

薬生薬審発 0129 第 8 号  
令和 3 年 1 月 29 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長  
（ 公 印 省 略 ）

### 「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」について

医薬品の製造（輸入）承認申請に際し提出すべき資料の収集のために行われる非臨床安全性試験に関し、生殖発生毒性評価については、「医薬品の製造（輸入）承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて」（平成元年 9 月 11 日薬審 1 第 24 号厚生省薬務局審査第一課長・審査第二課長・生物製剤課長通知。以下「旧課長通知」という。）別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」（3）「生殖・発生毒性試験」により取り扱ってきたところです。今般、医薬品規制調和国際会議（以下「ICH」という。）における合意に基づき、新たに「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」（以下「新ガイドライン」という。）を別添のとおり定めましたので、下記事項を御了知の上、貴管内関係者に対し周知方御配慮願います。

なお、本通知の適用に伴い旧課長通知別添「医薬品毒性試験法ガイドライン」（3）「生殖・発生毒性試験」は廃止します。

### 記

#### 1. 背景

優れた医薬品の国際的な研究開発の促進及び患者への迅速な提供を図るため、承認審査資料の国際的な調和を図る必要性が指摘されている。このような要請に応えるため、ICH における合意に基づき、近年の科学の進歩及び経験を

踏まえて、新ガイドラインが定められた。

## 2. 新ガイドラインの要点

動物実験の 3R（使用動物数の削減／苦痛の軽減／代替試験法の利用）の原則に従って、生殖発生毒性評価に関する見直しを行い、基本的な考え方（一般原則、ガイドラインの適用範囲、生殖発生毒性評価に関する一般的考慮事項、哺乳類を用いた *in vivo* 試験のデザインと評価、試験系の選択、用量設定・投与経路・投与スケジュール、データの報告及び統計、リスク評価の原則など）をガイドライン本文に、哺乳類を用いた *in vivo* 試験のデザインや代替試験法の詳細を附属書に掲載した。

## 3. 今後の取扱い

医薬品製造販売承認申請に際し、本ガイドラインに基づいて作成された資料を、この通知の通知日より、添付すべき生殖発生毒性試験に関する資料とすることができるものとする。

## 医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン

## 目次

略語一覧.....	3
1 緒言及び一般原則.....	4
1.1 試験の目的.....	4
2 ガイドラインの適用範囲.....	5
3 生殖毒性評価に関する一般的考慮事項.....	5
3.1 対象患者集団／適応症に関する考慮事項.....	6
3.2 薬理学的考慮事項.....	6
3.3 毒性に関する考慮事項.....	6
3.4 実施時期に関する考慮事項.....	7
3.5 トキシコキネティクス (TK).....	7
4 哺乳類を用いた <i>in vivo</i> 試験のデザインと評価.....	7
4.1 受胎能及び初期胚発生 (FEED) に関する戦略.....	8
4.1.1 バイオ医薬品に関する考慮事項.....	8
4.2 胚・胎児発生 (EFD) に関する戦略.....	9
4.2.1 バイオ医薬品に関する考慮事項.....	9
4.2.2 EFD リスクに対処するための代替アプローチ.....	10
4.2.2.1 代替法の利用.....	10
4.2.3 総合的試験戦略の一環として <i>in vivo</i> 本試験を延期することが可能なアプローチ.....	10
4.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能 (PPND) に関する戦略.....	11
4.3.1 バイオ医薬品に関する考慮事項.....	11
5 試験系の選択.....	12
5.1 通常の試験動物種.....	12
5.1.1 生殖発生毒性試験の動物種の選択.....	12
5.1.2 予防用及び治療用ワクチンのための動物種選択.....	12
5.2 通常用いられない動物種.....	13
5.3 病態モデル動物、遺伝子改変動物及びサロゲート分子の使用.....	13
6 用量設定、投与経路及び投与スケジュール.....	13
6.1 用量設定.....	14
6.1.1 毒性に基づく用量設定指標.....	14
6.1.2 全身曝露の飽和に関する用量設定指標.....	14
6.1.3 曝露マージンに基づく用量設定指標.....	14
6.1.3.1 バイオ医薬品における曝露量に基づくアプローチ.....	15
6.1.4 投与可能な最大用量 (MFD) に基づく用量設定指標.....	15
6.1.5 限界量に基づく用量設定指標.....	15
6.1.6 高用量以外の用量設定.....	15
6.2 投与経路.....	16

6.3	投与スケジュール .....	16
6.4	ワクチンの用量設定及び試験デザイン .....	16
7	げっ歯類を用いた組合せによる試験計画法 .....	17
8	データの報告及び統計 .....	18
8.1	データの報告 .....	18
8.2	統計 .....	18
9	リスク評価の原則 .....	18
10	注釈 .....	20
11	用語 .....	21
12	参考文献 .....	22
附属書1	<i>In vivo</i> 試験デザイン .....	23
1.1	<i>In vivo</i> 試験デザインに関する考慮事項 .....	25
1.1.1	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (FEED 試験) .....	26
1.1.2	胚・胎児発生に関する試験 (EFD 試験) .....	28
1.1.2.1	EFD 試験のための用量設定試験 .....	28
1.1.2.2	予備的な胚・胎児発生に関する試験 (pEFD 試験) .....	28
1.1.2.3	EFD 本試験 .....	28
1.1.3	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 (PPND 試験) .....	30
1.1.3.1	ヒト以外の霊長類 (NHP) を用いた ePPND 試験 .....	32
1.1.4	組合せ試験 .....	33
1.1.4.1	FEED 試験と EFD 試験 .....	33
1.1.4.2	雄動物の受胎能と反復投与毒性試験 .....	33
附属書2	代替法 .....	34
1.1	MEFL の予測のための代替法の適格性確認 .....	34
1.2	代替法を用いる EFD 試験戦略の例 .....	36
1.2.1	総合的試験戦略の一環として <i>in vivo</i> 試験を延期することが可能なアプローチ .....	36
1.2.2	胚・胎児に対して毒性物質であると考えられる医薬品 .....	36
1.2.3	身体機能を著しく損なう又は生命を脅かす疾患の治療を目的とした医薬品 .....	37
1.2.4	高齢期発症疾患の治療を目的とした医薬品 .....	38
1.3	対照物質リスト .....	39
1.3.1	陽性対照物質 .....	42
1.3.2	陰性対照物質 .....	116

## 略語一覧

AUC:	Area Under the Curve	血中濃度-時間曲線下面積
C <sub>max</sub> :	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
C <sub>min</sub> :	Minimum plasma concentration	最低血漿中濃度
DART:	Developmental and Reproductive Toxicity	生殖発生毒性
DRF:	Dose Range Finding	用量設定
EFD:	Embryo-Fetal Development	胚・胎児発生試験
ePPND:	Enhanced Pre- and Postnatal Developmental	ePPND 試験
FEED:	Fertility and Early Embryonic Developmental	受胎能及び初期胚発生
GD:	Gestation Day	妊娠日齢
GI:	Gastrointestinal	胃腸管
GLP:	Good Laboratory Practices	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH:	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IV:	Intravenous	静脈内
LOAEL:	Lowest Observed Adverse Effect Level	最小毒性量
LLO:	Late Life Onset	高齢期発症
MOA:	Mechanism of Action	作用機序
MEFL:	Malformation or Embryo-Fetal Lethality	形態異常又は胚・胎児致死性
MFD:	Maximum Feasible Dose	投与可能な最大用量
MRHD:	Maximum Recommended Human Dose	最大推奨臨床用量
NHP:	Non-Human Primate	ヒト以外の霊長類
NOAEL:	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
PD:	Pharmacodynamic	薬力学
pEFD:	Preliminary Embryo-Fetal Development	予備的胚・胎児発生試験
PK:	Pharmacokinetic	薬物動態
PND:	Postnatal Day	出生後日数
PPND:	Pre- and Postnatal Developmental	出生前及び出生後の発生
SDLT:	Severely Debilitating or Life-Threatening	身体機能を著しく損なう又は生命を脅かす疾患
TK:	Toxicokinetic	トキシコキネティクス
WOCBP:	Women of Child Bearing Potential	妊娠可能な女性

## 1 緒言及び一般原則

本ガイドラインの目的は、医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請に必要とされる生殖発生毒性の評価に関する国際標準を推奨し、調和を促進することである。本ガイドラインでは、リスクを特定、評価及び伝達する上で利用可能なデータを補完するためにとり得る戦略及び試験計画を記載する。さらに、試験データを解釈する際に検討すべき概念や推奨事項も提供する。

本ガイドラインは、1993年に発出された ICH ガイドライン「S5 Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products」（医薬品の生殖発生毒性試験）の改定版である。本改定版では、他の ICH ガイドラインとの整合をとるとともに、用量設定における曝露マージンの利用について詳述し、リスク評価に関する項を設け、さらに適用範囲を拡大してワクチン及びバイオテクノロジー応用医薬品（以下、「バイオ医薬品」）も対象とする。また、代替試験法（以下、「代替法」）に関する適格性確認や使用可能なシナリオについて記載し、生殖発生毒性試験の延期に関する選択肢も提供する。

医薬品の生殖発生への影響を評価するためには、一般的に、医薬品及び適切な場合はその代謝物（ICH M3 (1)、ICH S6 (2)）の曝露による生殖発生全ステージへの潜在的影響に関する情報を利用することができる。どのようなガイドラインにおいても、起こりうるすべての事例をカバーするために十分な情報は提供できないため、試験戦略には柔軟性が必要である。

### 1.1 試験の目的

生殖発生毒性試験の目的は、ヒトでのリスク評価に資する情報となる哺乳類の生殖発生に対する医薬品の影響を明らかにすることである。曝露による即時的及び遅発的な作用を検出するためには、必要に応じて、一連の試験で完全なライフサイクル（即ち、受精から次世代の受精までの期間）を通じて観察すべきである。一般的には以下の生殖発生ステージでの評価が実施される。

- A) 交尾前～受精（成熟雌雄動物の生殖機能、配偶子の発生及び成熟、交尾行動、受精）
- B) 受精～着床（成熟雌動物の生殖機能、着床前発生、着床）
- C) 着床～硬口蓋閉鎖（成熟雌動物の生殖機能、胚発生、主要な器官の形成）
- D) 硬口蓋閉鎖～妊娠終了（成熟雌動物の生殖機能、胎児の発生と成長、器官の発生と発達）
- E) 出生～離乳（分娩と授乳、新生児の子宮外生存への適応、離乳前の発生と成長）
- F) 離乳～性成熟（離乳後の発生と成長、自立生存への適応、性成熟の開始と完全な性機能の確立、次世代への影響）

対象集団に関連しない生殖発生ステージを除き、全てのステージにおけるリスクを評価すべきである。各試験でカバーする生殖発生ステージは申請者の判断に委ねられるが、医薬品開発に

おける試験の実施時期については、対象集団や薬剤の開発段階に依存する（ICH M3、ICH S6及びICH S9 (3)参照）。

## 2 ガイドラインの適用範囲

本ガイドラインは、バイオ医薬品、感染症ワクチン（及び、ワクチンに含まれる新規構成成分）を含むすべての医薬品、及び新添加剤に適用される。なお、本ガイドラインでは、「医薬品」という用語を、これらすべての治療モダリティを含むものとして使用する。本ガイドラインは、細胞加工製品及び遺伝子治療用製品には適用されない。本ガイドラインで概説する方法論の原則（試験計画、用量設定及び動物種選択など）は、生殖発生毒性試験の実施が適切なすべての化合物に適用される。生殖発生毒性試験の要否及び実施時期を検討するにあたっては、本ガイドラインと ICH M3、ICH S6及び ICH S9を参照すべきである。

## 3 生殖毒性評価に関する一般的考慮事項

開発中のほとんどの医薬品については、いくつかの例外がありうるものの、上述した全ての生殖発生ステージを評価すべきである。臨床開発を進めるためには、一般的に以下の3種類の *in vivo* 試験を用いて生殖発生ステージの評価が行われている：1) 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（FEED 試験）（ステージ A～B）、2) 2種の動物種を用いた胚・胎児発生に関する試験（EFD 試験）（ステージ C～D）、及び3) 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（PPND 試験）（ステージ C～F）。化合物ごとに評価する生殖発生ステージを決定し、実施すべき最も適切な試験を特定すべきである。生殖発生への影響を評価するにあたり、総合的に試験戦略を構築する上で考慮すべき重要な事項を以下に示す。

- 対象患者集団及び使用条件（特に生殖能力及び疾患の重篤度との関連性）
- 医薬品の剤型と臨床適用経路
- 毒性（*in vitro*、*ex vivo* 及び非哺乳類を用いた試験、並びに構造活性相関も含む）、薬力学、薬物動態及び他の医薬品との薬理学的類似性に関連するデータ
- 医薬品の標的に関する生物学的特性や生殖発生における既知の役割

上記の考慮すべき事項については、本ガイドライン中で詳細に言及している。

総合的なリスク評価を損なわない範囲で、動物の使用を最小限に抑える試験戦略をとるべきである。そのアプローチとしては、一般的なデザインの試験を組み合わせた試験の実施（7項参照）や、適切に適格性を確認された代替法（附属書2参照）を用いたリスク評価がある。第III相臨床試験前に開発が断念される医薬品も多いことから、ICH M3に示されるように、検討中の臨床試験をサポートする試験（妊娠可能な女性を組み入れるための胚・胎児発生毒性データなど）を適切な時期に実施することで、動物の使用を減らすことが可能である。

生殖発生毒性試験はリスク評価に利用されることから、原則として GLP に従って実施すべきである。しかしながら、非 GLP 試験において適切な生殖発生毒性リスクが明らかになった場合には、当該知見を確認するために GLP 試験を繰り返す必要はない。適切なリスクとは、臨床での曝露量又はそれに近い曝露量で生じるものであり、疑いなくヒトへ外挿できる事象である（9項参照）。試験の種類や状況によっては、特別な試験系や試験方法を用いた試験については、必ずしも GLP 下での実施が求められない場合がある。しかし、このような場合でも、科学的に質の高い水準を適用すべきであり、データの収集記録を容易に確認できるようにすべきである。また、GLP に準拠しない部分を試験報告書で特定するとともに、それによる試験の結果／データの解釈が安全性評価全体に及ぼす影響を考慮すべきである。

### 3.1 対象患者集団／適応症に関する考慮事項

対象患者集団や適応症によって、生殖発生毒性試験の実施範囲が影響されることがある。対象集団において、生殖発生毒性が医薬品のリスク評価にほとんど影響を及ぼすことがないと考えられる疾患の場合、生殖発生全ステージを評価する試験は必要ない。例えば、閉経後の女性のみを対象とする患者集団、小児や思春期前の若年集団、妊娠の可能性を排除することができる入院環境の患者集団を対象とする場合には、全ステージをカバーする試験は必ずしも必要ではない。

### 3.2 薬理学的考慮事項

試験戦略を検討する前に、まず医薬品の意図する薬理作用が、受胎能、正常な胚・胎児発生、あるいは特定のエンドポイントの評価に適さないこと（例えば、全身麻酔剤における交尾行動の評価など）を確認すべきである。当該評価においては、同様の薬理作用を持つ他の医薬品のデータ、標的に関する既知の作用、あるいはヒトの遺伝性疾患に関連する知見が根拠になりうる。例えば、早産を防ぐために開発されている医薬品では、PPND 試験のデザインを修正することが適切となる。意図する薬理作用が試験のエンドポイントにおいて適切でない場合、その根拠を示した上で、特定の生殖に関するエンドポイントの評価は必要ではない。

### 3.3 毒性に関する考慮事項

性成熟に達した動物を用いた反復投与毒性試験では、生殖器毒性に関する重要な情報が得られる場合があり、生殖発生毒性試験のデザインに影響を及ぼす可能性がある。化合物に関する既存の毒性データを考察する際には、用量段階、トキシコキネティクスに関するプロファイル、投与期間を常に考慮すべきである。例えば、精巣に影響を与える化合物では、標準的な受胎能試験のデザインを改変して、投与期間や同居開始時期を変更することができる。



### 3.4 実施時期に関する考慮事項

生殖発生毒性試験の実施時期については、ICH M3、ICH S6及びICH S9に一般的なガイダンスが記載されている。特定の生殖発生毒性を評価する時期は、臨床試験又は対象患者集団において、当該医薬品を安全に使用するために、関連するデータが必要か否かを踏まえて検討すべきである。その結果、特定の生殖発生ステージへの影響を評価する時期を変更することが適切となる場合がある。その他の選択肢については4.2.2項及び4.2.3項で述べる。

### 3.5 トキシコキネティクス (TK)

曝露データは生殖発生毒性試験（用量設定試験又は本試験）、あるいは反復投与毒性試験のいずれかで得ることができる。しかしながら、妊娠によってTKパラメータに意味のある変化が生じる可能性があることから、妊娠によって曝露量が変わるかどうかなを確認することが推奨される。用量設定が曝露量比に基づく場合（6.1.3項参照）、妊娠動物におけるTKデータはGLP下で得ることが望ましい。サンプリング時期については、その適切性を示すべきである。

生殖発生ハザードに関する矛盾点や不確かな試験データを解釈する上で、胚又は胎児の薬物濃度に関する情報が有用な場合もある。その場合には、別試験で実際の曝露量を測定することも可能である。しかしながら、その結果をヒト胎児における推定薬物濃度と直接比較することは適切ではない。

乳汁移行の確認が必要な場合、乳汁又は離乳前の出生児における曝露量から確認することができる

TKデータの収集に関する一般的な考え方については、ICH S3A (4)に記載されている。

## 4 哺乳類を用いた *in vivo* 試験のデザインと評価

医薬品の潜在的な生殖発生毒性リスクを評価するための戦略には、一般に、1種以上の *in vivo* 試験が含まれる。一部の動物種（ヒト以外の霊長類（以下、「NHP」）など）では実施不可能であるが、全体としては、生殖発生全ステージを網羅して評価することが重要である。ほとんどの医薬品では、通常、三試験計画法が適切となろうが、特定の製品ニーズに対応し、また使用動物数を削減するためには、これらの試験デザインを様々に組み合わせることも可能である。FEED 試験、EFD 試験及びPPND 試験の詳細、又はそれらの組合せによる試験については附属書1を参照のこと。各試験でカバーする生殖発生ステージは申請者の判断に委ねられる。医薬品に関して入手し得るすべての薬理学的データ、トキシコキネティクス及び毒性学的データを考慮して、どの試験デザインを選択すべきか判断しなければならない。

## 4.1 受胎能及び初期胚発生 (FEED) に関する戦略

FEED 試験の目的は、雄動物及び雌動物において交配前から交尾、着床に至るまでの投与による有害作用を検討することである。これは生殖発生ステージ A~B の評価となる。試験期間が短く、すべての有害作用を明らかにするには不十分な場合もあるが、少なくとも2週間の投与期間による反復投与毒性試験の成績を利用することで、用量設定試験を別途実施することなく、受胎能試験をデザインすることができる場合も多い。

対象集団への曝露を許容する上で、FEED 試験が必要とされる場合には、ほとんどの場合、交配による評価が求められる。このような試験は一般的にげっ歯類を用いて行われる。受胎能に対する有害作用が予測されない場合、同一の試験で雌雄ともに投与を行い、交配させることができる。当該試験で受胎能に対する影響が認められた場合には、どちらの性が被験物質の投与により影響を受けたかを明らかにすべきである。一方、作用機序や反復投与試験の結果から有害作用が予測される場合は、片性の動物のみに投与し無処置の動物と交配させることができる。この試験は、1つの FEED 試験の中で異なる投与群を用いても、2つの異なる試験で実施することも可能である。受胎能及び初期胚発生に対する有害作用の回復性は、リスク評価に重要な影響を与え得る。

げっ歯類を用いた FEED 試験デザイン (附属書1参照) では、雌動物で性周期、卵管内輸送、着床、着床前段階の胚発生に及ぼす影響を検出することができる。性周期を評価する際には、被験物質投与に関連した影響と動物間/個体内のばらつきを区別するために、性周期のベースラインデータ (最低2~3サイクル) を取得することが重要である。性周期観察は交尾確認まで継続すべきである。

同居前2~4週間に投与されたげっ歯類を用いた FEED 試験デザインでは、雄動物で精子形成及び精巣上体内精子輸送に対する影響を検出することができる。反復投与試験のデータから精巣に対する毒性が示唆される場合は、交配前の投与期間を10週間に延長することが適切な場合もある。これにより、精巣上体内精子輸送に加えて、すべての精子形成期間に対する影響が評価可能となる。FEED 試験では、雄動物の生殖器における病理組織学的検査では検出されない機能的な影響 (交尾行動、精巣上体内の精子成熟、射精など) も検出できる。

被験物質の作用機序や既存の試験データに基づく懸念がある場合には、受胎能に対する影響をより特徴づけるため、反復投与試験や受胎能試験で追加の検査 (精子数及び形態/運動性評価のための精子の採取、ホルモンレベルの測定、性周期観察など) を実施することができる。

### 4.1.1 バイオ医薬品に関する考慮事項

げっ歯類又はウサギにおいて薬理的活性を有するバイオ医薬品の場合は、これらの動物種のいずれかを用いた FEED 試験が推奨される。通常イヌや NHP などの非げっ歯類を用いて交配による評価を行うことは現実的ではない。例えば、NHP が薬理的に適切な唯一の動物種である場合 (多くのモノクローナル抗体の場合など、ICH S6参照) には、少なくとも3カ月間の反復投

与毒性試験で得られた生殖器の病理組織学的検査を受胎能の評価の代わりとして使用することができる。この際には、雌雄両方の生殖器の包括的な病理組織学的検査を含めるべきである（注1）。進行がんの治療を目的としたバイオ医薬品では FEED 試験は必要とされないが、それ以外のバイオ医薬品では、生殖器の適切な評価を行うため、動物は試験開始時に性成熟に達しているべきである。これらの病理組織学的検査データは、生殖組織の構造に関する情報を提供するだけで受胎能の機能的評価はできないことから、必ずしも病理組織学的評価の結果だけで受胎能及び初期胚発生に対する影響を予測することが可能とは限らない。

## 4.2 胚・胎児発生（EFD）に関する戦略

EFD 試験の目的は、胎児器官形成期（ステージC）の妊娠雌動物に投与し、母動物及び胚・胎児の発生への有害作用を検出することである。EFD 試験には、胎児の発生及び生存に関する評価が含まれる（ステージC～D）。

ほとんどの低分子化合物では、通常、EFD に対する影響の評価は2種の動物種（げっ歯類及び非げっ歯類 [通常はウサギ]）を用いて実施される。試験動物種のうち少なくとも1種は、意図する薬力学的反応を示す動物種を用いるべきである。通常用いられる試験動物種（5.1項参照）のいずれにおいても、薬力学的に活性を示さない医薬品の場合には、通常用いられない動物種（5.2項参照）、遺伝子改変動物（5.3項参照）、種特異的なサロゲート分子（5.3項参照）（オリゴヌクレオチドの場合など）の使用を検討することができるが、その際には、薬理的に適切なモデルの特性評価が十分に行われていることが前提となる。通常、遺伝子改変動物とサロゲート分子は、ハザードの特定には最も有用であるが、リスク評価に使用する場合は限界がある。適切なモデルがない場合、正常であれ病的状態であれ、薬理的な標的がヒトにしか発現していない場合などであっても、オフターゲット作用や副次的薬理作用による毒性を検出するため、2種の動物種を用いた EFD 試験を実施すべきである。

最大推奨臨床用量（Maximum Recommended Human Dose : MRHD）における推定臨床曝露量と同程度の曝露量で、形態異常や胚・胎児致死性（Malformations or Embryo-Fetal Lethality : MEFL）の誘発に関する明らかに陽性の結果が得られれば、開発している医薬品のリスク評価は当該動物種1種で十分と考えられる。

限定された条件下では、EFD 本試験の代わりに他のアプローチを用いることもできる（附属書2参照）。あるいは、EFD 試験を実施しなくても、リスクを伝えるにあたり適切な情報が得られる場合もある。意図する薬理作用による EFD への有害作用を示唆するエビデンス（作用機序、遺伝子改変動物の表現型など）があれば、リスクを伝えるには十分な可能性がある。

### 4.2.1 バイオ医薬品に関する考慮事項

バイオ医薬品の EFD への影響は、2種の動物種（げっ歯類1種及び非げっ歯類1種）がいずれも薬理的に適切であれば、通常、2種の動物種を用いて評価すべきである。しかしながら、げっ歯

類は薬理学的に適切でない場合が多く、その場合には、薬理学的に適切な1種類の非げっ歯類のみを用いて EFD を評価することが可能である。適切な動物種が唯一 NHP の場合には、EFD 試験の代わりに、ePPND 試験を実施することもできる。進行がんの治療を目的としたバイオ医薬品は、通常、薬理学的に適切な動物種1種を用いて評価するだけでよい（ICH S9参照）。

生殖発生毒性試験に適したいずれの動物種を用いても、ヒトの標的分子と相同な配列を有する分子（オーソログ）にバイオ医薬品が相互作用せず、適切な動物種が特定できない場合には、ICH S6に記載されているように、サロゲート分子や遺伝子改変動物の使用を検討することが可能である。サロゲート分子を用いて臨床曝露量に対する安全域を算出することは適切ではない。適切な動物種、遺伝子改変動物又はサロゲート分子が利用できない場合には、*in vivo* 生殖発生毒性試験の実施意義はない。その場合は、リスク評価に使用したアプローチ、又は試験を実施しないことの適切性を説明すべきである。

#### 4.2.2 EFD リスクに対処するための代替アプローチ

##### 4.2.2.1 代替法の利用

胚・胎児発生に対する潜在的ハザードを検出するために、*in vitro*、*ex vivo* や非哺乳類を用いた *in vivo* などのいくつかの代替法が開発されている。これらの代替法は EFD に対する有害作用に関する創薬スクリーニングに使用され、毒性メカニズムの理解を深める一助となっており、（特にヒト特異的な標的について）非臨床データをヒトでのリスクに外挿する上で役立つ場合もある。これらの目的で代替法を継続的に利用することが推奨される。

適格性が確認された場合、その代替法は、従来の *in vivo* 試験の実施を延期又は（特定の状況において）代替する可能性がある。これには、使用動物数を削減できる可能性があるという更なる利点もある。代替法の適格性を確認する際に考慮すべき事項や、代替法の利用が適切なシナリオの例を附属書2に示す。代替法を取り入れたアプローチは、ヒトでの安全性を担保するにあたり、上述した現行試験の枠組みと比較して、少なくとも同等の信頼度を有するべきである。本文書作成時点での科学の進捗を考えると、規制当局の受入れを目的とする場合、段階的なアプローチや組合せによるアプローチの中で、複数の代替法が使用されることが想定される。各代替法の化学的な適用領域、及び代替法の対象となる生物学的メカニズムの特性評価によって使用の範囲が定められ、試験戦略の適格性（当局の受入れの可能性）は、各々の適用範囲内で判断される。

#### 4.2.3 総合的試験戦略の一環として *in vivo* 本試験を延期することが可能なアプローチ

適切な試験戦略は、科学的根拠の重み付け（Weight-of-Evidence）の積み重ねにより成り立つ。ICH M3では、2種の動物において予備的な胚・胎児発生（Preliminary EFD : pEFD）毒性データが得られている場合、EFD 本試験を実施する前であっても、妊娠可能な女性（Women of Childbearing Potential : WOCBP）を限定的（最大150人の WOCBP を最長3カ月）に臨床試験に組

み入れることが可能とされている。これらの考慮事項を踏まえ、本ガイドラインでは ICH M3を拡大し、第III相臨床試験の前に WOCBP を臨床試験に組み入れることが許容されうる2つの追加的オプションを以下に記載する。

- 1) 1種の動物種における結果を予測する適格性が確認された代替法（附属書2参照）を、第二の動物種の pEFD 試験データと組み合わせることで、WOCBP を限定的（最大150人の WOCBP を最長3カ月）に臨床試験に組み入れることを可能とする。その場合、通常、代替法と第二の動物種の pEFD 試験データによって、げっ歯類と非げっ歯類の両方の動物種を評価されることになる。
- 2) 薬理的に適切な動物種を用いてエンドポイントを追加し（特に、1群あたりの評価可能な同腹児数を増やし、胎児の骨格検査を含める）、GLP 下で実施した少なくとも1つの pEFD 試験が利用可能な場合、第二の動物種を用いた pEFD 試験と組み合わせることにより、すべての地域において、第II相までの臨床試験に組み入れる WOCBP の人数に制限を設けないことが可能となる。

#### 4.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能（PPND）に関する戦略

PPND 試験の目的は、着床から離乳までの間、母動物に曝露したときの有害作用を検出し、妊娠中あるいは授乳中の雌動物及び児の発生に対する影響を評価することである。この期間における有害作用は遅発性の場合があることから、児の発達は性成熟完了まで評価する（ステージC～F）。PPND 試験には通常、げっ歯類が用いられるが、必要に応じて、他の動物種も利用可能である（附属書1参照）。

ほとんどの場合、それまでに実施した他の試験結果から必要な情報が入手できることから、予備的（用量設定）PPND 試験は必要とされない。しかしながら、出生児を離乳前あるいは離乳時まで観察する予備的PPND 試験によって、用量設定、試験デザインのための情報、あるいは出生児の曝露データが得られることもある。

小児用医薬品の開発にあたり、改変された PPND や ePPND 試験デザインを検討している場合は、ICH S11 (5)を参照すること。

##### 4.3.1 バイオ医薬品に関する考慮事項

NHP のみで評価可能な医薬品に関しては、ePPND 試験により限定的な出生後評価が可能であるが、出生児を成熟までの期間を通して評価することは現実的ではない（附属書1及び ICH S6参照）。

## 5 試験系の選択

### 5.1 通常の試験動物種

生殖発生毒性の検出には哺乳類を使用すべきである。先行して実施された毒性試験と同じ動物種・系統を使用することにより、追加の動物使用、薬物動態や代謝の特徴づけ、及び用量設定のための追加試験を避けることができる。使用する動物種は、特性が明確になっており、特定の試験のエンドポイント（健康状態、受胎能、繁殖能、形態異常及び胚・胎児死亡の自然発生率など）に対する影響を検出するのに適したものを選ぶべきである。

#### 5.1.1 生殖発生毒性試験の動物種を選択

ラットは一般的に生殖発生毒性試験に適しており、実用的で薬理学的にもよく理解されていること、非臨床所見を解釈する上で広範な毒性データが利用可能であること、さらに背景データが多く存在することなどの理由により、げっ歯類で最もよく使用されている。同様の理由で、マウスもげっ歯類としてよく使用される。

EFD 試験では、例外はあるものの（ワクチンやバイオ医薬品など、5.1.2項及び5.2項参照）、第二の動物種として、通常、非げっ歯類を用いた試験が行われる。ウサギは、げっ歯類では検出できなかったヒト催奇形性物質の特定に役立つことが明らかになっており、豊富な背景データ、動物の入手しやすさ及び実用性から、通常、非げっ歯類として使用される。

#### 5.1.2 予防用及び治療用ワクチンのための動物種選択

ワクチンの非臨床試験に用いられる動物種は、（アジュバントの有無によらず）ワクチンに対して免疫反応を示さなければならない。実施する生殖発生毒性試験の種類及び動物種を選択については、観察される免疫反応と適切な投与量の投与可否に基づいて適切性が示されるべきである。通常、ワクチンの生殖発生毒性試験にはウサギ、ラット及びマウスが使用される。免疫反応には質的及び量的な種差（液性免疫及び細胞性免疫など）が存在する可能性があるが、通常、1種の動物種を用いた生殖発生毒性試験の実施で十分である。母体抗体の胎盤通過の程度及び経時的変化は動物種により異なるものの、ウサギ、ラット又はマウスを用いた生殖発生毒性試験を実施することで、ワクチン構成成分／製剤における潜在的な胚・胎児毒性や妊娠中の安全性に関する重要な情報が得られる。NHP の使用については、免疫反応を示す適切な動物種が他にない場合に限るべきである。

適切な動物モデル（NHP を含む）がない場合でも、ウサギ、ラット又はマウスを用いた EFD 試験を実施することで、ワクチン構成成分／製剤における潜在的な胚・胎児毒性や妊娠中の安全性に関する重要な情報が得られる。

## 5.2 通常用いられない動物種

様々な生殖ステージに対する医薬品の影響を評価する上で、ラット、マウス及びウサギ以外の動物種を用いることができる。他の動物種の使用を検討する際には、被験物質、試験デザインと選択したエンドポイント、試験結果の臨床への外挿性の観点から、利点と欠点（附属書1、表1参照）を考慮すべきである。

NHP は通常用いられない試験動物種と考えるべきである。ICH S6に記載されているとおり、霊長類でのみ薬理学的活性を有するバイオ医薬品では、胚・胎児発生及び出生後早期の発達に対する影響の評価に通常、NHP が用いられる。ただし、NHP を用いて生殖発生毒性リスクを評価する際には、制約のあるエンドポイントがあることにも考慮する。（附属書1及び ICH S6参照）。

## 5.3 病態モデル動物、遺伝子改変動物及びサロゲート分子の使用

意図する薬理作用が生殖発生に及ぼす影響を調べる際には、病態モデル動物、遺伝子改変動物及びサロゲート分子が有用な場合がある。病態モデル動物を用いた試験は、正常動物から得られたデータでは誤解を生じる場合や、病態モデル動物以外では臨床での病態生理に適用できない場合に有用である。当該モデルは、評価しようとする生殖発生エンドポイントに対して薬理学的に適切なものであるべきである。また、そのモデルにおける病態生理の経時的変化も明らかにすべきである。ヒトの病態生理との差異が認められる場合であっても、データの解釈に混乱を生じる懸念が高くなければ、その使用を除外するものではない。動物間のばらつきを明確にした上で、試験の背景を踏まえて、当該データを適切に取り扱うべきである。背景データが限られる場合は、データの解釈を裏付けるために、エンドポイントに関する文献等のデータを利用するか、試験実施期間中に当該情報を取得すべきである。

遺伝子改変動物は、生殖発生毒性パラメータに対する医薬品のオンターゲット作用に関する情報を得るために利用可能である。これらのモデルから、標的の生物学的特性が通常の試験動物種における生殖発生への有害作用と密接に関連するかどうかに関する情報が得られる。

通常の試験動物種において、医薬品が標的に対して十分な活性を示さない場合には、生殖発生への潜在的な有害作用を評価するために、サロゲート分子を用いることが可能である。

## 6 用量設定、投与経路及び投与スケジュール

生殖発生毒性試験での用量、投与スケジュール及び投与経路は、試験デザインを検討する上で重要な事項であり、入手可能なあらゆる情報（薬理作用、反復投与毒性、薬物動態、用量設定試験など）に基づいて設定すべきである。低分子及びバイオ医薬品の用量設定の原則に関するガイダンスは、それぞれ ICH M3及び ICH S6に示されている。試験系における忍容性に関する十分な情報が入手できない場合には、用量設定試験を実施することが望ましい。

## 6.1 用量設定

生殖発生毒性試験には、数多くの利用可能な用量設定指標がある。本項で検討するすべての用量設定指標は、試験デザインの観点からはいずれも適切と考えられる。本試験での高用量は、6.1.1項から6.1.5項に記載する設定根拠の1つ以上を満たすことが想定される用量とすべきである。用量設定は、それまでの試験（反復投与試験、TK試験、用量設定試験など）で観察された影響を考慮して行うべきである。リスク評価に必要な情報を得るにあたり、3用量より少ない用量段階でも十分な場合もある。

以下に述べる用量設定指標を用いない場合でも、高用量選択の適切性はケースバイケースで示すことが可能である。

### 6.1.1 毒性に基づく用量設定指標

毒性に基づく用量設定指標は、高用量群の親動物における、ごく軽度の毒性の発現に基づいて決定される。先行して実施された試験から決定される高用量の規定要因を以下に示すが、これらに限定されるものではない。

- 体重変化（変化量又は絶対値；増加・減少）。一過性のわずかな体重増加量又は体重の変化は、用量設定の根拠として適切ではない。体重変化の影響を評価する際には、試験における投与期間全体を考慮すべきである。
- 過剰な薬理作用（過度な鎮静や低血糖など）
- 毒性学的反応（けいれん、著しく高い胚・胎児死亡率、臨床病理学的な変動など）。計画した生殖発生毒性試験の評価に影響を及ぼす可能性がある特定の標的臓器毒性。

### 6.1.2 全身曝露の飽和に関する用量設定指標

投与薬物に関連する物質の全身性利用率（アベイラビリティ）を測定し、全身曝露の飽和によって高用量設定の適切性を示すことは可能である。用量を増加させたとしても、未変化体又は代謝物の血漿中濃度が上昇しない場合には、用量を増加する意義はない。

### 6.1.3 曝露マージンに基づく用量設定指標

MRHD における曝露量に対して予測される曝露マージンを示すことで、用量設定の適切性を示すことは可能である。低分子の場合、MRHD における AUC 又は  $C_{max}$  を十分に上回る全身曝露が得られるのであれば、高用量設定において曝露量を用量設定指標とすることは可能である。妊娠動物における曝露量が、MRHD における曝露量の25倍を超えるのであれば、通常、生殖発生毒性試験における最大用量として適切である（注2）。25倍の曝露マージンは、GLP に準拠した用量設定試験/pEFD 試験又は本試験で確定すべきである。通常、当該曝露マージンは未変化体に基づいて計算するが、ヒトでの主要な代謝物についても十分な曝露マージンを確保すること



を検討すべきである（ICH M3及びICH M3 Q&A 参照）。プロドラッグにおいて、特に未変化体に対する活性代謝物の曝露量の比率がヒトと比べて低い試験動物種の場合、活性代謝物に基づいて曝露マージンを確定することがより適切である。当該曝露量の比較においては、未変化体又は代謝物を選択した根拠を示すべきである。

MRHD における曝露量の25倍を超える曝露でのみ、試験動物種において薬力学的活性がみられる医薬品では、過度な薬理作用の有害作用を評価する目的で、より高用量での評価が求められる場合があるが、リスク評価をする上で不適切なオフターゲット作用が発現しやすい。

曝露量に基づくエンドポイントを EFD 試験における用量設定の根拠とする場合には、GLP 試験における妊娠動物の TK データが求められる。当該曝露量として、結合型と非結合型を合わせた曝露量と非結合型の曝露量のいずれを選択するかについては適切性を示すべきであり、ICH S3A に概説されているとおり、非臨床開発プログラム全体との整合性がなければならない。

#### 6.1.3.1 バイオ医薬品における曝露量に基づくアプローチ

ICH S6に示されている通り、曝露量に基づくマージンを示すことにより、バイオ医薬品の用量設定の適切性を示すことが可能である。一般に、非臨床試験に用いる動物種において意図する薬理作用が最大となる用量、あるいは MRHD での曝露量の10倍程度の曝露が得られる用量のいずれか高い方とすべきである。標的結合親和性の種差及びその他の関連要因による用量調節については ICH S6を参照のこと。

#### 6.1.4 投与可能な最大用量（MFD）に基づく用量設定指標

投与経路／投与頻度、及び試験動物種の解剖学的／生理学的特性に関連した原薬（又は製剤）の物理化学的特性によって、投与可能な医薬品の用量が制限される場合には、MFDを高用量の設定に用いることが可能である。ICH M3 Q&A (1)に示されている通り、MFDを用いて高用量を設定する際には、投与量を最大にするよりも、試験動物種での曝露が最大となるよう設定すべきである。なお、1日あたりの可能な総曝露量を増やすために、投与頻度の変更を検討することもできる（6.3項参照）。

#### 6.1.5 限界量に基づく用量設定指標

1 g/kg/日未満の用量段階で、高用量設定のための要素が満たされない場合、一般に限界量として1 g/kg/日を適用することができる（その他の考慮事項については ICH M3参照）。

#### 6.1.6 高用量以外の用量設定

生殖発生毒性に関しては、通常、無毒性量（NOAEL）を求めることが望ましい。高用量以外の用量設定では、曝露量、薬理作用及び毒性所見を考慮して、適切な場合、所見の用量反応が見られるようにすべきである。低用量は MRHD における曝露の数倍（1～5倍など）となる用量と

すべきである。ヒトにおける治療域よりも低い曝露の用量を設定する場合は、その適切性を示すべきである。

## 6.2 投与経路

投与経路は、通常、ヒトでの予定適用経路とすべきである。ただし、ヒトでの予定適用経路で十分な曝露が得られない場合や、ヒトでの予定適用経路が使用できない場合は、別の経路を検討すべきである。ヒトで複数の投与経路が検討される場合には、すべての臨床適用経路での全身曝露に対して十分な全身曝露が得られ、かつ、代謝物が十分にカバーされるのであれば、当該動物種に関しては単一の投与経路で十分である。

## 6.3 投与スケジュール

毒性試験における投与スケジュールは、曝露プロファイルを決定するため、リスク評価において重要になる。多くの場合はヒトでの投与スケジュールと同様にすれば十分であるが、頻度を増減させることが適切な場合もある。例えば、試験動物種において速やかに代謝される化合物では1日2回投与が求められることがあるが、より高い頻度の投与スケジュールが想定される場合は、実際的な要素（試験の実行性、動物へのストレスなど）を考慮すべきである。また、試験で評価する生殖発生の重要なステージのすべてにおいて、十分な曝露が得られることを確実にするために、投与スケジュールを変更することも重要である。

## 6.4 ワクチンの用量設定及び試験デザイン

本ガイドラインは、感染症に対する予防又は治療に用いられるワクチン（アジュバントの有無を問わない）にも適用される。本ガイドラインの適用範囲には含まれないが、その他の適応症（がんなど）に対するワクチンにおける非臨床試験にも、本ガイドラインの原則を適用可能である。

予防又は治療用ワクチンの生殖発生毒性試験の種類は、ワクチンの対象集団及び関連する生殖発生リスクによって決まる。一般的に、新生児、思春期前の小児又は高齢者を対象に開発されているワクチンについては、生殖発生毒性試験は必要とされない。

ワクチンの生殖発生毒性試験では、通常、臨床での投与経路を用いて、動物で免疫反応を惹起することができる単一用量で評価すれば十分である（5.1.2項）。この用量は、体重換算をしないヒトでの最大用量（すなわち、ヒトでの1回投与量＝動物での1回投与量）とすべきである。投与できる容量の限界又は用量制限毒性（局所又は全身）により、動物にヒトでの最大用量を投与することができない場合、体重換算（mg/kg）を用いて、ヒトの体重換算用量を上回る用量を選択することが可能である。ヒトでの1回投与量より少ない用量を用いる場合には、ヒトでの1回投与量を動物に投与できない根拠を示すべきである。

ワクチンの投与計画は、母動物での抗体価や胚・胎児及び出生後早期にわたる免疫反応を最大化すべきである。投与のタイミングや投与回数は、ワクチンごとの免疫反応発現までの時間又は継続時間によって決まる。妊娠中に投与するワクチンを開発する場合には、目的とする用途（妊婦や出生後早期の出生児の予防など）に基づいて、具体的な試験デザインの適切性を示すべきである。

連日投与では、ワクチンの構成成分の過剰な曝露になる場合がある。妊娠動物に対しては、連日投与よりも間歇投与が推奨される。また、間歇投与のほうが、感染症を適応とする多くの予防及び治療用ワクチンに関して、予定している臨床での免疫スケジュールに近いものとなる。通常の試験動物種における妊娠期間が短いことを考慮し、妊娠中の胎児に影響を及ぼしやすい時期（すなわち器官形成期）に十分な免疫反応が得られているよう、交配の数日前あるいは数週間前に動物に初回免疫投与を実施することが通常推奨される。投与計画はヒトで予定される接種スケジュールに従って変更できる。

器官形成期の初期に少なくとも1回は投与を実施すべきである。これはワクチン製剤の構成成分による直接的な胚毒性への影響を評価するとともに、残りの妊娠期間を通じて高い抗体価を維持するためである。もし胚・胎児毒性が認められれば、所定の複数時点において投与される動物のサブグループを用いて、さらに評価してもよい。

ワクチンに新規活性構成成分（新規アジュバントなど）が含まれる場合、非ワクチン製品の試験と同様な追加の評価方法を検討することが適切であろう。

## 7 げっ歯類を用いた組合せによる試験計画法

ほとんどの医薬品開発では、三試験計画法（FEED 試験 [ステージ A~B]、EFD 試験 [ステージ C~D] 及び PPND 試験 [ステージ C~F]）が用いられてきたが、使用動物数を削減する目的で、これらの試験デザインを様々に組み合わせることも可能である。組合せによる試験計画法の主な利点は、より少数の動物を用いて、関連するすべての生殖発生ステージを評価できることである。また、特に半減期の長い医薬品では、臨床での曝露期間に近い曝露を実現することができる。広く用いられている組合せによる試験計画法として、受胎能試験と EFD 試験を統合した試験（ステージ A~D）に個別の PPND 試験（ステージ C~F）を組み合わせるものがある。

FEED 試験、EFD 試験、PPND 試験、あるいはそれらを統合した試験のデザイン及び試験の詳細については、附属書1を参照のこと。

雌雄の受胎能への影響が懸念されない場合、あるいは反復投与毒性試験において生殖器に毒性が確認され、投与期間を延長することが適切と考えられる場合には、反復投与毒性試験と FEED 試験を組み合わせた試験デザインを考慮してもよい。反復投与毒性試験で規定された投与期間を満了した後、雄動物を性成熟に達した雌動物（無処置又は交配前に2週間以上投与されたもの）と交配することも可能である。この組合せによる試験では使用動物数を削減できるが、各群の

交配数を16以上とすべきである。交配前に2週間以上投与された雌動物への投与を、更に器官形成期終了まで延長して、EFDのエンドポイントを評価できるようにすることも可能である（附属書1）。

## 8 データの報告及び統計

### 8.1 データの報告

試験に用いたすべての動物の成績を説明できるように、明確かつ簡潔に個々の値を表に示すべきである。データの表は、個々の動物とその受胎産物を、試験開始から試験終了まで容易に追跡できるものとするべきである。

胎児の形態学的異常所見は、業界で統一された用語を用いて記述すべきである。各同腹児のすべての所見を受胎産物別に明確に記載すべきである。異常所見を種類別に要約した一覧表を作成すべきである。妊娠していなかった動物のデータが要約表に含まれているか否かを明記すべきである。

試験データの解釈は、主に同試験内の対照群との比較によって行われる。データ解釈の補助として、背景データを使用することができる。実施施設で得られた最近の背景データが望ましい。一般に直近の5年間のデータが望ましく、このようなデータであれば遺伝的浮動を確認することが可能である。

### 8.2 統計

本試験では、投与群と対照群の間の有意差を評価する統計的検定が求められる。生殖発生毒性試験のデータセットの多くは正規分布に従わないため、ノンパラメトリックな統計手法を用いる必要がある。帝王切開、胎児及び出生後のデータの要約統計量は、同腹児を解析単位として算出すべきである。統計学的有意差がある場合に必ずしも毒性学的な意義があるとは限らず、統計学的有意差がない場合でも必ずしも影響がないとも限らない。生物学的妥当性の判断には、入手可能なすべての薬理的及び毒性学的データが有用であることも多い。

## 9 リスク評価の原則

これまでの項で述べたように、臨床試験及び製造販売承認後において、使用条件下でのヒトにおける潜在的な生殖発生リスクに対処するにあたっては、当該医薬品、関連化合物、ヒト遺伝学から得られた入手可能なデータ、及び当該医薬品の標的分子がもつヒトの生殖における役割に関する知識をすべて利用すべきである。制限事項（試験系の適切性、最大曝露量など）、不確実性、非臨床における生殖発生毒性データパッケージ内のデータの相違点については、いずれもその影響を評価すべきである。一般的に、十分な曝露量下で適切な動物種を用いて実施さ

れた *in vivo* 本試験の結果は、代替法や予備試験から得られる結果よりも重視される。随時新たな情報が得られるため、リスク評価は製品の開発期間を通じて継続的に行われる。

生殖発生毒性試験で報告されるすべての所見が有害というわけではない。所見が有害だと思われる場合は、科学的根拠の重み付けにより、いくつかの要素を検討しながらリスク評価すべきである。これには、曝露マージン、生物学的妥当性、用量反応関係、回復性、用量を制限するような親動物毒性の可能性及び動物種間での一致が含まれる。稀な形態異常が認められた場合、用量相関性がないとしても、必ずしも懸念が低くなるとは限らない。

試験動物種の NOAEL における薬物曝露量と MRHD における薬物曝露量の比較は、リスク評価において重要である。この比較は最も適切な指標（AUC、 $C_{max}$ 、 $C_{min}$ 、体表面積換算した用量など）に基づいて行うべきである。一般的に、NOAEL での曝露量が MRHD での曝露量の10倍未満である場合には懸念は増大し、10倍を超える場合には減少する。通常、MRHD における曝露量の25倍を超える曝露量でのみ生じる影響は、医薬品の臨床使用において懸念は小さい。他に適切な根拠がない限り、通常、最も感受性の高い動物種における曝露マージンを指標とする。生物学的妥当性の評価は、薬理学的作用機序と生殖発生における標的分子の既知の役割との比較によって行う。薬理作用の結果と解釈できる所見は、ヒトにとって懸念となることが示唆され、発現率又は重篤度の増加に用量相関性があれば因果関係はより明確になる。ある所見が生物学的に妥当と判断されない場合でも、明らかな用量反応関係がある場合には、オフターゲット毒性は否定できない。

回復性の有無によって、リスク評価の方法は変わる。例えば、投与中止後に回復するような雄動物と雌動物の受胎能に対する影響は、懸念が小さい。一方、死亡や形態異常などの重大で回復性のない発生に関わるエンドポイントは、懸念が大きい。その他の発生毒性（発育遅延、機能障害など）の回復性は所見次第である。一般的に、一過性の所見（げっ歯類における波状肋骨のような骨格変異など）は、単独で発現する場合には懸念が小さい。同様に、胎児体重の減少と共に生じた発育遅延も懸念が小さい。しかしながら、変異所見の発生頻度が全体的に増加（質的な類似性の有無を問わず）した場合には、明確な形態異常所見の増加がなくても、異常形態発生の懸念を示唆する可能性がある。

所見の重要性を判断する上では、親動物に対する毒性による影響を考慮すべきである。母動物の毒性が発現した状況下で認められた胚・胎児毒性は、ヒトへの外挿性の有無を慎重に判断すべきである。特に、同腹児ごとの所見とその母動物毒性の重篤度が一致しているかの評価が有用となりうる。発生毒性が母動物毒性による二次的な影響であると判断するには、それらの関連性を自ら実証するか、関連する公表文献から示す必要がある。

また、報告された所見に関する試験間又は動物種間での一致性も有害作用の懸念を強める。試験間での一致の例としては、げっ歯類を用いた EFD 試験で胎児致死の増加が認められ、かつ PPND 試験で生存児数の減少が認められる場合が挙げられる。動物種間での一致の例としては、ラットとウサギにおける着床後胚損失の増加の所見が挙げられる。各動物種の試験で特定された生殖発生への影響の機序に関する詳細な知見は、動物種間の反応性の違いを説明するのに役

立ち、ヒトへの外挿性に関する情報となる（マウスにおけるコルチコステロイド誘発性の口蓋裂など）。

授乳に関して特に実施するリスク評価は、*in vivo* 分娩試験（PPND 又は ePPND）により特定されたハザードに基づいて行う。これらのハザードには、乳汁中への薬物の分泌に起因する出生児の成長と発達に対する有害作用が含まれる。分娩試験で出生児の全身曝露データが得られた場合には、ヒト乳児で推定される授乳による曝露と比較することができる。乳汁の成分は動物種間で異なるため、動物の乳汁中薬物濃度をヒトの乳汁中薬物濃度と直接定量的に相関させることはできないが、動物の乳汁中に薬物が存在することは、一般に、ヒトの乳汁中にも薬物が存在することを示す。

最後に、利用可能なヒトでのデータは、ヒトの生殖発生リスクの総合的評価に影響を及ぼし得る。

## 10 注釈

**注1：**特に精巣と精巣上体は、精上皮の組織構造を維持できる方法を用いて採取及び処理すべきである。精子形成期間を考慮した詳細で定性的な病理組織学的検査は、精子形成に対する影響を検出する感度の高い方法である。通常必要とされないが、追加のエンドポイント（免疫組織化学検査、ホモジナイズ後の精子細胞数、フローサイトメトリー、ステージの定量的解析など）を試験デザインに組み入れ、認められた影響の特性をより明らかにすることができる。雌動物では、卵巣（卵胞、黄体、線維性間質細胞、間質腺細胞及び血管系を含む）、子宮、及び膣の詳細で定性的な病理組織学的検査を、生殖サイクル及び原始卵胞と一次卵胞の存在を考慮して実施すべきである。

**注2：**ヒトに対する催奇形性物質として既知あるいは推定される22の化合物を解析したところ、MEFL が認められたケースでは、少なくとも1種の動物種において、最小毒性量（LOAEL）での曝露量が MRHD での曝露量の6倍未満であった（Andrews et al. (6)）。このことは、EFD 試験での高用量選択の際に、25倍を超える曝露量比を用いればこれらすべての医薬品に対する催奇形性のハザードを十分検出できることを示している。本解析では、動物で MEFL が検出されたヒト催奇形性物質に関して、少なくとも1種の動物種における NOAEL での曝露量が MRHD での曝露量の4倍未満であったことも示された。

さらに IQ DruSafe リーダーシップグループにより EFD 試験に関する調査が行われた（Andrews et al. (7)）。この調査から、例えば、用量を制限するような母動物毒性が発現しない条件下において、ヒト（想定される治療用量での曝露量）に対して動物での未変化体の曝露量比が15倍以上に達していた EFD 本試験は、ラットで153件、ウサギで128件であったことが明らかとなった。これらのデータによると、母動物毒性が認められない場合（認められれば高用量投与は制限される）、ヒト曝露量の25倍以上の曝露量を達成するよう動物へ投与しても、MEFL は稀にしか認められない。これらすべての場合において、MEFL は50倍を超える曝露量まで認められず、この

ような高曝露量での所見がヒトでのリスク評価に適しているとは考えられない。そのため、用量を制限するような母動物毒性が発現しない場合、EFD及びPPND試験の高用量として、MRHDでの総未変化体濃度におけるヒト血中曝露量に対する曝露量比が25倍を超える用量とすることは理にかなっており、ヒトのリスク評価に適した結果を検出するのに十分であると考えられる。

## 11 用語

注意：本項に示す定義は本ガイドライン内で使用するためのものである。

**代替法**：形態異常や胚・胎児致死性（MEFL参照）を予測することを目的とした *in vitro*、*ex vivo* 又は非哺乳類 *in vivo* 試験法。

**適用領域**：試験法で信頼して試験されうる物質の物理化学的特性及び生物学的作用機序の定義。

**代替法の適格性確認（規制当局の受入れ目的）**：*in vivo* で認められる MEFL を特定する上での代替法の予測性の確認。

**構成成分**：ワクチンで賦形剤、希釈剤、又はアジュバントとして使用されている化学物質又は生物学的物質。製品を投与しやすくするために別途供給される希釈剤を含む。

**発生毒性**：成人期に達する前に誘発される有害作用。受精から出生後までに誘発、あるいは顕在化する影響を含む。

**GD 0**：妊娠0日。交尾成立が確認（げっ歯類では膣スミアによる精子確認／膣栓、ウサギでは交尾の確認など）された日。

**形態異常**：一般的に正常な発生や生存に支障をきたす、あるいは著しく有害な永続的構造の逸脱。

**予備的 EFD（pEFD）毒性試験**：器官形成期に曝露を行う胚・胎児発生毒性試験で、適切な用量段階を設定し、各群6匹以上の妊娠動物を用いて、胎児生存、胎児体重、外表・内臓の変化を評価する（ICH M3参照）。

**サロゲート分子**：医薬品がヒトで惹起するものと同様の薬理活性を試験動物種に引き起こす分子。

**ワクチン**：本ガイドラインでは、感染性疾患の予防と治療のためのワクチンを意図する。ワクチン（ワクチン製品という用語も含む）は完全な製剤として定義され、抗原（あるいは免疫原）及びアジュバント、賦形剤、保存剤などの添加剤が含まれる。当該ワクチンは免疫系を刺激しワクチン抗原に対する免疫反応を獲得することを目的としている。ワクチンの主な薬理作用は、感染あるいは感染性疾患の予防や治療である。

**変異**：生存性、発生、あるいは機能に影響を与えない構造変化（骨化遅延など）。可逆的なものもあり、生殖発生毒性試験の対照群で認められることもある。

## 12 参考文献

1. International Council on Harmonisation M3(R2): Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (2009) together with ICH M3(R2) Questions & Answers (2012).
2. International Council on Harmonisation S6(R1): Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (2011).
3. International Council on Harmonisation S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals (2009).
4. International Council on Harmonisation S3A: Note for Guidance on Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Toxicity in Toxicity Studies (1994) together with ICH S3A Questions and Answers (2017).
5. International Council on Harmonisation S11: Nonclinical Safety Testing in Support of Development of Pediatric Medicines (2019, step 2).
6. Andrews PA, Blanset D, Lemos Costa P, Green M, Green ML, Jacobs A, et al. Analysis of exposure margins in developmental toxicity studies for detection of human teratogens. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019a;105:62-8.
7. Andrews PA, McNerney ME, DeGeorge JJ. Reproductive and developmental toxicity testing: An IQ-DruSafe industry survey on current practices. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019b;107:104413.



附属書1 *In vivo* 試験デザイン

生殖発生毒性試験に用いる上での各動物種の利点及び欠点の概略を以下に示す。

表1：生殖発生毒性試験のための各動物種の主な利点と欠点

通常用いられる動物種		
動物種	利点	欠点
ラット	<ul style="list-style-type: none"> <li>生物学的によく理解されている</li> <li>薬力学及び創薬に広く用いられている</li> <li>妊娠期間が短く、生殖能が高い</li> <li>一群あたりの動物数を多く設定でき同腹児数が多い</li> <li>反復投与毒性試験のデータを利用可能である</li> <li>生殖発生毒性試験の全ての生殖ステージに適している</li> <li>幅広い多くの施設で使用経験があり、動物の入手が容易である</li> <li>背景データが豊富である</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ヒトと胎盤形成が異なる（時期、反転卵黄嚢など）</li> <li>妊娠の成立と初期の妊娠維持にあたり、主要ホルモンとしてプロラクチンに依存するため、それらに影響する一部の医薬品（ドパミンアゴニストなど）に対して感受性が高い</li> <li>出産の障害となる医薬品（妊娠後期における非ステロイド性抗炎症薬など）に対して感受性が高い</li> <li>ヒトと比較して、受胎能に対する有害作用を受けにくい</li> <li>異種タンパクに関しては用途が限られる <ul style="list-style-type: none"> <li>○薬理活性が限定的あるいはない</li> <li>○免疫原性に影響する可能性がある</li> </ul> </li> </ul>
ウサギ	<ul style="list-style-type: none"> <li>ラットと同様の利点がある</li> <li>非げっ歯類のモデルである</li> <li>連続的な精液採取と交配試験に適している</li> <li>げっ歯類よりも抗体の胎盤通過性が霊長類に近く、ワクチンの生殖発生毒性試験での利点となる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>異種タンパクに関してはラットと同様の制限がある</li> <li>受胎能試験、出生前及び出生後試験の背景データが限定的である</li> <li>消化管障害に対する感受性が高い（ある種の抗生物質など）</li> <li>自然流産しやすい</li> <li>症状観察所見から全身の一般状態を判断することが難しい</li> <li>一般毒性試験ではワクチンを除き通常使用されないため、薬力学、毒性及びTKデータを入手しなければならない</li> </ul>

マウス	<ul style="list-style-type: none"> <li>ラットと同様の利点がある</li> <li>遺伝子改変動物を利用可能又は作製可能である</li> <li>サロゲート分子が多くの場合に利用可能である</li> <li>被験物質の使用量が少ない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ラットと同様の制限がある</li> <li>胎児の大きさや組織の体積が小さい</li> <li>ストレスに対する感受性が高い</li> <li>形態異常が群発することが知られている</li> </ul>
-----	--	--

**通常用いられない動物種**

動物種	利点	欠点
カニクイザル (NHP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>一般に、他の動物種と比べて、より系統発生的及び生理学的にヒトと類似している</li> <li>げっ歯類と比べて、よりヒトと類似した薬理作用を示しやすい</li> <li>胎盤形成がヒトと類似している</li> <li>反復投与毒性試験のデータが利用可能である</li> <li>抗体の胎盤通過性がヒトと類似している</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>一群あたりの動物数が少ないため、統計学的検出力が低く、群間のばらつきも大きい</li> <li>繁殖力が低い <ul style="list-style-type: none"> <li>単胎</li> </ul> </li> <li>流産が多い背景がある</li> <li>繁殖動物の入手が困難である</li> <li>月経周期 (30日間) と妊娠期間 (165日間) が長い</li> <li>受胎能 (交配) 試験には実用的でない</li> <li>性成熟に達するのが遅く (3~6歳頃)、F1世代の生殖機能の評価が困難である</li> <li>年齢と体重から性成熟を判断できない</li> <li>倫理面での配慮が必要である</li> <li>背景データが乏しく、使用経験があり試験の実施が可能な施設が少ない</li> <li>試験開始時の年齢、体重、出産歴にばらつきが大きい</li> </ul>
ミニプタ	<ul style="list-style-type: none"> <li>一般毒性試験に使用できる代替非げっ歯類である</li> <li>器官形成期が短い (GD11~35)</li> <li>遺伝的背景が明確で SPF 動物である</li> <li>7カ月以内に性成熟に達する</li> <li>NHP よりも同腹児数が多い</li> <li>連続的な精液採取及び交配試験に適している</li> <li>生殖エンドポイントに関する十分な背景データがある</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>使用経験がある施設が少ない</li> <li>妊娠期間が長い (114日間)</li> <li>被験物質の使用量が多い</li> <li>出生前の抗体移行がほとんどない</li> </ul>

限定的に用いられている動物種（主に研究目的での使用）		
動物種	利点	欠点
ハムスター	<ul style="list-style-type: none"> <li>薬理的に適切となりうる、げっ歯類の代替モデルである</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>食殺による出生後死亡が多い</li> <li>背景データが限定的であり、使用経験がある施設が少ない</li> <li>出生後の行動及び機能検査の実施が困難である</li> <li>静脈内投与が困難である</li> <li>攻撃的である</li> <li>消化管障害に対する感受性が高い</li> <li>一般毒性試験では通常使用されないため、薬力学、毒性及びTKデータを入手しなければならない</li> <li>採血が困難である</li> </ul>
イヌ	<ul style="list-style-type: none"> <li>通常、反復投与毒性試験のデータがある</li> <li>精液採取が容易である</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>妊娠期間が長い（63日間）</li> <li>背景データが限定的であり、使用経験がある施設が少ない</li> <li>出生後の行動及び機能検査の実施が困難である</li> <li>被験物質の使用量が多い</li> </ul>

医薬品の生殖発生毒性エンドポイントを評価する上で、ここに記載されていない哺乳類の動物種を用いることも可能である。

### 1.1 *In vivo* 試験デザインに関する考慮事項

一般的には、生殖発生毒性試験の同一試験内及び試験間において、試験開始時の年齢、体重、出産歴がほぼ同一である動物を用いるべきである。投与開始時点において若齢かつ性成熟した動物を用いることで、これらの要素を容易に満たすことができる。各試験における各群の動物数は、これらの試験デザインに関する長年の経験からの科学的判断と、動物の適切な使用に関する倫理的配慮とのバランスに基づき決定されている。医薬品の臨床での曝露量で予想される生殖発生への有害作用を確認する際に、一群あたりの動物数がより少なくても十分な場合がある。

げっ歯類やウサギの場合、16～20匹の母動物数で評価すれば、ある程度試験間での整合性が得られる。母動物数が16匹を下回ると試験間の結果に一貫性がなくなり、20～24匹を上回っても整合性と精度はそれほど向上しない。これらの数は評価可能な母動物数を指す。通常と異なった評価が必要で、さらに群を分割する場合、試験開始時の動物数は適切に設定すべきである。

以下に示す試験デザインは、特にパラメータ、評価時期、評価方法に関して改変可能であり、改変したとしても試験の目的を達成することは可能である。各施設や試験の目的に合わせて、これらの枠組みとなるデザインを改変する場合には、専門的判断に基づくべきである。

#### **1.1.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 (FEED 試験)**

FEED 試験は、配偶子の成熟、交尾行動、受胎能、着床前の胚発生、及び着床について評価できるようデザインされる。雌動物では、性周期及び卵管内輸送に及ぼす影響の評価が含まれる。雄動物では、雄の生殖器の病理組織学的検査では検出されない機能的な影響（精巣上体内の精子成熟など）の検出が含まれる。

FEED 試験では、一般的に雌雄のどちらにも被験物質を投与する（表2参照）。しかしながら、適切な数の無処置の雌動物又は雄動物で代用して、分離した試験として、雄動物のみあるいは雌動物のみに投与する試験を実施することも可能である。

表2：FEED 試験のデザイン：雌雄のげっ歯類に投与する試験

パラメータ	
一群あたりの動物数	雌雄それぞれ少なくとも16匹
群数	4 (対照群1群を含む)
投与期間 <sup>a</sup>	雄：交配開始の2週間以上前から少なくとも交尾確認まで 雌：交配開始の2週間以上前から着床 (GD6) まで
交配比率	雄：雌=1：1
交配期間 <sup>b</sup>	2週間以上
性周期の評価	交配開始の2週間前から交尾確認まで毎日
一般状態／生死	1日1回以上
体重	週2回以上
摂餌量	週1回以上 (交配期間を除く)
雄動物の剖検 <sup>c</sup>	精巣及び精巣上体は病理組織学的検査の可能性を考慮して保存し、必要に応じて評価する。 病理組織学的検査を実施する可能性を考慮し、肉眼的変化が認められた臓器に加え、比較検討のため十分な数の対照群の同臓器を保存する。
精子検査 <sup>d</sup>	必要に応じて実施
雌動物の剖検 <sup>e</sup>	卵巣及び子宮は病理組織学的検査の可能性を考慮して必要に応じて保存する。 病理組織学的検査を実施する可能性を考慮し、肉眼的変化が認められた臓器に加え、比較検討のため十分な数の対照群の同臓器を保存する。
帝王切開	帝王切開は通常、妊娠中期に行う。
子宮内着床データ	黄体数、着床数、生存・死亡胚数

- a: 反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験から利用可能なデータを、特に精子形成に対する影響を検出するための、投与期間の根拠として用いるべきである。少なくとも2週間の反復投与毒性試験で影響が認められていない場合には、雌動物で2週間、雄動物で2週間の交配前投与期間を設定することができる。雄動物への投与は交尾が確認されるまで継続すべきであるが、雌動物の受胎確認後に剖検することも有用な場合がある。雌動物への投与は少なくとも着床まで継続すべきである。これにより、反復投与毒性試験における病理組織学的検査では検出することができない受胎能に対する機能的影響及び交尾行動に対する影響を評価することができる。
- b: ほとんどのラット及びマウスは同居開始後5日以内 (すなわち、同居後最初の発情期) に交尾するが、少数の雌動物が偽妊娠となる場合がある。2週間を超える期間、雌動物を雄動物と同居しておくことで、これらの雌動物は性周期が再開し、妊娠可能となる。
- c: 交尾結果がわかるまで雄動物の剖検を延期することは有用である。受胎能に対する影響が認められた場合、その影響が雄動物に起因する可能性を確認するために、雄動物を無処置の雌動物と交尾させてもよい。交尾後も投与が継続して実施され剖検が延期されて、精子形成期間の全期間 (10週間など) にわたり雄動物が曝露される場合には、より詳細に雄生殖器系に対する毒性の評価を行うことができる。
- d: 問題が生じた場合は、リスク評価の一助として、精子検査 (精子数、運動性、形態など) が有用なこともある。

e: 雌動物の剖検は一般的に妊娠13～15日頃に行うのが受胎能や生殖機能への影響を評価する上では適切である（生存胚と吸収胚を見分けるためなど）。妊娠末期に雌動物の剖検を行うという選択肢もある。

### 1.1.2 胚・胎児発生に関する試験（EFD 試験）

EFD 試験は、非妊娠雌動物と比較した母動物毒性の増強を評価し、胚・胎児の生存、子宮内発育、形態学的発生に対する潜在的影響を評価するようデザインされる。

げっ歯類、ウサギ、カニクイザルの推奨される試験デザインを以下に示す。

#### 1.1.2.1 EFD 試験のための用量設定試験

交尾雌動物を用いた用量設定試験は、げっ歯類及びウサギの EFD 本試験のための適切な用量段階や投与スケジュールを選択するために最もよく利用される。しかしながら、この目的のためには既存の反復投与毒性試験における忍容性及び TK データで十分な場合もある。

#### 1.1.2.2 予備的な胚・胎児発生に関する試験（pEFD 試験）

pEFD 試験（表3）のデザインは EFD 本試験と類似している。典型的な pEFD 試験のデザインでは、器官形成期に曝露を行い、適切な用量段階を設定し、各群6匹以上の妊娠動物を用いて、胎児生存、胎児体重、胎児の外表及び内臓の異常の評価を実施する（ICH M3参照）。

#### 1.1.2.3 EFD 本試験

妊娠末期に雌動物の帝王切開を行う。胎児の生存、胎児体重、胎児の外表、内臓の異常の評価及び骨格検査を実施する（表3）。表3に示した評価時期は、げっ歯類、ウサギ及びカニクイザルに関するものである。他の動物種については、適切な評価時期を用いるべきである。

表3：げっ歯類、ウサギ及びNHPのEFD試験のデザイン

パラメータ	pEFD	EFD		
	げっ歯類/ウサギ	ラット (マウス)	ウサギ	NHP <sup>a</sup>
GLP 準拠	▲ <sup>c</sup>	○	○	○
最少母動物数	6	16	16	16 <sup>b</sup>
群数	4 (対照群1群を含む)	4 (対照群1群を含む)	4 (対照群1群を含む)	2以上 (対照群1群を含む)
投与期間 <sup>d</sup>	動物種毎の適切な期間	GD6/7-17 (6/7-15)	GD6/7-19	およそ GD 20 - 少なくとも GD 50
<b>妊娠期間エンドポイント</b>				
一般状態/生死	1日1回以上	1日1回以上	1日1回以上	1日1回以上
体重	週2回以上	週2回以上 <sup>e</sup>	週2回以上 <sup>e</sup>	週1回以上
摂餌量	週1回以上	週1回以上	週1回以上	▲
<b>TK</b>	▲ <sup>c</sup>	○	○	○
<b>帝王切開後エンドポイント</b>				
帝王切開 <sup>f</sup>	動物種毎の適切な時期	GD20/21 (17/18)	GD28/29	GD100
肉眼観察	○	○	○	▲
妊娠子宮重量	▲	▲	▲	-
黄体	○	○	○	-
着床部位	○	○	○	-
胚・胎児の生死	○	○	○	○
早期・後期吸収胚	○	○	○	-
胎盤の肉眼的観察	○	○	○	○
胎盤重量	▲	▲	▲	▲
生存胎児体重	○	○	○	○
生存胎児性別	○	○	○	○
胎児外表検査 <sup>g</sup>	○	○	○	○
胎児内臓検査 <sup>g,h</sup>	○	○	○	○
胎児骨格検査 <sup>g,h</sup>	▲ <sup>c</sup>	○	○	○

○：必要、▲：任意、-：不要

- a: カニクイザル以外の NHP を用いる際には、試験デザインを改変すべきである。
- b: EFD 試験における一群あたりの動物数は、形態発生に対する潜在的有害作用の評価を行う上で、十分な胎児数が得られるように設定すべきである。
- c: EFD 本試験の実施を延期するために pEFD 試験を用いる場合、pEFD 試験は GLP 下で実施すべきであり、妊娠動物の TK データを収集し、骨格検査を実施すべきである。
- d: げっ歯類及びウサギでは、着床から硬口蓋閉鎖までの期間、雌動物に被験物質を投与する（ステージ C、1.1項参照）。NHP では、妊娠確認（GD 20頃）から少なくとも GD50（主要な器官形成の終了）までの期間、雌動物への投与を行う。
- e: 投与期間中は毎日、妊娠した雌動物の体重を測定することにより有益な情報が得られる。
- f: げっ歯類及びウサギでは、帝王切開は分娩予定の約1日前に実施すべきである。病理組織学的検査を実施する可能性を考慮し、肉眼的変化が認められた組織に加え、対照群の同組織を比較のため十分数保存する。NHP では、GD 100頃に帝王切開を実施すべきである。
- g: 全ての胚・胎児に対して生死と異常を検査すべきである。異なる観察方法による所見の関係性を、後日評価できるように、胎児は個体識別すべきである。
- h: げっ歯類の全胎児に対して内臓検査と骨格検査のどちらも実施することが望ましいが（観察方法が可能であれば）、同腹児の半数ずつをそれぞれの検査に割り当てることも許容される。

### 1.1.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（PPND 試験）

PPND 試験は、非妊娠雌動物と比較した毒性の増強、出生前及び出生後の出生児の生存、成長及び発達の変化、並びに出生児の性成熟、成熟時の生殖機能、感覚機能、運動機能、学習・記憶のような機能に対する影響を評価するようデザインされる。

雌動物は分娩させ、離乳まで出生児を哺育させる。離乳時に1腹につき少なくとも雌雄各1匹の出生児を選択し、性成熟に達するまで飼育し、生殖機能を評価するために交配させる（表4参照）。



表4：PPND 試験のデザイン：ラット

パラメータ	
一群あたりの動物数	少なくとも16匹
群数	4 (対照群1群を含む)
投与期間	着床 (GD 6/7) から離乳 (PND20) まで
<b>F0雌</b>	
一般状態／生死	1日1回以上
体重	週2回以上
摂餌量	授乳期間中期までは少なくとも週1回以上
分娩観察	GD 21から分娩完了まで
剖検	PND 21 剖検時に、病理組織学的検査の可能性を考慮し、肉眼的変化が認められた臓器に加え、比較検討のため十分な数の対照群の同臓器を保存する。また、子宮内着床数を調べる。
<b>F1離乳前</b>	
一般状態／生死	PND 0から毎日
離乳前後の生存	PND 0から毎日
体重と性別	PND 0/1、以降週2回以上
同腹児数の調整 (任意)	PND 4以降、雌雄各4又は5匹
身体的発達 <sup>a</sup>	離乳前の発達指標及び反射 (眼瞼開裂、耳介開展、面正向反射、聴覚性驚愕反射、空中落下反射、対光反射など)
<b>F1離乳後</b>	
離乳後評価のための選択及び一群あたりの動物数 <sup>b</sup>	PND 21に各群雌雄各16匹を確保できる場合、1腹あたり雌雄各1匹以上
一般状態／生死	毎日
体重	毎週
摂餌量 (任意)	毎週
性成熟 <sup>c</sup>	雌：膣開口 雄：包皮分離
その他の機能検査 <sup>d</sup>	感覚機能、運動機能、学習・記憶の評価
生殖機能	10週齢以上にて同群内 (兄妹交配を避ける) で交配のために同居させる (雌雄1:1)

- a: 身体発達の最も的確な指標は体重であるが、体重測定のみでその他の発達指標の評価の代替とすることは許容されない。
- b: 行動及びその他の機能検査、並びに生殖機能を評価するために、同腹児あたり雌雄1匹ずつを確保する。行動及びその他の機能検査と生殖機能の評価を別々の動物で実施するために、同腹児あたりさらに多くの動物を確保する場合もある。
- c: 対照群との差が特異的なものなのか、あるいはそれが全体的な成長と関連しているのかを判別するため、指標達成時の体重を記録すべきである。
- d: 学習と記憶は複雑な学習課題で評価すべきである。自発運動及びプレパルス抑制を用いた驚愕反応検査を実施する場合には、十分な馴化期間終了後に評価すべきである。

### 1.1.3.1 ヒト以外の霊長類（NHP）を用いた ePPND 試験

ePPND 試験（表5）は、EFD 試験と PPND 試験の両方のエンドポイントを組み合わせた NHP での試験である。この試験では、投与が妊娠期間から分娩まで（GD20から分娩までなど）延長される。評価時期及び追加のパラメータについては ICH S6を参照のこと。

表5：ePPND 毒性試験のデザイン:カニクイザル<sup>a</sup>

パラメータ	
一群あたりの動物数 <sup>b</sup> 群数 投与期間	約16匹の妊娠動物 2以上（対照群1群を含む） 妊娠の確認（およそ GD20）から分娩まで
<b>F0雌</b> 一般状態／生死 体重 分娩所見 胎盤 剖検と組織評価	1日1回以上 週1回以上 分娩完了日を記録 可能なら採取し保存する 必要な場合のみ
曝露評価	TK プロファイルや全身薬物濃度は適切に測定すべきである
<b>F1</b> 一般状態／生死 体重 形態／身体／機能評価 神経行動学的バッテリー試験	PND 0から毎日 毎週 定期的に適切に評価する 分娩後最初の2週間の時点で少なくとも1セット
握力 母子間行動	PND 28 哺育行動を妨げないよう出生後早期の観察は最小限とし、その後適切に行う
曝露評価 外表検査 骨格検査 内臓検査 剖検	全身薬物濃度を適切に測定すべきである 定期的に実施 およそ PND 28以降 剖検時 評価の目的に応じて、最短で1カ月後 病理組織学的検査の可能性を考慮し、組織を保存する

- a: カニクイザル以外の NHP を用いる際には、試験デザインを適宜改変すべきである。
- b: ePPND 試験における一群あたりの動物数は、妊娠結果に対する潜在的有害作用と、異常形態及び出生後の発達の評価を行い、必要に応じて（免疫系など）専門的な評価が行えるよう、十分な児数が得られるようにすべきである。通常、ePPND 試験では妊娠動物を数カ月にわたって試験に組み入れる。

#### 1.1.4 組合せ試験

開発計画の目標を達成する上では、異なる種類の試験を組み合わせることも可能である。その場合は、上述の各試験で評価する適切なエンドポイントを1つの試験に組み込むことになる。様々な組合せ試験の考え方について以下に示す。

##### 1.1.4.1 FEED 試験と EFD 試験

FEED 試験と EFD 試験を組み合わせた試験の目的は、交尾前（雄雌）から交尾、着床、器官形成期終了までの期間、被験物質の投与による毒性作用を調べることである。これはステージ A から D の評価となる（1.1項参照）。この試験デザインはげっ歯類でも用いることはできるが、ほとんどの場合はげっ歯類で用いられる。

雌雄を用いた FEED 試験と EFD 試験を組み合わせる試験を実施することは可能であるが、適切な期間を設定した反復投与試験などの別の試験で雄動物の受胎能が評価されている場合には、雌動物だけを評価する試験とすることも可能である。この試験の場合、無処置の雄動物は交配の目的のみに使用することになる。これらの試験デザインと観察項目は、附属書1の1.1.1項及び1.1.2項を参照すること。

##### 1.1.4.2 雄動物の受胎能と反復投与毒性試験

げっ歯類の反復投与毒性試験の中で雄動物の受胎能を評価することも可能である。この組合せ試験では、規定の週数の投与を行った雄動物を、無処置の雌動物と交配させる。同居後も、反復投与毒性試験の予定終了時まで雄動物への投与を継続する。交尾成立が確認されてから約2週間後に、無処置の雌動物の帝王切開を行う。評価する試験のエンドポイントは、附属書1の1.1.1項に示したものと同一である。影響を適切に評価するため、試験には各群16匹以上の雄動物を組み込むべきである。雌動物の受胎能及びその他の FEED のエンドポイントは、別の試験で評価する必要がある。

## 附属書2 代替法

適格性が確認された代替法（用語参照）のみのデータ、又は1つ以上の *in vivo* 試験と併用して得たデータは、限定された条件下でのハザードの特定やリスク評価の補助に利用できる。

代替法の利用例を以下に示す。

- EFD への有害作用を示唆する科学的根拠がある場合（例；発生生物学における基本的なパスウェイに影響する作用機序、遺伝子改変動物の表現型、クラスエフェクトなど）（附属書2の1.2.2項及び図1を参照）
- 毒性により動物試験では臨床曝露量までの全身曝露が得られない場合
- 動物試験での所見が不確かな場合に、科学的根拠の重み付けによる評価の補助として利用
- 最大150人の WOCBP を最長3カ月の臨床試験に組み入れるための部分的な補助として利用（本ガイドラインの4.2.3項参照）
- 身体機能を著しく損なう又は生命を脅かす疾患を対象に開発されている医薬品の場合（附属書2の1.2.3項、1.2.4項及び図2参照）

リスク評価の補助として代替法を使用する場合は、総合的試験戦略に代替法を組み込む妥当性を示すべきである。リスク評価のための代替法は GLP 下で実施し、使用の背景（適用領域及び試験結果が信頼性を有することを示す規制条件）に関する適格性を確認すべきである。代替法を組み込んだ戦略では、必要に応じて薬物代謝物の影響も評価すべきである（ICH M3）。附属書2では特定の試験法を推奨するのではなく、規制当局の受入れに用いられる際の、試験法の適格性確認に関する科学的原則を示す。*in vivo* で得られる EFD エンドポイントを検討せず、作用機序の探索に用いる場合の代替法については、厳密な適格性確認は求められない。

### 1.1 MEFL の予測のための代替法の適格性確認

試験結果を有用にするためには、試験方法は適切でなければならない。したがって、評価の目的及び予測性に関して、評価するエンドポイントの科学的な妥当性を示すべきである。当該評価の予測性、評価するエンドポイント、及び適用領域との関係性を、経験に基づき補助すべきである。規制当局の受入れのためのリスク評価に使用する1つの代替法、又は代替法の組合せに

関する適格性確認<sup>1</sup>にあたり、包括的に説明すべき項目を下記に示す。

- 予測モデルの詳細な説明と正当性：どの動物種（ラット、ウサギ、ヒトなど）及びどのようなエンドポイントを予測しようとしているのかを含む。発生に対する潜在的ハザードの評価に使用される現在利用可能な *in vitro* 代替法が、MEFLを検出するようデザインされていること。
- モデルの生物学的妥当性に関する評価：胚・胎児発生の機序（細胞移動、分化、脈管形成、神経管形成、原腸形成など）及びそのモデルで試験するその後の発生に対する有害作用の説明などを意味する。また、個々の試験法に制限事項があれば、それについても述べるべきである。説明には、曝露の期間と時期が *in vivo* での MEFL の予測を裏付けることを示す記述とデータを含めるべきである。
- MEFL を検出する代替法の精度及び検出能力の評価：用量を制限するような母動物毒性が発現しない場合、代替法の性能を、MEFL を引き起こす化合物を用いた *in vivo* 試験で得られたデータと比較する。当該化合物が市販の医薬品でない場合には、その *in vivo* データを提供すべきである。
- 当該試験法での陽性・陰性判定に関する考察
- MEFL を予測する分子マーカー及び代謝マーカーの定義及び閾値の正当性
- *in vivo* での陽性及び陰性結果を判定する際に用いたアルゴリズムの詳細：予測モデルでは、代替法で用いた濃度を、予測する動物種（可能であれば妊娠動物）で有害作用を生じる *in vivo* 曝露量と関連づけるべきである。
- 試験法の適格性確認に用いられたトレーニングセット（予測性能を明らかにするために用いられるデータ）及びテストセット（予測性能の強度と有用性を評価するために用いられるデータ）、並びにそれぞれの化合物リストと当該化合物を選択した根拠
- 対照物質リスト（附属書2の1.3項）に含まれていない化合物を用いる場合は、適格性確認データセットの化合物における、全ての *in vivo* 曝露量及び MEFL に関するデータの出典（文献、試験報告書、規制当局の審査報告書など）
- 代替法の使用目的を正当化するような、生物学的及び化学的領域の適切な範囲を満たす性能を証明するデータ（使用の背景）
- *in vivo* 発生毒性結果を予測する1つの試験法又は複数の試験の組合せにおける、感度、特異度、陽性率、陰性率、及び再現性を証明するデータ：トレーニングセット及びテストセットの性能については、選択したアプローチの適切性が示されれば、個別の評価や、

---

<sup>1</sup>本ガイドラインにおける適格性確認をした代替法は、ある特定の状況下に限って適用されるものであるため、正式なバリデーションは必要とされない。

これらを併せた評価を実施できる。

- 複数の代替法を実施する場合には、予測モデルによる総合評価に加え、それぞれの代替法の性能についても個別に記述する。個々の代替法の結果を、どのように組み合わせて最終予測としたかを明示する。
- 陽性対照物質を含めた試験法の開発及び使用に関する背景データ（生存性、形態異常の数と種類など）

申請者は、当該試験法の適格性確認をいずれかの規制当局に提出している場合、提出先を述べるべきである。ただし、1つの規制当局が試験法を受け入れたとしても、それにより他の規制当局がその試験法を受け入れるわけではない。最後に、*in vivo* 試験で検出不能な MEFL を予測できる代替法の可能性も考慮し、ラットやウサギを用いた *in vivo* 試験で検出されていないヒト催奇形性物質を評価に含めることが期待されている。

## 1.2 代替法を用いる EFD 試験戦略の例

この項では、EFD に対する有害作用の評価のために代替法を組み入れた総合的試験戦略の例を示す。

### 1.2.1 総合的試験戦略の一環として *in vivo* 試験を延期することが可能なアプローチ

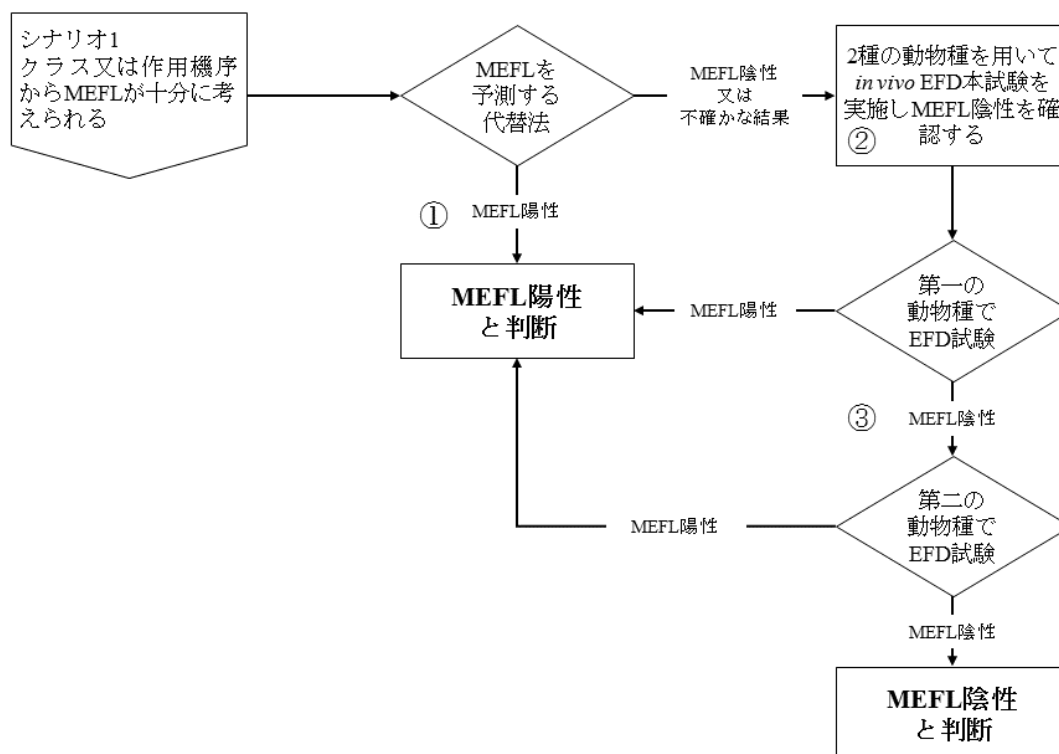
本ガイドラインの4.2.3項を参照。

### 1.2.2 胚・胎児に対して毒性物質であると考えられる医薬品

作用機序、薬理学的クラス又は標的分子の生物学的側面から胚・胎児発生に有害作用を及ぼすと考えられる医薬品の場合は、適格性を確認した代替法によりその作用を確認することが適切な場合がある（附属書2の図1を参照）。

適格性を確認した代替法により、臨床曝露量に相当する曝露量での MEFL が明確に予測されるのであれば、その化合物を EFD リスクがあるものと判断する上で十分であり、通常、追加の試験は不要である。代替法によって MEFL が予測されない場合は、2種の動物種を用いた *in vivo* での EFD 本試験で確認すべきである。附属書2の図1に示すような流れで試験を実施すると、最初の *in vivo* 試験で陽性であれば、2つ目の *in vivo* 試験は不要となることから、使用動物数を削減することができる。このシナリオでは、その医薬品は胚・胎児発生に有害作用を及ぼすと考えられるため、代替法での陽性反応を否定するために *in vivo* EFD 試験を用いる利点はない。

図1：EFD 毒性物質であると考えられる医薬品に対する代替法の使用



- ① 不確かな MEFL の兆候が臨床曝露量に相当する曝露量で認められた場合には、追加の評価は不要である。
- ② pEFD 試験も利用可能であるが、陰性結果を確認する上では適切な動物種を用いた本試験でなければならない。
- ③ このような流れで *in vivo* EFD 試験を実施すると、最初の *in vivo* 試験で陽性であれば2つ目の *in vivo* 試験は不要となることから、使用動物数を削減することができる。

### 1.2.3 身体機能を著しく損なう又は生命を脅かす疾患の治療を目的とした医薬品

身体機能を著しく損なう又は生命を脅かす疾患の治療を目的とした医薬品では、（重篤度の低い慢性疾患を対象としたものと比較して）妊娠の可能性が低く、そのリスク／ベネフィットを考慮すると、適格性が確認された代替法を使用することは、EFD リスク評価の一環として適切と考えられる（附属書2の図2参照）。

適格性が確認された代替法を用いて、第一の動物種（例えばラット）において臨床曝露量に相当する曝露量で MEFL が明確に予測される場合は、ケースバイケースで、EFD リスクが十分に明確にされたと考えることができる。しかしながら、当該結果が不確かな場合や偽陽性と考え

られる場合は、ヒトでのリスク評価の補助として、1種又は2種の動物種を用いた *in vivo* 本試験を実施すべきである。2つの *in vivo* 本試験において、適切な曝露マージン下で EFD のシグナルが認められない場合、代替法の結果については、ヒトのリスクに対する懸念が極めて小さいと考えることができる。しかしながら、（動物の MEFL のみを予測するのではなく）ヒトの MEFL を予測するものとして適格性が確認された代替法の場合は、代替法の結果が偽陽性であるという結論の裏付けとして、追加のデータ（メカニズムや遺伝学的データなど）を提示すべきである。*in vivo* 試験のいずれか又は両方が EFD 毒性について陽性の場合、当該化合物は EFD リスク陽性であると考えられる。附属書2の図2に示すような流れで試験を実施すると、最初の *in vivo* 試験で陽性であれば2つ目の試験は不要となることから、使用動物数を削減することができる。代替法の結果により最初の動物種で陰性結果（MEFL なし）が予測される場合は、第二の動物種で *in vivo* EFD 本試験を実施して当該評価を確認すべきである。その結果が陽性の場合、その化合物は EFD リスク陽性と考えられる。その結果が陰性の場合、その化合物は EFD リスク陰性と考えられ、追加の試験によってリスク評価が大きく変化すると判断されない限り、通常、追加の試験は必要とされない。

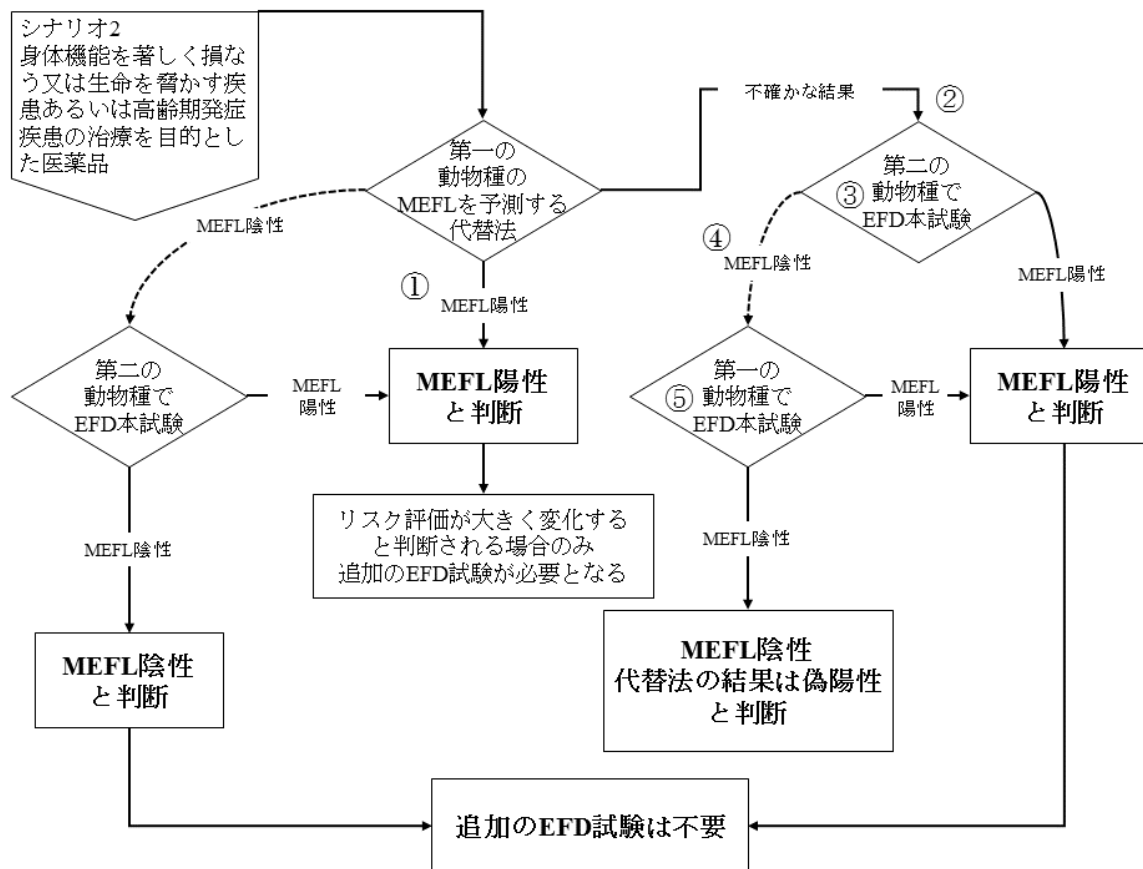
#### 1.2.4 高齢期発症疾患の治療を目的とした医薬品

一部の疾患は、一般に高齢でのみ診断（水疱性類天疱瘡などは、一般に60歳を超える年齢から診断）されるが、発生率は低いながらも生殖能力のある女性で診断されることがある。このような高齢期発症疾患を有する女性集団では一般に受胎率が低いことを考えると、当該集団のみを対象として用いられる医薬品により、先天異常の発生率が上昇する可能性は低い。このシナリオにおいて、EFD 評価が必要かどうかは、ケースバイケースで判断すべきである。このシナリオは、EFD 評価が一般に不要とされるような、治療対象集団に受胎能がないと推定される状況（閉経後骨粗鬆症など）を意図したものではない。

このシナリオでの試験戦略は、身体機能を著しく損なう又は生命を脅かす疾患で記述した試験戦略と同様であるが、第二の動物種での最初の *in vivo* 評価を pEFD 試験として実施できる点が異なる。



図2：身体機能を著しく損なう又は生命を脅かす疾患あるいは高齢期発症疾患の場合の代替法の使用



- ① 臨床曝露量に相当する曝露量で MEFL が明確に予測される場合は、ケースバイケースで、EFD リスクがあるものと判断する上で十分であり、追加の評価は不要である。
- ② pEFD 試験も利用可能であるが、代替法の結果が偽陽性であることを確定させるには、2種の動物種で *in vivo* EFD 本試験を実施し、その両方で陰性結果を得る必要がある。
- ③ 高齢期発症疾患の場合、この患者集団では一般に妊娠の可能性が低いことを考えると、第二の動物種で pEFD 試験を実施することで十分である。
- ④ このような流れで *in vivo* EFD 試験を実施すると、最初の *in vivo* 試験で陽性であれば2つ目の試験は不要となることから、使用動物数を削減することができる。
- ⑤ 代替法で結果を予測する同じ動物種を用いる。

### 1.3 対照物質リスト

対照物質リストには、非臨床試験において（明らかな母動物毒性が発現しない条件下）又はヒトにおいて、MEFL を誘発することが明らかとなっている29の化合物が含まれている（附属書2の表1）。

これらの NOAEL 及び LOAEL の決定にあたっては、MEFL の所見のみに着目した。回復性がある、あるいは軽微な発生毒性所見（胎児体重の変動、発育遅延、骨格変異など）の誘発を伴う用量は、この評価には使用しなかった（本ガイドラインの9項を参照）。

どの NOAEL 及び LOAEL を使用するかを判断する際には、試験における一般的な頑健性（GLP への準拠、使用動物数、用量段階の数など）が考慮された。複数の出典がある場合は、ICH S5(R2)ガイドラインで推奨されているものと一致したデザインの試験で得られたデータを最終的なデータとして採用した。複数の頑健なデータを掲載した出典があり、値が一致していない場合、異なる試験のデータではあるが、基本的に（マージンを少なくする偏向を避けるため）最も高い NOAEL 値と、（規制上の評価で通常実施される通り）最も低い LOAEL 値が用られている。

このリストに記載された化合物は、他の化合物と同様に、1つの代替法又は複数の試験の組合せの適格性確認の裏付けとして使用できる。

試験法の特異度を評価するために、MEFL を引き起こさない化合物（陰性物質）も使用すべきである。このような化合物は、胎児体重の変化、構造の変異、骨化遅延／減少などの胚／胎児に対する影響の有無にかかわらず、MEFL は引き起こさない。これらの化合物は、実施された *in vivo* 試験のすべての用量で陰性であることもあろうが、より高い用量／曝露量で陽性（MEFL が認められる）となる場合、その使用の背景の中で代替法が陰性から陽性への移行を予測できることになる。すなわち、代替法は *in vivo* 試験で陰性結果（MEFL が認められない）が示される条件下の曝露量に相当する曝露量で陰性結果を予測すべきである。対照物質リストには、陰性化合物の例として3つの化合物が含まれている（Cetirizine、Saxagliptin、Vildagliptin）。これらの化合物は、ラット及びウサギにおいて、MRHD での曝露量の25倍を超える曝露量（AUC 及び C<sub>max</sub>）で MEFL を誘発していない。

表1：代替法の適格性確認のための陽性対照物質の例

Positive Controls	Human Teratogen	Rat MEFL	Rabbit MEFL
Acitretin	○	○	○
Aspirin	○	○	—
Bosentan	—	○	—
Busulfan	○	○	○
Carbamazepine	○	○	○
Cisplatin	—	○	—
Cyclophosphamide	○	○	○
Cytarabine	○	○	—
Dabrafenib	—	○	—
Dasatinib	—	○	—
Fluconazole	○	○	○
5-Fluorouracil	○	○	○
Hydroxyurea	○	○	○
Ibrutinib	—	○	○
Ibuprofen	○	○	—
Imatinib	—	○	—
Isotretinoin (13- <i>cis</i> -retinoic acid)	○	○	○
Methotrexate	○	○	○
Pazopanib	—	○	○
Phenytoin (Diphenylhydantoin)	○	○	○
Pomalidomide	▲	○	○
Ribavirin	—	○	○
Tacrolimus	—	○	○
Thalidomide	○	○	○
Topiramate	○	○	○
Tretinoin (all- <i>trans</i> -retinoic acid)	○	○	○
Trimethadione	○	○	—
Valproic acid	○	○	○
Vismodegib	▲	○	—

○：陽性物質、▲：陽性と推定される物質、—：該当せず

1.3.1 陽性対照物質

ACITRETIN (ETRETIN)

CAS No.: 55079-83-9

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
7.5 mg/kg oral GD7-16 (Kistler)  C <sub>max</sub> = 1.5 μg/mL <sup>a</sup> AUC = 6.6 μg·h/mL <sup>a</sup>	15 mg/kg oral GD7-16 (Kistler)  C <sub>max</sub> = 3.0 μg/mL <sup>a</sup> AUC = 13.2 μg·h/mL <sup>a</sup>	15 mg/kg: malformed humeri, dilated renal pelvis  30 mg/kg: cleft palate; malformed humeri, radii and ulnae	0.2 mg/kg oral GD7-19 (Kistler)  no PK data available	0.6 mg/kg oral GD7-19 (Kistler)  no PK data available	0.6 mg/kg: cleft palate, open eyelid, skeletal  2 mg/kg: cleft palate, skull and tail malformations, ectrodactyly of the fore- and hindfeet and malformations of the long bones	50 mg (0.83 mg/kg, 29.4 mg/m <sup>2</sup> )  Exposure values at steady state: C <sub>max</sub> = 0.79 μg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> : 3.6 μg·h/mL <sup>b</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 1.9 (1.5/0.79) AUC = 1.8 (6.6/3.6)  <u>rabbit</u> <sup>c</sup> C <sub>max</sub> = 0.2 (0.2/0.83) AUC = 0.08 (2.4/29.4)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 3.8 (3.0/0.79)	Acitretin is the major metabolite (free acid) of etretinate (ethyl ester)

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit NOAEL</b>	<b>Rabbit LOAEL</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat</b>	<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>Findings</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
							AUC = 3.7 (13.2/3.6) <u>rabbit<sup>c</sup></u> C <sub>max</sub> = 0.7 (0.6/0.83) AUC = 0.2 (7.2/29.4)	

a: Extrapolated from reported values at 5 mg/kg (Brouwer): C<sub>max</sub> = ~1.0 µg/mL from visual inspection of graph, AUC = 4.4 µg·h/mL.

b: Steady state values after 21 daily doses administered with food (FDA, United States): C<sub>max</sub> = 0.786 µg/mL, AUC<sub>(0-24h)</sub> = 3.569 µg·h/mL.

c: In the absence of rabbit PK data, C<sub>max</sub> ratio was based on mg/kg dose ratio and AUC was based on mg/m<sup>2</sup> dose ratio.

### References

Brouwer KR, McNamara PJ. Influence of pregnancy on the pharmacokinetic disposition of two aromatic retinoids (etretinate and acitretin) in the rat. II. Single and multiple oral dosing studies. Drug Metab Dispos. 1989;17:652-5.

FDA, United States. Approval package review of NDA 019821, part 01 (28 Oct 1996), page 86.

Kistler A, Hummler H. Teratogenesis and reproductive safety evaluation of the retinoid etretin (Ro 10-1670). Arch Toxicol. 1985;58:50-6.

### Additional References Evaluated

FDA, United States. Pharm/tox review of NDA 019821 (08 Jun 1988), page 13. [There were no details provided for study findings, study appears to be the same as reported by Kistler and Hummer.]

## ACETYLSALICYLIC ACID (ASPIRIN)

CAS No.: 50-78-2

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
125 mg/kg oral GD6-17 (n=20 Sprague Dawley) [Gupta] <sup>a</sup>  <u>aspirin</u> C <sub>max</sub> = ~25 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 6.6 – 25.3 µg·h/mL <sup>b</sup>  <u>salicylate</u> C <sub>max</sub> = 132 µg/mL <sup>c</sup> AUC = 8333 µg·h/mL <sup>d</sup>	200 mg/kg oral GD7-17 (n=20 Sprague Dawley) [Nakatsuka] <sup>e</sup>  <u>aspirin</u> C <sub>max</sub> = ~40 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 10.5 – 40.5 µg·h/mL <sup>b</sup>  <u>salicylate</u> C <sub>max</sub> = 211 µg/mL <sup>c</sup> AUC = 13,333 µg·h/mL <sup>d</sup>	<u>Nakatsuka (200 mg/kg):</u> malformations including craniorachischisis, abdominal hernia, exencephaly, club foot, open eyelid, severe defects of vertebral and costal bones; increased resorptions  <u>Gupta (250 mg/kg):</u>	350 mg/kg oral GD7-19 (n=20 NZW) [Cappon] <sup>f</sup>  <u>aspirin:</u> aspirin PK data in rabbits is not available  <u>salicylate</u> C <sub>max</sub> = 490 µg/mL <sup>g</sup> AUC = 4865 µg·h/mL <sup>g</sup>	Not Applicable: no MEFL findings in rabbits up to a maternally toxic dose	None	650 mg (10.8 mg/kg) q4h 3900 mg daily oral (2294 mg/m <sup>2</sup> daily)  <u>aspirin</u> C <sub>max</sub> = 7.08 µg/mL <sup>h</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 48.3 µg·h/mL <sup>h</sup>  <u>salicylic acid</u> C <sub>max</sub> = 45.2 µg/mL <sup>i</sup> AUC = 1448 µg·h/mL <sup>i</sup>	<b>Aspirin</b> NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 3.5 (25/7.08) AUC = 0.1 – 0.5 (6.6/48.3 to 25.3/48.3)  <u>rabbit</u> <sup>j</sup> C <sub>max</sub> = 32.4 (350/10.8) AUC = 1.8 (4200/2294)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 5.6 (40/7.08) AUC = 0.2 – 0.8 (10.5/48.3 to 40.5/48.3)	The aspirin metabolite, salicylate (salicylic acid) has much higher concentrations in comparison to the parent and is pharmacologically active. Since aspirin concentrations were often BLQ, salicylate exposure data are also reported.

		<p>ablepharia,  cranio-  rachischisis,  exencephaly,  various low  occurrence head  malformations,  bent fore and hind  paw, kinked tail,  protruding tongue,  gastroschisis,  ectopic adrenal,  various low  occurrence cardio-  vascular  malformations,  VSD, DH,  hypoplastic  kidney,  hypoplastic testes;  decreased  implantations,  increased  resorptions and</p>				<p><u>rabbit</u>  LOAEL not identified</p> <p><b>Salicylate</b>  NOAEL:</p> <p><u>rat</u>  C<sub>max</sub>: 2.9 (132/45.2)  AUC: 5.8  (8333/1448)</p> <p><u>rabbit</u>  C<sub>max</sub>: 10.8 (490/45.2)  AUC: 3.4  (4865/1448)</p> <p>LOAEL:</p> <p><u>rat</u>  C<sub>max</sub>: 4.7 (211/45.2)  AUC: 9.2  (13,333/1448)</p> <p><u>rabbit</u>  LOAEL not identified</p>	<p>salicylic acid  MW = 138.12  g/mol</p> <p>aspirin  MW = 180.16  g/mol</p>
--	--	--	--	--	--	--	--

		post implantation loss						
--	--	---------------------------	--	--	--	--	--	--

- a: Nakatsuka and Fujii reported a NOAEL of 100 mg/kg in Sprague Dawley rats; the highest NOAEL of the 2 studies is reported here.
- b: Extrapolated or actual reported value at 200 mg/kg oral dose in Sprague Dawley rats (Wientjes):  $C_{\max} = 40 \mu\text{g/mL}$  (visual inspection of Figure 1);  $\text{AUC} = 629 - 2430 \mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$  (recalculated as  $10.5 - 40.5 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ).  $C_{\max}$  data for aspirin is also available in Wistar rats administered 200 mg/kg (Higgs).
- c: Extrapolated from reported value at 200 mg/kg oral dose in Sprague Dawley rats (Wientjes):  $C_{\max} = 211 \mu\text{g/mL}$  (Table 5); no AUC values were reported for salicylate.  $C_{\max}$  data for salicylate is also available in Wistar rats administered 200 mg/kg (Higgs) and in Fischer rats administered 90 mg/kg (Kapetanovica).
- d: Extrapolated from reported value at oral 90 mg/kg/day on D15 in Fischer rats (Kapetanovica):  $\text{AUC} = 6000 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . Note the AUC in Table 2 is reported as  $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ , but this is incompatible with the plot in Figure 1a. An AUC estimated from concentrations visually estimated from Figure 1a was  $5319 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  (personal calculation); thus it is assumed that the reported value should actually be  $6000 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- e: Gupta reported a LOAEL of 250 mg/kg in Sprague Dawley rats; the lowest LOAEL of the 2 studies is reported here.
- f: Data from Cappon is reported since the study design complied with ICH S5 standards. Data are also available in which 200 mg/kg was reported as the NOAEL (McColl, Schardein), but these studies were pre-ICH S5. McColl reported small auricles in hearts (18% v 4.5% in controls) and increased presence of 13th rib (93% vs 56% in controls) at 200 mg/kg aspirin, but these are considered variations. Schardein reported marked reduction in litter size at 200 mg/kg/day, but this dose was maternally toxic.
- g: Extrapolated from reported values on D3 after 50 mg/kg/day oral dose in NZW rabbits (Marangos):  $C_{\max} = 70 \mu\text{g/mL}$  and  $\text{AUC} = 695 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . Note that the extrapolation is 7-fold and that there are no data available on the linearity of the pharmacokinetics in rabbits.
- h: Extrapolated to 6 daily doses every 4 hours from reported values after a single 1000 mg dose (Schurer):  $C_{\max} = 10.89 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC} = 12.38 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . The  $C_{\max}$  after a single dose likely represents the  $C_{\max}$  at steady state since the half life is short (approximately 0.5 hours) and no accumulation is expected using the equation:  $\text{accumulation} = 1/(1 - e^{-k\tau})$ , where  $k = 0.693/t_{1/2}$  with  $t_{1/2} = 0.5$  hours and  $\tau = 4$  hours. For  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})}$ , the single dose AUC at 1000 mg was extrapolated to 650 mg and multiplied by 6 (the maximum recommended doses in 24 hours). Data are also available following administration of 500 mg (Nagelschmitz).



- i: Extrapolated to 6 daily doses every 4 hours from reported values after a single 1000 mg dose (Schurer):  $C_{\max} = 53.5 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC} = 371.32 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . For  $C_{\max}$ , an accumulation factor of 1.3 was applied that was estimated from the equation:  $\text{accumulation} = 1/(1 - e^{-k\cdot\text{tau}})$ , where  $k = 0.693/t_{1/2}$  with  $t_{1/2} = 2.0$  hours and  $\text{tau} = 4$  hours (i.e.,  $1/(1 - e^{-1.386}) = 1/(1 - 0.25) = 1/0.75 = 1.3$ ). For  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})}$ , the single dose AUC at 1000 mg was extrapolated to 650 mg and multiplied by 6 (the maximum recommended doses in 24 hours). Data are also available following administration of 500 mg (Nagelschmitz).
- j: In the absence of PK data,  $C_{\max}$  ratio was based on mg/kg dose ratio and AUC was based on  $\text{mg}/\text{m}^2$  dose ratio.

### References

- Cappon GD, Gupta U, Cook JC, Tassinari MS, Hurtt ME. Comparison of the developmental toxicity of aspirin in rabbits when administered throughout organogenesis or during sensitive windows of development. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2003;68:38-46.
- Gupta U, Cook JC, Tassinari MS, Hurtt ME. Comparison of developmental toxicology of aspirin (acetylsalicylic acid) in rats using selected dosing paradigms. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2003;68:27-37.
- Kapetanovic IM, Bauer KS, Tessier DM, Lindeblad MO, Zakharov AD, Lubet R, et al. Comparison of pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of aspirin following oral gavage and diet dosing in rats. *Chem Biol Interact.* 2009;179:233-9.
- Marangos MN, Onyeji CO, Nicolau DP, Nightingale CH. Disposition kinetics of aspirin in female New Zealand white rabbits. *Lab Anim Sci.* 1995;45:67-9.
- Nakatsuka T, Fujii T. Comparative teratogenicity study of diflunisal (MK-647) and aspirin in the rat. *Oyo Yakuri.* 1979;17:551-7.
- Schurer M, Bias-Imhoff U, Schulz HU, Schwantes U, Riechers AM. Lack of influence of glycine on the single dose pharmacokinetics of acetylsalicylic acid in man. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1996;34:282-7.
- Wientjes MG, Levy G. Nonlinear pharmacokinetics of aspirin in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;245:809-15.

### Additional References Evaluated

- Higgs GA, Salmon JA, Hendersonn B, Vane JR. Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1986;84:1417-20.
- McCull JD, Robinson S, Globus M. Effect of some therapeutic agents on the rabbit fetus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1967;10:244-252.
- Nagelschmitz J, Blunck M, Kraetzschmar J, Ludwig M, Wensing G, Hohlfeld T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacol.* 2014;6:51-9.

Schardein JL, Blatz AT, Woosley ET, Kaump DH. Reproduction studies on sodium meclufenamate in comparison to aspirin and phenylbutazone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1969;15:46-55.

**ALL-TRANS-RETINOIC ACID (ATRA), TRETINOIN**

CAS No.: 302-79-4

<b>Rat NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Human Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Margins<sup>a</sup></b> <b>NOAEL/Human</b> <b>LOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
5 mg/kg oral GD6-15 (Wistar) [Seegmiller]  C <sub>max</sub> = 0.15 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-8h)</sub> = 0.25 µg·h/mL <sup>b</sup>	10 mg/kg oral GD6-15 (Wistar) [Seegmiller]  C <sub>max</sub> = 0.30 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-8h)</sub> = 0.50 µg·h/mL <sup>b</sup>	cleft palate, sporadic gross external and soft tissue malformations, skeletal alterations	2 mg/kg oral GD6-18 [Tzimas, 1994]  C <sub>max</sub> = 0.10 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 0.207 µg·h/mL <sup>c</sup>	6 mg/kg oral GD6-18 [Tzimas, 1994]  C <sub>max</sub> = 0.30 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-8h)</sub> = 0.622 µg·h/mL <sup>c</sup>	fetal resorptions and a decrease in live fetuses; visceral ectopia, skin erosions, acaudia, torsion of hindlimbs, and omphalocele	45 mg/m <sup>2</sup> /day in two divided doses  C <sub>max</sub> = 0.394 µg/mL <sup>d</sup> AUC = 0.537 µg·h/mL <sup>d</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.4 (0.15/0.394) AUC = 0.5 (0.25/0.537)  <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 0.3 (0.100/0.394) AUC = 0.4 (0.207/0.537)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.8 (0.30/0.394)	tretinoin induces its own metabolism, so PK margins are highly dependent on day of assessment

							AUC = 0.9 (0.50/0.537)	
							<u>rabbit</u>	
							C <sub>max</sub> = 0.8 (0.300/0.394)	
							AUC = 1.2 (0.622/0.537)	

- a: Since tretinoin induces its own metabolism, which causes a significant decrease in plasma exposures with repeated dosing, single dose PK data in animals and humans were used for calculating exposure margins.
- b: Extrapolated or actual value after single 5 mg/kg oral dose on GD9 in Wistar rats (Tzimas 1997): C<sub>max</sub> = 0.15 µg/mL, AUC<sub>(0-8h)</sub> = 0.25 µg·h/mL. Pharmacokinetic data are also available after a single dose of 6 mg/kg on GD12 (Collins, 1995): C<sub>max</sub> = 0.320 µg/mL from visual inspection of graph, AUC<sub>(0-8h)</sub> = 0.820 µg·h/mL; as well as after 6 daily doses (Collins 1994, 1995): C<sub>max</sub> = 0.046 or 0.052 µg/mL, and AUC<sub>(0-24h)</sub> = 0.098 µg·h/mL or AUC<sub>(0-10h)</sub> = 0.090 µg·h/mL, respectively.
- c: Extrapolated or actual value after single 6 mg/kg oral dose on GD12 in Swiss hare rabbits (Collins 1995): C<sub>max</sub> = 0.300 µg/mL from visual inspection of graph, AUC<sub>(0-8h)</sub> = 0.622 µg·h/mL. Pharmacokinetic data are also available following 6 daily doses in Swiss hare rabbits (Collins 1995): C<sub>max</sub> = 0.110 µg/mL, AUC<sub>(0-10h)</sub> = 0.281 µg·h/mL; and from (Tzimas 1994): C<sub>max</sub> = 0.105 µg/mL, AUC<sub>(0-24h)</sub> = 0.321 µg·h/mL.
- d: PK data after first dose (US label).

## References

- Collins MD, Tzimas G, Bürgin H, Hummler H, Nau H. Single versus multiple dose administration of all-trans-retinoic acid during organogenesis: differential metabolism and transplacental kinetics in rat and rabbit. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;130:9-18.
- Seegmiller RE, Ford WH, Carter MW, Mitala JJ, Powers WJ Jr. A developmental toxicity study of tretinoin administered topically and orally to pregnant Wistar rats. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(3 Pt 2):S60-6

Tzimas G, Bürgin H, Collins MD, Hummler H, Nau H. The high sensitivity of the rabbit to the teratogenic effects of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) is a consequence of prolonged exposure of the embryo to 13-cis-retinoic acid and 13-cis-4-oxo-retinoic acid, and not of isomerization to all-trans-retinoic acid. *Arch Toxicol.* 1994;68:119-28.

Tzimas G, Thiel R, Chahoud I, Nau H. The area under the concentration-time curve of all-trans-retinoic acid is the most suitable pharmacokinetic correlate to the embryotoxicity of this retinoid in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;143:436-44.

US label tretinoin.

#### **Additional References Evaluated**

Collins MD, Tzimas G, Hummler H, Bürgin H, Nau H. Comparative teratology and transplacental pharmacokinetics of all-trans-retinoic acid, 13-cis-retinoic acid, and retinyl palmitate following daily administrations in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;127:132-44. [PK data after 6 daily doses]

Kochhar DM, Christian MS. Tretinoin: a review of the nonclinical developmental toxicology experience. *J Am Acad Dermatol.* 1997;36(3 Pt 2):S47-59. [review article of other papers already cited]

Tembe EA, Honeywell R, Buss NE, Renwick AG. All-trans-retinoic acid in maternal plasma and teratogenicity in rats and rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;141:456-72. [single dose teratology and PK at  $\geq 20$  mg/kg]

FDA, United States. Pharmtox review of NDA 021108/S000 (31 Aug 2000), page 16,26. [p. 16: same study as Seegmiller; p. 26: review mentions “only a modest increase in intrauterine death” at 2.5 mg/kg in an oral rat developmental toxicity study, but there are no study details to allow confirmation].

US label tretinoin. [fetal resorptions and a decrease in live fetuses were stated as findings in all species studied, but the dose at which these occurred was not mentioned]

**Bosentan**

CAS No.: 147536-97-8

<b>Rat NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
60 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States, p. 39, 155)  C <sub>max</sub> = 4.5 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 13.2 µg·h/mL <sup>a</sup>	300 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States, p. 39, 155)  C <sub>max</sub> = 16.25 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 53.5 µg·h/mL <sup>b</sup>	<u>Cesarean sections</u> 300 mg/kg: agenesi s of soft palate (1 litter) 1500 mg/kg: agenesi s of soft palate (14 litters), shortened tongues, abnormal origin of the right subclavian artery (1 litter); abnormalities of the skull (shortened and misshapen mandibles, abnormally shaped palatine, abnormally shaped tympanic annulus and hyoid bone, fusion of the pterygoid process with the tympanic annulus, bent internal pterygoid process)  <u>Spontaneous delivery fetuses (PPND groups) that died on study:</u> <sup>c</sup> 300 mg/kg: agenesi s of the soft palate, anophthalmia, and microphthalmia	1500 mg/kg/day oral (750 mg/kg BID) GD7-18 (FDA, United States, p. 66)  C <sub>max</sub> = 1.435 µg/mL <sup>d</sup> AUC = 27.7 µg·h/mL <sup>d</sup>	LOAEL not identified	none	

- a: Extrapolated from reported values in plasma after 10 doses of 200 mg/kg oral bosentan in pregnant rats (FDA, United States, p. 78):  $C_{\max} = 15 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC} = 44 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- b: Interpolated from reported values in plasma after 10 doses of 200 and 600 mg/kg oral bosentan in pregnant rats (FDA, United States, p. 78): at 200 mg/kg,  $C_{\max} = 15 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC} = 44 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ; at 600 mg/kg,  $C_{\max} = 20 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC} = 82 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- c: In a separate PPND study with higher levels of impurities and pup sacrifice on PND4, agenesis of the soft palate was also observed in 3 litters at 120 mg/kg (FDA, United States, p. 58)
- d: Actual values in plasma after 12 doses of 1500 mg/kg/day oral bosentan administered as 2 divided doses (750 mg/kg each) 5 to 6 hours apart in pregnant Himalayan rabbits (FDA, United States, p. 78):  $C_{\max} = 1.435 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC} = 27.70 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .

## References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 021290 (30 Aug 2001).

**Busulfan**

CAS No.: 55-98-1

<b>Rat NOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rat LOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Human Dose<sup>a</sup> C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Margins NOAEL/Human LOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
NOAEL not identified	3 mg/kg oral single dose GD12 (18 mg/m <sup>2</sup> ) [Dodo]  C <sub>max</sub> = 0.84 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 2.70 µg·h/mL <sup>b</sup>	3 mg/kg: fused carpal bones  10 mg/kg: low incidence of limb and rib malformations  30 mg/kg: high incidence of limb and rib malformations	1.3 mg/kg oral GD7–14 (15.6 mg/m <sup>2</sup> ) [Somers]  no rabbit PK data found	3.6 mg/kg oral GD7-14 (43.2 mg/m <sup>2</sup> ) [Somers]  no rabbit PK data found	increased resorptions and decreased live young, abnormalities in liver and gall bladder	4 – 8 mg daily oral (0.06 – 0.13 mg/kg, 2.4 – 4.7 mg/m <sup>2</sup> )  <u>for 8 mg dose</u>  C <sub>max</sub> = 0.128 µg/mL <sup>c</sup> AUC = 0.529 µg·h/mL <sup>c</sup>	NOAEL: <u>rat</u> NOAEL not identified <u>rabbit<sup>d</sup></u>  C <sub>max</sub> = 10 (1.3/0.13) AUC = 3.3 (15.6/4.7)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 6.6 (0.84/0.128) AUC = 5.1 (2.7/0.529) <u>rabbit<sup>d</sup></u>	human dose is daily but MEFL NOAEL was single dose, margins likely even lower if rats dosed through organogenesis



								$C_{\max}$ = 27.7 (3.6/0.13) AUC = 9.2 (43.2/4.7)
--	--	--	--	--	--	--	--	--

- a: Note that Busulfex is a concentrated busulfan intravenous formulation with dimethylformamide indicated for bone marrow ablation. Myleran is the original busulfan oral drug product indicated for treatment of chronic myelogenous leukemia. The doses used below are for remission induction in chronic myelogenous leukemia.
- b: Extrapolated from reported values after 1 mg/kg busulfan oral dose to fasted rats (strain not specified) (FDA, United States):  $C_{\max}$  = 0.28  $\mu\text{g/mL}$ , AUC = 0.9  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- c: Extrapolated from the average of dose-normalized (to 2 mg) values across the range 2 to 6 mg ( $C_{\max}$  = 0.03  $\mu\text{g/mL}$ , AUC = 0.130  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ) and dose-normalized values (to 4 mg) from 4 and 8 mg in a separate study ( $C_{\max}$  = 0.068  $\mu\text{g/mL}$ , AUC = 0.269  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ) (US label, Ehrsson).
- d: In the absence of rabbit PK data,  $C_{\max}$  ratio was based on mg/kg dose ratio and AUC was based on  $\text{mg/m}^2$  dose ratio.

### References

- Dodo T, Uchida K, Hirose T, Fukuta T, Kojima C, Shiraishi I, et al. Increases in discontinuous rib cartilage and fused carpal bone in rat fetuses exposed to the teratogens, busulfan, acetazolamide, vitamin A, and ketoconazole. *Hum Exp Toxicol.* 2010;29:439-50.
- Ehrsson H, Hassan M, Ehrnebo M, Beran M. Busulfan kinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 1983;34:86-9.
- FDA, United States. Pharmtox review NDA 020954 (04Feb1999), page 11.
- Somers GF. The evaluation of drugs for foetal toxicity and teratogenicity in the rabbit. *Excerpta Medica International Congress.* 1969;181:227-34. [*Proc Eur Soc Study Drug Toxic.* 1969;10:227-34].

### Additional References Evaluated

- Bishop and Wassom. Toxicological review of busulfan (Myleran). *Mutat Res.* 1986;168:15-45.

# CARBAMAZEPINE

CAS No.: 298-46-4

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
200 mg/kg oral GD7-18 [Vorhees] <sup>a</sup>  C <sub>max</sub> = 33 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-24 h)</sub> = 547 µg·h/mL <sup>b</sup>	400 mg/kg oral GD4-14 [FDA, United States 1967, Vorhees]  C <sub>max</sub> = 65 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 1094 µg·h/mL <sup>b</sup>	<u>400 mg/kg GD4-14</u> [FDA, United States 1967] abortions  <u>600 mg/kg GD7-18</u> <u>SD rats [Vorhees]</u> increased resorptions, increased kinked tails  <u>650 mg/kg [US</u> <u>label]</u> offspring showed low incidence of	NOAEL was not identified [FDA, United States 1967]	225 mg/kg GD5- 12 [FDA, United States 1967]  C <sub>max</sub> = 29 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 267 µg·h/mL <sup>c</sup>	No malformations up to 450 mg/kg GD5- 12 Decreased numbers of fetuses, increased resorptions at 225 – 450 mg/kg	Up to 800 mg twice daily (1600 mg/day)  C <sub>max</sub> = 11.7 µg/mL <sup>d</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 232 µg·h/mL <sup>d</sup>	NOAEL: <u>Rat</u> C <sub>max</sub> = 2.8 (33/11.7) AUC = 2.4 (547/232)  <u>Rabbit</u> No NOAEL identified  LOAEL: <u>Rat</u> C <sub>max</sub> = 5.6 (65/11.7) AUC = 4.7 (1094/232)  <u>Rabbit</u>	Human exposure is invariant, independent of dose.

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
		cleft palate, talipes, or anophthalmos					C <sub>max</sub> = 2.5 (29/11.7) AUC = 1.2 (267/232)	

- a: Data from Vorhees was used for establishing the NOAEL because the data were much more detailed than provided in the FDA, United States review, which suggested a NOAEL of 300 mg/kg.
- b: Extrapolated or actual data after 200 mg/kg oral single dose in Sprague Dawley male rats (Shi): C<sub>max</sub> = 32.7 µg/mL, AUC<sub>(0-24h)</sub> = 32.8 mg·min/mL (547 µg·h/mL).
- c: Extrapolated from reported value after 80 mg/kg oral single dose in Angora grey rabbits (Kourmaravelou): C<sub>max</sub> = 10.4 µg/mL, AUC<sub>(0-24h)</sub> = 94.8 µg·h/mL. Data are also available from Abushammala at a dose of ~20.6 mg/kg. The data from Kourmaravelou were used because the dose was closer to the LOAEL, which provided a smaller extrapolation range (<3-fold).
- d: From actual data for 1600 mg dose of conventional tablet carbamazepine (FDA, United States 1996). C<sub>max</sub> = 11.66 µg/mL, AUC = 232.27 µg·h/mL.

## References

- FDA, United States. Pharmtox review of Tegretol NDA 016608 Part 02 (19 December 1967), page 5.
- FDA, United States. Approval package of Carbatrol NDA 020712 Part 02 (23 December 1996), page 33.
- Koumaravelou K, Adithan C, Shashindran CH, Asad M, Abraham BK. Effect of honey on carbamazepine kinetics in rabbits. Indian J Exp Biol. 2002;40:560-3.
- Shi L, Dang XL, Liu XY, Wei HM, Yang MM, Zhang Y. Effect of *Sophora flavescens* on the pharmacokinetics of carbamazepine in rats. Arch Pharm Res. 2014;37:1617-23.

US Label Tegretol.

Vorhees CV, Acuff KD, Weisenburger WP, Minck DR. Teratogenicity of carbamazepine in rats. *Teratology*. 1990;41:311-17.

**Additional References Evaluated**

Abushammala I. The effect of pioglitazone on pharmacokinetics of carbamazepine in healthy rabbits. *Saudi Pharm J*. 2015;23:177-81.

El-Sayed MG, Aly AE, Kadri M, Moustafa AM. Comparative study on the teratogenicity of some antiepileptics in the rat. *East Afr Med J*. 1983;60:407-15.

Tolbert D, Cloyd J, Biton V, Bekersky I, Walzer M, Wesche D, et al. Bioequivalence of oral and intravenous carbamazepine formulations in adult patients with epilepsy. *Epilepsia*. 2015;56:915-23. (PK data for oral carbamazepine was similar to cited data, AUC is invariant across dose levels.)

## CISPLATIN

CAS No.: 15663-27-1

<b>Rat NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
0.3 mg/kg IP on GD6,8,11, or 14 in Wistar rats (Keller)  C <sub>max</sub> = 0.32 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 0.25 µg·h/mL <sup>a</sup>	1 mg/kg IP on GD8 or 11 in Wistar rats (Keller)  C <sub>max</sub> = 1.08 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 0.85 µg·h/mL <sup>a</sup>	increased fetal mortality, decreased live fetuses per dam	NOAEL not identified	LOAEL not identified	No data found	

a: Extrapolated from values in plasma (unbound) after an intraperitoneal 5 mg/kg cisplatin single dose in male Donryu rats (Tamura): C<sub>max</sub> = 5.4 µg/mL, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 254 µg·min/mL (4.23 µg·h/mL).

### References

Keller KA, Aggarwal SK. Embryotoxicity of cisplatin in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1983;69:245-56.  
Tamura T, Imai J, Matsukawa Y, Horikiri Y, Suzuki T, Yoshino H, et al. Pharmacokinetic behaviour of cisplatin in peritoneal fluid after intraperitoneal administration of cisplatin-loaded microspheres. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53:1331-9.

### Additional References Evaluated

Chen Y, Brott D, Luo W, Gangl E, Kamendi H, Barthlow H, et al. Assessment of cisplatin-induced kidney injury using an integrated rodent platform. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268:352-61.  
Darwish MA, Abo-Youssef AM, Khalaf MM, Abo-Saif AA, Saleh IG, Abdelghany TM. Resveratrol influences platinum pharmacokinetics: A novel mechanism in protection against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett.* 2018;290:73-82.

Okada A, Fukushima K, Fujita M, Nakanishi M, Hamori M, Nishimura A, et al. Alterations in cisplatin pharmacokinetics and its acute/sub-chronic kidney injury over multiple cycles of cisplatin treatment in rats. *Biol Pharm Bull.* 2017;40:1948-55.

Sekiya S, Iwasawa H, Takamizawa H. Comparison of the intraperitoneal and intravenous routes of cisplatin administration in an advanced ovarian cancer model of the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1985;153:106-11. [No  $C_{\max}$  or AUC values were reported. Substantial differences in PK were noted between the intravenous and intraperitoneal routes]

Toro-Cordova A, Flores-Cruz M, Santoyo-Salazar J, Carrillo-Nava E, Jurado R, Figueroa-Rodriguez PA, et al. Liposomes loaded with cisplatin and magnetic nanoparticles: physicochemical characterization, pharmacokinetics, and *in vitro* efficacy. *Molecules.* 2018;23(9). pii: E2272. doi: 10.3390/molecules23092272. [PK following 6 mg/kg intravenous cisplatin:  $C_{\max} = 21.3 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-t)} = 7.49 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}\cdot\text{kg}$ , which is  $2.25 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  in 300 g rats.]

### Summary of Cisplatin PK data evaluated

Note: There was no obvious choice for the best PK data to use. Chen required a 15-fold extrapolation, Darwish was unclear whether the data were total Pt or unbound drug, and Tamura used a different strain of rat (Donryu) than used for the EFD toxicity study (Wistar). There are substantial differences in PK between the intravenous and intraperitoneal routes (Sekiya, et al., 1985), so intravenous data were not used.

Reference	Route	Dose (mg/kg)	C <sub>max</sub> (µg/mL)		AUC (µg·h/mL)		Notes
			Reported	Normalized to 1.0 mg/kg	Reported	Normalized to 1.0 mg/kg	
Chen	IP	15	10.36	0.69	81.74 (0-inf)	5.45	unbound drug (DDTC-derivatized)
Darwish	IP	6	5.66	0.94	9.77	1.63	unclear whether unbound or total drug
Tamura <sup>a</sup>	IP	5	5.4	1.08	4.23	0.85	unbound drug (ultrafilterable)
Okada	IV	5	7.3	1.5	3.0 (0-2h)	0.6	unbound drug (DDTC-derivatized)
Toro-Cordova	IV	6	21.3	3.55	2.25 <sup>b</sup> (0-t)	0.375	unbound (ultrafilterable, DDTC-derivatized)

All studies used male Wistar rats except for Tamura et al., which used male Donryu rats.

a: PK parameters were derived from Figure 4 using scanning software (CurveUnscan).

b: Reported as AUC<sub>(0-t)</sub> = 7.49 µg·h/mL·kg, which is 2.25 µg·h/mL in 300 g rats.

## Cyclophosphamide

CAS No.: 50-18-0

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Huma LOAEL/Human	Notes
NOAEL not identified (<2.5 mg/kg) [Chaube]	2.5 mg/kg IP GD9 [Chaube] <u>Cytosax</u> C <sub>max</sub> = 4.1 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 3.65 µg·h/mL <sup>a</sup> <u>PM</u> C <sub>max</sub> = 0.55 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 2.13 µg·h/mL <sup>b</sup>	<u>2.5 mg/kg GD9</u> [Chaube] embryoethal <u>5 mg/kg GD11</u> [von Kreybig, Mirkes] encephalocele, exencephaly, microcephaly, limb defects (ie, syndactyly and ectrodactyly), defective facial	NOAEL not identified (<30 mg/kg)	30 mg/kg IV single doses on GD6-14 [Mirkes, Fritz] <u>Cytosax</u> C <sub>max</sub> = 151 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-8h)</sub> = 24.1 µg·h/mL <sup>d</sup> <u>PM</u> C <sub>max</sub> = 0.07 µg/mL <sup>e</sup> AUC <sub>(0-8h)</sub> = 0.297 µg·h/mL <sup>e</sup>	embryo-fetal resportions, omphalocele, cleft lip/ palate, forelimb skeletal defects	1600 mg/m <sup>2</sup> (40 mg/kg) IV (highest dose, q 3 – 4 weeks) <sup>f</sup> <u>Cytosax</u> C <sub>max</sub> = 106 µg/mL <sup>g</sup> AUC = 798 µg·h/mL <sup>g</sup> <u>PM</u> C <sub>max</sub> = 14.4 µg/mL <sup>h</sup> AUC = 352 µg·h/mL <sup>h</sup>	NOAEL: <u>rat</u> : NOAEL not identified, but LOAEL margins were <0.1 <u>rabbit</u> NOAEL not identified, but LOAEL margins were <1.5 LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> : 0.04 (4.1/106) AUC: (3.65/798) <u>rabbit</u>	• MW CP = 261.086 • MW PM = 221.018 • Cytosax is a prodrug, MEFL has been attributed to both phosphoramidate mustard (PM) and acrolein metabolites



		development (cleft palate)					$C_{\max} = 1.4$ (151/106) $AUC = 0.03$ (24.1/798)  <u>PM margins</u>  <u>rat</u> $C_{\max} = 0.04$ (0.55/14.4) $AUC = 0.006$ (2.13/352)  <u>rabbit</u> $C_{\max} = 0.005$ (0.07/14.4) $AUC = 0.0008$ (0.297/352)	
--	--	-------------------------------	--	--	--	--	---	--

- a: Extrapolated from reported value after 20 mg/kg intravenous single dose in Sprague Dawley rats (Hong):  $C_0 = 125.3 \mu\text{M}$  (32.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $AUC/D = 265.3 \text{ min}/\text{L}$  (in rats with mean BW = 0.330 kg the administered dose = 6.6 mg/rat; thus  $AUC = 265.3 \text{ min}/\text{L} \times 6.6 \text{ mg} = 1751 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{L} = 29.2 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ).
- b: Extrapolated from reported value after 20 mg/kg intravenous single dose in Sprague Dawley rats (Hong):  $C_{\max} = 20 \mu\text{M}$  (4.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from visual inspection of graph,  $AUC_{(0-24\text{h})} = 76.9 \mu\text{M}\cdot\text{h}$  (17.0  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ) from calculation based on concentration values estimated by visual inspection of graph.
- c: Extrapolated from reported value after 45 mg/kg cytoxin intravenous single dose in 2 New Zealand White rabbits (Holm):  $C_{\max} = 227 \mu\text{g}/\text{mL}$  from visual inspection of graphs (mean of 2 rabbits). Values for the *R* and *S* isomers were added together; parent cytoxin is a racemic mixture. Data are also available after a 20 mg/kg intravenous single dose in New Zealand White rabbits (Anthony), but the reported  $C_{\max}$  value (2.2  $\mu\text{M}$  [0.574  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] from visual inspection of graph) is inconsistent with the reported AUC and thus was not used.
- d: Extrapolated from reported value after 20 mg/kg cytoxin intravenous single dose in New Zealand White rabbits (Anthony):  $AUC_{(0-8\text{h})} = 3683 \mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  (16.0  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ). Data are also available after a 45 mg/kg intravenous single dose in 2 New Zealand White rabbits (Holm), but the reported

AUC values for total racemate (3189 and 1259  $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$  [53.15 and 20.98  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ]) in 2 rabbits differed by 2.5-fold and  $t_{\text{last}}$  was  $\leq 90$  minutes so these values were not used.

e: Extrapolated from reported value after 20 mg/kg cytoxan intravenous single dose in NZW rabbits (Anthony):  $C_{\text{max}} = 0.22 \mu\text{M}$  (0.049  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) from visual inspection of graph,  $\text{AUC}_{(0-8\text{h})} = 53.7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$  (0.198  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ).

f: From SmPC.

g: Extrapolated from reported value after 1000  $\text{mg}/\text{m}^2$  intravenous single dose cytoxan (Chan):  $C_0 = 254.4 \mu\text{M}$  (66.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})} = 1910 \mu\text{M}\cdot\text{h}$  (499  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ).

h: Extrapolated from reported value after 1000  $\text{mg}/\text{m}^2$  intravenous single dose cytoxan (Chan):  $C_0 = 40.5 \mu\text{M}$  (9.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})} = 996.3 \mu\text{M}\cdot\text{h}$  (220  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ).

## References

Anthony LB, Long QC, Struck RF, Hande KR. The effect of cimetidine on cyclophosphamide metabolism in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1990;27:125-30.

Chan KK, Hong PS, Tutsch K, Trump DL. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide and metabolites with and without SR-2508. *Cancer Res.* 1994;54:6421-9.

Chaube S, Kury G, Murphy ML: Teratogenic effects of cyclophosphamide (NSC-26271) in the rat. *Cancer Chemother Rep* 1967;51:363-76.

Fritz H, Hess R. Effects of cyclophosphamide on embryonic development in the rabbit. *Agents Actions.* 1971;2:83-6.

Holm KA, Kindberg CG, Stobaugh JF, Slavik M, Riley CM. Stereoselective pharmacokinetics and metabolism of the enantiomers of cyclophosphamide. Preliminary results in humans and rabbits. *Biochem Pharmacol.* 1990;39:1375-84.

Hong PS, Srigratsanapol A, Chan KK. Pharmacokinetics of 4-hydroxycyclophosphamide and metabolites in the rat. *Drug Metab Dispos.* 1991;19:1-7.

Mirkes PE. Cyclophosphamide teratogenesis: a review. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1985;5:75-88.

von Kreybig T. Die teratogene wirkung cyclophosphamid wahrend der embryonalen entwicklungsphase bei der ratte. *Naunyn-Schniedeb Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1965;252:173-95.

## Additional References Evaluated

Claussen U, Hettwer H, Voelcker G, Kregel HG, Servos G. The embryotoxicity of cyclophosphamide in rabbits during the histiotrophic phase of nutrition. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1985;5:89-100.

US label cyclophosphamide.

## Cytarabine

CAS No.: 147-94-4

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
10 mg/kg IP single dose GD10,11, or 12 [Chaube]  C <sub>max</sub> = ~5.8 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = ~15.9 µg·h/mL <sup>a</sup>	20 mg/kg IP single dose GD11 or 12 [Chaube]  C <sub>max</sub> = ~11.6 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = ~31.7 µg·h/mL <sup>a</sup>	≥20 mg/kg cleft palate, micrognathia, deformed rear appendages, paws and tail; skeletal defects including distortion and fusion of the bones of the skull and appendages, embryofetal mortality	no rabbit data found <sup>b</sup>	no rabbit data found <sup>b</sup>	no rabbit data found	100 mg/m <sup>2</sup> IV every 12 hours (days 1 to 7) many regimens are used including CIV  C <sub>max</sub> = ~2.8 µg/mL <sup>c</sup> AUC = 6.6 µg·h/mL <sup>c</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> : 2.1 (5.8/2.8) AUC: 2.4 (15.9/6.6)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> : 4.1 (11.6/2.8) AUC: 4.8 (31.7/6.6)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• half-life is short, rapidly deaminated to inactive uridine arabinoside by cytidine deaminase</li> <li>• active moiety is Ara-CTP which inhibits DNA polymerase</li> <li>• MW = 243.217</li> </ul>

- a: Extrapolated or reported value after 20 mg/kg intraperitoneal [<sup>14</sup>C]cytarabine single dose in male Sprague Dawley rats (Parker):  $C_{\max} = \sim 11.6 \mu\text{g/mL}$  from visual inspection of graph,  $\text{AUC}_{(0-\infty)} = \sim 31.7 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  from calculation based on concentration values estimated by visual inspection of graph. Note that the reported plasma concentrations represent total radioactivity and that at 4 hours only 71% of the total plasma radioactivity was attributed to intact cytarabine (Parker). The AUC value used, and the calculated margins, thus represents an upper bound and the true AUC for intact cytarabine would certainly be lower. Also note that teratology was performed in Wistar rats. PK data are also available in male Sprague Dawley rats administered 5 mg/kg intravenous cytarabine single dose (Zhang), in male Sprague Dawley rats administered 2.64  $\mu\text{g/kg}$  intravenous [<sup>3</sup>H]cytarabine (Simard), and in Wistar rats administered 5.4 mg/kg intramuscular cytarabine in solution with chitosan-beta-glycerophosphate (Mulik).
- b: Rabbit PK data are available in male New Zealand white rabbits administered single doses 50 mg/kg intravenous cytarabine (Zimmerman):  $C_{\max} = 400 \mu\text{M}$  (97  $\mu\text{g/mL}$ ) from visual inspection of graph,  $\text{AUC}$  estimated from  $\text{CL} = 8.16 \text{ mL}/(\text{min}\cdot\text{kg})$  and dose = 50 mg/kg,  $\text{AUC} = \text{dose}/\text{CL} = (50/8.16)(1 \text{ h}/60 \text{ min}) = 102 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- c: Extrapolated to 100 mg/m<sup>2</sup> BID dose from reported value after single 100 mg intravenous dose (1.67 mg/kg, 60 mg/m<sup>2</sup>) (Wan):  $C_{\max} = \sim 7.0 \mu\text{mol/L}$  (1.7  $\mu\text{g/mL}$ ) from visual inspection of graph,  $\text{AUC} = \text{dose}/\text{CL} = 100 \text{ mg}/845 \text{ mL}/\text{min} = 1.97 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  (which gives  $\text{AUC} = 3.29 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  at 100 mg/m<sup>2</sup> and 6.6  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  for 100 mg/m<sup>2</sup> BID).

Mouse NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Mouse LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Mouse Findings	Margins NOAEL/Human LOAEL Human	Notes
0.5 mg/kg IP GD6-15 Swiss mice [Ortega]  C <sub>max</sub> = ~0.50 µg/mL <sup>d</sup> AUC = ~0.46 µg·h/mL <sup>d</sup>  C <sub>max</sub> = ~0.41 µg/mL <sup>e</sup> AUC = 0.315 µg·h/mL <sup>e</sup>	2 mg/kg IP GD6-15 Swiss mice [Ortega]  C <sub>max</sub> = ~2 µg/mL <sup>d</sup> AUC = ~1.83 µg·h/mL <sup>d</sup>  C <sub>max</sub> = ~1.62 µg/mL <sup>e</sup> AUC = 1.26 µg·h/mL <sup>e</sup>	cleft palate, renouretal alterations, polydactyly, oligodactyly	NOAEL: <u>mice</u> C <sub>max</sub> : 0.16 (0.46/2.8) <sup>f</sup> AUC: 0.06 (0.39/6.6) <sup>f</sup> LOAEL: <u>mice</u> C <sub>max</sub> : 0.65 (1.81/2.8) <sup>f</sup> AUC: 0.23 (1.55/6.6) <sup>f</sup>	this table is included because: a) it shows that with the mouse teratology data, which was included in the US label, exposure margins at the NOAEL were <1, b) rat exposure margins at the NOAEL were much higher, c) rabbit data are not available, so it provides data in a 2nd species

- d: Extrapolated from reported value after administration of a 30 mg/kg intraperitoneal single dose cytarabine to Swiss mice (Dedrick): C<sub>max</sub> = ~30 µg/mL from visual inspection of graph, AUC<sub>(0-24h)</sub> = ~27.5 µg·h/mL from calculation based on concentration values estimated by visual inspection of graph. Note large extrapolation range.
- e: Extrapolated from reported value after administration of a 2.466 mmol/kg (600 mg/kg) intravenous single dose cytarabine to mice (Bayne): C<sub>max</sub> = 2 µmol/mL (486 µg/mL) from visual inspection of graph, AUC = 1.553 µmol·h/mL (378 µg·h/mL). Note large extrapolation range.
- f: Mouse values were taken as the average of the 2 sources, which gave similar values despite the 20-fold difference in administered dose, suggesting PK was linear.

## References

Bayne WF, Mayer LD, Swenson CE. Pharmacokinetics of CPX-351 (cytarabine/daunorubicin HCl) liposome injection in the mouse. J Pharm Sci. 2009;98:2540-8.

Chaube S, Kreis W, Uchida K, Murphy ML. The teratogenic effect of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in the rat. Protection by deoxycytidine. *Biochem Pharmacol.* 1968;17:1213-6.

Dedrick RL, Forrester DD, Cannon JN, el-Dareer SM, Mellett LB. Pharmacokinetics of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (ARA-C) deamination in several species. *Biochem Pharmacol.* 1973;22:2405-17.

Mulik R, Kulkarni V, Murthy RS. Chitosan-based thermosensitive hydrogel containing liposomes for sustained delivery of cytarabine. *Drug Dev Ind Pharm.* 2009;35(1):49-56.

Parker RJ, Priester ER, Sieber SM. Comparison of lymphatic uptake, metabolism, excretion, and biodistribution of free and liposome-entrapped [14C]cytosine-beta-D-arabinofuranoside following intraperitoneal administration to rats. *Drug Metab Dispos.* 1982;10:40-6.

Ortega A, Puig M, Domingo JL. Maternal and developmental toxicity of low doses of cytosine arabinoside in mice. *Teratology.* 1991;44:379-84.

Simard P, Hoarau D, Khalid MN, Roux E, Leroux JC. Preparation and *in vivo* evaluation of PEGylated spherulite formulations. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1715(1):37-48.

Wan SH, Huffman DH, Azarnoff DL, Hoogstraten B, Larsen WE. Pharmacokinetics of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in humans. *Cancer Res.* 1974;34:392-7.

Zhang B, Lu Y, Chen J, Wu W. Effects of interior gelation on pharmacokinetics and biodistribution of liposomes encapsulating an anti-cancer drug cytarabine. *J Biomed Nanotechnol.* 2010;6:704-9.

Zimmerman CL. The disposition of cytosine arabinoside and its metabolite after single doses to rabbits. *Biopharm Drug Dispos.* 1990;11:121-9.

#### **Additional References Evaluated**

Goto T, Endo A. Dose- and stage-related sex difference in the incidence of cytosine arabinoside induced digit anomalies in the mouse fetus. *Teratology.* 1987;35:35-40. [Single dose data only.]

Kochhar DM, Penner JD, McDay JA. Limb development in mouse embryos. II. Reduction defects, cytotoxicity and inhibition of DNA synthesis produced by cytosine arabinoside. *Teratology.* 1978;18:71-92. [Single dose data only.]

Percy DH. Teratogenic effects of the pyrimidine analogues 5-iododeoxyuridine and cytosine arabinoside in late fetal mice and rats. *Teratology.* 1975;11:103-17. [Rats were dosed subcutaneously on GD18-21 and offspring sacrificed on PND10 and 20. NOAEL was 12.5 mg/kg and LOAEL was 25 mg/kg.]

Scott WJ, Ritter EJ, Wilson JG. Studies on induction of polydactyly in rats with cytosine arabinoside. Dev Biol. 1975;45:103-11. [100 mg/kg was the only dose level.]

## DABRAFENIB

CAS No.: 1195765-45-7

<b>Rat NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
20 mg/kg oral pcD1-17 <sup>a</sup> (FDA, United States, p. 115)  C <sub>max</sub> = 1.17 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-t)</sub> = 4.10 µg·h/mL <sup>b</sup>	300 mg/kg oral pcD1-17 <sup>a</sup> (FDA, United States, p. 115)  C <sub>max</sub> = 2.17 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-t)</sub> = 22.6 µg·h/mL <sup>c</sup>	cardiac interventricular septal defects; decrease in the number of corpora lutea, number of implants, and the number of live fetuses	No rabbit data found	No rabbit data found	None	

a: From a combined female fertility and embryofetal development toxicity study in which females were dosed from 2 weeks prior to mating to post-coitum D17. Cesarean sections were performed on post-coitum D21.

b: Actual values in plasma after 20 mg/kg oral dabrafenib for 24 days in rats (FDA, United States, p. 119): C<sub>max</sub> = 1.17 µg/mL, AUC<sub>(0-t)</sub> = 4.10 µg·h/mL.

c: Actual values in plasma after 300 mg/kg oral dabrafenib for 24 days in rats (FDA, United States, p. 119): C<sub>max</sub> = 2.17 µg/mL, AUC<sub>(0-t)</sub> = 22.6 µg·h/mL.

## References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 202806 (25 Apr 2013).



**Dasatinib**

CAS No.: 302962-49-8

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit NOAEL</b>	<b>Rabbit LOAEL</b>		
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		
NOAEL not identified	2.5 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States, p. 225)  C <sub>max</sub> = 0.021 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-8h)</sub> = 0.105 µg·h/mL <sup>a</sup>	increased post-implantation loss and resorptions, decreased litter size; bent scapula or humerus	6 mg/kg oral GD7-19 (FDA, United States, p. 236)  C <sub>max</sub> = 0.227 µg/mL AUC <sub>(0-inf)</sub> = 0.834 µg·h/mL	LOAEL for MEFL not identified	None: findings in the definitive study were limited to an increase in skeletal variations (delays in ossifications); embryoletality observed in the DRF at 10 mg/kg was associated with severe maternal toxicity	

a: Actual values in plasma after 10 days (GD15) of 2.5 mg/kg oral dasatinib in pregnant Sprague Dawley rats (FDA, United States, p. 227): C<sub>max</sub> = 0.021 µg/mL, AUC<sub>(0-8h)</sub> = 0.105 µg·h/mL.

b: Actual values in plasma after 13 days (GD19) of 6 mg/kg oral dasatinib in pregnant NZW rabbits (FDA, United States, p. 238): C<sub>max</sub> = 0.227 µg/mL, AUC = 0.834 µg·h/mL.

**References**

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 21986/22072 (28 Jun 2006).

### Additional References Evaluated

Kassem MG, Ezzeldin E, Korashy HM, Mostafa GA. High-performance liquid chromatographic method for the determination of dasatinib in rabbit plasma using fluorescence detection and its application to a pharmacokinetic study. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013;939:73-9. [PK at 2.5 mg/kg was substantially different than reported in FDA, United States review:  $C_{max} = 0.459 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC = 3.289 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ]

### Fluconazole

CAS No.: 86386-73-4

Rat NOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rat LOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rabbit LOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rabbit Findings	Human Dose $C_{max}$ AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
50 mg/kg oral [US label]  $C_{max} = 33.8 \mu\text{g/mL}^a$ $AUC_{(0-\text{inf})} = 380 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^b$	80 mg/kg oral [US label]  $C_{max} = 54 \mu\text{g/mL}^a$ $AUC_{(0-\text{inf})} = 608 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^b$	at $\geq 80$ mg/kg: embryo lethality, cleft palate, abnormal craniofacial ossification, adactylia, brachygnathia [US Label, FDA, United States 1990a].	25 mg/kg oral [US Label, FDA, United States 1990a]  $C_{max} = 27 \mu\text{g/mL}^c$ $AUC = 521 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^d$	75 mg/kg oral [US Label, FDA, United States 1990a]  $C_{max} = 81 \mu\text{g/mL}^c$ $AUC = 1563 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^d$	abortions (at maternally toxic dose)	400 mg  $C_{max} = 9.07 \mu\text{g/mL}^e$ $AUC_{(0-24\text{h})} = 134.8 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^e$	NOAEL: <u>rat</u> $C_{max} = 3.7 (33.8/9.07)$ $AUC = 2.8 (380/134.8)$ <u>rabbit</u> $C_{max} = 3.0 (27/9.07)$ $AUC = 3.9 (521/134.8)$  LOAEL: <u>rat</u> $C_{max} = 6.0 (54/9.07)$ $AUC = 4.5 (608/134.8)$	

							<u>rabbit</u>	
							$C_{\max} = 8.9 (81/9.07)$	
							AUC = 11.6	
							(1563/134.8)	

- a: Extrapolated from reported value after 20 mg/kg fluconazole oral single dose in rats (FDA, United States 1990a, p. 7):  $C_{\max} = 13.5 \mu\text{g/mL}$ .
- b: Extrapolated from reported value after 20 mg/kg fluconazole oral single dose in rats (Humphrey):  $AUC_{(0-\text{inf})} = 152 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- c: Extrapolated from reported value after 10 mg/kg fluconazole oral single dose in rabbits (FDA, United States 1990a, p. 7):  $C_{\max} = 10.8 \mu\text{g/mL}$ .
- d: Calculated using plasma clearance value for rabbits (0.8 mL/min·kg, FDA, United States 1990a, p 8):  $AUC = \text{Dose}/Cl = (25 \text{ mg/kg})/(0.8 \text{ mL/min}\cdot\text{kg})(1 \text{ h}/60 \text{ min}) = 521 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- e: Actual value after 400 mg/day fluconazole oral single dose (FDA, United States 1990b, p. 7, 50-52):  $C_{\max} = 9.07 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-24\text{h})} = 134.8 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .  
Data are also available after 14 days of repeated administration, which shows significant drug accumulation.  $C_{\max} = 18.89 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-24\text{h})} = 349.9 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . Since PK was not available for repeated administration in animals, the single-dose human PK data were used for margin calculations.

## References

- Humphrey MJ, Jevons S, Tarbit MH. Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28:648-53.
- FDA, United States. Pharmacology Review NDA 019949 (26 Jan 1990a), p. 7, 13.
- FDA, United States. Clinical Pharmacology Review NDA 019949 (17 Apr 1990b), p. 7, 50 – 52.
- US label Diflucan.

## Additional References Evaluated

- Brammer KW, Farrow PR, Faulkner JK. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl 3:S318-26 .
- Pittrow L, Penk A. Plasma and tissue concentrations of fluconazole and their correlation to breakpoints. *Mycoses.* 1997;40:25-32.

## 5-FLUOROURACIL

CAS No.: 51-21-8

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Huma LOAEL/Human	Notes
10 mg/kg single dose IP GD9 [Wilson]  C <sub>max</sub> = 2.6 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 3.89 µg·h/mL <sup>a</sup>	15 mg/kg single dose IP GD9 [Wilson]  C <sub>max</sub> = 3.87 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 5.83 µg·h/mL <sup>a</sup>	<u>Wilson</u> : 15 mg/kg: malformations, embryofetal lethality <u>Kuwagata</u> : ≥17 mg/kg: micro- /anophthalmos, craniofacial defect, hydrocephaly, brain hernia	NOAEL not identified [DeSesso]	40 mg/kg SC GD12 [DeSesso]  C <sub>max</sub> = 111 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 11 µg·h/mL <sup>b</sup>	limb anomalies 85% of term fetuses	500 mg/m <sup>2</sup> (400 – 600 mg/m <sup>2</sup> ) in a variety of dosing regimens, including doses up to 3000 mg/m <sup>2</sup> CIV for 46 hours <sup>c</sup>  C <sub>max</sub> = 29 µg/mL <sup>d</sup> AUC = 11.5 µg·h/mL <sup>d</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.09 (2.6/29) AUC = 0.3 (3.89/11.5) <u>rabbit</u> no NOAEL identified  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.1 (3.87/29) AUC = 0.5 (5.83/11.5) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 3.8 (111/29) AUC = 1.0 (11/11.5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>note: half-life is very short (most patients have undetectable 5-FU levels in plasma 90 min after IV) and PK is nonlinear</li> <li>5FU is a pro-drug: thymidylate synthetase inhibitor is 5FdUMP</li> </ul>



Chaube S, Murphy ML. The teratogenic effects of the recent drugs active in cancer chemotherapy. In: Woolham, DHM, editor. *Advances in Teratology*, Volume 3. New York: Academic Press. 1968. pp. 180-237. [no incidence were provided, but confirms malformations in rats as detailed by Kuwagata]

Huang Y, Wei Y, Yang H, Pi C, Liu H, Ye Y, Zhao L. A 5-fluorouracil-loaded floating gastroretentive hollow microsphere: development, pharmacokinetic in rabbits, and biodistribution in tumor-bearing mice. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:997-1008. [no systemic PK, only oral after 50 mg/kg dose;  $C_{max} = 2.55\mu\text{g/mL}$ ,  $AUC = 5.82 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ]

Shuey DL, Lau C, Logsdon TR, Zucker RM, Elstein KH, Narotsky MG, et al. Biologically based dose-response modeling in developmental toxicology: biochemical and cellular sequelae of 5-fluorouracil exposure in the developing rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994a;126:129-44. [malformations were seen at 35 and 40 mg/kg administered SC on GD14; MEFL effects were seen at lower doses in other studies]

Shuey DL, Buckalew AR, Wilke TS, Rogers JM, Abbott BD. Early events following maternal exposure to 5-fluorouracil lead to dysmorphology in cultured embryonic tissues. *Teratology.* 1994b;50:379-86. [10 – 40 mg/kg SC on GD14, all malformations studied in explants]

US Adrucil label. [confirms malformations in rats as detailed by Kuwagata]

Zhao B, Zhao XL. [Pharmacokinetic studies on 5-fluorouracil and its metabolite in rabbits by high pressure liquid chromatography]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao (Acta Pharmacol Sin).* 1988;9:275-8. Chinese. [PK after 170 mg/kg IV dose, which would require greater extrapolation than data from Kar]

## Hydroxyurea

CAS No.: 127-07-1

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings <sup>a</sup>	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
100 mg/kg IP GD9-12 [Wilson] C <sub>max</sub> = 47.3 μg/mL <sup>b</sup> AUC not available	137 mg/kg IP GD9-12 [Wilson] C <sub>max</sub> = 80.6 μg/mL <sup>b</sup> AUC not available	embryofetal lethality, ocular and cerebral malformations	NOAEL not identified PK not available	30 mg/kg [US label] PK not available	650 mg/kg SC GD12 [DeSesso 1990]: cleft lip, cleft palate, reduction deformities of limbs and tail  750 mg/kg SC GD12 [DeSesso 1977]: skull and facial anomalies as well as severe	<u>oral for oncology</u> <u>indications:</u> 80 mg/kg Q3D, 20 – 30 mg/kg/day <u>oral for sickle cell</u> <u>anemia</u> 15 – 35 mg/kg/day (555 – 1295 mg/m <sup>2</sup> )  C <sub>max</sub> = 52 μg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 184 μg·h/mL <sup>c</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.9 (47.3/52) C <sub>max</sub> dose = 2.9 (100/35) <sup>d</sup> AUC = 0.5 (600/1295) <sup>e</sup> <u>rabbit</u> NOAEL not identified  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 1.6 (80.6/52) C <sub>max</sub> dose = 3.9 (137/35) <sup>d</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PK is nonlinear with short half-life (15 min in rats, 2 – 4 h in humans)</li> <li>• MW = 76.05g/mol</li> <li>• PK after IP and IV is similar (Wilson)</li> <li>• bioavailability is 70 – 80% in rats and humans, respectively (Beckloff)</li> <li>• no robust data</li> </ul>

					reduction deformities of all limbs	AUC = 0.6 (822/1295) <sup>e</sup>  <u>rabbit</u> <sup>f</sup> C <sub>max</sub> = 0.9 (30/35) AUC = 0.3 (360/1295)	for adverse human pregnancy outcomes
--	--	--	--	--	--	---	---

- a: US label states that “Hydroxyurea is embryotoxic and causes fetal malformations (partially ossified cranial bones, absence of eye sockets, hydrocephaly, bipartite sternbrae, missing lumbar vertebrae) at 180 mg/kg/day in rats and 30 mg/kg/day in rabbits”, but it is not clear which effects are in which species. Thus, 30 mg/kg is accepted as the LOAEL, but the findings are listed from publications with rabbits with SC doses of 650 and 750 mg/kg.
- b: Actual values after 100 and 137 mg/kg hydroxyurea IP doses in pregnant Wistar rats (Wilson): C<sub>max</sub> = 47.3 at 100 mg/kg and 80.6 µg/mL at 137 mg/kg.
- c: Extrapolated from reported value after 1000 mg (16.7 mg/kg) hydroxyurea oral single dose (MHRA): C<sub>max</sub> = 24.6 µg/mL, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 87.79 µg·h/mL. The dose for margin calculations was chosen to be 35 mg/kg/day. Although higher intermittent doses are used for oncology indications, the dose for sickle cell anemia is believed to be more relevant for assessing risk of developmental toxicity. As summarized in the table below, other human PK data are also available.
- d: Although rat C<sub>max</sub> data are available, this was after IP administration whereas the human data is after oral administration. Thus, in the absence of more direct PK comparisons, the estimated ratio based on mg/kg dose is also provided.
- e: In the absence of rat AUC data, AUC ratio was based on mg/m<sup>2</sup> dose ratio.
- f: In the absence of rabbit PK data, C<sub>max</sub> ratio was based on mg/kg dose ratio and AUC was based on mg/m<sup>2</sup> dose ratio.

## References

- DeSesso JM, Jordan RL. Drug-induced limb dysplasias in fetal rabbits. *Teratology*. 1977;15:199-211.
- DeSesso JM, Goeringer GC. Ethoxyquin and nordihydroguaiaretic acid reduce hydroxyurea developmental toxicity. *Reprod Toxicol*. 1990;4:267-75.
- MHRA Public Assessment Report PL 10880/128-9, page 48.



US label Hydrea and Droxea.

Wilson JG, Scott WJ, Ritter EJ, Fradkin R. Comparative distribution and embryotoxicity of hydroxyurea in pregnant rats and rhesus monkeys. *Teratology*. 1975;11:169-78.

#### Additional References Evaluated

Beckloff GL, Lerner HJ, Frost D, Russo-Alesi FM, Gitomer S. Hydroxyurea (NSC-32065) in biologic fluids: dose-concentration relationship. *Cancer Chemother Rep*. 1965;48:57-8. [PK data in cancer subjects, no AUC]

Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1992;79:2555-65. [PK data in sickle cell anemia subjects]

Chaube S, Murphy ML. The effects of hydroxyurea and related compounds on the rat fetus. *Cancer Res*. 1966;26:1448-57. [effects of single and repeated IP doses  $\geq 125$  mg/kg ]

Gwilt PR, Tracewell WG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34:347-58. [review article of PK publications]

Millicovsky G, DeSesso JM. Cardiovascular alterations in rabbit embryos *in situ* after a teratogenic dose of hydroxyurea: an *in vivo* microscopic study. *Teratology*. 1980;22:115-24. [effects on *ex vivo* embryos after 500 and 750 mg/kg to does on GD12 ]

Philips FS, Sternberg SS, Schwartz HS, Cronin AP, Sodergren JE, Vidal PM. Hydroxyurea. I. Acute cell death in proliferating tissues in rats. *Cancer Res*. 1967;27:61-75. [ $C_{max}$  after 46, 184, and 1840 mg/kg IV dose, nonlinear PK]

Tracewell WG, Vaughan WP, Gwilt PR. Nonlinear disposition of hydroxyurea. *J Pharm Sci*. 1994;83:1060-1. [formal PK analysis of Philips data]

Villani P, Maserati R, Regazzi MB, Giacchino R, Lori F. Pharmacokinetics of hydroxyurea in patients infected with human immunodeficiency virus type I. *J Clin Pharmacol*. 1996;36:117-21. [PK in HIV subjects]

#### Human Pharmacokinetic Data

Reference	Population	Dose	Route	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ )	Notes
Charache	sickle cell anemia	25 mg/kg	oral	19	$\text{AUC}_{(0-6)} = 1216$	AUC units were published as “ $\mu\text{g mL/min}$ ”, value seems wrong since ( $C_{max} \times 6 \text{ h} = 114 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )

Villani	HIV	mean 7.6 mg/kg BID	oral	0.135 nmol/L = 0.135 μmol/mL = 10.3 μg/mL	AUC <sub>(0-12h)</sub> = 540 μmol·h/L = 41.1 μg·h/mL; AUC <sub>(0-24h)</sub> = 82.1 μg·h/mL	
MHRA review	not stated – BE study	1000 mg (16.6 mg/kg)	oral	24.6	AUC <sub>(0-inf)</sub> = 87.79 μg·h/mL	use these values
Beckloff	cancer	20 mg/kg	oral	20.7	—	
		80 mg/kg	oral	128.1	—	

## IBRUTINIB

CAS No.: 936563-96-1

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL <sup>a</sup> Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings <sup>b</sup>	Notes
40 mg/kg oral GD6-17 (FDA, United States, p. 126)  C <sub>max</sub> = 1.31 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 5.348 µg·h/mL <sup>c</sup>	80 mg/kg oral GD6-17 (FDA, United States, p. 126)  C <sub>max</sub> = 2.627 µg/mL <sup>d</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 13.729 µg·h/mL <sup>d</sup>	malformations including dextrocardia, retroesophageal aortic arch, persistent truncus arteriosus, right-sided aortic arch, and interrupted aortic arch; increased post-implantation loss (increased early resorptions), decreased viable fetuses	30 mg/kg oral GD7-19 (FDA, United States, p. 135)  C <sub>max</sub> = 0.311 µg/mL <sup>e</sup> AUC = 1.31 µg·h/mL <sup>e</sup>	100 mg/kg oral GD7-19 (FDA, United States, p. 135) <sup>c</sup>  C <sub>max</sub> = 1.83 µg/mL <sup>f</sup> AUC = 21.00 µg·h/mL <sup>f</sup>	increased pre- and post-implantation loss (increased early resorptions), decreased viable fetuses, abortions	

a: The LOAEL for MEFL was a maternally toxic dose as indicated by increased mortality and abortions, clinical signs, and reductions in body weight and food consumption.

b: This was a dose range finding study with limited numbers of animals (n=6) and fetal evaluations limited to external morphology. It is thus unknown if there were visceral or skeletal alterations.

c: Actual values in plasma after 11 doses of 40 mg/kg oral ibrutinib in pregnant rats (FDA, United States, p. 130): C<sub>max</sub> = 1.31 µg/mL, AUC<sub>(0-24h)</sub> = 5.348 µg·h/mL.

d: Actual values in plasma after 11 doses of 100 mg/kg oral ibrutinib in pregnant rats (FDA, United States, p. 130): C<sub>max</sub> = 2.627 µg/mL, AUC<sub>(0-24h)</sub> = 13.729 µg·h/mL.

e: Actual values in plasma after 13 doses of 30 mg/kg oral ibrutinib in pregnant rabbits (FDA, United States, p. 136):  $C_{max} = 0.311 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC = 1.31 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .

f: Actual values in plasma after 13 doses of 100 mg/kg oral ibrutinib in pregnant rabbits (FDA, United States, p. 136):  $C_{max} = 1.83 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC = 21.00 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .

## References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 020552 (21 Aug 2013).

## Ibuprofen

CAS No.: 15687-27-1

Rat NOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rat LOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL <sup>c</sup> Dose $C_{max}$ AUC	Rabbit LOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rabbit Findings	Human Dose $C_{max}$ AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
180 mg/kg oral GD1-20 [Adams] $C_{max} = 205 \mu\text{g/mL}^a$ AUC = 597 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^a$	oral GD1-20: No LOAEL identified [Adams] oral GD9-10: 300 mg/kg [Cappon 2003] <sup>b</sup>	GD1-20: None GD9-10: ventricular septal defects	60 mg/kg oral GD1-29 [Adams] $C_{max} = 26.6 \mu\text{g/mL}^d$ AUC <sub>(0-inf)</sub> = 80.5 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^d$	No LOAEL identified	None	Maximum dose is 800 mg QID, 3200 mg/day (13.3 mg/kg/dose, 53 mg/kg/day) [US label] $C_{max} = 59 \mu\text{g/mL}^e$ AUC = 839 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^e$	NOAEL: rat $C_{max} = 3.4$ (205/59.7) $AUC = 0.7$ (597/839) rabbit <sup>c</sup> 60 mg/kg NOAEL	

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL <sup>c</sup> Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
	at 300 mg/kg C <sub>max</sub> = 341 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 995 µg·h/mL <sup>a</sup>		500 mg/kg oral GD9-11 [Cappon 2003] <sup>b</sup> C <sub>max</sub> = 222 µg/mL <sup>d</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 671 µg·h/mL <sup>d</sup>				C <sub>max</sub> = 0.5 (26.6/59) AUC = 0.1 (80.5/839) <u>500 mg/kg NOAEL</u> C <sub>max</sub> = 3.8 (222/59) AUC = 0.8 (671/839)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 5.8 (341/59) AUC = 1.2 (995/839)  <u>rabbit</u> no LOAEL	

a: Extrapolated from reported value after 25 mg/kg ibuprofen (suspension) single oral dose in Sprague Dawley rats (You): C<sub>max</sub> = 28.4 µg/mL, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 4971.3 µg·min/mL (82.9 µg·h/mL). Note that different data (5- to 7-fold lower values) are available from the same laboratory at 25 mg/kg where the only difference appears to be that ibuprofen was administered in hard gelatin capsules versus a suspension (Newa): C<sub>max</sub> = 5.32 µg/mL, AUC = 12.41 µg·h/mL.

- b: To enhance detection of VSD and midline defects (seen in humans and with other NSAIDs), exposure was limited to the sensitive period of cardiovascular development and midline closure (i.e., GD9-10 in rats and GD9-11 in rabbits). By limiting the exposure period, maternal GI toxicity was reduced, allowing for the administration of higher doses.
- c: Two values are included for the rabbit NOAEL since neither study design was ideal for assessing the risk of developmental toxicity according to current conventions. The study by Adams dosed rabbits on GD1-29 instead of the conventional GD7-19, whereas the study by Cappon dosed rabbits only on GD9-11 to enhance detection of VSD and midline defects.
- d: Extrapolated from reported value after 56 mg/kg ibuprofen single oral dose in male New Zealand White rabbits (Kondal):  $C_{\max} = 24.85 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-\infty)} = 75.14 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- e: Extrapolated from reported value after 14.8 mg/kg (mean) ibuprofen single oral dose (Konstan):  $C_{\max} = 65.5 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-\infty)} = 14.0 \text{ mg}\cdot\text{min/mL}$  ( $233 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ). Note the  $C_{\max}$  was multiplied by 0.9 ( $13.3/14.8$ ) to give the extrapolated  $C_{\max}$ . The  $C_{\max}$  after a single dose likely represents the  $C_{\max}$  at steady state since the half life is short (approximately 1.8 to 2 hours [US label]) and little accumulation is expected using the equation:  $\text{accumulation} = 1/(1 - e^{-k\cdot\text{tau}})$ , where  $k = 0.693/t_{1/2}$  with  $t_{1/2} = 2$  hours and  $\text{tau} = 6$  hours (yielding an accumulation factor of 1.1). The AUC was multiplied by 4 to get the daily AUC for QID dosing (at 59.2 mg/kg/day), and then by 0.9 to give the extrapolated AUC for 53 mg/kg/day.

## References

- Adams SS, Bough RG, Cliffe EE, et al. Absorption, distribution and toxicity of ibuprofen. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1969;15:310-30.
- Cappon GD, Cook JC, Hurtt ME. Relationship between cyclooxygenase 1 and 2 selective inhibitors and fetal development when administered to rats and rabbits during the sensitive periods for heart development and midline closure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2003;68:47-56.
- Kondal A1, Garg SK. Influence of acidic beverage (Coca-Cola) on pharmacokinetics of ibuprofen in healthy rabbits. *Indian J Exp Biol*. 2003;41:1322-4.
- Konstan MW, Krenicky JE, Finney MR, Kirchner HL, Hilliard KA, Hilliard JB, et al. Effect of ibuprofen on neutrophil migration *in vivo* in cystic fibrosis and healthy subjects *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306:1086-91.
- Newa M, Bhandari KH, Kim JO, Im JS, Kim JA, Yoo BK, et al. Enhancement of solubility, dissolution and bioavailability of ibuprofen in solid dispersion systems. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008;56:569-74.
- US Motrin label.

You X, Xing Q, Tuo J, Song W, Zeng Y, Hu H. Optimizing surfactant content to improve oral bioavailability of ibuprofen in microemulsions: just enough or more than enough? *Int J Pharm.* 2014;471:276-84.

**Additional References Evaluated**

Cappon GD, Fleeman TL, Cook JC, Hurtt ME. Combined treatment potentiates the developmental toxicity of ibuprofen and acetazolamide in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2005;28:409-21. [confirmed VSD findings in Cappon 2003]

Cook JC, Jacobson CF, Gao F, Tassinari MS, Hurtt ME, DeSesso JM. Analysis of the nonsteroidal anti-inflammatory drug literature for potential developmental toxicity in rats and rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2003;68:5-26. [review article: captured data from Adams]

Malm H, Borisch C. Analgesics, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), muscle relaxants, and antigout medications. In: Schaefer C, Peters P, Miller RK, editors. *Drugs during pregnancy and lactation: treatment options and risk assessment (Third Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 27-58. [mainly human data]

**IMATINIB**

CAS No.: 152459-95-5 (220127-57-1 as mesilate)

<b>Rat NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
30 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States, p. 69)  C <sub>max</sub> = 3.57 µg/mL <sup>a</sup>	100 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States, p. 69)  C <sub>max</sub> = 12.14 µg/mL <sup>b</sup>	exencephaly and/or protruding tongue, encephalocele, absent frontal or parietal bones; increased post-implantation loss, decreased live fetuses	60 mg/kg oral GD7-19 (FDA, United States, p. 72)  C <sub>max</sub> = 53.06 µg/mL <sup>c</sup> AUC = 699.8 µg·h/mL <sup>c</sup>	LOAEL not identified	None	

AUC = 39.28 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}^{\text{a}}$	AUC = 142.55 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}^{\text{b}}$					
--	---	--	--	--	--	--

a: Interpolated from reported values in plasma after 15 and 50 mg/kg imatinib oral single dose in female rats (FDA, United States, p. 24): at 15 mg/kg,  $C_{\text{max}} = 1.69 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 15.40 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ; at 50 mg/kg,  $C_{\text{max}} = 6.07 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 71.276 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ .

b: Extrapolated from reported value in plasma after 50 mg/kg imatinib oral single dose in female rats (FDA, United States, p. 24):  $C_{\text{max}} = 6.07 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 71.276 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ .

c: Reported value after 60 mg/kg oral imatinib single dose in rabbits species (FDA, United States, p. 26):  $C_{\text{max}} = 53.06 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 699.8 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ .

### References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 021335 (04 May 2001).



**Isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid)**

CAS No.: 4759-48-2

<b>Rat NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Human</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Margins</b> <b>NOAEL/Human</b> <b>LOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
50 mg/kg oral dose on GD10 [Tembe]  C <sub>max</sub> = 0.9 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-10h)</sub> = 4.8 µg·h/mL <sup>a</sup>	100 mg/kg oral dose on GD10 [Tembe]  C <sub>max</sub> = 1.8 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-10h)</sub> = 9.6 µg·h/mL <sup>a</sup>	LOAEL: microtia and talipes.  Higher doses: microcephaly, anotia, exophthalmos, protruding tongue, cleft lip, mandibular hypoplasia, cleft palate, overdeveloped papillae, analatresia, spina	3 mg/kg oral GD8-11 [Eckhoff]  C <sub>max</sub> = 0.95 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 12.2 µg·h/mL <sup>b</sup>	15 mg/kg oral GD8-11 [Eckhoff]  C <sub>max</sub> = 3.1 µg/mL <sup>c</sup> AUC = 49.1 µg·h/mL <sup>c</sup>	increased resorptions, malformations including eye defects, tail defects, cardiomegaly, skin tag on face	0.5 mg/kg BID (1 mg/kg/day)  C <sub>max</sub> = 0.32 µg/mL <sup>d</sup> AUC = 7.52 µg·h/mL <sup>d</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 2.8 (0.9/0.32) AUC = 0.6 (4.8/7.52) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 3.0 (0.95/0.32) AUC = 1.6 (12.2/7.52)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 5.6 (1.8/0.32) AUC = 1.3 (9.6/7.52) <u>rabbit</u>	

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit NOAEL</b>	<b>Rabbit LOAEL</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
		bifide,deformed tail, and acaudate; increased resorptions					C <sub>max</sub> = 9.7 (3.1/0.32) AUC = 6.5 (49.1/7.52)	

a: Extrapolated from reported value after 500 mg/kg isotretinoin oral single dose in Wistar rats (Tembe): C<sub>max</sub> = 9.07 µg/mL, AUC<sub>(0-10h)</sub> = 47.9 µg·h/mL.

b: Actual values after 3 mg/kg isotretinoin oral single dose in New Zealand White rabbits (Eckhoff): C<sub>max</sub> = 0.952 µg/mL, AUC = 12.2 µg·h/mL.

c: Actual values after 15 mg/kg isotretinoin oral single dose in New Zealand White rabbits (Eckhoff): C<sub>max</sub> = 3.099 µg/mL, AUC<sub>(0-10h)</sub> = 49.1 µg·h/mL.

d: Extrapolated from reported value after 80 mg (1.33 mg/kg) isotretinoin oral single dose with food (US label): C<sub>max</sub> = 0.86 µg/mL, AUC<sub>(0-10h)</sub> = 10.0 µg·h/mL. The C<sub>max</sub> extrapolation was based on a 0.5 mg/kg dose, whereas the AUC extrapolation was based on the daily dose of 1 mg/kg/day. PK data are also available while fasting, but the higher values from the fed state were used for margin calculations: C<sub>max</sub> = 0.3 µg/mL, AUC = 3.7 µg·h/mL.

### References

Eckhoff C, Chari S, Kromka M, Staudner H, Juhasz L, Rudiger H, et al. Teratogenicity and transplacental pharmacokinetics of 13-cis-retinoic acid in rabbits. Toxicol Appl Pharmacol. 1994;125:34-41.

Tembe EA, Honeywell R, Buss NE, Renwick AG. All-trans-retinoic acid in maternal plasma and teratogenicity in rats and rabbits. Toxicol Appl Pharmacol. 1996;141:456-72.

US label isotretinoin.

# METHOTREXATE

CAS No.: 59-05-2

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL (Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose <sup>c</sup> C <sub>max</sub> AUC	NOAEL Margins	Notes
NOAEL not identified	0.1 mg/kg IP GD9 [Jordan, Woo]  C <sub>max</sub> = 0.21 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 0.067 µg·h/mL <sup>a</sup>	resorbed litters, malformations	NOAEL not identified	0.3 mg/kg IV GD10 [Jordan]  C <sub>max</sub> = 1.58 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 0.61 µg·h/mL <sup>b</sup>	hydrocephalus, microphthalmia, cleft lip and palate, micrognathia, dysplastic sacral and caudal vertebrate, phocomelia, hemimelia, syndactyly, and ectrodactyly; embryo lethality, resorptions	<u>psoriasis</u> : 10 – 25 mg Q7D (5.9 – 14.7 mg/m <sup>2</sup> ) oral or IV <sup>c</sup>  <u>ALL</u> : induction – 3.3 mg/m <sup>2</sup> daily; maintenance – 15 mg/m <sup>2</sup> oral twice/week <u>choriocarcinoma</u> : 15 – 30 mg oral QD × 5 (8.8 – 17.6 mg/m <sup>2</sup> ) <u>lymphoma</u> : 10 – 25 mg QD × 4-8 oral (5.9 – 14.7 mg/m <sup>2</sup> ); 0.625 – 2.5 mg/kg (23 – 92.5 mg/m <sup>2</sup> )	NOAEL: <u>rat</u> NOAEL not identified  <u>rabbit</u> NOAEL not identified  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.1 (0.21/2.14) AUC = 0.02 (0.067/3.28) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 0.7 (1.58/2.14)	Note: animal MEFL data is after single dose, so margins would likely be even lower if dosed throughout organogenesis

						<u>mycosis fungoides</u> : 5 – AUC = 0.2 50 mg Q7D oral (2.9 – 29 (0.61/3.28) mg/m <sup>2</sup> ) <u>RA</u> : 7.5 mg Q7D oral (4.4 mg/m <sup>2</sup> )  C <sub>max</sub> = 2.14 µg/mL <sup>d</sup> AUC = 3.28 µg·h/mL <sup>d</sup>	
--	--	--	--	--	--	---	--

- a: Extrapolated from reported value after 0.31 mg/kg methotrexate intravenous single dose in Wistar rats (Scheufler 1982): C<sub>0</sub> = 0.64 µg/mL, AUC<sub>(0.1-4h)</sub> = 0.207 µg·h/mL. Other PK data are also available as shown in the table below. The data from Scheufler 1982 were chosen for margin calculations because it required the least degree of extrapolation in the same strain as the teratology study.
- b: Extrapolated from reported value after 1.33 mg/kg methotrexate intravenous single dose in male rabbits (Iven): C<sub>max</sub> = 7 µg/mL, AUC = 2.72 µg·h/mL. Data are also available after a 10 mg/kg methotrexate intravenous single dose in female New Zealand White rabbits (Stagni): C<sub>max</sub> = 74 µg/mL, AUC = 31.4 µg·h/mL. The data from Iven were chosen for margin calculations because it required the least degree of extrapolation to the dose in the teratology study.
- c: As noted there is a wide variety of doses, schedules, and routes used in a variety of indications (US label). An intravenous dose of 25 mg (14.7 mg/m<sup>2</sup>) in psoriasis was chosen for PK margin comparisons since this was the highest dose in a non-oncology indication and would also provide a higher exposure than a 50 mg (29 mg/m<sup>2</sup>) oral dose (mycosis fungoides) since oral bioavailability is only ~40%.
- d: Extrapolated to 14.7 mg/m<sup>2</sup> from reported value after 30 mg/m<sup>2</sup> methotrexate intravenous single dose (Campbell): C<sub>max</sub> = 4.37 µg/mL from visual inspection of graph, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 6.69 µg·h/mL. Oral data are also available (Campbell): C<sub>max</sub> = 0.50 µg/mL from visual inspection of graph, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 2.34 µg·h/mL.

## References

- Campbell MA, Perrier DG, Dorr RT, Alberts DS, Finley PR. Methotrexate: bioavailability and pharmacokinetics. *Cancer Treat Rep.* 1985;69:833-8.
- Iven H, Brasch H, Engster J. Pharmacokinetics of methotrexate and 7-hydroxy-methotrexate in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1985;15:115-20.
- Jordan RL, Wilson JG, Schumacher HJ. Embryotoxicity of the folate antagonist methotrexate in rats and rabbits. *Teratology.* 1977;15:73-9.
- Scheufler E. Evidence of nonlinear pharmacokinetics of methotrexate in the rat. *Pharmacology.* 1982;25:51-6.
- US label methotrexate.
- Woo DC, McClain RM, Hoar RM. Potentiation of methotrexate embryoletality by aspirin in rats. *Teratology.* 1978;17:37-41.

## Additional References Evaluated

- Berry CL. Transient inhibition of DNA synthesis by methotrexate, in the rat embryo and foetus. *J Embryol Exp Morphol.* 1971;26:469-74. [increased resoprions at  $\geq 1$  mg/kg]
- Hyoun SC, Običan SG, Scialli AR. Teratogen update: methotrexate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94:187-207. [review article]
- Kim MM, Lee SH, Lee MG, Hwang SJ, Kim CK. Pharmacokinetics of methotrexate after intravenous and intramuscular injection of methotrexate-bearing positively charged liposomes to rats. *Biopharm Drug Dispos.* 1995;16:279-93. [PK in Sprague Dawley rats at 4 mg/kg dose]
- Scheufler E, Zetler G, Iven H. Pharmacokinetics and organ distribution of methotrexate in the rat. *Pharmacology.* 1981;23:75-81. [PK only at 31 mg/kg dose]
- Stagni G, Shukla C. Pharmacokinetics of methotrexate in rabbit skin and plasma after iv-bolus and iontophoretic administrations. *J Control Release.* 2003;93:283-92. [PK only at 10 mg/kg dose]
- Wilson JG, Scott WJ, Ritter EJ, Fradkin R. Comparative distribution and embryotoxicity of methotrexate in pregnant rats and rhesus monkeys. *Teratology.* 1979;19:71-9. [no AUC data, only concentrations at 0.25 hours]

Rat Pharmacokinetic Data						
Reference	Dose (mg/kg)	Route	Strain	C <sub>max</sub> (µg/mL)	AUC (µg·h/mL)	Notes

Wilson	0.3	IV	Wistar	0.40	—	$C_0$ was estimated from graph since 1st timepoint was 0.25 hours
Scheufler 1981	31	IV	Wistar	177	$AUC_{(0-\infty)} = 38.4$	$C_{\max}$ is $C_0$
Scheufler 1982	0.31	IV	Wistar	0.64	$AUC_{(0.1-4h)} = 0.207$	
Kim	4.0	IV	Sprague Dawley	40	$AUC_{(0-\infty)} = 2.88$	$C_{\max}$ was from visual inspection of graph, AUC was 173 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$

## Pazopanib

CAS No.: 444731-52-6

<b>Rat NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL</b> <b>Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
1 mg/kg oral GD6-17 (FDA, United States, p. 218)  C <sub>max</sub> = 3.47 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 0.028 µg·h/mL <sup>a</sup>	3 mg/kg oral GD6-17 (FDA, United States, p.218)  C <sub>max</sub> = 10.4 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 0.083 µg·h/mL <sup>a</sup>	malformations in the great vessels, missing innominate artery	3 mg/kg oral GD7-19 (FDA, United States, p. 225)  C <sub>max</sub> = 0.130 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-t)</sub> = 0.517 µg·h/mL <sup>c</sup>	10 mg/kg oral GD7-19 (FDA, United States, p. 225)  C <sub>max</sub> = 1.063 µg/mL <sup>d</sup> AUC <sub>(0-t)</sub> = 1.723 µg·h/mL <sup>d</sup>	increased post-implantation loss	

a: Extrapolated or actual reported value in plasma after 3 mg/kg oral pazopanib for 28 days to Sprague Dawley rats (FDA, United States, p. 249): C<sub>max</sub> = 10.4 µg/mL, AUC = 83 µg·h/L (0.083 µg·h/mL).

b: Actual values in plasma after 3 mg/kg pazopanib in rabbits (FDA, United States, p. 227): C<sub>max</sub> = 0.130 µg/mL.

c: Extrapolated from reported value after 10 mg/kg pazopanib to rabbits (FDA, United States, p. 227): AUC<sub>(0-t)</sub> = 1.723 µg·h/mL.

d: Actual values in plasma after 10 mg/kg pazopanib in rabbits (FDA, United States, p. 227): C<sub>max</sub> = 1.063 µg/mL, AUC<sub>(0-t)</sub> = 1.723 µg·h/mL.

### References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 022456 (18 Sep 2009).

### Additional References Evaluated

US Label Votrient.

**PHENYTOIN**

CAS No.: 57-41-0

<b>Rat NOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rat LOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Human Dose C<sub>max</sub> AUC</b>	<b>Margins NOAEL/Human LOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
150 mg/kg oral GD6-15 [Kim]  C <sub>max</sub> = 13.4 μg/mL <sup>a</sup> AUC = 205 μg·h/mL <sup>a</sup>	300 mg/kg oral GD6-15 [Kim]  C <sub>max</sub> = 26.8 μg/mL <sup>a</sup> AUC = 410 μg·h/mL <sup>a</sup>	external findings (protruding tongue, meningoencephalocoele, domed head, anasarca, and limb hyperflexion), skeletal malformation (short rib)	50 mg/kg oral GD7-18 [McClain]  C <sub>max</sub> = 27 μg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 193 μg·h/mL <sup>c</sup>	75 mg/kg oral GD7-18 [McClain]  C <sub>max</sub> = 34 μg/mL <sup>d</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 290 μg·h/mL <sup>c</sup>	open eyes, cleft palate, and limb abnormalities that included shortened and curved long bones, pes caves, syndactyly	up to 625 mg/day oral solution <sup>e</sup>  C <sub>max</sub> = 14.5 μg/mL <sup>f</sup> AUC = 291 μg·h/mL <sup>g</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.9 (13.4/14.5) AUC = 0.7 (205/291) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 1.9 (27/14.5) AUC = 0.7 (193/291)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 1.8 (26.8/14.5) AUC = 1.4 (410/291)	





ANDA #40-420 Bioequivalence Review, Phenytoin FDA, United States Approval package, Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review 040420/S-000

FDA, United States Approval Package (Bioequivalence Review) for ANDA 088771 (22 Oct 1986), p. 32.

FDA, United States Approval Package (Bioequivalence Review) for ANDA 040420 (19 Apr 2002), p. 40.

Kim SH, Lee IC, Baek HS, Lim JH, Moon C, Shin DH, Kim SH, Park SC, Kim JC. Dose-response effects of diphenylhydantoin on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2012;95:337-45.

McClain RM, Langhoff L. Teratogenicity of diphenylhydantoin in the New Zealand white rabbit. Teratology. 1980;21:371-9.

Medhi B, Prakash A, Joshi R, Byrav DS. Effect of esomeprazole on pharmacokinetics of phenytoin in rabbits. Indian J Physiol Pharmacol. 2012;56:382-7.

Rowland JR, Binkerd PE, Hendrickx AG. Developmental toxicity and pharmacokinetics of oral and intravenous phenytoin in the rat. Reprod Toxicol. 1990;4:191-202.

US label Dilantin oral solution.

US label Dilantin extended release capsules.

### Pomalidomide

CAS No.: 19171-19-8

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit NOAEL</b>	<b>Rabbit LOAEL</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		

NOAEL not identified	25 mg/kg oral GD6-17 [FDA, United States 2013a] $C_{max} = 2.7 \mu\text{g/mL}^a$ $AUC_{(0-24)} = 34.3 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^a$	absence of urinary bladder and thyroid gland, fusion and misalignment of lumbar and thoracic vertebral elements (vertebral, central and/or neural arches)  resorptions; increased post-implantation loss, decreased viable fetuses	NOAEL not identified	10 mg/kg GD7-19 [FDA, United States 2013a] $C_{max} = 0.072 \mu\text{g/mL}^b$ $AUC_{\tau} = 0.418 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^b$	interventricular septal defects; misaligned, fused or small caudal vertebrae	4 mg per day $\times$ 21 (2.4 mg/m <sup>2</sup> /day) $C_{max} = 0.079 \mu\text{g/mL}^c$ $AUC_{(0-24h)} = 0.402 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^d$	NOAEL: <u>rat</u> NOAEL not identified <u>rabbit</u> NOAEL not identified  LOAEL: <u>rat</u> $C_{max} = 34 (2.7/0.079)$ $AUC = 85 (34.3/0.402)$  <u>rabbit</u> $C_{max} = 0.9 (0.072/0.079)$ $AUC = 1.0 (0.418/0.402)$
----------------------	--	--	----------------------	--	--	--	---

a: Actual value on GD17 after 25 mg/kg pomalidomide oral dose in pregnant Sprague Dawley rats (FDA, United States 2013a, p. 152):  $C_{max} = 2.729 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-24h)} = 34.34 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .

b: Actual value on GD17 after 10 mg/kg pomalidomide oral dose in pregnant New Zealand White rabbits (FDA, United States 2013a, p. 163):  $C_{max} = 0.072 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{\tau} = 0.418 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .

c: Actual value after 4 mg pomalidomide oral dose for 8 days in multiple myeloma subjects (FDA, United States 2013b, p. 24):  $C_{max} = 0.079 \mu\text{g/mL}$ .

d: Actual value after 4 mg/kg mg pomalidomide oral dose for 4 weeks (FDA, United States 2013a, p. 180):  $AUC_{(0-24h)} = 0.402 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .

### **References**

FDA, United States Pharmtox Review for Pomalyst NDA 204026 (08 Feb 2013a), pp. 149-156, 158-170, 178-180.

FDA, United States ClinPharm Review for Pomalyst NDA 204026 (08 Feb 2013b), p. 25.

### **Additional References Evaluated**

Gay F, Mina R, Troia R, Bringham S. Pharmacokinetic evaluation of pomalidomide for the treatment of myeloma. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9:1517-27. [review article, data from Hoffman]

Hoffmann M, Kasserra C, Reyes J, Schafer P, Kosek J, Capone L, et al. Absorption, metabolism and excretion of [<sup>14</sup>C]pomalidomide in humans following oral administration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71:489-501. [PK in healthy volunteers, used data for patients from FDA, United States reviews]

## Ribavirin

CAS No.: 36791-04-5

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit NOAEL</b>	<b>Rabbit LOAEL</b>		
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		
0.3 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States, p. 64)  C <sub>max</sub> = 3.8 ng/mL <sup>a</sup> AUC = 8.28 ng·h/mL <sup>a</sup>	1.0 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States, p. 64)  C <sub>max</sub> = 12.7 ng/mL <sup>a</sup> AUC = 27.6 ng·h/mL <sup>a</sup>	hydrocephaly, retinal folds, diaphragmic hernia, displaced adrenal, displaced oesophagus, vascular defects; extra vertebra, scoliosis, fused ribs and vertebrae, split sternum, ectrodactyly, malrotated hind limbs; increased post-implantation loss	0.3 mg/kg oral GD6-18 (FDA, United States, p. 68)  No rabbit PK data found	1.0 mg/kg oral GD6-18 (FDA, United States, p. 68)  No rabbit PK data found	anomalous cervicothoracic arteries	Ribavirin undergoes significant 1st pass metabolism. As a prodrug, it is rapidly anabolized to ribavirin monophosphate and ribavirin triphosphate, which play a role in its antiviral activity (Dixit). It is also deribosylated to triazole carboxamide (Lin). The contribution of each of these metabolites to the developmental effects in rats is unknown.

a: Extrapolated from reported value in plasma after 10 mg/kg ribavirin oral single dose in female Sprague Dawley rats (FDA, United States, p. 76): C<sub>max</sub> = 0.127 µg/mL, AUC = 0.276 µg·h/mL. Note ≥10-fold extrapolation.

## References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 020903 (18 May 1998).

**Additional References Evaluated**

Dixit NM, Perelson AS. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. Cell Mol Life Sci. 2006;63:832-42

Liao S, Jin X, Li J, Zhang T, Zhang W, Shi W, et al. Effects of silymarin, glycyrrhizin, and oxymatrine on the pharmacokinetics of ribavirin and its major metabolite in rats. Phytother Res. 2016;30:618-26. [at 30 mg/kg in fasted male Sprague Dawley rats: C<sub>max</sub> = 1.36 µg/mL, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 14.7 µg·h/mL]

Lin CC, Yeh LT, Luu T, Lourenco D, Lau JY. Pharmacokinetics and metabolism of [<sup>14</sup>C]ribavirin in rats and cynomolgus monkeys. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47:1395-8. [at 30 mg/kg in fasted male Sprague Dawley rats: C<sub>max</sub> = 0.433 µg/mL, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 3.04 µg·h/mL]

**TACROLIMUS**

CAS No.: 104987-11-3

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit NOAEL</b>	<b>Rabbit LOAEL</b>		
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>		<b>Dose</b>	<b>Dose</b>		
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>Rat Findings</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Notes</b>
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		
1.0 mg/kg oral GD7-17 (FDA, United States, p. 18)  C <sub>max</sub> = 2.9 ng/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 10.9 ng·h/mL <sup>a</sup>	3.2 mg/kg oral GD7-17 (FDA, United States, p. 18)  C <sub>max</sub> = 20 ng/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 68.9 ng·h/mL <sup>b</sup>	slight increase in post implantation loss (late resorptions)	0.32 mg/kg oral GD6-18 (FDA, United States, p. 19)  C <sub>max</sub> = 0.93 ng/mL <sup>c</sup> AUC = 17.6 µg·h/mL <sup>c</sup>	1.0 mg/kg oral GD6-18 (FDA, United States, p. 19)  C <sub>max</sub> = 2.9 ng/mL <sup>c</sup> AUC = 55 ng·h/mL <sup>c</sup>	ventricular hypoplasia, interventricular septal defect, bulbous aortic arch and stenosis of arch and ductus arteriosus, omphalocele, gallbladder agenesis, skeletal malformations;	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maternal toxicity seen in both rats and rabbits at LOAEL</li> <li>• Ratio of blood:plasma is 4:1</li> <li>• Metabolites are</li> </ul>

					increased implantation decreased litter size	post- loss,	3-fold parent • 99% protein bound
--	--	--	--	--	--	----------------	---

a: Actual values in plasma after 1.0 mg/kg tacrolimus oral single dose in male rats (FDA, United States, p. 25):  $C_{max} = 2.9$  ng/mL,  $AUC_{(0-inf)} = 10.9$  ng·h/mL.

b: Actual values in plasma after 3.2 mg/kg tacrolimus oral single dose in male rats (FDA, United States, p. 25):  $C_{max} = 20$  ng/mL,  $AUC_{(0-inf)} = 68.9$  ng·h/mL.

c: Extrapolated from reported value after 2 mg/kg tacrolimus oral single dose in NZW rabbits (Piekoszewski):  $C_{max} = 5.79$  ng/mL,  $AUC = 110$  ng·h/mL.

### References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 50-708/50-709 (08 Apr 1994).

Piekoszewski W, Chow FS, Jusko WJ. Disposition of tacrolimus (FK 506) in rabbits. Role of red blood cell binding in hepatic clearance. Drug Metab Dispos. 1993;21:690-8.

### Additional References Evaluated

Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Hirano K, Nozaki K, Noda K. Pharmacokinetic study of FK 506 in the rat. Transplant Proc. 1991;23:2757-9.

## Thalidomide

CAS No.: 50-35-1

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings <sup>a</sup>	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
10 mg/kg <sup>b</sup> [Janer]  C <sub>max</sub> = 0.97 μg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 10.75 μg·h/mL <sup>c</sup>	50 mg/kg <sup>b</sup> [Newman, Schardein]  C <sub>max</sub> = 4.87 μg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 53.75 μg·h/mL <sup>c</sup>	decreased implantation sites	20 mg/kg oral GD7-19 [Christian]  at GD19 C <sub>max</sub> = 0.82 μg/mL <sup>d</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 4.18 μg·h/mL <sup>d</sup>	60 mg/kg oral GD7-19 [Christian]  at GD19 C <sub>max</sub> = 2.16 μg/mL <sup>e</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 14.4 μg·h/mL <sup>e</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• resorptions</li> <li>• rotated or flexed limbs (4/38 fetuses at 60 mg/kg and 15/25 fetuses at 180 mg/kg)</li> <li>• hydrocephaly (n=2/38)</li> <li>• increased postimplantation loss, including dead fetuses, and numerous external and visceral malformations at 180 mg/kg</li> </ul>	50 mg oral <sup>f</sup>  C <sub>max</sub> = 0.62 μg/mL <sup>g</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 4.9 μg·h/mL <sup>g</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 1.6 (0.97/0.62) AUC = 2.2 (10.75/4.9) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 1.3 (0.82/0.62) AUC = 0.9 (4.18/4.9)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 7.9 (4.87/0.62) AUC = 11.0 (53.75/4.9) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 3.5 (2.16/0.62) AUC = 2.9 (14.4/4.9)	



- a: Numerous developmental toxicity studies in rats have been reported in the literature with a variety of divergent results in different strains (Newman, Neubert, Janer, Schardein). Many of these older studies do not meet today's standards for design. Although malformations cannot be reproducibly induced, embryolethality appears to be a common effect at doses  $\geq 100$  mg/kg (Newman).
- b: Based on literature reviews by Newman and Schardein, a dose of 50 mg/kg was chosen as the LOAEL. Based on review by Janer, 10 mg/kg appeared to be the highest dose with no evidence of developmental toxicity.
- c: Extrapolated or actual value after 50 mg/kg thalidomide oral dose for 8 days in female Fischer rats (FDA, United States p. 86):  $C_{\max} = 4.87$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 53.75$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . PK data are also available after 30 mg/kg oral single dose in female Fischer rats (FDA, United States, p. 22, 91):  $C_{\max} = 10.4$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-18\text{h})} = 63.99$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ; and after a 100 mg/kg oral single dose in male Sprague Dawley rats (FDA, United States, p. 73):  $C_{\max} = 21.60$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-48\text{h})} = 348.5$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- d: Actual value after 20 mg/kg thalidomide oral doses in pregnant New Zealand White rabbits (Christian). GD7:  $C_{\max} = 1.77$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 13.4$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ; GD19:  $C_{\max} = 0.824$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 4.18$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- e: Actual value after 60 mg/kg thalidomide oral doses in pregnant New Zealand White rabbits (Christian). GD7:  $C_{\max} = 6.39$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 78.7$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ; GD19:  $C_{\max} = 2.16$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-24\text{h})} = 14.4$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- f: Currently approved doses range from 100 to 400 mg/day. A dose of 50 mg was used for PK comparisons because that was the lowest dose used to treat insomnia when thalidomide was first developed. Also, one 50 mg tablet of thalidomide during the time-sensitive window is sufficient to cause birth defects in 50% of pregnancies (Vargesson).
- g: Actual value after 50 mg single dose to healthy volunteers (Teo, US label):  $C_{\max} = 0.62$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC} = 4.90$   $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .

## References

- Christian MS, Laskin OL, Sharper V, Hoberman A, Stirling DI, Latriano L. Evaluation of the developmental toxicity of lenalidomide in rabbits. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2007;80:188-207.
- FDA, United States. Pharmtox review NDA 020785 (11 May 1998).
- Janer G, Slob W, Hakkert BC, Vermeire T, Piersma AH. A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: what is the added value of the rabbit as an additional test species? *Regul Toxicol Pharmacol.* 2008;50:206-17.
- Neubert R, Neubert D. Peculiarities and possible mode of actions of thalidomide. In: Kavlock RJ, Daston GP, editors. *Handbook of experimental pharmacology 124: Drug toxicity in embryonic development II.* New York: Springer-Verlag; 1997. p.41-119.
- Newman LM, Johnson EM, Staples RE. Assessment of the effectiveness of animal developmental toxicity testing for human safety. *Reprod Toxicol.* 1993;7:359-90.
- Schardein JL, Macina OT. *Human developmental toxicants: aspects of toxicology and chemistry.* Boca Raton: CRC Press; 2007. p. 127-141.
- Teo SK, Colburn WA, Tracewell WG, Kook KA, Stirling DI, Jaworsky MS, Scheffler MA, Thomas SD, Laskin OL. Clinical pharmacokinetics of thalidomide. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43:311-27.
- Vargesson N. Thalidomide embryopathy: an enigmatic challenge. *ISRN Development Biol.* 2013;2013:Article ID 241016. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/241016>
- US label Thalomid.

## Additional References Evaluated

- Brock N, [Experimental contribution to the testing of teratogenic drug effects in the laboratory rat]. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.* 1964;249:117-145 [500 mg/kg only dose tested]
- EMA Assessment Report for Thalidomide Pharmion. EMEA/176582/2008, p. 13. [same PK values as FDA, United States review,  $AUC_{(0-\infty)} = 55.25 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  at 50 mg/kg on D8]
- Eriksson T, Riesbeck K, Ostraat O, Ekberg H, Björkman S. Drug exposure and flow cytometry analyses in a thalidomide treatment schedule that prolongs rat cardiac graft survival. *Transplant Proc.* 1992;24:2560-1. [no PK parameters published]
- FDA, United States. Pharmtox review NDA 021430 (23 Nov 2005). [review for multiple myeloma, no new PK or teratology data from NDA 020785 ]

FDA, United States. Pharmtox review NDA 204026 (08 Feb 2013). [thalidomide was used as a positive control in the rabbit developmental toxicity study at a dose of 180 mg/kg]

## TOPIRAMATE

CAS No.: 97240-79-4

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
100 mg/kg oral GD6-15 [US label, FDA, United States 1996a]  C <sub>max</sub> = 49 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 893 µg·h/mL <sup>b</sup>	400 mg/kg oral GD6- 15 [US label, FDA, United States 1996a]  C <sub>max</sub> = 168.6 µg/mL <sup>c</sup>	ectrodactyly, hydronephrosis	20 mg/kg oral GD6-18 [US label, FDA, United States 1996a]  C <sub>max</sub> = 13 µg/mL <sup>d</sup> AUC = 67 µg·h/mL <sup>d</sup>	35 mg/kg oral GD6-18 [US label, FDA, United States 1996a]  C <sub>max</sub> = 23 µg/mL <sup>d</sup> AUC = 117 µg·h/mL <sup>d</sup>	embryofetal mortality at ≥35 mg/kg	400 mg/day in two divided doses  C <sub>max</sub> = 13.5 µg/mL <sup>e</sup> AUC = 229 µg·h/mL <sup>e</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 3.6 (49/13.5) AUC = 3.9 (893/229) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 1.0 (13/13.5) AUC = 0.3 (67/229)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 12.5 (169/13.5)	<ul style="list-style-type: none"> <li>In rats: Although reduced fetal BW and increased incidence of structural variations were observed at 20 mg/kg, the NOAEL for MEFL is assumed to be 100 mg/kg</li> <li>In rats: Clinical signs of maternal toxicity were seen at</li> </ul>

	AUC = 3573 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}^{\text{b}}$						AUC = 15.6 (3573/229) <u>rabbit</u> $C_{\text{max}} = 1.7$ (23/13.5) AUC = 0.5 (117/229)	$\geq 400$ mg/kg and maternal BW gain was reduced at $\geq 100$ mg/kg • In rabbits: maternal toxicity (decreased BW gain, clinical signs, and/or mortality) was seen at $\geq 35$ mg/kg
--	--	--	--	--	--	--	---	--

- a: Extrapolated from reported value after 200 mg/kg topiramate for GD12-15 (4 days) in pregnant female Sprague Dawley rats (FDA, United States, p. 48):  $C_{1.5\text{h}} = 97.3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- b: Extrapolated from reported value after 30 mg/kg topiramate for 8 days in female Sprague Dawley rats (FDA, United States, p. 12):  $C_{\text{max}} = 22.2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , AUC = 268.2  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ .
- c: Actual value after 400 mg/kg topiramate for GD12-15 (4 days) in pregnant female Sprague Dawley rats (FDA, United States, p. 48):  $C_{1.5\text{h}} = 168.6$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- d: Extrapolated from reported value after 60 mg/kg topiramate for 14 days in female New Zealand White rabbits (FDA, United States, p. 13):  $C_{\text{max}} = 39.1$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , AUC = 201  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ .
- e: Extrapolated from reported value after 100 mg/kg topiramate BID oral for 14 days (FDA, United States 1996b):  $C_{\text{max}} = 6.76$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ , AUC<sub>(0-24h)</sub> = 57.2  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ . PK data at a number of other doses and schedules and in combination with other drugs are also available (FDA, United States 1995b, Bialer).

### References

- Bialer M, Doose DR, Murthy B, Curtin C, Wang SS, Twyman RE, et al. Pharmacokinetic interactions of topiramate. Clin Pharmacokinet. 2004;43:763-80. FDA, United States. Pharmtox Review NDA 020505 (24 Dec 1996a).
- FDA, United States. Clinical Pharmacology Review NDA 020505 (24 Dec 1996b), p. 39.



## TRIMETHADIONE

CAS No.: 127-48-0

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
60 mg/kg oral GD6-15 [Buttar 1976]  <u>Trimethadione</u> C <sub>max</sub> = 58.9 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 203 µg·h/mL <sup>a</sup>	240 mg/kg oral GD6-18 [Buttar 1976]  <u>Trimethadione</u> C <sub>max</sub> = 235 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 814 µg·h/mL <sup>a</sup>	240 mg/kg GD6-15 [Buttar]: “adverse fetal effects on survival and litter size”  250 mg/kg GD7-18 [Vorhees]: embryoletality, malformations (primarily cardiac, with a lower incidence of esophageal and kidney defects)	No rabbit data found  <u>Trimethadione</u> AUC = 10.78 µg·h/mL <sup>c</sup>	No rabbit data found	No rabbit data found	600 mg QID (10 mg/kg × 4) [highest dose, US label]  <u>Trimethadione</u> C <sub>max</sub> = 42.75 µg/mL <sup>d</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 1000 µg·h/mL <sup>d</sup>	<u>Trimethadione</u> NOAEL: rat C <sub>max</sub> = 1.4 (58.9/42.75) AUC = 0.2 (203/1000) <u>rabbit</u> NOAEL not identified  LOAEL: rat C <sub>max</sub> = 5.5 (235/42.75) AUC = 0.8 (814/1000) <u>rabbit</u> LOAEL not identified  <u>Dimethadione</u> NOAEL:	Dimethadione is the only metabolite, has much higher exposures than trimethadione, and is a confirmed teratogen (Buttar 1978). Thus, margins for dimethadione are also listed.

							<u>rat</u> $C_{max} = 0.1$ (97.7/1251) AUC = 0.1 (4872/36670)  LOAEL: <u>rat</u> $C_{max} = 0.3$ (391/1251) AUC = 0.5 (19488/36670)	
--	--	--	--	--	--	--	--	--

- a: Extrapolated from reported value after 100 mg/kg trimethadione oral single dose in male Wistar rats (Tanaka 1981):  $C_{max} = 98.1 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-\text{inf})} = 339 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- b: Extrapolated from reported value after 100 mg/kg trimethadione oral single dose in male Wistar rats (Tanaka 1981): dimethadione  $C_{max} = 162.8 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-\text{inf})} = 8120 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ .
- c: Actual value after 4 mg/kg trimethadione intravenous single dose in Japanese White rabbits (Tanaka 1999):  $AUC_{(0-\text{inf})} = 10.78 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$  calculated from  $Cl = 0.371 \text{ L}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ .
- d: Extrapolated from reported value after 4 mg/kg trimethadione oral single dose (Kobayashi):  $C_{max} = 6.0 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-\text{inf})} = 100.1 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . For  $C_{max}$ , an accumulation factor of 2.85 was applied that was estimated from the equation:  $\text{accumulation} = 1/(1 - e^{-k\cdot\text{tau}})$ , where  $k = 0.693/t_{1/2}$  with  $t_{1/2} = 9.6$  hours and  $\text{tau} = 6$  hours (i.e.,  $1/(1 - e^{-0.433}) = 1/(1 - 0.649) = 1/0.351 = 2.85$ ).
- e: Extrapolated from reported value after 4 mg/kg trimethadione oral single dose (Kobayashi): dimethadione  $C_{max} = 12.83 \mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{(0-\text{inf})} = 3667 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . For  $C_{max}$ , an accumulation factor of 39 was applied that was estimated from the equation:  $\text{accumulation} = 1/(1 - e^{-k\cdot\text{tau}})$ , where  $k = 0.693/t_{1/2}$  with  $t_{1/2} = 160$  hours and  $\text{tau} = 6$  hours (i.e.,  $1/(1 - e^{-0.026}) = 1/(1 - 0.974) = 1/0.026 = 39$ ).

## References

Buttar HS, Dupui I, Khera KS. Fetotoxicity of trimethadione and paramethadione in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1976;37:126 [abstract]

Buttar HS, Dupuis I, Khera KS. Dimethadione-induced fetotoxicity in rats. *Toxicology*. 1978;9:155-64.

Tanaka E, Kinoshita H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Takabatake E. Pharmacokinetic studies of trimethadione and its metabolite in rats with chemical-induced liver injury. *J Pharmacobiodyn*. 1981;4:576-83.

Tanaka E, Ishikawa A, Horie T. *In vivo* and *in vitro* trimethadione oxidation activity of the liver from various animal species including mouse, hamster, rat, rabbit, dog, monkey and human. *Hum Exp Toxicol*. 1999;18:12-16.

Vorhees CV. Fetal anticonvulsant syndrome in rats: dose- and period-response relationships of prenatal diphenylhydantoin, trimethadione and phenobarbital exposure on the structural and functional development of the offspring. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983;227:274-87.

US label trimethadione.

#### **Additional References Evaluated**

Midha KK. Metabolism and disposition of trimethadione in pregnant rats. *Epilepsia*. 1979;20:417-23. [only useful data are concentrations at 6 hours after last dose following dosing 60 and 240 mg/kg GD6-15: at 60 mg/kg ,  $C_{6h} = 11.3 \mu\text{g/mL}$ ]

Schardein JL, Schwetz BA, Kenel MF. Species sensitivities and prediction of teratogenic potential. *Environ Health Perspect*. 1985;61:55-67. [claimed rats are an insensitive species for detecting trimethadione teratogenesis]

Tanaka E, Yoshida T, Kuroiwa Y. Dose-independent pharmacokinetics of trimethadione and its metabolite in rats. *J Pharm Sci*. 1985;74:340-1. [PK values after 4 mg/kg trimethadione oral single dose in male Wistar rats: trimethadione  $C_{\text{max}} = 3.0 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})} = 8.21 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ , and dimethadione  $C_{\text{max}} = 10.2 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})} = 465.8 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ . The values after 100 mg/kg (Tanaka 1981) were used instead].

Taylor JD, Bertcher EL. The determination and distribution of trimethadione (tridione) in animal tissues. *J Pharmacol Exp Ther*. 1952;106:277-85. [levels in rabbit brain after 1000 mg/kg IP]



## Valproic Acid

CAS No.: 99-66-1 (sodium valproate: 1069-66-5)

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
65 mg/kg oral GD6-15, SD rats [FDA, United States, 1995]  C <sub>max</sub> = 73.8 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 230 µg·h/mL <sup>a</sup>	200 mg/kg oral, SD rats, GD7-18 [Voorhees], GD8-17 [Binker]; [US Depacon label]  C <sub>max</sub> = 227 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 707 µg·h/mL <sup>a</sup>	hydronephrosis, cardiovascular defects	150 mg/kg oral GD6-18 [FDA, United States, 1977]  C <sub>max</sub> = 410 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 690 µg·h/mL <sup>b</sup>	350 mg/kg oral GD6-18 [FDA, United States, 1977]  C <sub>max</sub> = 957 µg/mL <sup>b</sup> AUC = 1610 µg·h/mL <sup>b</sup>	resorptions; external abnormalities (cleft palate, umbilical hernia, bilateral talipes, exencephaly, hypoplastic ears, gastrochisis, bilateral talipes); visceral malformations (intraventricular septal defects, misshapen ventricle, renal	60 mg/kg/day oral in 2 divided doses (30 mg/kg/dose) [highest approved dose, US Depakote and Depakene labels]  C <sub>max</sub> = 205 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>(0-inf)</sub> = 4180 µg·h/mL <sup>d</sup>	NOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.4 (73.8/205) AUC = 0.06 (230/4180) <u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 2.0 (410/205) AUC = 0.2 (690/4180)  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 1.1 (227/205) AUC = 0.2 (707/4180)	

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit NOAEL</b>	<b>Rabbit LOAEL</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
					agenesis); skeletal malformations (supernumerary ribs, fused ribs)		<u>rabbit</u> C <sub>max</sub> = 4.7 (957/205) AUC = 0.4 (1610/4180)	

- a: Extrapolated or actual value after 200 mg/kg valproic acid oral dose on GD17 in pregnant Sprague Dawley rats (Binkerd): C<sub>max</sub> = 227 µg/mL, AUC = 707 µg·h/mL. PK data are also available on GD8: C<sub>max</sub> = 341 µg/mL, AUC = 1019 µg·h/mL
- b: Extrapolated from reported value after 70 mg/kg valproic acid oral single dose in male New Zealand White rabbits (Bourin): C<sub>max</sub> = 191.3 µg/mL, AUC<sub>(0-inf)</sub> = 322 µg·h/mL. Rabbit PK data are also available after 50 mg/kg oral (FDA, United States), 20 mg/kg oral (van Jaarsveld), 43 mg/kg intravenous (Nakashima), and 75 mg/kg intravenous (Yokogawa).
- c: Extrapolated from reported value after 1000 mg valproic acid oral BID for 5 days (Nitsche): C<sub>max</sub> = 114 µg/mL.
- d: Extrapolated from reported value after 1000 mg valproic acid oral single dose (Nitsche): AUC<sub>(0-inf)</sub> = 1161 µg·h/mL.

## References

- Binkerd PE, Rowland JM, Nau H, Hendrickx AG. Evaluation of valproic acid (VPA) developmental toxicity and pharmacokinetics in Sprague-Dawley rats. *Fundam Appl Toxicol.* 1988;11:485-93.
- Bourin M, Guenzet J, Thomare P, Kergueris MF, Ortega A, Larousse C. Effects of administration route on valproate pharmacokinetics in the rabbit. *Fundam Clin Pharmacol.* 1991;5:331-9.
- FDA, United States Approval Package, NDA 018081 (S-001, S-025) and 018082 (S-008) (1995), Part 2. p. 7-8,10,12,28.
- FDA, United States Pharmtox reviews IND 011152 (March 1977), p. 31-32, 34.

Nitsche V, Mascher H. The pharmacokinetics of valproic acid after oral and parenteral administration in healthy volunteers. *Epilepsia*. 1982;23:153-62

Ong LL, Schardein JL, Petrere JA, Sakowski R, Jordan H, Humphrey RR, et al. Teratogenesis of calcium valproate in rats. *Fundam Appl Toxicol*. 1983;3:121-6.

Vorhees CV. Teratogenicity and developmental toxicity of valproic acid in rats. *Teratology*. 1987;35(2):195-202.

US Depacon (valproate injection) label.

US Depakene (valproate capsule) label.

US Depakote (valproex tablets) label.

#### **Additional References Evaluated**

FDA, United States Pharmtox reviews IND 011152 (1977), p. 48. [after 50 mg/kg [<sup>14</sup>C]valproic acid oral single dose in rabbits (FDA, United States):  $C_{\max} = 86 \mu\text{g/mL}$ ].

Katayama H, Mizukami K, Yasuda M, Hatae T. Effects of carnitine on valproic acid pharmacokinetics in rats. *J Pharm Sci*. 2016;105:3199-3204. [PK data in male Wistar rats after 32 mg/kg oral:  $C_{\max} = 40.7 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})} = 3458 \mu\text{g}\cdot\text{min/mL}$  ( $57.6 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )]

Nakashima M, Takeuchi N, Hamada M, Matsuyama K, Ichikawa M, Goto S. *In vivo* microdialysis for pharmacokinetic investigations: a plasma protein binding study of valproate in rabbits. *Biol Pharm Bull*. 1994;17:1630-4. [PK after 43 mg/kg intravenous valproic acid in anesthetized male Japanese Albino rabbits:  $C_0 = 157 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})} = 308 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ]

Rha JH, Jang IJ, Lee KH, Chong WS, Shin SG, Lee N, Myung HJ. Pharmacokinetic comparison of two valproic acid formulations--a plain and a controlled release enteric-coated tablets. *J Korean Med Sci*. 1993 Aug;8(4):251-6.

van Jaarsveld MF, Walubo A, du Plessis JB. Interaction between valproic acid and acyclovir after intravenous and oral administration in a rabbit model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007;101:434-40. [PK after 20 mg/kg valproic acid oral single dose in New Zealand White rabbits:  $C_{\max} = 64.2 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-\text{inf})} = 227 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ].

Yokogawa K, Iwashita S, Kubota A, Sasaki Y, Ishizaki J, Kawahara M, Matsushita R, Kimura K, Ichimura F, Miyamoto K. Effect of meropenem on disposition kinetics of valproate and its metabolites in rabbits. *Pharm Res.* 2001;18:1320-6. [PK after 75 mg/kg intravenous dose in male albino rabbits:  $C_{\max} = 238 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{AUC}_{(0-6\text{h})} = 17.5 \text{ mg}\cdot\text{min/L}$  ( $292 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ )]

Zaccara G, Messori A, Moroni F. Clinical pharmacokinetics of valproic acid--1988. *Clin Pharmacokinet.* 1988;15:367-89.

## VISMODEGIB

CAS No.: 879085-55-9

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
NOAEL not identified	10 mg/kg GD6-17 oral [FDA, United States, 2011]  C <sub>max</sub> = 7.22 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 50.5 µg·h/mL <sup>a</sup>	malformations included absent and/or fused digits on the hind limb, open perineum, multiple craniofacial anomalies	no rabbit data found	no rabbit data found	no rabbit data found	150 mg oral  C <sub>max</sub> = 13.0 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>(0-24h)</sub> = 306 µg·h/mL <sup>b</sup>	NOAEL: <u>rat</u> : NOAEL not identified <u>rabbit</u> : no data found  LOAEL: <u>rat</u> C <sub>max</sub> = 0.6 (7.22/13) AUC = 0.2 (50.5/306) <u>rabbit</u> no data found	MW = 421.3

a: Reported value after 10 daily oral doses of 10 mg/kg vismodegib in female pregnant Wistar rats (FDA, United States, 2011): C<sub>max</sub> = 7.22 µg/mL, AUC<sub>(0-24h)</sub> = 50.5 µg·h/mL

b: Reported value after 14 daily oral doses of 150 mg vismodegib (FDA, United States, 2012):  $C_{max} = 30.9 \mu\text{M}$  ( $13.0 \mu\text{g/mL}$ ),  $AUC_{(0-24h)} = 727 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$  ( $306 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ ).

### References

FDA, United States. Pharmacology Review NDA 203388 (08 Sep 2011), p. 66-9.

FDA, United States. Clinical Pharmacology Review NDA 203388 (13 Jan 2012), p. 48.

### 1.3.2 陰性对照物質

#### CETIRIZINE

CAS No.: 83881-51-0

Rat NOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rat LOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rabbit LOAEL Dose $C_{max}$ AUC	Rabbit Findings	Human Dose $C_{max}$ AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
NOAEL (MEFL) 75 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States 1989) $C_{max} = 45 \mu\text{g/mL}^a$ AUC = 301 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^b$	225 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States 1989) $C_{max} = 128 \mu\text{g/mL}^a$ AUC = 1010 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}^b$	225 mg/kg: pre- and post-implantation loss in presence of maternal toxicity (death, clinical signs)	NOAEL (MEFL) 135 mg/kg oral GD6-18 (FDA, United States 1989) $C_{max} = 137 \mu\text{g/mL}^c$	Not established	No MEFL observed	10 mg MRHD Exposure values after single dose: $C_{max} = 0.33 \mu\text{g/mL}^d$ AUC <sub>(0-24h)</sub> : 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}^d$	NOAEL: rat (75 mg/kg/day) $C_{max}$ : 136 (45/0.33) AUC: 111 (334/3.02) Rabbit (135 mg/kg/day) $C_{max}$ : 415 (137/0.33) AUC: 213 (642/3.02)	None

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit</b>	<b>Rabbit</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>NOAEL Dose</b>	<b>LOAEL Dose</b>	<b>Rabbit</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>Findings</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
<u>Exposure data at lower doses</u> 8 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States 1989)  C <sub>max</sub> = 4.6 µg/mL <sup>a</sup> AUC = 32 µg•h/mL <sup>b</sup>  25 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States 1989)  C <sub>max</sub> = 12 µg/mL <sup>a</sup>			AUC = 642 µg•h/mL <sup>c</sup>  <u>Exposure data at lower doses</u> 15 mg/kg oral GD6-18 (FDA, United States 1989)  C <sub>max</sub> = 15 µg/mL <sup>c</sup> AUC = 71 µg•h/mL <sup>c</sup>  45 mg/kg oral GD6-18 (FDA, United States 1989)				LOAEL: <u>Rat (225 mg/kg/day)</u> C <sub>max</sub> : 388 (128/0.33) AUC: 334 (1010/3.02) <u>rabbit</u> Not applicable	

<b>Rat NOAEL Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat LOAEL Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>Rabbit NOAEL Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit LOAEL Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Human Dose</b> <b>C<sub>max</sub></b> <b>AUC</b>	<b>Margins NOAEL/Human</b> <b>LOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
AUC = 41 μg•h/mL <sup>b</sup>			C <sub>max</sub> = 51 μg/mL <sup>c</sup> AUC = 116 μg•h/mL <sup>c</sup>					

a: From reported C<sub>max</sub> values in a 4-week repeated-dose toxicity study in rats at steady state (day 23) at doses of 25, 75 and 225 mg/kg/day. C<sub>max</sub> for 8 mg/kg/day was linearly extrapolated from these data. (FDA, United States 1993, page 4).

b: From reported AUC values in a 4-week repeated-dose toxicity study in rats at steady state (day 23) at doses of 25 mg/kg/day and 225 mg/kg/day. AUC for 8 and 75 mg/kg/day were linearly extrapolated from these data (FDA, United States 1993, page 4).

c: From reported C<sub>max</sub> and AUC values in pregnant rabbits exposed from GD6-18 at steady state (GD18) at doses of 25, 45 and 90 mg/kg/day. C<sub>max</sub> and AUC for 15 and 135 mg/kg/day were linearly extrapolated from these data. (FDA, United States 1993, page 5).

d: Single administration of 10 mg cetirizine with water (FDA, United States, 2003).

## References

FDA, United States. Pharmacology review of NDA 019835 (11 Apr 1989) part 01, pages 10-11 (rat and rabbit EFD overview).

FDA, United States. Pharmacology review of NDA 019835 (11 Apr 1989) part 02, pages 10-30 (rat and rabbit EFD summary).

FDA, United States. Pharmacology review of NDA 019835 (18 Oct 1993), pages 4 (rat PK data) and 5 (rabbit PK data).

FDA, United States. Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Review 021621/S-000 (31 Oct 2003) (Clinical AUC, single dose pg 11)

US Label Zyrtec.

EU SmPC Zyrtec.



# SAXAGLIPTIN

CAS No.: 361442-04-8

Rat NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rat Findings	Rabbit NOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit LOAEL Dose C <sub>max</sub> AUC	Rabbit Findings	Human Dose C <sub>max</sub> AUC	Margins NOAEL/Human LOAEL/Human	Notes
<p><u>NOAEL (MEFL)</u> 900 mg/kg oral GD6-15 (FDA, United States 2009)</p> <p><i>Saxagliptin</i> C<sub>max</sub> = 249 µg/mL<sup>a</sup> AUC<sub>0-24</sub> = 647 µg•h/mL<sup>a</sup></p> <p><i>BMS-510849</i> C<sub>max</sub> = 21.1 µg/mL<sup>b</sup> AUC<sub>0-24</sub> = 144 µg•h/mL<sup>a</sup></p>	Not established	No MEFL observed	<p><u>NOAEL (MEFL)</u> 200 mg/kg oral GD7-19 (FDA, United States 2009)</p> <p><i>Saxagliptin</i> C<sub>max</sub> = 43 µg/mL<sup>c</sup> AUC<sub>0-24</sub> = 111 µg•h/mL<sup>a</sup></p> <p><i>BMS-510849</i> C<sub>max</sub> = 125 µg/mL<sup>c</sup></p>	Not established	No MEFL observed	<p>5 mg MRHD</p> <p>Exposure values after single dose:</p> <p><i>Saxagliptin</i> C<sub>max</sub> = 0.024 µg/mL<sup>d</sup> AUC<sub>(0-24h)</sub>: 0.078 µg•hr/mL<sup>d</sup></p> <p><i>BMS-510849</i> C<sub>max</sub> = 0.047 µg/mL<sup>d</sup> AUC<sub>(0-24h)</sub>: 0.214 µg•hr/mL<sup>d</sup></p>	<p>NOAEL: <u>rat (900 mg/kg/day)</u></p> <p><i>Saxagliptin</i> C<sub>max</sub>: 10,375 (249/0.024) AUC: 8,294 (647/0.078)</p> <p><i>BMS-510849</i> C<sub>max</sub>: 449 (21.1/0.047) AUC: 673 (144/0.214)</p>	<p>BMS-510849 is a major active metabolite of saxagliptin. (US Label and EU EPAR Onglyza)</p>

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit</b>	<b>Rabbit</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>NOAEL Dose</b>	<b>LOAEL Dose</b>	<b>Rabbit</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>Findings</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
Exposure data at lower doses 64 mg/kg oral GD6-15  <i>Saxagliptin</i> C <sub>max</sub> = 17.7 µg/mL <sup>a</sup> AUC <sub>0-24</sub> = 23.6 µg•h/mL <sup>a</sup>  <i>BMS-510849</i> C <sub>max</sub> = 1.5 µg/mL <sup>b</sup> AUC <sub>0-24</sub> = 6.3 µg•h/mL <sup>a</sup>  240 mg/kg oral			AUC <sub>0-24</sub> = 434 µg•h/mL <sup>a</sup>  Exposure data at lower doses 8 mg/kg oral GD7-19  <i>Saxagliptin</i> C <sub>max</sub> = 2 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>0-24</sub> = 2.5 µg•h/mL <sup>a</sup>  <i>BMS-510849</i> C <sub>max</sub> = 5 µg/mL <sup>c</sup> AUC <sub>0-24</sub> = 7.4 µg•h/mL <sup>a</sup>				Rabbit (200 <u>mg/kg/day</u> )  <i>Saxagliptin</i> C <sub>max</sub> : 1,792 (43/0.024) AUC: 1,423 (111/0.078)  <i>BMS-510849</i> C <sub>max</sub> : 2,659 (125/0.047) AUC: 2,028 (434/0.214)  LOAEL: <u>rat</u> Not applicable <u>rabbit</u> Not applicable	

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit</b>	<b>Rabbit</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>NOAEL Dose</b>	<b>LOAEL Dose</b>	<b>Rabbit</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>Findings</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
GD6-15			40 mg/kg oral					
<i>Saxagliptin</i>			GD7-19					
C <sub>max</sub> = 66.3 µg/mL <sup>a</sup>			<i>Saxagliptin</i>					
AUC <sub>0-24</sub> = 121 µg•h/mL <sup>a</sup>			C <sub>max</sub> = 9 µg/mL <sup>c</sup>					
<i>BMS-510849</i>			AUC <sub>0-24</sub> = 12.3 µg•h/mL <sup>a</sup>					
C <sub>max</sub> = 5.6 µg/mL <sup>b</sup>			<i>BMS-510849</i>					
AUC <sub>0-24</sub> = 28.9 µg•h/mL <sup>a</sup>			C <sub>max</sub> = 25 µg/mL <sup>c</sup>					
			AUC <sub>0-24</sub> = 47.9 µg•h/mL <sup>a</sup>					

a: From reported AUC values in pregnant rats (GD15) and pregnant rabbits (GD19) at steady state at doses of 64, 240 and 900 mg/kg/day saxagliptin for rat and 8, 40 and 200 mg/kg/day saxagliptin for rabbit (FDA, United States, 2009, part 02, page 84)

b: From reported C<sub>max</sub> values in a 4-week repeated-dose toxicity study in female rats at steady state (day 28) at doses of 150, 300 and 225 mg/kg/day, corresponding to 50, 78 and 139 ug/mL for saxagliptin and 4.6, 7.9 and 11 ug/mL for the active metabolite.. Saxagliptin C<sub>max</sub> values were linearly extrapolated from these data. (FDA, United States, 2009, part 04, page 56)

c: From reported C<sub>max</sub> values in a rabbit EFD study at steady state (GD19) at 40 mg/kg/day saxagliptin (C<sub>max</sub> 8.5 µg/mL). Saxagliptin C<sub>max</sub> values were linearly extrapolated from these data.

d: Single administration of 5 mg saxagliptin (US Label Onglyza, page 12).

### **References**

FDA, United States. Pharmacology Review 022350/S-000 (3 March 2009) Part 02, page 84 (rat and rabbit AUC data Saxagliptin and active metabolite)

FDA, United States. Pharmacology Review 022350/S-000 (3 March 2009) Part 03, pages 57-59 (rat and rabbit EFD studies).

FDA, United States. Pharmacology Review 022350/S-000 (3 March 2009) Part 04, page 56 (rat C<sub>max</sub> data Saxagliptin and active metabolite)

FDA, United States. Pharmacology Review 200678Orig1s000 (10 January 2010) for Saxagliptin + metformin, page 44 table 30 (rabbit C<sub>max</sub> data Saxagliptin and active metabolite)

US Label Onglyza.

EU EPAR Onglyza.

**VILDAGLIPTIN**

CAS No.: 274901-16-5

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit</b>	<b>Rabbit</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>NOAEL Dose</b>	<b>LOAEL Dose</b>	<b>Rabbit Findings</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
<u>NOAEL (MEFL)</u> 750 mg/kg oral GD6-17 (TGA, Australia 2010)  AUC <sub>0-24</sub> = 241 µg•h/mL <sup>a</sup>  <u>Exposure data at</u> <u>lower doses</u> 75 mg/kg oral GD6-17  AUC <sub>0-24</sub> = 23 µg•h/mL <sup>a</sup>	Not established	No MEFL observed	<u>NOAEL</u> <u>(MEFL)</u> 150 mg/kg oral GD7-20 (TGA, Australia 2010)  AUC <sub>0-24</sub> = 80 µg•h/mL <sup>a</sup>  <u>Exposure data</u> <u>at lower doses</u> 15 mg/kg oral GD7-20  AUC <sub>0-24</sub> = 6 µg•h/mL <sup>a</sup>	Not established	No MEFL observed	50 mg b.i.d. MRHD (100 mg/day)  Exposure values after 50 mg b.i.d.:  AUC <sub>(0-24h)</sub> : 2.06 µg•hr/mL <sup>b</sup>	NOAEL: rat (750 <u>mg/kg/day</u> )  AUC: 117 (241/2.06)  Rabbit (150 <u>mg/kg/day</u> )  AUC: 39 (80/2.06)  LOAEL: Not applicable	

<b>Rat NOAEL</b>	<b>Rat LOAEL</b>		<b>Rabbit</b>	<b>Rabbit</b>		<b>Human</b>	<b>Margins</b>	
<b>Dose</b>	<b>Dose</b>	<b>Rat Findings</b>	<b>NOAEL Dose</b>	<b>LOAEL Dose</b>	<b>Rabbit</b>	<b>Dose</b>	<b>NOAEL/Human</b>	<b>Notes</b>
<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>		<b>C<sub>max</sub></b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>Findings</b>	<b>C<sub>max</sub></b>	<b>LOAEL/Human</b>	
<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>	<b>AUC</b>		<b>AUC</b>		
225 mg/kg oral GD6-17  AUC <sub>0-24</sub> = 68 µg•h/mL <sup>a</sup>			50 mg/kg oral GD7-20  AUC <sub>0-24</sub> = 19 µg•h/mL <sup>a</sup>					

a: Calculated from exposure ratios compared to human exposure at MRHD (2.06 µg•hr/mL at 50 mg BID) of AUC data provided within the rat and rabbit EFD studies (TGA, Australia, 2010, page 19)

b: Human exposure data at 50 mg BID (TGA, Australia, 2010, page 14)

### References

TGA, Australia. Australian Public Assessment Report for Vildagliptin (April 2010) pages 19 (EFD studies), 14, 24 (exposure data) and 72 (pregnancy).

EU EPAR Galvus

EU SmPC. Galvus