Duration of Postdose:**	28 Days	**Location:**	4.2.3.2-11
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral gavage; Dose vol: 3 mL/kg	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	Citric Acid Anhydrous USP in purified water. Concentrations of citric acid in vehicle and test article formulations were 31.08, 18.11, 21.47, and 31.08 mg/mL for the 0, 30, 100, and 300 mg/kg/day dose groups, respectively.				
Special Features:	Special staining of the brain tissue included IBA-1 microglia immunohistochemistry and Fluoro-Jade B staining for necrotic cell bodies.				
NOAEL:	30 mg/kg/day (males); undetermined (females) based upon body weight loss in one female at 30 mg/kg/day				

Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals	Main Study:	3	3	3	3	3	3	3	3
	Recovery:	2	2	2	2	2	2	2	2
Toxicokinetics									
Rilzabrutinib [a]									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	985	821	1500	5530	2170	12100
	Day 37	0	0	1350	903	3230	6160	14700	4190
	Day 91/92	0	0	1070	1040	1980	4410	NE	7350
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	575	365	441	1280	718	1730
	Day 37	0	0	591	444	844	918	2480	1140
	Day 91/92	0	0	592	484	736	1670	NE	1780

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; NE: not evaluated; NOAEL: no observed adverse effect level; USP: United States Pharmacopeia.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 E - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**		
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
PRN618									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	1130	1150	1400	5490	2710	8910
	Day 37	0	0	1940	1270	3370	6660	14700	5190
	Day 91/92	0	0	1360	1740	3120	5520	NE	7860
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	401	273	286	800	452	871
	Day 37	0	0	481	364	537	636	1380	749
	Day 91/92	0	0	414	491	491	845	NE	858
PRN834									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	997	1590	2030	6530	3940	14900
	Day 37	0	0	1660	1430	6340	13400	29100	9380
	Day 91/92	0	0	1370	1710	3860	7170	NE	11400
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	166	215	249	592	411	1270
	Day 37	0	0	234	196	761	1070	2130	1090
	Day 91/92	0	0	192	242	433	686	NE	923

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NA: not applicable; NE: not evaluated.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 E - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Noteworthy Findings:									
DIED OR SACRIFICED MORIBUND [b]		0	0	0	0	1	1	5	3
BODY WEIGHT (kg) [c]									
Main Study	Day 38	8.5	7.4	5.9	-4.1	-1.2	-5.4	-10.6	-4.1
	Day 91	8.8	7.5	6.8	-4.0	-5.7	-8.0	NE	-12.0
Recovery	Day 119	9.8	7.8	0	-9.0	-11.2	-2.6	NE	NE
FOOD CONSUMPTION [c] (% consumed)									
Main study	Day-1	95	85	-21.1	-29.4	5.3	-29.4	0.0	-23.5
	Day 7	90	90	0.0	-22.2	-5.6	-55.6+	-16.7	-11.1
	Day 20	95	80	0.0	-6.3	-15.8	-37.5	-36.8*	-43.8*
	Day 38	85	80	-11.8	-18.8	0	-37.5	-70.6+	-61.3*
	Day 50	95	80	-15.8	0.0	-26.3	10.0	-100+	-58.8*
	Day 89	95	80	-5.3	12.5	-27.4	-37.5*	NE	-22.5
Recovery	Day 119	100	88	-25.0	0	-50.0	-43.2	NE	NE
WATER CONSUMPTION		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NA: not applicable; NE: not evaluated.

* P<0.05; + P<0.01. Dunnett's Test, ANOVA, or ANOVA/Dunnett's Test.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b One male and female at 100 mg/kg/day, and all males and three females at 300 mg/kg/day were considered to be in extremis and euthanized for humane considerations during the treatment period. Euthanasia occurred beginning Day 27 through Day 66. Considerations for euthanasia included persistent decreases in food consumption, pronounced weight loss, lack of response to supplemental feeding, and unresponsiveness to dosing holidays.

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

表 2.6.7.7 E - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs		**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**							
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
CLINICAL OBSERVATIONS									
Main Study (N)	Emesis-fluid	1	0	0	1	2	2	1	1
	Emesis-food	0	0	0	1	2	3	3	4
	Emesis-frothy	0	0	5	5	5	5	5	5
	Emesis-material	0	0	1	0	0	0	2	1
	Feces-mucoid diarrhea	0	0	3	4	4	3	2	4
	Feces-soft	2	0	2	2	2	4	2	4
	Feces-watery diarrhea	0	1	5	4	5	4	5	5
	Feces-material, mucous	0	2	5	3	4	3	3	3
	Salivation-increased	1	0	0	1	2	2	2	4
OPHTHALMOSCOPY		-	-	-	-	-	-	-	-
HEMATOLOGY [b]		-	-	-	-	-	-	NE	-
COAGULATION [b]		-	-	-	-	-	-	NE	-
FLOW CYTOMETRY [b] (Immunophenotyping)		-	-	-	-	-	-	NE	-
ELECTROCARDIOGRAMS		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding; NE: not evaluated.

-: no noteworthy findings.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Excludes animals euthanized prior to scheduled sacrifice.

表 2.6.7.7 E - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs		**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**							
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
CLINICAL CHEMISTRY [b]									
Main Study	TBIL (mg/dL)	0.03	0.05	0.04	0.08	0.08	0.16*	NE	0.22+
	AST (U/L)	34	34	33	33	64	78	NE	87
	ALT (U/L)	33	33	36	36	230	228	NE	465+
URINALYSIS [b]		-	-	-	-	-	-	NE	-
ORGAN WEIGHTS		-	-	-	-	-	-	NE	-
GROSS PATHOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NE: not evaluated; TBIL: total bilirubin.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; + P<0.01. Dunnett's Test, ANOVA, or ANOVA/Dunnett's Test.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Excludes animals euthanized prior to scheduled sacrifice.

表 2.6.7.7 E - Repeat-dose toxicity - 3-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs		**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**							
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY									
Main Study (N) [b]		3	3	3	3	3	3	5	5
BRAIN	IBA-1 staining	0	0	NE	NE	0	0	0	0
	Fluoro-Jade B staining	0	0	NE	NE	0	0	0	0
LIVER	Increased Glycogen	0	0	0	0	1	0	0	1
	Increased Single Cell Necrosis	0	0	0	0	1	0	0	4
	Pigment; Brown; Kupffer cells	0	0	0	0	1	1	0	4
	Vacuolation; Hepatocyte; Centrilobular	0	0	0	0	1	1	4	4
LYMPH NODE, CERVICAL	Decreased Lymphocytes; Germinal Centers	0	0	0	1	0	2	4	1
LYMPH NODE, MESENTRIC	Decreased Lymphocytes, Germinal Centers	0	0	1	0	1	3	5	3
PEYER'S PATCHES	Decreased Lymphocytes	0	0	2	3	2	3	5	5
THYMUS	Decreased Lymphocytes, Cortex and Medulla	2	0	1	1	1	2	5	5
Recovery (N)		2	2	2	2	2	2	0	0
LIVER	Vacuolation; Hepatocyte; Centrilobular	0	0	0	0	0	1	NE	NE

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male; N: number of animals with the finding; NE: not evaluated.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Includes animals euthanized prior to scheduled sacrifice.

表 2.6.7.7 F - Repeat-dose toxicity - 9-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs

Nine-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Species / Strain:	Beagle dog	**Duration of Dosing:**	9 months			**Study No.:**	[DVR0377]		
Initial Age:	7 to 8 months	**Duration of Postdose:**	4 weeks			**Location:**	4.2.3.2-12		
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral by capsule			**GLP Compliance:**	Yes		
Vehicle/Formulation:	[redacted] in a ratio of 1:1:3 (W:W:W)								
NOAEL:	30 mg/kg/day								
Dose (mg/kg/day)		**0 (Control)**		**15**		**30**		**50**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Number of Animals	Main Study	5	5	5	5	5	5	5	5
	Recovery	3	3	3	3	3	3	3	3
Toxicokinetics									
Rilzabrutinib [a]									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	482	1070	889	1370	2370	2370
	Day 127	0	0	239	495	613	1470	1540	3230
	Day 273	0	0	248	377	689	751	2410	3250
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	257	559	360	558	806	817
	Day 127	0	0	97.8	257	236	688	514	1090
	Day 273	0	0	65.7	202	257	339	593	940

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; TPGS: tocopherol polyethylene glycol succinate.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 F - Repeat-dose toxicity - 9-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Nine-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**		
Dose (mg/kg/day)		**0 (Control)**		**15**		**30**		**50**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
PRN618									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	529	828	1060	1350	1660	1890
	Day 127	0	0	364	651	985	1390	1950	3260
	Day 273	0	0	280	484	952	1100	2750	3240
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	148	294	273	358	331	368
	Day 127	0	0	77.8	191	186	356	324	578
	Day 273	0	0	45.0	134	199	245	393	500
PRN834									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	555	692	1090	1720	3350	2740
	Day 127	0	0	509	613	1540	1970	4170	5020
	Day 273	0	0	686	596	1950	1680	6310	5760
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	96.3	107	175	272	478	410
	Day 127	0	0	76.8	97.4	197	275	512	646
	Day 273	0	0	80.5	95.2	242	251	708	685

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 F - Repeat-dose toxicity - 9-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Nine-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**15**		**30**		**50**	
Sex	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Noteworthy Findings:								
DIED OR SACRIFICED MORIBUND	0	0	0	0	0	0	1	0
BODY WEIGHT (kg) [b]								
Day 273	10.6	8.4	-3.8	-9.5	-6.6	-10.7	**-9.4**	**-17.9****
Days -1 to 273	1.1	1.4	-36.4	-50.0	-54.5	-50.0	**-72.7**	**-92.9****
FOOD CONSUMPTION	Both sexes administered 50 mg/kg/day had consistently lower food consumption during the dosing phase. Once dosing stopped, group mean food consumption values for males were comparable to the vehicle control group but remained lower for females than the vehicle control group.							
WATER CONSUMPTION	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NA: not applicable.

Bold = These findings were considered related to rilzabrutinib.

** P<0.01. Dunnett's Test.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

表 2.6.7.7 F - Repeat-dose toxicity - 9-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Nine-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs					**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**		**15**		**30**		**50**	
Sex	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
CLINICAL OBSERVATIONS (N)								
Activity Decreased	0	0	0	0	0	0	**2**	**1**
Appears Thin	0	0	0	0	0	0	**1**	0
Cage/Run Material	0	0	0	0	0	0	0	**1**
Emesis- Fluid	0	0	0	**3**	**1**	**2**	**3**	**4**
Emesis- Food	0	0	2	**2**	**1**	**3**	**5**	**6**
Emesis- Frothy	0	3	2	**3**	**1**	**3**	**3**	**7**
Emesis- Gelatin Capsule (re-administered)	0	1	0	**4**	**3**	**4**	**2**	**6**
Emesis- Gelatin Capsule (unable to re-administer)	0	2	0	**2**	**2**	**1**	0	**2**
Emesis- Material	0	0	0	0	0	0	**1**	**3**
Erythema- Focal	0	1	**3**	**2**	**5**	**7**	**2**	**1**
Feces- Absent	0	0	0	0	0	0	**2**	**2**
Feces- Material	0	0	0	0	**1**	0	**1**	**1**
Feces- Material, Mucous	2	3	2	3	**5**	**6**	**5**	**8**
Feces- Mucoid Diarrhea	2	1	3	**4**	**5**	**7**	**6**	**8**
Feces- Watery Diarrhea	2	2	6	**2**	**6**	**7**	**7**	**8**
Salivation- Increased	0	0	0	0	0	**2**	**3**	**4**
Swelling- Focal	0	0	0	0	**1**	**2**	0	**1**
OPTHALMOSCOPY	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

Bold = These findings were considered related to rilzabrutinib.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 F - Repeat-dose toxicity - 9-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Nine-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Dose (mg/kg/day)		**0 (Control)**		**15**		**30**	**50**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HEMATOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-
COAGULATION		-	-	-	-	-	-	-	-
FLOW CYTOMETRY (Immunophenotyping)		-	-	-	-	-	-	-	-
ELECTROCARDIOGRAM		-	-	-	-	-	-	-	-
CLINICAL CHEMISTRY									
Main Study	ALP (U/L)	93	76	68	114	112	134*	107	116
	ALT (U/L)	36	28	37	27	40	36	**108****	**94****
	AST (U/L)	30	32	40	28	34	38	**42***	38
	Total Bilirubin (mg/dL)	0.03	0.03	0.03	0.05	0.02	0.06	0.05	**0.08****
Recovery	ALP (U/L)	90	66	70	**136***	**110**	**156****	**123**	**127**
	ALT (U/L)	35	30	36	32	36	39	**101***	**166****
	AST (U/L)	33	34	39	33	39	40	**43***	**64**
	Glucose (mg/dL)	100	95	90	97	96	94	97	**84***
	Total Bilirubin (mg/dL)	0.05	0.05	0.05	0.09	0.06	0.07	0.07	**0.08**
	Protein (g/dL)	5.6	5.5	5.6	5.6	5.7	5.4	5.3	5.0*
URINALYSIS		-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS		-	-	-	-	-	-	-	-
GROSS PATHOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ALP: alkaline phosphatase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.
Bold = These findings were considered related to rilzabrutinib.
-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01. Dunnett's Test.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.7 F - Repeat-dose toxicity - 9-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib in beagle dogs (Continued)

Nine-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] in beagle dogs									**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**
Dose (mg/kg/day)		**0 (Control)**		**15**		**30**		**50**	
Sex		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY									
Main Study (N)									
LIVER	Pigment, Kupffer cells								
	Minimal	2	0	1	2	1	1	**1**	**2**
	Mild	0	0	0	1	1	1	**5**	**2**
	Hypertrophy, Kupffer cells								
	Minimal	0	0	0	0	0	1	**1**	**1**
	Mild	0	0	0	0	0	0	**3**	**1**
STOMACH	Atrophy								
	Mild	0	0	0	0	0	0	**2**	0
Recovery (N)									
LIVER	Pigment, Kupffer cells								
	Minimal	0	2	1	0	0	0	**2**	0
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	**3**
	Hypertrophy, Kupffer cells								
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.
Bold = These findings were considered related to rilzabrutinib.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

8 In vitro 遺伝毒性試験

表 2.6.7.8 A - Genotoxicity: in vitro - Bacterial reverse mutation assay

Bacterial reverse mutation assay			**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells		**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[DVR0169]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA		**No. of Replicate Cultures**: 3	**Location:**	4.2.3.3.1-1
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO		**Vehicle for Positive Controls**: DMSO; water for sodium azide		
Treatment: Plate incorporation for 48 to 72 h			**Date of Treatment**: [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: No background lawn toxicity; reductions in revertant counts were observed at 5000 µg per plate with some test conditions.				
Genotoxic Effects: None				

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	50 µL/plate	13 ± 4	93 ± 10	8 ± 3	6 ± 1	29 ± 8
	Rilzabrutinib [a] Free Base	15	15 ± 2	102 ± 14	7 ± 2	5 ± 4	17 ± 2
		50	14 ± 2	91 ± 19	6 ± 2	5 ± 2	15 ± 2
		150	13 ± 2	88 ± 8	9 ± 4	5 ± 3	25 ± 7
		500	20 ± 3	92 ± 16	9 ± 2	6 ± 2	19 ± 8
		1500 [b]	7 ± 4	70 ± 15	6 ± 2	5 ± 2	18 ± 6
		5000 [b]	4 ± 3	60 ± 8	2 ± 2	3 ± 2	9 ± 3

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; SD: standard deviation.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Precipitate was observed.

表 2.6.7.8 A - Genotoxicity: in vitro - Bacterial reverse mutation assay (Continued)

Bacterial reverse mutation assay							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	2NF	1.0	131 ± 26				
	SA	1.0		602 ± 92	419 ± 100		
	9AAD	75				512 ± 450	
	MMS	1000					282 ± 49
With S9 Activation	DMSO	50 µL/plate	21 ± 2	114 ± 7	11 ± 6	7 ± 2	26 ± 5
	Rilzabrutinib [a] Free Base	15	23 ± 8	102 ± 6	8 ± 3	8 ± 3	27 ± 4
		50	40 ± 8	126 ± 17	11 ± 4	6 ± 2	32 ± 5
		150	36 ± 15	108 ± 16	10 ± 2	5 ± 1	23 ± 4
		500	36 ± 5	134 ± 21	8 ± 1	7 ± 1	25 ± 4
		1500 [b]	33 ± 7	97 ± 13	8 ± 2	8 ± 4	21 ± 2
		5000 [b]	26 ± 7	73 ± 12	3 ± 1	6 ± 3	15 ± 2
	2AA	1.0	389 ± 165		64 ± 36		
		2.0		1007 ± 526		65 ± 31	
		15					254 ± 70

Abbreviations: 2AA: 2-aminoanthracene; 2NF: 2-nitrofluorene; 9AAD: 9-aminoacridine; DMSO: dimethyl sulfoxide; MMS: methyl methanesulfonate; SA: sodium azide; SD: standard deviation.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Precipitate was observed.

表 2.6.7.8 B - Genotoxicity: In vitro mammalian chromosome aberration assay in human peripheral blood lymphocytes

In vitro mammalian chromosome aberration assay in human peripheral blood lymphocytes		**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Test for Induction of: Chromosome aberrations	**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[DVR0170]
Strain: HPBL	**No. of Replicate Cultures**: 2	**Location:**	4.2.3.3.1-2
Metabolizing System: Aroclor-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture**: Rilzabrutinib [a]: 100 for structural, 100 for numerical; Positive controls: 50 for structural, 100 for numerical	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle For Test Article: DMSO	**Vehicle For Positive Controls**: Water (MMC, CP)		
Treatment: 20 h without S9; 4 h with 16 h recovery period with and without S9		**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted] (Definitive Assay)	
Cytotoxic Effects: ≥50% reduction in mitotic index relative to the solvent control observed at dose levels ≥30 µg/mL in the non-activated 4-h exposure group, at dose levels ≥45 µg/mL in the S9-activated 4-h exposure group, and at dose levels ≥7.5 µg/mL in the non-activated 20-h exposure group.			
Genotoxic Effects: Negative for the induction of structural and numerical chromosome aberrations in both non-activated and S9-activated test systems.			

Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Cytotoxicity [b] (% of Control)**	**Aberrant Cells**		**Aberrations per Cell** *c,e* **Mean ± SD**	**Total Polyploid Cells (Mean %) [f]**
				Structural (Mean %) [c]	**Numerical (Mean %) [d]**		
20-h Continuous Treatment Without Activation	DMSO	NA	NA	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
	Rilzabrutinib [a]	2.5	11	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
		5	23	0.5	0.0	0.005 ± 0.071	0.0
		7.5	50	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
	MMC	0.3	57	20.0**	0.0	0.230 ± 0.489	0.0

Abbreviations: CP: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; HPBL: human peripheral blood lymphocytes; MMC: mitomycin C; NA: not applicable; SD: standard deviation.

a Rilzabrutinib is identified as PRN1008.

b Based on mitotic inhibition relative to solvent control.

c Does not include cells with only gaps.

d Includes polyploid and endoreduplicated cells.

e Severely damaged cells counted as 10 aberrations.

f Does not include endoreduplicated cell.

** P≤0.01. Fisher's Exact Test.

表 2.6.7.8 B - Genotoxicity: In vitro mammalian chromosome aberration assay in human peripheral blood lymphocytes (Continued)

In vitro mammalian chromosome aberration assay in human peripheral blood lymphocytes						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Cytotoxicity [b] (% of Control)**	**Aberrant Cells**		**Aberrations per Cell [c,e] Mean ± SD**	**Total Polyploid Cells (Mean %) [f]**
				Structural (Mean %) [c]	**Numerical (Mean %) [d]**		
4-h Treatment With 16 h Recovery Without Activation	DMSO	NA	NA	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
	Rilzabrutinib [a]	5	2	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
		15	-1	0.5	0.0	0.005 ± 0.071	0.0
		30	50	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
	MMC	0.6	58	20.0**	0.0	0.240 ± 0.515	0.0
4-h Treatment With 16 h Recovery With Activation	DMSO	NA	NA	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
	Rilzabrutinib [a]	15	16	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
		30	37	0.0	0.0	0.000 ± 0.000	0.0
		45	51	1.0	0.0	0.010 ± 0.100	0.0
	CP	5	53	18.0**	0.0	0.220 ± 0.524	0.0

Abbreviations: CP: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; MMC: mitomycin C; NA: not applicable; SD: standard deviation.

a Rilzabrutinib is identified as PRN1008.

b Based on mitotic inhibition relative to solvent control.

c Does not include cells with only gaps.

d Includes polyploid and endoreduplicated cells.

e Severely damaged cells counted as 10 aberrations.

f Does not include endoreduplicated cell.

** P≤0.01. Fisher's Exact Test.

9 In vivo 遺伝毒性試験

表 2.6.7.9 - Genotoxicity: In vivo micronucleus assay in rats

In vivo micronucleus assay in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Test for Induction of:	Bone marrow micronuclei	**Treatment Schedule:**	One dose	**Study No.:**	[DVR0185]
Species/Strain/Sex:	Hsd:SD rats /Males & Females	**Sampling Times:**	24 and 48 h post-dose	**Location:**	4.2.3.3.2-1
Age:	6 weeks	**Method of Administration:**	Oral gavage	**GLP Compliance:**	Yes
Cells Evaluated:	PCE	**Vehicle for the Test Article Formulation**: Citric acid anhydrous, USP in water: 7.2 mg/mL			
		Vehicle/Positive control: Sterile water for injection/CP			
No. of Cells Analyzed/Animal:	2000 PCE/animal	**Feeding Condition:**	Ad libitum	**Date of Dosing:**	[redacted]20[redacted]
Special Features:	Dose formulation analysis, bioanalysis, and toxicokinetic analysis				
Toxic/Cytotoxic Effects:	No mortality occurred at any dose level. Clinical signs included piloerection at the high dose (2000 mg/kg in males; 1500 mg/kg in females).				
Genotoxic Effects:	No statistically significant increase in the incidence of MnPCEs in the test-article treated groups was observed relative to the negative control group.				
Evidence of Exposure:	Measurable concentrations of rilzabrutinib [a] were detected in the plasma samples of test article-treated dose groups but not the vehicle control groups.				

Abbreviations: CP: cyclophosphamide; GLP: good laboratory practice; Hsd:SD: Sprague-Dawley; MnPCE: micronucleated PCE; PCE: polychromatic erythrocytes; USP: United States Pharmacopeia.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.9 - Genotoxicity: In vivo micronucleus assay in rats (Continued)

In vivo micronucleus assay in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**
Sampling Time	**Controls/ Test Articles**	**Dose Level mg/kg**	**Sex/No. of Animals/ Group**		**PCE/ Total Erythrocyte (Mean ± SD)**	**Number MnPCE/PCE Scored (for 5 rats)**
24 h post-dose	Vehicle**	0	Males	5	0.477 ± 0.04	9 / 10000
		0	Females	5	0.457 ± 0.03	9 / 10000
	Rilzabrutinib [a]	500	Males	5	0.421 ± 0.06	6 / 10000
		375	Females	5	0.443 ± 0.03	7 / 10000
		1000	Males	5	0.471 ± 0.03	7 / 10000
		750	Females	5	0.403 ± 0.04	10 / 10000
		2000	Males	5	0.431 ± 0.01	6 / 10000
		1500	Females	5	0.430 ± 0.03	8 / 10000
	CP	40	Males	5	0.341 ± 0.01	*277 / 10000
		40	Females	5	0.340 ± 0.03	*221 / 10000
48 h post-dose	Vehicle**	0	Males	5	0.463 ± 0.04	7 / 10000
		0	Females	5	0.463 ± 0.04	6 / 10000
	Rilzabrutinib [a]	2000	Males	5	0.469 ± 0.03	3 / 10000
		1500	Females	5	0.446 ± 0.02	11 / 10000

Abbreviations: CP: cyclophosphamide; MnPCE: micronucleated PCE; PCE: polychromatic erythrocytes; SD: standard deviation; USP: United States Pharmacopeia.

* Statistically significant increase, p ≤0.05 (Kastenbaum-Bowman Tables, binomial distribution);

** Citric acid anhydrous, USP in water: 7.2 mg/mL; the number of MnPCEs in the vehicle control groups did not exceed the historical control range.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.9 - Genotoxicity: In vivo micronucleus assay in rats (Continued)

In vivo micronucleus assay in rats					**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Sampling Time	**Controls/Test Articles**	**Dose Level (mg/kg)**	**Sex/No. of Animals/Group**		**Toxicokinetic Analysis**	
					C_{max} (ng/mL)	**AUC_{0-24} (ng•h/mL)**
Sampling Time on Day 1	Rilzabrutinib [a]	500	Males	5	1580	10700
		375	Females	5	2870	27800
		1000	Males	5	2720	17600
		750	Females	5	7070	30300
		2000	Males	5	11800	60000
		1500	Females	5	10500	147000

Abbreviations: AUC_{0-24}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to 24 h; C_{max}: maximum concentration.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

10　がん原性試験

表 2.6.7.10 A - Carcinogenicity

Long-term study: Two-year oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Species/Strain:	Rat/Crl:WI(Han) Wistar Han IGS	**Duration of Dosing:**		2 years		**Study No.:**		[1281-18051]	
Initial Age:	Approximately 7 weeks	**Method of Administration:**		Oral gavage		**Location:**		4.2.3.4.1-1	
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**		Citric acid in water		**GLP Compliance:**		Yes	
Basis for High-Dose Selection: 6-month oral toxicity study with NOAEL of 150 mg/kg/day for males and 50 mg/kg/day for females [DVR0376].									
Special Features: None									
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**10**	**5**	**30**	**15**	**100**	**50**
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics									
Rilzabrutinib [a]									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	106	65.2	576	731	3910	6400
	Day 182	0	0	234	139	841	1120	3670	6930
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	27.9	16.7	188	251	761	1230
	Day 182	0	0	97.2	83.4	404	429	690	1600

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; IGS: International Genetic Standardization; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.10 A - Carcinogenicity (Continued)

Long-term study: Two-year oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**10**	**5**	**30**	**15**	**100**	**50**
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
PRN618									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	8.53	NC	107	58.0	907	566
	Day 182	0	0	45.4	17.9	294	171	989	826
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	3.15	1.66	23.3	13.4	117	65.3
	Day 180	0	0	19.2	8.26	87.9	52.8	134	124
PRN834									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	134	121	475	688	2880	4740
	Day 180	0	0	310	232	707	1210	3820	6370
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	33.7	37.6	138	150	388	500
	Day 180	0	0	87.3	64.3	146	285	396	753
NUMBER OF ANIMALS									
At Start		60	60	60	60	60	60	60	60
Died/Sacrificed Moribund		15	16	9	17	12	16	18	25
Non-moribund Sacrifice		7	7	5	8	5	10	8	8
Terminal Sacrifice		38	37	46	35	43	34	34	27
Survival (%)		63.3	61.7	76.7	58.3	71.7	56.7	56.7	45.0
CLINICAL OBSERVATIONS (N)									
Crackles (respiratory)		1	0	1	2	9	6	34	25

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding; NC: not calculated.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.10 A - Carcinogenicity (Continued)

Long-term study: Two-year oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**10**	**5**	**30**	**15**	**100**	**50**
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
BODY WEIGHT (g) [b]									
Day 714		597.6	381.0	5.32	-5.88	4.07	-3.78	-7.36*	-5.54
BODY WEIGHT CHANGE (g) [b]									
Days -1 to 714		430.4	234.2	7.55	-10.1	5.41	-5.47	-10.8*	-8.67
FOOD CONSUMPTION (g/day) [b]									
Days 224-231		19.5	13.8	5.13**	-2.17	1.54	-0.72	0.51	-5.07*
Days 623-630		21.3	16.8	3.29	0.00	-0.94	-3.57	-9.39**	-9.52**
Days 707-714		20.4	17.1	6.37	-6.43	6.86	-4.09	0.00	-8.77
NEOPLASTIC LESIONS (N) [c]									
BRAIN	Granular cell tumor, benign	0	0	0	0	4^	1	2	0
ADRENAL GLAND	Adenoma, adrenocortical, benign [d]	2	0	0	0	2	1	0	3
THYROID GLAND	Adenoma, follicular cell, benign	7	5	9	4	8	5	16^	0
	Carcinoma, follicular cell, malignant	7	2	5	2	3	10^	8	5
	Carcinoma/adenoma, follicular cell	10	7	13	6	10	14^	21^	5

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

* P<0.05; ** P<0.01. ANOVA/Dunnett's Test; ^ Statistically significant (p≤0.05, 1-sided pairwise comparison with vehicle).

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

c Only statistically significant data (1-sided pairwise comparison with vehicle or 1-sided trend test including vehicle and active treatment groups) are shown for tumor incidence.

d Only the trend test across groups was statistically significant (p≤0.05 for rare tumor) in females; none of the pairwise comparisons were statistically significant.

表 2.6.7.10 A - Carcinogenicity (Continued)

Long-term study: Two-year oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**10**	**5**	**30**	**15**	**100**	**50**
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
NEOPLASTIC LESIONS (N) (Continued)[b]									
MESENTERIC LYMPH NODE	Hemangiosarcoma/hemangioma	1	1	4	1	1	2	6^	3
PANCREAS	Adenoma, islet cell, benign	1	0	3	2	0	0	7^[c]	0
THYMUS	Thymoma, benign	2	5	2	12^	1	7	1	4
UTERUS	Adenocarcinoma, malignant	NA	1	NA	3	NA	1	NA	6^
Noteworthy Findings									
GROSS PATHOLOGY		-	-	-	-	-	-	-	-
NON-NEOPLASTIC LESIONS (N)									
PANCREAS	Fibrosis, islet cell(s)								
	Minimal	22	4	**30**	0	**11**	2	**6**	3
	Mild	7	0	**11**	0	**23**	0	**15**	1
	Moderate	0	0	**2**	0	**15**	0	**24**	0
	Marked	0	0	**0**	0	**1**	0	**7**	0
	Hyperplasia, islet-cell, focal								
	Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
	Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding; NA: not applicable.

-: no noteworthy findings; ^ Statistically significant (p≤0.05, 1-sided pairwise comparison with vehicle)

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Only statistically significant data (1-sided pairwise comparison with vehicle or 1-sided trend test including vehicle and active treatment groups) are shown for tumor incidence.

c The statistically significantly increased incidence in high-dose male pancreatic islet-cell adenoma may have been related to rilzabrutinib, though random intergroup distribution of a spontaneous change cannot be entirely ruled out.

Bold = These findings were considered related to rilzabrutinib.

表 2.6.7.10 A - Carcinogenicity (Continued)

Long-term study: Two-year oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**10**	**5**	**30**	**15**	**100**	**50**
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
NON-NEOPLASTIC LESIONS (N) (Continued)									
MESENTERIC LYMPH NODE	Erythrocytosis, sinus								
	Minimal	15	14	15	**14**	**18**	**19**	**17**	**17**
	Mild	6	2	2	**3**	**6**	**7**	**13**	**5**
	Moderate	3	1	3	**3**	**5**	**3**	**6**	**8**
	Marked	0	0	0	**1**	**1**	**1**	**5**	**1**
	Severe	0	0	0	**0**	**0**	**0**	**1**	**2**
GLAND, THYROID	Hyperplasia, follicular-cell, focal								
	Minimal	2	0	7	3	3	1	2	2
	Mild	1	0	5	0	7	0	1	0
	Moderate	0	1	3	0	1	1	3	0
	Marked	0	0	0	0	0	0	1	1

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

Bold = These findings were considered related to rilzabrutinib.

表 2.6.7.10 B - Carcinogenicity

Range-finding study: One- or three-day oral GLP range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**	
Species/Strain:	Mouse/TgHRAS	**Duration of Dosing:**	1 or 3 days	**Study No.:**	[DVR0454]
Initial Age:	Approximately 12 to 13 weeks	**Method of Administration:**	Oral gavage	**Location:**	4.2.3.4.2-1
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	0.5% aqueous methylcellulose (400 cP)	**GLP Compliance:**	Yes
Basis for High-Dose Selection: The limit dose of 1500 mg/kg/day was selected as the high dose due to lack of rilzabrutinib [a]-related toxicity in a previous study in mice using a different form of rilzabrutinib [a] (precipitated/non-micronized). Due to exceeding the maximum tolerated dose in male mice after the first dose of this study, rilzabrutinib [a] was administered to females at lower dosages of 100, 300, and 1000 mg/kg/day of body weight. The 1000 mg/kg dosage was the common dosage between males and females for comparison.					
Special Features: none					

Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**500**	**100**	**1000**	**300**	**1500**	**1000**
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics (Day 1)								
Rilzabrutinib [a]								
AUC_{0-24} (ng•h/mL)	0	0	265000	34100	452000	120000	192000	157000
C_{max} (ng/mL)	0	0	20100	7400	32100	31100	17700	10200
PRN618								
AUC_{0-24} (ng•h/mL)	0	0	13900	2000	40800	10500	9370	9220
C_{max} (ng/mL)	0	0	988	316	4100	1850	885	520
PRN834								
AUC_{0-24} (ng•h/mL)	0	0	108000	8220	265000	44700	69700	63800
C_{max} (ng/mL)	0	0	7050	938	25300	6220	3380	3750

Abbreviations: AUC_{0-24}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to 24 h; C_{max}: maximum concentration; GLP: good laboratory practice.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.10 B - Carcinogenicity (Continued)

Range-finding study: One- or three-day oral GLP range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice					**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**			
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**500**	**100**	**1000**	**300**	**1500**	**1000**
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
NUMBER OF ANIMALS (Main study only):								
At Start	12	12	12	12	12	12	12	12
Died/Sacrificed Moribund	0	0	3	0	9	0	10	6
Terminal Sacrifice	12	12	9	12	3	12	2	6
Survival (%)	100	100	75	100	25	100	16.7	50
BODY WEIGHT	None recorded after dosing due to early termination of the study							
FOOD CONSUMPTION	None recorded after dosing due to early termination of the study							
NEOPLASTIC LESIONS	No microscopic pathology performed due to early termination of the study							
Noteworthy Findings:								
GROSS PATHOLOGY (N)								
Lungs - discolored					1		-	1
Liver - discolored					1		2	2
Urinary bladder - distended					-		1	-
Spleen - discolored					-		-	1
Stomach - misshapen (pyloris)					-		-	1
HISTOPATHOLOGY								
NON-NEOPLASTIC LESIONS	No microscopic pathology performed due to early termination of the study							

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

-: no noteworthy findings

表 2.6.7.10 C – Carcinogenicity

Range-finding study: Two-week oral range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Species/Strain:	Mouse/TgHRAS	**Duration of Dosing:**	14 days	**Study No.:**	[DVR0385]
Initial Age:	Approximately 6 to 7 weeks	**Method of Administration:**	Oral gavage	**Location:**	4.2.3.4.2-2
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	0.5% aqueous methylcellulose	**GLP Compliance:**	No

Basis for High-Dose Selection: Sponsor's prior experience with the rilzabrutinib [a]

Special Features: none; no toxicokinetic or microscopic assessment

Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**		**600**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
NUMBER OF ANIMALS:										
At Start	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Died/Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	1 [b]	0
Terminal Sacrifice	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6
Survival (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	83	100
BODY WEIGHT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FOOD CONSUMPTION	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEOPLASTIC LESIONS	No microscopic examination performed on preserved tissues.									
Noteworthy Findings:										
CLINICAL CHEMISTRY										
Cholesterol (mg/dL)	114	91	121	106 X	125	99	154**	116*	180 X	141**
Triglycerides (mg/dL)	149	116	117	154 X	101	92	81	67*	85 X	77*

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; X: excluded from statistics since n =2.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Not rilzabrutinib-related; perforated trachea.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01. ANOVA or ANOVA/Dunnett's Test.

表 2.6.7.10 C - Carcinogenicity (Continued)

Range-finding study: Two-week oral range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice							**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**		**600**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
GROSS PATHOLOGY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS										
Liver (g)	1.283	1.133	1.431	1.117	1.479*	1.100	1.534**	1.207	1.743**	1.327
Liver/Body weight ratio (%)	5.311	5.267	5.440	5.185	5.650	5.288	6.017**	5.728	6.749**	6.204**
Liver/Brain weight ratio (%)	280.761	232.137	302.944	239.268	313.758	227.433	327.319**	252.778	362.264**	282.151**
HISTOPATHOLOGY										
NON-NEOPLASTIC LESIONS	No microscopic examination performed on preserved tissues.									

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; F: female; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01. ANOVA or ANOVA/Dunnett's Test.

表 2.6.7.10 D - Carcinogenicity

Range-finding study: One-month oral range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Species/Strain:	Mouse/TgHRAS	**Duration of Dosing:**	28 days (M), 29 days (F)		**Study No.:**	[DVR0407]	
Initial Age:	8 to 9 weeks	**Method of Administration:**	Oral gavage		**Location:**	4.2.3.4.2-3	
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	0.5% aqueous methylcellulose (400 cP)		**GLP Compliance:**	Yes	
Basis for High-Dose Selection: 14-day oral range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS Mice [DVR0385].							
Special Features: none							
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**100**		**300**		**600**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics - Day 28								
AUC_{0-24} (ng•h/mL)	0	0	19400	28000	54600	57100	42700	81000
C_{max} (ng/mL)	0	0	7170	7270	10800	9610	7460	13500
NUMBER OF ANIMALS:								
At Start	10	10	10	10	10	10	10	10
Died/Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	1 [b]	3 [b]	3 [b]
Terminal Sacrifice	10	10	10	10	10	9	7	7
Survival (%)	100	100	100	100	100	90	70	70
BODY WEIGHT	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: AUC_{0-24}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to 24 h; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Not rilzabrutinib-related; gavage injury was likely cause of death.

-: no noteworthy findings.

表 2.6.7.10 D - Carcinogenicity (Continued)

Range-finding study: One-month oral range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**		
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**100**		**300**		**600**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
FOOD CONSUMPTION	-	-	-	-	-	-	-	-
NEOPLASTIC LESIONS (N)	0	0	0	0	0	1 [b]	0	0
Noteworthy Findings:								
CLINICAL CHEMISTRY								
Cholesterol (mg/dL)	112	81	121	90	133*	102**	163**	124**
Triglycerides (mg/dL)	128	102	115	76*	86**	69**	79**	60**
GROSS PATHOLOGY	-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS								
Liver (g)	1.299	1.037	1.369	1.115	1.367	1.228*	1.576**	1.323**
Liver/Body weight ratio (%)	5.231	5.285	5.438	5.546	5.512	5.898	6.119**	6.392**
Liver/Brain weight ratio (%)	284.252	217.739	289.902	233.056	293.119	260.172**	337.918**	278.480**
Kidney (g)	0.478	0.345	0.485	0.357	0.485	0.366	0.543**	0.372
Kidney/Body weight ratio (%)	1.926	1.754	1.927	1.777	1.954	1.764	2.108**	1.801
Kidney/Brain weight ratio (%)	104.662	72.352	102.684	74.718	103.892	77.703	116.454**	78.350

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; F: female; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Bronchiolo-alveolar adenocarcinoma; unrelated to rilzabrutinib based on its occurrence in a single animal, lack of dose response and the fact that this is a common spontaneous neoplasm in this mouse strain.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01. ANOVA or ANOVA/Dunnett's Test.

表 2.6.7.10 D - Carcinogenicity (Continued)

Range-finding study: One-month oral range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**		
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**100**		**300**		**600**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
HISTOPATHOLOGY								
NON-NEOPLASTIC LESIONS (N)								
LIVER								
Glycogen decreased, minimal	0	0	2	1	7	4 [b]	5 [b]	6 [b]
Vacuolation, hepatocyte	0	0	0	0	0	0	3 [c]	2 [c]
mild							2	0
moderate							1	1
marked							0	1

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; F: female; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Unscheduled death animals included; value represents the number of animals out of 10 with the finding.

c Finding present only in unscheduled death animals.

表 2.6.7.10 E - Carcinogenicity

Range-finding study: One-month oral GLP range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**	
Species/Strain:	Mouse/TgHRAS	**Duration of Dosing:**	28 days	**Study No.:**	[DVR0455]
Initial Age:	8 weeks	**Method of Administration:**	Oral gavage	**Location:**	4.2.3.4.2-4
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	0.5% aqueous methylcellulose (400 cP)	**GLP Compliance:**	Yes
Basis for High-Dose Selection: The high dose was selected by the Sponsor based on results of an acute oral range-finding study in TgHRAS mice [DVR0454]. High doses in that study administered once were 1500 mg/kg in males and 1000 mg/kg in females. Severe toxicity and lethality occurred beginning at the low dose (500 mg/kg) in males and the high dose in females within 2 days, generally without pre-monitory clinical signs other than cool to touch and decreased activity.					
Special Features: none					

Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics									
Rilzabrutinib [a]									
AUC_{0-24} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	5270	6440	29100	31900	82300	89300
	Day 28	0	0	4310	5980	13700	16500	30100	49300
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	2210	2880	5560	6910	13900	14500
	Day 28	0	0	2580	3010	4300	4300	6650	7120
PRN618									
AUC_{0-24} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	329	472	1720	2680	4660	5230
	Day 28	0	0	160	215	658	610	2120	1900
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	95.7	90.4	339	354	952	920
	Day 28	0	0	84.0	86.9	200	140	488	359

Abbreviations: AUC_{0-24}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to 24 h; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.10 E - Carcinogenicity (Continued)

Range-finding study: One-month oral GLP range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
PRN834									
AUC_{0-24} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	1820	1950	9540	10600	21800	21700
	Day 28	0	0	1140	1570	5630	4830	19000	15400
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	457	384	1220	1330	2080	2480
	Day 28	0	0	279	450	1210	720	2490	2010
NUMBER OF ANIMALS (Main Study):									
At Start		10	10	10	10	10	10	10	10
Died/Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	1 [b]	0	0
Terminal Sacrifice		10	10	10	10	10	9	10	10
Survival (%)		100	100	100	100	100	90	100	100
BODY WEIGHT		-	-	-	-	-	-	-	-
FOOD CONSUMPTION		-	-	-	-	-	-	-	-
CLINICAL CHEMISTRY									
Cholesterol (mg/dL)		122	85	127	97 [c]	124	94	150**	90
NEOPLASTIC LESIONS (N)		0	0	0	0	0	0	0	0

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; AUC_{0-24}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to 24 h; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Death was due to an esophageal perforation (dosing error); not rilzabrutinib-related.

c Group excluded from statistics because n = 1.

-: no noteworthy findings; ** P<0.01. ANOVA/Dunnett's Test.

表 2.6.7.10 E - Carcinogenicity (Continued)

Range-finding study: One-month oral GLP range-finding study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice					**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**			
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Noteworthy Findings:								
GROSS PATHOLOGY	-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS								
Liver (g)	1.382	0.914	1.415	0.897	1.408	0.980	1.458	1.045**
Liver:body weight ratio (%)	5.721	4.927	5.920	5.013	5.858	5.267	6.050	5.603**
HISTOPATHOLOGY								
NON-NEOPLASTIC LESIONS	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: ANOVA: analysis of variance; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

-: no noteworthy findings; ** P<0.01. ANOVA/Dunnett's Test.

表 2.6.7.10 F - Carcinogenicity

Medium-term study: Six-month oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**					
Species/Strain:	Mouse/TgHRAS	**Duration of Dosing:**	26 weeks			**Study No.:**		[1281-20014]	
Initial Age:	Approximately 8 weeks	**Method of Administration:**	Oral gavage			**Location:**		4.2.3.4.1-2	
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	0.5% methylcellulose (400 cps)			**GLP Compliance:**		Yes	
Basis for High-Dose Selection: Acute maximum tolerated dose study in TgHRAS mice showed a single oral dose of 500 mg/kg in males and 1000 mg/kg in females was lethal [DVR0454]; A 28-day oral range-finding study showed no dose-limiting toxicity, and the NOAEL was 300 mg/kg/day [DVR0455].									
Special Features: A positive control group (10/sex) was treated with urethane at 1000 mg/kg on Days 1, 3, and 5.									
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Toxicokinetics									
Rilzabrutinib [a]									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	8360	7600	40600	35400	69000	78800
	Day 66	0	0	8820	10200	26900	41500	40300	71100
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	3220	3360	6600	6560	9000	9030
	Day 66	0	0	3070	3750	4560	5770	5920	6080
PRN618									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	255	250	1300	1280	4400	3730
	Day 66	0	0	243	195	1090	1280	2230	1950
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	105	81.2	306	231	551	485
	Day 66	0	0	92.8	77.9	199	156	310	245

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.10 F - Carcinogenicity (Continued)

Medium-term study: Six-month oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice						**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**			
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
PRN834									
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	0	0	1460	1360	11900	10600	24500	21600
	Day 66	0	0	2110	1610	8610	9920	22300	22200
C_{max} (ng/mL)	Day 1	0	0	421	373	1100	966	1700	1530
	Day 66	0	0	423	479	975	963	1790	1590
NUMBER OF ANIMALS:									
At Start		25	25	25	25	25	25	25	25
Died/Sacrificed Moribund/Sacrificed Non-moribund		0	3 *b*	1 *c*	1 *d*	1 *e*	0	0	2 *f*
Terminal Sacrifice		25	22	24	24	24	25	25	23
Survival (%)		100.0	88	96.0	96.0	96.0	100.0	100.0	92.0
BODY WEIGHT (g)		-	-	-	-	-	-	-	-
FOOD CONSUMPTION (g/day)		-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Animal 1F129 was found dead on Day 55 from lymphoma; signs prior to death included decreased activity, labored breathing/dyspnea, cool to touch, and dehydrated appearance. 1F126 was sacrificed in a non-moribund condition on Day 155 due to a mass (1-2 cm) on the right shoulder that was an extensive cutaneous tumor (hemangiosarcoma). Animal 1F130 was sacrificed in a moribund condition on Day 176 with decreased activity, dyspnea, and dehydrated appearance; this animal had an intranasal squamous cell carcinoma.

c Animal 2M041 was found dead on Day 137. On Day 136, this animal was dyspneic, had a rough hair coat and decreased activity but was moving around without difficulty and had no palpable masses. Upon re-evaluation on Day 137, the animal was more lethargic, appeared thin, and activity was decreased. The animal was scheduled for euthanasia due to poor condition and weight loss but was found dead beforehand. The cause of death was most likely due to gavage trauma as red material was present in the mediastinum.

d Animal 2F151 was found dead from splenic hemangiosarcoma on Day 147.

e Animal 3M055 was sacrificed in a non-moribund condition on Day 156 due to a mass (2-5 cm) on the left shoulder.

f Animal 4F189 was sacrificed in a non-moribund condition on Day 134 due to masses in the right axilla (2-5 cm) and the right inguinal region (1-2 cm); this animal had an extensive area of cutaneous necrosis and inflammation, the initiating cause of which was not determined. Animal 4F197 was found dead on Day 167; this death was determined to be the result of gavage trauma.

-: no noteworthy findings

表 2.6.7.10 F - Carcinogenicity (Continued)

Medium-term study: Six-month oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**					
Dose (mg/kg/day)		**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Gender		**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
NEOPLASTIC LESIONS [b] (N)									
HARDERIAN GLAND	Adenoma	1	0	0	1	0	2	0	0
LIVER	Hemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
LUNG	Adenoma	0	0	1	0	0	1	2	0
	Carcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0
MULTICENTRIC	Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	3	0	0
	Lymphoma	0	1	0	0	0	0	0	0
SKIN/SUBCUTIS	Hemangiosarcoma	0	1	0	0	1	0	0	0
	Papilloma	0	0	0	0	1	1	0	0
SPLEEN	hemangiosarcoma	0	0	1	2	1	0	0	0
STOMACH	hemangiosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
THYMUS	Lymphoma	1	0	0	0	0	1	0	1
	Thymoma	0	1	0	0	0	0	0	0
TONGUE	Papilloma	1	0	0	0	0	0	0	0
WHOLE BODY	Hemangiosarcoma	0	2	2	2	2	3	0	0
	Lymphoma	0	1	0	0	0	1	0	1

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; N: number of animals with the finding.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b There were no statistically significant differences in tumor incidence in rilzabrutinib-treated TgHRAS mice compared with the vehicle controls. Neoplastic lesions present only in the urethane positive controls are not included in the tabulated summary.

表 2.6.7.10 F - Carcinogenicity (Continued)

Medium-term study: Six-month oral GLP carcinogenicity study of rilzabrutinib [a] in TgHRAS mice			**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base (micronized)**					
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle)**		**30**		**100**		**300**	
Gender	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**	**M:**	**F:**
Noteworthy Findings:								
GROSS PATHOLOGY	-	-	-	-	-	-	-	-
HISTOPATHOLOGY								
NON-NEOPLASTIC LESIONS	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.
-: no noteworthy findings

11　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験

表 2.6.7.11 - Reproductive and developmental toxicity - nonpivotal studies - noteworthy findings

Test Article: Rilzabrutinib [a] free base						
Species / Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses (mg/kg)**	**No. Per Group (mated females)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Sprague-Dawley [Crl:OFA (SD)]	Oral Gavage Vehicle: Citric Acid	GD6 - GD17 [b]	0, 50, 150, 500	Main Study: 10/group Toxicokinetics: Vehicle: 4/group Test Article: 8/group	≥150: ↓body weight gain and food consumption 500: maternal and fetal toxicity; visceral and skeletal changes; exceeded the maximum tolerated dose for the dams. The NOAEL for maternal and embryo-fetal toxicity, including embryo-fetal changes, was 150 mg/kg/day.	[DVR0298]
Rabbit/New Zealand White [LAGO:INRA 1077]	Oral Gavage Vehicle: Citric Acid	GD6 - GD19 [b]	0, 50, 100, 150	8/group	≥50: maternal toxicity; visceral (cardiovascular) changes NOAEL for maternal toxicity was 100 mg/kg/day; NOAEL for embryo-fetal changes could not be determined.	[DVR0299]

Abbreviations: GD: gestational day; NOAEL: no observed adverse effect level; SD: Sprague Dawley.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b GD0: day of mating.

12　生殖発生毒性試験－受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

表 2.6.7.12 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation

Fertility and early embryonic development to implantation of rilzabrutinib [a] administered by oral gavage in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Design similar to ICH 4.1.1?	Yes	**Duration of Dosing:**	M: 4 weeks prior to mating through Days 57 to 60 F: 2 weeks prior to mating through Day 7 of gestation	**Study No.:**	[DVR0380]
Species/Strain:	Rats/ Wistar Han	**Day of Mating:**	GD0	**Location:**	4.2.3.5.1-1
Initial Age:	M: 69 days old at receipt F: 62 days old at receipt	**Day of C-Section:**	GD13	**GLP compliance:**	Yes
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration**	Oral gavage		
Special Features:	none	**Vehicle/Formulation:**	Citric Acid Anhydrous, in reverse osmosis deionized water at concentrations of 0.72, 2.16, and 4.32 mg/mL for low-, mid-, and high-dose animals, respectively.		
No Observed Adverse Effect Level:	**F0 Males:**	150 mg/kg/day (general toxicity); 300 mg/kg/day (reproductive and developmental toxicity)			
	F0 Females:	150 mg/kg/day (general toxicity); 300 mg/kg/day (reproductive and developmental toxicity)			
	F1 Litters:	300 mg/kg/day			

Abbreviations: F: filial; GD: gestational day; GLP: good laboratory practice; M: male.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.12 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation (Continued)

Fertility and early embryonic development to implantation of rilzabrutinib [a] administered by oral gavage in rats			**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**			
Daily Dose (mg/kg)			**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
Males	No. Evaluated		22	22	22	22
	No. Died or Sacrificed Moribund		0	1 [b]	0	0
	Clinical Observations [c]	Rales	1/1	1/1	0/0	8/5
	Necropsy Observations		-	-	-	-
	Body Weight (g, %) [d]		341.5	-0.3	+1.4	-4.6*
	Body Weight Gain (g, %) [d]		59.4	-3.2	+5.1	-27.1**
	Food Consumption (g,%) [d]		43.8	-2.7	-1.6	-7.1
	Mean No. Days Prior to Mating		2.4	2.2	2.1	2.1
	No. of Males that Mated		22	20	22	21
	No. of Fertile Males		22	20	22	19
	Organ Weights		-	-	-	-
	Ratio of Organ Weights to Body Weight (%)	Left Testis	0.476	0.472	0.493	0.540**
		Right Testis	0.470	0.468	0.484	0.515**
	Sperm Parameters		-	-	-	-

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b Male 9327 (50 mg/kg/day) was euthanized 1 h and 20 minutes after dose administration on study Day 6 due to adverse clinical signs. Clinical signs for this animal consisted of limited use of the left forelimb, rales, and hyperpnea on study Day 6. Body weights and food consumption were unremarkable. No abnormalities were detected at necropsy examination. This death was not considered related to rilzabrutinib because it was not dose dependent. Based on the clinical signs and the time they were observed after dose administration, it is likely the adverse condition was related to a dosing error.

c N/N = Total number of observations/number of rats with observations

d At end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

-: no noteworthy findings; * P≤0.05; ** P≤0.01. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

表 2.6.7.12 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation (Continued)

Fertility and early embryonic development to implantation of rilzabrutinib [a] administered by oral gavage in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
Females	No. Evaluated	22	22	22	22
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1 [c]
	Clinical Observations	-	-	-	-
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Premating Body Weight (g, %) [b]	220.4	-1.1	-1.1	-2.0
	Premating Body Weight Gains (g, %) [b]	12.0	-4.2	-15.0	-32.5*
	Gestation Body Weight (g, %) [b]	261.4	+0.5	+1.5	-0.3
	Gestation Body Weight Gains (g, %) [b]	41.3	-1.7	+3.1	+1.2
	Premating Food Consumption (g, %) [b]	32.2	-2.5	-1.9	-8.1
	Gestation Food Consumption (g, %) [b]	20.4	-8.3	-3.4	-3.4
	Mean No. Estrous Cycles/14 days	3.36	3.36	3.36	3.10
	Mean No. Days Prior to Mating	2.4	2.4	2.1	2.1
	No. of Females Sperm Positive	22	22	22	21
	No. of Pregnant Females	22	21	22	19
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter	0	0	0	0

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.
b At end of premating or gestation period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
c Female 9484 (300 mg/kg/day) was found dead prior to dosing on study Day 11. The only clinical sign for this animal was rales on study Day 7. Body weights and food consumption were unremarkable; there were no abnormalities detected at necropsy examination; however, this rat was partially cannibalized by its cage mate). This death was considered unrelated to rilzabrutinib because it was a single occurrence and was not associated with any rilzabrutinib-related toxicity.
-: no noteworthy findings; * P≤0.05. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

表 2.6.7.12 - Reproductive and developmental toxicity - fertility and early embryonic development to implantation (Continued)

Fertility and early embryonic development to implantation of rilzabrutinib [a] administered by oral gavage in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
Females	Mean No. Corpora Lutea	13.3	14.0	14.3	13.2
	Mean No. Implantations	12.0	11.7	13.0	12.3
	Mean % Preimplantation Loss	10.6	16.4	8.6	6.6
	Mean No. Viable Embryos	11.1	11.2	11.9	11.6
	Mean No. Nonviable Embryos	0.9	0.5	1.1	0.6
	Mean % Postimplantation Loss	6.7	3.7	8.2	5.0
	Organ Weights	-	-	-	-

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.
-: no noteworthy findings.

13　生殖発生毒性試験ー胚･胎児発生に関する試験

表 2.6.7.13 A - Reproductive and developmental toxicity - effects on embryo-fetal development in rats

An embryo-fetal development study of rilzabrutinib [a] by oral gavage in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Design similar to ICH 4.1.3?	Yes	**Duration of Dosing:**	GD7 to GD17	**Study No.:**	[DVR0378]
Species/Strain:	Rats/ Wistar Han	**Day of Mating:**	GD0	**Location:**	4.2.3.5.2-3
Initial Age:	60 to 70 days old at receipt	**Day of C-Section:**	GD21	**GLP compliance:**	Yes
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Method of Administration**	Oral gavage		
Special Features:	Toxicokinetics	**Vehicle/Formulation:**	Citric Acid Anhydrous, in reverse osmosis deionized water at concentrations of 0.72, 2.16, and 4.32 mg/mL.		
No Observed Adverse Effect Level:	**F0 Females:**	150 mg/kg/day			
	F1 Litters:	300 mg/kg/day			

Daily Dose (mg/kg)			**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
Dams:	**Toxicokinetics:**					
	GD7	C_{max} (ng/mL)	NA	2590	3470	3390
		AUC_{last} (ng•h/mL)	NA	4280	10600	31200
	GD17	C_{max} (ng/mL)	NA	2300	2970	3260
		AUC_{last} (ng•h/mL)	NA	3940	18200	15800
	No. Pregnant		20	18	20	20
	No. Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter		0	0	0	0

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; GD: gestational day; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.13 A - Reproductive and developmental toxicity - effects on embryo-fetal development in rats (Continued)

An embryo-fetal development study of rilzabrutinib [a] by oral gavage in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
Dams:	**Clinical Observations** [b]				
	Abnormal Breathing Sounds	0/0	1/1	8/4	20/10
	Necropsy Observations	-	-	-	-
	Body Weight (g, %) [c]	270.10	-1.35	+1.15	-6.09**
	Body Weight Gain GD7 to GD18 (g, %) [c]	63.20	+0.74	+1.03	-28.24**
	Food Consumption (g, %) [c]	21.42	-5.34	-8.56	-21.40**
	Mean No. Corpora Lutea	10.9	11.3	11.3	10.9
	Mean No. Implantations	10.0	10.2	10.0	9.8
	Mean % Preimplantation Loss	8.52	9.07	13.58	9.36
Litters:	No. Litters Evaluated	20	18	20	20
	No. Live Fetuses	9.4	9.6	9.8	9.2
	Mean No. Resorptions	0.6	0.6	0.3	0.6
	No. of Litters with Dead Fetuses	0	0	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	6.15	4.88	2.79	6.28
	Mean Fetal Body Weight (g)	5.376	5.331	5.371	5.151
	Fetal Sex Ratios (% males)	54.26	51.39	62.33	55.11
	Fetal Anomalies:	-	-	-	-

Abbreviations: GD: gestational day.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b N/N = Total number of observations/number of rats with observation.

c At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

-: no noteworthy findings; ** P<0.01.

表 2.6.7.13 B - Reproductive and developmental toxicity - effects on embryo-fetal development in rabbits

An embryo-fetal development study of rilzabrutinib [a] by oral gavage in rabbits				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Design similar to ICH 4.1.3?	Yes	**Duration of Dosing:**	GD7 to GD19	**Study No.:**	[DVR0379]
Species/Strain:	Rabbits/ New Zealand White	**Day of Mating:**	GD0	**Location:**	4.2.3.5.2-4
Initial Age:	4 to 6 months old at receipt	**Day of C-Section:**	GD29	**GLP compliance:**	Yes
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Method of Administration**	Oral gavage		
Special Features:	Toxicokinetics	**Vehicle/Formulation:**	Citric Acid Anhydrous, in reverse osmosis deionized water at concentrations of 7.2, 0.72, 2.16, and 7.2 mg/mL for control, low-, mid-, and high-dose animals, respectively.		
No Observed Adverse Effect Level:	F0 Females:	30 mg/kg/day			
	F1 Litters:	100 mg/kg/day			

Daily Dose (mg/kg)			**0 (Vehicle)**	**10**	**30**	**100**
Does:	**Toxicokinetics:**					
	GD7	C_{max} (ng/mL)	NA	10.7	232	2240
		AUC_{last} (ng•h/mL)	NA	9.56	175	3980
	GD19	C_{max} (ng/mL)	NA	35.1	340	5110
		AUC_{last} (ng•h/mL)	NA	27.3	313	6920
	No. Pregnant		20	17	19	18
	No. Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0
	No. Aborted or with Total Resorption of Litter		0	0	0	0
	Clinical Observations		-	-	-	-
	Necropsy Observations		-	-	-	-

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; GD: gestational day; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

-: no noteworthy findings.

表 2.6.7.13 B - Reproductive and developmental toxicity - effects on embryo-fetal development in rabbits (Continued)

An embryo-fetal development study of rilzabrutinib [a] by oral gavage in rabbits				**Test Article: Rilzabrutinib [a] free base**	
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**10**	**30**	**100**
Does:	Body Weight (g, %) [b]	3994.8	-0.6	-1.4	-2.4
	Body Weight Gains GD7 to GD20 (g, %) [b]	316.80	-3.5	+1.3	-29.4*
	Food Consumption (g, %) [b]	160	+1.7	-3.8	-10.9
	Mean No. Corpora Lutea	12.9	12.7	12.9	12.8
	Mean No. Implantations	11.3	11.6	11.5	10.9
	Mean % Preimplantation Loss	12.24	8.93	10.79	13.79
Litters:	No. Litters Evaluated	20	17	19	18
	No. Live Fetuses	10.6	10.6	11.1	10.0
	Mean No. Resorptions	0.6	0.8	0.4	0.9
	No. of Litters with Dead Fetuses	1	1	0	0
	Mean % Postimplantation Loss	5.62	6.31	3.72	8.51
	Mean Fetal Body Weight (g)	39.501	37.981	39.487	41.204
	Fetal Sex Ratios (% males)	47.87	48.86	53.09	44.49
	Fetal Anomalies	-	-	-	-

Abbreviations: GD: gestational day.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

-: no noteworthy findings; * P<0.05.

14　生殖発生毒性試験－出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

表 2.6.7.14 - Reproductive and developmental toxicity - effects on pre- and post-natal development, including maternal function

An oral (gavage) study of the effects of rilzabrutinib [a] on pre- and postnatal development, including maternal function in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] micronized**	
Design similar to ICH 4.1.2?	Yes	**Duration of Dosing:**	GD6 to LD20	**Study No.:**	[DVR0492]
Species/Strain:	Rat/Crl:CD(SD)	**Day of Mating:**	GD0	**Location**	4.2.3.5.3-1
Initial Age:	10 to 12 weeks	**Method of Administration**	Oral gavage	**GLP compliance:**	Yes
Date of First Dose:	[redacted]20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	Citric Acid Anhydrous, in reverse osmosis deionized water at concentrations of 4.32, 0.72, 2.16, and 4.32 mg/mL for control, low-, mid-, and high-dose animals, respectively.		
Special Features:	None	**Litter Culled/Not Culled:**	Culled		

No Observed Adverse Effect Level:	
F0 Maternal Systemic Toxicity:	50 mg/kg/day
F1 Neonatal/Developmental Toxicity:	150 mg/kg/day
F1 Parental Toxicity:	300 mg/kg/day
F1 Reproductive Toxicity:	300 mg/kg/day
F2 Embryonic Toxicity:	300 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
F0 Females:	No. Evaluated	25	25	25	25
	No. Pregnant	25	25	25	25
	No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	2	1

Abbreviations: F: filial; GD: gestational day; GLP: good laboratory practice; LD: lactation day; SD: Sprague Dawley.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.14 - Reproductive and developmental toxicity - effects on pre- and post-natal development, including maternal function (Continued)

An oral (gavage) study of the effects of rilzabrutinib [a] on pre- and postnatal development, including maternal function in rats			**Test Article: Rilzabrutinib [a] micronized**			
Daily Dose (mg/kg)			**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
F0 Females:	No. with Total Litter Loss		0	0	1	1
	Clinical Observations		-	-	-	-
	Necropsy Observations		-	-	-	-
	Gestation Body Weight (g,%) [b]	GD9	258	258 (0.0)	254 (-1.6)	242 (-6.2)**
		GD15	300	298 (-0.7)	288 (-4.0)*	276 (-8.0)**
		GD20	376	366 (-2.7)	351 (-6.6)**	333 (-11.4)**
	Lactation Body Weight (g,%) [b]	LD1	287	287 (0.0)	276 (-3.8)	257 (-10.5)**
		LD10	331	329 (-0.6)	312 (-5.7)**	305 (-7.9)**
		LD17	337	334 (-0.9)	326 (-3.3)	320 (-5.0)**
	Gestation Food Consumption (g/animal/day)	GD6 to GD9	19	18	18	13**
		GD12 to GD15	22	22	21	19**
		GD18 to GD20	26	25	24	21**
	Lactation Food Consumption (g/animal/day)	LD1 to LD4	37	36	37	35
		LD4 to LD7	43	42	40	38**
		LD7 to LD10	51	51	50	47
	Mean Duration of Gestation (days)		21.6	21.7	21.8	21.8
	Abnormal Parturition		-	-	-	-

Abbreviations: F: filial; GD: gestational day; LD: lactation day.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b For all groups, means are shown. For test article-treated groups, percent differences from control are shown in parentheses. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01 when compared to the control group using Dunnett's test.

表 2.6.7.14 - Reproductive and developmental toxicity - effects on pre- and post-natal development, including maternal function (Continued)

An oral (gavage) study of the effects of rilzabrutinib [a] on pre- and postnatal development, including maternal function in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] micronized**		
Daily Dose (mg/kg)			**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
F1 Litters: (preweaning)	No. Litters Evaluated		25	24	25	25
	Mean No. of Implantations		13.6	13.1	12.6	13.5
	Mean No. Pups/Litter		13.2	12.2	11.8	12.6
	Mean No. Liveborn Pups/Litter		13.2	12.0	11.7	12.3
	Pup Sex Ratio (% Males per Litter)		48.5	53.6	46.3	54.1
	Postnatal Survival to PND4 (% per Litter)		98.2	98.3	94.2	92.9
	Postnatal PND4 to Weaning (% per Litter)		100.0	99.5	99.4	100.0
	Change in Pup Body Weights (g)					
	Males	PND1 to PND4	3.5	3.7	3.5	2.6**
		PND10 to PND14	11.0	10.9	9.9	8.9**
		PND17 to PND21	15.0	15.8	14.8	12.4**
	Females	PND1 to PND4	3.4	3.6	3.5	2.8**
		PND10 to PND14	10.9	10.7	9.5*	9.1**
		PND17 to PND21	14.6	14.8	14.3	12.2**
	Pup Clinical Signs (N/N) [b]	Small stature	8/3	6/3	17/6	61/22
	Pup Necropsy Observations		-	-	-	-

Abbreviations: F: filial; PND: postnatal day

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

b N/N = Total number of observations/number of rats with observation.

-: no noteworthy findings; * P<0.05; ** P<0.01 when compared to the control group using Dunnett's test.

表 2.6.7.14 - Reproductive and developmental toxicity - effects on pre- and post-natal development, including maternal function (Continued)

An oral (gavage) study of the effects of rilzabrutinib [a] on pre- and postnatal development, including maternal function in rats			**Test Article: Rilzabrutinib [a] micronized**			
Daily Dose (mg/kg)			**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
F1 Males: (postweaning)	No. Evaluated Postweaning		25	24	22	23
	No. Died or Euthanized in Extremis		0	0	0	1
	Clinical Observations		-	-	-	-
	Body Weight Changes (g)	PND21 to PND28	46	46	45	41**
		PND21 to PND119	555	561	547	535
	Mean Age at Preputial Separation (days)		44.0	44.0	45.3	44.8
	Startle Response		-	-	-	-
	Motor Activity		-	-	-	-
	Learning and Memory		-	-	-	-
	No. of Males that Mated		25	21	21	21
	No. of Fertile Males		25	20	20	19
	Necropsy Observations		-	-	-	-

Abbreviations: F: filial; PND: postnatal day

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

-: no noteworthy findings; ** P<0.01 when compared to the control group using Dunnett's test.

表 2.6.7.14 - Reproductive and developmental toxicity - effects on pre- and post-natal development, including maternal function (Continued)

An oral (gavage) study of the effects of rilzabrutinib [a] on pre- and postnatal development, including maternal function in rats			**Test Article: Rilzabrutinib [a] micronized**			
Daily Dose (mg/kg)			**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
F1 Females: (postweaning)	No. Evaluated Postweaning		25	23	22	23
	No. Died or Euthanized in Extremis		0	0	0	0
	Clinical Observations		-	-	-	-
	Premating Body Weight Changes (g)	PND21 to PND28	40	40	40	36*
		PND21 to PND84	239	240	239	234
	Gestation Body Weight (g (%)) [b]		387	388 (0.3)	375 (-3.1)	373 (-3.6)
	Mean Age at Vaginal Patency (days)		34.4	34.4	33.8	34.0
	Startle Response		-	-	-	-
	Motor Activity		-	-	-	-
	Learning and Memory		-	-	-	-
	Mean Precoital Interval		2.5	2.3	3.4	3.0
	No. of Females that Mated		25	23	22	23
	No. Pregnant		25	22	21	21
	Necropsy Observations		-	-	-	-
	Mean No. of Corpora Lutea		17.7	17.6	17.5	16.7
	Mean No. of Implantations		16.6	16.5	16.0	15.8
	Mean % Pre-implantation Loss		6.4	5.7	8.2	5.6

Abbreviations: F: filial; PND: postnatal day.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

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

-: no noteworthy findings; * P<0.05 when compared to the control group using Dunnett's test.

表 2.6.7.14 - Reproductive and developmental toxicity - effects on pre- and post-natal development, including maternal function (Continued)

An oral (gavage) study of the effects of rilzabrutinib [a] on pre- and postnatal development, including maternal function in rats		**Test Article: Rilzabrutinib [a] micronized**			
Daily Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**	**50**	**150**	**300**
F2 Litters	No. of Litters Evaluated	25	20	21	21
	Mean No. of Live Conceptuses/Litter	15.5	15.9	14.7	14.5
	Mean No. of Resorptions	1.1	0.6	1.3	1.2
	Mean % Postimplantation Loss	6.2	3.8	9.0	8.1

Abbreviations: F: filial.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

15　幼若動物を用いた試験

表 2.6.7.15 - Studies in juvenile animals

Species/ Strain	Method of Adm. (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing [a]	Dose (mg/kg/day) [a]	No. Pups per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/Wistar Han	Oral gavage (Citric acid in ultra pure water)	PND10 to PND34	0 30 100 200	Main Study: 10/sex/group TK Phase: 6/sex/group (control); 33/sex/group (30-200 mg/kg/day) [b]	30	Administration of rilzabrutinib[c] by once daily oral gavage was not well tolerated at dose levels of ≥300 mg/kg/day. DLT was observed at the initial doses following a single dose (PND10). Increased mortality at 100 (1 M found dead on PND13) and 200 (1 M and 1 F found dead on PND11) mg/kg/day. Clinical signs of dehydration (PND12 to PND21) & thin body appearance (PND12 to PND17) were noted at 100 and 200 mg/kg/day. Additional clinical signs of abnormal breathing sounds (1 animal) and ungroomed fur (3 animals) were noted at 200 mg/kg/day. No rilzabrutinib[c]-related effects on body weights, food consumption, sexual maturation (females), or macroscopic evaluations. The NOAEL was 30 mg/kg/day, which corresponds to a C_{max} of 672 and 2270 ng/mL in males and females, respectively, on PND10 and 419 and 1130 ng/mL in males and females, respectively, on PND34 and to an AUC_{last} of 3730 and 2570 ng•h/mL in males and females, respectively, on PND10 and 1190 and 2020 ng•h/mL in males and females, respectively, on PND34.	[JUP0024]

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; DLT: dose limiting toxicity; F: female; M: male; NOAEL: no observed adverse effect level; PND: postnatal day; TK: toxicokinetic.

a TK Phase animals were dosed on PND10 according to the initial dose levels of 100, 300, and 1000 mg/kg/day. Due to toxicity, mortality, and adverse clinical observations, the doses were reduced. Thereafter, all animals assigned to the main study and remaining untreated toxicokinetic animals started dosing at the revised levels of 30, 100, and 200 mg/kg/day.

b 33 pups per sex per group were initially assigned to the 100, 300, and 1000 mg/kg/day dose groups. The number of TK Phase animals was increased by 48 pups per sex for the treated groups to provide a sufficient number of rats for TK evaluation at the revised dose levels for TK sample collection on PND 10, and to replace the TK animals that were dosed and terminally bled at the original dose levels. 15, 18, and 15 pups per sex were assigned to the 30, 100, and 200 mg/kg/day dose groups, respectively.

c Rilzabrutinib was identified as SAR444671.

16　局所刺激性試験

試験は実施しなかった。

17　その他の毒性試験

表 2.6.7.17 A - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN4361)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities						**Test Article: PRN4361**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)			**No. of Independent Assays**: 1			**Study No.:**	[AG58XF.502ICH.BTL]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA			**No. of Replicate Cultures**: 3			**Location:**	4.2.3.7.6-34
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9			**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA			**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO			**Vehicle for Positive Controls**: DMSO; water for sodium azide				
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)						**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None							
Genotoxic Effects: None							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	50 µL/plate	12 ± 5	89 ± 9	7 ± 1	6 ± 3	23 ± 2
	PRN4361	5.00	14 ± 3	82 ± 5	9 ± 3	6 ± 1	19 ± 3
		15.0	15 ± 1	81 ± 5	7 ± 3	8 ± 2	33 ± 7
		50.0	13 ± 4	82 ± 13	10 ± 2	6 ± 3	29 ± 5
		150	14 ± 3	84 ± 10	7 ± 3	9 ± 2	32 ± 5
		500 [a]	10 ± 3	84 ± 1	9 ± 5	9 ± 2	23 ± 4
		1500 [a]	7 ± 1	76 ± 15	8 ± 2	6 ± 3	18 ± 4
		5000 [a]	15 ± 2	76 ± 12	6 ± 3	3 ± 1	17 ± 3

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; SD: standard deviation.

a Precipitate was observed.

表 2.6.7.17 A - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN4361) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities							**Test Article: PRN4361**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	2NF	1.00	172 ± 13				
	NaN_3	1.00		735 ± 20	748 ± 22		
	9AAD	75.0				999 ± 273	
	MMS	1000					479 ± 63
With S9 Activation	DMSO	50 µL/plate	20 ± 3	83 ± 6	12 ± 5	5 ± 2	32 ± 3
	PRN4361	5.00	20 ± 6	93 ± 16	10 ± 5	4 ± 2	27 ± 5
		15.0	19 ± 3	83 ± 4	10 ± 3	6 ± 5	32 ± 4
		50.0	23 ± 2	93 ± 14	11 ± 5	2 ± 1	33 ± 6
		150	22 ± 3	95 ± 8	10 ± 2	4 ± 1	28 ± 4
		500 [a]	20 ± 2	92 ± 1	11 ± 3	5 ± 1	29 ± 3
		1500 [a]	19 ± 3	74 ± 10	8 ± 2	3 ± 2	23 ± 2
		5000 [a]	13 ± 2	84 ± 5	7 ± 1	3 ± 3	24 ± 8
	2AA	2.00	659 ± 68		139 ± 35		
	2AA	5.00		1575 ± 240		129 ± 16	
	2AA	15.0					341 ± 55

Abbreviations: 2AA: 2-aminoanthracene; 2NF: 2-nitrofluorene; 9AAD: 9-aminoacridine; DMSO: dimethyl sulfoxide; MMS: methyl methanesulfonate; NaN_3: sodium azide; SD: standard deviation.

a Precipitate was observed.

表 2.6.7.17 B - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (RA16732596)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities		**Test Article: PRN834-A4 (RA16732596)**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)	**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[HIS2449]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA	**No. of Replicate Cultures**: 3	**Location:**	4.2.3.7.6-4
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture**: -	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetonitrile:purified water (1:1)	**Vehicle for Positive Controls**: DMSO; water for sodium azide		
Treatment: Plate incorporation (with and without activation) for 3 days		**Date of Treatment**: [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None			
Genotoxic Effects: None			

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice.
-: not applicable

表 2.6.7.17 B - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (RA16732596) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities							**Test Article: PRN834-A4 (RA16732596)**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [a]				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	Acetonitrile:purified water (1:1)	0	15 ± 4	109 ± 17	14 ± 4	11 ± 5	14 ± 4
	Untreated control	0	11 ± 3	122 ± 21	12 ± 3	11 ± 8	14 ± 5
	RA16732596 (PRN834-A4)	5	18 ± 5	118 ± 10	13 ± 6	12 ± 4	13 ± 4
		16	16 ± 4	143 ± 4	21 ± 3	10 ± 2	13 ± 3 [b,c]
		50	12 ± 2	114 ± 8	11 ± 6	7 ± 2	10 ± 4
		160	16 ± 6	117 ± 8	14 ± 6	9 ± 3	12 ± 5
		500	18 ± 3 [d]	123 ± 13 [d]	12 ± 3 [d]	13 ± 3 [d]	13 ± 3 [c,d e]
		1600 [f]	- [d]	- [d]	- [d]	- [d]	- [d]
		5000 [f]	- [d]	- [d]	- [d]	- [d]	- [d]
	NaN_3	2		796 ± 58	658 ± 51		
	NQO	2					224 ± 8
	2NF	5	961 ± 141				
	AAC	50				340 ± 54	

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; NaN_3: sodium azide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Mean and Standard Deviation values are generated from unrounded values exported directly from data capture software, and so may appear to vary from those presented to 1 decimal place in the study report.

b Plate damaged.

c Plate counted manually.

d Precipitation of test article observed.

e Bubbles or split in agar.

f Scoring was performed up to the lowest precipitating dose level of 500 µg/plate.

-: not applicable

表 2.6.7.17 B - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (RA16732596) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN834-A4 (RA16732596)**		
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD) [a]**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
With S9 Activation	Acetonitrile:purified water (1:1)	0	28 ± 8	141 ± 10	12 ± 4 [b,d]	20 ± 6	21 ± 2
	Untreated control	0	27 ± 5	148 ± 18	18 ± 4	19 ± 3	18 ± 4
	RA16732596 (PRN834-A4)	5	32 ± 4	137 ± 19	16 ± 4	21 ± 10	13 ± 5
		16	34 ± 6	133 ± 4	14 ± 4	20 ± 7	18 ± 2
		50	26 ± 1	137 ± 5	11 ± 5	13 ± 6 [b,e]	20 ± 4
		160	31 ± 5	143 ± 19	9 ± 3	19 ± 2	21 ± 3
		500	32 ± 2 [c]	166 ± 4 [c]	14 ± 2 [b,c,d]	14 ± 5 [c]	19 ± 4 [c]
		1600 [f]	- [c]	- [c]	- [c]	- [c]	- [c]
		5000 [f]	- [c]	- [c]	- [c]	- [c]	- [c]
	B[a]P	10	265 ± 54				
	AAN	15					118 ± 30
	AAN	5		2287 ± 39	334 ± 135	206 ± 29	

Abbreviations: AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; SD: standard deviation.

a Mean and Standard Deviation values are generated from unrounded values exported directly from data capture software, and so may appear to vary from those presented to 1 decimal place in the study report.

b Plate counted manually.

c Precipitation of test article observed.

d Bubbles or split in agar.

e Contaminated plate.

f Scoring was performed up to the lowest precipitating dose level of 500 µg/plate.

-: not applicable

表 2.6.7.17 C - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (RA16735340)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN834 / D92-E (RA16735340)**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)			**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[HIS2453]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA			**No. of Replicate Cultures**: 3		**Location:**	4.2.3.7.6-3
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital induced rat liver S9			**No. of Cells Analyzed/Culture**: -		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO			**Vehicle for Positive Controls:** DMSO; water for sodium azide			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation) for 3 days					**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity was observed at 1600 µg/plate in strains TA98 and TA1535 in the presence of S9						
Genotoxic Effects: None						
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [a]				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	14 ± 2	152 ± 22 [b]	23 ± 8	12 ± 6 [b]	13 ± 4
	RA16735340 (PRN834 / D92-E)	5	16 ± 7	145 ± 15	21 ± 5	9 ± 2	12 ± 4
		16	14 ± 4	147 ± 4	27 ± 13	7 ± 2	12 ± 5
		50	18 ± 4	140 ± 13 [b]	22 ± 8	9 ± 2	18 ± 2
		160	19 ± 4	154 ± 14	25 ± 10	9 ± 2	12 ± 3
		500	18 ± 11	172 ± 6	21 ± 6	10 ± 3	14 ± 4
		1600	10 ± 3 [b,c]	179 ± 24 [b,c]	16 ± 3 [b,c]	8 ± 2 [b,c]	21 ± 9 [b,c]
		5000	_ [c]	_ [c]	_ [c]	_ [c]	_ [c]
	NaN_3	2		1108 ± 80	748 ± 52		

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NaN_3: sodium azide; SD: standard deviation.

a Mean and Standard Deviation values are generated from unrounded values exported directly from data capture software, and so may appear to vary from those presented to 1 decimal place in the study report.

b Plate counted manually.

c Precipitation of test article observed.

-: not applicable

表 2.6.7.17 C - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (RA16735340) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN834 / D92-E (RA16735340)**		
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [a]				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	NQO	2					229 ± 12
	2NF	5	1384 ± 345				
	AAC	50				268 ± 23	
With S9 Activation	DMSO	0	34 ± 3 [b]	170 ± 28	15 ± 6	21 ± 2	24 ± 5
	RA16735340 (PRN834 / D92-E)	5	35 ± 7	190 ± 24	13 ± 7	24 ± 2	23 ± 2
		16	33 ± 11	177 ± 15	14 ± 3	14 ± 7	28 ± 3
		50	37 ± 2	155 ± 13	11 ± 0	19 ± 6	24 ± 4
		160	30 ± 2	179 ± 7	10 ± 2	17 ± 3	23 ± 5
		500	32 ± 2	170 ± 2	9 ± 1	15 ± 6	21 ± 1
		1600	10 ± 1 [b,c]	187 ± 7 [b,c]	6 ± 4 [b,c]	13 ± 4 [b,c]	21 ± 5 [b,c]
		5000 [d]	- [c]	- [c]	- [c]	- [c]	- [c]
	B[a]P	10	334 ± 44				
	AAN	15					274 ± 28
	AAN	5		2369 ± 391	261 ± 16	176 ± 13	

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Mean and Standard Deviation values are generated from unrounded values exported directly from data capture software, and so may appear to vary from those presented to 1 decimal place in the study report.

b Plate counted manually.

c Precipitation of test article observed.

d Scoring was performed up to the lowest precipitating dose level of 1600 µg/plate.

-: not applicable

表 2.6.7.17 D - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN862)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities		**Test Article: PRN862**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)	**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[DVR0521]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA	**No. of Replicate Cultures**: 3	**Location:**	4.2.3.7.6-10
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA	**GLP Compliance:**	No [a]
Vehicle for Test Article: DMSO	**Vehicle for Positive Controls**: DMSO		
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)		**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: Observed at ≥600 µg/plate without S9 and ≥800 µg/plate with S9 for 1 or more bacterial strains			
Genotoxic Effects: Positive for TA100 (≥2-fold increase in mean number of revertants for PRN862 at 400, 600, and 800 µg/plate with S9 and 400 and 600 µg/plate without S9 compared to DMSO control)			

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [b]				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	22 ± 3	211 ± 15	11 ± 3	16 ± 4	32 ± 4
	PRN862	50	19 ± 3	222 ± 9	10 ± 1	11 ± 2	
		100	21 ± 2	277 ± 22	13 ± 1	14 ± 1	36 ± 5
		200	14 ± 2	287 ± 76	7 ± 2	11 ± 2	31 ± 2
		400	24 ± 2	422 ± 55	9 ± 1	15 ± 5	43 ± 2
		600	27 ± 9	442 ± 25	6 ± 1	7 ± 2 [c]	
		800	26 ± 1	342 ± 91 [c]	5 ± 1 [c]	1 ± 2 [c]	43 ± 2
		1000	15 ± 1 [c]	217 ± 52 [c]	5 ± 2 [c]	NC [c]	
		1600					39 ± 6 [c]

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to lack of background lawn; SD: standard deviation.

a Although GLP compliance is claimed by the laboratory, the study was not performed in compliance with international GLP regulations and is considered exploratory.

b Mean and Standard Deviation values are rounded to the nearest integer here but are presented to 2 decimal places in the study report.

c Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 D - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN862) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN862**		
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [a]				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	2NF	10	744 ± 228				
	NaN_3	1.2		801 ± 120	373 ± 54		
	ICR-191	1				181 ± 14	
	N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	5					276 ± 32
With S9 Activation	DMSO	0	36 ± 6	143 ± 21	14 ± 4	11 ± 6	34 ± 5
	PRN862	50	24 ± 6	132 ± 14	13 ± 2	10 ± 2	
		100	31 ± 2	190 ± 7	15 ± 5	8 ± 2	34 ± 5
		200	29 ± 5	215 ± 35	18 ± 7	4 ± 1	34 ± 1
		400	38 ± 5	294 ± 30	12 ± 2	2 ± 3	34 ± 3
		600	25 ± 10	324 ± 8	7 ± 2	1 ± 1	
		800	30 ± 6	323 ± 44 [b]	6 ± 3	3 ± 1 [b]	29 ± 7
		1000	19 ± 4 [b]	234 ± 27 [b]	4 ± 2 [b]	2 ± 2 [b]	
		1600					30 ± 13 [b]
	2AA	3	1735 ± 270	915 ± 124	231 ± 5	117 ± 23	
	2AA	20					523 ± 79

Abbreviations: 2AA: 2-aminoanthracene; 2NF: 2-nitrofluorene; DMSO: dimethyl sulfoxide; ICR-191: CAS Registry number 17070-45-0; NaN_3: sodium azide; SD: standard deviation.

a Mean and Standard Deviation values are rounded to the nearest integer here but are presented to 2 decimal places in the study report.

b Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 E - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN862)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities			**Test Article: PRN862**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)	**No. of Independent Assays**: 2		**Study No.:**	[HIS2490]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535, and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA	**No. of Replicate Cultures**: 3		**Location:**	4.2.3.7.6-11
Metabolizing System: rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO	**Vehicle for Positive Controls**: DMSO; water for sodium azide			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)			**Date of Treatment**: [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: observed at ≥1600 µg/plate with or without S9 for all bacterial strains; ≥1000 µg/plate without S9 and 1400 µg/plate with S9 for TA100				
Genotoxic Effects: None				

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 1 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	21.8 ± 4.3	166.8 ± 16.5	15.0 ± 2.6	11.6 ± 6.0	35.8 ± 9.0
	PRN862	5	19.3 ± 4.2	168.0 ± 5.6	11.0 ± 1.0	7.7 ± 2.3	34.0 ± 3.6
		16	18.3 ± 3.8	156.7 ± 8.7	10.3 ± 3.1	8.7 ± 2.5	43.3 ± 6.7
		50	18.3 ± 5.0	171.3 ± 7.6	10.7 ± 3.1	6.3 ± 2.1	37.3 ± 5.0
		160	14.3 ± 1.2	171.7 ± 8.6	6.0 ± 1.0	10.0 ± 5.3	40.0 ± 6.9
		500	21.3 ± 5.8	187.0 ± 7.8	11.7 ± 3.8	12.3 ± 6.5	37.3 ± 1.2
		1600	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	9.3 ± 4.0
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
	2NF	5	1073.7 ± 178.9				
	NaN_3	2		680.7 ± 33.3	498.0 ± 38.1		
	AAC	50				405.7 ± 38.5	
	NQO	2					374.0 ± 46.2

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to lack of background lawn; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 E - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN862) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities						**Test Article: PRN862**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 1 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
With S9 Activation	DMSO	0	32.0 ± 4.3	195.6 ± 20.3	16.0 ± 5.7	16.2 ± 5.8	39.0 ± 12.2
	PRN862	5	35.3 ± 3.5	211.7 ± 11.9	11.7 ± 1.5	17.7 ± 3.5	38.3 ± 8.1
		16	31.3 ± 2.3	201.7 ± 14.0	15.0 ± 4.4	12.7 ± 4.0	35.0 ± 1.7
		50	32.7 ± 1.2	198.3 ± 13.3	15.3 ± 2.3	11.7 ± 3.5	36.3 ± 6.4
		160	25.7 ± 8.5	206.3 ± 3.5	19.0 ± 4.0	10.3 ± 1.5	41.0 ± 4.4
		500	31.3 ± 4.9	204.3 ± 28.6	14.7 ± 3.8	9.0 ± 3.5	43.7 ± 10.3
		1600	11.3 ± 1.5	128.7 ± 11.0	9.0 ± 3.0	NC [a]	18.7 ± 5.1
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
	B[a]P	10	266.0 ± 57.4				
	AAN	5		3427.7 ± 74.2	342.0 ± 78.9	160.3 ± 3.5	
	AAN	15					171.3 ± 12.7

Abbreviations: AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to lack of background lawn; SD: standard deviation.

a Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 E - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN862) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities			**Test Article: PRN862**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 2 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**
			TA100
Without S9 Activation	DMSO	0	105.4 ± 10.2
	PRN862	200	134.3 ± 2.3
		400	132.3 ± 11.6
		600	123.7 ± 4.7
		800	121.7 ± 14.4
		1000	109.3 ± 9.3 *a*
		1200	70.7 ± 7.5 *a*
		1400	97.0 ± NC *a*
	NaN_3	2	1052.0 ± 59.3
With S9 Activation	DMSO	0	138.4 ± 9.2
	PRN862	400	136.3 ± 12.9
		600	128.3 ± 4.7
		800	162.3 ± 23.6
		1000	145.3 ± 20.6
		1200	115.7 ± 6.5
		1400	67.0 ± 9.6 *a*
		1600	NC
	AAN	5	3316.7 ± 578.6

Abbreviations: AAN: 2-aminoanthracene; DMSO: dimethyl sulfoxide; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to lack of background lawn; SD: standard deviation.

a Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 F - Other toxicity studies - Impurities - Lymphocyte assay (PRN862)

L5178Y gene mutation assay - Study of impurities				**Test Article: PRN862**	
Test for Induction of: Forward mutation at hprt locus			**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[LYM0377]
Test System: Mouse lymphoma cells			**No. of Replicate Cultures**: 2	**Location:**	4.2.3.7.6-12
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9			**No. of Cells Analyzed/Culture**: 1 x 10^7 cells	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO			**Vehicle for Positive Controls**: DMSO		
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)				**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None					
Genotoxic Effects: None					
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay, 3 H Treatment**		
			%RS	**MF (Day 7)**	
Without S9 Activation	DMSO	0	100.00	2.19	
	PRN862	20	137.22	4.18	
		40	122.53	3.31	
		60	111.27	3.46	
		80	109.10	4.19	
		100	113.55	3.89	
		120	111.97	3.71	
		140	81.78	3.31	
		160	17.98	1.27	
	NQO	0.15	87.73	20.51	
	NQO	0.2	68.46	31.41	

Abbreviations: 6TG: 6-thioguanine; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; hprt: hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase; MF: mutant frequency (6TG resistant mutants/10^6 viable cells 7 days after treatment); NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; RS: percent relative survival adjusted by post treatment cell counts.

表 2.6.7.17 F - Other toxicity studies - Impurities - Lymphocyte assay (PRN862) (Continued)

L5178Y gene mutation assay - Study of impurities				**Test Article: PRN862**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay, 3 H Treatment**	
			%RS	**MF (Day 7)**
With S9 Activation	DMSO	0	100.00	4.47
	PRN862	20	114.86	2.02
		40	113.53	2.96
		80	107.95	9.23
		100	101.92	1.93
		120	84.97	2.71
		140	68.08	2.68
		160	35.22	3.10
		180	4.56	2.42
	B[a]P	4	76.64	12.35
	B[a]P	6	56.47	15.14

Abbreviations: 6TG: 6-thioguanine; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; MF: mutant frequency (6TG resistant mutants/10^6 viable cells 7 days after treatment); %RS: percent relative survival adjusted by post treatment cell counts.

表 2.6.7.17 G - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN835-EDCI adduct; PRN3220)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN835-EDCI adduct; PRN3220**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)			**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[DVR0522]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA			**No. of Replicate Cultures**: 3		**Location:**	4.2.3.7.6-9
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9			**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA		**GLP Compliance:**	No [a]
Vehicle for Test Article: DMSO			**Vehicle for Positive Controls**: DMSO			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)					**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: Observed at ≥500 µg/plate without S9 and ≥1000 µg/plate with S9 for 1 or more bacterial strains for PRN835-EDCI; None for PRN3220						
Genotoxic Effects: None						
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [b]			
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	31 ± 6	229 ± 17	9 ± 2	13 ± 4	25 ± 3
	PRN835-EDCI adduct	20	26 ± 8	222 ± 23	11 ± 4	16 ± 6	
		50	37 ± 6	228 ± 13	12 ± 3	21 ± 6	
		100	38 ± 7	193 ± 14	9 ± 3	19 ± 5	
		200	56 ± 13	214 ± 12	6 ± 1	19 ± 4	33 ± 7
		500	59 ± 5	107 ± 1 [c]	8 ± 4 [c]	12 ± 5 [c]	29 ± 2
		1000	37 ± 4 [c]	29 ± 8 [c]	3 ± 2 [c]	NC	21 ± 3
		2000					31 ± 6 [c]
		5000					7 ± 3 [c]

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; SD: standard deviation.

a Although GLP compliance is claimed by the laboratory, the study was not performed in compliance with international GLP regulations and is considered exploratory.

b Mean and Standard Deviation values are rounded to the nearest integer here but are presented to 2 decimal places in the study report.

c Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 G - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN835-EDCI adduct; PRN3220) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN835-EDCI adduct; PRN3220**		
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [a]				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	2NF	10	1178 ± 241				
	NaN_3	1.2		945 ± 111	443 ± 21		
	ICR-191	1				139 ± 32	
	N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	5					343 ± 52
With S9 Activation	DMSO	0	36 ± 5	133 ± 9	7 ± 1	17 ± 3	39 ± 11
	PRN835-EDCI adduct	20	34 ± 2	136 ± 16	10 ± 5	8 ± 3	
		50	33 ± 8	139 ± 4	15 ± 6	12 ± 5	
		100	40 ± 12	127 ± 9	10 ± 3	9 ± 3	
		200	37 ± 9	139 ± 14	12 ± 4	12 ± 2	40 ± 1
		500	54 ± 7	115 ± 9	8 ± 4	14 ± 6	25 ± 2
		1000	37 ± 7 [b]	69 ± 16 [b]	13 ± 4 [b]	7 ± 4 [b]	24 ± 3
		2000					22 ± 4
		5000					19 ± 3 [b]
	2AA	3	2467 ± 221	1997 ± 369	280 ± 58	208 ± 43	
	2AA	20					395 ± 25

Abbreviations: 2AA: 2-aminoanthracene; 2NF: 2-nitrofluorene; DMSO: dimethyl sulfoxide; ICR-191: CAS Registry number 17070-45-0; NaN_3: sodium azide; SD: standard deviation.

a Mean and Standard Deviation values are rounded to the nearest integer here but are presented to 2 decimal places in the study report.

b Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 G - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN835-EDCI adduct; PRN3220) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN835-EDCI adduct; PRN3220**		
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)** [a]				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	29 ± 5	169 ± 10	15 ± 2	15 ± 1	33 ± 9
	PRN3220	200	27 ± 4	143 ± 6	13 ± 1	12 ± 1	46 ± 3
		500	27 ± 5	141 ± 13	10 ± 3	11 ± 1	58 ± 2
		1000	25 ± 5 [b]	145 ± 10 [b]	12 ± 0 [b]	12 ± 1 [b]	53 ± 9 [b]
		2000	18 ± 1 [b]	146 ± 7 [b]	11 ± 1 [b]	12 ± 4 [b]	43 ± 3 [b]
		5000	15 ± 2 [b]	102 ± 14 [b]	8 ± 3 [b]	6 ± 1 [b]	44 ± 4 [b]
	2NF	10	1227 ± 96				
	NaN_3	1.2		695 ± 189	138 ± 21		
	ICR-191	1				123 ± 8	
	N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	5					817 ± 119
With S9 Activation	DMSO	0	41 ± 5	154 ± 18	14 ± 5	18 ± 1	40 ± 4
	PRN3220	200	33 ± 7	172 ± 15	17 ± 3	15 ± 4	45 ± 9
		500	41 ± 4	165 ± 15	14 ± 1	19 ± 3	53 ± 7
		1000	33 ± 6 [b]	159 ± 17 [b]	14 ± 1 [b]	21 ± 3 [b]	56 ± 14 [b]
		2000	29 ± 4 [b]	161 ± 2 [b]	12 ± 4 [b]	17 ± 4 [b]	55 ± 13 [b]
		5000	19 ± 5 [b]	138 ± 45 [b]	11 ± 3 [b]	12 ± 5 [b]	48 ± 6 [b]
	2AA	3	2238 ± 462	787 ± 165	78 ± 14	83 ± 17	
	2AA	20					262 ± 43

Abbreviations: 2AA: 2-aminoanthracene; 2NF: 2-nitrofluorene; DMSO: dimethyl sulfoxide; ICR-191: CAS Registry number 17070-45-0; NaN_3: sodium azide; SD: standard deviation.

a Mean and Standard Deviation values are rounded to the nearest integer here but are presented to 2 decimal places in the study report.

b Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 H - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3232)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities		**Test Article: PRN3232**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)	**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[HIS2473]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2 uvrA)	**No. of Replicate Cultures**: 3	**Location:**	4.2.3.7.6-22
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO	**Vehicle for Positive Controls**: DMSO, water for sodium azide		
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)		**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None			
Genotoxic Effects: None			

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	23.6 ± 7.9	143.8 ± 6.9	8.0 ± 2.7	10.2 ± 4.0	20.4 ± 7.9
	PRN3232	5	17.0 ± 7.8	157.3 ± 14.0	12.7 ± 4.0	8.0 ± 0.0	26.3 ± 7.1
		16	19.7 ± 9.9	151.3 ± 23.3	13.3 ± 5.1	12.7 ± 2.5	23.3 ± 3.2
		50	22.7 ± 3.2	160.0 ± 12.5	8.3 ± 2.1	8.0 ± 4.6	25.3 ± 0.6
		160	20.7 ± 4.0	148.3 ± 10.8	9.7 ± 4.2	7.3 ± 3.2	22.3 ± 5.5
		500	21.0 ± 1.7	153.0 ± 15.6	10.0 ± 4.4	9.7 ± 3.1	23.0 ± 8.9
		1600	25.3 ± 6.0 [a]	139.7 ± 11.8 [a]	9.0 ± 2.6 [a]	4.0 ± 1.0 [a]	24.7 ± 6.4 [a]
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
	2NF	5	1071.3 ± 131.0				
	NaN_3	2		894.3 ± 64.1	852.7 ± 2.1		
	AAC	50				236.7 ± 80.3	
	NQO	2					410.3 ± 18.6

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to lack of background lawn; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 H - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3232) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities						**Test Article: PRN3232**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
With S9 Activation	DMSO	0	31.6 ± 6.9	172.0 ± 31.4	15.2 ± 1.9	23.8 ± 1.8	32.4 ± 12.3
	PRN3232	5	36.3 ± 9.5	182.7 ± 38.9	15.0 ± 2.6	17.0 ± 1.0	31.7 ± 10.8
		16	36.7 ± 11.5	170.3 ± 13.6	13.0 ± 5.0	20.0 ± 1.7	27.0 ± 3.6
		50	37.3 ± 9.3	190.0 ± 18.7	16.7 ± 4.0	19.7 ± 4.0	23.7 ± 1.5
		160	36.7 ± 1.5	185.3 ± 9.3	16.7 ± 1.2	21.3 ± 2.5	30.0 ± 9.2
		500	39.0 ± 1.0	183.7 ± 12.6	14.7 ± 4.0	15.3 ± 0.6	32.7 ± 6.1
		1600	33.0 ± 7.0 *a*	154.7 ± 29.0 *a*	13.7 ± 2.5 *a*	13.0 ± 3.0 *a*	28.7 ± 9.0 *a*
		5000	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*
	B[a]P	10	453.0 ± 21.3				
	AAN	5		2259.3 ± 123.9	277.7 ± 24.7	288.3 ± 41.2	
	AAN	15					118.7 ± 34.0

Abbreviations: AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to lack of background lawn; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 I - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN3232)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities					**Test Article: PRN3232**
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei and DNA damage in the duodenum and liver		**Treatment**: 3 administrations at 0, 24, and 45 h		**Study No.:**	[COM0057]
Species/Strain: Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)		**Sampling Time**: 48 h (Day 3)		**Location:**	4.2.3.7.6-25
Age: 7 to 8 weeks		**Method of Administration**: Oral gavage		**GLP Compliance:**	Yes
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000 PCE; 150 Comets		**Vehicle/Formulation**: Citric acid anhydrous 99% (0.5 mol eq) in purified water		**Date of Treatment:**	[redacted] 20[redacted]
Toxic/Cytotoxic Effects: None. Systemic exposure was confirmed via plasma bioanalysis					
Genotoxic Effects: None					
Summary of Micronucleus Data					
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals**	**Mean % PCE**	**Mean % Micronucleated PCE (±SD)**
PCE	Vehicle	0	6 M	42.47	0.10 ± 0.05
	PRN3232	500	6 M	43.03	0.13 ± 0.06
		1000	6 M	47.30	0.13 ± 0.03
		2000	6 M	42.30	0.07 ± 0.03
	EMS	150	3 M	37.40	0.91 ± 0.29*

Abbreviations: DNA: Deoxyribonucleic acid; EMS: ethyl methanesulfonate; GLP: good laboratory practice; M: male; PCE: polychromatic erythrocytes; SD: standard deviation; WI(Han): Wistar Hannover.

* P≤0.05.

表 2.6.7.17 I - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN3232) (Continued)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities					**Test Article: PRN3232**
Summary of Comet Data					
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals**	**Tail Intensity (±SEM)**	**Mean % Hedgehogs**
Duodenum	Vehicle	0	6 M	0.41 ± 0.16	9.95
	PRN3232	500	6 M	0.56 ± 0.35	7.98
		1000	6 M	0.29 ± 0.11	6.45
		2000	6 M	0.55 ± 0.22	8.27
	EMS	150	3 M	11.69*** ± 0.91	5.33
Liver	Vehicle	0	6 M	0.18 ± 0.07	1.38
	PRN3232	500	6 M	0.09 ± 0.02	1.06
		1000	6 M	0.10 ± 0.03	0.41
		2000	6 M	0.20 ± 0.06	0.93
	EMS	150	3 M	32.17*** ± 5.86	1.58

Abbreviations: EMS: ethyl methanesulfonate; M: male; SEM: standard error of mean.
*** P≤0.001.

表 2.6.7.17 J - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN3232)

Repeat-Dose Toxicity		**Non-Pivotal Studies**			**Test Article: PRN3232**	
Species / Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Wistar Han IGS	Oral Gavage (Citric Acid in water)	3 days	0 500 1000 2000	3/sex/group	No PRN3232-related clinical observations. Decreases in bodyweight gain or body weight loss was observed at ≥500 mg/kg/day and associated with decrease in food consumption in males and females. The effects on body weight and food consumption were dose-dependent in males. Hematology changes included decrease in RET at ≥500 mg/kg/day in males and females, and increase in RBC, hemoglobin, and hematocrit (associated with decreased MCV and RDW) in males at ≥2000 mg/kg/day and in females at ≥1000 mg/kg/day. Microscopic changes were observed in the liver and stomach at ≥1000 mg/kg/day in males and females and included periportal hepatocellular vacuolation in the liver (correlated with increases in liver weight and lobular pattern) and ulcers, acute inflammation, epithelial hyperplasia and/or hyperkeratosis in the non-glandular region; focal/multifocal erosion/ulcers and/or atrophy of the mucosa in the glandular region of the stomach. The dose of 500 mg/kg/day was well-tolerated and corresponded to a C_{max} of 2740 and 5270 ng/mL and AUC_{last} values of 28200 and 61800 ng•h/mL in males and females, respectively, on Day 3.	[TXP0589]

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; IGS: International Genetic Standardization; MCV: mean corpuscular volume; RBC: red blood cell; RDW: red cell distribution width; RET: reticulocytes.

表 2.6.7.17 K - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3232)

Micronucleus assay - Study of impurities			**Test Article: PRN3232**	
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[MNV1652]
Test System: Human lymphocytes		**No. of Replicate Cultures**: 2	**Location:**	4.2.3.7.6-23
Metabolizing System: β-Naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Concentration**: 2000	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO		**Vehicle for Positive Controls**: DMSO (CPA and NOS) or purified water (VIN and MMC)		
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by PHA			**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: 3 + 21 h treatment without S9 activation at 10, 25, and 39 µg/mL (13%, 23%, and 46% cytotoxicity, respectively); 24 + 24 h treatment without S9 activation at 10, 15, and 20 µg/mL (12%, 25%, and 50% cytotoxicity, respectively)				
Genotoxic Effects: 24 + 24 h treatment without S9 activation at 10, 15, and 20 µg/mL				

Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay**	
			Cytotoxicity (%) Based on RI	**Mean MN Cell Frequency (%)**
3 + 21 h without S9 activation	DMSO	0	-	0.68
	PRN3232	10	10	0.73
		25	23	0.70
		39	46	0.78
	MMC	0.30	17	9.78***
3 + 21 h with S9 activation	DMSO	0	-	0.60
	PRN3232	10	13	0.75
		25	30	0.55
		33	44	0.80
	CPA	5	61	2.80***

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; NOS: noscapine; PHA: phytohaemagglutinin; RI: replication index; VIN: vinblastine.

-: not applicable; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 K - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3232) (Continued)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3232**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay**	
			Cytotoxicity (%) Based on RI	**Mean MN Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	DMSO	0	-	0.70
	PRN3232	10	11	0.40
		15	34	0.55
		24	54	0.45
	NOS	20	20	3.80***
24 + 24 h without S9 activation	DMSO	0	-	0.65
	PRN3232	5	3	0.65
		10	12	1.10**
		15	25	1.10**
		20	50	1.35***
	VIN	0.04	37	5.08***

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; MN: micronucleated; NOS: noscapine; RI: replication index; VIN: vinblastine.
-: not applicable; ** P≤0.01; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 L - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN835.2HCl)

Bacterial Reverse Mutation Assay - Study of Impurities					**Test Article: PRN835.2HCl**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)			**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[HIS2472]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2 uvrA)			**No. of Replicate Cultures**: 3		**Location:**	4.2.3.7.6-5
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9			**No. of Cells Analyzed/Culture**: not applicable (manual count of revertants)		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: purified water			**Vehicle for Positive Controls**: DMSO (2NF, AAC, AAN, and B[a]P) and purified water (NaN_3 and MMC)			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)					**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: 500, 1600, and/or 5000 µg/plate with or without S9 activation						
Genotoxic Effects: None						
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	Purified Water	0	23.8 ± 7.4	155.2 ± 13.8	14.6 ± 5.7	9.8 ± 5.5	24.2 ± 3.4
	PRN835.2HCl	5	20.0 ± 2.6	233.3 ± 53.5	14.0 ± 2.6	10.3 ± 2.5	26.0 ± 3.0
		16	21.0 ± 3.0	161.0 ± 13.5	11.7 ± 1.5	10.3 ± 6.5	26.3 ± 2.1
		50	18.7 ± 3.2	176.3 ± 32.8	9.0 ± 4.0	12.0 ± 3.0	20.7 ± 2.9
		160	20.7 ± 7.5	136.0 ± 4.4	9.7 ± 4.6	14.3 ± 5.7	18.7 ± 2.5
		500	16.0 ± 2.6	119.0 ± 2.6	11.0 ± 4.4	11.0 ± 2.0	16.0 ± 3.6
		1600	3.3 ± 0.6	NC [a]	NC [a]	NC [a]	4.7 ± 5.5
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated as individual plates could not be counted to lack of background lawn; SD: standard deviation.

a Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 L - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN835.2HCl) (Continued)

Bacterial Reverse Mutation Assay - Study of Impurities						**Test Article: PRN835.2HCl**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	2NF	5	1256.7 ± 133.4				
	NaN_3	2		1196.3 ± 100.3	843.3 ± 24.4		
	AAC	50				412.3 ± 34.5	
	NQO	2					503.0 ± 6.1
With S9 Activation	Purified Water	0	35.2 ± 5.4	173.8 ± 3.3	16.0 ± 2.9	21.4 ± 4.6	31.4 ± 4.9
	PRN835.2HCl	5	26.7 ± 9.7	220.3 ± 24.0	11.7 ± 3.8	22.7 ± 5.5	36.3 ± 7.6
		16	46.3 ± 9.3	195.7 ± 9.7	18.3 ± 4.9	19.0 ± 4.0	29.0 ± 2.6
		50	43.0 ± 1.0	204.0 ± 15.4	17.3 ± 4.5	22.3 ± 5.7	33.0 ± 5.3
		160	32.7 ± 2.3	184.0 ± 19.5	12.0 ± 3.0	20.3 ± 4.9	30.3 ± 4.2
		500	29.7 ± 1.5	166.7 ± 18.1	7.3 ± 4.0	7.0 ± 1.7	31.7 ± 6.5
		1600	8.3 ± 3.5	NC *a*	NC *a*	NC *a*	3.3 ± 1.2
		5000	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*
	B[a]P	10	319.0 ± 27.4				
	AAN	5		3854.0 ± 511.2	236.0 ± 13.9	261.7 ± 18.8	
	AAN	15					123.7 ± 9.6

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated as individual plates could not be counted to lack of background lawn; SD: standard deviation.

a Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 M - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN835.2HCl)

Micronucleus assay - Study of Impurities			**Test Article: PRN835.2HCl**	
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[MNV1651]
Test System: Human lymphocytes		**No. of Replicate Cultures**: 2	**Location:**	4.2.3.7.6-6
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: Approximately 500 cells/culture	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Purified water		**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (VIN and MMC) and DMSO (CPA and NOS)		
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by PHA			**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: 24 + 24 h without S9 activation at 5, 10, 14, and 18 µg/mL				
Genotoxic Effects: 24 + 24 h without S9 activation at 5, 10, 14, and 18 µg/mL				

Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
3 + 21 h without S9 activation	Purified water	0	-	0.43
	PRN835.2HCl	20	0	0.45
		40	4	0.15
		60	43	0.40
	MMC	0.30	26	4.50***
3 + 21 h with S9 activation	Purified water	0	-	0.25
	PRN835.2HCl	20	14	0.30
		60	20	0.30
		70	32	0.45
		75	46	0.30
	CPA	3.00	46	2.00***

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; NOS: noscapine; PHA: phytohaemagglutinin; RI: replication index; VIN: vinblastine.

-: not applicable; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 M - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN835.2HCl) (Continued)

Micronucleus assay - Study of Impurities				**Test Article: PRN835.2HCl**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	Purified water	0	-	0.20
	PRN835.2HCl	5	13	0.45
		10	27	0.40
		14	43	0.40
		18	50	0.30
	NOS	30	41	4.40***
24 + 24 h without S9 activation	Purified water	0	-	0.45
	PRN835.2HCl	2.5	5	0.55
		5	15	1.80***
		10	30	3.65***
		14	43	3.55***
		18	49	3.45***
	VIN	0.04	48	4.30***

Abbreviations: MN: micronucleated; NOS: noscapine; RI: replication index; VIN: vinblastine.
-: not applicable; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher’s exact test.

表 2.6.7.17 N - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN835.2HCl)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities				**Test Article: PRN835.2HCl**	
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei and DNA damage in the duodenum and liver		**Treatment**: 3 administrations at 0, 24, and 45 h		**Study No.:**	[COM0056]
Species/Strain: Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)		**Sampling Time**: 48 h (Day 3)		**Location:**	4.2.3.7.6-8
Age: 7 to 8 weeks		**Method of Administration**: Oral gavage		**GLP Compliance:**	Yes
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000 PCE; 150 Comets		**Vehicle/Formulation**: Purified water		**Date of Treatment:**	[redacted]20[redacted]
Toxic/Cytotoxic Effects: Mortality occurred at 600 and 800 mg/kg/day. Mouth rubbing was observed at ≥600 mg/kg/day and salivation, labored respiration, and/or twitching was observed at 600 mg/kg/day. Other clinical signs included piloerection and decreased bodyweight at all dose levels.					
Genotoxic Effects: None					
Summary of Micronucleus Data					
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals**	**% PCE (±SD)**	**% Micronucleated PCE (±SD)**
PCE	Vehicle	0	6 M	41.10 ± 4.96	0.24 ± 0.11
	PRN835.2HCl	100	6 M	36.73 ± 8.19	0.32* ± 0.05
		200	6 M	36.37 ± 5.30	0.22 ± 0.08
		400	6 M	38.20 ± 7.40	0.31* ± 0.08
	EMS	150	3 M	46.87 ± 2.05	3.09* ± 1.45

Abbreviations: EMS: ethyl methanesulfonate; GLP: good laboratory practice; M: male; PCE: polychromatic erythrocytes; SD: standard deviation; WI(Han): Wistar Hannover.
* P≤0.05.

表 2.6.7.17 N - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN835.2HCl) (Continued)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities				**Test Article: PRN835.2HCl**	
Summary of Comet Data					
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals**	**Tail Intensity (±SEM)**	**Mean % Hedgehogs**
Duodenum	Vehicle	0	6 M	0.35 ± 0.10	12.50
	PRN835.2HCl	100	6 M	0.29 ± 0.08	9.50
		200	6 M	0.65 ± 0.32	8.56
		400	6 M	0.32 ± 0.08	7.61
	EMS	150	3 M	14.86*** ± 2.32	8.12
Liver	Vehicle	0	6 M	2.64 ± 1.15	0.81
	PRN835.2HCl	100	6 M	1.64 ± 0.57	1.62
		200	6 M	1.83 ± 0.42	1.54
		400	6 M	2.35 ± 0.59	1.57
	EMS	150	3 M	43.00** ± 11.71	3.42

Abbreviations: EMS: ethyl methanesulfonate; M: male; SEM: standard error of mean.
** P≤0.01; *** P≤0.001.

表 2.6.7.17 O - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN835.2HCl)

Repeat-Dose Toxicity		**Non-Pivotal Studies**				**Test Article: PRN835.2HCl**	
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**MTD (mg/kg/day)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Wistar Han IGS	Oral gavage (Purified water)	3 days	0 100 250 500	3/sex/group	100	Severe clinical signs with decreased body weight and food consumption, leading to early euthanasia or death was observed at ≥250 mg/kg/day in males and females. Hematology changes included increase in RBC and RBC parameters associated with a decrease in RET. Microscopic changes were observed in the liver and gastrointestinal tract and included necrosis/infiltrate and increased cellularity in sinusoids and erosions/ulcer and or mucosal atrophy in stomach and duodenum. Decrease in bodyweight was observed at 100 mg/kg/day and was associated with decrease in food consumption. Hematology changes (decrease in reticulocytes) and microscopic findings in the liver were also observed at 100 mg/kg/day. The MTD was 100 mg/kg/day and corresponded to a C_{max} of 2250 and 2660 ng/mL, and AUC_{0-24} of 48900 and 54300 ng•h/mL in males and females, respectively, on Day 3.	[TXP0586]

Abbreviations: AUC_{0-24}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to 24 h; C_{max}: maximum concentration; IGS: International Genetic Standardization; MTD: maximum tolerated dose; RBC: red blood cell; RET: reticulocytes.

表 2.6.7.17 P - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN1418)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities			**Test Article: PRN1418**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)		**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[HIS2456]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2 uvrA)		**No. of Replicate Cultures**: 3	**Location:**	4.2.3.7.6-15
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO		**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (NaN_3) and DMSO (2NF, NQO, AAC, AAN, and B[a]P)		
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)			**Date of Treatment**: [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: TA1537 at ≥1600 µg/plate without and with S9 activation and TA1535 at ≥1600 µg/plate with S9 activation				
Genotoxic Effects: None				

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	17.8 ± 3.0	119.4 ± 11.1	18.6 ± 7.1	11.0 ± 2.5	24.2 ± 7.0
	PRN1418	5	16.0 ± 6.6	122.0 ± 4.4	15.0 ± 1.7	9.3 ± 1.5	24.0 ± 5.3
		16	20.0 ± 5.0	114.0 ± 27.9	16.3 ± 3.1	11.0 ± 1.7	19.7 ± 4.7
		50	14.7 ± 5.1	110.0 ± 13.1	16.0 ± 3.6	9.3 ± 3.2	43.7 ± 14.4
		160	19.0 ± 1.7	125.0 ± 18.0	12.7 ± 2.1	10.0 ± 2.0	22.3 ± 2.5
		500	18.0 ± 2.6	111.0 ± 13.1	14.0 ± 3.6	9.3 ± 3.8	23.0 ± 4.6
		1600	19.7 ± 2.1 *a*	127.3 ± 10.3 *a*	15.3 ± 8.1 *a*	6.3 ± 0.6 *a,b*	18.3 ± 4.0 *a*
		5000	16.3 ± 5.5 *a*	136.3 ± 8.1 *a*	16.0 ± 4.4 *a*	3.3 ± 1.2 *a,b*	16.3 ± 5.1 *a*
	2NF	5	789.7 ± 61.3				

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 9-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; NA: not applicable; NaN_3: sodium azide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

b Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 P - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN1418) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities						**Test Article: PRN1418**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	NaN_3	2		910.0 ± 49.1	767.3 ± 101.1		
	AAC	50				266.3 ± 67.9	
	NQO	2					441.7 ± 37.2
With S9 Activation	DMSO	0	28.4 ± 3.2	148.8 ± 27.5	22.6 ± 4.3	20.6 ± 6.0	25.8 ± 12.8
	PRN1418	5	45.0 ± 7.2	130.7 ± 9.1	15.7 ± 6.4	19.0 ± 8.0	30.0 ± 3.5
		16	37.3 ± 5.1	133.7 ± 8.6	23.7 ± 4.0	12.3 ± 3.2	27.7 ± 3.8
		50	45.3 ± 6.4	138.0 ± 11.3	19.7 ± 4.7	16.3 ± 4.0	26.3 ± 11.1
		160	39.7 ± 3.8	145.7 ± 5.0	24.0 ± 5.0	23.3 ± 4.2	32.3 ± 7.5
		500	48.0 ± 8.7	139.0 ± 21.2	15.0 ± 2.0	20.7 ± 4.0	28.7 ± 9.6
		1600	40.0 ± 8.5 *a*	165.3 ± 15.6 *a*	11.3 ± 3.5 *a,b*	8.0 ± 5.3 *a,b*	20.7 ± 2.5 *a*
		5000	NC *a*	174.3 ± 14.5 *a*	11.3 ± 4.2 *a,b*	8.0 ± 1.0 *a,b*	19.3 ± 4.0 *a*
	B[a]P	10	270.3 ± 36.7				
	AAN	5		1965.0 ± 431.8	171.3 ± 128.5	200.0 ± 30.4	
	AAN	15					153.7 ± 5.5

Abbreviations: AAC: 9-aminoacridine; AAN: 9-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; NaN_3: sodium azide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

b Cytotoxicity observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 Q - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN1418)

Micronucleus assay - Study of impurities			**Test Article: PRN1418**	
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays**: 2	**Study No.:**	[MNV1637]
Test system: Human lymphocytes		**No. of Replicate Cultures**: 2	**Location:**	4.2.3.7.6-16
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: Approximately 500 cells/culture	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO		**Vehicle for Positive Controls**: DMSO (CPA and NOS) and purified water (VIN and MMC)		
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by PHA			**Date of Treatment:** [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: 24 + 24 h without S9 activation at 20 and 22.5 µg/mL				
Genotoxic Effects: 24 + 24 h without S9 activation at 20 and 22.5 µg/mL				

Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay 1**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
3 + 21 h without S9 activation	DMSO	0	-	0.38
	PRN1418	20	9	0.30
		38	21	0.45
		46	38	0.40
	MMC	0.30	19	2.45***
3 + 21 h with S9 activation	DMSO	0	-	0.35
	PRN1418	30	5	0.50
		38	17	0.45
		46	24	0.50
		54	52	1.08***
	CPA	5	53	2.95***

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; NOS: noscapine; PHA: phytohaemagglutinin; RI: replication index; VIN: vinblastine.

-: not applicable; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 Q - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN1418) (Continued)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN1418**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay 1 (Continued)**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	DMSO	0	-	0.40
	PRN1418	10	7	0.65
		15	14	0.75
		22.5	33	0.15
		30	57	0.55
	NOS	30	29	6.85***
24 + 24 h without S9 activation	DMSO	0	-	0.38
	PRN1418	5	1	0.28
		10	17	0.50
		15	28	0.68*
		22.5	47	1.00***
	VIN	0.04	43	6.50***

Abbreviations: DMSO: dimethyl sulfoxide; MN: micronucleated; NOS: noscapine; RI: replication index; VIN: vinblastine.
-: not applicable; * P≤0.05; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 Q - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN1418) (Continued)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN1418**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay 2**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
3 + 21 h with S9 activation	DMSO	0	-	0.45
	PRN1418	10	11	0.55
		38	31	0.60
		46	41	0.30
		50	56	0.60
	CPA	3	47	1.05**
	CPA	5	60	1.45***
24 + 24 h without S9 activation	DMSO	0	-	0.28
	PRN1418	5	13	0.40
		15	25	0.55
		20	40	0.90**
		22.5	55	0.85**
	VIN	0.04	38	2.20***
	MMC	0.20	25	18.10***

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; RI: replication index; VIN: vinblastine.
-: not applicable; ** P≤0.01; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 R - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN1418)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities					**Test Article: PRN1418**	
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei and DNA damage in the duodenum and liver			**Treatment**: 3 administrations at 0, 24, and 45 h		**Study No.:**	[COM0051]
Species/Strain: Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)			**Sampling Time**: 1-2 h after third dose (Day 3)		**Location:**	4.2.3.7.6-18
Age: 6 to 9 weeks			**Method of Administration**: Oral gavage		**GLP Compliance:**	Yes
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000 PCE; 150 Comets		**Vehicle/Formulation**: Citric acid anhydrous (0.5 eq. w/v) in deionized water			**Date of Treatment:**	[redacted] 20[redacted]
Toxic/Cytotoxic Effects: None. Systemic exposure was confirmed via plasma bioanalysis						
Genotoxic Effects: None						
Summary of Micronucleus Data						
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals/Sex**	**Number of Micronucleated PCE (Mean ± SD)**		
				Males	**Females**	
PCE	Vehicle	0	5	6.4 ± 1.8	5.2 ± 2.2	
	PRN1418	125	5	2.0 ± 1.0	3.4 ± 1.1	
		250	5	3.4 ± 1.8	5.2 ± 2.0	
		500	5	3.0 ± 1.0	5.0 ± 1.6	
	CP	19	3	65.3*** ± 20.2	-	

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; PCE: polychromatic erythrocytes; SD: standard deviation; WI(Han): Wistar Hannover.
-: not applicable; *** P≤0.001.

表 2.6.7.17 R - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN1418) (Continued)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities					**Test Article: PRN1418**
Summary of Comet Data					
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals/Sex**	**Tail Intensity % (±SD)**	
				Males	**Females**
Duodenum	Vehicle	0	5	2.70 ± 1.26	6.72 ± 0.79
	PRN1418	125	5	2.17* ± 0.76	9.96 ± 3.56
		250	5	3.65 ± 2.70	7.20 ± 1.58
		500	5	3.81 ± 2.42	6.55 ± 0.87
	EMS	200	3	40.61*** ± 3.11	54.78*** ± 5.93
Liver	Vehicle	0	5	2.14 ± 0.61	3.25 ± 0.44
	PRN1418	125	5	1.17 ± 0.13	2.58 ± 0.63
		250	5	2.09 ± 0.83	2.95 ± 0.52
		500	5	1.58 ± 0.21	2.78 ± 0.59
	EMS	200	3	83.27*** ± 3.24	91.97*** ± 2.49

Abbreviations: EMS: ethyl methanesulfonate; SD: standard deviation.
-: not applicable; * P<0.05; *** P≤0.001.

表 2.6.7.17 S - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN1418)

Repeat-Dose Toxicity		**Non-Pivotal Studies**				**Test Article: PRN1418**	
Species / Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**MTD (mg/kg/day)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Wistar Han IGS	Oral gavage (Citric acid anhydrous [0.5 eq. w/v] in deionized water)	3 days	0 150 300 500 750 1000	3/sex/group	500	Mortality was observed at ≥750 mg/kg/day. One male and all females given 1000 mg/kg/day were euthanized after dosing on Day 3 due to marked compound-related clinical (decreased activity, prostration, increased respiratory rate, labored respiration, piloerection, and/or decreased body temperature). One male and one female at 750 mg/kg/day were found dead on Day 4 before necropsy; clinical signs noted on Day 3 included decreased activity for the female only. Dose-related bodyweight loss and decreased food consumption was noted at ≥500 mg/kg/day. Slight to marked clinical signs of health deterioration was noted at ≥750 mg/kg/day. Hematology changes were noted in males at ≥150 mg/kg/day and females at ≥300 mg/kg/day and included increased RBC and parameters (hemoglobin and hematocrit) and decreased MCV and RET. Microscopic changes were noted in males and females ≥300 mg/kg/day in the liver (adverse necrosis/infiltrate, single cell necrosis and increased cellularity in sinusoids), nonglandular region of the stomach (focal or multifocal erosion/ulcers, epithelial hyperplasia with hyperkeratosis) and/or glandular region of the stomach (increased mucus). The MTD was 500 mg/kg/day and corresponded to a C_{max} and AUC_{0-24} of 4040 ng/mL and 46700 ng•h/mL respectively in males and 8830 ng/mL and 98500 ng•h/mL respectively in females.	[TXP0552]

Abbreviations: AUC_{0-24}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to 24 h; C_{max}: maximum concentration; IGS: International Genetic Standardization; MCV: mean corpuscular volume; MTD: maximum tolerated dose; RBC: red blood cell; RET: reticulocytes; v: volume; w: weight.

表 2.6.7.17 T - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3222)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3222**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)		**No. of Independent Assays**: 2		**Study No.:**	[HIS2461]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2uvrA)		**No. of Replicate Cultures**: 3		**Location:**	4.2.3.7.6-20
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone		**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (NaN_3 and MMC) and DMSO (2NF, AAC, AAN, and B[a]P)			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)				**Date of Treatment**: [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None					
Genotoxic Effects: None					

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 1 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	Acetone	0	17.6 ± 6.7	128.8 ± 20.1	15.6 ± 6.4	16.0 ± 4.8	25.0 ± 3.3
	PRN3222	160	19.0 ± 4.0	147.3 ± 6.1	10.0 ± 5.6	17.0 ± 1.7	34.7 ± 10.8
		200	23.0 ± 6.6	149.7 ± 2.5	12.3 ± 1.2	19.7 ± 4.7	31.0 ± 7.5
		320	24.0 ± 2.6	147.7 ± 14.2	18.0 ± 0.0	21.3 ± 5.5	32.0 ± 9.8
		500	33.0 ± 5.6	161.3 ± 14.3	22.0 ± 3.6	20.7 ± 4.0	44.7 ± 8.0
		800	29.3 ± 10.0 [a]	161.3 ± 13.2 [a]	16.0 ± 3.6 [a]	23.0 ± 3.5 [a]	36.3 ± 16.7 [a]
		1600	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
		2000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
	2NF	5	1358.7 ± 81.5				
	NaN_3	2		1071.3 ± 53.5	720.0 ± 31.5		

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to precipitate observed; SD: standard deviation.

a Precipitate observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 T - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3222) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities							**Test Article: PRN3222**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 1 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	AAC	50				459.7 ± 129.0	
	NQO	2					444.7 ± 25.4
With S9 Activation	Acetone	0	32.2 ± 10.1	154.4 ± 23.6	12.0 ± 5.7	22.8 ± 8.9	35.0 ± 2.4
	PRN3222	160	30.7 ± 4.0	161.0 ± 8.2	9.0 ± 2.0	26.3 ± 5.5	34.3 ± 8.0
		200	38.3 ± 10.4	189.3 ± 63.5	11.0 ± 1.0	24.0 ± 6.0	35.0 ± 11.4
		320	36.0 ± 3.0	156.7 ± 9.0	13.7 ± 4.0	33.0 ± 5.3	46.0 ± 8.5
		500	40.7 ± 6.1	145.7 ± 2.3	18.7 ± 4.5	24.7 ± 3.1	38.3 ± 7.5
		800	39.0 ± 6.1 *a*	182.0 ± 12.1 *a*	11.3 ± 7.6 *a*	28.7 ± 6.4 *a*	38.7 ± 0.6 *a*
		1600	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*
		2000	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*
		5000	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*
	B[a]P	10	318.7 ± 55.2				
	AAN	5		2731.3 ± 67.4	297.0 ± 154.1	246.7 ± 27.5	
	AAN	15					140.3 ± 14.0

Abbreviations: AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; NC: not calculated as individual plates could not be counted due to precipitate observed; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.
a Precipitate observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 T - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3222) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3222**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 2 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**	
			TA98	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	Acetone	0	21.2 ± 3.5	17.8 ± 6.1
	PRN3222	200	22.0 ± 5.6	22.7 ± 2.1
		300	26.3 ± 1.2	22.7 ± 4.0
		400	25.0 ± 1.7	23.7 ± 2.5
		500	27.3 ± 6.7	20.3 ± 6.1
		600	38.7 ± 6.7 *a*	19.3 ± 2.1 *a*
		700	26.0 ± 3.5 *a*	21.7 ± 2.3 *a*
		800	23.0 ± 2.0 *a*	20.0 ± 4.4 *a*
		1200	18.0 ± 0.0 *a*	20.7 ± 2.3 *a*
		1600	22.3 ± 7.5 *a*	16.0 ± 0.0 *a*
	2NF	5	1372.7 ± 19.9	
	NQO	2		361.3 ± 8.3

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.
a Precipitate observed (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 U - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3222)

Micronucleus assay - Study of impurities		**Test Article: PRN3222**	
Test for Induction of: Micronuclei	**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[MNV1638]
Strains: Human lymphocytes	**No. of Replicate Cultures**: 2	**Location:**	4.2.3.7.6-21
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture**: approximately 500 cells/culture	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone	**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (VIN and MMC) and DMSO (CPA and NOS)		
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by PHA		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None			
Genotoxic Effects: None			

Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
3 + 21 h	Acetone	0	NA	0.35
without S9 activation	PRN3222	95	0 *a*	0.65
		105	2 *a*	0.40
		125	8 *a*	0.15
	MMC	0.30	24	6.15***
3 + 21 h	Acetone	0	NA	0.50
with S9 activation	PRN3222	95	0 *a*	0.60
		105	3 *a*	0.35
		125	0 *a*	0.45
	CPA	5	52	2.85***

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; NA: not applicable; NOS: noscapine; PHA: phytohaemagglutinin; RI: replication index; VIN: vinblastine.

a Precipitate present (see report for scoring method).

*** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 U - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3222) (Continued)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3222**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	Acetone	0	NA	0.70
	PRN3222	85	15 *a*	0.35
		95	20 *a*	0.55
		105	20 *a*	0.40
	NOS	30	26	4.00***
24 + 24 h without S9 activation	Acetone	0	NA	0.53
	PRN3222	85	26 *a*	0.25
		95	21 *a*	0.50
		105	24 *a*	0.25
	VIN	0.04	37	3.20***

Abbreviations: MN: micronucleated; NA: not applicable; NOS: noscapine; RI: replication index; VIN: vinblastine.
a Precipitate present (see report for scoring method).
*** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher’s exact test.

表 2.6.7.17 V - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN2960)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities			**Test Article: PRN2960**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)		**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[HIS2460]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2uvrA)		**No. of Replicate Cultures**: 3	**Location:**	4.2.3.7.6-19
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO		**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (NaN_3) and DMSO (2NF, NQO, AAC, AAN, and B[a]P)		
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)			**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None				
Genotoxic Effects: None				

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	11.8 ± 5.3	138.4 ± 7.4	8.6 ± 4.7	14.0 ± 5.3	22.6 ± 3.2
	PRN2960	5	12.0 ± 5.3	144.0 ± 8.7	9.3 ± 6.1	15.7 ± 2.5	29.0 ± 5.2
		16	18.0 ± 3.6	147.0 ± 8.2	10.7 ± 2.5	19.3 ± 1.5	28.3 ± 7.6
		50	10.3 ± 2.5	153.3 ± 7.8	9.3 ± 3.2	16.7 ± 4.9	34.7 ± 4.7
		160	12.3 ± 4.0	157.0 ± 8.5	13.7 ± 2.5	17.0 ± 7.0	40.7 ± 2.9
		500	9.7 ± 5.1	162.3 ± 9.9	10.7 ± 4.6	16.0 ± 6.1	33.0 ± 2.6
		1600	10.0 ± 3.5 [a]	134.0 ± 24.8 [a]	7.3 ± 0.6 [a]	17.3 ± 3.5 [a]	37.7 ± 12.3 [a]
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
	2NF	5	670.3 ± 29.3				
	NaN_3	2		706.7 ± 47.7	611.7 ± 16.8		
	AAC	50				257.7 ± 71.6	
	NQO	2					345.7 ± 25.0

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 V - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN2960) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities							**Test Article: PRN2960**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
With S9 Activation	DMSO	0	28.6 ± 7.1	169.0 ± 3.1	14.6 ± 6.2	26.2 ± 5.6	31.0 ± 1.9
	PRN2960	5	33.7 ± 9.3	177.3 ± 9.1	18.7 ± 2.5	30.7 ± 4.2	49.3 ± 6.1
		16	47.7 ± 14.5	170.0 ± 18.4	14.0 ± 6.6	28.0 ± 3.5	49.7 ± 3.1
		50	38.0 ± 8.2	182.3 ± 20.4	12.0 ± 3.6	36.3 ± 11.6	49.3 ± 1.5
		160	44.3 ± 2.5	176.0 ± 22.6	19.3 ± 2.3	29.7 ± 8.0	46.0 ± 11.0
		500	39.0 ± 7.8	177.7 ± 7.0	18.0 ± 7.5	30.3 ± 6.4	45.0 ± 7.0
		1600	24.7 ± 4.2	163.0 ± 3.0	17.3 ± 3.2	27.0 ± 4.4	43.0 ± 13.0
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
	B[a]P	10	212.3 ± 32.1				
	AAN	5		2168.3 ± 125.7	196.0 ± 207.9	85.0 ± 10.6	
	AAN	15					237.7 ± 25.3

Abbreviations: AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; NC: not calculated; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 W - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3612)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities		**Test Article: PRN3612**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)	**No. of Independent Assays**: 1	**Study No.:**	[HIS2454]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2uvrA)	**No. of Replicate Cultures**: 3	**Location:**	4.2.3.7.6-28
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9	**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone	**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (NaN_3) and DMSO (2NF, NQO, AAC, AAN, and B[a]P)		
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)		**Date of Treatment**: [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None			
Genotoxic Effects: None			

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	Acetone	0	22.6 ± 7.6	128.0 ± 5.7	17.2 ± 2.6	16.6 ± 0.9	21.6 ± 7.7
	Untreated	0	22.6 ± 7.7	116.6 ± 10.5	17.8 ± 3.6	11.8 ± 3.6	16.0 ± 6.9
	PRN3612	5	15.7 ± 5.1	126.0 ± 10.5	11.0 ± 4.6	17.0 ± 1.7	19.7 ± 3.2
		16	25.7 ± 7.2	139.0 ± 13.9	13.0 ± 4.0	20.0 ± 9.2	10.7 ± 2.1
		50	22.3 ± 5.1	123.0 ± 15.1	13.3 ± 2.5	22.7 ± 6.1	14.0 ± 4.4
		160	27.3 ± 2.5	135.0 ± 18.1	14.0 ± 3.5	17.7 ± 4.2	11.3 ± 8.7
		500	30.0 ± 3.0	134.3 ± 15.5	17.7 ± 4.2	16.3 ± 4.0	13.0 ± 4.4
		1600	25.7 ± 5.7 [a]	119.3 ± 8.5 [a]	12.0 ± 5.6 [a]	16.3 ± 2.5 [a]	16.3 ± 4.0 [a]
		5000	NR [a]	NR [a]	NR [a]	NR [a]	NR [a]
	2NF	5	712.3 ± 112.8				

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NA: not applicable; NaN_3: sodium azide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; NR: not reported as appropriate limit concentration achieved; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 W - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3612) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities							**Test Article: PRN3612**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	NaN_3	2		743.3 ± 26.7	580.7 ± 58.3		
	AAC	50				272.0 ± 14.7	
	NQO	2					377.0 ± 16.5
With S9 Activation	Acetone	0	34.4 ± 4.2	135.8 ± 11.2	18.4 ± 3.0	20.6 ± 5.5	19.2 ± 2.7
	Untreated	0	28.0 ± 4.6	144.4 ± 12.2	11.2 ± 5.3	25.6 ± 6.2	19.2 ± 0.8
	PRN3612	5	30.0 ± 3.6	128.7 ± 27.5	21.3 ± 0.6	23.0 ± 1.0	23.7 ± 3.5
		16	27.0 ± 4.4	134.0 ± 11.1	16.7 ± 0.6	24.7 ± 8.7	21.0 ± 1.0
		50	39.7 ± 7.4	157.7 ± 39.7	16.0 ± 6.2	25.7 ± 8.5	24.0 ± 5.3
		160	35.3 ± 5.0	148.0 ± 21.2	24.0 ± 1.0	31.3 ± 8.0	21.0 ± 1.7
		500	36.7 ± 10.1	129.3 ± 2.9	18.7 ± 5.9	27.3 ± 6.8	16.7 ± 4.0
		1600	37.7 ± 5.5 *a*	141.7 ± 12.5 *a*	17.0 ± 2.6 *a*	19.3 ± 6.1 *a*	15.7 ± 2.9 *a*
		5000	NR *a*	NR *a*	NR *a*	NR *a*	NR *a*
	B[a]P	10	312.0 ± 40.7				
	AAN	5		2113.7 ± 72.0	239.0 ± 68.5	268.3 ± 37.1	
	AAN	15					175.3 ± 22.5

Abbreviations: AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; NaN_3: sodium azide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; NR: not reported as appropriate limit concentration achieved; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 X - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3612)

Micronucleus assay - Study of Impurities			**Test Article: PRN3612**	
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays**: 2	**Study No.:**	[MNV1635]
Strains: human lymphocytes		**No. of Replicate Cultures**: 2	**Location:**	4.2.3.7.6-29
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: approximately 500 cells/culture	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone		**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (VIN and MMC) and DMSO (CPA and NOS)		
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by PHA			**Date of Treatment**: [redacted]20[redacted]	
Cytotoxic Effects: 3 + 21 h without S9 activation at >5.0 µg/mL; 3 + 21 h with S9 activation at >5.5 µg/mL; and 24 + 24 h without S9 activation at >1.0 µg/mL				
Genotoxic Effects: 3 + 21 h without S9 activation at >5.0 µg/mL; 3 + 21 h with S9 activation at >5.5 µg/mL; and 24 + 24 h without S9 activation at >1.0 µg/mL				

Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay 1**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
3 + 21 h without S9 activation	Acetone	0	-	0.48
	PRN3612	4.0	14	0.43
		5.0	30	0.65
		5.5	49	0.87*
	MMC	0.30	22	4.40***
3 + 21 h with S9 activation	Acetone	0	-	0.38
	PRN3612	5.5	6	0.58
		7.0	34	0.93**
		9.0	52	1.30***
	CPA	5.0	50	4.30***

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; NOS: noscapine; PHA: phytohaemagglutinin; RI: replication index; VIN: vinblastine.
-: not applicable; * P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 X - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3612) (Continued)

Micronucleus assay - Study of Impurities				**Test Article: PRN3612**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay 1**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	Acetone	0	-	0.30
	PRN3612	2.25	7	0.50
		3.0	26	0.40
		3.5	57	0.38
	NOS	30.0	40	1.95***
24 + 24 h without S9 activation	Acetone	0	-	0.58
	PRN3612	2.5	10	0.85
		3.0	23	1.15**
		3.5	57	0.85
	VIN	0.04	37	5.10***

Abbreviations: MN: micronucleated; NOS: noscapine; RI: replication index; VIN: vinblastine.
-: not applicable; ** P≤0.01; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 X - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3612) (Continued)

Micronucleus assay - Study of Impurities				**Test Article: PRN3612**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Mutagenicity Assay 2**	
			Cytotoxicity based on RI (%)	**Mean MN Cell Frequency (%)**
3 + 21 h	Acetone	0	-	0.63
without S9 activation	PRN3612	4.0	11	0.75
		5.5	27	1.25*
		6.5	49	1.30**
	MMC	0.30	19	3.45***
3 + 21 h	Acetone	0	-	0.63
with S9 activation	PRN3612	4.0	3	0.85
		8.0	20	0.95
		8.5	39	1.10*
		9.0	52	1.10*
	CPA	5.0	58	3.60***
24 + 24 h	Acetone	0	-	0.50
without S9 activation	PRN3612	1.0	3	0.20
		2.0	5	1.20**
		2.5	17	0.95*
		3.2	35	1.20**
		3.3	47	1.50***
		3.4	48	1.10**
	VIN	0.04	58	5.20***

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; RI: replication index; VIN: vinblastine.
-: not applicable; * P≤0.05; ** P≤0.01; *** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 Y - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN3612)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3612**	
Test for Induction of: Bone marrow micronuclei and DNA damage in the duodenum and liver			**Treatment**: 3 administrations at 0, 24, and 45 h	**Study No.:**	[COM0053]
Species/Strain: Rat/Wistar Han Crl:WI(Han)			**Sampling Time**: 3 h after third dose (Day 3)	**Location:**	4.2.3.7.6-31
Age: 8 to 9 weeks			**Method of Administration**: Oral gavage	**GLP Compliance:**	Yes
No. of Cells Analyzed/Animal: 4000 PCE; 150 Comets			**Vehicle/Formulation**: Citric acid anhydrous 99% (0.5 mol eq) in purified water	**Date of Treatment:**	[redacted]20[redacted]
Toxic/Cytotoxic Effects: None					
Genotoxic Effects: None					
Summary of Micronucleus Data					
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals**	**Number of Micronucleated PCE (Mean ± SD)**	
PCE	Vehicle	0	6 M	0.24 ± 0.13	
	PRN3612	500	6 M	0.23 ± 0.07	
		1000	6 M	0.19 ± 0.15	
		2000	6 M	0.12 ± 0.09	
	EMS	150	3 M	2.05* ± 1.11	

Abbreviations: EMS: ethyl methanesulfonate; GLP: good laboratory practice; M: male; PCE: polychromatic erythrocytes; SD: standard deviation; WI(Han): Wistar Hannover.
* P≤0.05.

表 2.6.7.17 Y - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus and alkaline comet assay (PRN3612) (Continued)

Micronucleus and alkaline comet assay - Study of impurities					**Test Article: PRN3612**
Summary of Comet Data					
Cells Evaluated	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**No. of Animals**	**Tail Intensity % (±SEM)**	**Mean % Hedgehogs**
Duodenum	Vehicle	0	6 M	0.44 ± 0.12	3.10
	PRN3612	500	6 M	0.70 ± 0.23	1.69
		1000	6 M	0.30 ± 0.08	3.26
		2000	6 M	0.96 ± 0.50	1.19
	EMS	150	3 M	16.57** ± 0.70	3.72
Liver	Vehicle	0	6 M	0.36 ± 0.15	4.33
	PRN3612	500	6 M	0.69 ± 0.18	4.64
		1000	6 M	0.29 ± 0.07	3.59
		2000	6 M	0.33 ± 0.06	3.88
	EMS	150	3 M	49.19*** ± 5.07	15.01

Abbreviations: EMS: ethyl methanesulfonate; M: male; SEM: standard error of mean.
** P≤0.01; *** P≤0.001.

表 2.6.7.17 Z - Other toxicity studies - Impurities - Exploratory 3-day toxicity (PRN3612)

Repeat-Dose Toxicity		Non-Pivotal Studies				Test Article: PRN3612	
Species/ Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**MTD (mg/kg/day)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat/Wistar Han	Oral Gavage (Citric acid anhydrous [0.5 eq. w/v] in water)	3 days	0 500 1000 2000	3/sex/group	2000	No PRN3612-related clinical observations or changes in bodyweight or food consumption. Hematology changes were observed in males at ≥500 mg/kg/day and consisted of decreases in reticulocytes, with decreases in MCV and MCH, and increases in RBC and MCHC. Microscopic changes were observed in the stomach at 2000 mg/kg/day in males and females and included edema, and inflammation in submucosa, epithelial hyperplasia, hyperkeratosis, focal ulcer. The MTD was 2000 mg/kg/day and corresponded to a C_{max} and AUC_{last} 444 ng/mL and 4200 ng•h/mL and 189 ng/mL and 1760 ng•h/mL in males and females, respectively, on Day 3.	[TXP0555]

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; MTD: maximum tolerated dose; RBC: red blood cell.

表 2.6.7.17 AA - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3590)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN3590**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)			**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[HIS2462]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2uvrA)			**No. of Replicate Cultures**: 2		**Location:**	4.2.3.7.6-26
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9			**No. of Cells Analyzed/Culture**: NA		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone			**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (NaN_3) and DMSO (2NF, NQO, AAC, AAN, and B[a]P)			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)					**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None						
Genotoxic Effects: None						
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**			
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	Acetone	0	37.2 ± 9.1	143.8 ± 21.6	24.0 ± 4.5	17.0 ± 5.7	37.4 ± 6.2
	PRN3590	5	18.7 ± 3.2	159.0 ± 11.0	30.0 ± 3.5	19.7 ± 9.3	43.3 ± 4.2
		16	20.0 ± 4.0	150.3 ± 9.1	21.7 ± 2.9	19.0 ± 1.7	37.3 ± 4.5
		50	24.3 ± 4.7	156.0 ± 7.0	26.0 ± 6.9	22.0 ± 6.2	35.7 ± 6.7
		160	23.0 ± 4.6	159.3 ± 5.0	23.7 ± 1.5	24.3 ± 6.7	45.0 ± 7.0
		500	16.7 ± 4.2 [a]	170.0 ± 2.6 [a]	22.3 ± 5.7 [a]	20.3 ± 7.0 [a]	37.3 ± 1.2 [a]
		1600	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
		5000	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]	NC [a]
	2NF	5	1388.3 ± 119.3				
	NaN_3	2		863.3 ± 26.5	657.3 ± 41.2		

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NaN_3: sodium azide; NC: not calculated; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 AA - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3590) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities						**Test Article: PRN3590**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	AAC	50				270.3 ± 27.4	
	NQO	2					542.0 ± 84.4
With S9 Activation	Acetone	0	33.8 ± 4.4	156.6 ± 28.2	18.4 ± 4.8	26.0 ± 1.4	36.6 ± 7.1
	PRN3590	5	35.0 ± 2.6	190.0 ± 4.6	16.7 ± 8.1	28.7 ± 2.1	40.0 ± 4.0
		16	39.0 ± 7.9	177.0 ± 5.3	14.3 ± 5.9	22.7 ± 0.6	29.0 ± 7.9
		50	47.0 ± 1.0	180.7 ± 14.0	12.0 ± 2.6	30.7 ± 5.7	38.3 ± 1.5
		160	32.3 ± 1.5	178.3 ± 11.5	14.0 ± 2.6	27.3 ± 6.8	30.0 ± 4.4
		500	42.0 ± 2.0 *a*	176.3 ± 12.1 *a*	20.7 ± 4.9 *a*	24.0 ± 4.4 *a*	47.0 ± 3.6 *a*
		1600	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*
		5000	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*	NC *a*
	B[a]P	10	196.0 ± 25.1				
	AAN	5		2147.7 ± 181.7	128.7 ± 1.5	205.3 ± 12.1	
	AAN	15					170.0 ± 16.1

Abbreviations: AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; NC: not calculated; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Precipitate present (see report for scoring method).

表 2.6.7.17 AB - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3590)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3590**	
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[MNV1639]
Test System: Human lymphocytes		**No. of Replicate Cultures**: 2		**Location:**	4.2.3.7.6-27
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Concentration**: 2000		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone		**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (VIN and MMC) and DMSO (CPA and NOS)			
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by PHA				**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: 3 + 21 h without S9 activation at ≥80 µg/mL; 3 + 21 h with S9 activation at ≥80 µg/mL; 24 + 0 h without S9 activation at ≥40 µg/mL; and 24 + 24 h without S9 activation at ≥40 µg/mL					
Genotoxic Effects: None					
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Cytotoxicity based on RI (%)**	**Mean MN Cell Frequency (%)**	
3 + 21 h	Acetone	0	NA	0.45	
without S9 activation	PRN3590	20	5	0.40	
		40	14	0.40	
		80	14	0.65	
		150	1	0.25	
	MMC	0.30	17	4.50***	
3 + 21 h	Acetone	0	NA	0.43	
with S9 activation	PRN3590	20	5	0.70	
		40	14	0.50	
		80	10	0.40	
		150	13	0.35	
	CPA	5.0	37	2.10***	

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; MN: micronucleated; NA: not applicable; NOS: noscapine; PHA: phytohaemagglutinin; RI: replication index; VIN: vinblastine.

*** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher's exact test.

表 2.6.7.17 AB - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3590) (Continued)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3590**
Treatment Conditions	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Cytotoxicity based on RI (%)**	**Mean MN Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	Acetone	0	NA	0.35
	PRN3590	20	14	0.25
		40	9	0.20
		80	20	0.35
	NOS	30.0	26	5.25***
24 + 24 h without S9 activation	Acetone	0	NA	0.38
	PRN3590	20	20	0.20
		40	26	0.35
		80	28	0.40
	VIN	0.04	37	5.20***

Abbreviations: MN: micronucleated; NA: not applicable; NOS: noscapine; RI: replication index; VIN: vinblastine.
*** P≤0.001 when compared to the control group using Fisher’s exact test.

表 2.6.7.17 AC - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN1253)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities					**Test Article: PRN1253**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)			**No. of Independent Assays**: 2		**Study No.:**	[HIS2448]
Strains: Salmonella typhimurium (TA98, TA100, TA1535, and TA1537) and Escherichia coli (WP2uvrA)			**No. of Replicate Cultures**: 3		**Location:**	4.2.3.7.6-13
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital-induced rat liver S9			**No. of Cells Analyzed/Culture**: -		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO			**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (NaN_3) and DMSO (2NF, NQO, AAC, AAN, and B[a]P)			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)					**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None						
Genotoxic Effects: None						
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 1 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 Activation	DMSO	0	14.6 ± 5.9	108.0 ± 6.4	15.4 ± 5.8	14.6 ± 5.7	15.8 ± 2.9
	PRN1253	5	24.7 ± 2.9	90.0 ± 22.1	9.7 ± 2.9	15.0 ± 7.0	22.0 ± 11.0
		16	13.3 ± 5.5	117.3 ± 31.6	13.3 ± 4.2	16.0 ± 4.0	14.3 ± 6.1
		50	18.0 ± 6.6	101.3 ± 8.3	16.0 ± 4.6	11.3 ± 2.1	11.3 ± 1.5
		160	17.3 ± 4.5	105.3 ± 11.5	10.7 ± 2.5	18.0 ± 6.1	14.3 ± 3.2
		500	16.0 ± 5.3	111.7 ± 8.1	13.3 ± 4.7	21.7 ± 7.0	14.7 ± 3.2
		1600	16.7 ± 0.6	88.0 ± 10.8	14.0 ± 2.6	20.3 ± 3.8	23.0 ± 4.4
		5000	13.3 ± 4.5	98.3 ± 4.5	9.3 ± 4.6	12.7 ± 3.5	16.3 ± 1.2
	2NF	5	1149.3 ± 111.9	-	-	-	-
	NaN_3	2	-	712.3 ± 58.6	701.3 ± 51.4	-	-
	AAC	50	-	-	-	460.7 ± 137.7	-
	NQO	2	-	-	-	-	356.0 ± 63.0

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NaN_3: sodium azide; SD: standard deviation.
-: not applicable

表 2.6.7.17 AC - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN1253) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities						**Test Article: PRN1253**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 1 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
With S9 Activation	DMSO	0	33.2 ± 8.1	130.0 ± 16.0	18.6 ± 3.4	21.2 ± 5.4	22.6 ± 4.2
	PRN1253	5	39.0 ± 13.9	126.3 ± 15.4	23.0 ± 4.6	18.3 ± 6.1	15.0 ± 1.7
		16	32.0 ± 5.2	128.0 ± 8.2	25.3 ± 7.6	16.0 ± 3.0	17.7 ± 3.8
		50	42.7 ± 13.1	133.0 ± 2.6	11.0 ± 4.4	23.7 ± 2.9	20.0 ± 2.6
		160	32.0 ± 3.5	136.0 ± 11.4	17.7 ± 6.5	22.3 ± 3.1	18.0 ± 7.0
		500	48.0 ± 27.2	133.3 ± 11.0	17.3 ± 5.9	24.0 ± 6.1	23.7 ± 5.5
		1600	51.7 ± 38.4	133.7 ± 9.7	20.3 ± 6.7	20.0 ± 8.5	20.0 ± 3.6
		5000	63.7 ± 21.8	119.7 ± 10.6	17.7 ± 6.1	20.3 ± 11.2	18.0 ± 4.4
	B[a]P	10	344.3 ± 16.4	-	-	-	-
	AAN	5	-	2474.3 ± 92.0	220.0 ± 34.0	188.3 ± 9.5	-
	AAN	15	-	-	-	-	200.7 ± 18.5

Abbreviations: AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; SD: standard deviation.
-: not applicable

表 2.6.7.17 AC - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN1253) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities			**Test Article: PRN1253**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay 2 - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**
			TA98
With S9 Activation	DMSO	0	54.6 ± 7.9
	PRN1253	500	53.7 ± 5.5
		1000	50.7 ± 11.2
		2000	52.0 ± 10.1
		3000	55.0 ± 8.7
		4000	43.7 ± 5.1
		5000	42.3 ± 9.3
	B[a]P	10	337.7 ± 49.0

Abbreviations: B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; SD: standard deviation.

表 2.6.7.17 AD - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN1253)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN1253**	
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[MNV1633]
Test System: Human lymphocytes		**No. of Replicate Cultures**: 2 (treated groups) or 4 (vehicle group)		**Location:**	4.2.3.7.6-14
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: ≥500		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: DMSO		**Vehicle for Positive Controls**: DMSO (CPA and NOS); purified water (VIN and MMC)			
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by PHA				**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: None					
Genotoxic Effects: Small statistically significant increase in the frequency of micronuclei at the highest concentration tested following 3+21 h treatment without S9					
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Cytotoxicity (%)**	**Mean Micronucleated Cell Frequency (%)**	
3 + 21 h without S9 activation	Vehicle	0	-	0.50	
	PRN1253	50	2	0.75	
		150	1	0.65	
		200	0	0.45	
		213	0	1.10**	
	MMC	0.30	56	11.70***	
3 + 21 h with S9 activation	Vehicle	0	-	0.68	
	PRN1253	50	1	0.95	
		150	0	0.55	
		213	0	0.53	
	CPA	5.0	58	5.25***	

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; NOS: noscapine; PHA: phytohaemagglutinin; VIN: vinblastine.
** P≤0.01; *** P≤0.001.

表 2.6.7.17 AD - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN1253) (Continued)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN1253**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Cytotoxicity (%)**	**Mean Micronucleated Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	Vehicle	0	-	0.78
	PRN1253	50	4	0.55
		150	2	0.70
		213	7	0.65
	NOS	30.0	35	8.20***
24 + 24 h without S9 activation	Vehicle	0	-	0.48
	PRN1253	50	0	0.48
		150	0	0.78
		213	0	0.53
	VIN	0.04	44	7.25***

Abbreviations: NOS: noscapine; VIN: vinblastine.
*** P≤0.001.

表 2.6.7.17 AE - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3767)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3767**	
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells (Ames)		**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[HIS2455]
Strains: Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA		**No. of Replicate Cultures**: 3 (treated groups) or 4 (vehicle group)		**Location:**	4.2.3.7.6-32
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: -		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone		**Vehicle for Positive Controls**: Purified water (NaN_3), DMSO (2NF, AAC, NQO, AAN and B[a]P)			
Treatment: Plate incorporation (with and without activation)		**Date of Treatment**: [redacted]			
Cytotoxic Effects: None					
Genotoxic Effects: None					

Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 activation	Vehicle	0	22.4 ± 7.6	126.6 ± 9.2	11.2 ± 3.6	15.2 ± 7.0	19.2 ± 3.5
	PRN3767	5	25.0 ± 1.0	136.0 ± 10.0	10.7 ± 1.5	19.7 ± 3.2	17.7 ± 3.1
		16	21.0 ± 1.0	133.7 ± 6.7	10.3 ± 2.5	17.7 ± 1.5	24.3 ± 4.2
		50	21.7 ± 7.4	126.3 ± 13.2	9.3 ± 2.5	17.0 ± 6.2	17.0 ± 2.0
		160	20.7 ± 4.6	142.0 ± 6.1	9.7 ± 1.5	16.7 ± 7.0	22.7 ± 9.2
		500	23.0 ± 1.0	155.3 ± 17.9	18.7 ± 4.0	17.7 ± 3.1	27.7 ± 9.8
		1600	24.3 ± 5.5 [a]	142.0 ± 11.1 [a]	11.3 ± 3.5 [a]	15.7 ± 1.5 [a]	18.3 ± 0.6 [a]
		5000	- [a]	119.3 ± 10.3 [a]	12.3 ± 2.1 [a]	13.3 ± 2.5 [a]	- [a]

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; NaN_3: sodium azide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

-: not applicable

a Precipitation of test article observed.

表 2.6.7.17 AE - Other toxicity studies - Impurities - Bacterial reverse mutation assay (PRN3767) (Continued)

Bacterial reverse mutation assay - Study of impurities						**Test Article: PRN3767**	
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/plate)**	**Mutagenicity Assay - Revertant Colony Counts/Plate (Mean ± SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2uvrA**
Without S9 activation	2NF	5	1061.3 ± 32.3	-	-	-	-
	NaN_3	2	-	677.7 ± 16.2	628.0 ± 20.0	-	-
	AAC	50	-	-	-	255.3 ± 5.0	-
	NQO	2	-	-	-	-	352.3 ± 16.5
With S9 activation	Vehicle	0	28.8 ± 5.4	151.2 ± 11.9	14.0 ± 4.5	21.0 ± 2.3	23.6 ± 3.2
	PRN3767	5	32.7 ± 4.0	154.0 ± 7.2	16.0 ± 7.8	20.3 ± 1.5	26.7 ± 3.8
		16	28.7 ± 1.2	150.0 ± 7.9	10.3 ± 4.2	21.0 ± 1.7	30.7 ± 4.0
		50	38.7 ± 1.2	142.3 ± 8.1	17.3 ± 2.3	19.7 ± 3.1	24.0 ± 6.0
		160	32.7 ± 14.7	152.3 ± 7.2	12.0 ± 2.6	21.7 ± 2.1	27.3 ± 2.5
		500	34.7 ± 9.9	162.3 ± 5.5	18.0 ± 5.0	21.3 ± 6.1	29.7 ± 3.1
		1600	36.3 ± 5.0 *a*	162.0 ± 30.0 *a*	13.0 ± 3.0 *a*	18.7 ± 2.3 *a*	28.7 ± 3.1 *a*
		5000	*-a*	88.3 ± 11.5 *a*	13.0 ± 1.7 *a*	15.3 ± 3.2 *a*	*-a*
	B[a]P	10	282.0 ± 21.0	-	-	-	-
	AAN	5	-	2788.3 ± 320.9	149.3 ± 27.6	93.3 ± 2.3	-
	AAN	15	-	-	-	-	230.3 ± 5.1

Abbreviations: 2NF: 2-nitrofluorene; AAC: 9-aminoacridine; AAN: 2-aminoanthracene; B[a]P: benzo[a]pyrene; NaN_3: sodium azide; NQO: 4-nitroquinoline 1-oxide; SD: standard deviation.

a Precipitation of test article observed.

-: not applicable

表 2.6.7.17 AF - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3767)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3767**	
Test for Induction of: Micronuclei		**No. of Independent Assays**: 1		**Study No.:**	[MNV1636]
Test System: Human lymphocytes		**No. of Replicate Cultures**: 2		**Location:**	4.2.3.7.6-33
Metabolizing System: β-naphthoflavone/phenobarbital induced rat liver S9		**No. of Cells Analyzed/Culture**: -		**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle for Test Article: Acetone		**Vehicle for Positive Controls**: DMSO (NOS and CPA), purified water (VIN and MMC)			
Treatment: 48 h following mitogen stimulation by phytohaemagglutinin				**Date of Treatment**: [redacted] 20[redacted]	
Cytotoxic Effects: 24+24 h treatment in the absence of S9					
Genotoxic Effects: None					
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Cytotoxicity (%)**	**Mean MNBN Cell Frequency (%)**	
3 + 21 h without S9 activation	Vehicle	0	-	0.73	
	PRN3767	40	8	0.55	
		100	1	0.80	
		200	16	0.65	
	MMC	0.30	25	2.95***	
3 + 21 h with S9 activation	Vehicle	0	-	0.88	
	PRN3767	40	11	0.60	
		100	14	0.55	
		200	10	0.75	
	CPA	5.0	50	3.60***	

Abbreviations: CPA: cyclophosphamide; DMSO: dimethyl sulfoxide; GLP: good laboratory practice; MMC: mitomycin C; MNBN: micronucleated binucleated; NOS: noscapine; VIN: vinblastine.

-: not applicable; *** P≤0.001.

表 2.6.7.17 AF - Other toxicity studies - Impurities - Micronucleus assay (PRN3767) (Continued)

Micronucleus assay - Study of impurities				**Test Article: PRN3767**
Metabolic Activation	**Test Article**	**Dose Level (µg/mL)**	**Cytotoxicity (%)**	**Mean MNBN Cell Frequency (%)**
24 + 0 h without S9 activation	Vehicle	0	-	0.73
	PRN3767	20	21	1.00
		100	16	0.65
		150	15	0.75
	NOS	30.0	26	7.20***
24 + 24 h without S9 activation	Vehicle	0	-	0.63
	PRN3767	5	32	0.45
		10	40	0.50
		20	47	0.45
	VIN	0.04	44	6.80***

Abbreviations: MNBN: micronucleated binucleated; NOS: noscapine; VIN: vinblastine.
-: not applicable; *** P≤0.001.

表 2.6.7.17 AG - Other toxicity studies - Impurities - Repeat-dose toxicity

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] (non-spiked and spiked impurities) in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a] and rilzabrutinib [a] spiked with 8 impurities (Batch A and Batch B)**	
Species/Strain:	Rat/Crl:WI(Han) Wistar Han	**Duration of Dosing:**	13 weeks	**Study No.:**	[TXC1679]
Initial Age:	8 to 9 weeks	**Duration of Postdose:**	None	**Location:**	4.2.3.7.6-2
Date of First Dose:	[redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:**	Oral gavage	**GLP Compliance:**	Yes
Vehicle/Formulation:	2.16 mg/mL citric acid in drinking water treated by reverse osmosis/Solution for rilzabrutinib [a] Batch A and Suspension for rilzabrutinib [a] non-spiked and Batch B				
Special Features:	None				

Dose (mg/kg)	**0**		**150**		**150**		**150**	
Test Material	**Control Item**		**Rilzabrutinib [a]**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch A**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch B**	
Number of Animals	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**
DIED OR SACRIFICED	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**
CLINICAL OBSERVATIONS (SURVIVING ANIMALS)								
Salivation	0	0	12	11	12	12	12	11
Abnormal Breathing Sounds	0	0	1	0	1	1	1	1
Red Discharge (Muzzle)	0	0	1	0	1	0	3	1
Red Staining Fur/Red Skin (Mouth)	0	0	0	0	0	2	2	1
Erected Fur	0	0	0	0	0	1	0	0
BODY WEIGHT (%[b])	442.3 g	258.4 g	+1.0	-0.8	-1.5	+3.5	+0.2	-0.4
FOOD CONSUMPTION (%[b])	19.9 g/animal	13.3 g/animal	-2.3	-3.2	-4.2	+9.9	+0.3	0.0

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; WI(Han): Wistar Hannover.
-: no noteworthy findings.
a Rilzabrutinib was identified as SAR444671.
b For controls, group means at the end of the treatment period (i.e. Day 91 for body weight or interval Days 85-91 for food consumption) are shown.

表 2.6.7.17 AG - Other toxicity studies - Impurities - Repeat-dose toxicity (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] (non-spiked and spiked impurities) in rats					**Test Article: Rilzabrutinib [a] and rilzabrutinib [a] spiked with 8 impurities (Batch A and Batch B)**			
Dose (mg/kg)	**0**		**150**		**150**		**150**	
Test Material	**Control Item**		**Rilzabrutinib [a]**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch A**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch B**	
Number of Animals	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**
OPHTHALMOLOGY	-	-	-	-	-	-	-	-
HEMATOLOGY								
Lymphocytes (10^9/L)	4.997	2.730	5.997	3.946**	6.034	3.592*	6.258	3.685**
Monocytes (10^9/L)	0.166	0.071	0.171	0.114	0.202	0.136**	0.238	0.115
Basophils (10^9/L)	0.010	0.002	0.012	0.010**	0.015	0.008*	0.018	0.005
Neutrophils (10^9/L)	1.028	0.488	0.888	0.653	1.120	0.762	1.248	0.874**
Eosinophils (10^9/L)	0.168	0.077	0.098*	0.091	0.135	0.089	0.131	0.144

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

-: no noteworthy findings; * P≤0.05; ** P≤0.01.

a Rilzabrutinib was identified as SAR444671.

表 2.6.7.17 AG - Other toxicity studies - Impurities - Repeat-dose toxicity (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] (non-spiked and spiked impurities) in rats					**Test Article: Rilzabrutinib [a] and rilzabrutinib [a] spiked with 8 impurities (Batch A and Batch B)**			
Dose (mg/kg)	**0**		**150**		**150**		**150**	
Test Material	**Control Item**		**Rilzabrutinib [a]**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch A**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch B**	
Number of Animals	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**
COAGULATION								
Fibrinogen (g/L)	3.147	1.981	3.261	2.323*	3.368	2.231	3.400	2.431**
CLINICAL CHEMISTRY								
Triglycerides (mmol/L)	2.712	1.896	2.192	1.036**	1.613**	1.071**	2.228	0.936**
URINALYSIS	-	-	-	-	-	-	-	-
ORGAN WEIGHTS	-	-	-	-	-	-	-	-
GROSS PATHOLOGY	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined:	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 11**
HISTOPATHOLOGY								
BRAIN								
Infiltration, Mononuclear Cell, Lateral Ventricle								
Minimal	0	0	9	5	11	9	6	8
Infiltration, Mixed Cell, Neuropil, Meninges								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.
-: no noteworthy findings; * P≤0.05; ** P≤0.01.
a Rilzabrutinib was identified as SAR444671.

表 2.6.7.17 AG - Other toxicity studies - Impurities - Repeat-dose toxicity (Continued)

Three-month oral GLP toxicity study of rilzabrutinib [a] (non-spiked and spiked impurities) in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a] and rilzabrutinib [a] spiked with 8 impurities (Batch A and Batch B)**		
Dose (mg/kg)	**0**		**150**		**150**		**150**	
Test Material	**Control Item**		**Rilzabrutinib [a]**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch A**		**Rilzabrutinib [a] Spiked - Batch B**	
Number Examined:	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 12**	**M: 12**	**F: 11**
HISTOPATHOLOGY (Continued)								
PANCREAS								
Inflammation, Islet of Langerhans/Acinar Chronic/Chronic Active								
Minimal	0	0	0	0	3	0	2	0
Mild	0	0	2	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Pigment								
Minimal	0	0	3	0	5	0	1	0
Lobular Atrophy								
Minimal	1	0	1	0	3	0	0	0
Mild	0	0	1	0	2	0	0	0
Lobular Mononuclear Cell Infiltration								
Minimal	1	0	0	0	1	0	0	0
Mild	0	0	0	0	2	0	0	0
Lobular Fibrosis								
Minimal	2	0	0	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	2	0	0	0

Abbreviations: F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as SAR444671.

表 2.6.7.17 AH - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats

Three-day oral GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats						**Test Article: Rilzabrutinib [a]**
Species / Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rats/ Wistar Han IGS Crl:WI(Han)	Oral gavage; dose volume 10 mL/kg	3 days	0, 50, 150, 500	Main Study: 20 M/20 F TK: Vehicle: 3/sex/group Test Article: 6/sex/group	All animals survived until scheduled termination. TK information and histopathology findings are summarized below.	[DVR0302]
Special Features:	This GLP study was designed as a three-day neurotoxicity study with emphasis on brain histopathology. Rats were sacrificed at 12, 24, 48 and 72 h after the last dose. In addition to H&E, special staining of the brain tissue included; GFAP immunohistochemistry for astrocytes, IBA-1 immunohistochemistry for microglia, Fluoro-Jade B staining for necrotic cell bodies, and Bielschowsky silver stain to visualize axons, dendrites, and other neurofilament-containing neuronal processes. Additional study information has been summarized in 2.6.6 Nonclinical Toxicology Written Summary, [Section 8.9.2].					

Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals									
Main Study	12 h Sacrifice	5	5	5	5	5	5	5	5
	24 h Sacrifice	5	5	5	5	5	5	5	5
	48 h Sacrifice	5	5	5	5	5	5	5	5
	72 h Sacrifice	5	5	5	5	5	5	5	5
Toxicokinetics		3	3	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetics - Day 3									
AUC_{last} (ng•h/mL)		0	0	1190	3840	5280	12900	18300	49800
C_{max} (ng/mL)		0	0	437	1040	928	1740	1190	4400

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; H&E: hematoxylin and eosin; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; IGS: International Genetic Standardization; M: male; TK: toxicokinetics; WI(Han): Wistar Hannover.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AH - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-day oral GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a]**	
HISTOPATHOLOGY								
BRAIN								
Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
12 h Sacrifice (N)	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**
H&E Meninges/Neuropil, Infiltration, Neutrophilic	-	-	-	-	-	2	1	3
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	-	1	2
IBA-1 Increased Positivity; Periventricular	-	-	-	-	1	5	5	5
GFAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h Sacrifice (N)	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**
H&E Meninges/ Neuropil, Infiltration, Neutrophilic	-	-	-	-	-	2	2	1
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	-	-	3
IBA-1 Increased Positivity; Periventricular	-	-	-	-	1	5	5	5
GFAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male.
- = finding not present.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AH - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-day oral GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats							**Test Article: Rilzabrutinib [a]**	
HISTOPATHOLOGY (Continued)								
BRAIN (Continued)								
Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
48 h Sacrifice (N)	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**
H&E Meninges, Infiltration, Neutrophilic	-	-	-	-	-	-	1	-
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	-	1	1
IBA-1 Increased Positivity, Periventricular	-	-	-	-	3	5	5	5
GFAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-
72 h Sacrifice (N)	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**	**5**
H&E Meninges/ Neuropil, Infiltration, Neutrophilic	-	-	-	-	-	-	1	-
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	1	1	2
IBA-1 Increased Positivity, Periventricular	-	-	-	-	-	1	5	5
GFAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male.
- = finding not present.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AI - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats

Three-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats					**Test Article: Rilzabrutinib [a]**	
Species / Strain	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Dose (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rats/Wistar Han (RccHan®:WIST)	PO; dose volume 10 mL/kg IJ; dose volume 3 mL/kg	3 days	PO: 0; 50; 150; 500 IJ: 0; 75; 150	Main Study: PO - 24 M/24 F; IJ - 18 M/18 F TK: PO, IJ Vehicle: 3/sex/group Test Article: 6/sex/group	All main study animals survived until scheduled termination. TK information and histopathology finding are summarized below.	[DVR0312]
Special Features:	This GLP study was designed as a three-day neurotoxicity study with emphasis on brain histopathology was designed with both PO and IJ dosing. Rats were sacrificed at 12, 24, 72 and 168 (PO only) h after the last dose. In addition to H&E, special staining of the brain tissue included GFAP immunohistochemistry for astrocytes, IBA-1 immunohistochemistry for microglia, Fluoro-Jade B staining for necrotic cell bodies, and Bielschowsky silver stain to visualize axons, dendrites, and other neurofilament-containing neuronal processes. Additional study information has been summarized in 2.6.6, [Section 8.9.3].					

Oral Dose (mg/kg)		**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals									
Main Study	12 h Sacrifice	6	6	6	6	6	6	6	6
	24 h Sacrifice	6	6	6	6	6	6	6	6
	72 h Sacrifice	6	6	6	6	6	6	6	6
	168 h Sacrifice	6	6	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetics		3	3	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetics - Day 3									
AUC_{last} (ng•h/mL)		0	0	2650	3540	5820	10000	29000	69600
C_{max} (ng/mL)		0	0	605	1380	984	2600	1670	5160

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; H&E: hematoxylin and eosin; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; IJ: intra-jejunal; M: male; PO: oral gavage; TK: toxicokinetics.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AI - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats					**Test Article: Rilzabrutinib [a]**			
HISTOPATHOLOGY								
BRAIN								
Oral Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
12 h Sacrifice (N)	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
H&E Meninges/Neuropil, Infiltration, Neutrophilic	-	-	-	-	-	-	4	6
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	-	-	6
IBA-1 Increased Positivity; Periventricular	-	-	-	-	4	6	6	6
IBA-1 Increased Positivity; Submeningeal	-	-	-	-	-	-	5	5
GFAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-
24 h Sacrifice (N)	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
H&E Meninges/ Neuropil, Infiltration, Neutrophilic	-	-	-	-	-	-	6	4
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	-	2	6
IBA-1 Increased Positivity; Periventricular	-	-	-	-	4	6	6	6
IBA-1 Increased Positivity; Submeningeal	-	-	-	-	-	-	5	6
GFAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; H&E: hematoxylin and eosin; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male.

- = finding not present.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AI - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats					**Test Article: Rilzabrutinib [a]**			
HISTOPATHOLOGY (Continued)								
BRAIN (continued)								
Oral Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**50**		**150**		**500**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
72 h Sacrifice (N)	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
H&E Meninges, Infiltration, Neutrophilic	-	-	-	-	-	-	1	3
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	3	2	6
IBA-1 Increased Positivity, Periventricular	-	-	-	-	-	1	5	5
IBA-1 Increased Positivity; Submeningeal	-	-	-	-	-	-	-	5
GFAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-
168 h Sacrifice (N)	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
H&E	-	-	-	-	-	-	-	-
IBA-1 Increased Diffuse Positivity, Neuropil	-	-	-	-	-	-	-	-
IBA-1 Increased Positivity, Periventricular	-	-	-	-	-	-	-	-
IBA-1 Increased Positivity; Submeningeal	-	-	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; H&E: hematoxylin and eosin; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male.

- = finding not present.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AI - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a]**		
Intra-jejunal Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**75**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals						
Main Study 12 h Sacrifice	6	6	5	6	6	6
24 h Sacrifice	6	6	5	5	6	5
72 h Sacrifice	6	6	6	6	6	6
Toxicokinetics	3	3	6	6	6	6
Toxicokinetics - Day 3						
AUC_{last} (ng•h/mL)	0	0	4890	9230	7140	15600
C_{max} (ng/mL)	0	0	933	2120	1170	2430

Abbreviations: AUC_{last}: area under the plasma-concentration time curve from time zero to last measurable concentration; C_{max}: maximum concentration; F: female; GLP: good laboratory practice; M: male.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AI - Other toxicity studies - Neurotoxicity - 3-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib in rats (Continued)

Three-day oral or intra-jejunal GLP neurotoxicity study of rilzabrutinib [a] in rats				**Test Article: Rilzabrutinib [a]**		
Intra-jejunal Dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**		**75**		**150**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
HISTOPATHOLOGY						
BRAIN						
12 h Sacrifice (N)	**6**	**6**	**5**	**6**	**6**	**6**
IBA-1 Increased Positivity; Periventricular	-	-	-	-	1	3
GFAP	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-
24 h Sacrifice (N)	**6**	**6**	**5**	**5**	**6**	**5**
IBA-1 Increased Positivity; Periventricular	-	-	-	-	-	3
GFAP	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-
72 h Sacrifice (N)	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
IBA-1	-	-	-	-	-	-
GFAP	-	-	-	-	-	-
Bielschowsky Silver	-	-	-	-	-	-
Fluoro-Jade B	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: F: female; GFAP: glial fibrillary acidic protein; GLP: good laboratory practice; IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1; M: male.
- = finding not present.
a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AJ - Other toxicity studies - Phototoxicity of rilzabrutinib in BALB/c 3T3 cells

Phototoxicity of rilzabrutinib [a] in BALB/c 3T3 cells					**Test Article: Rilzabrutinib [a]**	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliant**	**Study Number**
3T3 NRU Phototoxicity Text (OECD Test No. 432)	Mouse fibroblast cell line, Balb/c 3T3, ATCC CCL-163	In vitro	0.009 to 150.00 µM	No evidence of phototoxicity IC_{50} (with irradiation) = 41.30 µM IC_{50} (without irradiation) = 79.84 µM PIF = 1.93	No	[DVR0374]

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IC_{50}: half-maximal inhibitory concentration; NRU: neutral red uptake; PIF: photoirritation factor.

a Rilzabrutinib was identified as PRN1008.

表 2.6.7.17 AK - Other toxicity studies - Phototoxicity - Neutral red uptake phototoxicity assay

Neutral red uptake phototoxicity assay of rilzabrutinib [a] in BALB/c 3T3 mouse fibroblasts					**Test Article: Rilzabrutinib [a]**	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Doses**	**Noteworthy Findings [b]**	**GLP Compliant**	**Study Number**
3T3 NRU Phototoxicity Text (OECD Test No. 432)	Mouse fibroblast cell line, Balb/c 3T3, ATCC CCL-163	In vitro	1.00 to 56.2 µg/mL	No evidence of phototoxicity IC_{50} (with irradiation) = 38.661 and 36.272 µM IC_{50} (without irradiation) = 39.926 and 42.980 µM PIF = 1.034 and 1.186 MPE = -0.008 and 0.022	Yes	[PHV0082]

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IC_{50}: half-maximal inhibitory concentration; MPE: mean photo effect; NRU: neutral red uptake; PIF: photoirritation factor.

a Rilzabrutinib was identified as SAR444671 (also named PRN1008).

b Results of definitive assays 3 and 4 reported as all assay acceptance criteria for definitive assays 1 and 2 were not met.