ブレンソカチブ水和物（INS1007）

第 2 部（モジュール 2）
2.6.6 毒性試験の概要文

インスメッド合同会社

Information and data contained herein are proprietary and confidential. This information should not be disclosed to any third party without the written consent of Insmed.

目次

用語及び略語一覧 5
1. まとめ 7
1.1. 緒言 7
1.2. 一般毒性試験 9
1.3. 遺伝毒性及びがん原性 12
1.4. 生殖発生毒性 12
1.5. その他の毒性 14
1.6. 結論 14
2. 単回投与毒性試験 16
3. 反復投与毒性試験 17
3.1. ラットを用いた反復投与毒性試験 17
3.1.1. ラットを用いた MTD 評価及び 28 日間経口投与毒性試験（非 GLP、525710 試験） 17
3.1.1.1. MTD 評価期間 17
3.1.1.2. 28 日間反復投与期間 18
3.1.2. ラットを用いた 1 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、527409 試験） 19
3.1.3. ラットを用いた 6 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、528313 試験） 21
3.2. イヌを用いた反復投与毒性試験 24
3.2.1. イヌを用いた MTD 評価と 14 日間反復投与毒性試験（非 GLP、525726 試験） 24
3.2.1.1. MTD 評価期間 24
3.2.1.2. 14 日間反復投与期間 25
3.2.2. イヌを用いた 1 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、527414 試験） 26
3.2.3. イヌを用いた 6 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、528329 試験） 28
3.2.4. イヌを用いた 9 箇月間の経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、505523 試験） 31
4. 遺伝毒性試験 33
4.1. *In Vitro* 試験 33
4.1.1. Ames 試験（GLP、8304016 試験） 33
4.1.2. マウスリンパ腫アッセイ（GLP、8304015 試験） 33
4.2. *In Vivo* 試験 34
4.2.1. ラット小核試験（GLP、8304017 試験） 34
5. がん原性試験 35
5.1. マウスを用いた試験 35
5.1.1. 野生型 rasH2 マウスを用いた 28 日間毒性試験（GLP、8003479 試験） 35
5.1.2. 遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間試験（GLP、20354490 試験） 36
5.2. ラットを用いた試験 38
5.2.1. ラットを用いた 2 年間試験（GLP、8002910 試験） 38
6. 生殖発生毒性試験 41
6.1. 受胎能及び初期胚発生試験 41
6.1.1. 受胎能試験：雄ラット（GLP、528313 試験）、雌ラット（GLP、497825 試験） 41
6.2. 胚・胎児発生試験 41
6.2.1. 雌ラットに経口投与した用量範囲設定と胚・胎児発生試験（GLP、497631 試験） 41

6.2.2. 雌ラットを用いた経口（強制）投与受胎能及び胚・胎児発生試験（GLP、497825試験）....42
6.2.3. 非妊娠ウサギを用いた経口投与用量範囲設定毒性試験（非 GLP、497610 試験）..44
6.2.4. 妊娠ウサギを用いた経口投与用量範囲設定胚・胎児発生試験（GLP、497626 試験）....44
6.2.5. 妊娠ウサギを用いた経口投与胚・胎児発生試験（GLP、497830 試験）....46
6.3. 出生前及び出生後の発生試験....47
6.3.1. ラットを用いた出生前及び出生後の発生試験（GLP、00335001 試験）....47
6.4. 幼若動物を用いた試験....48
7. 局所刺激性試験....50
8. その他の毒性試験....51
8.1. 免疫毒性....51
8.2. 依存性....52
8.3. 代謝物....53
8.4. 不純物....53
8.4.1. 不純物C*の許容摂取量に関するリスク評価....53
8.4.1.1. 緒言....53
8.4.1.2. *In Silico* carcinogenic potency categorization approach（非 GLP、試験番号 EQR-6850-142.01）....54
8.4.1.3. *In Vitro* Ames 試験（GLP、試験番号 STURS24AA0598-1）....55
8.4.1.4. *In Vitro* マウスリンパ腫アッセイ（GLP、試験番号 STUGC24AA2299-2）....56
8.4.1.5. *In Vitro* 代謝（非 GLP、試験番号 8547044）....57
8.4.1.6. 量子力学的な評価（非 GLP、試験番号 VV-NC-001334）....58
8.4.1.7. 要約....58
8.4.2. その他の不純物....59
8.5. 潜在的な光毒性（GLP、20059176 試験）....60
8.6. 肺及び腎臓組織の超微細構造の評価（非 GLP、EM-14.352 試験及び EM-14.353 試験）....60
9. 考察及び結論....62
9.1. 一般毒性の総合リスクアセスメント....62
9.1.1. 一般状態....62
9.1.2. 腎臓....62
9.1.3. リン脂質症....63
9.1.4. 肺....64
9.1.5. 免疫系....64
9.1.6. 精巣に対する毒性....64
9.1.7. 歯周病....66
9.1.8. 骨格筋....66
9.1.9. 肝臓....66
9.2. 結論....67
10. 参考文献....70

表目次

表 1: ブレンソカチブの毒性試験の一覧 8
表 2: ラットを用いた 1 箇月間試験の実験デザイン 19
表 3: ラットを用いた 1 箇月間試験で投与期間終了時にみられたブレンソカチブに関連する組織学的所見 21
表 4: ラットを用いた 6 箇月間試験の実験デザイン 22
表 5: ラットを用いた 6 箇月間試験で投与期間終了時にみられたブレンソカチブに関連する組織学的所見 24
表 6: イヌを用いた 1 箇月間試験の実験デザイン 26
表 7: イヌを用いた 1 箇月間試験でみられたブレンソカチブに関連する精巣及び精巣上体の病理組織学的所見 28
表 8: イヌを用いた 6 箇月間試験の実験デザイン 28
表 9: イヌを用いた 6 箇月間試験において精巣と精巣上体で観察されたブレンソカチブに関連する所見 30
表 10: イヌを用いた 9 箇月間試験の実験デザイン 31
表 11: マウスを用いた 28 日間試験の実験デザイン 35
表 12: マウスを用いた 6 箇月間がん原性試験の実験デザイン 37
表 13: ラットを用いた 2 年間のがん原性試験の実験デザイン 38
表 14: 雌雄ラットを用いた 2 年間のがん原性試験での死亡と生存率 38
表 15: 2 年間のがん原性試験の雌でみられた子宮内膜腺癌の発現率 39
表 16: 雌ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生試験の実験デザイン 42
表 17: 妊娠ウサギを用いた用量範囲設定 EFD 試験の実験デザイン 45
表 18: 妊娠ウサギを用いた EFD 試験の実験デザイン 46
表 19: 雌ラットを用いた PPND 試験の実験デザイン 47
表 20: ラット及びイヌにおける GLP 反復投与毒性試験（1 箇月、6 箇月及び 9 箇月試験）における投与開始時の動物の週齢・月齢 48
表 21: 動物を用いた主要試験の定常状態でみられた AUC と MRHD をヒトに投与したときの AUC を比較した曝露倍数 68

図目次

図 1: 不純物C*の構造 53
図 2: ブレンソカチブの UV 吸収スペクトル 60

用語及び略語一覧

用語及び略語	説明
AI	acceptable intake, 許容摂取量
ALP	alkaline phosphatase, アルカリホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase, アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	aspartate aminotransferase, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the concentration-time curve, 血漿中薬物濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours, 0 ～ 24 時間までの AUC
C_{max}	maximum (peak) plasma concentration of the drug, 最高（ピーク）血漿中濃度
CNS	central nervous system, 中枢神経系
CPCA	carcinogenic potency categorization approach, 発がん性潜在分類アプローチ
CPK	creatine phosphokinase, クレアチンホスホキナーゼ
DMSO	dimethyl sulfoxide, ジメチルスルホキシド
DPP1	dipeptidyl peptidase 1, ジペプチジルペプチダーゼ 1
DRF	dose range finding, 用量範囲設定
EFD	embryofetal development, 胚・胎児発生
EM	electron microscopy, 電子顕微鏡
EMA	European Medicines Agency, 欧州医薬品庁
FDA	Food and Drug Administration, 米国食品医薬品局
GALT	gut-associated lymphoid tissue, 腸管関連リンパ組織
GD	gestation day, 妊娠日数
GEF	global evaluation factor, 総合的評価ファクター
GLDH	glutamate dehydrogenase, グルタミン酸脱水素酵素
GLP	Good Laboratory Practice, 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準
HED	human equivalent dose, ヒト等価用量
HLM	human liver microsomes, ヒト肝ミクロソーム
ICH	International Council for Harmonisation, 医薬品規制調和国際会議
LD	lactation day, 授乳日数
LOAEL	lowest observed adverse effect level, 最小毒性量
MTD	maximum tolerated dose, 最大耐量
MRHD	maximum recommended human dose, 最大推奨臨床用量
NAG	N-acetyl β-d-glucosaminidase, N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ
NCFBE	non-cystic fibrosis bronchiectasis, 非嚢胞性線維症性気管支拡張症
NDEA	N-nitrosodiethylamine, N-ニトロソジエチルアミン

用語及び略語	説明
NDMA	N-nitrosodimethylamine, N-ニトロソジメチルアミン
NDSRI	nitrosamine drug substance-related impurity, 有効成分由来のニトロソアミン類
NOAEL	no observed adverse effect level, 無毒性量
NSP	neutrophil serine protease, 好中球セリンプロテアーゼ
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development, 経済協力開発機構
PLD	phospholipidosis, リン脂質症
PLS	Papillon- Lefèvre Syndrome, パピヨン・ルフェーヴル症候群
PND	postnatal day, 出生後日数
PPND	pre- and postnatal development, 出生前及び出生後の発生
QD	once daily, 1 日 1 回
QM	Quantum mechanical, 量子力学
QT	the time from the start of the Q wave to the end of the T wave, Q 波開始から T 波終了までの時間
rasH2	a hemizygous transgenic mouse carrying the human prototype c-Ha-ras gene with its own promotor/enhancer within the genetic background of a BALB/cByJ × C57BL/6J F1 mouse, BALB/cByJ × C57BL/6J F1 マウスの遺伝的背景でヒトプロトタイプ c-Ha-ras 遺伝子とマウスのプロモーター／エンハンサーを有するヘミ接合性遺伝子導入マウス
S9	Aroclor 1254-induced rat liver S9 fractions represent the metabolic activation system, アロクロール 1254 誘導ラット肝 S9 分画。代謝活性化系
T4	thyroxine, チロキシン
TD_{50}	tumorigenic dose 50, representing the dose of a substance that is estimated to cause tumors in 50% of animals exposed to it, 腫瘍形成 50%用量：その物質に曝露された動物の 50%に腫瘍を引き起こすと推定される量
TEM	transmission electron microscopy, 透過型電子顕微鏡
TFT	5-trifluorothymidine, 5-トリフルオロチミジン
TK	toxicokinetic, トキシコキネティクス
TSH	thyroid-stimulating hormone, 甲状腺刺激ホルモン

1. まとめ

1.1. 緒言

ブレンソカチブ（開発コード：INS1007、AZD7986 及び AZ13661057）はリソソームシステインプロテイナーゼのジペプチジルペプチダーゼ（DPP1）の選択的、競合的及び可逆的な低分子阻害剤で、経口で投与される。本剤は、気管支拡張症に対し長期投与する治療薬として開発中である。

DPP1 は、標的の基質タンパク質［好中球セリンプロテアーゼ（NSP）など］の前駆体の N 末端からジペプチド部分を除去し、活性化するエキソペプチダーゼである。DPP1 は骨髄で好中球成熟時に NSP を活性化する。好中球から放出された活性化 NSP は炎症性であり、一般に周囲の組織を破壊する。非嚢胞性線維症性気管支拡張症（NCFBE）の患者の喀痰中では好中球及び NSP の 1 種である好中球エラスターゼ（NE）の濃度が上昇しており、増悪時には更に上昇する（Chalmers et al., 2017）。ブレンソカチブは DPP1 酵素を阻害し、活性型 NSP の形成を抑制する。ブレンソカチブで DPP1 活性を阻害すると、活性型 NSP の形成が減少し、肺の構造成分の破壊及び痰の産生が減少するという仮説がある。

DPP1 阻害がネガティブな影響を及ぼす可能性を理解するために、DPP1 ノックアウト（DPP1$^{-/-}$）マウス及び DPP1 が遺伝的に欠如したヒトについて広範囲に研究してきた。DPP1$^{-/-}$マウスは正常に発達し、健康にみえ、生殖能もある。DPP1$^{-/-}$マウスの脾臓、肝臓、肺、心臓、腎臓、胸腺、脳及び骨髄などの主な臓器を組織学的に詳細に評価しても、明らかな異常は認められなかった（Pham and Ley, 1999）。DPP1$^{-/-}$マウスは、免疫系も免疫機能も保持していると考えられる（Adkison et al., 2002; Hu and Pham, 2005; Pham and Ley,1999）。パピヨン・ルフェーヴル症候群（PLS）の DPP1 活性がほぼ完全又は完全に欠如した稀な遺伝性疾患を有するヒト被験者は、足底と手掌の発赤と肥厚を特徴とする重度の掌蹠角化症、及び治療せずに放置すると 20 ～ 30 代の若年期に歯の脱落を引き起こす歯周病（Biraggari et al., 2015; Guarino et al., 2017; Sorensen et al., 2014; Toomes et al., 1999）といった 2 つの典型的な臨床症状を呈する。DPP1$^{-/-}$ マウス及び PLS 患者における観察から、患者における安全性リスクは明確で、DPP1 は治療ターゲットとなりうる。また、DPP1 抑制の程度はマウスや人でみられるような極端なレベルまでの減少とはならないため、安全性の観点から開発の可能性を否定するものではない。完了済みの第 II 相臨床試験において NCFBE 患者を対象に評価したところ、PLS 患者で認められた低い残存 NSP 活性と比べてブレンソカチブ 10 mg 及び 25 mg の投与では血中好中球の NSP 活性の部分的な減少を引き起こす程度であったことを踏まえると、前述の結論は妥当と言える。

臨床開発を支持するために、非臨床毒性試験の包括的なプログラムが行われた（表 1）。この中には、ラット及びイヌを対象としたそれぞれ最長 6 箇月間と 9 箇月間の反復投与一般毒性試験、マウスとラットを用いた *in vitro* 及び *in vivo* の遺伝毒性試験、がん原性試験、雄雌ラットを用いた受胎能評価、ラットとウサギを用いた胚・胎児発生（EFD）試験、ラットを用いた出生前及び出生後の発生（PPND）試験、並びに光毒性リスク評価などが含まれる。ブレンソカチブの DPP1 酵素阻害効果はマウス、ラット、イヌ、ウサギ及びヒトで同様であるため（Doyle et al.,

2016）、一般毒性評価で薬理学的に関連のある動物種として Wistar Han ラットとビーグル犬を選択した。

表 1:　　ブレンソカチブの毒性試験の一覧

Study Type and Duration	Route of Administration	Species	Study Number	GLP
Repeat Dose Toxicity:				
MTD/28-day	Oral	Rat	525710	No
MTD/14-day	Oral	Dog	525726	No
1-month + 1-month recovery	Oral	Rat	527409	Yes
1-month + 1-month recovery	Oral	Dog	527414	Yes
6-month + 3-month recovery, including assessment of male fertility	Oral	Rat	528313	Yes
6-month + 6-month recovery	Oral	Dog	528329	Yes
9-month + 6-month recovery	Oral	Dog	505523	Yes
Genetic Toxicity:				
Ames	*In vitro*	*In vitro*	8304016	Yes
Mouse lymphoma	*In vitro*	*In vitro*	8304015	Yes
Rat micronucleus	Oral	Rat	8304017	Yes
Carcinogenicity:				
28-day dose-range-finding study	Oral	Mouse	8003479	Yes
6-month carcinogenicity study	Oral	Mouse	20354490	Yes
2-year carcinogenicity study	Oral	Rat	8002910	Yes
Reproductive and Developmental Toxicity:				
Range-finding EFD study	Oral	Rat	497631	Yes
Female Fertility and EFD study	Oral	Rat	497825	Yes
Range-finding toxicity in non-pregnant rabbit	Oral	Rabbit	497610	No
Range-finding EFD study	Oral	Rabbit	497626	Yes
EFD study	Oral	Rabbit	497830	Yes
PPND study	Oral	Rat	00335001	Yes
Other Studies (不純物C*):				
CPCA	*In silico*	N/A	EQR-6850-142.01	No
Enhanced Ames	*In vitro*	*In vitro*	STURS24AA0598-1	Yes
Mouse lymphoma	*In vitro*	*In vitro*	STUGC24AA2299-2	Yes
Metabolism	*In vitro*	*In vitro*	8547044	No
Quantum mechanical assessment	*In silico*	N/A	VV-NC-001334	No
Other Studies (Other):				
3T3 Phototoxicity	*In vitro*	*In vitro*	20059176	Yes

※新薬承認情報提供時に置き換え

EM evaluation rat 1-month	Oral	Rat	EM-14.352	No
EM evaluation dog 1-month	Oral	Dog	EM-14.353	No

CPCA = carcinogenic potency categorization approach; EFD = embryofetal development; EM = electron microscopy; GLP = Good Laboratory Practice; MTD = maximum tolerated dose; PPND = pre and postnatal development.

臨床開発及び承認申請を裏付ける主要毒性試験はすべて、規制及び適用されるガイドラインに従って適切な試験系と試験デザインで行った。特に、すべての主要毒性試験は欧州連合、米国、日本、及び経済協力開発機構（OECD）に加盟しているその他の国の規制当局が認める医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に従って実施した。すべての主要な反復投与一般毒性試験で、無投与の回復期間を設定した。

ブレンソカチブは、NCFBE 患者の治療薬として経口錠剤を開発中である。NCFBE に対する最大推奨臨床用量（MRHD）は 25 mg 1 日 1 回（QD）の長期投与である。母集団薬物動態解析に基づくと、MRHD を投与したときの総ブレンソカチブの最高（ピーク）血漿中濃度（C_{max}）及び 0 ～ 24 時間までの血漿中薬物濃度時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24h}$）は、0.62 µM と 9.655 µM*h である（259 ng/mL と 4060 ng*h/mL に相当、ICPD 00694-1 報告書）。定常状態での総ブレンソカチブの $AUC_{0\text{-}24h}$ 値と遊離（非結合）ブレンソカチブの $AUC_{0\text{-}24h}$ 値に基づいて MRHD の安全マージンを算出し、表 21 に示す。毒性試験では C_{max} に関連すると考えられる毒性所見が認められなかったため、C_{max} に基づいた安全マージンは省略する。

非臨床毒性試験で、ブレンソカチブが NCFBE 患者の治療薬として適切な安全性プロファイルを示すことが確認されている。一般毒性試験では、オンターゲット作用とオフターゲット作用を含めた、毒性の標的臓器が特定されている。ブレンソカチブに関連する非臨床所見は全般に用量依存的かつ可逆的で、これらの所見が生じたときの曝露量は、臨床で NCFBE に対する MRHD を投与したときにみられる曝露量よりも多かった。

主要な GLP 試験でみられた主な非臨床毒性所見及び安全マージンを以下で考察する。

1.2. 一般毒性試験

ラットを用いた 1 箇月間試験でブレンソカチブ 0、3、15 又は 100 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、投与に関連した有害所見は最高用量の 100 mg/kg/day のみでみられた。有害所見は、腎臓、ヒラメ筋、肺、及び腸間膜リンパ節における顕微鏡的所見などであった。腎臓の所見は、重量増加、軽微な尿細管空胞化、及び軽度から中等度の好塩基性尿細管がみられ、そのため混濁尿の発現率が上昇し、尿糖、タンパク質及び N-アセチル β-D-グルコサミニダーゼ（NAG）が増加した。ヒラメ筋の所見は軽微から軽度の筋線維変性／再生、肺の所見は重量増加、及びびまん性の肺胞マクロファージの軽微から中等度の集簇であった。肺の顕微鏡的所見は、透過型電子顕微鏡（TEM）によりリン脂質症（PLD）と一致していることが確認された。同様に、マクロファージの軽微から軽度の集簇が腸間膜リンパ節で観察された。100 mg/kg/day の投与ではその他にもいくつか変化がみられたが、これらの変化に対応する顕微鏡的所見は認められなかった。ブレンソカチブに関連する所見はいずれも 1 箇月間の回復期間終了後に完全に可逆的であったが、腎臓の尿細管空胞化の回復は部分的であった。15 mg/kg/day の投与では、雌の腎

臓で軽微な尿細管空胞化の発現率が上昇したが、尿検査所見には明らかな影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 15 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 28 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は（雄と雌を合わせた平均）、27.3 µM と 270 µM*h であった。

ラットを用いた 6 箇月間試験でブレンソカチブ 0、3、9 又は 50 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、投与に関連した有害所見は最高用量の 50 mg/kg/day のみでみられた。有害所見は腎臓と肺における顕微鏡的所見などであった。腎臓では髄質の外層で軽微から軽度の好塩基性尿細管がみられ、尿中 NAG の増加に関連していた。肺での顕微鏡的所見は、血管周囲の軽微から軽度の好中球浸潤の発現率上昇、及び空胞化マクロファージの集簇の軽微から著明な増加であり、TEM により PLD と一致した。50 mg/kg/day の投与で腎臓と肺にみられた所見は 3 箇月の回復期間終了後には完全に可逆的であった。NOAEL は 9 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は（雄と雌を合わせた平均）、17.8 µM と 196 µM*h であった。

イヌを用いた 1 箇月間試験でブレンソカチブ 0、3、15 又は 75 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、投与に関連した有害所見は最高用量の 75 mg/kg/day のみでみられた。有害所見は、腎臓、肝臓、骨髄、胸腺、精巣／精巣上体、肺、及び種々のリンパ造血網状系組織における顕微鏡的所見などであった。腎臓の所見は、尿細管の軽微から軽度の空胞化／変性、及び硝子円柱を伴う軽微な好塩基性尿細管であり、これに伴って尿タンパク質及び NAG が増加した。肝臓では肉眼的所見として著明な小葉構造と退色、顕微鏡的所見として小葉中心部の軽微から著明な空胞化がみられたが、肝細胞傷害のエビデンスは認められなかった。胸骨骨髄の所見は、脂肪組織細胞充実性の軽微から中等度の増加であった。胸腺の所見は、軽微から中等度の退行／萎縮を伴う臓器重量の減少であった。肺と種々のリンパ造血網状系組織では［腋窩リンパ節、気管支リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節、腸管関連リンパ組織（GALT）及び脾臓］、PLD と一致する軽微から中等度の空胞化マクロファージが観察された。さらに、精巣で精母細胞が軽度に腫大し、精巣上体で細胞残屑の重症度が軽微から軽度に上昇した。4 週間の回復期間終了後、腎臓所見の回復は部分的であったが、すべての所見は完全に可逆的であった。NOAEL は 15 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 28 の C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$（雄と雌を合わせた平均）は、9.49 µM と 138 µM*h であった。

イヌを用いた 6 箇月間試験でブレンソカチブ 0、2、8 又は 50 mg/kg/day を投与したとき、50 mg/kg/day は忍容性が不良で、8 mg/kg/day と 50 mg/kg/day では投与に関連した有害所見がみられた。50 mg/kg/day の投与では歯周病が生じたため、Week 18 の間に投与を中断し、Week 18 と Week 19 に雄雌それぞれ 7 匹中 4 匹を人道的安楽死させる必要が生じた。残りのイヌは引き続き観察して 26 週間の回復期間による回復状態を評価した。顕微鏡的所見は、8 mg/kg/day と 50 mg/kg/day の投与で精巣／精巣上体及び肺で用量に依存した変化、並びに 50 mg/kg/day で腎臓及びリンパ組織に用量に依存した変化であった。精巣の所見は、軽微から重度の精細管変性／萎縮、及びライディッヒ細胞の軽度の過形成／肥大（50 mg/kg/day のみ）であり、これに伴い精巣上体では細胞残屑の軽微から軽度の増加、精子細胞充実性の軽微から重度の減少、及び上皮細胞の軽度のアポトーシス（50 mg/kg/day のみ）がみられた。肺の所見は、重量増加、空胞化マクロ

ファージの軽微から著明な集簇（PLD に一致）などであり、50 mg/kg/day の投与ではリンパ組織（腋窩リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節、GALT 及び脾臓）でも同じ顕微鏡的所見がみられた。50 mg/kg/day の投与では更に、腎臓の皮髄境界部に軽微から軽度の尿細管再生が観察され、これに伴い一部のイヌでは血漿中尿素、クレアチニン及び尿中 NAG の濃度が上昇した。所見はいずれも、26 週間の回復期間終了後には完全に可逆的であったが、精巣／精巣上体及び歯周組織の回復は部分的であった。NOAEL は 2 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 181 の C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$（雄と雌を合わせた平均）は、0.948 µM と 12.7 µM*h であった。

イヌを用いた 9 箇月間試験でブレンソカチブ 0、1、2、4 又は 8 mg/kg/day を投与したときの忍容性は良好で、いずれの用量でも投与に関連した有害所見は認められなかった。NOAEL は 8 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したときの Day 273 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は（雄と雌を合わせた平均）、4.3 µM と 51.4 µM*h であった。この AUC 値は、以前に行われた 6 箇月間試験で同じ用量を投与したときの AUC 値よりも約 24%低い。この 2 試験は同じ試験施設で GLP に従って行われており（バイオアナリシス及びトキシコキネティクス解析を含む）、用いた被験物質投与液も動物供給業者も同一であるため、上記の差は個体差と考えられた。6 箇月間試験で 8 mg/kg/day 以上を投与したときにみられた精巣及び肺の顕微鏡学的変化が、9 箇月間試験で NOAEL を投与したときにみられなかったのは、9 箇月間試験では AUC が低値であったためと考えられた。9 箇月間試験のほうがブレンソカチブ投与期間が長く、雄の生殖能がより総合的に評価され、ブレンソカチブに関連する非臨床所見がいずれも用量／曝露依存的な閾値を示したため、9 箇月間試験で NOAEL（8 mg/kg/day）を投与したときの AUC は低値であったが、臨床曝露量の安全マージンを算出する際の基礎としてより適切と考えられる。

ラットとイヌを用いた 1 箇月間及び 6 箇月間の一般毒性試験では、標準的な毒性評価項目の他にも、好中球機能に対するブレンソカチブの作用（末梢血における酸化バースト及び食作用の評価など）も目的に応じた方法で評価した。酸化バーストの評価では、Phagoburst キットを使用して全血を調製し、採取から 24 時間以内に分析した。食作用の評価では、検体を pHrodo 蛍光生体粒子とともに培養し（適切な対照も培養した）、採取から 24 時間以内に分析した。好中球機能の評価では、活性酸素種を産生する能力が用量に関連してわずかに低下したが、食作用に影響は認められなかった。一部の試験では好中球数が増加した。全体として好中球における変化は感染率に影響を及ぼすほど意義のあるものではなく、有害ではないと判断される。

要約すると、ラットとイヌを用いた一般毒性試験で毒性の標的臓器が同定された。6 箇月間試験では、顕微鏡的変化が肺及び腎臓（ラットとイヌ）、リンパ組織、精巣／精巣上体及び歯周組織（イヌ）にみられた。肺とリンパ組織の形態学的変化は PLD に一致しており、PLD はブレンソカチブなどの陽イオン性両親媒性の薬剤に関連する現象としてよく明らかにされている。歯周病は非常に高用量で長期にわたり投与したときに生じるオンターゲット作用と考えられる。オンターゲットと考えられるが有害ではないその他の影響として、ラットとイヌで好中球の活性酸素種産生能が用量に比例してわずかに低下した。1 箇月間試験では、高用量で他の組織（ヒラメ筋、肝臓、胸腺及び骨髄など）に顕微鏡的所見があったが、6 箇月間試験ではこれらの所見はみられず、イヌを用いた 9 箇月間試験では著明な所見は認められなかった。

したがって NOAEL は、ラットを用いた 6 箇月間試験では 9 mg/kg/day、イヌを用いた 9 箇月間試験では 8 mg/kg/day と判断された。安全マージンは、ラットを用いた 6 箇月間試験で NOAEL（9 mg/kg/day）を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 10 倍であり、イヌを用いた 9 箇月間試験で NOAEL（8 mg/kg/day）を投与したときの AUC に基づくと、それぞれ 5 倍と 12 倍である。ヒトに MRHD を投与したときと 6 箇月間試験における最小毒性量（LOAEL）をラットに投与したときの曝露倍数は、ラットに 50 mg/kg/day を投与したときの定常状態での総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍、イヌに 8 mg/kg/day を投与したときの AUC に基づくとそれぞれ 7 倍と 16 倍である。参考として、安全マージンは、イヌを用いた 6 箇月間試験で NOAEL（2 mg/kg/day）を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 1 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 3 倍である（表 21）。

非臨床試験に使用した動物種で特定された標的臓器に対する毒性は、臨床試験でも可能なかぎり綿密にモニタリングした。これまでに、ヒトでは関連する安全性の懸念はみられていない。

1.3. 遺伝毒性及びがん原性

ブレンソカチブの遺伝毒性を ICH 標準試験バッテリー（*in vitro* Ames 試験、*in vitro* マウスリンパ腫 L5178Y 細胞アッセイ、又はラットを用いた *in vivo* 骨髄小核試験）（ICH S2（R1）ガイドライン）で評価したところ、遺伝毒性は認められなかった。

遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間がん原性試験でブレンソカチブ 0、5、15 又は 50 mg/kg/day を投与したとき、がん原性は認められなかった。50 mg/kg/day を投与したときの Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄で 56.1 µM と 298 µM*h、雌で 68.9 µM と 708 µM*hr であり、雄と雌を合わせた平均はそれぞれ 63 µM と 503 µM*h であった。

ラットを用いた 2 年間のがん原性試験でブレンソカチブ 0、3、10 又は 30 mg/kg/day を投与したとき、がん原性は認められなかった。30 mg/kg/day を投与したときの Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄で 45.3 µM と 428 µM*h、雌で 68.6 µM と 649 µM*hr であり、雄と雌を合わせた平均はそれぞれ 57 µM と 538.5 µM*h であった。

がん原性試験で最高用量を投与したときの AUC 値（雄と雌を合わせた平均）に基づいた安全マージンは、マウスを用いた試験における総ブレンソカチブの AUC に基づくと 52 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 67 倍、ラットを用いた試験で得た値に基づくとそれぞれ 56 倍と 26 倍である（表 21）。

1.4. 生殖発生毒性

ラットの受胎能は、雄については 6 箇月間一般毒性試験の一部、雌については EFD 毒性試験の本試験の一部として評価した。いずれの試験でも、試験に使用した最高用量（雄で 50 mg/kg/day、雌で 100 mg/kg/day）まで受胎能に対する影響は認められなかった。

6 箇月間試験で 50 mg/kg/day を投与したとき、Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は雄で 97.0 µM と 1460 µM*h、雄と雌を合わせた平均はそれぞれ 98.7 µM と 1450 µM*h であった。

ラットを用いた受胎能及び EFD 毒性試験では、雌ラットに交配の 2 週間前から妊娠 16 日目（GD16）までブレンソカチブ 3、20 又は 100 mg/kg/day を投与したところ、20 mg/kg/day 及び 100 mg/kg/day の投与で母動物にわずかな毒性がみられた（摂餌量及び／又は体重の変化）。最高用量の 100 mg/kg/day まで発情周期、交尾行動、雌の受胎能、胚・胎児の生存及び胎児の重量に対する有害作用はなく、胎児の大奇形も認められなかった。100 mg/kg/day の投与では、肩甲骨弯曲及び波状肋骨など骨格異常がみられた。20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の投与では、骨格変異の発現率及び骨化進行の差が増加し、3 mg/kg/day の投与では 1 匹の頭蓋骨のみで骨化遅延が認められた。NOAEL は、母動物毒性及び EFD 毒性に対しては 3 mg/kg/day、雌の受胎能に対しては 100 mg/kg/day と判断された。GD16 の平均 C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は、3 mg/kg/day を投与したときに 2.73 µM と 28.7 µM*h、100 mg/kg/day を投与したときに 84.4 µM と 1240 µM*h であった［先行の用量範囲設定（DRF）試験から得たデータに基づく］。この試験の文脈では、軽度の骨格奇形（肩甲骨弯曲及び波状肋骨）及び変異が有害と考えられ、これらの異常は母動物にわずかな毒性が生じたときにみられた。文献では、交配が確認されたラットを用いた長期 *in vivo* 試験において、非侵襲的なマイクロコンピュータ X 線断層撮影で長骨の弯曲（肩甲骨を含む）がみられても、生後 3 週間で完全に回復すると報告されている（De Schaepdrijver et al., 2014）。肩甲骨弯曲及び波状肋骨の所見は一過性（回復可能）であり、奇形でなく変異と考えるべきであり、環境要因に対する曝露の標準設定、又は、薬剤の安全用量設定に際してリスクアセスメントで使用すべきでないと結論されている（Kimmel et al., 2014）。

妊娠ウサギを用いた EFD 試験でブレンソカチブ 5、15 又は 50 mg/kg/day を GD7 ～ 19 に投与したとき、胚・胎児の生存又は発生に対する影響は認められなかった。母動物では、15 mg/kg/day 以上の投与で体重増加の抑制、50 mg/kg/day の投与で一過性の摂餌量減少などのわずかな毒性がみられた。母動物に対する NOAEL は 5 mg/kg/day と判断された。胚・胎児に対する NOAEL は 50 mg/kg/day と判断され、GD 19 の平均 C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 23 µM と 195 µM*h であった。

PPND 毒性試験で妊娠ラットにブレンソカチブ 3、9 又は 20 mg/kg/day を GD6 から授乳 20 日目（LD20）まで投与したとき、有害所見は認められなかった。F_0 の親動物全身毒性、F_1 の新生仔発生に対する毒性、全身毒性、生殖毒性、及び F_2 の胚生存に対する NOAEL は、最高用量の 20 mg/kg/day と判断された。この用量を初回投与後の F_0 の雌に投与したときの GD6 における平均 C_{max} と $AUC_{0\text{–}24h}$ は、14.1 µM と 163 µM*h であった。

生殖発生毒性試験の結果に基づいた安全マージンは、雄ラットに生殖能に対する NOAEL（50 mg/kg/day）を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍、雌ラットに受胎能に対する NOAEL（100 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 128 倍と 61 倍、ラット EFD 試験で NOAEL（3 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 3 倍と 1 倍であり、ウサギ EFD 試験で NOAEL（50 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 20 倍と 36 倍、ラット PPND 試験で NOAEL（20 mg/kg/day）を投与したときの値に基づくとそれぞれ 17 倍と 8 倍である。ラットを用いた EFD 試験でみられた肩甲骨弯曲及び波状肋骨を骨格変異と考え、ヒトにおけるリスクア

セスメントに使用しなければ、ラットに 100 mg/kg/day を投与したときの値に基づくとそれぞれ 128 倍と 61 倍である（表 21）。

1.5. その他の毒性

3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 光毒性アッセイでブレンソカチブの光毒性を評価したところ、光毒性は認められなかった。この他には独立した毒性試験は行っていない。これまでに得られているデータの全体的な評価に基づき、ブレンソカチブは治療として意味のある曝露量では免疫毒性や中毒・依存の可能性はないと考えられる。ブレンソカチブ原薬／製剤に含まれるすべての不純物又は分解物は、適格性が確認されている及び／又は適切に管理されているため、ブレンソカチブのヒトにおける主要代謝物について、独立した非臨床安全性試験は必要ではない。対象患者集団及び年齢範囲を考慮すると、幼若動物を用いた試験は必要ではないと判断された。

1.6. 結論

一般毒性試験では、ラットとイヌで毒性の標的臓器が特定され、毒性の特徴が適切に明らかにされた。ブレンソカチブに関連する毒性所見はいずれも用量依存的、可逆的であって、MRHD を投与したときの曝露量より高い曝露量で発現した。NOAEL は、ラットを用いた 6 箇月間試験では 9 mg/kg/day、イヌを用いた 9 箇月間試験では 8 mg/kg/day と判断され、MRHD を投与したときの AUC とこれらの用量をラットとイヌに投与したときの定常状態における AUC に基づいた安全マージンは、ラットにおける総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 10 倍、イヌから得た値に基づくとそれぞれ 5 倍と 12 倍である（表 21）。

6 箇月間試験では、NOAEL を超えた用量／曝露量で肺と腎臓（ラットとイヌ）、リンパ組織、精巣／精巣上体及び歯周組織（イヌ）に顕微鏡的変化がみられた。肺及びリンパ組織の形態学的変化は PLD と一致しており、歯周病はオンターゲット効果と考えられる。1 箇月間試験では、高用量で他の組織（ヒラメ筋、肝臓、胸腺及び骨髄など）に顕微鏡的所見があったが、より低用量を投与した 6 箇月間試験ではこれらの所見はみられず、イヌを用いた 9 箇月間試験では著明な所見は認められなかった。

ラットとイヌを用いた 6 箇月間及び 9 箇月間の試験は、6 箇月を超える臨床投与（6 歳以上の小児患者も含まれる）を十分に支持すると考えられ、この件は米国食品医薬品局（FDA）、欧州医薬品庁（EMA）及び英国医薬品医療製品規制庁（MHRA）などの主な規制当局との間で行われた話し合いで合意されている。さらに、動物で特定された潜在的な標的臓器に対する毒性は、臨床試験でも可能なかぎり綿密にモニタリングされているが、これまで、ヒトでは関連する安全性の懸念はみられていない。

遺伝毒性の徴候は、*in vitro* 試験でも *in vivo* 試験でも認められなかった。がん原性は、遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間試験では最高用量の 50 mg/kg/day まで、ラットを用いた 2 年間の試験でも高用量の 30 mg/kg/day までみられなかった。これらの用量を投与したときの AUC に基づいた安全マージンは、マウスの雄と雌を合わせた平均総ブレンソカチブの AUC に基づくと 52 倍、平均遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 67 倍、ラットでそれぞれ 56 倍と 26 倍である（表 21）。

ラットの生殖能については、雄で 50 mg/kg/day、雌で 100 mg/kg/day まで影響はなく、安全マージンは、雄における総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍、雌から得た値に基づくとそれぞれ 128 倍と 61 倍である。ラットを用いた EFD 試験では、100 mg/kg/day の投与まで胚・胎児の生存、胎児の重量に対する有害作用はなく、胎児の大奇形もみられず、安全マージンは総ブレンソカチブの AUC に基づくと 128 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 61 倍である。母動物にわずかな毒性がみられた用量では、仔にわずかな奇形と変異がみられたが回復可能であった。NOAEL（3 mg/kg/day）を投与したときの AUC に基づいた安全マージンは、総ブレンソカチブの AUC に基づくと 3 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 1 倍である。ウサギでは 50 mg/kg/day まで胚・胎児毒性はみられず、安全マージンは、50 mg/kg/day を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 36 倍である。ラットを用いた PPND 試験では 20 mg/kg/day まで有害所見はなく、安全マージンは、総ブレンソカチブの AUC に基づくと 17 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 8 倍である（表 21）。

In vitro アッセイでは潜在的な光毒性はみられなかった。治療として意味のある曝露量では免疫毒性や中毒・依存の可能性はないと考えられる。ブレンソカチブ原薬／製剤に含まれるすべての不純物又は分解物は、適格性が確認されている及び／又は適切に管理されているため、ブレンソカチブのヒトにおける主要代謝物について、独立した非臨床安全性試験は必要ではない。対象患者集団及び年齢範囲を考慮すると、幼若動物を用いた試験は必要ではないと判断された。

要約すると、ブレンソカチブの非臨床毒性の特性は、規制及び適用されるガイドラインに従って適切な試験系と試験デザインを使用して行われた試験で適切に解析されている。NCFBE に対する MRHD の安全マージンは、定常状態での総ブレンソカチブの AUC 及び遊離ブレンソカチブの AUC に基づいて算出され、妥当な値が確立された。これらのデータは総合的に、ブレンソカチブが NCFBE 患者の治療薬として適切な安全性プロファイルを有することを示している。

2. 単回投与毒性試験

ブレンソカチブについて独立した単回投与毒性試験は行われていないが、ラットとイヌを用いた予備的な用量範囲設定試験の最大耐量（MTD）評価期間では単回漸増投与も評価した（注：ブレンソカチブを単回投与したときの病理組織学的評価は行われていない）。ラットとイヌを用いた用量範囲設定試験は、3.1.1 項と 3.2.1 項にそれぞれ示す。

3. 反復投与毒性試験

ブレンソカチブの反復投与毒性試験は、Han Wistar ラットとビーグル犬に強制経口投与して行った。ブレンソカチブの DPP1 阻害能は、50%阻害濃度の負の対数（pIC_{50}）値がマウスで 7.6、ラットで 7.7、イヌで 7.8、ウサギで 7.8 及びヒトで 6.85 と動物種間で同様であることが示されており（Doyle et al., 2016）、ラットとイヌはブレンソカチブの毒性学的特性評価に意味のある動物種と考えられる。DPP1 阻害能が動物種間で同様であることは、平均 pIC_{50} がマウス、ラット、イヌ及びヒトで 7.29 ～ 7.77 の範囲であったことによっても支持される（Module 2.6.2 [表 3]）。

ラットとイヌを用いて予備的な MTD 及び反復投与毒性試験（非 GLP）を行い、用量制限毒性を特定し、主要試験（GLP）の適切な用量範囲を定義する際に参考とした。GLP 主要毒性試験は、ラットでは 1 箇月と 6 箇月、イヌでは 1 箇月、6 箇月及び 9 箇月の試験として行い、すべての試験で回復期間を設定した。

すべての反復投与毒性試験でトキシコキネティクス（TK）を分析した。TK データは Module 2.6.4 と Module 2.6.5 に示す。

3.1. ラットを用いた反復投与毒性試験

3.1.1. ラットを用いた MTD 評価及び 28 日間経口投与毒性試験（非 GLP、525710 試験）

本試験の目的は、ラットにブレンソカチブを強制経口投与して潜在的な毒性及び TK を測定することであった。本試験は、単回漸増投与し、その後 1000 mg/kg/day 又は 400 mg/kg/day を 5 日間反復投与する MTD 評価期間と（1000 mg/kg/day の投与では死亡／瀕死状態がみられたため 3 日間で終了）、3 種類の用量を 28 日間反復投与する期間（溶媒対照群も設定）の 2 期間で行われた（525710 試験）。この試験で得た TK データは Module 2.6.4 [3.3.2.1 項]に示す。

3.1.1.1. MTD 評価期間

MTD 評価期間ではラット 4 群を使用し（各群に雄と雌それぞれ 3 匹）、最初の 3 群には精製水で処方したブレンソカチブ 20、200 及び 1000 mg/kg を経口で単回漸増投与した。4 番目の群では 1000 mg/kg/day を 1 日 1 回、5 回投与する予定であったが、3 日目に 2 匹が死んだ状態で発見され、残りのラットでも一般状態の異常が度を越しており、動物福祉の観点から Day 4 と Day 8 に投与を中止した。反復投与時の MTD を確立するために、最初に 20 mg/kg の低用量を投与したラットに 15 日間のウォッシュアウト期間をおいて 400 mg/kg/day を 1 日 1 回、5 回投与した。1000 mg/kg/day を 3 日間投与し、瀕死状態のため安楽死させた又は死亡した状態で発見されたラットは完全な剖検を行い、一部の組織を保存して病理組織学的評価を行った。他の単回投与群及び反復投与群で残ったラットは、投与後の適切な時点で安楽死させ、剖検は行わなかった。

MTD 評価期間では、一般状態及び体重（該当する場合）に対する影響を評価した。

20 ～ 1000 mg/kg を単回投与したときにわずかな体重減少がみられたが、毒性の徴候は認められなかった。

400 mg/kg/day を 5 日間にわたり反復投与したとき、雌でわずかな体重減少、主に雄で鼻／口を床にこすりつける動作、流涎、活動性低下、半眼、行動性低下、立毛、皮膚の冷感及び努力性呼吸などの一般状態がみられた。

1000 mg/kg/day を 3 日間にわたり反復投与したとき、早期死亡が生じ、400 mg/kg/day を投与したときと同様の一般状態がみられたため早期終了となった。1000 mg/kg/day の投与では円背位、浅呼吸及び異常歩行も観察された。病理学的評価では骨格筋の筋線維変性及び脾臓と胸腺のリンパ球枯渇が示されたが、正確な死因は確定できなかった。リンパ系でみられた変化は状態悪化に付随して生じたと考えられたが、骨格筋の筋線維変性はブレンソカチブの直接作用と考えられた。

結論として、ラットにおけるブレンソカチブの MTD は、単回投与では 1000 mg/kg、5 日間反復投与では 400 mg/kg/day と特定された。

3.1.1.2. 28 日間反復投与期間

ブレンソカチブ投与群 3 群と対照群を設定し（各群に雄と雌それぞれ 5 匹）、ブレンソカチブ投与群にはブレンソカチブ 5、50 及び 200 mg/kg/day、対照群には溶媒（精製水）を投与した。200 mg/kg/day を投与したラットでは、525710 試験の MTD 評価期間でみられた一般状態の異常と同様の徴候がみられ、Day 7 には雌 1 匹が早期死亡したため、Day 8 にこの群のすべてのラットに対する投与を中止し、この群は Day 9 に早期終了した。残りの群では 1 日 1 回の投与を 28 日間継続した。

28 日間反復投与期間で評価したパラメータは以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量と摂水量、一部の Irwin スクリーニング、血液学的検査、好中球機能（食作用及び酸化バースト）、血液生化学的検査、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、チロキシン（T4）、growth-regulated oncogene α／keratinocyte chemoattractant、尿検査及び尿化学、バイオアナリシス及び TK 評価、臓器重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査。

一部の Irwin 評価による中枢神経系（CNS）の評価では、5 mg/kg/day 及び 50 mg/kg/day を投与した雄で引き起こし反応がわずかに減少し、反応減少の発現率は用量に関連して上昇した。さらに、50 mg/kg/day の投与では、流涎、立毛及び円背位の一般状態が間欠的にみられた。

臨床検査値の分析では、50 mg/kg/day を投与したラットで好中球の増加（雄のみ 66%）と尿中ナトリウムと NAG の増加（量的増加及び／又はクレアチニン比の増加）が示唆された。また、この用量では好中球の酸化バースト機能がわずかに低下していたが、食作用に影響は認められなかった。5 mg/kg/day 及び 50 mg/kg/day の投与で病理組織学的変化は認められなかったため、これらの用量を投与したときの影響は有害とは判断されなかった。

200 mg/kg/day の投与では、死亡した状態で発見された 1 匹を含め、体重減少（最大で-24%）及び摂餌量減少の一般状態の異常がみられたため、生存していたラットでも Day 9 に試験を早期終了する結果となった。この用量では摂水量も減少し、尿中 NAG が増加し（量的増加及び／又はクレアチニン比の増加）、尿中カリウムが減少した。200 mg/kg/day を投与したときの剖検での肉眼的所見では、全身の削痩がみられた。顕微鏡的所見では骨格筋（筋線維の変性）、脾臓と

胸腺（リンパ球枯渇）、肝臓（肝索の萎縮）及び膵臓（酵素前駆体の脱顆粒）などがみられた。MTD 評価期間と同様に、リンパ系、肝臓及び膵臓でみられた変化は、状態の悪化に付随して生じたと考えられたが、骨格筋の筋線維変性はブレンソカチブの直接作用と考えられた。他のパラメータにはブレンソカチブに関連する変化は認められなかった。

結論として、200 mg/kg/day の用量は 7 日を超える投与では忍容性がなく、死亡及び毒性の徴候が現れた。50 mg/kg/day を 28 日間投与したときの忍容性は良好で、臨床検査所見及び尿化学パラメータにいくつかのわずかな変化がみられた。臓器重量、体重又は摂餌量に顕微鏡的異常や影響は認められなかったため、50 mg/kg/day でみられた変化は有害ではないと判断された。

3.1.2. ラットを用いた 1 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、527409 試験）

Han Wistar ラットの 4 群に（各群は雄と雌それぞれ 10 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒）、3、15 又は 100 mg/kg/day を 1 日 1 回、1 箇月にわたり強制経口投与した（527409 試験：Module 2.6.7 [表 7A]）。対照群と 100 mg/kg/day 投与群にそれぞれ雄と雌を 5 匹ずつ追加し、28 日間の回復期間による回復状態を評価した（表 2）。対照群には、水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水を投与した。

表 2: ラットを用いた 1 箇月間試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Animals			
				Main Study		Recovery Study	
				Male	Female	Male	Female
1	0	10	0	10	10	5	5
2	3	10	0.3	10	10	-	-
3	15	10	1.5	10	10	-	-
4	100	10	10	10	10	5	5

本試験で評価したパラメータは以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、尿化学、好中球の機能（酸化バーストと食作用）、ミオグロビン値、臓器重量、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [Section 3.3.2.2 項]）、肉眼的及び顕微鏡的病理検査。さらに、対照群と高用量群の一部のラットから肺と腎臓の切片を採取して TEM で評価した。データは 8.6 項で別に考察する。酸化バーストの評価では、Phagoburst キットで全血を調製し、採取から 24 時間以内に分析した。食作用の評価では、検体を pHrodo 蛍光生体粒子とともに培養し（適切な対照も培養した）、採取から 24 時間以内に分析した。

試験中、早期の死亡はなかった。

100 mg/kg/day の投与では、投与後すぐに流涎と鼻／口を床にこすりつける動作の徴候が何度かみられたが、約 1 時間後には回復した。またこの用量では、ケージの床敷に黄色い汚れが Day 9 又は Day 10 から Day 29 の投与期間終了時まで観察されたが、回復期間中に消失した。

100 mg/kg/day を投与した雌は投与期間中、対照群のラットより体重増加がわずかに多く、回復期間中はわずかに少なかった。回復期間終了時には、体重は対照群のラットと同程度になった。雌では Week 1 のみ摂餌量がわずかに少なかったが、体重と摂餌量の変化の間には相関は認められなかった。雄では体重や摂餌量に対する影響は認められなかった。

100 mg/kg/day を投与した雄では投与最終週に摂水量がわずかに増加したが、回復期間終了時には摂水量は評価しなかった。

100 mg/kg/day の投与では、雄でも雌でも網状赤血球のわずかな増加（25% ～ 46%）と好中球のわずかな増加（60% ～ 76%）がみられたが、これらの所見は 28 日間の回復期間終了後には消失した。

投与期間の Week 4 に好中球機能を免疫学的に評価したところ、活性酸素種産生能が用量に関連してわずかに低下したが、食作用に影響は認められなかった。回復期間終了時の好中球機能評価の結果は、対照群と同様であった。

100 mg/kg/day の投与では、血漿中のアルカリホスファターゼ（ALP）（雄のみで約 30%）、リン酸（雄のみで約 44%）、胆汁酸（2.8 ～ 2.9 倍）及びコレステロール（31% ～ 38%）の濃度が上昇し、クロール（2% ～ 3%）の濃度は雄でも雌でも低下した。さらに、雄でも雌でも混濁尿の発現率が上昇し、尿中 NAG の増加（3.4 ～ 4.0 倍）、及び NAG／クレアチニン比が増加（2.9 ～ 3.0 倍）した。雄では尿糖（1.9 倍）、グルコース／クレアチニン比（1.6 倍）、タンパク質（1.6 倍）及びタンパク質／クレアチニン比（2.1 倍）も上昇したが、対応するクレアチニンの変化はなかった。これらの変化は 28 日間の回復期間終了後には消失したが、雌の胆汁酸は対照群のラットよりわずかに高いままであった（雄では消失）。

100 mg/kg/day を投与した雄と雌では、対照群のラットと比べて臓器の絶対重量及び相対重量が腎臓（12% ～ 19%）、肺（17% ～ 35%）、肝臓（7% ～ 19%）で増加した。これらの差は回復期間終了時には観察されなかった。

顕微鏡で組織学的所見が、腎臓、ヒラメ筋、肺、腸間膜リンパ節でみられた（表 3）。腎臓では、15 mg/kg/day 以上を投与した雌で軽微な尿細管空胞化の発現率が上昇し、100 mg/kg/day を投与した雄で尿細管の軽微な空胞化と軽度から中等度の好塩基性尿細管の発現率が上昇した。100 mg/kg/day の投与では更に、雄のヒラメ筋で軽微から軽度の筋線維変性／再生、雄と雌の肺で軽微から中等度の肺胞マクロファージの集簇、及び雄の腸間膜リンパ節で軽微から軽度のマクロファージ集簇がみられた。肺における顕微鏡的所見はリン脂質症（PLD）と一致することが TEM で確認された（8.6 項）。28 日間の回復期間終了後にはいずれの所見も可逆的であったが、雌の腎臓における尿細管空胞化の回復は部分的であった。

他のパラメータについては、毒性学的に重要でブレンソカチブの投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

表 3: ラットを用いた 1 箇月間試験で投与期間終了時にみられたブレンソカチブに関連する組織学的所見

Dose (mg/kg/day)	0		3		15		100	
Histopathology: (Sex: No. of Animal Examined)	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**	**M: 10**	**F: 10**
Kidney								
Tubular basophilia, outer medulla								
Mild	0	0	0	0	0	0	3	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Tubular vacuolation								
Minimal	0	1	0	1	0	3	2	10
Soleus muscle								
Myofiber degeneration/regeneration								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	0
Mild	1	0	0	0	0	0	1	0
Lung								
Alveolar macrophage accumulation, diffuse								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	5
Mild	0	0	0	0	0	0	3	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	6	1
Mesenteric lymph node								
Increased cellularity, macrophage								
Minimal	0	0	0	1	0	0	3	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0

F = female, M = male.

結論として、ラットにブレンソカチブ 100 mg/kg/day を 28 日間経口（強制）投与したとき、忍容性があり、投与に関連する顕微鏡的所見は腎臓（雄と雌で尿細管空胞化、雄で好塩基性尿細管の発現率上昇）、ヒラメ筋（筋線維の変性／再生）、肺（PLD と一致するびまん性の肺胞マクロファージ集簇）及び腸間膜リンパ節（マクロファージの集簇）にみられ、腎臓と肺の重量が増加した。28 日間の回復期間終了後はいずれの所見も完全に回復したが、雌の尿細管空胞化の回復は部分的であった。15 mg/kg/day の投与では、雌で軽微な腎臓所見（尿細管空胞化）の発現率が上昇したが、尿検査には明らかな影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 15 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したとき、Day 28 において雄と雌を合わせた平均全身曝露量（C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$）は、27.3 µM と 270 µM*h であった。

3.1.3. ラットを用いた 6 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、528313 試験）

本試験では Han Wistar ラット 4 群に（各群は雄と雌それぞれ 15 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒）、3、9 又は 50 mg/kg/day を 1 日 1 回、6 箇月にわたり強制経口投与した（528313 試験：Module 2.6.7 [表 7B]）。対照群と 50 mg/kg/day 投与群にそれぞれ雄と雌を 10 匹ずつ追加し、3 箇月間の回復期間による回復状態を評価した。また、各群に雌 15 匹を追加し（投与せず）、10 週間投与後の雄の生殖能を評価した（表 4）。対照群には、水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水を投与した。

表 4:　　ラットを用いた 6 箇月間試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Animals				
				Main Study		Recovery Study		Fertility
				Male	Female	Male	Female	Female[a]
1	0	10	0	15	15	10	10	15
2	3	10	0.3	15	15	-	-	15
3	9	10	0.9	15	15	-	-	15
4	50	10	5	15	15	10	10	15

[a] Fertility assessment females were not dosed but were mated with dosed main study males in Week 10 at the dose levels indicated.

本試験で評価したパラメータは以下のとおりである：一般状態、眼科検査、体重及び体重変化、摂餌量及び摂水量、雄の交尾行動及び生殖能、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査及び尿化学、好中球機能、ミオグロビン、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.2.3 項]）、臓器重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査、TEM。

本試験中に 2 匹が予定外に死亡した。3 mg/kg/day を投与した雄 1 匹及び対照群の雄 1 匹で、Week 13 後に眼窩静脈叢出血が生じて眼球が突出したため、Day 86 と Day 93 に安楽死させた。顕微鏡では眼の炎症が確認されたが、ブレンソカチブに関連する肉眼的所見及び顕微鏡的所見は認められなかった。これらの予定外の死亡とブレンソカチブ投与の間に関連はないと判断された。

ブレンソカチブを 10 週間にわたり連日投与したとき、いずれの用量でも雄の交尾行動や生殖能に影響は認められなかった（6.1.1 項）。

好中球の食作用及び酸化バーストに関する機能を分析したところ、すべての時点で個体内及び個体間でばらつきがみられたが、結果の範囲はブレンソカチブを投与したラットと同時対照の間で同様であった。これらの結果は 50 mg/kg/day までの用量は好中球機能に影響を及ぼさないことを示す。

50 mg/kg/day の投与では、Week 3 以降の投与直後に流涎と鼻／口を床にこすりつける動作の一般状態が時々みられ、26 週間の投与期間及び回復期間の最初の 2 週間まで、ケージの床敷に黄色の汚れが観察された。この他には、ブレンソカチブの投与に関連すると考えられる一般状態はみられなかった。

血液生化学的検査には複数の変化があり、すべてのブレンソカチブ投与群（雄）で個別のラット、及び 9 mg/kg/day を投与した個別の雌と 50 mg/kg/day を投与した個別の雌で、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の中等度から著明な高値、すべての雄群で胆汁酸のわずかな高値、50 mg/kg/day を投与した雄と雌で尿素のわずかな減少、50 mg/kg/day を投与した雄と雌でコレステロールのわずかな高値とトリグリセリドのわずかな低値、及び 50 mg/kg/day を投与した雄でリン酸のわずかな高値がみられた。対応する顕微鏡的所見が認められなかったため、これらの臨床検査所見の意味は不明であるが、回復

期間終了時でも 50 mg/kg/day を投与した複数の雄及び雌 1 匹で AST 及び ALT 値が高く、50 mg/kg/day を投与した雌では尿素とトリグリセリド値は低かった。

50 mg/kg/day を投与した雄と雌では尿中 NAG と NAG／クレアチニン比もわずかに上昇しており、以下に記載する腎臓の顕微鏡的所見と関連する可能性がある。この変化は回復期間終了時には消失していた。

対照群と比較すると、3 mg/kg/day 以上を投与した雄で精嚢腺重量が統計学的に有意に小さく（絶対値及び終末期の体重に対する相対値）、50 mg/kg/day を投与した雄で統計学的に有意ではないが前立腺重量が小さかった（絶対値及び終末期の体重に対する相対値）。これらの組織で対応する組織学的所見はみられず、雄の生殖能にも影響は認められなかった。これらの変化は回復期間終了時にはみられなかった。

50 mg/kg/day の投与で、顕微鏡的所見が腎臓（雄のみ。髄質の外層の好塩基性尿細管）及び肺（雌で血管周囲の好中球浸潤の発現率上昇、雄と雌で肺胞のびまん性空胞化マクロファージ集簇）がみられた（表 5）。

50 mg/kg/day を投与した雄と雌の肺から得た顕微鏡写真を TEM で評価したところ、雄で肺胞マクロファージのリソソーム（二次）に膜の残留物蓄積、及び肺胞マクロファージ二次リソソーム（膜の残留物の蓄積はない）が増加しており、リソソーム活性の増加が示唆された。さらに、雌ではリソソーム物質の蓄積増加と関連すると考えられる肺胞マクロファージの増大がみられ、PLD と一致していた。回復期間終了時には雄でブレンソカチブに関連する所見が認められなかったため、これらの所見は完全に回復したことが示唆される（雌の超微細構造は回復期終了時には評価しなかった）。

他のパラメータについては、毒性学的に重要でブレンソカチブ投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

結論として、ラットにブレンソカチブ 3、9 又は 50 mg/kg/day を 26 週間にわたり経口（強制）投与したときの忍容性は良好であった。50 mg/kg/day の投与では、顕微鏡的変化が腎臓（雄で髄質の外層における好塩基性尿細管）及び肺［雌で血管周囲の好中球浸潤の発現率上昇、及び雄と雌で空胞化マクロファージ集簇（TEM でリソソーム活性／リソソーム物質の蓄積の増加と確認）］にみられた。3 mg/kg/day 以上の投与で精嚢重量が減少、50 mg/kg/day の投与で前立腺重量が減少した。これらの所見はいずれも、3 箇月間の回復期間終了後には完全に可逆的であった。50 mg/kg/day の投与で腎臓と肺に所見があったため、NOAEL は 9 mg/kg/day と判断された。NOAEL を投与したとき、Day 182 において雄と雌を合わせた平均全身曝露量（C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$）は、17.8 µM と 196 µM*h であった。

表 5: ラットを用いた 6 箇月間試験で投与期間終了時にみられたブレンソカチブに関連する組織学的所見

Dose (mg/kg/day)	0		3		9		50	
Histopathology: (Sex: No. of Animals Examined[a])	**M:15**	**F:15**	**M:14**	**F:15**	**M:15**	**F:15**	**M:15**	**F:15**
Kidney								
Tubular basophilia, outer medulla								
Minimal	0	0	0	-	0	-	10	0
Mild	0	0	0	-	0	-	2	0
Lung								
Cellular debris; alveolar								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration, neutrophilic; perivascular								
Minimal	4	1	3	1	5	2	1	6
Mild	0	2	0	1	0	1	0	1
Vacuolated macrophage accumulation; alveolar								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	4
Mild	0	0	0	0	0	0	6	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	2

[a] Low and mid dose groups were evaluated for target tissues identified initially by examination of control and high dose groups only: kidney (males only), prostate gland (males), and lungs (males and females).
F = female; M = male.

3.2. イヌを用いた反復投与毒性試験

3.2.1. イヌを用いた MTD 評価と 14 日間反復投与毒性試験（非 GLP、525726 試験）

イヌを用いた MTD を予備的に評価する 14 日間反復投与毒性試験では、精製水で処方したブレンソカチブを投与して制限用量を特定し、主な毒性の特徴を分析した（525726 試験）。本試験は、MTD 評価期間と用量範囲設定（DRF）期間の 2 期間で行われた。

両期間で評価したパラメータは以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.4.1 項]）、臓器重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査。さらに DRF 評価期間では、凝固、総胆汁酸、T4、TSH、インターロイキン-8、好中球機能（食作用及び酸化バースト）、尿検査、及び肝組織における肝チトクローム P450 誘導も評価した。

3.2.1.1. MTD 評価期間

MTD 評価期間ではビーグル犬の雄と雌を 1 匹ずつ使用した。イヌには 100、300、600 及び 1000 mg/kg を単回漸増強制経口投与し（投与と投与の間は 3 ～ 4 日）、その後 600 mg/kg/day を 3 日間連続して 1 日 1 回投与した。イヌは最終投与の翌日に剖検した。

100、300、600 及び 1000 mg/kg を単回投与し、600 mg/kg/day を 3 日間連続して 1 日 1 回投与した後の一般状態として、流涎、泡状／液状／粘液状の嘔吐（色は白／茶／黄）、及びケージに未

消化の食餌と液状便が観察された。これらの所見は全般に用量が高いほど発現率も重症度も高く、持続期間も長く、1000 mg/kg の投与では体重減少と摂餌量減少も伴っていた。

臨床検査所見から、600 mg/kg/day を 3 日間にわたり 1 日 1 回投与した雄で、投与前に比べてリンパ球数が減少し、複数の血液生化学的検査値が上昇したが［600 mg/kg/day を 3 日間投与した後に ALT と AST の増加（2 ～ 5 倍）：100 mg/kg を単回投与したイヌでクレアチンホスホキナーゼの増加（CPK：2 ～ 4 倍）］、これより高用量ではみられなかった。MTD 投与期間全体で、トリグリセリドとコレステロールが増加傾向であった。

雄と雌における病理組織学的所見は、600 mg/kg/day を 3 日間にわたり 1 日 1 回投与したときも 14 日間反復投与期間も同様であった（以下に示す）。

3.2.1.2. 14 日間反復投与期間

DRF 評価期間では、ビーグル犬 8 匹を 4 群（各群に雄と雌それぞれ 1 匹）に分け、ブレンソカチブ 0（溶媒の精製水）、10、75 又は 300 mg/kg/day を 1 日 1 回、14 日間にわたり強制経口投与し、最終投与の翌日に剖検した。

75 mg/kg/day 及び 300 mg/kg/day を投与した 14 日間反復投与期間にも、MTD 評価期間と同様の一般状態がみられた（300 mg/kg/day を投与したときのほうが発現率も重症度も高かった）。10 mg/kg/day を投与したイヌには一般状態の異常はみられなかった。体重増加及び摂餌量にブレンソカチブの投与による影響は認められなかった。

75 mg/kg/day 及び／又は 300 mg/kg/day の投与では、血漿中 ALT、AST 及びグルタミン酸脱水素酵素（GLDH）の濃度が上昇し、肝臓重量（体重に対する相対重量）は、ブレンソカチブを投与したすべての雌及び 300 mg/kg/day を投与した雄で対照よりも高値であった（約 20%）。肝臓にはこれらの関連する病理組織学的変化は認められなかった。その他にも 75 mg/kg/day 又は 300 mg/kg/day の投与では、その他の複数の血液生化学的検査値に変化がみられた（乳酸脱水素酵素、コレステロール、トリグリセリド、尿素、クレアチニン、総胆汁酸の増加）。

好中球機能の検査では、ブレンソカチブを投与したイヌで食作用への影響は認められなかったが、酸化バースト能力が低下していることが示された。

尿糖は 300 mg/kg/day を投与した雄で Week 2 で高値であった。

病理組織学的所見は MTD 評価期間と DRF 評価期間で全般に同様であり、DRF 評価期間では骨髄（胸骨）脂肪組織の細胞充実性の軽度から中等度の増加、GALT、リンパ節（腋窩リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節）及び脾臓（リンパ系コンパートメントのみ）に軽微から軽度の空胞化マクロファージがみられ、全般に用量の増加とともにこれらの所見の重症度も上昇した。いずれの期間でも病理組織学的所見と明らかな相関のある一般状態又は臨床検査値の変化はみられなかったため、病理組織学的所見は有害ではないと判断された。

酵素結合免疫測定法で肝組織を測定したところ、肝ミクロソームの CYP1A1/2、CYP2B11、CYP2C21 及び CYP3A12 タンパク質の誘導はみられなかった。

結論として、イヌを用いた MTD 評価期間と 14 日間反復投与期間の結果に基づき、ブレンソカチブを強制経口投与で単回投与したときの MTD は、試験に使用した最高用量である 1000 mg/kg/day と判断された。しかし、反復投与期間での一般状態及び体重と摂餌量のわずかな減少は用量制限と判断され、その後の期間では減量した（MTD 固定用量期間では 600 mg/kg/day を 3 日間、300 mg/kg/day を 14 日間投与）。10、75 又は 300 mg/kg/day を強制経口投与で 1 日 1 回、14 日間にわたり反復投与したときの著明な影響は、流涎、嘔吐、軟便及び血液生化学的検査値の変化（75 mg/kg/day と 300 mg/kg/day）、病理組織学的所見は、GALT、リンパ節及び脾臓（リンパ系コンパートメントのみ）などの複数のリンパ組織における空胞化マクロファージの増加（主に B 細胞濾胞／皮質領域）、並びに骨髄（胸骨）の脂肪組織量増加の発現率上昇であった。

3.2.2. イヌを用いた 1 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、527414 試験）

本試験ではビーグル犬 4 群に（各群は雄と雌それぞれ 3 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒）、3、15 又は 75 mg/kg/day を 1 日 1 回、28 日間にわたり強制経口投与し、イヌは最終投与の翌日に剖検した（527414 試験：Module 2.6.7 [表 7C]）。高用量群に雄と雌それぞれ 3 匹を追加し、回復状態を評価した。これらのイヌの剖検は最終投与から 28 日後以降（雄は 32 日後、雌は 30 日後）に行った（表 6）。溶媒（対照）は、水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水であった。

評価したパラメータは以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量、眼科検査、心電図、血液学的検査及び凝固検査、血液生化学的検査（ミオグロビンを含む）、好中球機能（食作用と酸化バースト）、尿検査、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.4.2 項]）、臓器重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査。さらに、対照群と高用量群の一部のイヌから肺の切片を採取して TEM で評価した。データは 8.6 項で別に考察する。

表 6: イヌを用いた 1 箇月間試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Animals			
				Main Study		Recovery Study	
				Male	Female	Male	Female
1	0	5	0	3	3	-	-
2	3	5	0.6	3	3	-	-
3	15	5	3	3	3	-	-
4	75	5	15	3	3	3	3

試験中、死亡したイヌ又は瀕死状態になったイヌはいなかった。

15 mg/kg/day 又は 75 mg/kg/day の投与では、投与後 2 時間以内に流涎、及びケージに粘液状／泡状／液状の嘔吐又は物質（色は白／黄／茶で、被験物質を含む可能性がある）の徴候がみられ、発現率に基づくと明らかに用量に対する反応であった。さらに 75 mg/kg/day の投与では、液状便又は粘液状の物質を含む便、及び異常な色（オレンジ／黄／緑）の便も観察された。

好中球機能の免疫学的評価では、15 mg/kg/day 又は 75 mg/kg/day の投与で Week 4 に活性酸素種産生能が用量に関連してわずかに低下したが、いずれの用量でも食作用に影響は認められなかった。

75 mg/kg/day の投与では、Week 1 と Week 4 に心拍数が増加し、その後、心電図で PR 間隔と QT 間隔が短縮した。しかし、QT 間隔を心拍数で補正すると明らかな短縮は認められなかった。投与期間中、血漿中ミオグロビン濃度は上昇したが（75 mg/kg/day を投与した雌 1 匹で CPK 濃度も上昇）、心筋又は骨格筋にミオグロビン濃度上昇に対応する病理学的所見は認められなかった。

肝臓では、75 mg/kg/day を投与したイヌの肉眼観察として著明な小葉構造と退色、顕微鏡観察として軽微から著明な小葉中心部の空胞化がみられたが、肝細胞傷害のエビデンスは認められなかった。

75 mg/kg/day を投与したイヌの顕微鏡的所見は、肺と種々のリンパ造血網状系組織（腋窩リンパ節、気管支リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節、GALT 及び脾臓）において、PLD と一致する軽微から中等度の空胞化マクロファージであった。胸腺では臓器重量の低下、及びこれに関連した顕微鏡的所見として軽微から中等度の退行／萎縮が観察され、胸骨骨髄の顕微鏡的所見は、軽微から中等度の脂肪組織細胞充実性の増加であった。

75 mg/kg/day の投与では、腎臓に軽微から軽度の尿細管空胞化／変性、及び軽微な好塩基性尿細管と硝子円柱がみられ、これらの変化は、尿中タンパク質及び NAG と関連する可能性がある。尿中タンパク質と NAG は 3 mg/kg/day 又は 15 mg/kg/day を投与した雄でも増加したが、これに対応する腎臓の病理組織学的所見は認められなかった。

75 mg/kg/day を投与したイヌでは、精巣で精母細胞が腫大し、精巣上体で細胞残屑の重症度が上昇した（表 7）。

腎臓の好塩基性尿細管を除いて、回復期間終了時には上記の所見はみられなかった。

他のパラメータについては、毒性学的に重要でブレンソカチブの投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

結論として、イヌにブレンソカチブ 75 mg/kg/day を 1 日 1 回、28 日間経口（強制）投与したとき、忍容性はあったが、組織学的所見が腎臓（好塩基性尿細管及び尿細管変性）、肝臓（著明な小葉構造、肝細胞の退色及び空胞化）、骨髄（脂肪組織の増加）、胸腺（退行／萎縮及び重量低下）、精巣及び精巣上体（精母細胞の腫大及び細胞残屑の重症度の増加）、肺、及び種々のリンパ造血網状系組織（空胞化マクロファージ）にみられた。4 週間の回復期間終了後には、腎臓の好塩基性尿細管のみが残存していた。15 mg/kg/day 群ではこれらの所見はなく、一過性の徴候と尿パラメータのわずかな変化がみられたのみであったため、この用量が NOAEL と判断された。NOAEL を投与したときの Day 28 において雄と雌を合わせた平均全身曝露量（C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$）は、9.49 µM と 138 µM*h であった。

表 7:　イヌを用いた 1 箇月間試験でみられたブレンソカチブに関連する精巣及び精巣上体の病理組織学的所見

	At End of Dosing				Recovery
Dose (mg/kg/day)	**0**	**3**	**15**	**75**	**75**
Histopathology: No. of Male Dogs	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
Testes					
Swollen spermatocytes	0	0	0	3	0
Mild	0	0	0	3	0
Epididymides					
Cellular debris, abnormal	2	0	0	3	0
Minimal	2	0	0	1	0
Mild	0	0	0	2	0

3.2.3.　イヌを用いた 6 箇月間経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、528329 試験）

本試験ではビーグル犬 4 群に、ブレンソカチブ 0（溶媒対照）、2、8 又は 50 mg/kg/day を 1 日 1 回、26 週間にわたり経口投与し、その後 26 週間を回復期間とする予定であった（528329 試験：Module 2.6.7 [表 7D]）。各群は雄と雌それぞれ 4 匹で、0 mg/kg/day 群と 50 mg/kg/day 群に雄と雌それぞれ 3 匹を追加し、回復状態を評価した（表 8）。50 mg/kg/day の投与で歯に有害所見があったため、この投与群では最終投与を Day 122（Week 18）とし、最も重症であった雄と雌 7 匹中 4 匹を Day 122 ～ 130（Week 18 ～ 19）の間に剖検した。残ったイヌは 26 週間にわたって回復状態を評価し、Day 314 に剖検した。回復期対照動物には Day 140 まで投与し（投与期間全体は 20 週間）、24 週間の回復後の Day 314 に剖検した。主試験で対照動物と 2 mg/kg/day 又は 8 mg/kg/day を投与したイヌは、26 週間の投与を完了してから剖検した。溶媒（対照）は、水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水であった。

評価した項目は以下のとおりである：一般状態、体重及び体重の変化、摂餌量、眼科検査、心電図、血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、ミオグロビン、好中球機能（食作用と酸化バースト）、尿検査と尿化学、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.4.3 項]）、臓器重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査、及び TEM。

表 8:　イヌを用いた 6 箇月間試験の実験デザイン

Group No.	**Dose (mg/kg/day)**	**Dose Volume (mL/kg)**	**Formulation Concentration (mg/mL)**	**Number of Animals**			
				Main Study		**Recovery Study**	
				Male	**Female**	**Male**	**Female**
1	0	5	0	4	4	3	3
2	2	5	0.4	4	4	-	-
3	8	5	1.6	4	4	-	-
4[a]	50[a]	5	10	4	4	3	3

[a] Due to adverse dental findings, the final dose was administered on Day 122 (Week 18) and the most severely affected 4 dogs of each sex were necropsied between Days 122 and 130 (Week 18 or 19); the remaining dogs were retained to assess recovery and were subjected to necropsy on Day 314 (following 26 weeks without dosing).

ブレンソカチブ 50 mg/kg/day の投与では、歯肉炎、歯石で覆われた歯、歯肉の後退と歯根の露出、歯肉出血とぐらつく歯などの一般状態、及び歯槽骨の吸収と線維化を伴う歯周組織の炎症などの病理学的所見を特徴とする歯周病が発現した。この用量では、好中球による活性酸素種の産生も阻害された。投与を中止すると歯周病の徴候は消失し、好中球機能は対照動物と同程度に戻ったが、病理学的には歯周組織の炎症が回復期間終了時でも残存していた。

ブレンソカチブに関連するその他の一般状態は、すべての用量で流涎、軟便及び／又は液状便及び嘔吐のみであり、発現率及び／又は重症度は用量に関連して上昇した。

本試験では、心電図パラメータを投与前、Week 1，Week 19（第 4 群のみ）、Week 26（第 1 群 ～ 第 3 群）、及び回復期間終了時（第 1 群 ～ 第 4 群）に評価したが、ブレンソカチブに関連する影響はみられなかった。

臨床検査値の変化は 50 mg/kg/day の投与でのみみられた。投与期間中は好中球数が増加し、損なわれた好中球機能に対する代償的な反応及び／又は歯周組織に生じた炎症の直接の結果と考えられる。投与期間中、血漿中の AST、ALT、GLDH、CPK、胆汁酸、コレステロール及びミオグロビン濃度はわずかから中等度に上昇したが、これらに対応する顕微鏡的所見は認められなかった。血漿中尿素とクレアチニン、及び尿中 NAG と NAG／クレアチニン比が一部のイヌで上昇し、腎臓での組織学的所見と関連する可能性がある（以下に記載）。

50 mg/kg/day を投与し、予定外に安楽死させたイヌでは、肝臓及び副腎の平均絶対重量及び相対重量が増加したが、対応する病理組織学的所見は認められなかった。

50 mg/kg/day を投与したイヌの予定外の剖検では、肺の虚脱はなく、退色／濃い色の変色／病巣が認められ、異常な硬さ及び重量の増加がみられた。肺実質に、ブレンソカチブに関連すると考えられる病理組織学的所見は認められなかった。ただし、PLD に一致する空胞化マクロファージの集簇が肺胞、及びリンパ組織（腋窩リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節、GALT 及び脾臓）で観察された。8 mg/kg/day を投与したイヌの剖検時の肺の所見は色の薄い病巣のみであり、病理組織学的には肺胞に空胞化マクロファージが集簇していたが、発現率と重症度は 50 mg/kg/day を投与したイヌより低かった。TEM による観察では（50 mg/kg/day を投与したイヌ）、肺胞マクロファージでリソソーム（二次）における膜残遺物の蓄積、及び二次リソソーム（膜残遺物の蓄積はない）の数が増加していた。これらの変化は、6 箇月の回復期間終了後にはみられなかった。

8 mg/kg/day 又は 50 mg/kg/day を投与した雄では、精巣で用量に依存した軽微から重度の精細管の変性／萎縮がみられ、数匹では精巣上体で精子の重度の減少と軽微から軽度の細胞残屑の増加を伴っていた（表 9）。50 mg/kg/day の投与のみでみられたその他の所見は、精巣の間質（ライディッヒ）細胞の軽度の肥大／過形成、及び一部のイヌで精巣上体の上皮細胞の軽度なアポトーシスであった。26 週間の回復期間終了後は 50 mg/kg/day を投与したイヌでみられた精巣内の変

化は部分的に回復した。最小用量（2 mg/kg/day）では、精巣にも精巣上体にもブレンソカチブに関連した所見は認められなかった（厳密には、軽微な毒性所見は一部で認められたものの、いずれも一過性であり本試験の条件下では NOAEL も 2 mg/kg/day と設定した）。この結果は、病理専門家の [redacted] による独立した病理学的評価と（[redacted]）、同じ研究所で年齢が一致した対照動物からこれまでに得られているデータの評価（[redacted]）の双方によって確認された。[redacted] は 6 箇月間試験の他にも、イヌを用いた用量範囲設定試験（非 GLP）及び 1 箇月間試験（GLP）で雄の生殖組織を評価している。

表 9: イヌを用いた 6 箇月間試験において精巣と精巣上体で観察されたブレンソカチブに関連する所見

Dose (mg/kg/day)	At End of Dosing				Recovery	
	0	2	8	50	0	50
Histopathology: (Number of Male Dogs Assessed)	**4**	**4**	**4**	**4**	**3**	**3**
Testes						
Tubular degeneration / atrophy	1	0	3	4	0	0
Minimal	1	0	1	0	0	0
Mild	0	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	1	0	0	0
Marked	0	0	0	1	0	0
Severe	0	0	0	3	0	0
Leydig cell hyperplasia / hypertrophy	0	0	0	4	0	1
Mild	0	0	0	4	0	1
Hypospermatogenesis	0	1	0	0	0	3
Minimal	0	0	0	0	0	1
Mild	0	1	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	1
Epididymides						
Increased cellular debris	1	2	3	2	0	0
Minimal	1	2	1	2	0	0
Mild	0	0	2	0	0	0
Apoptosis, initial segment	0	0	0	2	0	0
Mild	0	0	0	2	0	0
Decreased sperm cellularity	0	1	1	4	0	1
Minimal	0	1	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	1
Severe	0	0	1	4	0	0

Note: Dosing duration was 18 weeks for the high dose and 6 months for the other doses.

50 mg/kg/day の投与では、腎臓の皮髄境界部で軽微から軽度の好塩基性尿細管（尿細管再生）の顕微鏡的所見があったが、これらの変化は回復期間終了時には消失した。腎臓での顕微鏡的所見は、一部のイヌにおける血漿中尿素とクレアチニン濃度の上昇、及び尿中 NAG と NAG／クレアチニン比の上昇に寄与したと考えられる。

他のパラメータについては、毒性学的に重要でブレンソカチブの投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

結論として、ブレンソカチブ 50 mg/kg/day を経口（強制）投与したとき、歯周病が生じたため Week 18 に投与を中止し、この群の雄と雌それぞれ 7 匹中 4 匹を予定外に剖検しなければならなくなった。回復期間終了時には、残りの雄と雌それぞれ 3 匹の歯周病は回復していたが、病理学的所見として歯周組織の炎症が残存していた。8 mg/kg/day 及び 50 mg/kg/day の投与では、精巣及び精巣上体に用量に依存した変化が生じた。また、これらの用量の投与で空胞化マクロファージが肺に集簇し、50 mg/kg/day の投与ではリンパ組織（腋窩リンパ節、下顎リンパ節及び腸間膜リンパ節、GALT 及び脾臓）でも空胞化マクロファージの集簇が観察された。50 mg/kg/day の投与では腎臓の皮髄境界部で尿細管再生が観察された。肺、リンパ組織及び腎臓での所見は回復期間終了時には存在しなかったが、精巣と精巣上体及び歯周組織での変化は部分的に回復したのみであった。2 mg/kg/day を投与したイヌにおいてブレンソカチブに関連する所見は、一過性で有害ではない徴候のみであった。したがって、この試験の条件下での NOAEL は 2 mg/kg/day と判断され、NOAEL を投与したとき、Day 181 において雄と雌を合わせた平均全身曝露量（C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$）は 0.948 µM と 12.7 µM*h であった。

3.2.4. イヌを用いた 9 箇月間の経口投与毒性試験及び回復性評価（GLP、505523 試験）

本試験では、ビーグル犬 5 群にブレンソカチブ 0（溶媒対照）、1、2、4 又は 8 mg/kg/day を 1 日 1 回、39 週間にわたって経口投与した（505523 試験：Module 2.6.7 [表 7E]）。各群は雄と雌それぞれ 4 匹で、0 mg/kg/day 群と 8 mg/kg/day 群に雄と雌それぞれ 6 匹を追加し、26 週間の回復期間終了後の回復状態を評価した（表 10）。溶媒（対照）は、水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水であった。Week 36 から Week 39 の投与期間終了までは、すべての投与処方に不純物A* を 0.06 mg/kg/day の濃度で添加して毒性学的適格性を評価した。

表 10: イヌを用いた 9 箇月間試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Animals			
				Main Study		Recovery Study	
				Male	Female	Male	Female
1	0	5	0	4	4	6	6
2	1[a]	5	0.2	4	4	-	-
3	2[a]	5	0.4	4	4	-	-
4	4[a]	5	0.8	4	4	-	-
5	8[a]	5	1.6	4	4	6	6

※新薬承認情報提供時に置き換え

[a] From Week 36 to the end of dosing period in Week 39, the impurity (不純物A*) was included with the dosing formulations of brensocatib at 0.06 mg/kg/day.

本試験で評価したパラメータ及び評価項目は以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量、眼科検査、臨床検査（血液学的検査、凝固検査、血液生化学的検査、テストステロン及び尿検査）、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.4.4 項]）、精子分析、剖検時の肉眼的所見、臓器重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査、並びに TEM。

ブレンソカチブの忍容性は良好で、試験に使用した最高用量まで（8 mg/kg/day）、体重、体重増加、摂餌量、眼科検査、臨床検査値（テストステロンを含む）、精子パラメータ、肉眼的所見、臓器重量の変化、顕微鏡的所見にブレンソカチブに関連する変化はみられず、死亡したイヌもいなかった。

TEM では、8 mg/kg/day を投与したイヌで肺胞マクロファージの細胞質でリン脂質の物質が蓄積したリソソームの数が増加し、頻度は低いが時々2 型肺細胞がみられた。リソソームに物質が蓄積した 2 型肺細胞は時々、細胞質の軽微な希薄化と微絨毛の鈍麻／喪失などのわずかな変性変化を示した。リソソームのリン脂質物質蓄積の発現率及び／又は重症度の上昇は、PLD の診断と一致している。この所見に対応する組織学的所見はなく、観察もごくわずかであったため、有害とは判断しなかった。

結論として、イヌにブレンソカチブ（最高用量 8 mg/kg/day）を 1 日 1 回、39 週間にわたって強制経口投与したときの忍容性は良好であった。この結果に基づき、NOAEL は 8 mg/kg/day と判断された。NOAEL を投与したとき、Day 273 での雄と雌を合わせた平均全身曝露量（C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$）は、4.3 µM と 51.4 µM*h であった。

本試験では Week 36 ～ 39 に、ブレンソカチブを投与したすべての群で不純物 A*（0.06 mg/kg/day）も評価したため、不純物 0.06 mg/kg/day の適格性も評価されたと考えられた。この結果が MRHD に対して持つ意味は 8.4 項で更に考察する。

4. 遺伝毒性試験

ブレンソカチブ遺伝毒性は、GLP に従った標準の *in vitro* 及び *in vivo* 試験バッテリーで評価した。*In vitro* 試験として Ames 試験、マウスリンパ腫アッセイ、*in vivo* 試験としてラットに経口投与した骨髄小核試験を行った。

4.1. *In Vitro* 試験

4.1.1. Ames 試験（GLP、8304016 試験）

4 種類の *Salmonella typhimurium* ヒスチジン要求株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）、並びに 1 種類の *Escherichia coli* トリプトファン要求株［WP2 *uvrA*（pKM101）］を用いて、アロクロール 1254 誘導 rat liver post-mitochondrial fraction（S9）による代謝活性化の非存在下及び存在下でブレンソカチブによって生じる変異を評価した（8304016 試験：Module 2.6.7 [表 8A]）。本試験において処理に使用したブレンソカチブは、分析グレードの無水ジメチルスルホキシド（DMSO）で調製した処方を使用した。

S9 の非存在下及び存在下で処理し、ブレンソカチブの最終濃度は 5、16、50、160、500、1600 及び 5000 µg/plate（それぞれ 0.01189、0.03805、0.1189、0.3805、1.189、3.805 及び 11.89 µmol/plate）とし、溶媒対照と適切な陽性対照も使用した。S9 の非存在下と存在下で処理したところ、すべての株において 1600 µg/plate 及び／又は 5000 µg/plate（3.805 µmol/plate 及び／又は 11.89 µmol/plate）の濃度で毒性のエビデンスが観察された。

すべての試験株について、溶媒及び陽性対照により処理した。復帰変異体コロニーの平均数は、溶媒対照による処理では同程度で許容可能な範囲であり、陽性対照による処理では増加し、試験の妥当性が示された。

S9 の非存在下及び存在下でブレンソカチブにより処理したとき、溶媒で処理した同時対照と比べ、TA98、TA100 及び WP2 uvrA（pKM101）では、復帰変異体の 2 倍以上の増加はみられず、TA1535 及び TA1537 では 3 倍以上の増加はみられなかった。

結論として、本試験の条件下では、ブレンソカチブは 4 種類の *Salmonella typhimurium* ヒスチジン要求株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）、並びに 1 種類の *Escherichia coli* トリプトファン要求株［WP2 *uvrA*（pKM101）］において、5000 µg/plate（11.89 µmol/plate）の濃度まで突然変異誘発性は認められなかった。

4.1.2. マウスリンパ腫アッセイ（GLP、8304015 試験）

マウスリンパ腫 L5178Y 細胞の *tk* 遺伝子座［5-トリフルオロチミジン（TFT）耐性］におけるブレンソカチブの突然変異誘発性を、変動法を使用して評価した（8304015 試験：Module 2.6.7 [表 8B]）。*tk* 遺伝子座は、遺伝子変異及び染色体異常を検出する能力を有する。本試験には細胞毒性範囲設定実験と突然変異実験が含まれ、いずれも S9 による代謝活性化の存在下と非存在下で行った。被験物質は分析グレードの無水 DMSO で調製した。S9 の存在下では 3 時間の培養、S9 の非存在下では 3 時間と 24 時間の培養で処理した。細胞毒性範囲設定実験では、S9 存在下と非存在下で 6 種類の濃度（範囲：13.14 ～ 420.5 µg/mL）で 3 時間処理し、S9 非存在下で 9 種類の

濃度（範囲：1.643 ～ 420.5 µg/mL）で 24 時間処理した。突然変異実験の本試験では、細胞毒性の評価の結果に基づき、生存率及び TFT 耐性を測定するために分析した最高濃度を S9 存在下と非存在下の 3 時間の処理で 100 µg/mL、S9 非存在下の 24 時間の処理で 30 µg/mL とした。

突然変異実験（S9 の存在下と非存在下）では、溶媒対照及び陽性対照により処理した。溶媒対照培養における突然変異体の頻度は許容範囲内であり、陽性対照化学物質のメタンスルホン酸メチル（S9 非存在下）及びベンゾ［a］ピレン（S9 存在下）による処理では突然変異体が明らかに増加していた。したがって、本試験は有効と考えられた。

最高で毒性濃度のブレンソカチブを使用して 3 時間処理したとき（S9 非存在下）、80 µg/mL の濃度では同時対照と比べて平均突然変異体頻度の増加は約 134 であり、10^6 個の生存細胞あたり 126 個の突然変異体という総合的評価ファクター（GEF）をわずかに超えていた。同じ処理条件下で 60 µg/mL 及び 100 µg/mL で処理したとき、平均突然変異体頻度の増加は同時対照と比べてそれぞれ 54 個と 112 個であり、GEF 未満であった。60 ～ 100 µg/mL の濃度では、相対総増殖率は 12 ～ 14%の範囲であり、細胞毒性を示した。80 µg/mL でみられた影響は、相対総増殖率が 80%以上低下する高い毒性を有する単一の濃度で生じたのみである。ICH S2（R1）ガイドラインに従って全体の証拠の重み付けを考慮して解釈し、この実験で遺伝毒性がないことが示されたと判断された（ICH S2（R1）ガイドライン）。

最高で毒性濃度のブレンソカチブを使用して 3 時間（S9 存在下）及び 24 時間（S9 非存在下）処理したとき、いずれの培養でも同時対照と比べて GEF である 126 個を超える突然変異体頻度の増加はなく、これらの処理条件下では結果は陰性であった。

本試験の結果に基づくと、最高で毒性濃度のブレンソカチブを S9 の非存在下及び存在下で評価したとき、L5178Y マウスリンパ腫細胞の *tk* 遺伝子座において突然変異誘発性はないと結論した。

4.2. *In Vivo* 試験

4.2.1. ラット小核試験（GLP、8304017 試験）

ラット小核試験では、雄ラット（Han Wistar）4 群に（各群 7 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒対照）、40、200 又は 400 mg/kg/day を 2 日間にわたり経口投与して評価した（8304017 試験：Module 2.6.7 [表 9]）。溶媒対照は、pH を 3～4 に調製した酒石酸を含む精製水であった。最終投与から 24 時間後に骨髄を採取し、小核未熟赤血球の数を評価した。対照群を別に設定し（雄 3 匹）、陽性対照化合物であるシクロホスファミドを試験終了前 24 時間時点で 1 回投与した。MTD と考えられる高用量 400 mg/kg/day は、ラットを用いた MTD 評価及び 28 日間反復投与試験で観察された用量制限毒性に基づいて選択した（3.1.1 項：525710 試験）。ブレンソカチブの毒性に性差があることを示すデータはないため、本試験では雄ラットのみを使用した。

雄ラットに最高 400 mg/kg/day を 2 回経口投与したとき、骨髄で小核未熟赤血球の発現率上昇はみられなかった。ラットに 400 mg/kg/day を投与したときの高い全身曝露量は、別の試験で確認されている（Module 2.6.4 [3.3.2.1 項]：525710 試験）。

5. がん原性試験

ブレンソカチブのがん原性は、GLP に従い、遺伝子導入 raH2 マウスを用いた 6 箇月間試験及び Han Wistar ラットを用いた 2 年間の試験で、1 日 1 回強制経口投与して評価した。先行試験として野生型 rasH2 マウスを用いた 28 日間の用量範囲設定試験（GLP 試験）が完了しており、遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間の主要試験における用量はこの用量範囲設定試験の結果に基づいて選択した。遺伝子導入 rasH2 マウスはヘミ接合性遺伝子導入マウスで、BALB/cByJ × C57BL/6J F1 マウスの遺伝的背景でヒトプロトタイプ c-Ha-ras 遺伝子とマウス自体のプロモーター／エンハンサーを有する。このマウスは、遺伝毒性を有する化合物及び有しない化合物のがん原性を評価する、感度の高い動物モデルとして広く認められている。

用量範囲設定試験でもがん原性試験の本試験でも TK を評価した。TK データは Module 2.6.4 及び Module 2.6.5 に示す。

5.1. マウスを用いた試験

5.1.1. 野生型 rasH2 マウスを用いた 28 日間毒性試験（GLP、8003479 試験）

本試験では、野生型 rasH2 マウス 4 群に（各群に雄と雌それぞれ 10 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒対照）、50、100 又は 200 mg/kg/day を 1 日 1 回、28 日間にわたり強制経口投与した（8003479 試験）。TK 分析用として雄と雌それぞれ 3～6 匹からなるサテライト群も設定した（表 11）。溶媒（対照）は、水酸化ナトリウムで pH を 3～4 に調製した酒石酸を含む精製水で処方した。

表 11: マウスを用いた 28 日間試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Animals			
				Main Study		TK Study	
				Male	Female	Male	Female
1	0	10	0	10	10	3	3
2	50	10	5	10	10	6	6
3	100	10	10	10	10	6	6
4	200	10	20	10	10	6	6

本試験で評価したパラメータ及び評価項目は以下のとおりである：死亡、一般状態、体重、眼科検査、臨床検査（血液学的検査及び血液生化学的検査）、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.1.3 項]）、臓器重量、肉眼的及び顕微鏡的病理検査。

血液生化学的検査値においてブレンソカチブに関連してみられた変化は、50 mg/kg/day 以上を投与した雄及び雌で用量に関連した ALP 増加（最高で対照の 1.60 倍）、50 mg/kg/day 以上を投与した雄で用量に関連したリン濃度の上昇（最高で対照の 1.40 倍）、及び 200 mg/kg/day を投与した雄でトリグリセリド濃度の低下（対照の 0.67 倍）などであった。これらに対応する他の所見は認められなかったため、これらの変化は有害とは判断されなかった。

顕微鏡的所見としては、喉頭に軽微から軽度の上皮の変化が、50 mg/kg/day 以上を投与した雄及び 50 mg/kg/day 又は 200 mg/kg/day を投与した雌の舌下腹側嚢でみられた。雌では、軽微から軽度の扁平上皮化生が 50 mg/kg/day 又は 200 mg/kg/day の投与で観察された。雄でも雌でも、50 mg/kg/day の投与（雌 1 匹のみ）及び 200 mg/kg/day の投与で少数のマウスの粘膜に単核細胞浸潤が観察された。さらに、200 mg/kg/day を投与した 1 匹では鼻腔に上皮の変性／萎縮が観察された。喉頭の上皮の変化と扁平上皮化生、及び鼻腔の上皮の変性／萎縮（1 匹）は、ブレンソカチブに関連した強制投与の逆流を示唆する所見であり、有害ではないと判断された。

他のパラメータに、ブレンソカチブに関連する変化は認められなかった。

結論として、マウスをブレンソカチブに投与したとき、最高用量の 200 mg/kg/day まで忍容性良好で、ブレンソカチブに関連する有害所見は認められなかった。ブレンソカチブに関連した強制投与の逆流を示唆する所見として喉頭（上皮の変化、扁平上皮化生、単核細胞浸潤）及び鼻腔（上皮の変性／萎縮）に顕微鏡的変化が観察された。これらの所見の性質に基づき、NOAEL は 200 mg/kg/day と判断された。NOAEL を投与したときの Day 28 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$（雄と雌を合わせた平均）は、163 µM と 2160 µM*h であった。

本試験では、原薬（バッチ番号 6850-P54/19-402）中に不純物 B*（0.26%）が存在していた。したがって、この不純物は 0.52 mg/kg/day（200 mg/kg/day × 0.26%）で適格性が評価されたと判断された。この観察と MRHD との関連性は 8.4 項で更に考察する。

5.1.2. 遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間試験（GLP、20354490 試験）

本試験では、ヘミ接合性遺伝子導入 CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic マウス 5 群に、ブレンソカチブ 0（溶媒対照）、0（水対照）、5、15 又は 50 mg/kg/day を 1 日 1 回、6 箇月にわたり強制経口投与した（20354490 試験：Module 2.6.7 [表 10B]）。最高用量は、遺伝子を導入しない野生型同腹仔を用いて以前に行われた 28 日間の DRF 試験に基づいて選択し、定常状態の AUC が臨床曝露量の 50 倍を超えるようにした。各群は雄と雌それぞれ 25 匹とし、更に TK 評価用に各群に雄と雌それぞれ 3～8 匹を追加した。ブレンソカチブは溶媒（対照。水酸化ナトリウムで pH を 3～4 に調製した酒石酸を含む精製水）で処方した。さらに、ヘミ接合性遺伝子導入マウスの雄と雌それぞれ 10 匹で構成される別の群も設定し、ウレタンを含む 0.9%塩化ナトリウム溶液 500 mg/kg/day を Week 1 に 3 日に分けて 1 日 1 回腹腔内注射で投与し、陽性対照群とした（表 12）。

表 12:　マウスを用いた 6 箇月間がん原性試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Animals			
				Main Study		TK Study[a]	
				Male	Female	Male	Female
1	0 (vehicle)	10	0	25	25	3	3
2	0 (water)	10	0	25	25	3	3
3	5	10	0.5	25	25	8	8
4	15	10	1.5	25	25	8	8
5	50	10	5	25	25	8	8
6	500 (positive control)[b]	10	50	10	10	-	-

[a] Non-transgenic littermates were used for TK.
[b] Positive control urethane was administered by intraperitoneal injection once daily on 3 separate days during Week 1.

本試験で評価したパラメータと評価項目は以下のとおりである：生存、一般状態、体重、TK（Module 2.6.4 [3.3.1.4 項]）、肉眼的及び顕微鏡的病理検査。

ブレンソカチブの忍容性は良好で、生存に影響は認められなかった。死亡及び／又は瀕死状態とブレンソカチブ投与との間に関連はないと判断された。

ブレンソカチブに関連する徴候、又は体重、体重増加及び肉眼的所見の変化は認められなかった。

本試験でブレンソカチブに関連する新生物又は非新生物の所見は認められなかった。腫瘍の発現率及び非新生物の所見は、背景所見と判断されるもの、対照群とブレンソカチブ投与群でランダムに分布しているもの、及び／又は用量に関連したパターンを示さないものであった。

ウレタンを投与した陽性対照マウスの雄と雌では、肺の細気管支肺胞腺腫／癌及び脾臓血管肉腫の発現率上昇など、新生物に関して予想された変化が観察された。これらの所見の特徴は、ウレタン関連の病理組織学的変化としてよく解析、報告されており、本試験で使用した CByB6F1-Tg-(HRAS)2Jic ヘミ接合性マウスモデルがバリデートされた。

結論として、CByB6F1/Tg rasH2 ヘミ接合性マウスにブレンソカチブ 0（溶媒対照）、0（水対照）、5、15 又は 50 mg/kg/day を 1 日 1 回、26 週間以上にわたり強制経口投与したとき、被験物質に関連する影響は認められなかった。本試験で使用した用量ではブレンソカチブのがん原性は認められなかった。最高用量の 50 mg/kg/day を投与したときの Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は、雄で 56.1 µM と 298 µM*h、雌で 68.9 µM と 708 µM*h であり、雄と雌を合わせた平均は 63 µM と 503 µM*h であった。

5.2. ラットを用いた試験

5.2.1. ラットを用いた 2 年間試験（GLP、8002910 試験）

本試験では Wistar Han ラット 4 群に、ブレンソカチブ 0（溶媒対照）、3、10 又は 30 mg/kg/day を 1 日 1 回、104 週間にわたり強制経口投与した（8002910 試験及び Module 2.6.7 [表 10C]）。最高用量は、ラットを用いて以前に行われた 1 箇月間及び 6 箇月間の毒性試験で NOAEL（15 mg/kg/day 及び 9 mg/kg/day）を投与したときの結果に基づいて選択し、定常状態での AUC が臨床曝露量の 25 倍を超えるようにした。各群は雄と雌それぞれ 50 匹とし、TK 評価用として各群に雄と雌 3～6 匹を追加した（表 13）。溶媒（対照）は、水酸化ナトリウムで pH を 3～4 に調製した酒石酸を含む精製水であった。

本試験で評価したパラメータと評価項目は以下のとおりである：生存、一般状態（触知腫瘤を含む）、体重、摂餌量、TK（Module 2.6.4 [3.3.2.4 項]）、肉眼的及び顕微鏡的病理検査

表 13: ラットを用いた 2 年間のがん原性試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Animals			
				Main Study		TK Study	
				Male	Female	Male	Female
1	0	10	0	50	50	3	3
2	3	10	0.3	50	50	6	6
3	10	10	1	50	50	6	6
4	30	10	3	50	50	6	6

試験中、合計で 173 件の予定外の死亡が生じた。試験終了前に死亡した又は安楽死させたラットの数は、1 群あたり雄 16 ～ 22 匹、雌 19 ～ 32 匹であった（表 14）。これらの早期に死亡したラットの大半で、死因又はその他の寄与因子が特定された。高頻度にみられた死因は雄と雌で下垂体腫瘍、雌で子宮腫瘍／頸部腫瘍、及び乳房腫瘍であった。

表 14: 雌雄ラットを用いた 2 年間のがん原性試験での死亡と生存率

Group	Dose Level (mg/kg/day)	Males		Females	
		Mortality	Survival Rate	Mortality	Survival Rate
1	0	16	68%	20	60%
2	3	19	62%	19	62%
3	10	18	64%	27	46%
4	30	22	56%	32	36%

雄の生存に対しては、ブレンソカチブに関連する影響は認められなかった。

雌に 10 mg/kg/day 以上を投与したとき、Week 104 には同時対照と比較して生存率が低く、用量の増加に従い、生存ラットの数は 30、31、23 及び 18 と減少した。30 mg/kg/day を投与した雌で生存率が低かったため、この群の投与は Week 103 に中止した。死因について、対照群のラッ

トとブレンソカチブを投与した群の間の顕著な差は、30 mg/kg/day を投与した雌で子宮及び／又は子宮頸部の子宮内膜腺癌の発現率が高かったことであり、これらのがん種の発現率が高かったことがこの群の高い死亡率に寄与していた。しかし、すべての試験終了前の雌（死亡した雌と死亡しなかった雌を含む）における子宮内膜腺癌の総発現率は、対照群のラット［20 匹中 8 匹（40%）］と 30 mg/kg/day を投与したラット［32 匹中 11 匹（34%）］の間で同程度であった。さらに、試験終了まで生存していた雌でも、子宮内膜腺癌の発現率は対照群のラットで 30 匹中 3 匹（10%）、30 mg/kg/day を投与したラットで 18 匹中 1 匹（6%）と同程度であった（表 15）。対照群とブレンソカチブ投与群の間で、試験終了前も試験終了時も子宮内膜腺癌の発現が全体に同程度であったため、30 mg/kg/day を投与した雌でこの腫瘍発生による予定外の死亡数の増加は偶然であり、ブレンソカチブのがん原性を示しているわけではないと判断された。

表 15:　　2 年間のがん原性試験の雌でみられた子宮内膜腺癌の発現率

Group	**1**	**2**	**3**	**4**
Dose (mg/kg/day)	**0**	**3**	**10**	**30**
No. of Females per Group	**50**	**50**	**50**	**50**
Preterminal Death (No. of females examined) Fatal endometrial adenocarcinoma Non-fatal endometrial adenocarcinoma	20 4 4	19 6 3	27 4 0	32 11 0
Terminal Necropsy (No. of females examined) Endometrial adenocarcinoma	30 3	31 6	23 6	18 1

触知腫瘤、体重、又は摂餌量に、ブレンソカチブに関連する一般状態又は影響はなく、ブレンソカチブに関連する肉眼的所見、新生物による変化も認められなかった。

統計解析（全般傾向検定及び第 1 群対照とのペアワイズ比較）の結果、雌の乳腺癌及び子宮内膜間質ポリープ、雄の甲状腺の濾胞細胞腺腫及び濾胞細胞腺腫／癌、雌の良性の胸腺腫、並びに雌の腸間膜リンパ節の血管腫など、いくつかのがん種で用量に応じて腫瘍発生率が増加する傾向が明らかであった。これらの腫瘍の発現率増加傾向は、発現率が既存対照データに比べて同程度であるかわずかに高いのみであること、関連する増殖性又は新生物性の変化全体で用量依存性のパターンがみられないこと、雄と雌の間で同様の傾向がみられないこと（該当する場合）及び／又は Wistar Han ラットではこれらの腫瘍発現の報告は多いことから、偶然生じた傾向であって、ブレンソカチブ投与とは関連がないと判断された。

ブレンソカチブに関連する新生物以外の所見は、30 mg/kg/day を投与した雄及び 3 mg/kg/day 以上を投与した雌の肺で、肺胞マクロファージの軽微から中等度の発現率／又は重症度の上昇、及び 30 mg/kg/day を投与した雄の肝臓で、軽微から中等度の肝細胞空胞化の発現率及び重症度の上昇であった。さらに、処方に関連した新生物以外の所見として、胃と鼻腔に所見があった。胃では、対照群の雄 1 匹、3 mg/kg/day を投与した雌 1 匹、30 mg/kg/day を投与した雄 1 匹と雌 2 匹で胃の堤状の隆起に軽度から著明なびらん／潰瘍が観察された。鼻腔では、対照群の雄、3 mg/kg/day 以上を投与した雄、及び 10 mg/kg/day 以上を投与した雌で、強制投与の結果及び／

又は胃逆流の結果と考えられるいくつかの所見（軽微から中等度の滲出液、軽微から中等度の炎症、及び／又は軽微から著明な呼吸上皮及び／又は嗅上皮の変性）が生じた。

胃及び鼻腔におけるこれらの所見は、非特異的な刺激と一致しており、ブレンソカチブの有無にかかわらず投与した参照物質の化学的性質（低 pH）に関連している可能性が高く、被験物質の直接の毒性ではないと考えられた。

結論として、雄と雌の Wistar Han ラットにブレンソカチブ 3、10 及び 30 mg/kg/day を 1 日 1 回、104 週間にわたり強制経口投与したときがん原性は認められなかった。30 mg/kg/day を投与したときの Day 182 での C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は雄で 45.3 µM と 428 µM*hr、雌で 68.6 µM と 649 µM*hr であり、雄と雌を合わせた平均は 57 µM と 538.5 µM*h であった。

6. 生殖発生毒性試験

ラットを用いた 6 箇月間反復投与毒性試験で、雄ラットの交尾行動と生殖能を評価した。雌ラットの受胎能と生殖発生プロセスは、ラットを用いた胚・胎児発生（EFD）試験の本試験で評価した。妊娠 Han Wistar ラットと非妊娠及び妊娠ニュージーランドホワイトウサギを使用して、一連の用量範囲設定試験（非 GLP）及び EFD 毒性試験の本試験（GLP）を行った。また、ラットを用いた試験では、出生前及び出生後の発生（PPND）も評価した。

生殖発生毒性試験では TK も評価した。TK のデータは Module 2.6.4 と Module 2.6.5 に示す。

6.1. 受胎能及び初期胚発生試験

6.1.1. 受胎能試験：雄ラット（GLP、528313 試験）、雌ラット（GLP、497825 試験）

雄の交尾行動及び受胎能は、ラットにブレンソカチブ 0、3、9 及び 50 mg/kg/day を 6 箇月間反復投与した毒性試験で 10 週間投与した後に評価した（3.1.3 項）。雌の受胎能及び生殖発生プロセスは、ラットを用いた EFD 試験の本試験で交配の 2 週間前から妊娠（GD）16 日目まで 0、3、20 及び 100 mg/kg/day を投与して評価した（6.2.2 項）。

6 箇月間反復投与毒性試験では、いずれの用量でも雄の交尾行動及び雄の受胎能に対してブレンソカチブに関連する影響はなく、雄の受胎能に関する NOAEL は最高用量の 50 mg/kg/day と示された。NOAEL を投与したとき、Day 182 での全身曝露量（C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$）は、雄で 97.0 µM と 1460 µM*h であり、雄と雌を合わせた平均は 98.7 µM と 1450 µM*h であった。

雌の受胎能と EFD 試験では、いずれの用量でも発情周期、交尾行動（交尾前の期間を含む）及び受胎能に対してブレンソカチブに関連する影響は認められなかった。したがって、雌の発情周期と受胎能に対する NOAEL は最高用量の 100 mg/kg/day と判断された。用量範囲設定試験（497631 試験）で NOAEL を投与したとき、雌の GD16 での全身曝露量（C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$）は 84.4 µM と 1240 µM*h であった。

6.2. 胚・胎児発生試験

6.2.1. 雌ラットに経口投与した用量範囲設定と胚・胎児発生試験（GLP、497631 試験）

Han Wistar ラット 4 群に（各群に交配が確認された雌 6 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒）、3、9、50 又は 100 mg/kg/day を GD 6 ～ 16 に 1 日 1 回強制経口投与した（497631 試験）。溶媒（対照）は、pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水であった。名目用量 3 mg/kg/day を投与するラットは、GD 6 ～ 11 まで 3 mg/kg/day、GD 12 ～ 16 までは約 4.5 mg/kg/day を投与した。2 週目に 3 mg/kg/day から 4.5 mg/kg/day に増加したのは、規格処方の分析では名目値よりも 50%高い結果が得られたためである。名目用量と実際の用量の差（50%）を考慮した場合と考慮しない場合で、用量で正規化した推定値を比較したところ、曝露量は用量範囲全体で全般にほぼ用量比例的という TK 期間の報告の結論に変更は認められなかった。

本試験で評価した項目は以下のとおりである：一般状態、体重及び体重の変化、摂餌量及び摂水量、GD 16 の血漿中ブレンソカチブ濃度（Module 2.6.4 [3.3.2.5 項]）、GD 21 の妊娠状態及び母動物の肉眼的病理検査、妊娠子宮及び胎児の重量、卵巣、子宮及び胎児（外表、内臓及び頭部のみ）の検査。

ブレンソカチブ 100 mg/kg/day を GD 6 ～ 16 に投与したとき、投与開始から数日間は母動物の摂餌量がわずかに減少した。この用量を投与した雌 1 匹で、GD 20 と GD 21 に活動性低下と半眼の徴候がみられた。3、9 又は 50 mg/kg/day を投与したラットには有害な徴候はなく、母動物の体重や摂餌量に対する影響も認められなかった。

器官形成期に母動物に 3、9、50 又は 100 mg/kg/day を投与したとき、胚・胎児の生存、外表及び内臓の形態に対する影響は認められなかった。50 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の投与では、胎児の平均重量が用量に関連してわずかに減少した。

結論として、母動物にブレンソカチブ 100 mg/kg/day を GD 6 ～ 16 まで投与したとき、妊娠最後の 2 日間に 1 匹で摂餌量のわずかな減少と有害な徴候など、母動物に対する軽微な毒性が生じた。50 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の投与では、胎児の平均重量が用量に関連してわずかに減少した。その結果、ラットを用いた EFD 試験の本試験では 100 mg/kg/day を高用量とすることが適切と考えられた。100 mg/kg/day を投与したとき、GD 16 での平均 C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ は 84.4 µM と 1240 µM*h であった。

6.2.2. 雌ラットを用いた経口（強制）投与受胎能及び胚・胎児発生試験（GLP、497825 試験）

雌の Han Wistar［CRL:WI(Han)］ラット 4 群に（20 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒）、3、20 又は 100 mg/kg/day を 1 日 1 回、交配のためのペアリングの 2 週間前から GD 16 まで強制経口投与した（表 16）（497825 試験：Module 2.6.7 [表 13A]）。被験物質を投与していない同じ系統の雄とこれらの雌を交配し、試験期間終了後、母動物は GD 21 に剖検した。被験物質は、溶媒（水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水）で処方した。

表 16: 雌ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Females
1	0	10	0	20
2	3	10	0.3	20
3	20	10	2	20
4	100	10	10	20

本試験で評価した項目は以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量、GD 16 の血漿中ブレンソカチブ濃度（Module 2.6.4 [3.3.2.6 項]）、受胎能及び妊娠の結果、母動物の剖検時の肉眼的所見、妊娠子宮の重量、同腹仔のデータ、胎児及び同腹仔の重量、胎児の性別、胎児の外表／内臓及び骨格。

試験終了前に死亡したラットはいなかった。

3 mg/kg/day の投与では、母動物の体重や摂餌量に対して投与に関連した徴候又は影響はなく、20 mg/kg/day の投与でも投与に関連した徴候は認められなかったが、100 mg/kg/day の投与では、投与期間を通じて鼻／口を床にこすりつける動作の徴候が観察された。

交配前に、20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day を投与したラットで投与開始後最初の 4 ～ 5 日間は体重増加が抑制され、100 mg/kg/day を投与したラットでは摂餌量のわずかな減少を伴っていたが、交尾前期間の 2 週間の終了時点では対照動物との体重増加の差は認められなかった。
100 mg/kg/day の投与では、妊娠期間中の体重増加が GD 0 ～ 16 の間わずかに増加し、摂餌量は GD 17 ～ 21 の間わずかに増加した。剖検時の妊娠子宮の重量で調整した体重は、20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day を投与したラットでわずかに増加し、妊娠子宮の重量は 3 mg/kg/day 又は 20 mg/kg/day を投与したラットでわずかに増加した。

いずれの用量でも、発情周期、交尾行動（交尾前の期間を含む）、受胎能、胎児の重量又は胚・胎児の生存に対してブレンソカチブに関連する影響はなく、胎児に大奇形はなく、ブレンソカチブ投与に関連する外表又は内臓の異常／変異も認められなかった。

100 mg/kg/day の投与では、2 同腹仔の 4 胎児に骨格のわずかな奇形（肩甲骨弯曲）がみられ、中等度／重度の波状肋骨の発現率が上昇した。

20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の投与では、骨格変異（骨盤帯の位置不正、頸部と胸腰椎の両方に過剰な完全な肋骨及び／又は短い肋骨の痕跡）を有する胎児の数が増え、発現率と重症度は全般に 100 mg/kg/day を投与したときのほうが高かった。すべての用量で指節骨骨化の発現率、20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の投与では後肢踵骨骨化の発現率が上昇した。
100 mg/kg/day の投与では、頭頂間骨の軽微な不完全な骨化の発現率が低下し、頸椎中心未骨化の発現率が上昇した。頭頂部頭蓋骨の不完全な骨化の発現率は、すべての用量で増加した。

結論として、雌ラットにブレンソカチブ 3、20 又は 100 mg/kg/day を交配前、交配のためのペアリング中、及び胚の主な器官形成期終了まで 1 日 1 回経口投与したとき、20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の投与でわずかな母動物毒性（体重増加及び摂餌量の変化）が生じた。発情周期、交尾行動、受胎能、胚胎児の生存又は胎児の重量に、ブレンソカチブ投与による有害作用は認められなかった。主な奇形や外表又は内臓の異常／変異はみられなかった。肩甲骨弯曲及び波状肋骨などの骨格のわずかな奇形が 100 mg/kg/day を投与したときのみみられた。20 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day を投与したとき、骨格変異の発現率及び骨化の差異が増加した。3 mg/kg/day の投与では、頭蓋骨骨化の発現率低下が 1 匹のみでみられた。母動物及び EFD に対する毒性の NOAEL は 3 mg/kg/day と判断され、3 mg/kg/day を投与したときの GD 16 での平均 C_{max} と AUC_{0-24h} は、2.73 µM と 28.7 µM*h であった。雌の発情周期と受胎能に対する NOAEL は 100 mg/kg/day であり、100 mg/kg/day を投与したときの GD 16 での平均 C_{max} と AUC_{0-24h}［ラットを用いた用量範囲設定胚・胎児発生試験（497631 試験）で測定］は、84.4 µM と 1240 µM*h であった。

この試験の文脈では、骨格のわずかな奇形（肩甲骨弯曲及び波状肋骨）及び変異は有害と考えられるが、これらは母動物にわずかな毒性がみられたときに観察された。文献では、交配が確認

されたラットを用いた長期 *in vivo* 試験で非侵襲的なマイクロコンピュータ X 線断層撮影で長骨の弯曲（肩甲骨を含む）がみられても、生後 3 週間で完全に回復すると報告されている（De Schaepdrijver et al., 2014）。さらに、肩甲骨弯曲及び波状肋骨の所見は一過性（回復可能）であるため、奇形でなく変異と考えるべきであり、環境要因に対する曝露の標準設定、又は、薬剤の安全用量設定に際してリスクアセスメントで使用すべきでないと結論されている（Kimmel et al., 2014）。

6.2.3. 非妊娠ウサギを用いた経口投与用量範囲設定毒性試験（非 GLP、497610 試験）

ニュージーランドホワイト HsdIf ウサギ 5 群に（各群は非妊娠雌 2 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒対照）、15、100、150 又は 200 mg/kg/day を 1 日 1 回、Day 1 ～ Day 13 に経口投与した（497610 試験）。被験物質は、溶媒（水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水）で処方した。

本試験で評価した項目は以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量、バイオアナリシス、TK 評価（Module 2.6.4 [3.3.3.1 項]）、及び肉眼的病理所見。予定された剖検は Day 14 に行い、胸部と腹部の臓器を評価した。

15 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day の用量では、被験物質に関連した一般状態、及び体重又は摂餌量に対する影響は認められなかった。

150 mg/kg/day 又は 200 mg/kg/day の投与では、肛門周囲の被毛の汚れ、色の薄い便又は便の減少と活動性低下、削痩及び皮膚の冷感、色の薄い皮膚及び眼脂などの一般状態の異常がみとめられた。また、150 mg/kg/day を投与した 1 匹及び 200 mg/kg/day を投与した 2 匹に、体重減少を伴う摂餌量低下が観察された。投与 Day 8 ～ Day 9 前後までには大半の動物で摂餌量が回復したが、200 mg/kg/day 用量群の 1 匹では投与期間の大半で摂餌量が著明に減少し、投与期間終了時までに体重が 25%減少した。いずれの用量でも剖検時の肉眼的所見は認められなかった。

結論として、ウサギにブレンソカチブ 200 mg/kg/day を 1 日 1 回、13 日間にわたり経口投与したとき、一般状態の異常として摂餌量及び体重の著明な減少が生じた。150 mg/kg/day の投与では、摂餌量の減少、及び体重のわずかな減少又は体重が全く増加しないなどが観察された。いずれの用量でも剖検時に肉眼的所見は認められなかった。15 mg/kg/day 又は 100 mg/kg/day を投与した動物では、被験物質に関連した影響はみられなかった。本試験の結果、150 mg/kg/day は忍容性があり、その後、妊娠ウサギを使用して行う用量範囲設定試験で使用する高用量として適切であると判断された。

6.2.4. 妊娠ウサギを用いた経口投与用量範囲設定胚・胎児発生試験（GLP、497626 試験）

ニュージーランドホワイト（HsdIf: NZW）ウサギ 4 群に（各群に妊娠雌 6 匹）、ブレンソカチブ 15、50、100 又は 150 mg/kg/day を 1 日 1 回、GD 7 ～ 19 に経口投与した（497626 試験）。15 mg/kg/day と 50 mg/kg/day の低用量を投与する試験は、100 mg/kg/day と 150 mg/kg/day の高用量を投与する試験の完了後に開始した。同じ数の妊娠ウサギからなる群を対照群として使用し、

溶媒（水酸化ナトリウムで pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水）のみを投与した（表 17）。すべてのウサギを妊娠 29 日目に剖検する予定とした。

本試験で評価した項目は以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量及び摂水量、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.3.2 項]）、肉眼的所見、妊娠の結果、妊娠子宮の重量、胎児の重量、外表及び内臓。

表 17:　　妊娠ウサギを用いた用量範囲設定 EFD 試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Females
1	0	10	0	6
2	100	10	10	6
3	150	10	15	6
4	15	10	1.5	6
5	50	10	5	6

100 mg/kg/day 又は 150 mg/kg/day の投与は忍容性がなく、流産の発現率が高くなり、100 mg/kg/day を投与した 6 匹中 3 匹、150 mg/kg/day を投与した 6 匹中 4 匹を早期に安楽死（GD 13 ～ 23）させた。これらの早期に死亡したウサギの剖検時所見として、子宮内死亡の高い発現率がみられた。100 mg/kg/day 又は 150 mg/kg/day の投与では、一般状態の異常（軟便／色の薄い便／便量の減少、呼吸数減少、削痩、活動性低下及び無尿）、摂水量及び摂餌量の減少、体重減少、及び剖検時の肉眼的所見の異常（退色及び／又は変色した肝臓／腎臓／胃／心臓、肺の斑状／濃色の病巣、盲腸の液状内容物、膣及び膀胱に濃色の液体）がみられた。そのため、これらのウサギの早期の安楽死及び胚・胎児生存率低下は、ブレンソカチブの投与と関連があると判断される。

15 mg/kg/day 又は 50 mg/kg/day の投与では、摂餌量の一過性の減少と摂水量の増加が観察された。

すべての用量で、胎児や妊娠子宮の重量、又は胎児の異常や変異の種類と分布に対してブレンソカチブに関連する影響は認められなかった。

結論として、妊娠ウサギにブレンソカチブ 100 mg/kg/day 又は 150 mg/kg/day を 1 日 1 回、GD 7 ～ 19 に経口投与すると、忍容性がなく、流産及び母動物に対する有害毒性のため早期に試験を終了した。これらの用量では、一般状態の異常、摂餌量及び摂水量の減少、体重減少、剖検時の異常な肉眼的所見などが生じた。15 mg/kg/day 又は 50 mg/kg/day の投与では、摂餌量の一過性の減少と節水量の増加がみられたが、胚・胎児の生存又は胎児の発生に対する影響は認められなかった。本試験の結果に基づき、50 mg/kg/day の用量は忍容性があり、この後、妊娠ウサギを使用して行う EFD 試験の本試験で使用する高用量として適切であると判断された。

6.2.5. 妊娠ウサギを用いた経口投与胚・胎児発生試験（GLP、497830 試験）

ニュージーランドホワイト（HsdIf: NZW）ウサギ 4 群に（各群に妊娠ウサギ 22 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒）、5、15 又は 50 mg/kg/day を 1 日 1 回、GD 7 ～ 19 に経口投与した（497830 試験、Module 2.6.7 [表 13B]）（表 18）。溶媒（対照）は、水酸化ナトリウムで pH を 3～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水であった。すべてのウサギを GD 29 に安楽死させる予定とした。

本試験で評価した項目は以下のとおりである：一般状態、体重、摂餌量及び節水量、バイオアナリシス、TK（Module 2.6.4 [3.3.3.3 項]）、肉眼的所見、妊娠の結果、妊娠子宮の重量、胎児の重量、内臓及び骨格。

表 18: 妊娠ウサギを用いた EFD 試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Females
1	0	10	0	22
2	5	10	0.5	22
3	15	10	1.5	22
4	50	10	5	22

本試験では試験終了前にブレンソカチブに関連した死亡は生じなかった。対照ウサギ 1 匹は瀕死状態のため GD 22 に安楽死させた。

5 mg/kg/day の投与では母動物に対する影響は認められなかった。

15 mg/kg/day 又は 50 mg/kg/day の投与では、投与期間中（GD 7 ～ 19）体重増加がわずかに抑制され、50 mg/kg/day の投与では、投与期間中、摂餌量が一過性に減少した。胚・胎児の生存又は体重に対してブレンソカチブ投与による影響は認められなかった。15 mg/kg/day 又は 50 mg/kg/day の投与では、骨盤帯の尾側への移動、及び第 13 胸椎に過剰な数の肋骨の発現率が上昇した。しかし、これらの変異はこの系統のウサギでよくみられるため、胎児の発生に有害な影響はないと考えられた。どの用量でも EFD に対するその他の影響は認められなかった。

結論として、妊娠ウサギにブレンソカチブ 15 mg/kg/day 又は 50 mg/kg/day を 1 日 1 回経口投与したとき、50 mg/kg/day の投与でのみ母動物に対する毒性（体重増加のわずかな抑制と一過性の摂餌量減少）が生じた。いずれの用量でも胚・胎児の生存又は胎児の発生に対する影響は認められなかった。この試験の結果に基づき、母動物に対する NOAEL は 5 mg/kg/day と判断された。胚・胎児に対する NOAEL は、以前に行った用量範囲設定試験（497626 試験）で決定したように 50 mg/kg/day と判断され、GD 19 における平均 C_{max} と $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 23.0 µM と 195 µM*h であった。

6.3. 出生前及び出生後の発生試験

6.3.1. ラットを用いた出生前及び出生後の発生試験（GLP、00335001 試験）

雌の Han Wistar［CRL:WI(Han)］ラット（F_0雌）4 群に（各群に 25 匹）、ブレンソカチブ 0（溶媒）、3、9 又は 20 mg/kg/day を 1 日 1 回、GD 6 から LD 20 まで強制経口投与した（表 19）（00335001 試験、Module 2.6.7 [表 14]）。被験物質は、溶媒（pH を 3 ～ 4 に調製した酒石酸を含む精製水）で処方した。各群に 4 匹を追加し、GD 6 と授乳／出生後（LD／PND）4 日目に血漿中の被験物質量の TK を評価した（Module 2.6.4 [3.3.2.7 項]）。F_0世代の全動物、及び成獣になった時点での評価用として選択しなかった F_1世代の仔は、LD/PND 21 に剖検した。繁殖用として選択しなかった F_1世代の仔は PND 55 ～ 60 に性的発達の指標がみられた後に剖検した。繁殖用として選択した F_1世代の雌は GD 15 に剖検し、F_1世代の雄はその後 PND 113 ～ 118 に剖検した。

表 19: 雌ラットを用いた PPND 試験の実験デザイン

Group No.	Dose (mg/kg/day)	Dose Volume (mL/kg)	Formulation Concentration (mg/mL)	Number of Females	
				Main Study	TK Study
1	0	10	0	25	4
2	3	10	0.3	25	4
3	9	10	0.9	25	4
4	20	10	2	25	4

本試験の目的は、着床から仔の離乳まで母動物を被験物質に曝露させたとき、妊娠、分娩、授乳に有害作用が生じる可能性、及び F_1世代の新生仔の成長、生存、発生に有害作用が生じる可能性を評価することであった。F_1世代の生殖能も評価した。

本試験で評価したパラメータと評価項目は以下のとおりである：一般状態、体重、体重増加、摂餌量、発情周期、受胎能、分娩、同腹仔の生存、発達指標、神経行動、子宮内での生存及び剖検時の肉眼的所見。

F_0世代の雌はいずれも予定された剖検時まで生存しており、被験物質に関連する一般状態は認められなかった。F_0世代の 3、9 又は 20 mg/kg/day 群の平均体重、体重増加、摂餌量は、妊娠及び授乳期間を通じて対照群と同様であった。いずれの用量でも、平均妊娠日数又は分娩に対して、被験物質に関連する影響は認められなかった。F_0世代のラットの剖検時に、被験物質に関連する肉眼的所見は認められなかった。被験物質を投与した群における着床痕の数及び着床したが出産に至らなかった着床部位の平均数は、対照群と同程度であった。

いずれの用量でも、F_1世代の仔の生存、離乳前の体重、体重増加、又は状態に対し、被験物質に関連する影響は認められなかった。死亡した状態で発見された F_1世代の仔の剖検時又は PND 21 に行われた剖検時に、被験物質に関連した肉眼的所見は認められなかった。3、9 及び 20 mg/kg/day 群の母動物から生まれた仔で、陰茎亀頭と包皮の分離又は膣の開口がみられるまでの平均日数及び体重に対し、被験物質に関連した影響は認められなかった。被験物質投与群の仔

の驚愕反応、運動能、及び学習と記憶（Biel 型水迷路）能は、対照群と同様であった。成獣時の評価に選択したすべての F_1 世代の雄と雌は、予定された剖検時まで生存していた。F_0 世代の母動物に被験物質を投与したことに起因する可能性がある一般状態は認められなかった。いずれの用量でも F_1 世代の雄と雌で毎週の平均体重と体重増加、雌で妊娠時の体重と体重増加に、被験物質に関連した影響はみられなかった。F_0 世代の母動物に被験物質 3、9 又は 20 mg/kg/day を投与しても、F_1 世代の生殖能に影響は認められなかった。これらの群における雄と雌の交配と生殖能、雄の交尾、雌の受胎率、発情周期の平均の長さ、及び交尾前の平均期間は、対照群と同様であった。成獣になった F_1 世代の剖検時に肉眼的所見はなく、F_2 世代の胚の生存に対して、F_0 世代の母動物に投与した被験物質に起因すると考えられる影響は認められなかった。

試験期間中、被験物質に関連する影響が認められなかったことに基づき、ラットに経口投与したとき、試験に使用した最高用量である 20 mg/kg/day が F_0 世代の親の全身毒性、F_1 世代の新生仔の発生、全身及び生殖に対する毒性、及び F_2 世代の胚の生存に対する NOAEL と判断された。この用量を F_0 世代の雌に投与したとき、GD 6 時点での $AUC_{0\text{-}24h}$ と C_{max} は 163 µM*h と 14.1 µM であった。

6.4. 幼若動物を用いた試験

独立した幼若動物試験は実施されていない。

ブレンソカチブは、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験（GLP）で評価された。各試験（1 箇月、6 箇月及び 9 箇月試験）における投与開始時のラット週齢及びイヌの月齢は、以下の表 20 に記載している。表に示すように、最も若齢の動物は 6 箇月試験で評価され、ラットは投与開始時 6～7 週齢、イヌは 5～6 箇月齢であった。これらの週齢・月齢は両動物種においては思春期に相当し、ICH S11 ガイドラインで定める思春期年齢（≥12 歳）と発達の観点から一致している。

さらに、ラットとイヌにおいて毒性の標的臓器は十分に特徴付けられた。6 箇月試験では、両動物種において肺と腎臓に顕微鏡的変化が観察され、イヌではリンパ組織、精巣／精嚢、歯周組織においても追加所見が認められた。成熟動物を対象とした 1 箇月試験では、高用量レベルで骨格筋、肝臓、胸腺、骨髄を含む他の組織において顕微鏡的所見が認められたが、これらの所見は 6 箇月試験では観察されなかった。イヌを対象とした 9 箇月試験では、特筆すべき所見は報告されていない。ブレンソカチブに関連する所見はすべて、用量依存的で可逆性があり、ヒトに対する最大推奨用量である 25 mg/日を超える曝露で発生した。

表 20: ラット及びイヌにおける GLP 反復投与毒性試験（1 箇月、6 箇月及び 9 箇月試験）における投与開始時の動物の週齢・月齢

	1-month study	6-month study	9-month study
Rat	10-11 weeks (Study No. 527409)	6-7 weeks (Study No. 528313)	Not applicable
Dog	8-9 months (Study No. 527414)	5-6 months (Study No. 528329)	7-8 months (Study No. 505523)

投与開始時の動物の週齢・月齢及び反復投与毒性試験で特定された標的臓器に基づき、完了した第 III 相臨床試験における 12 歳以上 18 歳未満の青少年サブグループ及び予定している小児を対象とした臨床試験における 6 歳以上 12 歳未満の NCFBE 患者に対するブレンソカチブの安全性は、現在の非臨床毒性試験で十分に確認されていると考えられる。6 歳以上 18 歳未満の小児及び青少年患者は、ブレンソカチブの投与に対して成人よりも高い感受性を示すことは予想されないため、独立した幼若動物試験を実施する必要はなかった。

7. 局所刺激性試験

局所刺激性については、反復投与毒性試験でラットとイヌにブレンソカチブを強制経口投与し、消化管を病理組織学的に評価した。いずれの毒性試験でも消化管に顕著な組織学的所見は認められなかったが、イヌでは嘔吐と便の変化が生じ、発現率及び／又は重症度は用量に関連して上昇した。

8. その他の毒性試験

8.1. 免疫毒性

ICH S8（ICH S8 ガイドライン）に従って証拠の重み付けに基づき総合的に評価したところ、免疫毒性の懸念は認められなかったため、免疫毒性を特に評価した試験は行われていない。

潜在的な免疫毒性の評価は報告書番号 BRE-AB-IM-001 に詳述し、概要を以下に示す。

- 文献では、DPP1$^{-/-}$マウスは正常かつ健康で生殖能があり、免疫系も機能も保存されていることが示されている。さらに、まれな遺伝的状態で DPP1 活性がほぼ完全又は完全に欠損している PLS 患者では、典型的で特異的な臨床症状として掌蹠角化症及び歯周病がみられるが全身的な免疫機能不全はない。したがって、ブレンソカチブによる DPP1 阻害が、免疫系に全身的な有害作用を及ぼすことは予想されない。
- 1 億 1500 万を超える化学構造及びこれらの生理活性のデータが含まれている総合的な化学データベースの PubChem で構造の同等性を検索し、その後、目視で検証したところ、免疫調節活性が知られている薬剤とブレンソカチブの間に類似性はない。
- ラット及びイヌに反復投与した一般毒性の主要試験では、グロブリン、アルブミン／グロブリン比、又は全身感染の発現率に対してブレンソカチブの影響は認められなかった。好中球機能を特に評価したところ、活性酸素種産生能が用量に関連してわずかに低下したが、食作用に影響は認められなかった。組織学的評価では免疫関連の変化として、リンパ組織で PLD と一致するマクロファージの集簇及び／又は空胞化マクロファージの集簇がみられた。非臨床試験で観察された免役関連の変化は全般に用量依存的、可逆的で、高用量の投与で生じ、MRHD と比べると曝露倍数は有意であった。
- ラットの定量的全身オートラジオグラフィー試験では、免疫系臓器と組織でブレンソカチブに関連する高い濃度の放射能が滞留することはなかった。これらの組織には微量の放射能が検出されたが、ラットとイヌに反復投与した一般毒性試験において唯一の免疫関連の組織学的変化はリンパ組織での PLD であり、臨床的に意味のある曝露量に対して有意な曝露倍数となる用量を投与したときに生じていることから、毒性学的に重要ではないと判断された。
- 終了した臨床試験では、免疫毒性又は自己免疫に関連する有害事象の発現率が、ブレンソカチブに関連して増加する徴候は認められなかった。
- ブレンソカチブの主要代謝物であるチオシアン酸塩は内因性の化合物であり、免疫毒性とは関連がなく、臨床でブレンソカチブを投与してもチオシアン酸塩の曝露量に影響を及ぼすことはない。

総合的に評価すると、ブレンソカチブは治療薬として意義のある曝露量で免疫毒性を有する可能性はなく、免疫毒性を評価する追加の非臨床試験は必要ではないと考えられる。

8.2. 依存性

総合的な非臨床及び臨床評価で中毒／依存の懸念は認められなかったため、中毒／依存を特に評価する非臨床試験は行っていない。

中毒／依存の可能性は、米国 FDA の業界向けガイドライン「Assessment of Abuse Potential of Drugs」（FDA, 2017）、及び EMA のガイドライン「Nonclinical Investigation of the Dependence Potential of Medicinal Products」（EMA, 2006）に従って評価した。詳細は報告書番号 BRE-AB-IM-001 に記載し、以下に要約を示す。

- ブレンソカチブの薬理学的作用機序、DPP1$^{-/-}$動物に関する文献データ、及び PLS 患者においてみられている表現型に基づくと、ブレンソカチブによる DPP1 の阻害が中毒／依存を引き起こす可能性を示す CNS 関連の安全性の懸念はない。
- データベースで構造の同等性を検索し、その後目視で検証したところ、ブレンソカチブと中毒／依存がみとめられる一般的な薬剤との間に構造の類似性はなく、評価した中毒／依存物質の直接の前駆体となることもない。
- *in vitro* CEREP オフターゲットスクリーニングアッセイで同定された潜在的な標的に対する IC_{50} 値、及び CNS が曝露することはほとんどなく脳内濃度に対する安全マージンが適切であることに基づくと、ブレンソカチブを MRHD 又は MRHD を超える用量（10 倍など）で投与しても中毒／依存の可能性は考えにくい。
- CNS に対する安全性を特に検討した薬理試験では、ラットにブレンソカチブ 0.5、10 又は 200 mg/kg を単回経口投与しても CNS に関連する影響は認められなかった。
- ラットとイヌに反復投与した一般毒性試験では、中毒や依存に関連する CNS 特異的な作用を示す徴候は認められなかった。
- ラットの定量的全身オートラジオグラフィー試験では、脳及び脊髄においてブレンソカチブに関連する放射能の組織-血液濃度比は 0.15 未満で、脳及び脊髄への分布はほとんどなく、血液脳関門はほとんど通過しないことが示唆された。これは、ブレンソカチブが Pgp の基質であることと一致する。
- ブレンソカチブについて完了した臨床試験では、MedDRA 標準検索式の「薬物乱用、依存および離脱」（狭域）に含まれる事象は報告されていない。
- 主要代謝物であるチオシアン酸塩は内因性の化合物であり、中毒／依存の可能性はなく、臨床でブレンソカチブを投与しても、チオシアン酸塩の全身曝露量に影響を及ぼすことはない。

総合的に評価すると、ブレンソカチブに中毒／依存の可能性はないと判断され、その可能性を更に非臨床試験又は臨床で評価する必要はないと考えられる。

8.3. 代謝物

代謝物の毒性を特に評価する非臨床毒性試験は行っていない。

非臨床試験で使用した動物種及びヒトにおける代謝物への曝露は、Module 2.6.4 [5.4 項]で詳細に考察されている。要約すると、ブレンソカチブについて検討されているすべての適応症に対する最大臨床用量 40 mg をヒトに投与したときに同定された主要代謝物は M8（チオシアン酸塩）のみであった。この代謝物はマウス、ラット及びイヌでも形成される。ヒトにおけるチオシアン酸塩の C_{max} は、ラットに NOAEL（9 mg/kg/day）を反復経口投与したときの C_{max} と同程度で、イヌに NOAEL（8 mg/kg/day）を反復経口投与したときの約 5 分の 1、マウスに 50 mg/kg を投与したときの血漿中 C_{max} の約半分である。

さらに、チオシアン酸塩は内因性の化合物であり、臨床でブレンソカチブを投与しても、チオシアン酸塩の全身曝露量に影響を及ぼすことはない。

これまでに得られているデータに基づくと、ブレンソカチブを投与したマウス、ラット及びイヌはヒトと同程度又はヒトより高い循環血中の M8 に曝露されており、チオシアン酸塩の毒性を評価する非臨床試験を追加で行う必要はないと判断される。

8.4. 不純物

8.4.1. 不純物C*の許容摂取量に関するリスク評価

8.4.1.1. 緒言

不純物C*は、ブレンソカチブの有効成分由来のニトロソアミン類（NDSRI）である。化学名は[redacted]であり、その構造は図 1 に示されている。

図 1: 不純物C*の構造

[redacted]

不純物C*は、ブレンソカチブ原薬及び製剤（錠剤）で確認されている。ブレンソカチブ原薬の 6 バッチ（うち 3 バッチは約 1 年前、残りの 3 バッチは約 2 年前に製造されたもの）において、不純物C*の濃度は約[redacted]～[redacted] ppm の範囲であった（Module 3.2.S.3.2）。25 mg のブレンソカチブの製剤（錠剤）では、Module 3.2.P.5.5 及びModule 3.2.P.8.3 に示されているように、不純物C*の濃度は上昇した。

ICH M7（R2）ガイドライン（ICH 2023）では、N-ニトロソアミンを「cohort of concern」として定義している。不純物C*の患者に対する変異原性又は発がん性の潜在的リスクを評価し、化合物固有の許容摂取量（AI）の限度値を定めるため、不純物C*に関する非臨床評価として、*in silico* 発がん性潜在分類アプローチ（CPCA）が実施された。その後、変異原性及び代謝に関する試験を実施し、AI 限度値をより明確にするため、不純物C*を用いた追加の *in vitro* 試験が 3 試験（Ames 試験、哺乳類細胞遺伝子突然変異試験、ヒト肝ミクロソーム及びラット肝 S9 における代謝試験）実施された。この評価は、米国FDA のウェブページで公開されている現行ガイダンス「CDER Nitrosamine Impurity Acceptable Intake Limits」に従って実施された（FDA 2024）。これは、EMA ガイダンス（EMA 2024）と比較しても、より保守的なアプローチである。

8.4.1.2. *In Silico* carcinogenic potency categorization approach（非 GLP、試験番号 EQR-6850-142.01）

不純物C*については、発がん性データも規制当局による AI 限度値も得られていない。そのため、この不純物に対する適切な AI を導き出すために、*In Silico* CPCA 手法が用いられた。さらに、文献、データベース、MultiCASE 社のソフトウェアツール QSAR Flex v. 2.8を用いて、関連代替物質の検索と構造活性相関分析に基づく評価が実施された。

毒性発現機構としては、ニトロソアミンは直接的に DNA と反応するわけではなく、代謝的に活性化されて化学反応性の高い物質に変化する必要がある（EMA 2020）。構造的には、不純物C* は[redacted]である。N-ニトロソジメチルアミン（NDMA、AI = 96 ng/day）や N-ニトロソジエチルアミン（NDEA、AI = 26.5 ng/day）などの単純な低分子揮発性ニトロソアミンと比較して、不純物C*の分子量は[redacted] g/mol と、より複雑な分子である（FDA 2024）。したがって、不純物C*は、これらの化合物と比較して発がん性リスクが低いことが予想された。

CPCA 手法に従い、不純物C* の[redacted]（[redacted]）であることから、Potency スコアは[redacted] と算出された。したがって、ニトロソアミン不純物不純物C*は、[redacted]、Potency Category [redacted] に分類され、その[redacted]は[redacted] ng/日であった。

この[redacted]は、文献検索により発見された N-ニトロソ-1,4-オキサゼパンの構造と共通又は類似した特徴を含む 6 つの類似化合物のリードアクロスによる算出値と非常に類似している。そのうちの 3 つ、ジニトロソホモピペラジン、N-ニトロソヘキサメチレンイミン、N-ニトロソモルフォリンは、それぞれ 100、313、127 ng/日の AI 値が算出されている。さらに、規制対象の AI を持つ 3 つの関連 NDSRI である N-ニトロソ-フェノルドパム、N-ニトロソ-デスメチルアゼラスチン、及び N-ニトロソ-レボキセチンの承認 AI 値は、それぞれ 100、100、及び 127 ng/日である。

これらを総合すると、ブレンソカチブの NDSRI としての 不純物C*の [redacted] は [redacted] ng/日とすることが、*In Silico* アプローチに基づいて科学的に妥当であると考えられた。

8.4.1.3.　*In Vitro* Ames 試験（GLP、試験番号 STURS24AA0598-1）

Ames 試験（GLP）では、不純物C*の複数の濃度を用いた 2 つの独立した実験が、*Salmonella typhimurium* 株 TA98、TA100、TA1535、及び TA1537、ならびに *Escherichia coli*株 WP2 uvrA（pKM101）において、代謝活性化の有無それぞれにおいて実施した。なお、代謝活性化は前培養法によりラット及びハムスターS9 濃度を 30%として実施した。さらに、予備試験で TA1535 株においてわずかに復帰変異コロニー数の増加がみられたため、確認試験を実施した。

被験物質は DMSO に溶解した。陰性対照（精製水）、溶媒対照（DMSO）、及び陽性対照（代謝活性化なし：アジ化ナトリウム、4-ニトロ-o-フェニレンジアミン、メチルメタンスルホネート；代謝活性化あり：2-アミノアントラセン；ニトロソアミン陽性対照：NDEA 及び 1-シクロペンチル-4-ニトロソピペラジン）を適切な試験条件下で実験に含めて評価した。

実験 I は、フェノバルビタール／β-ナフトフラボン誘導ラット肝 S9 を用いて、代謝活性化なしで実施した。実験 II は、フェノバルビタール／β-ナフトフラボン誘導ハムスター肝 S9 を用いて実施した。実験に用いた被験物質の濃度は以下の通りである。

実験 I（代謝活性化なし、ラット肝 S9 あり）：

- 0.316、1、3.16、10、31.6、100、316、及び 1000 µg/プレート［TA98、TA100、及び TA1537（代謝活性化あり）］
- 1、3.16、10、31.6、100、316、1000、2500、及び 5000 µg/プレート［TA98 及び TA1535（代謝活性化なし）］
- 3.16、10、31.6、100、316、1000、2500、及び 5000 µg/プレート［TA100 及び TA1537（代謝活性化なし）、TA1535（代謝活性化あり）、*Escherichia coli* 株 WP2 uvrA（pKM101）（代謝活性化あり及びなし）］

実験 II（代謝活性化あり、ハムスター肝 S9 のみ）：

- 0.316、1、3.16、10、31.6、100、316、及び 1000 µg/プレート［TA98（代謝活性化あり）］
- 1、3.16、10、31.6、100、316、1000、2500、5000 µg/プレート［TA100、TA1535、TA1537、*Escherichia coli* 株 WP2 uvrA（pKM101）（代謝活性化あり）］

さらに、確認試験では以下の濃度も試験された（TA1535 のみ）：

- 3.16、10、31.6、100、250、500、750 µg/プレート（代謝活性化なし及びラット肝 S9 あり）
- 1、3、6、9、15、及び 30 µg/プレート（ハムスター肝 S9 あり）

被験物質の沈殿が、すべての試験株で観察され、細胞毒性も複数濃度で認められた。

被験物質の少なくとも 5 種類の異なる濃度を、ラット肝 S9 あり、ハムスター肝 S9 あり、及び代謝活性化なしで、各系統で分析した。精製水及び溶媒（DMSO）対照によるプレート当たりの復帰変異体数は、試験施設の背景データと一致した。また、各条件下における N-ニトロソアミン陽性対照群では、プレート当たりの復帰変異体数が有意に増加した。適合基準はすべて満たされており、試験結果の妥当性が示された。

ラット肝 S9、ハムスター肝 S9、及び代謝活性化なしで試験したあらゆる濃度レベルの不純物C*で処理した後、5 種類の試験菌株のいずれにおいても、生物学的関連性のあるプレート当たりの復帰変異体数の増加は認められなかった。この Ames 試験において、不純物C*の変異原性は陰性であった。

8.4.1.4. *In Vitro* マウスリンパ腫アッセイ（GLP、試験番号 STUGC24AA2299-2）

不純物C*がマウスリンパ腫チミジンキナーゼ遺伝子座（$tk^{+/-}$）において突然変異を誘発するかどうかを調べるため、L5178Y 細胞株を用いて *in vitro* ほ乳類細胞突然変異試験（マウスリンパ腫アッセイ）が GLP 適用で実施された。細胞は、不純物C*で4 時間処理し、代謝活性化あり及びなし（5%ラットフェノバルビタール／β-ナフトフラボン誘導S9；4 時間+S9 及び 4 時間-S9 のそれぞれ）と代謝活性化なし（24 時間-S9）で処理した。

0.000195、0.00039、0.00078、0.00156、0.00313、0.00625、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2、0.5 mg/mL（培地中の最終濃度）を含む 12 種類の濃度で試験を実施した。

被験物質は DMSO に溶解した。陰性対照（細胞培養培地）、溶媒対照（DMSO）、及び陽性対照（エチルメタンスルホン酸塩、メチルメタンスルホン酸塩、及びベンゾ[a]ピレン）を実験に用いた。

処理期間終了時の被験物質沈殿は、4 時間-S9 条件下では 0.00313 mg/mL 以上の濃度で、4 時間+S9 条件下では 0.00625 mg/mL 以上の濃度で、24 時間-S9 条件下では 0.025 mg/mL 以上の濃度で認められた。したがって、突然変異分析には以下の濃度が選択された。

- 4 時間-S9 条件下では、0.00039、0.00078、0.00156、及び 0.00313 mg/mL
- 4 時間+S9 条件下では 0.00078、0.00156、0.00313、及び 0.00625 mg/mL
- 24 時間-S9 条件下では 0.00313、0.00625、0.0125、及び 0.025 mg/mL

DMSO 中の 9 濃度の不純物C*の測定濃度（0、0.039、0.078、0.156、0.313、0.625、1.25、2.5、及び 50 mg/mL）は、理論濃度の 94.8%から 112.3%であった。DMSO 中の被験物質は、室温で 24 時間以上安定であった。

陰性対照及び溶媒対照（DMSO）によって誘発された突然変異頻度は、50～170 突然変異体/10^6 細胞の許容範囲内であった。陽性対照であるエチルメタンスルホン酸塩、メチルメタンスルホン酸塩及びベンゾ[α]ピレンは、突然変異頻度に明確な反応を示した。陰性対照、溶媒対照及び

陽性対照の突然変異頻度は、試験施設の背景データと一致した。すべての適合基準が満たされ、試験の妥当性が示された。

すべての処理条件下で試験された不純物 C*のすべての濃度において、生物学的に関連した突然変異体の増加は認められなかった。4 時間-S9、4 時間+S9、及び 24 時間-S9 条件下におけるすべての濃度の不純物 C*によって誘発された突然変異頻度は、マイクロウェル法におけるグローバル評価因子である 126 突然変異体/10^6 細胞を超えなかった。本試験では不純物 C*の突然変異誘発性は認められなかった。

8.4.1.5. *In Vitro* 代謝（非 GLP、試験番号 8547044）

ヒト肝ミクロソーム（HLM）及びラット肝 S9（フェノバルビタール又はβナフトフラボン誘導）における不純物 C*の代謝を特徴づけるため、*in vitro* 試験を実施した。NADPH の存在下又は非存在下で、HLM（0.5 mg/mL）又はラット S9（1 mg/mL）に不純物 C*（5 µM）を加え、60 分間まで培養した。マトリックスの代謝活性を示すために、コントロールとしてブレンソカチブ（5 µM）及び N-ニトロソモルフォリン（代謝活性化を受けることが知られているニトロソアミン化合物、5 µM）を用いて同様の条件下で培養した。各化合物の代謝物は特定され、特にα水酸化（α-N-ニトロソアミン）又はその下流生成物によって形成される可能性のある生物活性代謝物の同定に重点が置かれた。LC-HRMS（液体クロマトグラフィー高分解能質量分析）クロマトグラムの保持時間とピーク面積を使用して、不純物 C*の代謝物が同定され、その相対量が推定された。

クロマトグラフィーデータに基づき、HLM における不純物 C*の代謝回転は中程度であり、相対ピーク面積は 0 分で 86.2%であったのが 60 分で 41.0%に減少した。フェノバルビタール誘導ラット S9 との培養でも同程度の代謝が確認されたが（84.7%から 43.7%に減少）、β-ナフトフラボン誘導ラット S9 との培養ではやや減少した（86.3%から 65.8%に減少）。HLM 及びラット S9 との培養後、不純物 C*の代謝物が 14 個確認された。HLM との培養で確認されたすべての代謝物はラット S9 との培養でも確認され、HLM とフェノバルビタール誘導ラット S9 の 60 分間の培養後で比較した場合、各代謝物の相対的な量は 2 倍以内の範囲に収まっていた。すべての代謝物において、オキサゼパン環上で代謝が起こり、[redacted]が失われた。不純物 C*代謝物の一つであるブレンソカチブが培養開始時試料や陰性対照（NADPH 非存在下、ミクロソーム又は S9 非存在下）を含むすべての培養で 13.6%～15.3%の割合で確認され、不純物 C*標準溶液中でも確認された。培養中のブレンソカチブ及びその代謝物の量から、ブレンソカチブは不純物 C*試料中の代謝物であると同時に不純物である可能性が高い。不純物 C*代謝物の 5 つ（Met-1、Met-2、Met-3、Met-4、Met-11）は、その構造及びブレンソカチブを用いた培養で存在が確認されたことから、ブレンソカチブの代謝物でもあると考えられる。これら 5 つの代謝物は、60 分間の HLM との培養では総量の 34.4%（個別では 0.8%～18.1%）を占め、フェノバルビタール誘導ラット S9 では 30.4%（個別では 1.3%～15.2%）を占めた。残りの 8 つの代謝物（60 分間の HLM との培養における個々の割合は 0.4%から 4.5%、合計で 10%未満）は、不純物 C*に特有であると考えられた。予定している構造に基づいて、これらの代謝物の一部が形成される最初のステップは、α-水

酸化であり、その後に化学的再配置が起こる可能性がある。

まとめると、HLM との培養で確認されたすべての代謝物は、フェノバルビタール誘導ラット S9 との培養と比較可能なレベルで、ラット S9 との培養でも確認された。これらのデータは、不純物 C*にはヒト特有の代謝物や代謝経路が存在せず、α-水酸化代謝は副次的な経路であることを示している。

8.4.1.6. 量子力学的な評価（非 GLP、試験番号 VV-NC-001334）

不純物 C*の発がん性及び P450 結合性についての量子力学（QM）評価を、計算及び統計モデリングにより実施した。

不純物 C*の QM 評価では、発がん性ポテンシャルが低く、予測[redacted]>[redacted]mg/kg、[redacted]>[redacted] µg/日であり、懸念される化合物群ではないとみなされている。統計モデルでは、いくつかの P450 アイソザイム（CYP1A1、2A6、2B6、及び 2C8）が不純物 C*の触媒的に最適な結合及び α-ヒドロキシル化の可能性があると予測されているが、QM 発がん性ポテンシャル予測及び P450 結合評価の枠組みでは、QM 発がん性ポテンシャル予測の方が優先される。

したがって、不純物 C*は、予測[redacted]>[redacted] mg/kg（[redacted]）であり、[redacted]>[redacted]µg/日に対応する、[redacted]とみなされ、[redacted]とみなされる。

8.4.1.7. 要約

不純物 C*は、Tg.RasH2 マウス及び Wistar Han ラットにおけるがん原性の評価に加え、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験においても陰性であった原薬（ブレンソカチブ）と高い構造類似性を示す NDSRI である。

不純物 C*は、[redacted]の誘導体であり、[redacted]基周辺の α 炭素の立体障害は限定的であるが、β 炭素の大きな置換基によって生じる潜在的な立体障害がある。不純物 C*は分子量が大きいため、低分子で揮発性のニトロソアミン（例えば、NDMA や NDEA）と比較して発がん性は低いと予想された。

不純物 C*は、Ames 試験及び *in vitro* ほ乳類細胞突然変異試験（マウスリンパ腫試験）では陰性であった。不純物 C*が α-水酸化によって代謝される可能性は排除できないものの、HLM における代謝経路は副次的であると思われた。重要なことは、HLM で確認されたすべての代謝物がラット S9 との培養でも同等のレベルで存在しており、*in vitro* 遺伝毒性試験の陰性データから、ヒトにおける遺伝子突然変異及び発がん性のリスクは低いことが示唆された。注目すべきは、これらの *in vitro* 遺伝毒性試験には、フェノバルビタール／β-ナフトフラボン誘導ラット S9 を用いた評価がされていることであり、この S9 は、不純物 C*の *in vitro* 代謝が HLM と同程度であることが示されたラット S9 マトリックスと類似のものであることである。

不純物C*の非臨床評価を総合的に考慮すると、ブレンソカチブの NDSRI としての 不純物C*の[redacted]は[redacted] µg/日とすることが科学的に妥当である。この限度値は、[redacted] mg 製剤（錠剤）における 不純物C*を[redacted] ppm まで支持するものであり（[redacted] µg の 不純物C*÷[redacted] mg=[redacted] ppm）、1 日あたり 25 mg のブレンソカチブを服用する患者にとって安全性上の懸念はないと予想される。

8.4.2. その他の不純物

その他の不純物及び／又は分解物の適格性を特に評価する非臨床毒性試験は行われていない。これまでに得られている情報に基づくと、原薬／製剤中のすべての不純物及び／又は分解物は適格性が評価されているか、適切に管理されている。

ICH M7（R1）ガイドライン（ICH M7（R1）ガイドライン）に従い、ブレンソカチブの製造工程において潜在的な変異原性不純物（PMI）を 2 種類の相補的な（Q）SAR 法で評価した［DEREK Nexus（Lhasa Ltd.）と SARAH Nexus（Lhasa Ltd.）］。PMI の評価に従うと、原薬／製剤で管理すべき 2 種類の不純物／分解物は、クラス 5「非変異原性不純物」に分類される。

これらの 2 種類の不純物／分解物について提案されるコード及び対応する規格限度は以下のとおりである（Module 3.2.P.5.6 [1.5 項]）。

- 不純物A*（別名[redacted]）、0.60%以下
- 不純物B*（別名[redacted]）、0.50%以下

不純物 A*（不純物 A*）の適格性は、イヌを用いた 9 箇月間 GLP 毒性試験で評価されている（3.2.4 項、505523 試験）。この試験でブレンソカチブを投与したすべての群で 不純物 A*（0.06 mg/kg/day）も Week 36 ～ 39 に評価したところ、この不純物の NOAEL は評価に使用した用量（0.06 mg/kg/day）であった。ヒト等価用量（HED）は 33 µg/kg/day（0.06 mg/kg/day ÷ 1.8）である。ブレンソカチブの MRHD はヒト 1 人に 25 mg/day、又は体重 60 kg のヒトで 417 µg/kg/day である。不純物 A*に対して提案される規格は 0.60%以下であるため、患者にブレンソカチブを投与したとき、この不純物の最高用量は 2.5 µg/kg/day（417 µg/kg/day × 0.60%）となり、安全マージンは 13 以上である（33 µg/kg/day ÷ 2.5 µg/kg/day）。

不純物B*の適格性は、野生型 rasH2 マウスを用いた 28 日間の GLP 一般毒性試験で評価されている（5.1.1 項、8003479 試験）。この試験でのブレンソカチブの NOAEL は 200 mg/kg/day であり、不純物 B*の原薬中（バッチ番号 6850-P54/19-402）濃度は 0.26%であった。したがって、不純物 B* の NOAEL は 0.52 mg/kg/day（200 mg/kg/day × 0.26%）となり、HED は 43 µg/kg/day（0.52 mg/kg/day ÷ 12）である。ブレンソカチブの MRHD はヒト 1 人に 25 mg/day、又は体重 60 kg のヒトでは 417 µg/kg/day である。この不純物に対して提案されている規格は 0.50%以下であるため、患者にブレンソカチブを投与したとき、この不純物の最高用量は 2.1 µg/kg/day（417 µg/kg/day × 0.50%）となり、安全マージンは 20 以上（43 µg/kg/day ÷ 2.1 µg/kg/day）である。

さらに、不純物 A*及び 不純物 B*は、*In Vivo* において微量代謝物として同定されている（Module 2.6.4 [5.3 項]）。不純物 A* は、雌雄マウスの血漿（循環放射能の 1%未満）及び雌雄ラットの糞便（投与量の 1～3%）で微量代謝物として観察された代謝物 M12 と同一の構造を有している。不純物 B*は、雌雄ラットの血漿（循環放射能の 1%以下）、雌雄ラットの糞便（投与量の1%未満）、及びイヌの血漿（循環放射能の 1%未満）において微量代謝物として検出された代謝物 M35 と同一の構造を有している。

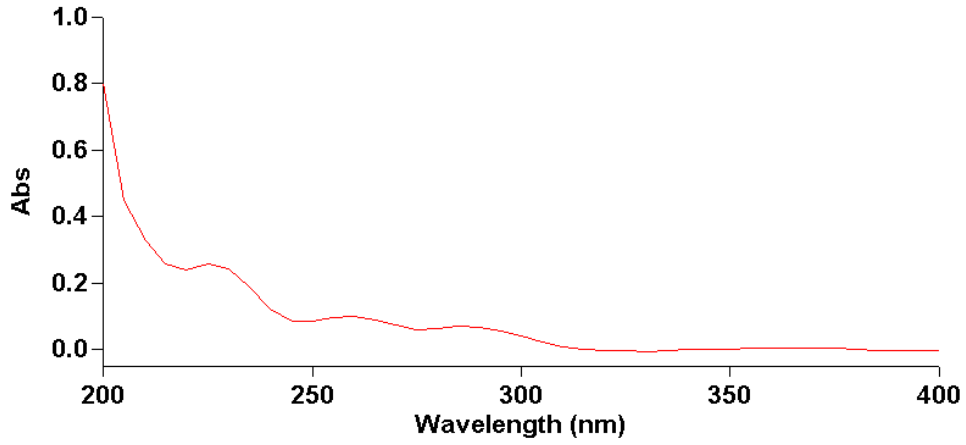
要約すると、原薬／製剤中で管理すべきすべての不純物又は分解物は、これまでに得られている情報に基づき、適格性が評価されている。

8.5. 潜在的な光毒性（GLP、20059176 試験）

ブレンソカチブは波長 290 ～ 700 nm の光を吸収するが、290 nm 超では光吸収のピークはない（図 2）。有色ラット及び無色ラットにおける分布を全身オートラジオグラフィーで測定したところ（Module 2.6.4 [4.3 項]）、有色ラットでは眼球血管膜及びその他のメラニン含有組織で有意に分布した。したがって、ブレンソカチブの潜在的な光毒性の探索的評価は意義があると判断した。

ブレンソカチブの潜在的な光毒性は *in vitro* ニュートラルレッド光毒性（3T3 細胞）アッセイで評価した（20059176 試験）。OECD ガイドライン（OECD, 2004）に従い、この *in vitro* 試験系を使用して主要溶媒での溶解性と安定性の限度まで評価を行ったが、光毒性はみられなかった。

図 2: ブレンソカチブの UV 吸収スペクトル



8.6. 肺及び腎臓組織の超微細構造の評価（非 GLP、EM-14.352 試験及び EM-14.353 試験）

ラット（527409 試験）とイヌ（527414 試験）を用いた 1 箇月間 GLP 試験で、光学顕微鏡を使用して病理組織学的評価を行ったところ、種々の臓器で細胞内のリン脂質蓄積を示唆する空胞が確認された。肺などの臓器で観察された空胞の特徴を更に明らかにするために、ラットとイヌを用いた 1 箇月間反復投与毒性試験の溶媒陰性対照群及び明らかに空胞がみられた高用量群の動物

など、一部の動物から肺と腎臓（腎臓はラットのみ）を採取して TEM で検討した。評価した検体は、ラットでは対照群及び 100 mg/kg/day を投与したラットから得てホルマリン固定した肺の切片（各群それぞれ 2 匹）及び腎臓の切片（各群それぞれ 4 匹）（EM-14.352 試験）、イヌでは対照群及び 75 mg/kg/day を投与した投与したイヌから得た肺の切片（各群それぞれ 2 匹）（EM-14.353 試験）などであった。

ブレンソカチブを投与したラットから得た肺の顕微鏡写真で超微細構造を評価したところ、肺胞マクロファージの肥大、及びリソソームに蓄積した明らかに渦巻き状の膜残遺物の増加がみられ、PLD と一致すると判断された。イヌでも同様に、PLD と一致した、肺胞マクロファージにおけるリソソーム中の膜残遺物の蓄積増加がみられた。

ブレンソカチブを投与したラットから得た腎臓の顕微鏡写真で超微細構造を評価したところ、ミトコンドリア膨張、管腔残屑の増加、及び雌のみで細胞質空胞化又は細胞質の希薄化の主に低グレードの変性が観察された。ブレンソカチブを投与した雄で評価した部位では、光学顕微鏡的所見（尿細管空胞化）に対応する明らかな超微細構造所見は認められなかったが、雌では光学顕微鏡でみられた腎尿細管空胞化に対応する可能性のある超微細構造として、近位尿細管細胞質の空胞化及び／又は近位尿細管細胞質の希薄化などがみられた。

9. 考察及び結論

非臨床毒性試験の総合的なプログラムが終了している。プログラムの内容は、ラットとイヌを用いた反復投与一般毒性試験、遺伝毒性及びがん原性試験、ラットとウサギを用いた生殖発生試験、並びに光毒性のリスクアセスメントなどであった。NOAEL 及び LOAEL を投与したときの主な曝露データと、主要試験において定常状態でみられた総ブレンソカチブの AUC と遊離ブレンソカチブの AUC に基づいて、NCFBE に対する MRHD と比較したときの安全マージンを表 21 に要約する。毒性試験では C_{max} に関連すると考えられる毒性所見は認められなかったため、C_{max} に基づいた安全マージンは省略する。

以下では、一般毒性試験で特定された毒性の標的臓器とこれに対応する安全マージンについて考察する。

9.1. 一般毒性の総合リスクアセスメント

9.1.1. 一般状態

ラットにおける毒性の徴候は、主に 100 mg/kg/day 超を反復投与したときに明らかにみられ、全身毒性を反映している可能性があった。イヌでは流涎、泡状／液状／粘液状嘔吐、及び軟便／粘性便／水様便がみられ、発現率、重症度及び／又は持続期間は全般に用量に依存して増加した。

ケージの床敷では黄色い汚れ（ラット）や黄色や茶色の嘔吐物（イヌ）が観察され、イヌでは 75 mg/kg/day の投与で着色便（オレンジ／黄／緑）がみられたが、これらの観察に明らかに関連すると考えられる肝胆道又は腎臓／尿の変化は認められなかった。製剤は茶色／黄色であるため、製剤の色がこれらの観察に寄与した可能性がある。

一般状態の所見はいずれも投与中止後、速やかに消失した。

9.1.2. 腎臓

ラットとイヌを用いた 6 箇月間毒性試験では、いずれの動物種でも試験で評価した最高用量（50 mg/kg/day）の投与で、機能の変化（血漿及び／又は尿パラメータ）を伴う顕微鏡的変化が腎臓で生じた。1 箇月間試験でも同じ所見がより高用量（ラットで 100 mg/kg/day、イヌで 75 mg/kg/day）でみられた。そのため 6 箇月間試験では、腎臓所見に関する最小作用量は 50 mg/kg/day であった。この用量を投与したとき、MRHD と比較してラットでの総ブレンソカチブの AUC に基づいた曝露倍数は 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づいた曝露倍数は 71 倍であった。イヌでは試験を早期終了したため、AUC に基づいた曝露倍数は算出できなかった。一方、6 箇月間試験では、ラットで 9 mg/kg/day、イヌで 8 mg/kg/day を投与したときに腎臓に顕微鏡的変化はなく、この用量を投与したとき、ラットでの総ブレンソカチブの AUC に基づいた曝露倍数は 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づいた曝露倍数は 10 倍、イヌではそれぞれ 7 倍と 16 倍となる（表 21）。腎臓に生じた変化は、1 箇月間試験では部分的に可逆的、6 箇月間試験では完全に可逆的であった。

曝露倍数を考慮すると、NCFBE のヒトに MRHD を投与したときの腎臓毒性リスクは低いと考えられる。

9.1.3. リン脂質症

ラットとイヌを用いた 1 箇月間と 6 箇月間の毒性試験で、肺、及び、程度は低いがリンパ節及び脾臓などの免疫組織に空胞化マクロファージの形態学的変化がみられた。空砲はリン脂質が細胞内に蓄積した結果と考えられ、PLD とされる状態で典型的な所見である。ブレンソカチブを投与した動物の肺の微細構造を TEM で観察したところ、これらの空胞で渦巻き状／層状の脂質構造という典型的なパターンがみられ、PLD が原因であることが支持された。

PLD はよく知られており、複数の薬物や薬剤などについて明らかにされており（Halliwell, 1997; Reasor, 1981; Reasor and Walker, 1981）、典型的には陽イオン性両親媒性とされる物理化学的性質と関連がある（Chatman et al, 2009; Halliwell, 1997）。ブレンソカチブは、親油性が高い部分にリンクした陽イオン性親水性の環状アミンを含んでおり、上記の性質と一致する。PLD は肺で顕著なことが多く、肺のリン脂質ターンオーバーにおけるマクロファージの大きな役割に関連する（Halliwell, 1997）。肝臓や腎臓などの他の臓器での空胞も、PLD を起こす薬剤で報告が多い。PLD の毒性学的意義や性質の考察においては、PLD は毒性を反映しているのではなく適応的であると説明されることが多く、ほとんどの場合は可逆的である（Forbes et al., 2014; Lewis et al, 2014; Reasor, 1981; Reasor and Kacew, 2001; Reasor et al., 2006）。

ブレンソカチブの毒性試験では、PLD 関連の所見は用量依存的で可逆的であった。ラットでは、肺では 50 mg/kg/day 以上、リンパ組織では 100 mg/kg/day の投与で変化がみられ、15 mg/kg/day 以下の投与ではこのような影響はみられなかった。イヌを用いた 1 箇月間及び 6 箇月間試験では、肺では 8 mg/kg/day 以上、リンパ組織では 50 mg/kg/day 以上の投与で変化がみられた。イヌを用いた 9 箇月間試験では、いずれの組織でも、最高用量の 8 mg/kg/day まで PLD の顕微鏡的エビデンスは認められなかった。

ブレンソカチブ誘発性 PLD に対して最も感度が高い臓器は肺と考えられる。肺でみられた変化に基づくと、PLD に関する最小作用量又は無作用量を投与したときの曝露倍数（MRHD との比較）は次のとおりである：ラットの 6 箇月間試験において 50 mg/kg/day を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍、ラットの 1 箇月間試験における 15 mg/kg/day の投与ではそれぞれ 28 倍と 13 倍、イヌの 6 箇月間試験における 8 mg/kg/day の投与では 7 倍と 16 倍、9 箇月試験における 8 mg/kg/day の投与では 5 倍と 12 倍（表 21）。

PLD は臨床でモニタリング可能とは考えられない。しかし、所見の性質（空胞化マクロファージ）、明らかな用量-反応関係、可逆性及び安全マージンを考慮すると、この顕微鏡的所見は NCFBE に対する MRHD について臨床的に意味があるとは予想されない。

9.1.4. 肺

ラットの肺でもイヌの肺でも、PLD と一致した空胞化マクロファージの集簇がみられ、いずれも完全に可逆的であった。肺の PLD について、最小作用量と無作用量、及び対応する曝露倍数は 9.1.3 項に記載する。

9.1.5. 免疫系

ラットとイヌにおいてみられた、ブレンソカチブの好中球機能に対する作用及びリンパ組織における PLD と一致した顕微鏡的変化は、潜在的な免疫毒性の評価の一部として考察する（8.1 項）。これらの総合的な評価に基づき、ブレンソカチブは治療上意義のある曝露量で免疫毒性を有する可能性はないと考えられる。

9.1.6. 精巣に対する毒性

イヌでは精巣に対して用量依存的な毒性が 1 箇月間試験と 6 箇月間試験ではみられたが、9 箇月間試験ではみられなかった。イヌを用いた用量範囲設定試験及び 1 箇月間と 6 箇月間の GLP 試験から得た雄の生殖組織は、[redacted] が独立して検討した（[redacted]）。以下の考察には彼女の専門的評価が反映されている。

6 箇月間試験では（投与開始時に月齢 5 ～ 6 箇月。用量は 0、2、8 又は 50 mg/kg/day）、50 mg/kg/day を投与したすべてのイヌで著明から重度の精細管変性／萎縮及び精巣上体の変化（精子数の減少及び／又は細胞残屑の増加及び／又はイニシャルセグメントのアポトーシス）が観察された。劣化した精細管はセルトリ細胞で裏打ちされ、基底核は健康で生存していると考えられた。この用量ではライディッヒ細胞過形成／肥大も観察され、精子形成の減少に対する適応反応と判断された。8 mg/kg/day を投与したイヌの精巣を病理組織学的に評価したときも、同様ではあるが重度は低い変化がみられ、ライディッヒ細胞には特に所見は認められなかった。精子形成の変化パターンは、毒性の標的は精原細胞の分裂及び／又は精母細胞が減数分裂前期を通じて成熟するプロセスであることを示唆する。2 mg/kg/day の投与では、精巣にも精巣上体にもブレンソカチブに関連する変化は認められなかった。6 箇月間の回復期間終了後には、高用量群でもほとんどの精細管で精子形成は正常で、精巣上体の精子の数は正常であり、生殖細胞のアクティブな変性はみられなかったため、上記の所見は大幅に改善したことが示された。しかし、これらのイヌでは種々の程度の精子形成減少もみられたため、回復は不完全と判断された。

1 箇月間試験では（投与開始時の月齢は 8 ～ 9 箇月、用量は 0、3、15 又は 75 mg/kg/day）、精巣の所見は 75 mg/kg/day の高用量でのみみられ、所見は 6 箇月間試験で 8 mg/kg/day を投与したイヌでみられた所見と同様であった。1 箇月間試験では、1 箇月間の回復期間中に精巣の所見は完全に可逆的であった。

9 箇月間試験では（投与開始時の月齢は 7 ～ 8 箇月、用量は 0、1、2、4 又は 8 mg/kg/day）、最高用量の 8 mg/kg/day まで精巣に対する毒性はみられなかった。さらに、テストステロン値に変化はなく、精子を完全に評価しても特に所見は認められなかった。本試験における NOAEL は 8 mg/kg/day と考えられた。9 箇月試験で 8 mg/kg/day を投与したとき、Day 273 時点での雄の平均 AUC と雌の平均 AUC はそれぞれ 48.1 µM*h と 54.6 µM*h であり、6 箇月間試験の Day 181 時点

での AUC（60.4 μM*h と 74.7 μM*h）よりわずかに低かった。この違いは、生体試料中薬物濃度分析及び TK 分析を含む両試験が、同一の試験施設で、同一の被験物質製剤及び同一の動物供給業者を使用し、GLP 下で実施されたことから、生物学的変動によるものと判断されました。それにもかかわらず、9 箇月間試験で曝露量が少なかったことは、この用量で精巣／精巣上体に所見が認められなかったことの理由かもしれないが、6 箇月間試験と 9 箇月間試験では開始時の動物の月齢がわずかに異なっていた（5 ～ 6 箇月と 7 ～ 8 箇月）ことの影響も完全に排除できるわけではない。

9 箇月間試験のほうが投与期間が長く、精巣に対する毒性や雄の生殖機能もより総合的に評価しており、ブレンソカチブに関連するすべての非臨床所見に対して、明確な用量依存／曝露依存の閾値を示したことから、安全マージンの算出では 9 箇月間試験のほうが意義があると考えられる。9 箇月間試験で NOAEL（8 mg/kg/day）を投与したとき、MRHD と比べた曝露倍数は定常状態での総ブレンソカチブの AUC に基づくと 5 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 12 倍であった（表 21）。

ラットを用いた試験（全試験）及びマウスを用いた 28 日間試験では、全身曝露量がはるかに多かったにもかかわらず、精巣に所見は認められなかった。具体的には、ラットにおける反復投与毒性試験（1 箇月及び 6 箇月）でそれぞれ評価された最高用量である 100 mg/kg/日及び 50 mg/kg/日において、精巣所見は観察されなかった。MRHD と比べた曝露倍数は定常状態での総ブレンソカチブの AUC に基づくと、100 mg/kg/日及び 50 mg/kg/日において、それぞれ 199 倍及び 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと、94 倍及び 71 倍であった（表 21）。さらに、6 箇月試験において、雄ラットに 50 mg/kg/日までのブレンソカチブを 10 週間投与しても、交尾能及び受胎能に対して、投与に関連した影響は認められなかった。1 箇月試験において、マウスに最高用量 200 mg/kg/日まで投与しても、精巣に異常は認められなかった。NOAEL（200 mg/kg/日）において、Day 28 における雌雄を合わせた平均 AUC は 2160 μM・h であり、MRHD と比べた曝露倍数は定常状態での総ブレンソカチブの AUC に基づくと 224 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 288 倍であった。

精巣に対する毒性は、第 I 相臨床試験でブレンソカチブ 40 mg（QD）を 28 日間投与して評価した。最終投与後 13 週間の時点で精液検査を評価したが、臨床的に有意な変化の報告はなかった（D6190C00001 試験 [12.5.4 項]）。

以上のように、非臨床及び臨床データを包括的に評価した結果、ヒト被験者における精巣毒性のリスクは低いと考えられる。イヌを用いた 9 箇月間試験で、精巣及び雄の生殖パラメータに関し、より包括的な評価を含めた NOAEL で特定された保守的な曝露倍数（5/12 倍）と、マウス、ラット、及びヒトではそのような所見が認められなかったことを考慮すると、患者の安全性は確保されていると考えられる。したがって、ブレンソカチブで治療を受けた患者において、臨床的に意義のある曝露では、男性の生殖能に影響を与える可能性はないと考えられる。

9.1.7. 歯周病

イヌを用いた 6 箇月間試験では高用量の 50 mg/kg/day を投与したとき歯周疾患が生じたため、Week 18 に投与を中止し、雄と雌それぞれ 7 匹中 4 匹を人道的安楽死させる必要が生じた。残りのイヌは、その後 26 週間にわたり被験物質を投与せずに可逆性を評価した。投与を中止すると歯周疾患の徴候は消失したが、歯周組織の炎症の病理所見は回復期間終了時でも残存していた（程度は投与期間終了時よりもはるかに低かった）。イヌを用いた 6 箇月間試験と 9 箇月間試験では、9 箇月間試験で使用した最高用量である 8 mg/kg/day まで歯周病の徴候はみられなかった。早期に安楽死させたため、歯周組織に対する作用量である 50 mg/kg/day を投与したときと比較した曝露倍数は算出できなかった。無作用量（8 mg/kg/day）を投与したときの曝露倍数は、6 箇月間試験での総ブレンソカチブの AUC に基づくと 7 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 16 倍、9 箇月間試験についてはそれぞれ 5 倍と 12 倍であった（表 21）。

ラットを用いた試験では全身曝露量がはるかに高かったにもかかわらず、いずれの試験でも歯の所見は認められなかった。

PLS 患者では、小児期に歯周病が生じることが多い（Biraggari, 2015; Dalgic, 2011; Tooms, 1999）。PLS は DPP1 をコード化する遺伝子の変異を特徴とするまれな疾患で、その結果、DPP1 活性がほとんどないか全くない。イヌを用いた 6 箇月間試験で観察された歯周疾患は有害ではあるが予想された作用で、非常に高用量のブレンソカチブを慢性的に投与したときにみられるオンターゲット薬理作用と考えられる。

9.1.8. 骨格筋

ラットを用いた用量範囲設定試験では、200 mg/kg/day を 7 日間投与したとき骨格筋の筋線維の変性／再生が記録された。そのため、1 箇月間の GLP 試験では筋肉をより広範囲に評価した。ラットを用いた 1 箇月間試験では、この作用は 100 mg/kg/day を投与したときにヒラメ筋のみで記録され、完全に可逆的であった。ラットを用いた 6 箇月間試験では筋肉損傷の病理組織学的徴候は最高用量の 50 mg/kg/day までみられず、イヌを用いた試験ではいずれの試験でもみられなかった。ラットの筋肉に対する毒性の最小作用量及び無作用量を投与したときの曝露と MRHD を投与したときの曝露を比較すると、曝露倍数は最小作用量（100 mg/kg/day）を投与したときの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 199 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 94 倍、無作用量（50 mg/kg/day）についてはそれぞれ 150 倍と 71 倍であった（表 21）。

曝露倍数に基づくと、ラットの骨格筋でみられた所見は、NCFBE に対して MRHD を投与したときでは、臨床的意義がないと予想される。

9.1.9. 肝臓

イヌを用いた 1 箇月間試験で最高用量の 75 mg/kg/day を投与したとき、肝臓で可逆的ではあるが軽微から著明な小葉中心部の空胞化、及び血漿中 ALT、AST 及び GLDH 濃度の上昇がみられた。イヌを用いた 6 箇月間試験では、評価した最高用量の 50 mg/kg/day の投与で ALT、AST 及び GLDH 値が上昇したが、これに対応する顕微鏡的所見は認められなかった。肺やリンパ組織などの他の臓器では、PLD を示す顕微鏡的変化パターンが観察され、PLD に関連する肝細胞の空

胞化及び血漿中肝酵素の増加が報告されているため（Asaoka et al., 2013; Hruban, 1984）、肝臓における反応は PLD に関連すると考えられるが、明らかな相関は確認されていない。

ラットを用いた 1 箇月間試験及び 6 箇月間試験では、肝臓には特筆すべき顕微鏡的所見は認められなかったが、6 箇月間試験では、ALT と AST の増加が雄ではすべての用量、雌では中用量と高用量の数匹でみられた。

毒性試験での肝臓所見は比較的良性であるため、NCFBE に対する MRHD をヒトに投与しても肝毒性があるとは予想されない。

9.2. 結論

一般毒性試験では、ラットとイヌで毒性の標的臓器が特定された。ブレンソカチブに関連する毒性所見はいずれも用量依存的、可逆的であり、MRHD を投与したときの曝露量よりも多い曝露量で生じた。NOAEL は、ラットでは 6 箇月間試験で 9 mg/kg/day、イヌでは 9 箇月間試験で 8 mg/kg/day と判断され、MRHD をヒトに投与したときと比べると、安全マージンはラットの総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 10 倍、イヌではそれぞれ 5 倍と 12 倍である（表 21）。

6 箇月間試験では、ラットでもイヌでも NOAEL を超えた用量及び／又は曝露量で肺と腎臓に顕微鏡的変化が生じ、イヌではこのほかにリンパ組織、精巣／精巣上体及び歯周組織でも観察された。肺とリンパ組織における形態学的変化は PLD と一致しており、歯周疾患はオンターゲット作用と考えられた。1 箇月間試験では、高用量を投与したときに骨格筋、肝臓、胸腺及び骨髄などのその他の組織に顕微鏡的所見がみられたが、これらの所見は 6 箇月間試験では観察されなかった。イヌを用いた 9 箇月間試験では特筆すべき所見は認められなかった。

ラットとイヌを用いた 6 箇月間試験及び 9 箇月間試験の結果は、臨床試験（6 歳以上の小児患者も含まれる）で 6 箇月を超えて投与することを十分に支持すると考えられる。また、臨床試験では動物で特定された毒性の潜在的な標的臓器が綿密にモニタリングされているが、ヒトではこれまで安全性の懸念はない。

In vitro 試験及び *in vivo* 試験で遺伝毒性の徴候は認められなかった。がん原性は、遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間試験で最高用量（50 mg/kg/day）まで、ラットを用いた 2 年間試験で最高用量（30 mg/kg/day）までみられなかった。これらの用量を投与したときの安全マージンは、雄と雌を合わせた平均総ブレンソカチブの AUC に基づくとマウスで 52 倍、平均遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 67 倍、ラットではそれぞれ 56 倍と 26 倍である（表 21）。

生殖能に対する影響は、雄ラットでは 50 mg/kg/day、雌ラットでは 100 mg/kg/day までみられず、これに対応する安全マージンは、雄の総ブレンソカチブの AUC に基づくと 150 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 71 倍であり、雌ではそれぞれ 128 倍と 61 倍であった。ラットを用いた EFD 試験では、胚・胎児の生存、胎児の重量及び胎児の主な奇形に対する有害作用は 100 mg/kg/day までみられず、対応する安全マージンは、総ブレンソカチブの AUC に基づくと 128 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 61 倍であった。この試験の文脈では、仔でみられた軽度な奇形と変異は可逆的ではあるが有害と考えられ、NOAEL は 3 mg/kg/day と判断され

た。ラットに対する 3 mg/kg/day の投与とヒトへの MRHD 投与を比較したときの安全マージンは総ブレンソカチブの AUC に基づくと 3 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 1 倍となるが、これらの観察はヒトに対する安全上のリスクとは判断されない。ウサギでは 50 mg/kg/day の投与まで胚・胎児毒性はみられず、安全マージンは、総ブレンソカチブの AUC に基づくと 20 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 36 倍であった。ラットを用いた PPND 試験では 20 mg/kg/day の投与まで有害所見はなく、安全マージンは総ブレンソカチブの AUC に基づくと 17 倍、遊離ブレンソカチブの AUC に基づくと 8 倍であった（表 21）。

In vitro アッセイでは光毒性の懸念は認められなかった。ブレンソカチブは、治療として意義のある曝露量では免疫毒性又は中毒／依存の可能性はないと考えられた。ブレンソカチブ原薬／製剤中の不純物又は分解物はいずれも適格性が確認されており、適切に管理されているため、ヒトの主要代謝物を評価する独立した非臨床安全性試験は必要ではない。対象患者集団及び年齢範囲を考慮すると、幼若動物を用いた試験は必要ではないと考えられる。

要約すると、ブレンソカチブの非臨床毒性の特徴は、規制及び適用されるガイドラインに従って適切な試験系と試験デザインで行われた試験で明らかになった。定常状態での総ブレンソカチブの AUC 及び遊離ブレンソカチブの AUC に基づいて算出した安全マージンは、妥当であった。これらのデータは総合的に、ブレンソカチブが NCFBE 患者の治療薬として適切な安全性プロファイルを有することを示している。

表 21:　動物を用いた主要試験の定常状態でみられた AUC と MRHD をヒトに投与したときの AUC を比較した曝露倍数

Species and Study	NOAEL or Doses with Noteworthy Toxicity Findings	Dose (mg/kg)	AUC (µM*h)		AUC Multiple	
			Total	Free[a]	Total	Free
Human (Report ICPD 00694-1)	25 mg/day (MRHD)	0.42	9.655[b]	1.236	-	-
Rat: 1-mo study (Study No. 527409)	NOAEL	15	270	16.36	28	13
	Lesions in lung, kidney, mesenteric lymph nodes, and soleus muscle	100	1920	116.35	199	94
Dog: 1-mo study (Study No. 527414)	NOAEL	15	138	40.99	14	33
	Lesions in lung, kidney, lymph nodes, liver, bone marrow, thymus, lymphohemoreticular tissues, and testes/epididymides	75	475	141.08	49	114
Rat: 6-mo study (Study No. 528313)	NOAEL	9	196	11.88	20	10
	NOAEL (male fertility)	50	1450	87.87	150	71
	Lesions in kidney and lung	50	1450	87.87	150	71
Dog: 6-mo Study (Study No. 528329)	NOAEL	2	12.7	3.77	1	3
	Lesions in testis and lung	8	67.5	20.05	7	16

Species and Study	NOAEL or Doses with Noteworthy Toxicity Findings	Dose (mg/kg)	AUC (µM*h)		AUC Multiple	
			Total	Free[a]	Total	Free
	Adverse dental findings; lesions in testis/epididymides, kidney, lung, and lymphoid tissues	50	ND[c]	-	-	-
Dog: 9-mo study (Study No. 505523)	NOAEL	8	51.4	15.27	5	12
Mouse: 6-mo carci study (Study No. 20354490)	Top dose	50	503	83	52	67
Rat: 2-year carci study (Study No. 8002910)	Top dose	30	538.5	32.63	56	26
Rat: EFD study (Study No. 497825)	NOAEL	3	28.7	1.74	3	1
	Skeletal variations	≥20	403	24.42	42	20
	Minor skeletal malformations	100	1240[d]	75.14	128	61
	NOAEL (female fertility)	100	1240[d]	75.14	128	61
Rabbit: EFD study (Study No. 497830)	NOAEL	50	195[e]	44.27	20	36
Rat: PPND study (Study No. 00335001)	NOAEL	20	163	9.88	17	8

[a] Free PK exposure data based on percentages of unbound brensocatib in mouse (16.50%), rat (6.06%), rabbit (22.70%); dog (29.7%), and human (12.8%) (Study ADME-AZS-Wave4-130621).
[b] Steady state AUC of 9.655 µM*h for total brensocatib at 25 mg QD in humans was derived by dividing the original value of 4060 ng*h/mL in Report ICPD 00694-1 with 420.5, the molecular weight of brensocatib as free base.
[c] This dose group was terminated early, and no plasma exposure was determined prior to necropsy.
[d] Exposure from a preceding dose-range finding study (Study No. 497631).
[e] Exposure from a preceding dose-range finding study (Study No. 497626).
AUC = area under the concentration-time curve; carci = carcinogenicity; EFD = embryofetal development; mo = month; ND = not determined; NOAEL = No-Observed-Adverse-Effect Level; PK = pharmacokinetic(s); PPND = pre- and postnatal development, QD = once daily.

10. 参考文献

Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CT. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. J Clin Invest. 2002 Feb;109(3):363-71. doi: 10.1172/JCI13462.

Asaoka Y, Togashi Y, Imura N, Sai T, Miyoshi T, Miyamoto Y. Immunohistochemistry of LAMP-2 and adipophilin for phospholipidosis in liver and kidney in ketoconazole-treated mice. Exp Toxicol Pathol. 2013 Sep;65(6):817-23. doi: 10.1016/j.etp.2012.11.008. Epub 2012 Dec 28.

Biraggari SK, Reddy KK, Sudhakar J, Bugude SS, Nichenametla R, Hakeem MA, et al. Papillion-Lefevre Syndrome: Periodontists' Perspective. Case Rep Dent. 2015;2015:137381. doi: 10.1155/2015/137381. Epub 2015 Oct 8.

Chalmers JD, Moffitt KL, Suarez-Cuartin G, Sibila O, Finch S, Furrie E, et al. Neutrophil Elastase Activity Is Associated with Exacerbations and Lung Function Decline in Bronchiectasis. Am J Respir Crit Care Med. 2017 May 15;195(10):138493. doi: 10.1164/rccm.201605-1027OC.

[redacted]

Chatman LA, Morton D, Johnson TO, Anway SD. A strategy for risk management of drug-induced phospholipidosis. Toxicol Pathol. 2009 Dec;37(7):997-1005. doi: 10.1177/0192623309352496.

[redacted]

Dalgic B, Bukulmez A, Sari S. Eponym: Papillon-Lefevre syndrome. Eur J Pediatr. 2011 Jun;170(6):689-91. doi: 10.1007/s00431-010-1367-4. Epub 2010 Dec 17.

De Schaepdrijver L, Delille P, Geys H, Boehringer-Shahidi C, Vanhove C. *In vivo* longitudinal micro-CT study of bent long limb bones in rat offspring. Reprod Toxicol. 2014 Jul; 46:91-7. doi: 10.1016/j.reprotox.2014.03.004. Epub 2014 Mar 13.

Doyle K, Lönn H, Käck H, Van de Poël A, Swallow S, Gardiner P, et al. Discovery of Second Generation Reversible Covalent DPP1 Inhibitors Leading to an Oxazepane Amidoacetonitrile Based Clinical Candidate (AZD7986). J Med Chem. 2016 Oct 27;59(20):9457-72. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01127. Epub 2016 Oct 11.

EMEA. Guideline on the non-clinical investigation of the dependence potential of medicinal products. London: Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). March 2006.

European Medicines Agency. CHMP Assessment Report. Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004 Nitrosamine impurities in human medicinal products. Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490. 25 June 2020. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/opinion-any-scientific-matter/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf. Accessed on 15 January 2025.

European Medicines Agency. Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products. 19 July 2024. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/opinion-any-scientific-matter/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders-applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726-2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf. Accessed on 15 January 2025.

Food and Drug Administration (FDA). CDER Nitrosamine Impurity Acceptable Intake Limits [Internet]. Available from: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cder-nitrosamine-impurity-acceptable-intake-limits. Accessed on 04 December 2024

Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry: Assessment of Abuse Potential of Drugs. January 2017.

Forbes B, O'Lone R, Allen PP, Cahn A, Clarke C, Collinge M, et al. Challenges for inhaled drug discovery and development: Induced alveolar macrophage responses. Adv Drug Deliv Rev. 2014 May;71:15-33. doi: 10.1016/j.addr.2014.02.001. Epub 2014 Feb 13.

Guarino C, Hamon Y, Croix C, Lamort AS, Dallet-Choisy S, Marchand-Adam S, et al. Prolonged pharmacological inhibition of cathepsin C results in elimination of neutrophil serine proteases. Biochem Pharmacol. 2017 May 1;131:52-67. doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.009. Epub 2017 Feb 11.

Halliwell WH. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. Toxicol Pathol. l997 Jan-Feb;25(1):5360. doi: 10.1177/019262339702500111.

Hruban Z. Pulmonary and generalized lysosomal storage induced by amphiphilic drugs. Environ Health Perspect. 1984 Apr;55:53-76. doi: 10.1289/ehp.845553.

Hu Y, Pham CT. Dipeptidyl Peptidase I Regulates the Development of Collagen-Induced Arthritis. Arthritis & Rheumatism. 2005 Aug;52(8): 2553-8. doi: 10.1002/art.21192.

ICH M7(R1). US FDA. Guidance for Industry. M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk. Mar 2018.

ICH M7(R2). US FDA. Guidance for Industry. Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. July 2023.

ICH S2(R1). US FDA. Guidance for Industry. Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. June 2012.

ICH S8. US FDA. Guidance for Industry. Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals. April 2006.

Kimmel, CA, Garry, MR and DeSesso, JM. Relationship between Bent Long Bones, Bent Scapulae, and Wavy Ribs: Malformations or Variations? Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2014 Oct;101(5):379-92. doi: 10.1002/bdrb.21122. Epub 2014 Sep 23.

Lewis DJ, Williams TC, Beck SL. Foamy macrophage responses in the rat lung following exposure to inhaled pharmaceuticals: a simple, pragmatic approach for inhaled drug development. J Appl Toxicol. 2014 Apr;34(4):319-31. doi: 10.1002/jat.2950. Epub 2013 Nov 6.

OECD guideline for the testing of chemicals. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, No. 432 section 4 Health Effects (Pink pages); adopted April 13, 2004. Organisation for Economic Cooperation and Development.

Pham CT, Ley TJ. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Jul 20;96(15):8627-32. doi: 10.1073/pnas.96.15.8627.

Reasor MJ, Hastings KL, Ulrich RG. Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. Expert Opin Drug Saf. 2006 Jul;5(4):567-83. doi: 10.1517/14740338.5.4.567.

Reasor MJ, Kacew S. Drug-induced phospholipidosis: Are there functional consequences? Exp Biol Med (Maywood). 2001 Oct;226(9):825-30. doi: 10.1177/153537020122600903.

Reasor MJ, Walker ER. Recovery from chlorphentermine-induced phospholipidosis in rat alveolar macrophages: Morphological features. Exp Mol Pathol. 1981 Dec;35(3):370-9. doi: 10.1016/0014-4800(81)90020-4.

Reasor MJ. Drug-induced lipidosis and the alveolar macrophage. Toxicology. 1981;20(1):1-33. doi: 10.1016/0300-483x(81)90102-5.

Sørensen OE, Clemmensen SN, Dahl SL, Østergaard O, Heegaard NH, Glenthøj A, et al. Papillon-Lefèvre syndrome patient reveals species-dependent requirements for neutrophil defenses. J Clin Invest. 2014 Oct;124(10):4539-48. doi: 10.1172/JCI76009. Epub 2014 Sep 17.

Toomes C, James J, Wood AJ, Wu CL, McCormick D, Lench N, et al. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. Nat Genet. 1999 Dec;23(4):421-4. doi: 10.1038/70525.

ブレンソカチブ水和物（INS1007）

第 2 部（モジュール 2）
2.6.7 毒性試験概要表

インスメッド合同会社

Information and data contained herein are proprietary and confidential. This information should not be disclosed to any third party without the written consent of Insmed.

目次

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 4
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 11
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 13
2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 16
2.6.7.5 単回投与毒性試験 18
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 19
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 22
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 50
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 56
2.6.7.10 がん原性試験 58
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 87
2.6.7.12 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（重要な試験） 89
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（重要な試験） 90
2.6.7.14 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（重要な試験） 97
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 103
2.6.7.16 局所刺激性試験 104
2.6.7.17 その他の毒性試験 105

表目次

表 1: 毒性試験概要 4
表 2: トキシコキネティクス試験の概要 11
表 3: ピボタル試験におけるトキシコキネティクス試験の概要 13
表 4A: GLP 試験で使用された被験物質（バッチ毎） 16
表 5: 単回投与毒性試験の概要 18
表 6: 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 19
表 7A: ラット 1 ヵ月反復投与毒性試験 22
表 7B: ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験 27
表 7C: イヌ 1 ヵ月反復投与毒性試験 32
表 7D: イヌ 6 ヵ月反復投与毒性試験 39
表 7E: イヌ 9 ヵ月反復投与毒性試験 48
表 8A: 遺伝毒性： サルモネラチフス菌及び大腸菌を用いた AMES 復帰突然変異試験（*IN VITRO*） 50
表 8B: 遺伝毒性：マウスリンパ腫（L5178Y TK+/-）前方突然変異アッセイ（*IN VITRO*） 53
表 9: *IN VIVO* 遺伝毒性試験：ラット小核試験 56
表 10A: がん原性試験：28 日間用量設定試験 58
表 10B: がん原性試験：26 週間遺伝子導入 RASH2 マウスを用いた 6 箇月間試験 59
表 10C: がん原性試験：WISTAR HAN ラットにおける 2 年間のがん原性試験 64
表 11: 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 87
表 12: 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（重要な試験） 89
表 13A: 胚・胎児発生に関する試験 90
表 13B: ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験 94
表 14: 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（重要な試験） 97
表 15: 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 103
表 16: 局所刺激性試験 104
表 17A: 不純物（不純物F*）：*IN SILICO* CARCINOGENIC POTENCY CATEGORIZATION APPROACH（非 GLP） 105
表 17B: 遺伝毒性：*SALMONELLA TYPHIMURIUM* 及び *ESCHERICHIA COLI* を用いた *IN VITRO* AMES 試験 106
表 17C: 遺伝毒性：*IN VITRO* L5178Y TK+/- マウスリンパ腫アッセイ 112
表 17D: 不純物（不純物F*）：*IN VITRO* 代謝アッセイ（非 GLP） 115
表 17E: その他の毒性試験 117

図目次

図 1: 非臨床動物種及びヒトにおける主要な定常状態 AUC_{24HR} の概要（雌雄平均又は雌のみ） 15

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

表 1: 毒性試験概要

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)** [a]	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
Single-Dose Toxicity	No single-dose toxicity studies were conducted with brensocatib						
Repeat-Dose Toxicity	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	MTD: up to 5 days; RD phase: up to 28 days	MTD: 20 (1), 200 (1), 1000 (1); 1000 (3), 400 (5); RD phase: 0, 5, 50, 200	No	[redacted], UK	525710
	Dog / Beagle	Oral (gavage)	MTD: up to 3 days DRF: 14 days	MTD: 100 (1), 300 (1), 600 (1), 1000 (1); 600 (3); DRF: 0, 10, 75, 300	No	[redacted], UK	525726
	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	28 days	0, 3, 15, 100	Yes	[redacted], UK	527409
	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	6 months	0, 3, 9, 50 (male fertility)	Yes	[redacted], UK	528313

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)** [a]	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	28 days	0, 3, 15, 75	Yes	[redacted], UK	527414
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	6 months	0, 2, 8, 50	Yes	[redacted] UK	528329
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	9 months	0, 1, 2, 4, 8	Yes	[redacted] UK	505523
Genotoxicity	*Salmonella typhimurium* TA98, 100, 1535, 1537; and *Escherichia coli* (WP2uvrA[pKM101])	Incubation	Plate incorporation and incubation for 3 days	5 to 5000 µg/plate (+/- S9)	Yes	[redacted] UK	8304016
	L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2C	Microwell fluctuation	Microwell fluctuation assay, 3 hours in the presence and absence of S9 and 24 hours in the	20-100 µg/mL (+/- S9) for 3h; 2.5-30 µg/mL (-S9) for 24h	Yes	[redacted] UK	8304015

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day) [a]**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
			absence of S9				
	Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	Two daily doses	0, 40, 200, 400	Yes	[redacted] UK	8304017
Carcinogenicity	Mouse/Wild type rasH2	Oral (gavage)	28 days	0, 50, 100, 200	Yes	[redacted], Canada	8003479
	Mouse/Hemizygous rasH2	Oral (gavage)	6 months	0 (vehicle), 0 (water), 5, 15, 50	Yes	[redacted], USA	20354490
	Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	2 years	0, 3, 10, 30	Yes	[redacted], Canada	8002910

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)** [a]	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	Days 6 to 16 of gestation	0, 3[b], 9, 50, 100	Yes	[redacted] UK	497631
	Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	Two weeks prior to pairing and up until Day 16 of gestation	0, 3 (NOAEL F_0 females and F_1 litters), 20, 100 (female fertility)	Yes	[redacted] UK	497825
	Rabbit/New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage)	13 days	0, 15, 100, 150, 200	No	[redacted] UK	497610
	Rabbit/New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage)	Days 7 to 19 of gestation	0, 15, 50, 100, 150	Yes	[redacted] UK	497626
	Rabbit/New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage)	Days 7 to 19 of gestation	0, 5 (NOAEL F_0 females), 15, 50 (NOAEL F_1 litters)	Yes	[redacted]	497830

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day) [a]**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
						[redacted] UK	
	Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	Gestation Day 6 through Lactation Day 20	0, 3, 9, 20 (NOAEL F_0 females, F_1 litters, and F_2 litters)	Yes	[redacted], USA	00335001
Local Tolerance	No standalone studies. Local tolerance (histopathological evaluations of the gastrointestinal tract) was assessed in the repeat-dose general toxicity studies in rats and dogs.						
Other Toxicity (Impurity: Impurity F*)	In silico Carcinogenic Potency Categorization Approach	N/A	N/A	N/A	No	[redacted], Spain	EQR-6850-142.01
	Quantum mechanical assessment	N/A	N/A	N/A	No	[redacted], Israel	VV-NC-001334
	Enhanced Ames Test: Salmonella typhimurium TA98, 100, 1535, 1537; and Escherichia coli (WP2uvrA[pKM101])	Pre-incubation	Pre-incubation for 30 min and incubation for at least 48 hours	0.316 to 5000 µg/plate, +/- rat and hamster S9 (30%)	Yes	[redacted]	STURS24AA0598-1

※新薬承認情報提供時に置き換え

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day) [a]**	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
						[redacted], Germany	
	In vitro mammalian cell gene mutation assay: L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2C	Microwell fluctuation	Microwell fluctuation assay, 4 hours in the presence and absence of S9 and 24 hours in the absence of S9	0.39 to 3.13 µg/mL for 4-hour - S9; 0.78 to 6.25 µg/mL for 4-hour + S9; and 3.13 to 25 µg/mL for 24-hour - S9	Yes	[redacted], Germany	STUGC24AA2299-2
	In vitro metabolic stability and metabolite profiling in human liver microsomes and rat liver S9 (phenobarbital and β-naphthoflavone induced)	*In vitro*	Up to 60 minutes	5 µM	No	[redacted], USA	8547044
Other Toxicity (Other)	Balb/c 3T3 mouse fibroblasts	*In vitro* Evaluation of phototoxicity using the Neutral Red Uptake Assay	Not applicable	1.78–100 µg/mL	Yes	[redacted], USA	20059176
	Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	28 days	0, 100 (lung and kidney)[c]	No	[redacted]	EM-14.352

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Type of Study	**Species and Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)** [a]	**GLP Compliance**	**Testing Facility**	**Study/Report Number**
						[redacted], USA	
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	28 days	0, 75 (lung)[d]	No	[redacted], USA	EM-14.353

[a] For the pivotal toxicity studies, the highest no observed adverse effect level (NOAEL) is underlined.
[b] Dosed with 3 mg/kg/day on Days 6 to 11 and with 4.5 mg/kg/day on Days 12 to 16.
[c] Tissue samples were from the original 28-day repeat dose general toxicity study in rats: Study No. 527409.
[d] Tissue samples were from the original 28-day repeat dose study general toxicity in dogs: Study No. 527414.
DRF = dose range finding; F0 = parental generation; F1 = the offspring of the F0 parental generation; F2 = the offspring of the F1 generation; GLP = good laboratory practice; MTD = maximum tolerated dose; NOAEL = no observed adverse effect level; RD = repeat dose.

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2: トキシコキネティクス試験の概要

Test Article: Brensocatib (INS1007)						
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**GLP Compliance**	**Study/Report Number**
Repeat-dose Toxicity	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	MTD: up to 5 days; RD phase: up to 28 days	MTD: 20 (1), 200 (1), 1000 (1); 1000 (3), 400 (5); RD: 0, 5, 50, 200	No	525710
	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	28 days	0, 3, 15, 100	Yes	527409
	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	6 months	0, 3, 9, 50	Yes	528313
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	MTD: up to 3 days DRF: 14 days	MTD: 100 (1), 300 (1), 600 (1), 1000 (1); 600 (3); DRF: 0, 10, 75, 300	No	525726
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	28 days	0, 3, 15, 75	Yes	527414
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	6 months	0, 2, 8, 50	Yes	528329
	Dog/Beagle	Oral (gavage)	9 months	0, 1, 2, 4, 8	Yes	505523
Carcinogenicity	Mouse / Wild type rasH2	Oral (gavage)	28 days	0, 50, 100, 200	Yes	8003479
	Mouse / Hemizygous CByB6F1-Tg-(HRAS)2Jic (transgenic)	Oral (gavage)	26 weeks	0, 0, 5, 15, 50	Yes	20354490
	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	104 weeks	0, 3, 10, 30	Yes	8002910

Test Article: Brensocatib (INS1007)						
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**GLP Compliance**	**Study/Report Number**
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	Days 6 to 16 of gestation	0, 3[b], 9, 50, 100	Yes	497631
	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	Two weeks prior to pairing and up until Day 16 of gestation	0, 3, 20, 100	Yes	497825
	Rabbit / New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage)	13 days	0, 15, 100, 150, 200	No	497610
	Rabbit / New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage)	Days 7 to 19 of gestation	0, 15, 50, 100, 150	Yes	497626
	Rabbit / New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage)	Days 7-19 of gestation	0, 5,15, 50	Yes	497830
	Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	Gestation Day 6 through Lactation Day 20	0, 3, 9, 20	Yes	00335001

DRF = dose range finding; GLP = good laboratory practice, MTD = maximum tolerated dose; RD = repeat dose

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

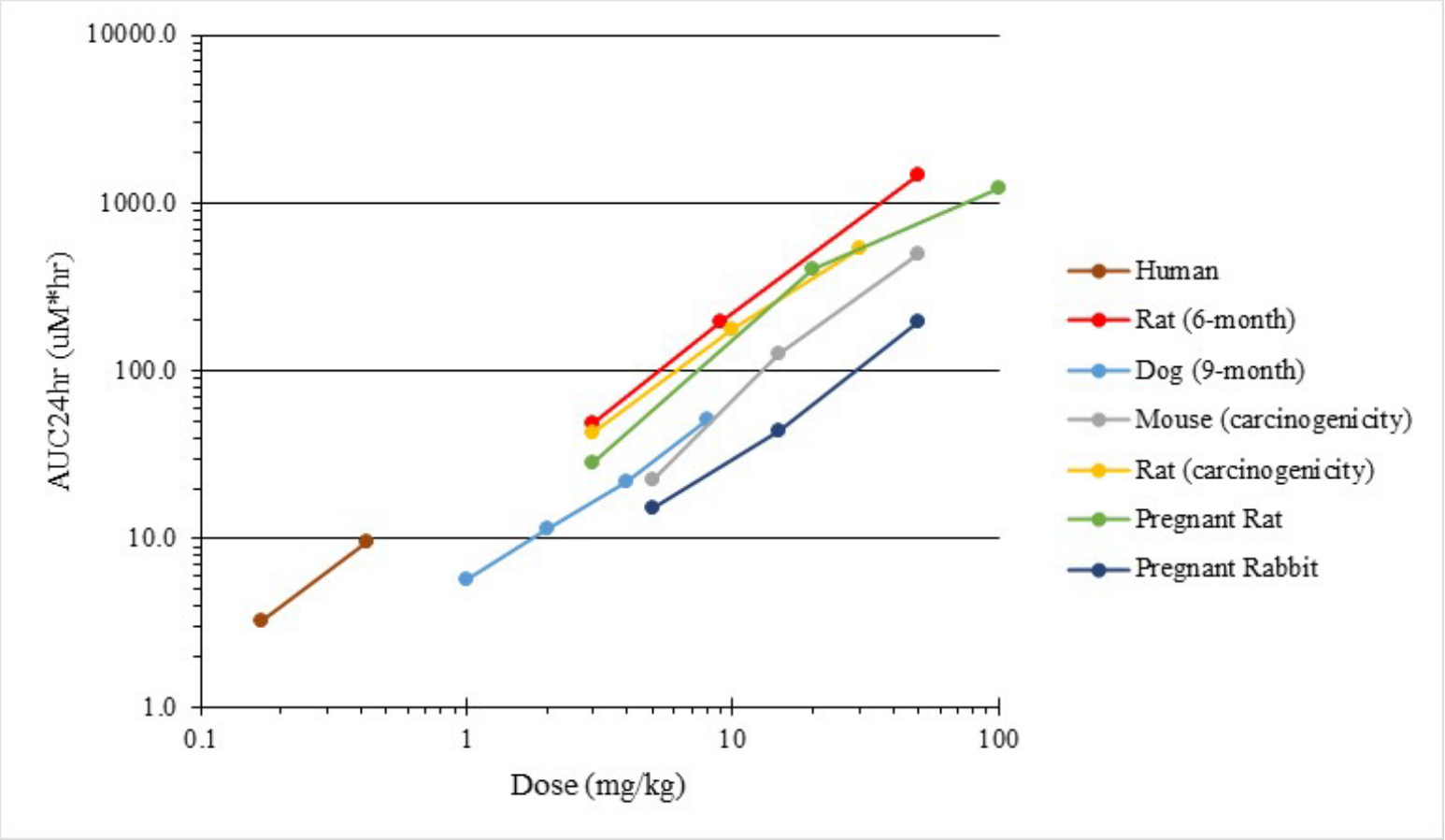
表 3: ピボタル試験におけるトキシコキネティクス試験の概要

Test Article: Brensocatib (INS1007)									
Daily Dose (mg/kg)	Sampling Day	Steady State AUC_{0-24h} (µM*h)							Study/Report No.: Type
		Mouse: M	Mouse: F	Rat: M	Rat: F	Dog: M+F	Rabbit: F	Human	
0.17	NA							3.234	ICPD 00694-1: POPPK
0.42	NA							9.655	ICPD 00694-1: POPPK
1	273					5.7			505523: 9-month dog
2	181					12.7			528329: 6-month dog
2	273					11.5			505523: 9-month dog
3	28			30.3	42.7				527409: 28-day rat
3	182			45.2	51.3				528313: 6-month rat
3	28					18.9			527414: 28-day dog
3	182			36.3	49.2				8002910: 2-year carc rat
3	GD16				28.7				497825: fertility + EFD rat
3	GD6				12.9[a]				00335001: PPND rat
4	273					22.2			505523: 9-month dog
5	182	NA[b]	34.9						20354490: 6-month carc mouse
5	GD19						15.1		497830: EFD rabbit
8	181					67.5			528329: 6-month dog
8	273					51.4			505523: 9-month dog
9	182			177	215				528313: 6-month rat
9	GD6				101[a]				00335001: PPND rat

Test Article: Brensocatib (INS1007)									
Daily Dose (mg/kg)	Sampling Day	Steady State AUC_{0-24h} (µM*h)							Study/Report No.: Type
		Mouse: M	Mouse: F	Rat: M	Rat: F	Dog: M+F	Rabbit: F	Human	
10	182			120	236				8002910: 2-year carc rat
15	28			240	300				527409: 28-day rat
15	28					138			527414: 28-day dog
15	182	79.8	173						20354490: 6-month carc mouse
15	GD19						44.4[c]		497830: EFD rabbit
20	GD16				403				497825: female fertility + EFD rat
20	GD6				163[a]				00335001: PPND rat
30	182			428	649				8002910: 2-year carc rat
50	182			1460	1440				528313: 6-month rat
50	182	298	708						20354490: 6-month carc mouse
50	GD19						195[c]		497830: EFD rabbit
50	28	516	1050						8003479: 28-day mouse
75	28					475			527414: 28-day dog
100	28			1640	2230				527409: 28-day rat
100	GD16				1240[d]				497825: female fertility+EFD rat
100	28	1270	1670						8003479: 28-day mouse
200	28	1820	2490						8003479: 28-day mouse

[a] AUC was on the first day of dosing, as opposed to being at steady state, in the PPND study in rats.
[b] AUC_{0-24h} is not reported due to %AUC extrapolated >25%.
[c] Steady state AUC from a preceding dose range finding Study No. 497626.
[d] Steady state AUC from a preceding dose range finding Study No. 497631.
AUC = area under the concentration-time curve; AUC0-24h = area under the concentration-time curve over the last 24-hour dosing interval; carc = carcinogenicity; EFD = embryofetal development; F = female; GD = gestation day; M = male; N/A = not applicable; POPPK = population PK; PK = pharmacokinetic; PPND = pre- and postnatal development.

図 1:　　非臨床動物種及びヒトにおける主要な定常状態 AUC_{24hr} の概要（雌雄平均又は雌のみ）



AUC_{24hr} = area under the concentration-time curve over the last 24-hour dosing interval.

2.6.7.4 毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 4A: GLP 試験で使用された被験物質（バッチ毎）

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Brensocatib Batch Number	**Purity (%)**	**Specified Impurity**					**Study/Report No.**	**Type of Study**
		[redacted] **(Impurity A*)[a]**	[redacted] **(Impurity B*)[a]**	**Impurity C***	**Impurity D***	**Impurity E***		
Proposed Specification	[redacted]	≤[redacted] %	≤[redacted] %	≤[redacted] %	≤[redacted] %	≤[redacted] %		
C600/1	[redacted]	-	-	-	-	-	527409 527414 8304016 8304015 8304017 20059176	1-month rat 1-month dog Ames study Mouse lymphoma Rat micronucleus 3T3 Phototoxicity
C600/1	[redacted]	-	-	-	-	-	528329	6-month dog
C600/2	[redacted]	-	-	-	-	-	528329	6-month dog
C628/1	[redacted]	-	-	-	-	-	528329 497631 497825 497626 497830	6-month dog Embryofetal (rat) Fertility/embryofetal (rat) Embryofetal (rabbit) Embryofetal (rabbit)
MC446L	[redacted]	-	-	-	-	-	528313	6-month rat
C610/4P1H	[redacted]	[redacted][b]	-	-	-	-	505523	9-month dog
C610/4P1	[redacted]	-	-	-	-	-	00335001	Pre- and postnatal rat
6850-P54/19-402	[redacted]	[redacted]	[redacted]	-	-	-	8002910 8003479	2-year study in rat 28-day study in mouse

※新薬承認情報提供時に置き換え

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Brensocatib Batch Number	**Purity (%)**	**Specified Impurity**					**Study/Report No.**	**Type of Study**
		[redacted] (Impurity A*)[a]	**[redacted] (Impurity B*)[a]**	**Impurity C***	**Impurity D***	**Impurity E***		
Proposed Specification	**[redacted]**	**≤[redacted]%**	**≤[redacted]%**	**≤[redacted]%**	**≤[redacted]%**	**≤[redacted]%**		
6850-P54/20-401	[redacted]	[redacted]	[redacted]	-	-	-	20354490	26-week study in mouse

[a] Impurity A* is also known as [redacted] and impurity B* is also known as [redacted] in the Report No. [redacted]6850-09.05 by [redacted]

[b] Impurity [redacted] was spiked into the formulation at [redacted]mg/kg/day in all brensocatib dose groups at 1, 2, 4, 8 mg/kg/day, leading to a [redacted]% to [redacted]% of the impurity in the brensoc oups in the 9-month dog study. The impurity-spiked formulations were administered to dogs in the last 4 weeks of the s y. There were no adverse effects noted in the study.

- = not detected. GLP = good laboratory practice.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 5: 単回投与毒性試験の概要

Test Article: Brensocatib (INS1007)
No studies were conducted; single-dose data were derived from repeat-dose toxicity studies (discussed in Module 2.6.6).

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

表 6: 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle / Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and No. per Group**	**NOAEL[a] (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage) (purified water)	MTD: up to 5 days per dose RD phase: up to 28 days	MTD[b]: 20 (1), 200 (1), 1000 (1), 1000 (3), 400 (5); RD phase: 0, 5, 50, 200	MTD: 3M + 3F RD phase: 5M + 5F	Not determined	MTD phase: Single administration of brensocatib at 20 and 1000 mg/kg was associated with slight body weight loss. Repeat administration at 400 mg/kg/day for 5 days was associated with clinical observations and slight body weight loss (females only). Repeat administration at 1000 mg/kg/day was associated with the premature death of 2 animals at Day 3. The remaining animals were killed for welfare reasons due to adverse clinical observations. Myofiber degeneration of the skeletal muscle noted at histopathological examination was considered to be compound-related. RD phase: Administration at 200 mg/kg/day resulted in the early termination of all animals on Day 9 following adverse clinical observations, body weight loss and reduced food and water consumption, along with an increase in urinary NAG and a decrease in urinary potassium. Gross findings at 200 mg/kg/day included the general appearance of the whole body (thin), and microscopic findings considered treatment-related were noted in the skeletal muscle (myofiber degeneration). Administration at 50 mg/kg/day was associated with intermittent clinical observations, increased neutrophils, and increases in urinary sodium and NAG. Slight decreases in oxidative burst function were also observed at this dose level. A dose related increase in the incidence of decreased traction response was noted at 5 and 50 mg/kg/day in males only, increasing in incidence throughout the study at both dose levels. The MTD following single administration of brensocatib was considered to be 1000 mg/kg.	525710

Species/Strain	Method of Administration (Vehicle / Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Dog / Beagle	Oral (gavage) (purified water)	MTD: up to 3 days per dose DRF phase: 14 days	MTD[b]: 100 (1), 300 (1), 600 (1), 1000 (1), 600 (3) DRF: 0, 10, 75, 300	1M + 1F	Not determined	MTD phase: clinical observations of salivation, foamy/liquid/mucoid vomit (white/brown/yellow in color), and undigested food and liquid feces in pen, were observed at all doses, generally observed with a higher incidence, severity and persisted for longer with increasing dose level, and were coupled with body weight losses and reduced food consumption at 1000 mg/kg. The lymphocyte count in the male dog was decreased following 3 daily doses at 600 mg/kg/day. ALT and AST were elevated. Histopathology findings with similar severities to those listed below were observed. DRF phase: similar clinical observations were noted at ≥75 mg/kg/day, with a higher incidence and severity at 300 mg/kg/day. ALT, AST, and GLDH were elevated, whilst liver weights (relative to body weight) were greater than controls in all brensocatib-dosed females and in the male dosed at 300 mg/kg/day. There were a number of other clinical chemistry changes (increased LDH, cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, and total bile acids). There was an indication that the oxidative burst capacity of neutrophils was reduced in brensocatib-dosed dogs. Urinary glucose was higher during Week 2 in the male receiving 300 mg/kg/day. Histopathology findings included mild to moderate increases in the cellularity of the fat tissue in the bone marrow (sternum), and minimal to mild vacuolated macrophages in the gut-associated lymphoid tissue (GALT), lymph nodes (axillary, mandibular, and mesenteric) and spleen (lymphoid compartment only) with generally a higher severity with increasing dose level. The MTD following single administration of brensocatib was considered to be 1000 mg/kg.	525726

[a] No- observed adverse effect level.
[b] Number of daily doses shown in parentheses.

Note: All non-pivotal repeat dose studies were non-GLP.
ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; DRF = dose range finding; F = female; GALT = gut-associated lymphoid tissue; GLDH = glutamate dehydrogenase; GLP = good laboratory practice; LDH = lactate dehydrogenase; M = male; MTD = maximum tolerated dose; NAG = N-acetyl-beta-d-glucosaminidase; RD = repeat dose.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

表 7A: ラット 1 ヵ月反復投与毒性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Species/Strain: Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	**Duration of Dosing:** 28 days	**Study Number:** 527409
Initial Age at Dosing: 10-11 weeks	**Duration of Postdose:** 28 days	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special Features: Neutrophil function (phagocytic and oxidative burst activity). In addition, electron microscopy was conducted, and the data were reported separately in Study No. EM-14.352.		**Vehicle:** Purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide Formulation: Suspension
No-Observed-Adverse-Effect Level (NOAEL) 15 mg/kg/day.		
Conclusion: Oral (gavage) administration of brensocatib in rats for 28 days at a dose level of 100 mg/kg/day was well tolerated but was associated with microscopic findings in the kidney (minimal tubular vacuolation in both sexes and tubular basophilia in males), mesenteric lymph nodes (increased macrophage cellularity), soleus muscle (increased myofibre degeneration/regeneration) and the lung (diffuse alveolar macrophage accumulation) and higher kidney and lung weights. After 28 days off dose, both sexes recovered from all of these findings, except for females with tubular vacuolation in the kidney, for which there was partial recovery. At 15 mg/kg/day there was an increased incidence of minimal kidney findings (tubular vacuolation) in females without any apparent effect on function. The NOAEL was considered to be 15 mg/kg/day.		

表 7A:　　ラット 1 ヵ月反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg/day)	**0**		**3**		**15**		**100**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals: **Main:** **Recovery:**	**10** **5**	**10** **5**	**10** **0**	**10** **0**	**10** **0**	**10** **0**	**10** **5**	**10** **5**
Toxicokinetics[a]: $AUC_{(0-24)}$ (µM*h) C_{max} (µM)			 30.3 2.63	 42.7 5.28	 240 25.8	 300 28.8	 1640 98.8	 2230 178
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)[b,c]	(g)							
	362	217	+3.31	+1.84	+6.35	+2.30	+0.829	+3.69
Body Weight Gain (%)[c]	(g)							
Days 1 to 29	50	20	+22	+10	+28*	+15	0	+35**
Food Consumption (%)[c]	(g/animal/day)							
Days 1 to 8 Days 22 to 29	22.9 23.4	17.7 17.3	+4.80 +3.85	-5.08 -1.73	+5.68 +3.42	-5.08 -1.73	-6.11 +2.56	-13.0** -1.73
Water Consumption (%)[b,c]	(mL/animal/day)							
	29.7	32.4	+0.673	-14.8	+2.69	-18.8	+23.9*	-5.56
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	++[d]	++[d]
Hematology Neutrophils (10^9/L) Reticulocytes (10^9/L)	 1.04 237	 1.18 202	 1.70* 251	 1.19 182	 1.50 245	 1.33 214	 1.83** 301**	 1.89* 299*

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg/day)	**0**		**3**		**15**		**100**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals:								
Main:	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Recovery:	**5**	**5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**5**	**5**
Serum Chemistry								
ALP (U/L)	112	72	118	67	131	80	146*	77
Bile acids (µmol/L)	14.2	12.7	12.8	14.8	15.3	18.7	40.6**	35.1**
Chloride (mmol/L)	105	104	103	103	103	102	102**	102*
Cholesterol (mmol/L)	1.6	1.6	1.6	1.5	1.8	1.7	2.1**	2.2**
Phosphate (mmol/L)	1.42	1.39	1.42	1.58	1.40	1.65	2.04**	1.78
Sodium (mmol/L)	146	144	144	144	145	143	146	142*
Urinalysis								
Cloudy urine (Incidence)	0	0	0	1/10	1/10	1/10	5/10	5/10
Glucose (mmol/L)	0.33	0.38	0.39	0.43	0.36	0.37	0.63*	0.48
Glucose/creatinine ratio (%)	0.08	0.11	0.08	0.09	0.08	0.12	0.13***	0.13
NAG (U/L)	11.0	5.2	10.3	11.1	15.1	5.3	37.0***	20.9*
NAG/creatinine ratio (%)	2.6	1.6	2.9	1.7	3.2	1.5	7.8***	4.6**
Protein (mg/L)	372	67	326	136	321	76	576	114
Protein/creatinine ratio (%)	79.1	21.2	66.0	21.5	64.3	19.7	116.2	23.4
Neutrophil Function								
Oxidative burst (stimulation index, PMA, median fluorescence intensity)	19.9	19.8	15.4	16.0	8.91	13.2	5.64	7.66
Organ Weights (%)[c,e]	(g)							
Kidney (absolute value)	2.277	1.371	-1.01	+1.53	+3.95	+1.90	+17.7**	+16.6***
Kidney (% of body weight)	0.6285	0.6463	-3.36	-0.63	+0.22	-1.95	+19.3***	+11.7**
Liver (absolute value)	12.214	7.051	+4.84	+1.30	+9.62	+5.56	+7.01	+18.9***
Liver (% of body weight)	3.3669	3.3196	+2.47	-0.85	+5.76	+1.66	+8.42	+14.0***
Lung (absolute value)	1.620	1.038	-3.95	-4.72	+1.60	-3.28	+17.3	+34.9***
Lung (% of body weight)	0.4484	0.4890	-6.38	-6.71	-2.14	-6.85	+18.5*	+30.2***

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg/day)	**0**		**3**		**15**		**100**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals:								
Main:	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**	**10**
Recovery:	**5**	**5**	**0**	**0**	**0**	**0**	**5**	**5**
Histopathology								
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Kidney								
Tubular basophilia, outer medulla								
Mild	0	0	0	0	0	0	3	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Tubular vacuolation								
Minimal	0	1	0	1	0	3	2	10
Lung								
Alveolar macrophage accumulation, diffuse								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	5
Mild	0	0	0	0	0	0	3	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	6	1
Mesenteric Lymph Node								
Increased cellularity, macrophage								
Minimal	0	0	0	1	0	0	3	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Soleus Muscle								
Myofiber degeneration/regeneration								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	0
Mild	1	0	0	0	0	0	1	0
Postdose Evaluation:								
Number Evaluated	5	5	0	0	0	0	5	5

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg/day)	**0**		**3**		**15**		**100**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals: **Main:** **Recovery:**	 **10** **5**	 **10** **5**	 **10** **0**	 **10** **0**	 **10** **0**	 **10** **0**	 **10** **5**	 **10** **5**
Noteworthy Findings								
Body Weight (%)[c,f]	(g)							
	390	233					+4.10	0
Body Weight Gain (%)[c]	(g)							
Days 29–57	37	14					+16	-50*
Hematology Neutrophils (10^9/L)	 0.72	 0.91					 0.89	 0.66*
Serum Chemistry Bile acids (µmol/L)	 17.1	 6.2					 21.6	 16.0*
Histopathology Kidney: Tubular vacuolation, Minimal	 0	 1					 0	 4

[a] Day 28 mean data shown. No brensocatib was detected in control animals.
[b] At end of dosing period.
[c] For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[d] Salivation and "ploughing" through cage bedding noted on several occasions immediately post dose. Yellow staining of cage bedding observed in both males and females from Days 9 or 10 until end of dosing period.
[e] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute and relative organ weight effects.
[f] At end of recovery period.
Note: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Body weight, food and water consumption and organ weight data analyzed using Dunnett's Test. Clinical chemistry data analyzed using Dunn's Test for the main study period and using Wilcoxon's Test for the recovery period.
- = no noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}24}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to 24-hour post dose; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration, F = female; M = male.

表 7B:　　ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Species/Strain: Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	**Duration of Dosing:** 6 months	**Study Number:** 528313
Initial Age at Dosing: 6-7 weeks	**Duration of Postdose:** 3 months	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special Features: Neutrophil function (phagocytic and oxidative burst activity), and transition electron microscopy		**Vehicle / Formulation:** purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide
No-Observed-Adverse-Effect Level: 9 mg/kg/day		
Conclusion: Oral (gavage) administration of brensocatib to rats for 26 weeks at dose levels of 3, 9, or 50 mg/kg/day was well tolerated with microscopic changes at 50 mg/kg/day in the kidney (basophilic tubules in the outer medulla in males) and the lung (increased incidence of perivascular neutrophil infiltration in females, and vacuolated macrophage accumulation in males and females, confirmed by electron microscopy as increased lysosomal activity/material accumulation) and lower seminal vesicle weights at 3 mg/kg/day and above. After 3 months off dose, there was complete reversibility of all of these findings. Due to the presence of findings in the kidney and lung at 50 mg/kg/day, the NOAEL was considered to be 9 mg/kg/day.		

表 7B:　　ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**9**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**
Toxicokinetics [a]								
$AUC_{(0\text{-}t)}$ (μM*h)			45.2	51.3	177	215	1460	1440
Cmax (μM)			4.76	4.56	14.9	20.7	97.0	100
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	1	0	1	0	0	0	0	0
Clinical Observations								
Ploughing (through cage bedding)							+	+
Salivation							+	+
Yellow staining of cage bedding							+	+
Serum Chemistry [b]								
Aspartate aminotransferase (U/L)	70	70	255***	83	365***	79	157***	70
Alanine aminotransferase (U/L)	47	60	235***	59	262***	56	140***	52*
Bile acids (μmol/L)	14.5	-	33.7*	-	41.2***	-	36.3***	-
Cholesterol (mmol/L)	1.7	1.5	1.9	1.4	1.8	1.5	1.9*	1.9***
Phosphate (mmol/L)	1.09	-	1.17	-	1.16	-	1.59***	-
Triglycerides (mmol/L)	1.99	1.73	1.75	1.37	1.82	1.60	1.49**	1.36*
Urea (mmol/L)	5.2	5.7	5.2	5.6	5.4	5.7	4.3***	4.8***

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**9**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**
Urinalysis chemistry [b]								
NAG (U/L)	8.9	4.2	9.9	6.4	10.3	4.4	16.1***	11.5**
NAG/Creatinine	1.8	1.9	2.1	1.7	2.4	1.8	4.1***	3.7**
Organ Weights (%) [c,d]	(g)							
Prostate gland	1.009		8.4		-3.4		-13.1	
Seminal vesicle gland	1.360		-14.5*		-13.2*		-24.7***	
Histopathology Number examined [e]	15	15	14	15	15	15	15	15
Kidney Tubular basophilia, outer medulla Minimal Mild	 0 0	 0 0	 0 0	 - -	 0 0	 - -	 10 2	 0 0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**9**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**
Lung								
Cellular debris; alveolar								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2
Infiltration, neutrophilic; perivascular								
Minimal	4	1	3	1	5	2	1	6
Mild	0	2	0	1	0	1	0	1
Vacuolated macrophage accumulation; alveolar								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	4
Mild	0	0	0	0	0	0	6	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	2
Electron Microscopy [f]								
Fertility Assessment [g]								
Postdose Evaluation (No. Evaluated)	10	10					10	10
Noteworthy findings								
Clinical Observations								
Yellow staining of cage bedding							+	+
Serum Chemistry								
Aspartate aminotransferase (U/L)	78	109					118	82
Alanine aminotransferase (U/L)	51	70					108**	61
Triglycerides (mmol/L)	1.82	1.42					1.63	0.87*

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**9**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 15**	**M: 15** **M: 10**	**F: 15** **F: 10**
Urea (mmol/L)	5.4	5.9					5.1	4.8**

[a] Day182 mean data shown.
[b] At end of dosing period.
[c] For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[d] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.
[e] Low and mid dose groups were evaluated for target tissues only: kidney (males only), prostate gland (males), and lungs (males and females).
[f] TEM evaluation of photomicrographs of lung from male and female rats given brensocatib at 50 mg/kg/day revealed increased accumulation of membrane remnant material in lysosomes (secondary) of alveolar macrophages; increased numbers of secondary lysosomes (without accumulation of membrane remnant material) in alveolar macrophages in males only which suggested increased lysosomal activity; and increased size of alveolar macrophages in females only, which was considered related to the increased lysosomal material accumulation. Complete recovery is suggested by lack of brensocatib-related findings in the recovery males, although recovery females were not evaluated ultrastructurally.
[g] Administration of brensocatib to males had no effects on mating performance and fertility as indicated by the number of nights to a positive mating sign and by the number of animals pregnant. The number of pre- and post-implantation losses was similar across all groups.
Note: - = No noteworthy findings; + = Severity not recorded.
Note: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.
$AUC_{0\text{-}t}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration at timepoint t; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration; F = female; M = male; NAG = N acetyl-beta-d-glucosaminidase; TEM = transmission electron microscopy.

表 7C:　　イヌ 1 ヵ月反復投与毒性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Species / Strain: Dog / Beagle	**Duration of Dosing:** 28 days	**Study Number:** 527414
Initial Age at Dosing: 8-9 months	**Duration of Postdose:** 32/30 days (Male/Female)	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special Features: Neutrophil function (phagocytic and oxidative burst activity). In addition, electron microscopy was conducted and reported separately in Study No. EM-14.353.		**Vehicle:** Purified water with tartaric acid to adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide Formulation: Suspension
No-Observed-Adverse-Effect Level: 15 mg/kg/day		
Conclusion: Once-daily oral (gavage) administration of brensocatib in dogs for 28 days at a dose level of 75 mg/kg/day was well tolerated, but associated with pathological findings in the kidney (basophilic tubules and tubular degeneration), liver (prominent lobular architecture, pale discoloration and vacuolated hepatocytes), bone marrow (increased adipose tissue), thymus (involution/atrophy and low weights), testes and epididymides (swollen spermatocytes and an increase in the severity of cellular debris, respectively), and lung as well as various lymphohemoreticular tissues (vacuolated macrophages). Following a 4-week recovery period, only basophilic tubules in the kidney were present. In the absence of any of these findings at 15 mg/kg/day, and with only transient clinical signs and slight changes in urinary parameters, this dose level was considered to be the NOAEL.		

表 7C:　　イヌ 1 ヵ月反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**15**		**75**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 3**	**F: 3** **F: 3**
Toxicokinetics [a]								
$AUC_{(0\text{-}t)}$ (µM*h)			19.6	18.1	136	141	458	492
C_{max} (µM)			1.51	1.46	10.0	8.94	24.3	24.7
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical Observations [b]	-	-	-	-	+	+	++	++
Electrocardiography (%) [c,d]								
Week 1								
Heart rate (bpm)	61 (10 h)	82 (1 h)	+48	+3.7	+33	+20	+54	+52*
PR interval (ms)	92	100	-7.6	-3.0	-3.3	-16	-5.4	-9.0
Week 4								
Heart rate (bpm)	83 (1 h)	81 (2 h)	-22	-6.2	+77[#]	+23	+36	+54***
PR interval (ms)	96	95	+1.0	+5.3	-14[#]	-7.4	-25	-21
Serum Chemistry								
ALT (U/L)	31	32	35	31	37	23	287	266
AST (U/L)	33	35	34	35	33	29	225	308
GLDH (U/L)	5.0	5.9	6.1	5.4	6.3	4.9	66.7	18.1
Myoglobin (ng/mL)	2.88	2.88	2.74	5.71	4.39	4.32	41.7	55.8
Urinalysis								
NAG (U/L)	2.7	2.4	7.5	1.1	9.5	2.3	17.8	4.8
NAG/creatinine ratio	0.3	0.2	1.0	0.2	1.1	0.3	1.7	0.5
Protein (mg/L)	106	86	318	114	210	175	299	264
Protein/creatinine ratio	11.83	9.84	37.72	11.16	27.75	15.95	31.16	25.81

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**15**		**75**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 3**	**F: 3** **F: 3**
Neutrophil Function Oxidative burst: average median fluorescence intensity following PMA stimulation (Week 4)	118	76.2	129	123	122	54.9	64.5	30.7
Organ Weights (%) [d,e]	(g)							
Thymus	5.682	4.286	+6.6	-14	-13	+57	-48	-57
Gross Pathology								
Liver								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Discoloration, pale	0	0	0	0	0	0	0	1
Prominent lobular architecture	0	0	0	0	0	0	1	2
Lymph node, bronchial								
Number examined	0	0	0	0	1	0	0	3
Enlargement					0			3
Histopathology								
Number examined (unless otherwise stated)	3	3	3	3	3	3	3	3
Bone marrow, sternum								
Increased cellularity, adipose tissue								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
GALT								
Vacuolated macrophages								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**15**		**75**	
Number of Animals								
Main	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**	**M: 3**	**F: 3**
Recovery	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 3**	**F: 3**
Kidney								
Degeneration, tubular, medulla								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1
Tubular basophilia with hyaline casts, corticomedullary junction								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	3
Vacuolation, tubular, corticomedullary junction								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	0
Liver								
Vacuolation, centrilobular								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Lung								
Vacuolated macrophages, alveolar								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2
Lymph node, axillary								
Vacuolated macrophages, germinal center								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	3

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**15**		**75**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 3**	**F: 3** **F: 3**
Lymph node, bronchial	(0)	(0)	(0)	(0)	(1)	(0)	(0)	(3)
Vacuolated macrophages, paracortex								
Minimal					1			0
Mild					0			1
Moderate					0			2
Lymph node, mandibular								
Vacuolated macrophages, germinal center								
Mild	0	0	0	0	0	0	3	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymph node, mesenteric								
Vacuolated macrophages, germinal center								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Vacuolated macrophages, paracortex								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Spleen								
Vacuolated macrophages, white pulp								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	2
Thymus								
Involution/atrophy								
Minimal	1	0	1	0	0	0	1	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**15**		**75**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 0**	**F: 3** **F: 0**	**M: 3** **M: 3**	**F: 3** **F: 3**
Testis								
Swollen spermatocytes								
Mild	0		0		0		3	
Epididymis								
Cellular debris, abnormal								
Minimal	2		0		0		1	
Mild	0		0		0		2	
Postdose Evaluation:								
Number Evaluated	0	0	0	0	0	0	3	3
Noteworthy Findings								
Histopathology								
Kidney								
Tubular basophilia with hyaline casts, corticomedullary junction								
Minimal							2	0
Tubular basophilia, cortex/corticomedullary								
Minimal/mild							1	2

[a] Day 28 mean data shown. No brensocatib was detected in control animals.
[b] Clinical signs of salivation and mucoid/foamy/liquid vomit or material in pens (white/yellow/brown in color and possibly containing test item) were noted within first 2 hours following dosing, with a dosage response apparent with regards to incidence. At 75 mg/kg/day, liquid feces, feces with mucoid material and/or abnormally colored (orange/yellow/ green) feces were also observed.
[c] The time point at which the maximal difference from control occurred is shown in brackets. Values marked # are for a single animal, therefore were excluded from statistical analyses.
[d] 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).
[e] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.
Note: - = No noteworthy findings; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$. ECG data was analyzed using Dunnett's Test.

ALT = alanine aminotransferase; AST = aspartate aminotransferase; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration at timepoint t; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration; ECG = electrocardiogram; F = female; GALT = gut-associated lymphoid tissue; GLDH = glutamate dehydrogenase; M = male; NAG = N acetyl-beta-d-glucosaminidase; PMA = phorbol myristate acetate.

表 7D:　　イヌ 6 ヵ月反復投与毒性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Species/Strain: Dog/beagle	**Duration of Dosing:** Up to 6 months (range: 18 to 26 weeks)	**Study Number:** 528329
Initial Age at Dosing: 5-6 months (range: 24-27 weeks)	**Duration of Postdose:** Up to 6 months	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special Features: Neutrophil function (phagocytic and oxidative burst activity), and electron microscopy		**Vehicle / Formulation:** Purified water (with an equivalent amount of tartaric acid as high dose added and adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide).
No-Observed-Adverse-Effect Level: 2 mg/kg/day		
Conclusion: Oral (gavage) administration of brensocatib at 50 mg/kg/day caused periodontal disease that necessitated the cessation of dosing during Week 18 of the study and the unscheduled euthanasia of 4 of the 7 animals per sex in this group. In the remaining 3 animals/sex/group, recovery from the periodontal disease was observed clinically, although inflammation of the periodontal tissue was observed pathologically at the end of the recovery period. At 8 or 50 mg/kg/day, there were dose dependent changes in the testes and epididymides. There were also accumulations of vacuolated macrophages in the lungs at these dose levels and in lymphoid tissues (axillary, mandibular, and mesenteric lymph nodes, GALT, and spleen) at 50 mg/kg/day. Tubular regeneration at the corticomedullary junction of the kidney was also present at 50 mg/kg/day. The findings in the lungs, lymphoid tissues, and kidneys were not present at the end of the recovery period but there was only partial recovery of the changes in the testes and epididymides. Brensocatib-related findings in animals administered 2 mg/kg/day were limited to transient and non-adverse clinical signs. Therefore, under the conditions of this study, the NOAEL was considered to be 2 mg/kg/day.		

表 7D:　　イヌ 6 ヵ月反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**2**		**8**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**
Toxicokinetics [a]								
Day 28								
Concentration at 2-hour postdose (μM)			0.871	0.827	3.79	4.17	21.6	21.5
Day 181								
C_{max} (μM)			1.00	0.895	4.38	5.47		
$AUC_{(0-t)}$ (μM*h)			13.3	12.1	60.4	74.7		
Noteworthy Finding								
Died or Sacrificed Moribund [b]	0	0	0	0	0	0	4	4
Clinical Observations								
Periodontal disease [c, d]	+ - ++	+ - ++			+ - ++	+ - ++	++ - ++++	++ - ++++
Hematology [e]								
White blood cell count ($\times 10^9$/L)	8.77	10.0	9.38	9.79	8.83	9.85	15.5**	16.5*
Neutrophil count ($\times 10^9$/L)	4.88	6.32	5.89	6.17	5.66	6.15	10.6***	10.7*
Plasma Chemistry [e, f]								
Aspartate aminotransferase (U/L)	34	35	35	38	36	41	167**	187***
Alanine aminotransferase (U/L)	32	31	30	34	34	32	136**	132**
Glutamate dehydrogenase (U/L)	5.8	6.4	5.7	6.8	7.5	7.7	19.1**	21.9**

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**2**		**8**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**
Creatine phosphokinase (U/L)	248	237	250	247	268	282	504**	598**
Bile acids (µmol/L)	3.5	7.9	2.2	0.9	3.7	4.4	24.7	37.5*
Urea (mmol/L)	5.0	5.3	5.1	5.2	4.9	5.9	6.0	6.1
Cholesterol (mmol/L)	4.0	3.8	4.2	3.4	3.9	4.5	5.6**	5.0*
Myoglobin (ng/mL)	11.4	11.4	10.4	8.59	8.36	18.9	36.6**	46.8*
Urinalysis [e]								
N-acetyl glucosaminidase (NAG) (U/L)	4.9	3.2	2.6	1.9	3.5	1.7	6.3	4.3
NAG/creatinine ratio	0.4	0.4	0.4	0.1	0.3	0.1	0.8	0.4
Neutrophil Function [e] Oxidative burst activity (MFI [g]) *E.coli s*timulation PMA stimulation	 36.2 79.1	 23.4 148	 50.0 144	 18.1 141	 20.8 100	 33.8 97.7	 20.8 44.1	 12.9 23.6
Organ Weights (%) [h, i]	(g)							
Adrenal gland	1.10	1.24	+12.8	+4.82	+20.2	+9.65	+47.7	+24.0
Liver	309	300	-2.59	+2.24	+5.79	-0.187	+26.3	+14.0
Lung	79.1	78.6	+12.6	-0.519	+15.7	-5.09	+70.3	+50.5

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**2**		**8**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**
Gross Pathology[j]								
Lung (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Abnormal consistency	0	1	0	0	0	0	1	1
Discoloration; mottled	0	1	0	0	0	1	0	0
Discoloration; pale	0	0	0	0	0	0	2	2
Failure to collapse	0	0	0	0	0	0	2	1
Focus; pale	0	0	0	0	3	1	2	3
Focus; dark	0	0	1	0	0	0	0	1
Oral cavity (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	3
Material accumulation	0	0	0	0	0	0	3	2
Tooth (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Loose and/or decayed (up to all teeth)	0	0	0	0	0	0	3	4
Histopathology[j]								
Epididymis (No. examined)	4		4		4		4	
Decreased cellularity; bilateral, sperm								
Minimal	0		1		0		0	
Mild	0		0		0		0	
Severe	0		0		1		4	
Increase cellular debris; bilateral								
Minimal	1		2		1		2	
Mild	0		0		2		0	
Apoptosis, initial segment; bilateral								
Mild	0		0		0		2	

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**2**		**8**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**
Gut associated lymphoid tissue (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Vacuolated macrophage accumulation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	3	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Kidney (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Basophilia; tubular, bilateral								
Minimal	0	0	2	0	1	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1
Lung (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Vacuolated macrophage accumulation, alveolar								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Mild	0	0	0	0	3	1	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	3
Marked	0	0	0	0	0	0	2	0
Lymph node, axillary (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Vacuolated macrophage accumulation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	2
Mild	0	0	0	0	0	0	2	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**2**		**8**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**
Lymph node, mandibular (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Vacuolated macrophage accumulation								
Mild	0	0	0	0	0	0	3	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	1
Lymph node, mesenteric (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Vacuolated macrophage accumulation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	3	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Spleen (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Vacuolated macrophage accumulation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	1
Testis (No. examined)	4		4		4		4	
Degeneration/atrophy; tubular, bilateral								
Minimal	1		0		1		0	
Mild	0		0		1		0	
Moderate	0		0		1		0	
Marked	0		0		0		1	
Severe	0		0		0		3	
Hypospermatogenesis, segmental								
Mild	0		1		0		0	
Hypertrophy/hyperplasia; bilateral, interstitial (Leydig) cell								
Mild	0		0		0		4	

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**2**		**8**		**50**	
Number of Animals **Main** **Recovery**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 0**	**F: 4** **F: 0**	**M: 4** **M: 3**	**F: 4** **F: 3**
Tooth (No. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Inflammation; periodontal								
Minimal	4	4	4	4	4	4	0	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	3
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Resorption/fibrosis; alveolar bone								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	0
Electron Microscopy Lung (No. examined)	0	0	0	0	0	0	2	3
Alveolar macrophage; accumulation, membrane remnant material; lysosome								
Minimal							0	1
Mild							1	0
Alveolar macrophage; increased number, secondary lysosomes								
Mild							0	1
Moderate							1	0
Postdose Evaluation (No. Evaluated)	3	3	0	0	0	0	3	3

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**2**		**8**		**50**	
Number of Animals								
Main	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Recovery	**M: 3**	**F: 3**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 3**	**F: 3**
<u>Noteworthy Findings</u>								
Histopathology[k]								
Epididymis (No. examined)	3						3	
Decreased cellularity; bilateral, sperm								
Mild	0						1	
Testis (No. examined)	3						3	
Hypospermatogenesis, segmental								
Minimal	0						1	
Mild	0						1	
Moderate	0						1	
Hypertrophy/hyperplasia; bilateral, interstitial (Leydig) cell								
Mild	0						1	
Tooth (No. examined)	3	3					3	3
Inflammation; periodontal								
Minimal	3	3					0	0
Mild	0	0					2	1
Moderate	0	0					1	2

[a] Dosing at 50 mg/kg/day ceased on Day 122 (Week 18); therefore, no data exist for Day 181; data from 2 hours postdose on Day 28 (sampling limited to 2 and 24 hours post-dose) are included here for comparison; brensocatib was not detected in samples collected from control animals.
[b] Due to periodontal disease (see footnote c) observed at 50 mg/kg/day, the final dose was administered on Day 122 (Week 18), and the most severely affected 4 dogs of each sex were necropsied between Days 122 and 130 (Week 18 or 19). The remaining dogs at 50 mg/kg/day were retained to assess recovery over a 27 week period and were subjected to necropsy on Day 314. The recovery controls were dosed up to Day 140 (20 complete weeks of dosing) and were subjected to necropsy on Day 314 after 24 weeks of recovery.

[c] Scale for assessing periodontal disease: Very mild (+): Focal calculus on occasional teeth covering < 50% of tooth surface, no more than mild, focal gingivitis; Mild (++): Calculus obscuring shape of some teeth and associated with more generalized gingivitis restricted to the gingival margin; calculus not encasing junction between gum and tooth, no exposure of tooth roots; Moderate (+++): Gum recession exposing tooth roots in some areas; calculus encasing junction between gum and tooth in some areas, some resentment to palpation; Severe (++++): 'Moderate' plus one or more of the following signs: loose tooth/teeth, bleeding, pus, gum recession exposing ≥ 50% of one or more tooth roots, extreme resentment of palpation. Note animals at 0 or 8 mg/kg/day assessed for comparative purposes; animals at 2 mg/kg/day were not assessed.
[d] Other brensocatib-related clinical observations at 2, 8, or 50 mg/kg/day were limited to salivation, soft and/or liquid feces, and vomiting, with a dose related response with respect to incidence and/or severity apparent.
[e] At Week 13 of the dosing period.
[f] Increases in creatinine were recorded in some dogs (up to a 5.78-fold of mean prestudy values) 1 week (Week 19/Day 129) after the final administration at 50 mg/kg/day. For the animals that showed this change and were allowed a recovery period, clear evidence of full reversibility was observed.
[g] Median fluorescence intensity.
[h] For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown. Note: organ weight data was recorded for the 4 animals/sex in the 50 mg/kg/day dose group subjected to unscheduled euthanasia (at Week 18 or 19); the percent differences presented are relative to the control group mean values at the end of scheduled dosing period (26 weeks). Statistical analysis was conducted using actual data (not on the percent differences) and was limited to the end of the dosing period data (ie, control versus the 2 or 8 mg/kg/day dose groups).
[i] At 50 mg/kg/day (the only dose level brensocatib-related organ weight changes) both absolute and relative weights differed from controls in the directions indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects.
[j] Findings from main study animals at 0, 2, or 8 mg/kg/day subjected to scheduled euthanasia at the end of scheduled dosing period (26 weeks) and from animals at 50 mg/kg/day subjected to unscheduled euthanasia (at Week 18 or 19).
[k] Duration of recovery: 24 or 27 weeks (0 or 50 mg/kg/day, respectively) after the final dose administration.
Note: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$. Hematology and plasma chemistry data were analyzed using Dunn's Test.
AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration at timepoint t; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration; F = female; GALT = gut-associated lymphoid tissue; GLP = good laboratory practice; M = male; NOAEL = no observed adverse effect level; PMA = phorbol myristate acetate.

表 7E:　　イヌ 9 ヵ月反復投与毒性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 9 months	**Study Number:** 505523
Initial Age at Dosing: 7-8 months	**Duration of Postdose:** 6 months	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Special Features: Electron microscopy.		**Vehicle/Formulation:** Purified water with the equivalent amount of tartaric acid as used in Group 5 added and adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide
No-Observed-Adverse-Effect Level: 8 mg/kg/day		
Conclusion: Administration of brensocatib by once-daily oral gavage for 39 weeks was well tolerated in dogs at levels of up to 8 mg/kg/day, the highest dose employed. Based on the results, the NOAEL was considered to be 8 mg/kg/day.		

表 7E:　　イヌ９ヵ月反復投与毒性試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)										
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**1**		**2**		**4**		**8**	
Number of Animals										
Main	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**	**M: 4**	**F: 4**
Recovery	**M: 6**	**F: 6**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 6**	**F: 6**
Toxicokinetics [a]:										
$AUC_{(0\text{-}t)}$ (μM*h)			5.18	6.23	11.7	11.2	20.4	24.0	48.1	54.6
C_{max} (μM)			0.354	0.416	0.862	0.928	1.55	1.85	3.91	4.70
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Electron Microscopy Lung										
(No. examined)	4	4	0	0	0	0	0	0	4	4
Type II pneumocyte, degeneration										
Minimal	0	0							3	4
Type II pneumocyte, hyperplasia/hypertrophy, lysosomal (secondary)	0	0							4	4
Alveolar macrophage, accumulation, phospholipid material, lysosomes	0	0							4	4
Postdose Evaluation:										
Number Evaluated [b]	6	6	0	0	0	0	0	0	6	6
Noteworthy findings	-	-							-	-

[a] Day 273 mean data shown. No brensocatib was detected in control animals.
[b] Only clinical observation, food consumption, hematology, coagulation, clinical chemistry, urinalysis, sperm analysis (Week 52), macroscopic pathology, and organ weight evaluations were performed.
Note: - = No noteworthy findings.
$AUC_{0\text{-}t}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration at timepoint t; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration; F = female; GLP = good laboratory practice; M = male; NOAEL = no observed adverse effect level.

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

表 8A: 遺伝毒性： サルモネラチフス菌及び大腸菌を用いた Ames 復帰突然変異試験（*in vitro*）

Test Article: Brensocatib (INS1007)			
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells.		**Number of Independent Assays:** 1	**Study Number:** 8304016
Strains: *S. typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, TA98) and *E. coli* (WP2 *uvrA* [pKM101])		**Number of Replicate Cultures:** 5 for vehicle 3 for Test Article and positive controls	**GLP Compliance:** Yes
Metabolizing System: Aroclor 1254 induced rat liver S9, 10%		**Number of Cells Analyzed/Culture:** Not applicable	**Testing Facility:** [redacted], UK
Vehicles:	**For Test Article:** DMSO; **For Positive Controls:** DMSO (2-nitrofluorene, 9 aminoacridine, 2-aminoanthracene, benzo[a]pyrene, 4-nitroquinoline 1-oxide) and water (sodium azide)		
Treatment: Assay 1 (+/- S9), plate incorporation for 3 days.			**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity ranging from a slight thinning of the background bacterial lawn, with or without a concurrent reduction in revertant numbers, to a complete killing of the test bacteria was observed at 1600 and/or 5000 µg/plate in all strains in the absence and presence of S9.			
Genotoxic Effects: None.			

表 8A:　遺伝毒性：サルモネラ菌及び大腸菌を用いた Ames 復帰突然変異試験（*in vitro*）（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate)**	**Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
Without activation	DMSO	100 µL/plate	22.4 (7.3)	146.6 (13.8)	29.0 (5.9)	7.6 (1.5)	204.4 (9.1)
	Brensocatib	5	22.3 (3.2)	155.7 (11.6)	41.0 (8.0)	9.3 (4.2)	185.3 (1.5)
		16	17.0 (2.6)	167.3 (6.7)	33.7 (5.0)	9.3 (4.2)	174.0 (21.9)
		50	19.3 (5.0)	148.0 (10.5)	31.0 (4.4)	10.0 (1.0)	203.0 (22.5)
		160	23.7 (0.6)	151.3 (2.9)	32.3 (6.0)	9.3 (0.6)	214.3 (23.2)
		500	24.0 (4.6)	140.7 (2.1)	29.7 (10.4)	11.7 (2.9)	198.3 (18.9)
		1600	28.3 (5.5) [S]	132.3 (17.6) [S]	32.0 (3.5) [S]	16.7 (1.2) [S]	183.7 (11.9)
		5000	0 [T]	0 [T]	0 [T]	0 [T]	0 [T]
	2-Nitrofluorene	5	966.0 (177.8)				
	Sodium Azide	2		737.7 (25.8)	726.7 (15.0)		
	9-Aminoacridine	50				347.0 (84.2)	
	4-Nitroquinoline 1-oxide	2					1281.0 (103.5)

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate)**	**Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
With activation	DMSO	100 µL/plate	31.6 (8.4)	138.0 (11.2)	17.6 (4.4)	18.8 (3.3)	223.8 (22.5)
	Brensocatib	5	38.7 (2.5)	139.0 (6.1)	17.7 (2.5)	19.7 (5.1)	228.3 (12.1)
		16	34.3 (8.1)	140.0 (12.1)	17.0 (8.2)	25.7 (5.8)	227.3 (7.2)
		50	33.3 (3.8)	136.0 (23.8)	17.3 (3.2)	19.0 (3.6)	235.0 (12.1)
		160	43.4. (3.1)	130.3 (10.1)	15.7 (2.1)	22.3 (6.0)	245.3 (3.2)
		500	40.3 (5.5)	146.7 (10.6)	16.0 (5.0)	22.3 (7.0)	243.0 (21.2)
		1600	44.3 (6.0) [S]	157.0 (11.1) [S]	13.3 (5.8) [S]	9.3 (1.5) [S]	204.0 (15.4)
		5000	0 [T]	3.0 (2.0) [V]	2.3 (2.1) [V]	0 [T]	0 [T]
	Benzo[a]pyrene	10	464.0 (45.2)				
	2-Aminoanthracene	5		1162.7 (262.9)	305.3 (2.3)	210.0 (29.5)	
	2-Aminoanthracene	10					760.7 (44.1)

S: Slight thinning of background bacterial lawn.
T: Toxic, no revertant colonies.
V: Very thin background bacterial lawn.
DMSO = dimethylsulfoxide, GLP = good laboratory practice; SD = standard deviation.

表 8B:　遺伝毒性：マウスリンパ腫（L5178Y TK+/-）前方突然変異アッセイ（*In vitro*）

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Test for Induction of: Gene mutation and chromosome aberrations.	**Number of Independent Assays:** 1	**Study Number:** 8304015
Strains: L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2C	**Number of Replicate Cultures:** 2	**GLP Compliance:** Yes
Metabolizing System: Aroclor 1254 induced rat liver S9, 2%	**Number of Cells Analysed/Culture:** 1 x 10^7 (3-hour treatment) 4 x 10^6 (24-hour treatment)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Vehicles:	**For Test Article:** DMSO; **For Positive Controls:** DMSO (Methyl methane sulphonate, Benzo[a]pyrene)	
Treatment: Microwell fluctuation assay, 3 hours in the presence and absence of S9 and 24 hours in the absence of S9.		**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: Relative Total Growth (RTG) reduced to 14% at 100 µg/mL following 3-hour treatments without and with S9 and to 19% at 30 µg/mL for 24-hour treatments without S9 (limited by toxicity).		
Genotoxic Effects: No biologically relevant increases in mutant frequency.		

表 8B:　遺伝毒性：マウスリンパ腫（L5178Y TK+/-）前方突然変異アッセイ（*In vitro*）（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)						
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Assay 1: 3-hour Treatment**			
			Suspension Growth	**Relative Day 2 Viability (%)**	**Relative Total Growth (%)**	**Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)**
Without activation	DMSO	10 µL/mL	15.02	100.00	100.00	97.28
	Brensocatib	20	15.39	74.20	76.03	111.05
		30	12.31	76.06	62.30	120.71
		40	10.45	74.90	52.11	123.47
		50	8.01	72.13	38.48	143.53
		60	2.76	67.48	12.38	151.36
		80	3.32	60.11	13.27	231.68 [a]
		100	3.36	61.86	13.84	209.32
	Methyl methane sulphonate	15	12.50	63.66	52.96	463.50
		20	5.81	40.90	15.83	1020.12
With activation	DMSO	10 µL/mL	19.14	100.00	100.00	84.21
	Brensocatib	20	16.25	105.56	89.65	96.79
		40	12.79	106.39	71.11	96.85
		60	10.26	111.60	59.84	103.38
		70	7.50	89.40	35.01	133.05
		80	4.62	101.54	24.49	134.17
		100	2.90	92.07	13.94	182.05
	Benzo[a]pyrene	2	14.74	86.83	66.89	521.43
		3	6.91	77.40	27.94	937.76

Test Article: Brensocatib (INS1007)						
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**Assay 1: 24-hour Treatment**			
			Suspension Growth	**Relative Day 2 Viability (%)**	**Relative Total Growth (%)**	**Mutant Frequency ($\times 10^{-6}$)**
Without activation	DMSO	10 µL/mL	93.82	100.00	100.00	96.95
	Brensocatib	2.5	82.89	96.15	84.95	96.64
		5	75.50	90.44	72.77	98.34
		10	75.68	78.04	62.95	87.96
		20	43.27	82.11	37.87	104.44
		25	28.24	85.19	25.64	113.81
		30	21.80	81.51	18.94	91.77
	Methyl methane sulphonate	5.0	72.05	64.84	49.79	922.22
		7.5	55.31	56.73	33.44	1294.80

[a] Mutant frequency exceeds the sum of the vehicle control mutant frequency plus global evaluation factor (GEF: 126 mutants per 106 viable cells for microwell assays).
DMSO = dimethylsulfoxide; GEF = global evaluation factor; GLP = good laboratory practice; RTG = relative total growth.

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

表 9: *In Vivo* 遺伝毒性試験：ラット小核試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Test for Induction of: Bone-marrow micronuclei (MN)	**Treatment Schedule:** Two daily oral doses	**Study Number:** 8304017
Species/Strain: Rat/Han Wistar (CRL:WI(Han))	**Sampling Time:** 24 hours after second dose	**GLP Compliance:** Yes
Age: 9-10 weeks	**Method of Administration:** Oral (gavage)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Cells Evaluated: Immature erythrocytes (IEs)	**Vehicle:** Purified water/0.1-1M Tartaric acid at pH 3-4 adjusted with sodium hydroxide Formulation: Suspension	**Dates of Dosing:** [redacted] 20[redacted]
Number of Cells Analyzed/Animal: 2000 IE		
Special Features: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		
Evidence of Exposure: Slight dose-related decreases in body weight		

表 9: *In Vivo* 遺伝毒性試験：ラット小核試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)					
Sampling Time (After Final Dose)	**Test Article**	**Dose (mg/kg/day)**	**Number of Animals**	**Mean % IEs**	**Mean % Micronucleated IEs**
24 hours	Vehicle	10 mL/kg	7 Male	44.00	0.14
	Brensocatib	40	7 Male	42.93	0.14
		200	7 Male	48.29	0.10
		400	7 Male	48.46	0.09
	Cyclophosphamide[a]	20	3 Male	44.07	1.77**

[a] Cyclophosphamide administered as single dose at 24 hours.
Note: Analysis conducted using Wilcoxon test; ** $p \leq 0.01$.
GLP = good laboratory practice; IE = immature erythrocytes; MN = micronuclei.

2.6.7.10 がん原性試験

表 10A: がん原性試験：28 日間用量設定試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Duration of Dosing**	**Doses (mg/kg/day)**	**Gender and Number per Group**	**NOAEL (mg/kg)**	**Noteworthy Findings**	**Testing Facility**	**Study Number**
Mouse/ wild type rasH2	Oral (gavage) (purified water with tartaric acid and adjusted to pH at 3-4 with sodium hydroxide)	28 days	0, 50, 100, 200	10/sex/group	200	Administration of brensocatib by once daily oral gavage was well tolerated in mice at levels of ≤200 mg/kg/day, and there were no brensocatib-related adverse findings noted in the study. Microscopic changes suggestive of gavage reflux were observed in the larynx (epithelial alteration at ≥50 mg/kg/day, squamous metaplasia and mononuclear cell infiltration at 50 and 200 mg/kg/day) and in the nasal cavity (epithelial degeneration/atrophy at 200 mg/kg/day). Based on the nature of the findings mentioned above, the NOAEL was considered to be 200 mg/kg/day. At the NOAEL, the mean C_{max} and $AUC_{(0\text{-}24h)}$ sex combined values were 163 µM and 2160 µmol•h/L, after 28 days of dosing.	[redacted], Canada	8003479

$AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to 24-hour post last administration; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration; GLP = good laboratory practice; NOAEL = no observed adverse effect level.

表 10B:　　がん原性試験：26 週間遺伝子導入 rasH2 マウスを用いた 6 箇月間試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Species/Strain: Mouse/CByB6F1-Tg-(HRAS)2Jic Hemizygous (transgenic)	**Duration of Dosing:** 26 weeks, once daily	**Study Number:** 20354490
Age at First Dose: 10 weeks old	**Duration of Postdose:** N/A	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Testing Facility:** [redacted]. USA
Treatment of Controls: Purified water containing tartaric acid (with pH adjusted to 3 to 4)		**Positive Control:** Urethane in sodium Chloride for injection
Special Features: Non-transgenic littermates (CByB6F1 wild type mice) were used for toxicokinetic evaluation.		**Vehicle:** Purified water containing tartaric acid (with pH adjusted to 3 to 4) **Formulation**: Solution
Basis for High-Dose Selection: A high dose of 50 mg/kg/day was chosen based on the no-observed-adverse-effect level of 200 mg/kg/day in a previous 28-day study and the final ICH S1B(R1) Addendum indicating a 50-fold plasma exposure ratio (rodent:human) is adequate criterion for high-dose selection.		
Conclusion: Once daily oral gavage administration of brensocatib for a minimum of 26 weeks to CByB6F1/Tg rasH2 hemizygous mice at 0, 0, 5, 15, and 50 mg/kg/day did not result in any carcinogenic effect related to brensocatib administration at any dose level in this study.		

表 10B:　がん原性試験：28 日間用量設定試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)												
Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle Control)**		**0 (Water Control)**		**5**		**15**		**50**		**500[a]**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Number of Animals												
Carcinogenicity - CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous (transgenic):	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	10	10
Toxicokinetics - CByB6F1 wild-type (non-transgenic) mice:	3	3	3	3	8	8	8	8	8	8	0	0
Toxicokinetics												
C_{max} (µmol/L)												
Day 1	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	2.60	3.69	7.25	10.9	26.0	48.9	NA	NA
Day 182	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	2.63	4.14	15.1	23.5	56.1	68.9	NA	NA
$AUC_{(tlast)}$ (µmol•h/L)												
Day 1	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	7.54	14.8	23.0	74.7	135	286	NA	NA
Day 182	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	BLLOQ	10.1	34.9	79.8	173	297	708	NA	NA
Died or Euthanized Moribund												
Carcinogenicity Animals	1	1	1	2	1	0	0	0	1	2	1	0
Toxicokinetics Animals	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	NA	NA
Survival of Carcinogenicity Animals (%)	96	96	96	92	96	100	100	100	96	92	90	100
Body Weight (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	[b]	[b]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neoplastic Lesions – Drug-Related	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	10	10

Test Article: Brensocatib (INS1007)												
Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle Control)**		**0 (Water Control)**		**5**		**15**		**50**		**500[a]**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Neoplastic Lesions – Incidental/Spontaneous[c]											[b]	[b]
Number Examined	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	10	10
Body cavity, nasal												
Adenocarcinoma (malignant)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (1)	NE
Papilloma, squamous cell (benign)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0 (1)	NE
Bone, femur												
Hemangiosarcoma, metaphysis (malignant)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (1)	NE
Brain												
Oligodendroglioma (malignant)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0 (1)	NE
Gland, harderian												
Adenoma, acinar (benign)	0	1	0	1	0	3	0	1	0	1	0 (1)	NE
Adenocarcinoma (malignant)	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0 (1)	NE
Hemolymphoreticular tissue												
Lymphoma (malignant)	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0 (1)	NE
Kidney												
Hemangiosarcoma, adipose tissue (malignant)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0 (1)	NE
Liver												
Hepatocellular adenoma (benign)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (1)	NE

Test Article: Brensocatib (INS1007)												
Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle Control)**		**0 (Water Control)**		**5**		**15**		**50**		**500[a]**	
Sex	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Lung												
Bronchioloalveolar adenoma (benign)	3	0	1	3	2	2	3	3	2	2	10	10
Bronchioloalveolar carcinoma (malignant)	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
Site, uncertain primary												
Hemangiosarcoma (malignant)	NE	NE	1 (1)	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Skin												
Hemangiosarcoma (malignant)	0	0	0 (24)	0	1	0	0	0	0	0 (24)	0 (1)	NE
Papilloma, squamous cell (benign)	0	0	0 (24)	0	0	0	0	0	0	1 (24)	0 (1)	NE
Spleen												
Hemangiosarcoma (malignant)	0	3	0	0	0 (24)	0	2	2	3	1	2	1
Thymus												
Hemangiosarcoma (malignant)	0	0	0 (24)	0	1	0	0	0	0	0	0 (1)	NE
Uterus/cervix												
Hemangiosarcoma (malignant)	NA	1	NA	2	NA	0	NA	1	NA	1	NA	NE
Noteworthy Findings												
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	10	10
Non-neoplastic Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number Examined	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	10	10

[a] Dosed once daily, on Days 1, 4, and 7, with positive control (urethane) via intraperitoneal injection.
[b] For urethane-treated mice, there was an overall statistically significant increase in mean body weight gain for males that resulted in absolute body weights that were 8.41% and 13.18% higher than vehicle and water controls, respectively, and an overall statistically significant increase in mean body weight gain for females that resulted in absolute body weights that were 15.72% and 16.46% higher than vehicle and water controls, respectively, on Day 92. Increases in mean body weight gain compared with the controls are expected in urethane-treated mice. Urethane-administered positive control mice in both sexes exhibited the expected neoplastic changes (increased incidence of lung

bronchioloalveolar adenoma/carcinoma and splenic hemangiosarcoma). These are well characterized and reported urethane-related histopathology changes, thereby, validating the CByB6F1-Tg-(HRAS)2Jic hemizygous mouse model used in this study.

[c] Number indicates the number of animals with neoplastic lesions; the number in parentheses indicates the number of animals examined if all animals in the group were not examined.

- = No noteworthy findings; $AUC_{(tlast)}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to the time of the final quantifiable sample; BLLOQ = below the lower limit of quantification (<0.05 µmol/L); C_{max} = maximum observed concentration; F = female; GLP = good laboratory practice; M = male; N/A = not applicable; NE = not examined.

表 10C:　がん原性試験：Wistar Han ラットにおける 2 年間のがん原性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han) Wistar Han rat	**Duration of Dosing:** 104 weeks Due to the low survival in the 30 mg/kg/day females, dosing was discontinued for this group during Week 103	**Study Number:** 8002910
Age at First Dose: 6 weeks old	**Duration of Postdose:** N/A	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Testing Facility:** [redacted], Canada
Vehicle/Formulation: Purified water treated with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide[a]		**Treatment of Controls:** vehicle formulation
Special Features: 3 additional rats per sex for the control group and 6 additional rats per sex per drug-treated group bled at 6 months for toxicokinetic analyses and then removed from the study.		
Basis for High Dose Selection: Exposure multiple-based endpoint		
Conclusion: Not carcinogenic		

表 10C:　Wistar Han ラットにおける 2 年間のがん原性試験（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main: **Toxicokinetic:**	**50** **3**	**50** **3**	**50** **6**	**50** **6**	**50** **6**	**50** **6**	**50** **6**	**50** **6**
Toxicokinetics								
Day 1								
AUC_{0-24} (hr*µmol/L)	N/A	N/A	10.7	18.7	34.5	96.0	169	329
C_{max} (µmol/L)	N/A	N/A	1.12	1.48	3.98	9.44	18.9	32.1
Day 182								
AUC_{0-24} (hr*µmol/L)	N/A	N/A	36.3	49.2	120	236	428	649
C_{max} (µmol/L)	N/A	N/A	2.49	3.61	13.0	20.6	45.3	68.6
Noteworthy Findings:								
Died or Euthanized Moribund	16	20	19	19	18	27	22	32
Survival (%)	68	60	62	62	64	46	56	36
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Palpable Masses	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Histopathology[b]								
Neoplastic Changes:								
Adipose tissue								
Number of animals examined	4	7	3	8	7	8	4	17
Endometrial adenocarcinoma	0	3	0	5	0	3	0	8
Ductal cell adenocarcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Schwannoma, malignant	1	0	0	0	0	0	0	0
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Endometrial stromal sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	1	1
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	1	0	0	0
Tubulostromal carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Body cavity, abdominal								
Number of animals examined	0	1	0	0	0	0	0	4
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	2
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Body cavity, nasal								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Schwannoma, benign	0	0	1	0	0	0	0	0
Schwannoma, malignant	0	0	1	0	0	1	0	0
Carcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Adenoma	0	0	1	0	0	0	0	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Body cavity, cranial								
Number of animals examined	0	0	0	0	1	0	0	0
Granular cell tumor, malignant	0	0	0	0	1	0	0	0
Body cavity, pelvic								
Number of animals examined	1	0	0	0	2	0	3	0
Rhabdomyosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Mesothelioma, malignant	1	0	0	0	1	0	3	0
Body cavity, thoracic								
Number of animals examined	0	0	0	0	0	1	0	1
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Bone marrow								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Bone, femur								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	49
Osteosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	1	0	0	0
Bone, sternum								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Brain								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	49	50	50
Astrocytoma, malignant	0	0	2	0	0	1	0	0
Granular cell tumor, malignant	1	0	4	1	1	1	3	1
Granular cell tumor, benign	0	0	0	1	0	1	0	0
Oligodendroglioma, malignant	0	1	0	0	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Schwannoma, malignant	0	0	1	0	0	0	0	0
Carcinoma, pars distalis	0	4	0	2	0	3	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	0	0	0	0
Cervix								
Number of animals examined	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50
Histiocytic sarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
Leiomyosarcoma	N/A	0	N/A	1	N/A	1	N/A	0
Endometrial adenocarcinoma; adenosquamous	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Endometrial adenocarcinoma	N/A	3	N/A	5	N/A	3	N/A	9
Polyp	N/A	2	N/A	0	N/A	1	N/A	1
Endometrial stromal sarcoma	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Papilloma; squamous cell	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Schwannoma, malignant	N/A	1	N/A	0	N/A	1	N/A	2
Carcinosarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
Neuroendocrine cell tumor, benign	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Sarcoma; stromal	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	1

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Epididymis								
Number of animals examined	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A
Mesothelioma, malignant	1	N/A	0	N/A	0	N/A	4	N/A
Lymphoma, malignant	0	N/A	0	N/A	2	N/A	0	N/A
Ductal cell adenocarcinoma	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A
Esophagus								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Eye								
Number of animals examined	50	50	49	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Gland, adrenal								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Pheochromocytoma, benign	1	1	1	0	1	0	0	0
Cortical adenoma	2	4	2	1	7	3	4	2
Pheochromocytoma, complex, benign	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	3	0	1	0	0	0	6
Neuroblastoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Ganglioneuroma	0	0	0	0	1	0	0	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Gland, harderian								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	1	0	0	0
Gland, lacrimal								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Gland, parathyroid								
Number of animals examined	47	50	49	50	46	50	47	47
Adenoma	1	0	1	2	1	2	1	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	0	0	0	0
Gland, pituitary								
Number of animals examined	50	50	50	49	50	49	50	50
Pituicytoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Carcinoma, pars distalis	0	4	0	2	0	3	0	0
Adenoma, pars intermedia	2	2	0	3	0	1	0	0
Adenoma, pars distalis	18	24	22	28	18	23	21	25
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	2	0	0	0
Schwannoma, malignant	0	0	1	0	0	0	0	0
Gland, preputial								
Number of animals examined	0	N/A	2	N/A	3	N/A	1	N/A
Lymphoma, malignant	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
Adenocarcinoma	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Gland, prostate								
Number of animals examined	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A
Adenoma	2	N/A	1	N/A	2	N/A	0	N/A
Lymphoma, malignant	0	N/A	1	N/A	2	N/A	0	N/A
Gland, salivary, mandibular								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Schwannoma, malignant	0	0	0	0	0	0	1	0
Liposarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Adenocarcinoma	1	0	0	0	0	1	0	0
Carcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Gland, seminal vesicle								
Number of animals examined	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A
Lymphoma, malignant	0	N/A	1	N/A	2	N/A	0	N/A
Mesenchymal tumor, malignant	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A
Gland, thyroid[c]								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
C-cell adenoma	13	13	13	10	7	6	13	14
C-cell carcinoma	1	0	0	1	3	1	2	2
Follicular cell carcinoma	5@	0	2	2	5	1	4	3
Follicular cell adenoma	5@	3	4	2	3	2	10	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	1	0	0	0
Gland, zymbals								
Number of animals examined	0	1	3	1	0	0	1	0
Carcinoma	0	1	3	1	0	0	1	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Heart								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	1
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0	0	1
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Hemolymphoreticular tissue								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	1	1	0	0	0	2
Lymphoma, malignant	0	1	1	0	3	1	0	0
Lymphoma, malignant; globule leukocyte	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Nephroblastoma, malignant	1	0	0	0	0	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Mesenchymal tumor, malignant	0	0	0	0	1	1	1	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	3	0	1	0	0	0	6
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Large intestine, cecum								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	50
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	1	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Large intestine, colon								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	50
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	2	0	1	0	4
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	1	0	0	0
Tubulostromal carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Large intestine, rectum								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	2	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	2
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	1	0
Larynx								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	1	0	0	0
Schwannoma, malignant	0	0	0	0	0	0	1	0
Follicular cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
C-cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Liver								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Hepatocellular adenoma	1	0	0	2	3	3	0	1
Cholangioma	0	0	0	0	1	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	4	0	6	0	3	0	6
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Mesenchymal tumor, malignant	0	0	0	0	0	0	1	0
Tubulostromal carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Lung								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Bronchioloalveolar adenoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Carcinoma; basal cell	0	1	0	0	0	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	3	0	8	0	5	0	9
Schwannoma, malignant	0	0	1	0	0	0	1	0
Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	1
C-cell carcinoma	1	0	0	0	0	0	1	0
Endometrial stromal sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Follicular cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph node								
Number of animals examined	17	22	19	20	17	18	13	24
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Lymphoma, malignant; globule leukocyte	0	0	0	0	0	0	0	1
Endometrial adenocarcinoma	0	3	0	2	0	1	0	4
Schwannoma, malignant	1	0	0	0	0	0	0	0
Liposarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
C-cell carcinoma	1	0	0	0	0	0	1	1
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	1	0	0
Endometrial stromal sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Mesenchymal tumor, malignant	0	0	0	0	0	0	1	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Lymph node, mandibular								
Number of animals examined	50	48	50	50	50	50	49	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Hemangiosarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph node, mesenteric[e]								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	49
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	2
Ductal cell adenocarcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Hemangioma	2	1@	3	0	2	1	1	3
Hemangiosarcoma	4	0	2	1	1	0	1	0
Mammary gland[d]								
Number of animals examined	40	49	28	49	35	49	35	49
Adenoma	0	0@	0	3	0	3#	0	1#
Adenocarcinoma	0	4@	0	4	0	6#	0	8#
Fibroadenoma	0	8@	0	8	0	9#	1	9#
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	1	0	0	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Muscle, skeletal								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Schwannoma, malignant	0	0	1	0	0	0	1	0
Rhabdomyosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	1	0	0	0
Hemangioma	0	0	0	0	1	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	2	0	1	0	1	0	10
Ductal cell adenocarcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Liposarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
C-cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0
Hemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Tubulostromal carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Nerve, cranial								
Number of animals examined	0	0	1	0	0	0	0	0
Schwannoma, malignant	0	0	1	0	0	0	0	0
Nerve, sciatic								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	49
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Ovary								
Number of animals examined	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50
Adenoma; rete ovarii	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A	2
Thecoma, malignant	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
Endometrial adenocarcinoma	N/A	0	N/A	1	N/A	2	N/A	6
Mixed sex cord stromal tumor, benign	N/A	2	N/A	3	N/A	1	N/A	0
Sarcoma; not otherwise specified	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A	0
Carcinosarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
Tubulostromal carcinoma	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Pancreas								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Ductal cell adenocarcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	2	0	4	0	1	0	10
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Islet cell adenoma	1	0	3	0	1	0	1	0
Schwannoma, malignant	1	0	0	0	0	0	0	0
Islet cell carcinoma	1	0	0	0	1	1	3	1
Endometrial stromal sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Mesenchymal tumor, malignant	0	0	0	0	0	0	1	0
Adenoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Skin								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	49	50	50
Squamous cell carcinoma	1	0	0	0	1	1	0	0
Basal cell tumor, benign	0	0	1	0	0	0	0	0
Papilloma; squamous cell	1	0	2	0	1	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	2	0	0	0
Carcinoma; basal cell	0	1	0	1	0	1	0	0
Lipoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Keratoacanthoma	3	0	6	2	3	0	6	0
Osteosarcoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Sebaceous cell adenoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Sebaceous cell carcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Small intestine, duodenum								
Number of animals examined	49	49	50	50	50	50	50	50
Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	3
Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	0	0	0	0
Small intestine, ileum								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	50
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	2
Hemangiosarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	1	0	0	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Small intestine, jejunum								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Leiomyoma	0	0	0	0	0	2	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	1	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	4
Endometrial stromal sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Fibrosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Spinal cord, lumbar								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Spinal cord, thoracic								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Astrocytoma, malignant	0	0	0	0	1	0	0	0
Spleen								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Leukemia	0	0	1	0	0	0	0	0
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Hemangiosarcoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Hemangioma	0	0	0	0	0	0	1	1
Histiocytic sarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	2	0	2	0	1	0	9
Schwannoma, malignant	1	0	0	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Tubulostromal carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Stomach								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Adenocarcinoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Mesothelioma, malignant	0	0	0	0	0	0	0	1
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Papilloma; squamous cell	0	2	0	0	0	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	4	0	4	0	1	0	6
Schwannoma, malignant	1	0	0	0	0	0	0	0
Squamous cell carcinoma	1	0	0	0	0	0	0	0
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1
Tubulostromal carcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Subcutis								
Number of animals examined	3	4	8	3	6	6	8	3
Fibrosarcoma	1	0	1	0	2	2	1	1
Fibrosarcoma; myxomatous	0	0	1	0	1	0	0	0
Schwannoma, malignant	1	0	1	1	0	0	3	0
Fibroma	1	1	2	1	2	3	2	1
Histiocytic sarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Liposarcoma	0	0	1	0	0	0	0	0
Hemangiosarcoma	0	0	1	0	1	0	0	0
Lipoma	0	0	1	0	0	0	1	0
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	1	0	0	0
Osteosarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Melanoma, malignant	0	1	0	0	0	0	0	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Testis								
Number of animals examined	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A
Interstitial (leydig) cell adenoma	3	N/A	2	N/A	1	N/A	0	N/A
Interstitial (leydig) cell carcinoma	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0	N/A
Mesothelioma, malignant	1	N/A	0	N/A	1	N/A	4	N/A
Lymphoma, malignant	0	N/A	0	N/A	2	N/A	0	N/A
Ductal cell adenocarcinoma	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A
Thymus[f]								
Number of animals examined	46	49	48	48	48	49	46	47
Lymphoma, malignant	0	1	0	0	1	0	0	0
Thymoma, benign	0	2@	2	2	4	3	0	6
Endometrial adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0	0	1
Tongue								
Number of animals examined	50	49	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	0	0	2	0	0	0
Trachea								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	1	0	0	0
C-cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Uterus[g]								
Number of animals examined	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50
Endometrial stromal polyp	N/A	1*	N/A	3	N/A	5	N/A	8#
Schwannoma, malignant	N/A	1	N/A	0	N/A	1	N/A	0
Endometrial stromal sarcoma	N/A	2	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Histiocytic sarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	2
Leiomyosarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	1	N/A	0
Endometrial adenocarcinoma	N/A	9	N/A	12	N/A	10	N/A	11
Endometrial adenocarcinoma; adenosquamous	N/A	1	N/A	3	N/A	0	N/A	1
Polyp; glandular	N/A	0	N/A	2	N/A	0	N/A	2
Squamous cell carcinoma	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Endometrial adenoma	N/A	1	N/A	1	N/A	0	N/A	3
Carcinosarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
Hemangiosarcoma	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Sarcoma; stromal	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	1
Ureter								
Number of animals examined	0	4	0	2	2	2	1	6
Endometrial adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0
Urinary bladder								
Number of animals examined	50	50	50	50	49	50	50	50
Lymphoma, malignant	0	0	1	0	2	0	0	0
Endometrial adenocarcinoma	0	2	0	2	0	3	0	5
Carcinosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Vagina								
Number of animals examined	N/A	50	N/A	50	N/A	50	N/A	50
Polyp	N/A	2	N/A	0	N/A	0	N/A	0
Histiocytic sarcoma	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	1
Endometrial adenocarcinoma	N/A	1	N/A	0	N/A	1	N/A	0
Sarcoma; stromal	N/A	1	N/A	0	N/A	0	N/A	1
Non-neoplastic Lesions								
Number of animals examined	50	50	50	50	50	50	50	50
Lung								
Alveolar macrophages; increased								
Minimal	19	5	15	13	17	11	30	12
Mild	1	0	0	1	1	0	10	5
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Liver								
Vacuolation; hepatocellular								
Minimal	4	11	4	15	7	12	11	12
Mild	1	2	2	2	3	3	9	2
Moderate	0	0	0	0	0	1	1	0
Stomach								
Erosion/ulcer; limiting ridge								
Mild	0	0	0	1	0	0	0	0
Moderate	1	0	0	0	0	0	1	0
Marked	0	0	0	0	0	0	0	2

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Daily Dose (mg/kg)	**0**		**3**		**10**		**30**	
Number of Animals/Sex/Group:	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Body cavity, nasal								
Exudate								
Minimal	2	0	2	0	0	0	6	6
Mild	0	0	0	0	3	1	3	2
Moderate	0	0	0	0	1	1	0	0
Inflammation								
Minimal	3	0	1	0	1	0	6	1
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	2	0	0	0
Degeneration; respiratory epithelium								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
Mild	0	0	0	0	1	1	2	3
Marked	0	0	0	0	2	0	0	0
Degeneration; olfactory epithelium								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	3
Mild	0	0	0	0	3	1	1	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0

[a] Purified water with the equivalent amount of tartaric acid as Group 4 added and adjusted to pH 3 to 4 with sodium hydroxide.
[b] Incidence is presented.
[c] Statistical analyses showed statistical significance in the overall trend test (@): follicular cell adenoma and combined follicular cell adenoma/carcinoma in males. However, the increasing trends for all these tumors were considered incidental and not related to brensocatib administration given the comparable incidence of these findings to the historical control data.
[d] Statistical analysis in the overall trend (@) results was positive for mammary gland tumors in females: adenocarcinoma ($p = 0.0325$), combined adenoma/adenocarcinoma ($p = 0.043$), and combined fibroadenoma/adenoma/adenocarcinoma ($p = 0.018$). The pairwise comparisons test (#) was also positive for the combined fibroadenoma/adenoma/adenocarcinoma in Group 3 and 4 females ($p = 0.0244$ and 0.0282, respectively) and adenoma/adenocarcinoma in Group 4 females ($p = 0.0373$). However, all these tumors are commonly encountered in female rats and their corresponding p-values would only be considered significant for tumors classified as rare (Lin and Rahman, 2018).
[e] Statistical analyses showed statistical significance in the overall trend test (@): hemangioma of the mesenteric lymph node in females. However, the increasing trends for all these tumors were considered incidental and not related to INS1007 administration given the comparable incidence of these findings to the historical control data.

[f] Statistical analyses showed statistical significance in the overall trend test (@): benign thymoma of the thymus in females. However, the increasing trends for all these tumors were considered incidental and not related to INS1007 administration given the comparable incidence of these findings to the historical control data.
[g] Statistical analyses for both the overall trend test (@,*) and pairwise comparisons test (#, in Group 4 females at 30 mg/kg/day only) were significantly positive for endometrial stromal polyp with p = 0.0075 and 0.0284, respectively. However, the incidences of stromal polyps for all treated groups were within the range in the historical control data at 0 to 20%.
Significant difference between groups:

Overall trend Test	@: p ≤0.05 (Significant for rare tumors)
	*: p ≤0.01 (Significant for common and rare tumors)
Pairwise Comparisons	#: p ≤0.05 (Significant for rare tumors)

- = no noteworthy findings; AUC0-24 = area under the concentration versus time curve from the start of dose administration to 24 hours postdose; Cmax = maximum observed concentration measured after dosing; F = female; GLP = good laboratory practice; M = male; N/A = not applicable.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

表 11: 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)							
Species/Strain	**Method of Administration (Vehicle/Formulation)**	**Dosing Period**	**Doses (mg/kg)**	**Number per Group**	**Noteworthy Findings**	**Testing Facility**	**Study Number**
Rat/Han Wistar CRL:WI (Han)	Oral (gavage) (purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide)	Days 6-16 of gestation	0 3[a] 9 50 100	6F	Doses of brensocatib at 100 mg/kg/day administered from Day 6 to 16 of gestation caused minimal maternal toxicity indicated by a slight reduction in maternal food consumption and adverse clinical signs in one female during the last two days of gestation. At 50 and 100 mg/kg/day, there was a slight dosage-related decrease in mean fetal weight.	[redacted] UK	497631
Rabbit/New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage) (purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide)	13 days	0 15 100 150 200	2F	Once daily oral administration of brensocatib to rabbits at 200 mg/kg/day for 13 days was associated with adverse clinical observations, markedly reduced food consumption and body weight loss. Administration at 150 mg/kg/day was associated with reduced food consumption and a slight body weight loss or no body weight gain. There were no gross necropsy findings noted at any dose level. There were no test item-related effects noted in animals administered 15 or 100 mg/kg/day.	[redacted] UK	497610
Rabbit/New Zealand White: HsdIf	Oral (gavage) (purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide)	Days 7-19 of gestation	0 15 50 100 150	6F	Once daily oral administration of brensocatib to pregnant rabbits at 100 or 150 mg/kg/day over Days 7-19 of gestation was not well tolerated and resulted in premature termination due to evidence of abortion and adverse maternal toxicity. Administration at these dose levels was also associated with adverse clinical observations, reduced food and water consumption, body weight loss, and abnormal gross necropsy findings. Administration at 15 or 50 mg/kg/day was associated with some transient reductions in food consumption and an increase in water consumption but had no effect on embryofetal survival or fetal development.	[redacted] UK	497626

[a] Dosed with 3 mg/kg/day on Days 6 to 11 and with 4.5 mg/kg/day on Days 12 to 16.
Notes: Studies 497631 and 497626 contain GLP statements. Study 497610 does not claim GLP compliance.
F = female; GLP = good laboratory practice.

2.6.7.12 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（重要な試験）

表 12: 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（重要な試験）

Test Article: Brensocatib (INS1007)
Male fertility assessments were included in the 6-month toxicity study in rats (See Table 7B). Female fertility assessments were included in the embryofetal toxicity study in rats (See Table 13A).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（重要な試験）

表 13A: 胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Design Similar to ICH 4.1.3? 4.1.1 & 4.1.3 combined	**Duration of Dosing:** Two weeks prior to pairing and up until Day 16 of gestation	**Study Number:** 497825
Species / Strain: Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)	**Day of Mating:** Day 0	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 12-13 weeks (females)	**Day of C-Section:** Day 21	**Testing Facility:** [redacted], UK
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	
Special Features: None.	**Vehicle / Formulation:** purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide	
No-Observed-Adverse-Effect Level: **F_0 Females:** 3 mg/kg/day **F_1 Litters:** 3 mg/kg/day **Fertility:** 100 mg/kg/day		
Conclusion: Once-daily oral administration of brensocatib to female rats prior to mating, during pairing for mating and up to the end of major embryonic organogenesis at dose levels of 3, 20, or 100 mg/kg/day resulted in slight maternal toxicity at 20 or 100 mg/kg/day. There were no adverse effects of brensocatib administration on oestrous cycles, mating performance, fertility, embryofetal survival or fetal weights and there were no major malformations. The minor malformations of bent scapula and wavy ribs were only noted after dosing with 100 mg/kg/day. There was an increased incidence of skeletal variations and differences in ossification after dosing with 20 or 100 mg/kg/day. After dosing with 3 mg/kg/day, there was reduced incidence of ossification in one skull bone only. The NOAEL for maternal toxicity was considered to be 3 mg/kg/day. The NOAEL for effects on oestrous cycles and fertility was 100 mg/kg/day. The NOAEL for embryofetal development was considered to be 3 mg/kg/day.		

表 13A:　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（重要な試験）（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily Dose (mg/kg)	**0**	**3**	**20**	**100**
Dams/does:				
Toxicokinetics [a]: $AUC_{0\text{-}24h}$ (µM*h) Mean C_{max} (µM)		 28.7 2.73	 403 29.3	 1240 84.4
Number pregnant	20	15	20	19
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Clinical observation [b]	-	-	-	+
Necropsy observations	-	-	-	-
Premating body weight (g, %) [c]	231	3	3	4
Premating body weight gain from Day 1 to 15 (g)	15	13	14	16
Gestation body weight (g, %) [c]	327	3	4	4
Gestation body weight gain from Day 0 to 16 (g) [c]	60	2	3	10
Premating food consumption (g/animal/day, %) [c]	16	6	0	0
Gestation food consumption (g/animal/day, %) [c]	24	0	4	13*
Number with oestrous cycles of regular pattern and duration	8	7	13	6
Mean number of corpora lutea	13.3	13.9	14.3	12.7
Mean number of implantations	11.7	13.2	13.8*	11.9
Mean % pre-implantation loss	12.97	6.15	3.40*	5.83

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily Dose (mg/kg)	**0**	**3**	**20**	**100**
Litters:				
Number of litters evaluated	20	15	20	19
Mean number of live fetuses	11.1	12.5	12.9	11.3
Mean number of resorptions	0.6	0.7	0.9	0.6
Number of litters with dead fetuses	0	0	0	0
Mean % post-implantation loss	6.03	5.86	6.82	7.03
Mean fetal body weight (g)	5.06	5.14	5.07	4.99
Mean Fetal sex ratios (% Males)	45.26	47.60	53.10	50.85
Fetal anomalies:	0	0	0	0
Gross external	-	-	-	-
Visceral anomalies	-	-	-	-
Skeletal anomalies (major malformation)	-	-	-	-
Skeletal anomalies (minor malformation and variation) [d]:				
Bent scapulae	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (2)
Wavy ribs-moderate	4 (4)	0 (0)	5 (4)	10 (5)
Wavy ribs- severe	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)
Malpositioned pelvic girdle-bilateral	2 (2)	2 (2)	5 (5)	8 (5)
Malpositioned pelvic girdle-unilateral	2 (2)	2 (1)	5 (5)	7 (5)
Supernumerary ribs:				
Short cervical ribs	4 (4)	5 (4)	10 (10)	18 (9)
Short thoracolumbar ribs- minimal	58 (18)	46 (13)	85 (19)	78 (19)
Short thoracolumbar ribs- moderate	6 (6)	2 (2)	4 (3)	17 (10)
Full thoracolumbar ribs	1 (1)	1 (1)	1 (1)	9 (5)

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily Dose (mg/kg)	**0**	**3**	**20**	**100**
Incomplete ossification of parietal skull bone- minimal	3 (3)	6 (4)	10 (5)	6 (5)
Incomplete ossification of interparietal skull bone- minimal	13 (9)	13 (8)	16 (8)	5 (3)
Unossified vertebrae cervical centrum	16 (11)	21 (9)	20 (9)	29 (15)
Hindpaw phalanges unossified	29 (13)	16 (8)	15 (10)	12 (7)
Forepaw phalanges- less than expected number ossified	5 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Increased ossification of hindlimb calcaneous	40 (14)	42 (13)	45 (16)	50 (16)

[a] No brensocatib was detected in control animals. Toxicokinetic data for 100 mg/kg/day taken from dose range-finding embryofetal development study 497631 in the rat.
[b] The main clinical signs present at 100 mg/kg/day was ploughing, in all females generally beginning on Day 5 of dosing until Day 16 of gestation.
[c] For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
[d] Incidence of fetuses (litters).
Note: Statistically significantly different from control group 1 value: * = $p \leq 0.05$ (Dunnett)
- = No noteworthy findings. $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the concentration-time curve over the last 24-hour interval post dose administration; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration; F_0 = the parental generation; F_1 = offspring of the F_0 parental generation; GLP = good laboratory practice.

表 13B:　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Design Similar to ICH 4.1.3? Yes	**Duration of Dosing:** 13 days (Days 7 to 19 of gestation)	**Study Number:** 497830
Species / Strain: Rabbit / New Zealand White HsdIf	**Day of Mating:** Day 0	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 18-31 weeks (at start of dosing)	**Day of C-Section:** Day 29	**Testing Facility:** [redacted], UK
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	
Special Features: None	**Vehicle/Formulation:** purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide	
No-Observed-Adverse-Effect Level: **F_0 Females:** 5 mg/kg/day **F_1 Litters:** 50 mg/kg/day		
Conclusion: Once-daily oral administration of brensocatib to pregnant rabbits at 15 or 50 mg/kg/day caused slight maternal toxicity indicated by a slight reduction in body weight gain and some transient reductions in food consumption at 50 mg/kg/day only. There was no effect on embryofetal survival or notable effects on fetal development at any dose level. Based on the results of this study the maternal NOAEL was considered to be 5 mg/kg/day. The embryofetal NOAEL was considered to be 50 mg/kg/day.		

表 13B:　生殖発生毒性試験：ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（重要な試験）（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily dose (mg/kg)	**0**	**5**	**15**	**50**
Dams/ does:				
Toxicokinetics[a]: $AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µM*h) C_{max} (µM)	 - -	 15.1 1.93	 44.4 5.39	 195 23.0
Number pregnant	17	18	20	20
Number died or sacrificed moribund	1	0	0	0
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	1
Clinical observation	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight (g, %)[b]	3375.6	6	4	8
Gestation body weight (g, %, Day 7-19) [b]	168.2	-30	-52*	-62**
Gestation food consumption, g/animal/day (%)[b]	84	1	-19	-20
Mean number of corpora lutea	8.9	8.8	8.4	8.8
Mean number of implantations	7.5	8.1	7.7	8.3
Mean % pre-implantation loss	15.6	7.8	10.4	5.8
Litters:				
Number of litters evaluated	16	18	20	19
Number of live fetuses	107	127	135	139
Mean number of resorptions	0.8	1.1	0.9	0.9
Number of litters with dead fetuses	0	0	0	0
Mean % post-implantation loss	11.7	11.6	10.5	13.6
Mean fetal body weight (g)	47.3	44.2	45.0	45.3

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily dose (mg/kg)	**0**	**5**	**15**	**50**
Fetal sex ratios (% Males)	55	54	54	50
Fetal anomalies:				
Gross external	-	-	-	-
Visceral anomalies	-	-	-	-
Skeletal anomalies:				
Pelvic girdle caudal displacement				
Unilateral[c]	3(3)	3(2)	6(6)	8(5)
Bilateral[c]	10(4)	9(4)	17(9)	11(7)
Complete supernumerary rib(s) on 13th thoracic vertebra[c]	16(8)	27(10)	45** (17*)	46 ** (15)

[a] Mean TK on Day 19 of gestation for 0 and 5 mg/kg treatment groups for this study. Toxicokinetic data for 15 and 50 mg/kg/day treatment groups taken from dose range finding embryofetal development study 497626 in the rabbit. Brensocatib was not detected in the control animals.
[b] After the end of the dosing period (Day 19 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).
[c] Incidence of fetuses (litters).
Note:* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ analyzed using Fisher's exact test.
- = No noteworthy findings; $AUC_{0\text{-}t}$ = area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable concentration at timepoint t; C_{max} = maximum (peak) plasma concentration; NOAEL = no observed adverse effect level; TK = toxicokinetics.

2.6.7.14 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（重要な試験）

表 14: 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（重要な試験）

Test Article: Brensocatib (INS1007)		
Design similar to ICH 4.1.2? Yes	**Duration of Dosing:** Gestation Day 6 through Lactation Day 20	**Study Number:** 00335001
Species/Strain: Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	**Day of Mating:** Day 0	**GLP Compliance:** Yes
Initial Age: 10-12 weeks (females)	**Litters Culled/Not Culled:** Culled (PND 4)	**Testing Facility:** [redacted], USA
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral (gavage)	
Special Features: None	**Vehicle / Formulation:** purified water with tartaric acid adjusted to pH 3-4 with sodium hydroxide	
No-Observed-Adverse-Effect Level: **F_0 females:** 20 mg/kg/day **F_1 males and females:** 20 mg/kg/day **F_2 embryonic survival:** 20 mg/kg/day		
Conclusion: Based on the lack of test article-related effects throughout the study, a dosage level of 20 mg/kg/day (the highest dosage level tested) was considered to be the NOAEL for F_0 parental systemic toxicity, F_1 neonatal, developmental, systemic, and reproductive toxicity, and F_2 embryonic survival of brensocatib when administered orally to CRL:WI(Han) rats. This dosage level corresponded to AUC_{0-t} and C_{max} values of 163 µM*h and 14.1 µM, respectively, on Gestation Day 6.		

表 14:　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（重要な試験）（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily dose (mg/kg)	**0**	**3**	**9**	**20**
F_0 Females:				
Toxicokinetics, GD 6: $AUC_{(0-t)}$ (µM*h) Mean C_{max} (µM)	 BLQ BLQ	 12.9 1.45	 101 14.4	 163 14.1
Number evaluated	25	25	25	25
Number pregnant	24	23	24	24
Number died or euthanized in extremis	0	0	0	0
Number with total litter loss	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Gestation body weight (g, %) [a]	290	284 (-2.1)	294 (1.4)	297(2.4)
Lactation body weight (g, %) [a]	274	277 (1.1)	279 (1.8)	279 (1.8)
Gestation food consumption, g/animal/day (GD 6-20)	18	16*	17	17
Lactation food consumption, g/animal/day (LD 1-21)	43	43	44	45
Mean duration of gestation (days)	21.6	21.5	21.4	21.5
Abnormal parturition	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-

表 14:　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（重要な試験）（続き）

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3**	**9**	**20**
F_1 litters (*pre-weaning*):				
Number of litters evaluated	24	22	24	24
Mean number of implantations	9.5	9.8	10.1	10.9
Mean number of pups born/litter	8.9	9.0	9.5	10.1
Mean number liveborn pups/litter	8.8	9.0	9.5	10.1
Postnatal survival to PND 4 (% per litter)	98.0	100.0	98.9	99.3
Postnatal survival PND 4 to weaning (% per litter)	97.9	99.4	99.5	99.3
Pup body weight (g, %) [a]				
Males				
PND 1	7.0	7.1 (1.4)	6.9 (-1.4)	6.8 (-2.9)
PND 21	44.5	44.3 (-0.4)	43.4 (-2.5)	42.8 (-3.8)
Females				
PND 1	6.6	6.6 (0.0)	6.5 (-1.5)	6.5 (-1.5)
PND 21	43.4	42.4 (-2.3)	43.2 (-0.5)	42.0 (-3.2)
Pup sex ratio (% males per litter)	50.0	58.9	52.5	49.8
Pup clinical observations	-	-	-	-
Pup necropsy observations	-	-	-	-
F_1 males (*post-weaning*):				
Number evaluated postweaning	46	44	48	47
Number died or euthanized in extremis	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3**	**9**	**20**
Body weight (g, %) [a]				
PND 21	44	44 (0.0)	44 (0.0)	43 (-2.3)
PND 112	367	366 (-0.3)	393(7.1)	389 (6.0)
Body weight change (g)				
PND 21-84 (premating period)	291	282	299	296
PND 21-112 (entire generation)	322	322	350	347
Mean age at preputial separation (days)	45.1	44.8	44.9	44.7
Startle response	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-
Number of males paired	24	21	24	24
Number of males that mated	24	21	24	24
Number of fertile males	22	20	23	23
Necropsy observations	-	-	-	-

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3**	**9**	**20**
F_1 females (*post-weaning*):				
Number evaluated postweaning	46	40	47	48
Number died or euthanized in extremis	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Premating body weight (g, %) [a]				
PND 21	43	42 (-2.3)	43 (0.0)	42 (-2.3)
PND 84	215	208 (-3.3)	215(0.0)	210 (-2.3)
Gestation body weight (g, %) [a, b]	277	266 (-4.0)	275 (-0.7)	267 (-3.6)
Mean age at vaginal patency (days)	31.9	32.5	32.4	33.3
Startle response	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-
Estrous cycle length (days)	4.0	4.0	4.0	4.0
Mean precoital interval (days)	2.3	2.6	2.1	2.8
Number of females paired	24	21	24	24
Number of females that mated	24	21	24	24
Number pregnant	22	20	23	23
Necropsy observations	-	-	-	-
Mean number of corpora lutea	13.4	13.6	14.2	13.6
Mean number of implantations	12.4	12.6	13.3	12.4
Mean % of pre-implantation loss	7.9	7.0	6.3	8.3

Test Article: Brensocatib (INS1007)				
Daily dose (mg/kg)	**0 (Vehicle)**	**3**	**9**	**20**
F_2 litters:				
Number of litters evaluated	22	19	22	23
Mean number of live conceptuses/litter	11.9	11.6	12.7	11.8
Mean number of resorptions	0.5	1.0	0.6	0.6
Mean number dead conceptuses	0.0	0.0	0.0	0.0
Mean % post-implantation loss	3.4	8.2	4.5	5.1

[a] 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).
[b] At the end of premating, gestation, or lactation.
- = Note: Dunnett's Test; * $p \leq 0.05$.
- = No noteworthy findings; BLQ = below the limit of quantification; GD = gestation day; LD = lactation day; PND = Postnatal day.

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

表 15: 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

Test Article: Brensocatib (INS1007)
Studies in juvenile animals were not conducted based on the intended age range of the patient population and the findings in adult animals in repeat-dose general toxicity studies.

2.6.7.16 局所刺激性試験

表 16: 局所刺激性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)
Local tolerance (gastrointestinal tract) was evaluated by histopathological assessments in the repeat-dose toxicology studies in rats and dogs following oral administration by gavage.

2.6.7.17 その他の毒性試験

表 17A: 不純物（不純物F*）：*In Silico* carcinogenic potency categorization approach（非 GLP）

Approach	**Noteworthy Findings**	**Study Number**
In silico carcinogenic potency categorization approach (CPCA)	Following the CPCA methodology, a Potency Score of 2 has been calculated for Impurity F* based on an [redacted] ([redacted]) [redacted] ([redacted]). Therefore, the nitrosamine impurity Impurity F*was placed in Potency Category [redacted] with an associated [redacted] of [redacted] ng/day [redacted].	EQR-6850-142.01
Quantum mechanical assessment	Impurity F*is considered a [redacted] compound with a predicted [redacted] ([redacted]) > [redacted] mg/kg ([redacted]), which corresponds to [redacted] > [redacted] µg/day. Impurity F* is considered [redacted] that can be controlled at levels higher than [redacted] µg/day.	VV-NC-001334

表 17B:　遺伝毒性：*Salmonella typhimurium* 及び *Escherichia coli* を用いた *In Vitro* Ames 試験

Test Article: Impurity F*			
Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells		**Number of Independent Assays:** 3	**Study Number:** STURS24AA0598-1
Strains: *S. typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537,) and *E. coli* (WP2 *uvrA* [pKM101])		**Number of Replicate Cultures:** 3 for Test Article and Controls	**GLP Compliance:** Yes
Metabolizing System: Phenobarbital and β-naphthoflavone-induced rat S9, phenobarbital and β-naphthoflavone-induced hamster S9, 30%		**Number of Cells Analyzed/Culture:** Not applicable	**Testing Facility:** [redacted], Germany
Vehicles:	**For Test Article:** DMSO; **For Positive Controls:** DMSO (4-nitro-o-phenylene-diamine, 2-aminoanthracene, N-nitrosodiethylamine, and 1-cyclopentyl-4-nitrosopiperazine) and water (methylmethanesulfonate and sodium azide)		
Treatment: Pre-incubation			**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects. Cytotoxic effects of the test item were noted at concentrations of 316 µg/plate and higher. Precipitation of the test item was also observed in all tester strains at 10 µg/plate and higher.			
Genotoxic Effects: None			

※新薬承認情報提供時に置き換え

表 17B:　遺伝毒性：Salmonella typhimurium 及び Escherichia coli を用いた In Vitro Ames 試験（続き）

Test Article: Impurity F*							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate)**	**Revertant colony counts, Mean (SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
Without activation	Water	100 µL/plate	17 (2.9)	123 (35.7)	7 (5.0)	5 (1.2)	134 (29.7)
	DMSO	50 µL/plate	24 (4.3)	142 (4.5)	4 (1.2)	4 (1.2)	123 (1.2)
	Impurity F*	1	25 (3.4)		6 (0.5)		
		3.16	18 (2.1)	87 (0.8)	6 (0.5)	4 (2.1)	80 (0.8)
		10	18 (4.2)	89 (1.2)	5 (2.4)	4 (1.2)	100 (7.1)
		31.6	22 (4.5) P	95 (3.9) P	6 (0.8) P	4 (1.9) P	122 (3.7) P
		100	18 (2.5) P	89 (6.1) P	5 (1.2) P	6 (2.9) P	130 (14.7) P
		316	24 (3.7) P	88 (5.4) P	9 (4.2) P	1 (0.5) P	140 (5.6) P
		1000	18 (5.0) P	100 (10.0) P	2 (0.5) BP	4 (2.1) P	114 (15.6) P
		2500	25 (5.0) P	168 (2.5) P	3 (0.8) BP		83 (35.6) P
		5000	24 (2.1) BP	126 (7.6) P	2 (0.9) BPnA		92 (11.8) P
	NaN_3	10		767 (36.8)	326 (103.8)		
	MMS	1.0 uL/plate					2296 (83.1)
	4-NOPD	10	452 (27.4)				
		40				159 (12.5)	

Test Article: Impurity F*							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate)**	**Revertant colony counts, Mean (SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
With Rat S9, 30%	Water	100 µL/plate	33 (5.6)	84 (4.7)	7 (2.1)	9 (0.9)	158 (24.5)
	DMSO	50 µL/plate	36 (5.0)	76 (5.2)	7 (0.0)	15 (3.9)	155 (36.0)
	Impurity F*	0.316	39 (2.5)	88 (6.5)		19 (7.3)	
		1	36 (3.9)	126 (0.9)		15 (0.0)	
		3.16	33 (8.4)	129 (41.7)	11 (2.2)	16 (5.0)	130 (31.8)
		10	45 (2.4)	85 (7.7)	9 (4.1)	10 (0.9)	176 (11.6)
		31.6	36 (4.9) P	63 (17.9)	11 (3.6) P	9 (0.5) P	161 (6.5) P
		100	38 (11.1) P	122 (11.3) P	7 (0.8) P	14 (3.7) P	193 (8.5) P
		316	37 (4.5) P	102 (1.4) BP	8 (4.5) P	16 (2.6) BP	117 (10.4) P
		1000	36 (8.3) P	77 (6.0) BP	9 (2.1) P	16 (2.2) BP	139 (15.5) P
		2500			PnA		PnA
		5000			PnA		PnA

※新薬承認情報提供時に置き換え

Test Article: Impurity F*							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate)**	**Revertant colony counts, Mean (SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
	NDEA	2500	53 (3.1)	107 (5.9)	11 (1.2)	7 (4.2)	1099 (551.2)
	CPNP	500	37 (5.0)	230 (14.4)	45 (12.5)	8 (2.5)	136 (9.2)
	2-AA	2.5	427 (15.6)	412 (125.1)	24 (2.1)	92 (31.6)	
		10					362 (82.1)

※新薬承認情報提供時に置き換え

Test Article: Impurity F*							
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/plate)**	**Revertant colony counts, Mean (SD)**				
			TA98	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**WP2 *uvrA* (pKM101)**
With S9, 30%	Water	100 µL/plate	40 (6.2)	136 (4.0)	6 (1.7)	17 (1.4)	134 (2.4)
	DMSO	50 µL/plate	33 (3.9)	123 (6.1)	5 (1.2)	21 (7.6)	109 (13.0)
	Impurity F*	0.316	40 (5.9)				
		1	37 (2.9)	120 (15.4)	7 (2.1)	18 (4.2)	92 (8.6)
		3.16	45 (3.4)	121 (5.6)	10 (1.4)	14 (0.8)	120 (8.3)
		10	25 (16.7)	134 (10.3) P	9 (5.0) P	15 (2.8) P	114 (12.1) P
		31.6	47 (6.0)	143 (2.2) P	6 (2.4) P	17 (3.1) P	139 (13.5) P
		100	38 (1.7)	131 (4.5) P	6 (0.9) P	18 (11.1) P	135 (20.4) P
		316	46 (4.5) BP	142 (3.3) P	7 (1.4) P	27 (4.5) P	142 (0.5) P
		1000	40 (3.4) BP	134 (2.1) P	4 (0.9) P	13 (4.5) P	133 (11.8) P
		2500		138 (17.9) P	6 (1.7) P	6 (0.9) P	151 (29.4) P
		5000		157 (26.9) P	6 (3.4) P	8 (1.4) P	139 (3.3) P
	NDEA	2500	70 (15.6)	241 (6.5)	54 (20.0)	23 (9.1)	568 (89.6)
	CPNP	500	47 (6.2)	924 (59.8)	2149 (208.9)	19 (5.4)	232 (45.9)
	2-AA	2.5	584 (86.8)	577 (42.2)	36 (0.9)	64 (6.6)	
		10					952 (21.7)

Test Article: Impurity F*				
Test Article	**Concentration (µg/plate)**	**Revertant colony counts in TA1535, Mean (SD)**		
		Without S9	**With Rat S9, 30%**	**With Hamster S9, 30%**
Water	100 µL/plate	12 (3.1)	11 (4.2)	11 (2.9)
DMSO	50 µL/plate	6 (2.2)	17 (3.8)	6 (1.2)
Impurity F*	1			11 (4.0)
	3			8 (2.8)
	3.16	9 (3.7)	12 (4.6)	
	6			7 (3.9)
	9			9 (2.2)
	10	12 (2.4)	9 (4.1)	
	15			7 (4.9)
	30			11 (1.7)
	31.6	8 (2.9) P	8 (2.6) P	
	100	8 (0.8) P	8 (2.2) P	
	250	9 (4.3) P	7 (1.7) P	
	500	8 (2.5) P	7 (2.1) P	
	750	8 (1.6) P	10 (3.9) P	
NDEA	2500		20 (3.3)	14 (4.8)
	5000			54 (18.0)
CPNP	500		83 (18.4)	679 (131.0)
NaN_3	10	994 (23.6)		
2-AA	2.5		110 (11.3)	41 (7.1)

2-AA = 2-aminoanthracene; B = Background lawn reduced; CPNP = 1-Cyclopentyl-4-nitrosopiperazine; DMSO = Dimethyl sulfoxide; MMS = Methyl methanesulfonate; nA = Not analysable; NaN_3 = Sodium azide; NDEA = N-Nitrosodiethylamine; 4-NOPD = 4-nitro-o-phenylene-diamine; P = Precipitation; SD = Standard deviation.

※新薬承認情報提供時に置き換え

表 17C:　遺伝毒性：*In vitro* L5178Y TK+/- マウスリンパ腫アッセイ

Test Article: Impurity F*			
Test for Induction of: Gene mutation and chromosome aberrations		**Number of Independent Assays:** 1	**Study Number:** STUGC24AA2299-2
Strains: L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2C		**Number of Replicate Cultures:** 2	**GLP Compliance:** Yes
Metabolizing System: Phenobarbital and β-naphthoflavone-induce rat liver S9, 5%		**Number of Cells Analyzed/Culture:** 1 x 10^7 (4-hour treatment) 5 x 10^6 (24-hour treatment)	**Testing Facility:** [redacted], Germany
Vehicles:	**For Test Article:** DMSO; **For Positive Controls:** DMSO (Benzo[a]pyrene), cell culture medium (Ethyl methanesulfonate), and 0.9% NaCl (Methyl methanesulfonate)		
Treatment: Microwell fluctuation assay, 4 hours in the presence and absence of S9 and 24 hours in the absence of S9			**Date of Treatment:** [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: The selection of the concentrations was based on precipitation of the dissolved test item, which was noted under 4-hour – S9 treatment conditions at 0.00313 mg/mL and above, in under 4-hour + S9 treatment conditions at 0.00625 mg/mL and above, and under 24-hour – S9 treatment conditions at 0.025 mg/mL and above, at the end of the treatment period.			
Genotoxic Effects: No biologically relevant increases in mutant frequency			

※新薬承認情報提供時に置き換え

表 17C:　遺伝毒性：*In vitro* L5178Y TK+/- マウスリンパ腫アッセイ（続き）

Test Article: Impurity F*					
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**4-hour Treatment**		
			RCE (%)	**RTG (%)**	**MF (mutants/10^6 cells)**
Without Activation	Cell Culture Medium	0	98	105	57
		0	91	82	
	DMSO	0	100	100	56
		0			
	Impurity F*	0.39	88	82	40
		0.78	85	61	40
		1.56	92	58	57
		3.13 P	85	88	44
	EMS	300	66	54	490
	MMS	10	57	30	383
With Activation	Cell Culture Medium	0	83	94	67
		0	83	74	
	DMSO	0	100	100	60
		0			
	Impurity F*	0.78	91	96	80
		1.56	82	78	67
		3.13	98	97	57
		6.25 P	76	74	61
	B[a]P	2.5	88	72	363
		3.5	97	64	371

※新薬承認情報提供時に置き換え

Test Article: N-nitroso-brensocatib					
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration (µg/mL)**	**24-hour Treatment**		
			RCE (%)	**RTG (%)**	**MF (mutants/10^6 cells)**
Without Activation	Cell Culture Medium	0	118	146	54
		0	134	144	
	DMSO	0	100	100	61
		0			
	Impurity F*	3.13	98	88	39
		6.25	109	96	51
		12.5	93	71	45
		25 P	91	53	62
	EMS	200	73	44	1978
	MMS	8	70	38	832

B[a]P = Benzo[a]pyrene; DMSO = Dimethyl sulfoxide; EMS = Ethyl methanesulfonate; MF = Mutant frequency; MMS = Methyl methanesulfonate; P = Precipitation; RCE = Relative cloning efficiency; RTG = Relative total growth.

表 17D:　不純物（不純物F*）：*In vitro* 代謝アッセイ（非 GLP）

Test Article: Impurity F*		
Study Number: 8547044	**Testing Facility:** [redacted] USA	**Test Systems:** pooled human liver microsomes (HLM); phenobarbital (PB)- or β-naphthoflavone (BN)-induced rat liver S9
Analytical method: Liquid chromatography with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS)	**Incubation conditions:** HLM (0.5 mg/mL) or rat liver S9 (1 mg/mL) incubated up to 60 minutes with 5 µM N-nitroso-brensocatib, brensocatib or nitroso-morpholine, with or without NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form)	

Metabolite/ Compound	**Proposed Identification**	**Percent of Total Peak Area following a 60-minute Incubation with Impurity F***					
		HLM	**PB-Induced S9**	**BN-Induced S9**	**HLM (0 minute)**	**HLM (-NADPH)**	**No Matrix**
Met-1	*N, O*-Desalkyl-brensocatib[a]	18.1	11.7	5.02	ND	ND	ND
Met-2	Dioxy-brensocatib[a]	1.37	2.47	1.03	ND	ND	ND
Met-3	Dioxy-brensocatib[a]	0.765	1.32	0.603	ND	ND	ND
Met-4	Oxy-brensocatib[a]	11.4	5.82	2.55	ND	ND	ND
Met-5	*O*-Dealkyl-dioxepane-brensocatib	0.806	0.767	0.240	ND	ND	ND
Met-6	Oxy-didehydro-brensocatib	0.441	0.677	0.126	ND	ND	ND
Met-8	Oxy-dioxepane-brensocatib	1.11	1.73	0.383	ND	ND	ND
Met-9	Dioxy-dioxepane-brensocatib	0.382	0.605	0.255	ND	ND	ND
Met-10	Oxy-dioxepane-brensocatib	1.11	1.36	0.585	ND	ND	ND
Met-11	Oxy-didehydro-brensocatib[a]	2.78	9.07	4.46	ND	ND	ND
Met-12	Dioxepane-brensocatib	0.656	1.43	0.693	ND	ND	ND
Met-13	Dioxepane-brensocatib	0.428	1.22	1.03	ND	ND	ND
Met-14	Dioxepane-brensocatib	4.50	2.95	2.53	ND	ND	ND
Brensocatib	Brensocatib[a]	15.2	15.2	14.8	13.8	14.7	13.6
Impurity F*	Impurity F*	41.0	43.7	65.8	86.2	85.3	86.4

※新薬承認情報提供時に置き換え

Conclusion: All metabolites observed in HLM incubations were also observed in rat liver S9, and at levels within 2-fold of the levels observed in phenobarbital-induced rat S9.

[a] Also observed in incubations with brensocatib.
ND = not detected.

表 17E:　その他の毒性試験

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Antigenicity:	No studies were conducted.							
Immunotoxicity:	No dedicated studies were conducted as a weight of evidence assessment in accordance with ICH S8 did not reveal a concern for immunotoxic effects.							
Mechanistic Studies:	No studies were conducted.							
Dependence:	No studies were conducted as a comprehensive assessment of nonclinical and clinical data did not reveal a concern for dependence.							
Metabolites:	No studies were conducted.							
Impurities:	Impurity [redacted] was spiked into the brensocatib formulations in the 9-month dog study (Study No. 505523).							
Phototoxicity:	**Species/Strain**	**Method of Administration**	**Duration of Dosing**	**Doses (µg/mL or mg/kg)**	**Gender and Number Per Group**	**Noteworthy Findings**	**Testing Facility**	**Study Number**
	Balb/c 3T3 mouse fibroblasts	In vitro Evaluation of phototoxicity using the Neutral Red Uptake Assay	Not applicable	1.78-100 (µg/mL)	Not applicable	Not phototoxic	[redacted], USA	20059176
Electron Microscopy:	Rat/Han Wistar CRL:WI(Han)	Oral (gavage)	28 days	0, 100 (lung and kidney) (mg/kg/day)	Lung: 1M/1F control, 2M at 100 mg/kg/day Kidney: 2M/2F control and at 100 mg/kg/day	Lung: Increased lysosomal accumulation of definitive whorls of membrane remnant material of alveolar macrophages, consistent with phospholipidosis. Kidney: low-grade degenerative changes of mitochondrial swelling, increased luminal debris, and cytoplasmic vacuolation or cytosolic rarefaction.	[redacted], US	EM 14.352

Test Article: Brensocatib (INS1007)								
Electron Microscopy:	Dog/Beagle	Oral (gavage)	28 days	0, 75 (lung) (mg/kg/day)	Lung: 1M/1F control and 2F 75 mg/kg/day	Alveolar macrophage aggregation, increased lysosomal accumulation of membrane remnant material, consistent with phospholipidosis.	[redacted], US	EM 14.353

F = female; M = male.