

スインプロイク錠 0.2 mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表.....	3
2.6.1 緒言.....	4
2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理学的特性.....	4
2.6.1.2 申請した効能・効果及び用法・用量.....	5

2.6.1 略号及び用語定義一覧表

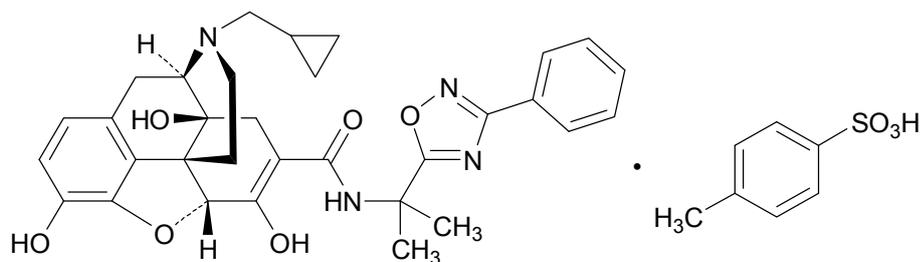
略号	用語定義
ED ₅₀₍₈₀₎	50% (80%) 有効量 [50% (80%) effective dose]

2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品の構造及び薬理学的特性

ナルデメジントシル酸塩は、塩野義製薬株式会社で創製されたオピオイド誘発性便秘症に対して経口投与で薬効を発揮する新規の強力な末梢性 μ オピオイド受容体拮抗薬である。

1 医薬品の構造



2 薬理学的特性

- ナルデメジントシル酸塩は、ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対して、結合親和性を示すとともに、アンタゴニスト活性を示したが、アゴニスト活性は示さなかった。
- ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ又はオキシコドン皮下投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害が有意に抑制され、モルヒネ皮下投与で誘発される阻害に対する50%及び80%有効量(それぞれED₅₀及びED₈₀)は、それぞれ0.03及び0.14 mg/kgであり、オキシコドン皮下投与で誘発される阻害に対する値は、それぞれ0.02及び0.13 mg/kgであった。また、モルヒネ経口投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害も有意に抑制された。さらに、ナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用は、ラットヒマシ油誘発下痢を皮下投与のモルヒネで抑制するモデルにおいても認められ、ED₅₀及びED₈₀値は、それぞれ0.010及び0.011 mg/kgであった。
- ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、ラットテイル・フリック試験では7 mg/kgまで、ラット術後痛モデルでは3 mg/kgまで、モルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛作用に対して有意な影響を及ぼさなかった。
- ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ依存マウスの末梢性退薬症候の指標である下痢は、1及び10 mg/kgで認められたが、中枢性退薬症候の指標である跳躍行動は、10 mg/kgまでの用量でも認められなかった。また、ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ依存ラットの中枢性退薬症候の指標である跳躍行動及び身震い行動の誘発は、3 mg/kgまでの用量でも認められなかったが、別の中枢性退薬症候の指標である歯をカタカタ鳴らす行動が3 mg/kgで認められ、末梢性退薬症候の指標である下痢及び体重減少が、それぞれ0.03 mg/kg以上及び0.3 mg/kg以上で認められた。
- ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ皮下投与で誘発されるフェレットの催吐が抑制され、ED₅₀及びED₈₀値は、それぞれ0.033及び0.119 mg/kgであった。また、モルヒネ経口投与で誘発されるフェレットの催吐も有意に抑制され、ED₅₀及びED₈₀値は、それ

ぞれ 0.016 及び 0.023 mg/kg であった.

2.6.1.2 申請した効能・効果及び用法・用量

1. 効能・効果

オピオイド誘発性便秘症

2. 用法・用量

通常，成人には，ナルデメジンとして 1 回 0.2 mg を 1 日 1 回経口投与する.

スインプロイク錠 0.2 mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表.....	4
2.6.2 薬理試験の概要文.....	5
2.6.2.1 まとめ.....	5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	7
2.6.2.2.1 <i>In Vitro</i> 試験.....	7
2.6.2.2.1.1 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の結合親和性.....	7
2.6.2.2.1.2 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX のアンタゴニスト活性.....	7
2.6.2.2.1.3 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX のアゴニスト活性.....	8
2.6.2.2.1.4 ラット μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩の結合親和性, アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性.....	8
2.6.2.2.1.5 ナルデメジントシル酸塩の μ オピオイド受容体に対する結合キネティクス及び阻害様式.....	9
2.6.2.2.2 <i>In Vivo</i> 試験.....	11
2.6.2.2.2.1 モルヒネ皮下投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の抗便秘作用.....	11
2.6.2.2.2.2 オキシコドン皮下投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害に対するナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用.....	12
2.6.2.2.2.3 モルヒネ経口投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害に対するナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用.....	13
2.6.2.2.2.4 モルヒネ皮下投与で誘発されるラットヒマシ油誘発下痢阻害に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の抗便秘作用.....	13
2.6.2.3 副次的薬理試験.....	15
2.6.2.3.1 選択性.....	15
2.6.2.3.1.1 各種受容体, イオンチャネル及びトランスポーター結合及び酵素アッセイ.....	15
2.6.2.3.2 オピオイドによる鎮痛作用への抑制作用 (鎮痛抑制作用).....	15
2.6.2.3.2.1 ラットテールフリック試験におけるモルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の作用.....	15
2.6.2.3.2.2 テールフリック試験におけるナルデメジントシル酸塩の鎮痛抑制作用の時間経過.....	16
2.6.2.3.2.3 ラット術後痛モデルにおけるモルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛に対するナルデメジントシル酸塩及びナロキシソンの作用.....	16
2.6.2.3.3 オピオイド受容体占有率.....	17
2.6.2.3.3.1 ラット大脳皮質及び視床におけるナルデメジントシル酸塩による <i>in vivo</i> オピオイド受容体占有率.....	17

2.6.2.3.4	オピオイドによる嘔気嘔吐の抑制作用 (制吐作用).....	18
2.6.2.3.4.1	フェレットにおけるモルヒネ皮下投与で誘発される催吐に対するナルデ メジントシル酸塩及び MNTX の抑制作用.....	18
2.6.2.3.4.2	フェレットにおけるモルヒネ皮下投与で誘発される嘔気嘔吐に対するナルデ メジントシル酸塩及び MNTX の抑制作用の持続性.....	18
2.6.2.3.4.3	フェレットにおけるモルヒネ経口投与で誘発される嘔気嘔吐に対するナルデ メジントシル酸塩の抑制作用.....	19
2.6.2.3.5	ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩代謝物の 結合親和性, アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性.....	19
2.6.2.4	安全性薬理試験.....	21
2.6.2.4.1	<i>In Vitro</i> 試験.....	21
2.6.2.4.1.1	モルモット乳頭筋での心筋活動電位に対する作用.....	21
2.6.2.4.1.2	hERG チャンネル発現細胞でのカリウム電流に対する作用.....	21
2.6.2.4.2	<i>In Vivo</i> 試験.....	22
2.6.2.4.2.1	ラットの中樞神経系に対する作用.....	22
2.6.2.4.2.2	ラットの呼吸系に対する作用.....	22
2.6.2.4.2.3	イヌの心血管系に対する作用.....	22
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	24
2.6.2.6	考察及び結論.....	25
2.6.2.6.1	効力を裏付ける <i>in vitro</i> 試験.....	25
2.6.2.6.2	効力を裏付ける <i>in vivo</i> 試験.....	25
2.6.2.6.3	副次的薬理試験.....	26
2.6.2.6.4	安全性薬理.....	27
2.6.2.6.5	結論.....	28
2.6.2.7	図表.....	29
2.6.2.8	参考文献.....	30

2.6.2 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
APA	活動電位振幅 (action potential amplitude)
APD ₃₀₍₉₀₎	30% (90%) 再分極時の活動電位持続時間 (action potential duration at 30% (90%) repolarization)
APD ₃₀₋₉₀	APD ₉₀ と APD ₃₀ の差 (a difference between APD ₉₀ and APD ₃₀)
AUC _{0-24hr}	時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours)
C _{max}	最高血漿中濃度 (maximum plasma concentration)
DAMGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-enkephalin
DMSO	ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)
EC ₅₀	50%有効濃度 (50% effective concentration)
ED ₅₀₍₈₀₎	50% (80%) 有効量 (50% (80%) effective dose)
FOB	機能観察総合評価法 (functional observational battery)
FR1 (5) (10)	定率 1 (5) (10) [fixed ratio 1 (5) (10)]
GLP	Good Laboratory Practice
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (human ether-à-go-go related gene)
IC ₅₀	50%阻害濃度 (50% inhibitory concentration)
K _b	結合定数 (binding constant)
K _i	阻害定数 (inhibition constant)
K _{obs}	見かけの結合速度定数 (observed association rate constant)
K _{off}	解離速度定数 (dissociation rate constant)
MC	メチルセルロース (methylcellulose)
MNTX	メチルナルトレキソン (methylnaltrexone)
MPE	最大可能効果 (maximal possible effect)
OIC	オピオイド誘発性便秘 (opioid-induced constipation)
RMP	静止膜電位 (resting membrane potential)
[³⁵ S]-GTPγS	グアノシン 5'-O-(3-[³⁵ S] チオ) トリリン酸 (guanosine 5'-O-(3-[³⁵ S]thio)triphosphate)
t _{1/2}	消失半減期 (elimination half-life)
WBP	whole body plethysmography
ナルデメジン 3-G	ナルデメジン 3-O-β-D-グルクロニド (naldemedine 3-O-β-D-glucuronide)
ナルデメジン 6-G	ナルデメジン 6-O-β-D-グルクロニド (naldemedine 6-O-β-D-glucuronide)
ナルデメジン-CA	ナルデメジン-カルボン酸体 (naldemedine-carboxylic acid)

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ナルデメジントシル酸塩は、強力な μ オピオイド受容体アンタゴニスト活性を有し、オピオイドの有する中枢性の鎮痛作用に影響することなく、オピオイドによって誘発される便秘に対して抗便秘作用を示す。また、ナルデメジントシル酸塩はオピオイド誘発性の嘔吐に対しても制吐作用も示す。薬理試験の概要文では、特に明記しない限り、試験は日本の信頼性基準下で実施し、ナルデメジントシル酸塩の投与量及び濃度はナルデメジン (フリー体) の量及び濃度を示す。

ナルデメジントシル酸塩は、ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対して結合親和性を有し、基質の結合に対する阻害定数 (K_i) は、それぞれ 0.34、0.43 及び 0.94 nmol/L であった。ナルデメジントシル酸塩は、ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対してアンタゴニスト活性を示し、機能的結合定数 (K_b) は、それぞれ 0.50、0.27 及び 0.44 nmol/L であったが、アゴニスト活性は示さなかった。ナルデメジントシル酸塩は、 μ オピオイド受容体に対してナロキソンと比較して結合及び解離速度が遅く、 μ オピオイド受容体活性化に対して非競合的な様式で阻害作用を示した。

ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ又はオキシコドン皮下投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害が有意に抑制された。モルヒネ皮下投与で誘発される阻害に対する 50% 及び 80% 有効量 (それぞれ ED_{50} 及び ED_{80}) は、それぞれ 0.03 及び 0.14 mg/kg であり、オキシコドン皮下投与で誘発される阻害に対する ED_{50} 及び ED_{80} 値は、それぞれ 0.02 及び 0.13 mg/kg であった。また、ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ経口投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害も有意に抑制された。さらに、ナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用は、ラットのヒマシ油誘発下痢を皮下投与のモルヒネで抑制するモデルにおいても認められ、 ED_{50} 及び ED_{80} 値は、それぞれ 0.010 及び 0.011 mg/kg であった。

ナルデメジントシル酸塩の非選択的リガンドを用いたオピオイド受容体に対する *in vitro* 結合阻害率は 10 μ mol/L の濃度で 100% であったが、61 種の受容体、イオンチャネル及びトランスポーター並びに 9 種の酵素に対する阻害率は 10 μ mol/L の濃度で 50% 未満であった。

モルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛作用に対して、ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、ラットテールフリック試験では 7 mg/kg まで、ラット術後痛モデルでは 3 mg/kg まで、有意な影響 (鎮痛抑制) は認められなかった。

ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ皮下投与で誘発されるフェレットの嘔吐が抑制され、 ED_{50} 値及び ED_{80} 値は、それぞれ 0.033 及び 0.119 mg/kg であった。ナルデメジントシル酸塩は、0.3 mg/kg の単回経口投与によって、モルヒネ皮下投与で誘発される嘔吐をナルデメジントシル酸塩の投与後 6 時間まで完全に抑制し、投与後 8 時間でも 80% の抑制作用を維持していた。さらに、ナルデメジントシル酸塩の単回経口投与により、モルヒネ経口投与で誘発されるフェレットの嘔吐も有意に抑制され、 ED_{50} 値及び ED_{80} 値は、それぞれ 0.016 及び 0.023 mg/kg であった。

ナルデメジントシル酸塩の 5 つの主代謝物について、オピオイド受容体に対する結合親和性、

アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性を評価した。これらの代謝物のうち、nor-ナルデメジン、ナルデメジン 3-O-β-D-グルクロナイド (ナルデメジン 3-G)、ナルデメジン 6-O-β-D-グルクロナイド (ナルデメジン 6-G) 及びナルデメジン-カルボン酸体 (ナルデメジン-CA) の4つの代謝物のヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対する結合親和性は、ナルデメジントシル酸塩と比較して弱かった。一方、もう1つの主代謝物であるベンズアミジンは、これらのオピオイド受容体に対して明らかな結合親和性を示さなかった。Nor-ナルデメジン、ナルデメジン 3-G、ナルデメジン 6-G 及びナルデメジン-CA は、ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対してアンタゴニスト活性を示したが、それらの活性は、ナルデメジントシル酸塩と比較して弱かった。また、5つの主代謝物のうち nor-ナルデメジンがヒト δ オピオイド受容体に対して 96.04 nmol/L の 50%有効濃度 (EC₅₀) でアゴニスト活性を示したが、他の代謝物はアゴニスト活性を示さなかった。

ナルデメジントシル酸塩の中樞神経系、呼吸系及び心血管系に対する作用を評価する目的で、安全性薬理コアバッテリー試験を Good Laboratory Practice (GLP) 基準下で実施した。ナルデメジントシル酸塩は、300 mg/kg までの単回経口投与で、投与後 8 時間までの一般症状及び神経行動学的機能に影響を及ぼさなかった。ナルデメジントシル酸塩は、300 mg/kg までの単回経口投与で、投与後 8 時間までの呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に影響を及ぼさなかった。心血管系に対する *in vitro* 試験では、ナルデメジントシル酸塩は、30 μ mol/L (17.1 μ g/mL) の濃度でモルモット乳頭筋標本の 90%再分極時の活動電位持続時間 (APD₉₀) 及び APD₉₀ と APD₃₀ の差 (APD₃₀₋₉₀) を 10%以上延長した。また、ナルデメジントシル酸塩のヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャネル発現細胞におけるカリウム電流 (hERG 電流) に対する 50%阻害濃度 (IC₅₀) は 30 μ mol/L を超えると推定した。心血管系に対するイヌを用いた *in vivo* 試験では、ナルデメジントシル酸塩は、100 mg/kg までの経口投与で、血圧、心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In Vitro* 試験

ヒト及びラット組換え μ , δ 及び κ オピオイド受容体を発現させた CHO-K1 細胞から調製した細胞膜を用い, ナルデメジントシル酸塩及び参照物質であるメチルナルトレキソン (MNTX) の結合親和性及び機能活性を検討した. また, ナルデメジントシル酸塩及び別の参照物質であるナロキシンの μ オピオイド受容体に対する結合キネティクス及び阻害様式も検討した.

2.6.2.2.1.1 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の結合親和性

評価資料 4.2.1.1-01, 4.2.1.1-02
概要表 2.6.3.2.1, 2.6.3.2.2

ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の結合親和性を, 特異的な結合サイトにおける [^3H]-標識リガンドである μ オピオイド受容体に対する [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-enkephalin (DAMGO), δ オピオイド受容体に対する [^3H]-[D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin 及び κ オピオイド受容体に対する [^3H]-U69593 を用いて, それぞれ 50%置換する濃度から算出した K_i 値で評価した.

ナルデメジントシル酸塩及び MNTX のヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対する K_i 値を表 2.6.2.2-1 に示す. これらの結果から, ナルデメジントシル酸塩は, これらのオピオイド受容体に対して強い結合親和性を有することが示された.

表 2.6.2.2-1 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の結合親和性

物質	K_i 値 (nmol/L)		
	μ 受容体 ^(a)	δ 受容体 ^(a)	κ 受容体 ^(b)
ナルデメジントシル酸塩	0.34 ± 0.03	0.43 ± 0.08	0.940 ± 0.0835
MNTX	5.48 ± 1.11	3458.86 ± 305.64	32.1 ± 1.4

(a): データは評価資料 4.2.1.1-01 から引用. 各値は各 2 回繰り返し実施した 3 実験の平均値 ± 標準誤差.

(b): データは評価資料 4.2.1.1-02 から引用. 各値は 2 実験の平均値 ± 標準誤差.

2.6.2.2.1.2 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX のアンタゴニスト活性

評価資料 4.2.1.1-01, 4.2.1.1-02
概要表 2.6.3.2.1, 2.6.3.2.2

ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX のアンタゴニスト活性を, それぞれの作動薬 (μ オピオイド受容体に対する DAMGO, δ オピオイド受容体に対する [Met⁵]-enkephalin 及び κ オピオイド受容体に対する U-50488H) による guanosine-5'-O-(3-[^{35}S]thio) triphosphate ([^{35}S]GTP γ S) の結合を 50%減少する濃度から算出した K_b 値で評価した.

ナルデメジントシル酸塩及び MNTX のヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対する K_b 値を

表 2.6.2.2-2 に示す。これらの結果は、ナルデメジントシル酸塩は、これらのオピオイド受容体に対して強いアンタゴニスト活性を有することを示している。

表 2.6.2.2-2 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX のアンタゴニスト活性

物質	K _b 値 (nmol/L)		
	μ 受容体 ^(a)	δ 受容体 ^(a)	κ 受容体 ^(b)
ナルデメジントシル酸塩	0.50 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.436 ± 0.0846
MNTX	55.86 ± 6.07	1082.71 ± 234.31	> 270.68

(a) : データは評価資料 4.2.1.1-01 から引用。各値は各 2 回繰り返し実施した 3 実験の平均値 ± 標準誤差。

(b) : データは評価資料 4.2.1.1-02 から引用。各値は 2 実験の平均値 ± 標準誤差。

2.6.2.2.1.3 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX のアゴニスト活性

評価資料 4.2.1.1-01, 4.2.1.1-02
概要表 2.6.3.2.1, 2.6.3.2.2

ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX のアゴニスト活性を、^[35S]-GTP γ S 結合アッセイ系を用いて算出した ^[35S]-GTP γ S の最大結合率及び 50%活性化する濃度 (EC₅₀) で評価した。

ナルデメジントシル酸塩及び MNTX は、いずれもヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するアゴニスト活性は認められなかった (EC₅₀ 値 : > 10 μ mol/L)。

2.6.2.2.1.4 ラット μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩の結合親和性、アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性

評価資料 4.2.1.1-03, 4.2.1.1-04
概要表 2.6.3.2.3, 2.6.3.2.4

ラット μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩の結合親和性、アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性を、K_i 値、K_b 値及び EC₅₀ 値で評価した。

ナルデメジントシル酸塩のラット μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対する K_i 値及び K_b 値を表 2.6.2.2-3 に示す。ナルデメジントシル酸塩のラット μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するアゴニスト活性は認められなかった (EC₅₀ 値 : > 10 μ mol/L)。これらの結果から、ナルデメジントシル酸塩のラット並びにヒトオピオイド受容体に対する結合親和性及び機能活性は、類似していると結論した。

表 2.6.2.2-3 ラット μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩の結合親和性, アンタゴニスト活性

パラメータ	μ 受容体 ^(a)	δ 受容体 ^(b)	κ 受容体 ^(b)
K_i 値 (nmol/L)	1.40 ± 0.24	0.96 ± 0.06	2.16 ± 0.24
K_b 値 (nmol/L)	0.56 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.49 ± 0.02

各値は各 2 回繰り返し実施した 3 実験の平均値 ± 標準誤差.

(a) : データは評価資料 4.2.1.1-03 から引用.

(b) : データは評価資料 4.2.1.1-04 から引用.

2.6.2.2.1.5 ナルデメジントシル酸塩の μ オピオイド受容体に対する結合キネティクス及び阻害様式

評価資料 4.2.1.1-05, 4.2.1.1-06

参考資料 4.2.1.1-11, 4.2.1.1-12

概要表 2.6.3.2.5, 2.6.3.2.6, 2.6.3.2.7, 2.6.3.2.8

ヒト又はラット μ オピオイド受容体に対する [3 H]-ナルデメジン及び [3 H]-ナロキシソンの結合及び解離の時間経過を検討した. ナロキシソンは, 結合キネティクスのプロファイルが知られていることから [1], 陽性対照物質として使用した.

ヒトあるいはラット μ オピオイド受容体に対する [3 H]-ナルデメジン及び [3 H]-ナロキシソンの見かけの結合速度定数 (K_{obs}), 解離速度定数 (K_{off}) 及び過剰量の非標識リガンド添加により [3 H]-標識リガンドの結合が 50% まで減少する時間 ($t_{1/2}$) を表 2.6.2.2-4 に示す. [3 H]-ナルデメジンのこれらの値は, ヒト及びラット μ オピオイド受容体で, 大きな差は認められなかった. ヒト及びラット μ オピオイド受容体に対する [3 H]-ナルデメジンの K_{obs} 及び K_{off} 値は, [3 H]-ナロキシソンの値より小さく, [3 H]-ナルデメジンの $t_{1/2}$ は, [3 H]-ナロキシソンの値より大きかった. 以上の結果から, [3 H]-ナルデメジンは, [3 H]-ナロキシソンに比べて, ヒト又はラット μ オピオイド受容体に対する結合速度及び解離速度が遅いと結論した.

また, モルモット摘出回腸を用いて, ナルデメジントシル酸塩の μ オピオイド受容体に対する阻害様式を予備的に検討した. 電気刺激誘発収縮の DAMGO による抑制に対するナルデメジントシル酸塩 (濃度: 10^{-10} ~ 10^{-7} mol/L) の阻害様式を, Schild 回帰の傾きで評価した. Schild 回帰の傾きが 0.8 ~ 1.2 の間の場合, 競合的な阻害と定義した. 本試験は信頼性基準外試験として実施した.

図 2.6.2.2-1 に示すように, ナルデメジントシル酸塩は, DAMGO による収縮抑制に対して, DAMGO の濃度反応曲線は右上方向にシフトする, 濃度依存的な阻害作用を示した. ナルデメジントシル酸塩は, 10^{-8} 及び 10^{-7} mol/L で, DAMGO による収縮抑制に対して強力な阻害作用を示し, 10^{-5} mol/L の DAMGO による収縮率の抑制は 50% 未満であった. Schild 回帰の傾きが 1.42 であったことから, ナルデメジントシル酸塩は, DAMGO による μ オピオイド受容体活性化を非競合的な様式で阻害すると結論した.

さらに, ヒト組換え μ オピオイド受容体発現 CHO-K1 細胞膜を用いて, モルヒネ, オキシコドン, ハイドロコドンあるいはフェンタニルにより誘発される [35 S]-GTP γ S 結合に対するナルデメジントシル酸塩及びナロキシソンの阻害様式を, Schild 回帰の傾きで検討した. Schild 回帰の

傾きの 95%信頼区間に 1 が含まれる場合を、競合的な阻害と定義した。本試験は信頼性基準外試験として実施した。

表 2.6.2.2-5 に示すように、ナルデメジントシル酸塩のモルヒネ、オキシコドン、ハイドロコドン及びフェンタニルに対する阻害の Schild 回帰の傾きが、すべて有意に 1 より大きかったことから、ナルデメジントシル酸塩は、モルヒネ、オキシコドン、ハイドロコドン及びフェンタニルによる μ オピオイド受容体活性化を非競合的な様式で阻害すると結論された。一方、ナロキソンのこれらのアゴニストに対する阻害の Schild 回帰の傾きは、1 に対して有意差がなかったことから、ナロキソンは、モルヒネ、オキシコドン、ハイドロコドン及びフェンタニルによる μ オピオイド受容体活性化を競合的な様式で阻害すると結論した。

表 2.6.2.2-4 $[^3\text{H}]$ -ナルデメジントシル酸塩及び $[^3\text{H}]$ -ナロキソンのヒト又はラット μ オピオイド受容体に対する結合キネティクス

物質	μ オピオイド受容体	K_{obs} (min^{-1})	K_{off} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
$[^3\text{H}]$ -ナルデメジン	ヒト ^(a)	0.045 ± 0.002	0.023 ± 0.000	30.687 ± 0.511
	ラット ^(b)	0.070 ± 0.006	0.016 ± 0.000	43.778 ± 0.092
$[^3\text{H}]$ -ナロキソン	ヒト ^(a)	0.233 ± 0.007	0.266 ± 0.027	2.653 ± 0.249
	ラット ^(b)	0.503 ± 0.009	0.397 ± 0.007	1.745 ± 0.029

各値は各 2 回繰り返し実施した 3 実験の平均値 \pm 標準誤差。

(a) : データは評価資料 4.2.1.1-05 から引用。

(b) : データは評価資料 4.2.1.1-06 から引用。

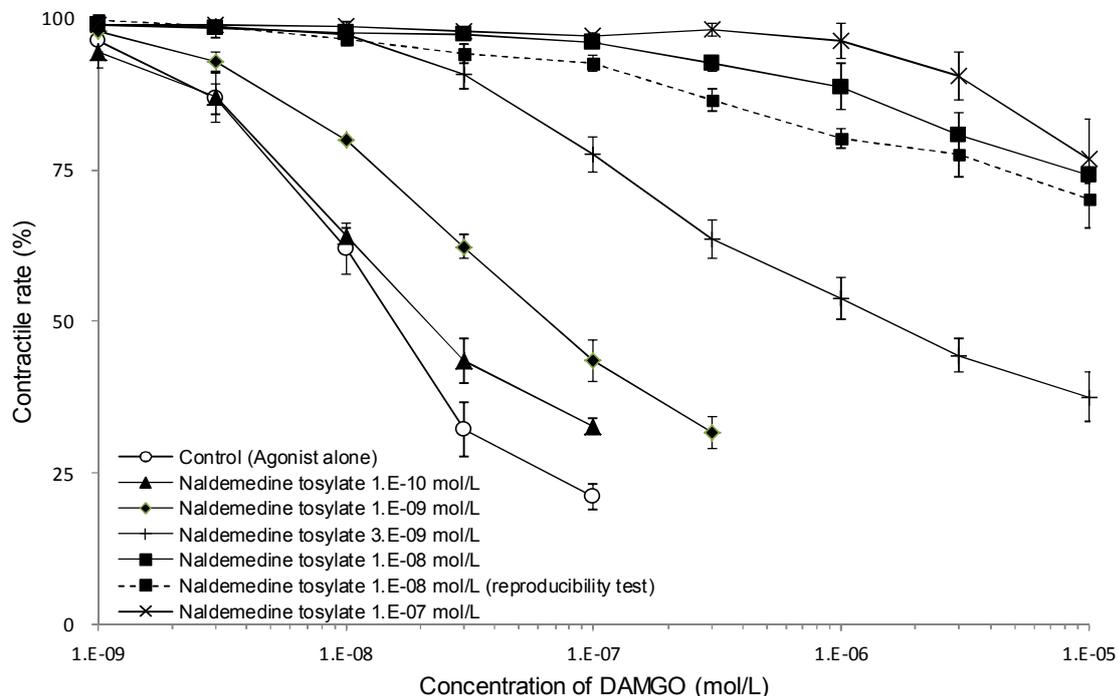
表 2.6.2.2-5 ナルデメジントシル酸塩及びナロキソンのモルヒネ、オキシコドン、ハイドロコドン及びフェンタニルに対する阻害の Schild 解析

作動薬	Schild 回帰の傾き (95%信頼区間)	
	ナルデメジントシル酸塩	ナロキソン
モルヒネ	1.37 ± 0.02 (1.32 – 1.42)	1.00 ± 0.06 (0.89 – 1.11)
オキシコドン	1.29 ± 0.02 (1.25 – 1.34)	0.97 ± 0.02 (0.92 – 1.02)
ハイドロコドン	1.43 ± 0.04 (1.35 – 1.51)	1.04 ± 0.03 (0.98 – 1.09)
フェンタニル	1.37 ± 0.05 (1.28 – 1.47)	1.00 ± 0.05 (0.90 – 1.09)

各値は各 2 回繰り返し実施した 3 実験の平均値 \pm 標準誤差。

データは参考資料 4.2.1.1-12 から引用。

図 2.6.2.2-1 ナルデメジントシル酸塩のモルモット摘出回腸における電気刺激誘発収縮の DAMGO による抑制に及ぼす影響



収縮率は DAMGO 添加前の電場刺激誘発収縮に対する割合として計算。

平均値 ± 標準誤差 (n = 3)。

データは参考資料 4.2.1.1-11 から引用。

2.6.2.2.2 In Vivo 試験

2.6.2.2.2.1 モルヒネ皮下投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の抗便秘作用

評価資料 4.2.1.1-07

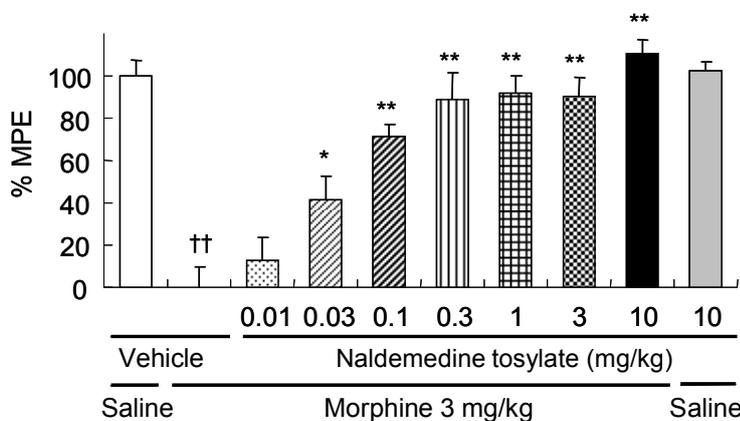
概要表 2.6.3.2.9

ラットへのモルヒネ皮下投与で誘発される便秘に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の作用を、エバンスブルーの小腸移動距離を測定することにより評価した。また、MNTX は、臨床で使用されている末梢作用型の μ オピオイド受容体拮抗薬であることから、オピオイド拮抗薬の参照物質として使用した。絶食下の雄性 Wistar 系ラット (各群 10 例) に媒体 [0.5 w/v% メチルセルロース (MC) 水溶液] 又はナルデメジントシル酸塩 (投与量: 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg) を単回経口投与あるいは MNTX (投与量: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 及び 30 mg/kg) を単回皮下投与し、その 15 分後にモルヒネ (投与量: 3 mg/kg) 又は生理食塩液を皮下投与した。モルヒネ又は生理食塩液の皮下投与 30 分後に、エバンスブルー溶液 (0.5 w/v%) を胃内投与し、その 15 分後に小腸を摘出した。小腸輸送能は、小腸の全長に対するエバンスブルーの移動距離の割合から算出した。

図 2.6.2.2-2 に示すように、媒体-モルヒネ群では、媒体-生理食塩液群に比べて、小腸輸送能は有意に低下し、媒体-モルヒネ群及び媒体-生理食塩液群間の平均値の差を、100%最大効果

(MPE) と定義した。ナルデメジントシル酸塩は、0.03～10 mg/kg の用量範囲で、モルヒネ皮下投与で誘発される小腸輸送能阻害を有意に抑制した。また、MNTX も、10 及び 30 mg/kg の用量範囲で有意な抑制を示した。ナルデメジントシル酸塩及び MNTX の ED₅₀ 値はそれぞれ 0.03 及び 4.47 mg/kg であり、ED₈₀ 値はそれぞれ 0.14 及び 17.86 mg/kg であった。モルヒネ非存在下でのナルデメジントシル酸塩単独の最高用量 (10 mg/kg) あるいは MNTX 単独の最高用量 (30 mg/kg) では、小腸輸送能阻害に対する影響は認められなかった。これらの結果から、ナルデメジントシル酸塩は、モルヒネ皮下投与で誘発される小腸輸送能阻害作用に対して、MNTX より低用量で有効であると結論した。

図 2.6.2.2-2 モルヒネ皮下投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害に対するナルデメジントシル酸塩の作用



平均値 + 標準誤差 (n = 10).

* P < 0.05, ** P < 0.01: 媒体-モルヒネ群との比較 (Dunnett's test).

†† P < 0.01: 媒体-生理食塩液群との比較 (Welch's test).

データは評価資料 4.2.1.1-07 から引用.

2.6.2.2.2.2 オキシコドン皮下投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害に対するナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用

評価資料 4.2.1.1-08
概要表 2.6.3.2.10

ラットへのオキシコドン皮下投与で誘発される便秘に対するナルデメジントシル酸塩の作用を、エバンスブルーの小腸移動距離を測定することにより評価した。絶食下の雄性 Wistar 系ラット (各群 10 例) に媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) 又はナルデメジントシル酸塩 (投与量: 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 及び 3 mg/kg) を単回経口投与し、その 30 分後にオキシコドン (投与量: 1 mg/kg) 又は生理食塩液を皮下投与した。オキシコドン又は生理食塩液の皮下投与 15 分後に、エバンスブルー (0.5%) を胃内投与し、その 15 分後に小腸を摘出した。小腸輸送能は、小腸の全長に対するエバンスブルーの移動距離の割合から算出した。

媒体-オキシコドン群では、媒体-生理食塩液群に比べて、小腸輸送能は有意に低下し、媒体-オキシコドン群及び媒体-生理食塩液群間の平均値の差を、100%MPE と定義した。ナルデメジントシル酸塩は、0.03～3 mg/kg の用量範囲で、オキシコドン皮下投与で誘発される小腸輸送能

阻害作用を有意に抑制し、ED₅₀及びED₈₀値は、それぞれ0.02及び0.13 mg/kgであった。これらの結果は、ナルデメジントシル酸塩は、オキシコドン皮下投与で誘発される小腸輸送能阻害作用に対しても有効であることが示している。

2.6.2.2.2.3 モルヒネ経口投与で誘発されるラット小腸輸送能阻害に対するナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用

評価資料 4.2.1.1-09
概要表 2.6.3.2.11

ラットへのモルヒネ経口投与で誘発される便秘に対するナルデメジントシル酸塩の作用を、エバンスブルーの小腸輸送距離を測定することにより評価した。モルヒネの経口投与量は、モルヒネを3 mg/kgで皮下投与したときの抑制効果に近い作用（媒体-生理食塩液群に対し54.48±3.62%の抑制）を示す20 mg/kgとした。絶食下の雄性Wistar系ラット（各群12例）に媒体（0.5 w/v% MC水溶液）又はナルデメジントシル酸塩（投与量：0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3及び10 mg/kg）を単回経口投与し、その15分後に、モルヒネ（投与量：20 mg/kg）又は蒸留水を経口投与した。モルヒネ又は蒸留水の経口投与30分後に、エバンスブルー（0.5%）を胃内投与し、その15分後に小腸を摘出した。小腸輸送能は、小腸の全長に対するエバンスブルーの移動距離の割合から算出した。

ナルデメジントシル酸塩は、0.1～10 mg/kgの用量範囲で、モルヒネ経口投与で誘発される小腸輸送能阻害作用を有意に抑制し、ED₅₀及びED₈₀値は、それぞれ0.23及び1.04 mg/kgであった。これらの結果は、ナルデメジントシル酸塩は、モルヒネ経口投与で誘発される小腸輸送能阻害作用に対しても有効であることを示している。

2.6.2.2.2.4 モルヒネ皮下投与で誘発されるラットヒマシ油誘発下痢阻害に対するナルデメジントシル酸塩及びMNTXの抗便秘作用

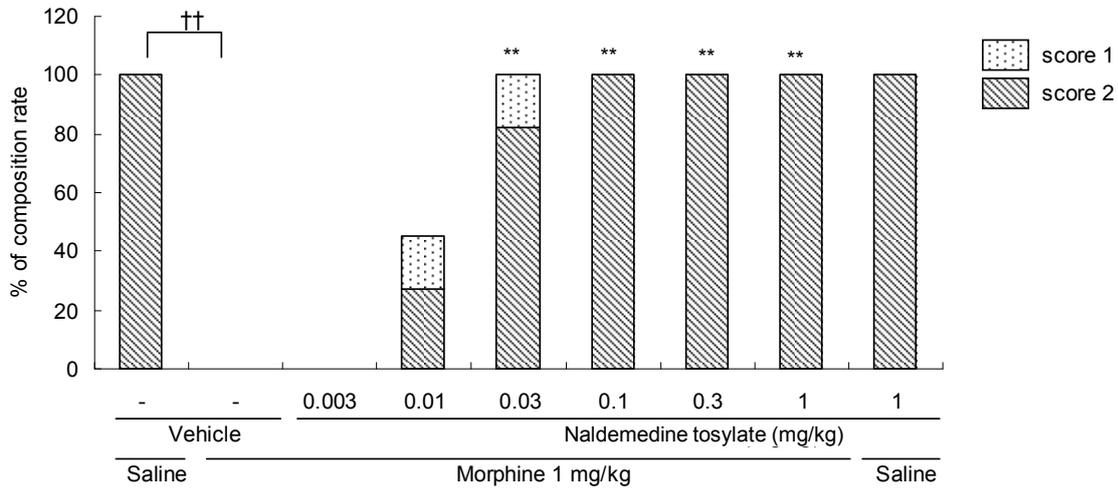
評価資料 4.2.1.1-10
概要表 2.6.3.2.12

ラットへのモルヒネ皮下投与で誘発される便秘に対するナルデメジントシル酸塩及びMNTXの作用を、ヒマシ油誘発下痢を評価することにより比較した。絶食下の雄性Sprague-Dawley系ラット（各群11例）に媒体（0.5 w/v% MC水溶液）又はナルデメジントシル酸塩（投与量：0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3及び1 mg/kg）を単回経口投与あるいはMNTX（投与量：0.03, 0.1, 0.3, 1, 3及び10 mg/kg）を単回皮下投与し、その45分後にヒマシ油を胃内投与した。ヒマシ油投与15分後に、モルヒネ（投与量：1 mg/kg）又は生理食塩液を皮下投与した。モルヒネ又は生理食塩液投与後1時間、ヒマシ油誘発による下痢症状を観察した。この試験では、下痢症状をスコア化（0：下痢症状なし、1：軟便を含む軽度の下痢、2：液状の激しい下痢）し、ED₅₀値及びED₈₀値は、スコア1又は2の下痢を発現した動物数の割合を基に算出した。

ナルデメジントシル酸塩は、0.03～1 mg/kgの用量範囲でモルヒネ皮下投与で誘発されるヒマシ油誘発下痢阻害を有意に抑制し（図 2.6.2.2-3）、ED₅₀及びED₈₀は、それぞれ0.010及び0.011 mg/kgであった。MNTXも、1～10 mg/kgの用量範囲で、モルヒネ皮下投与で誘発されるヒマシ

油誘発下痢阻害を有意に抑制し、ED₅₀ 値及び ED₈₀ 値は、それぞれ 0.585 及び 1.929 mg/kg であった。

図 2.6.2.2-3 モルヒネ皮下投与で誘発されるラットヒマシ油誘発下痢阻害に対するナルデメジントシル酸塩の作用



各群 11 例.

** P < 0.01 : 媒体-モルヒネ群との比較 (Steel multiple comparison test).

†† P < 0.01 : 媒体-生理食塩液群との比較 (Wilcoxon rank sum test).

データは評価資料 4.2.1.1-10 から引用.

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 選択性

2.6.2.3.1.1 各種受容体, イオンチャネル及びトランスポーター結合及び酵素アッセイ

評価資料 4.2.1.2-01

概要表 2.6.3.3.1

ナルデメジントシル酸塩の 62 種の各種受容体, イオンチャネルあるいはトランスポーター及び 9 種の酵素に対する阻害作用を 10 $\mu\text{mol/L}$ で検討した。

その結果, 非選択的リガンドを用いたオピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩の阻害率は 100%であったが, 他の受容体, イオンチャネル, トランスポーター及び酵素に対する阻害率は 50%未満であった。

これらの結果から, ナルデメジントシル酸塩投与により, オピオイド受容体を除いた各種受容体, イオンチャネル, トランスポーター及び酵素を介する副作用が出現するリスクは低いと考えられる。

2.6.2.3.2 オピオイドによる鎮痛作用への抑制作用 (鎮痛抑制作用)

2.6.2.3.2.1 ラットテールフリック試験におけるモルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の作用

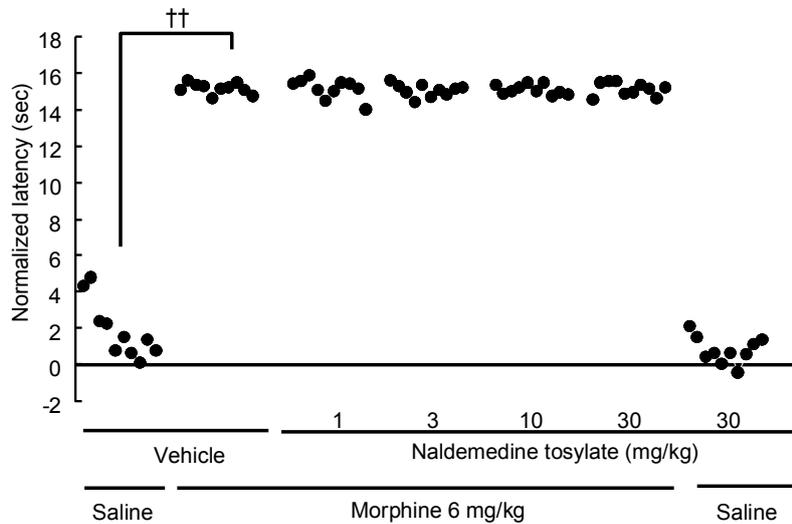
評価資料 4.2.1.2-02

概要表 2.6.3.3.2

モルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の影響を, ラットテールフリック試験で評価した。雄性 Wistar 系ラット (各群 10 例) に, 0.5 w/v% MC 水溶液に懸濁したナルデメジントシル酸塩 (投与量: 1, 3, 10 及び 30 mg/kg) の単回経口投与又は 5%キシリトールに溶解した MNTX (投与量: 1, 3, 10 及び 30 mg/kg) の単回皮下投与 1 時間後に, 皮下投与したモルヒネ (投与量: 6 mg/kg) の鎮痛作用を評価した。モルヒネ又は生理食塩液は, テールフリック試験の 45 分前に皮下投与した。モルヒネ投与群のすべての動物は, 強力な鎮痛作用を示した。

ナルデメジントシル酸塩は, いずれの用量でも, モルヒネの鎮痛作用に対して影響を及ぼさなかった (図 2.6.2.3-1)。一方, MNTX は, 1~10 mg/kg の用量では, モルヒネの鎮痛作用に対して影響を及ぼさなかったが, 最高用量の 30 mg/kg では, モルヒネの鎮痛作用に対する有意な抑制がみられた。

図 2.6.2.3-1 ラットテールフリック試験におけるモルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛に対するナルデメジントシル酸塩投与後 1 時間の作用



各個体のノーマライズした潜時。

ノーマライズした潜時 (秒) は, [投与後の潜時 (秒)] - [ベースラインの潜時 (秒)] で算出。

†† $P < 0.01$: 媒体-生理食塩液群との比較 (Fisher's exact test).

データは, 評価資料 4.2.1.2-02 から引用。

2.6.2.3.2.2 テールフリック試験におけるナルデメジントシル酸塩の鎮痛抑制作用の時間経過

評価資料 4.2.1.2-03

概要表 2.6.3.3.3

ナルデメジントシル酸塩の鎮痛抑制作用を経時的に調べる目的で, モルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛作用に対するナルデメジントシル酸塩の影響を, ナルデメジントシル酸塩単回経口投与後 24 時間までに 6 回, ラットテールフリック試験で評価した。雄性 Wistar 系ラット (各群 10~11 例) にナルデメジントシル酸塩 (投与量: 3, 5, 7, 10 及び 30 mg/kg) 又は媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を単回経口投与し, 投与後 1, 2, 4, 6, 8 及び 24 時間に, 尾の逃避反射の潜時を測定した。モルヒネ (投与量: 6 mg/kg) 又は生理食塩液は, 各測定時点の 45 分前に皮下投与した。

ナルデメジントシル酸塩は, 3~7 mg/kg の用量範囲では, いずれの測定時点でもモルヒネの鎮痛作用に対して影響を及ぼさなかった。一方, 10 mg/kg では投与後 6 時間で, 30 mg/kg では投与後 4, 6 及び 8 時間で, それぞれモルヒネの鎮痛作用に対して有意な影響を及ぼした。ラットテールフリック試験では, ナルデメジントシル酸塩は, 7 mg/kg の用量までモルヒネの鎮痛作用に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.3.2.3 ラット術後痛モデルにおけるモルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛に対するナルデメジントシル酸塩及びナロキシソンの作用

評価資料 4.2.1.2-04

概要表 2.6.3.3.4

モルヒネ皮下投与で誘発される鎮痛に対するナルデメジントシル酸塩及びナロキシソンの影響

を、ラット術後痛モデルで評価した。ナロキソンは、血液脳関門を容易に通過することから [2]、オピオイド拮抗薬の陽性対照物質として使用した。雄性 Wistar 系ラット (各群 10~12 例) にナルデメジントシル酸塩 (投与量: 1, 3, 5 及び 7 mg/kg) 又は媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を単回経口投与あるいはナロキソン (投与量: 0.1 mg/kg) を単回皮下投与し、投与後 1, 2, 4, 6 及び 8 時間に、鎮痛抑制作用を測定した。モルヒネ (投与量: 6 mg/kg) 又は生理食塩液は、各測定時点の 45 分前に皮下投与した。

ナロキソンは投与後 1 時間にモルヒネの鎮痛作用を有意に抑制した。これに対し、ナルデメジントシル酸塩は、1 及び 3 mg/kg の用量範囲では、いずれの測定時間でもモルヒネの鎮痛作用に対して影響を及ぼさなかった。一方、5 mg/kg では、投与後 1, 2, 4 及び 8 時間においてはモルヒネの鎮痛作用に影響を及ぼさなかったが、投与後 6 時間において有意な阻害が認められた。また、7 mg/kg では投与後 1 及び 2 時間においてはモルヒネの鎮痛作用に影響を及ぼさなかったが、投与後 4, 6 及び 8 時間において有意な阻害が認められた。ラット術後痛モデルでは、ナルデメジントシル酸塩は、3 mg/kg の用量までモルヒネの鎮痛作用に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.3.3 オピオイド受容体占有率

2.6.2.3.3.1 ラット大脳皮質及び視床におけるナルデメジントシル酸塩による *in vivo* オピオイド受容体占有率

評価資料 4.2.1.2-05

概要表 2.6.3.3.5

ラット大脳皮質及び視床におけるナルデメジントシル酸塩によるオピオイド受容体占有率を検討した。雄性 Wistar 系ラット (各群 4~6 例/測定時点) にナルデメジントシル酸塩 (投与量: 3, 10 及び 30 mg/kg) 単回経口投与し、投与後 1, 4, 8 及び 24 時間にオピオイド受容体占有率を調べた。非特異的オピオイド受容体拮抗薬である [³H]-diprenorphine を、オピオイド受容体占有率を評価するトレーサーとして用い、各測定時点の 30 分前に静脈内投与した。また、血漿中及び大脳皮質内ナルデメジン濃度も、投与後 1, 4, 8 及び 24 時間に測定した。

大脳皮質及び視床におけるオピオイド受容体は、3 mg/kg 投与後 24 時間まで、ナルデメジントシル酸塩により占有されていなかった。一方、10 mg/kg 投与後 1 時間では両部位におけるナルデメジントシル酸塩によるオピオイド受容体の占有は認められなかったが、投与後 4 時間では約 14%の占有が認められ、投与後 8 時間では最大の占有率 (約 28%) を示した。さらに、大脳皮質及び視床におけるナルデメジントシル酸塩による受容体占有率は、30 mg/kg 投与後 4 時間では、それぞれ 39%及び 24%であり、投与 8 時間後では最大の占有率 (それぞれ 57%及び 35%) を示し、投与後 24 時間後でもそれぞれ 28%及び 18%の占有率が持続していた。

ラット大脳皮質におけるナルデメジントシル酸塩による受容体占有率及び大脳皮質内ナルデメジン濃度を、表 2.6.2.3-1 に示す。いずれの用量においても、大脳皮質内ナルデメジン濃度は投与後 4 時間で最大であったが、受容体占有率が最大となる時間は、大脳皮質内ナルデメジン濃度が最大となる時間と比較して遅延していた。

表 2.6.2.3-1 ラット大脳皮質におけるナルデメジントシル酸塩による *in vivo* オピオイド受容体占有率及び大脳皮質内ナルデメジン濃度

用量 (mg/kg)	ラット大脳皮質におけるナルデメジントシル酸塩によるオピオイド受容体占有率 (%)			
	1 時間	4 時間	8 時間	24 時間
3	0.35 ± 21.53	-1.15 ± 22.18	-9.29 ± 37.05	-0.39 ± 9.00
10	-7.06 ± 18.27	14.32 ± 11.17	27.79 ± 20.72	8.78 ± 7.02
30	-8.45 ± 12.41	38.53 ± 11.25	57.09 ± 10.92	27.79 ± 15.41

用量 (mg/kg)	大脳皮質内ナルデメジン濃度 (ng/g)			
	1 時間	4 時間	8 時間	24 時間
3	2.94 ± 0.99	3.40 ± 0.68	2.43 ± 0.72	1.20 ± 0.17
10	9.69 ± 3.71	11.9 ± 3.3	7.88 ± 1.42	4.12 ± 0.44
30	25.8 ± 12.3	28.5 ± 5.4	19.4 ± 4.2	8.49 ± 1.26

データは 6 例のラットの平均値 ± 標準偏差。

データは評価資料 4.2.1.2-05 から引用。

2.6.2.3.4 オピオイドによる嘔気嘔吐の抑制作用 (制吐作用)

2.6.2.3.4.1 フェレットにおけるモルヒネ皮下投与で誘発される催吐に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の抑制作用

評価資料 4.2.1.2-06

概要表 2.6.3.3.6

フェレットにおけるモルヒネ皮下投与で誘発される嘔気嘔吐に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の抑制作用を検討した。雄性マーシャルフェレット (各群 10 例) にナルデメジントシル酸塩 (投与量: 0.01, 0.03, 0.1 及び 0.3 mg/kg) あるいは媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を単回経口投与あるいは MNTX (投与量: 0.03, 0.1, 0.3, 1 及び 3 mg/kg) 又は媒体 (5%キシリトール) を単回皮下投与し, 30 分後にモルヒネ (投与量: 0.6 mg/kg) を皮下投与後, 30 分間催吐反応を観察した。催吐反応は嘔気 (腹部のリズミカルな収縮運動) 及び嘔吐 (嘔吐物を排泄する行為又はその類似行為) に分類した。制吐作用は, 催吐反応が完全に抑制された動物数の割合を基に評価した。

フェレットにモルヒネを 0.6 mg/kg の用量で皮下投与したとき, 催吐反応が誘発された。ナルデメジントシル酸塩は, 0.03~0.3 mg/kg で, モルヒネで誘発される嘔気嘔吐に対して有意な抑制効果を示し, 制吐作用の ED₅₀ 及び ED₈₀ 値はそれぞれ 0.033 及び 0.119 mg/kg であった。MNTX は, 0.3~3 mg/kg で有意な抑制効果を示し, 制吐作用の ED₅₀ 及び ED₈₀ 値は, それぞれ 0.694 及び 1.175 mg/kg であった。これらの結果は, ナルデメジントシル酸塩の制吐作用は MNTX より強力であることを示している。

2.6.2.3.4.2 フェレットにおけるモルヒネ皮下投与で誘発される嘔気嘔吐に対するナルデメジントシル酸塩及び MNTX の抑制作用の持続性

評価資料 4.2.1.2-07

概要表 2.6.3.3.7

フェレットにおけるナルデメジントシル酸塩及び MNTX の制吐作用の持続性について検討し

た。雄性マーシャルフェレット (各群 10 例) にナルデメジントシル酸塩を 0.3 mg/kg で単回経口投与又は MNTX を 3 mg/kg で単回皮下投与し、投与後 0.5, 4, 6 及び 8 時間に、モルヒネ (投与量 : 6 mg/kg) を皮下投与後、催吐反応を 30 分間観察した。制吐作用は、催吐反応が完全に抑制された動物数の割合を基に評価した。

ナルデメジントシル酸塩は、投与後 0.5~6 時間で、モルヒネで誘発される嘔気嘔吐を完全に抑制した。また、投与後 8 時間でも、80%の抑制率を維持していた。MNTX は、投与後 0.5 時間では、モルヒネで誘発される嘔気嘔吐を完全に抑制したが、投与後 4, 6 及び 8 時間での抑制率は、それぞれ 50%, 40%及び 10%であった。これらの結果は、ナルデメジントシル酸塩の制吐作用は MNTX より長く持続することを示している。

2.6.2.3.4.3 フェレットにおけるモルヒネ経口投与で誘発される嘔気嘔吐に対するナルデメジントシル酸塩の抑制作用

評価資料 4.2.1.2-08
概要表 2.6.3.3.8

フェレットにおけるモルヒネ経口投与で誘発される嘔気嘔吐に対するナルデメジントシル酸塩の抑制効果を検討した。雄性マーシャルフェレット (各群 10 例) にナルデメジントシル酸塩 (投与量 : 0.01, 0.03, 0.1 及び 0.3 mg/kg) 又は媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を経口投与し、30 分後にモルヒネ (投与量 : 1.2 mg/kg) を経口投与後、90 分間催吐反応を観察した。

ナルデメジントシル酸塩は、0.03~0.3 mg/kg で、モルヒネで誘発される嘔気嘔吐に対して有意な抑制効果を示した。催吐反応が完全に抑制された動物数の割合を基に算出した制吐作用の ED₅₀ 及び ED₈₀ 値は、それぞれ 0.016 及び 0.023 mg/kg であった。

2.6.2.3.5 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩代謝物の結合親和性、アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性

評価資料 4.2.1.1-02, 4.2.1.2-09
概要表 2.6.3.2.2, 2.6.3.3.9

ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩の 5 つの主代謝物 (nor-ナルデメジン, ナルデメジン 3-G, ナルデメジン 6-G, ナルデメジン-CA 及びベンズアミジン) の結合親和性、アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性を、K_i 値, K_b 値及び EC₅₀ 値で評価した。

これらの代謝物のヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対する K_i 値を表 2.6.2.3-2 に示す。これらの結果は、nor-ナルデメジン, ナルデメジン 3-G, ナルデメジン 6-G 及びナルデメジン-CA のこれらの受容体に対する結合親和性が、ナルデメジントシル酸塩 (表 2.6.2.2-1) と比較して弱いこと及びベンズアミジンは明らかな結合親和性を有しないことを示している。

表 2.6.2.3-2 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩代謝物の結合親和性

物質	K _i 値 (nmol/L)		
	μ 受容体 ^(a)	δ 受容体 ^(a)	κ 受容体 ^(b)
Nor-ナルデメジン	1.95 ± 0.28	10.23 ± 3.01	60.8 ± 13.4
ナルデメジン 3-G	191.78 ± 33.39	158.59 ± 38.14	915 ± 320
ナルデメジン 6-G	9.79 ± 1.03	0.51 ± 0.06	36.2 ± 8.34
ナルデメジン-CA	7.38 ± 1.10	2.05 ± 0.96	151 ± 33.1
ベンズアミジン	> 2644.04	> 2942.93	> 6250

(a) : データは評価資料 4.2.1.2-11 から引用. Nor-ナルデメジン以外の各値は, 各 2 回繰り返し実施した 3 実験の
 平均値 ± 標準誤差. Nor-ナルデメジンの各値は, 各 2 回繰り返し実施した 2 実験の平均値 ± 標準誤差.

(b) : データは評価資料 4.2.1.1-02 から引用. 各値は 2 実験の平均値 ± 標準誤差.

ナルデメジントシル酸塩の代謝物のヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対する K_b 値を表 2.6.2.3-3 に示す. これらの結果から, 5 つの主代謝物のヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するアンタゴニスト活性は, ナルデメジントシル酸塩 (表 2.6.2.2-2) と比較して弱いと判断した.

表 2.6.2.3-3 ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するナルデメジントシル酸塩代謝物のアンタゴニスト活性

物質	K _b 値 (nmol/L)		
	μ 受容体 ^(a)	δ 受容体 ^(a)	κ 受容体 ^(b)
Nor-ナルデメジン	31.65 ± 10.76	112.36 ± 10.65	> 270.68
ナルデメジン 3-G	> 42.41	301.13 ± 110.67	> 270.68
ナルデメジン 6-G	15.53 ± 0.98	0.70 ± 0.20	28.5 ± 7.28
ナルデメジン-CA	14.11 ± 3.24	6.11 ± 1.32	201 ± 13.3
ベンズアミジン	N.D.	N.D.	> 270.68

N.D. : ベンズアミジンはヒト μ 及び δ 受容体に結合親和性を示さなかったので評価せず.

(a) : データは評価資料 4.2.1.2-11 から引用. Nor-ナルデメジン以外の各値は, 各 2 回繰り返し実施した 3 実験の
 平均値 ± 標本平均の標準誤差. Nor-ナルデメジンの各値は, 各 2 回繰り返し実施した 2 実験の平均値 ± 標準
 誤差.

(b) : データは評価資料 4.2.1.1-02 から引用. 各値は 2 実験の平均値 ± 標準誤差.

Nor-ナルデメジン以外の代謝物は, ヒト μ , δ 及び κ オピオイド受容体に対するアゴニスト活性を有していなかった (EC₅₀ 値 : > 10 μ mol/L). Nor-ナルデメジンは, μ 及び κ オピオイド受容体に対するアゴニスト活性を有していなかったが (EC₅₀ 値 : > 10 μ mol/L), δ オピオイド受容体に対してアゴニスト活性を有していた (EC₅₀ 値 : 96.04 nmol/L).

2.6.2.4 安全性薬理試験

薬物弁別試験，自己投与試験及び身体依存性試験の用量設定試験以外の安全性薬理試験は，全て GLP 基準下で実施した。

2.6.2.4.1 *In Vitro* 試験

2.6.2.4.1.1 モルモット乳頭筋での心筋活動電位に対する作用

評価資料 4.2.1.3-01
概要表 2.6.3.4.1

モルモットから摘出した乳頭筋の活動電位に対するナルデメジントシル酸塩の作用を検討した。雄性 Hartley 系モルモットから摘出した右心室乳頭筋標本 (各濃度 5 例) を用いた。ナルデメジントシル酸塩は，0 (対照群)，0.3，3 及び 30 $\mu\text{mol/L}$ (それぞれ 0.17，1.71 及び 17.1 $\mu\text{g/mL}$) の濃度で標本に適用した。活動電位波形から，活動電位振幅 (APA)，静止膜電位 (RMP)，脱分極最大立ち上がり速度 (MRD)，APD₃₀ 及び APD₉₀ を測定すると共に APD₃₀₋₉₀ を算出し，これらのパラメータを評価した。対照群には媒体 [0.1% ジメチルスルホキシド (DMSO)] を適用した。

ナルデメジントシル酸塩は，0.3 $\mu\text{mol/L}$ ではいずれのパラメータにも影響を及ぼさなかった。しかし，3 $\mu\text{mol/L}$ では APD₉₀ 及び APD₃₀₋₉₀ をそれぞれ適用前より 2.1%及び 5.6%延長し，30 $\mu\text{mol/L}$ では APD₃₀，APD₉₀ 及び APD₃₀₋₉₀ をそれぞれ 4.2%，11.4%及び 24.8%延長した。また，30 $\mu\text{mol/L}$ では RMP の 0.7%の増加及び APA の 1.8%の減少も認められたが，これらは実施施設における対照群の背景データ変動範囲内であった。以上のように，ナルデメジントシル酸塩は，30 $\mu\text{mol/L}$ でモルモット乳頭筋の活動電位持続時間 (APD₉₀ 及び APD₃₀₋₉₀) を 10%以上延長させた。

2.6.2.4.1.2 hERG チャンネル発現細胞でのカリウム電流に対する作用

評価資料 4.2.1.3-02
概要表 2.6.3.4.2

hERG チャンネルを発現させたヒト胎児腎臓由来培養細胞 (各濃度 5 例) におけるカリウム電流 (hERG 電流) に対するナルデメジントシル酸塩の電気生理学的作用について，ホールセルパッチクランプ法を用いて検討した。ナルデメジントシル酸塩は，0 (対照群)，0.3，3 及び 30 $\mu\text{mol/L}$ (それぞれ 0.17，1.71 及び 17.1 $\mu\text{g/mL}$) の濃度で細胞に適用し，遅延整流 K⁺電流 (ピークテール電流) を測定した。対照群には媒体 (0.1%DMSO) を適用した。

ナルデメジントシル酸塩は，0.3，3 及び 30 $\mu\text{mol/L}$ で，ピークテール電流をそれぞれ適用前値より 3.2%，5.6%及び 33.1% (媒体対照群の抑制率で補正) 抑制した。これらの成績から，IC₅₀ は 30 $\mu\text{mol/L}$ を超えると推定した。

2.6.2.4.2 *In Vivo* 試験

2.6.2.4.2.1 ラットの中枢神経系に対する作用

評価資料 4.2.1.3-03

概要表 2.6.3.4.3

ナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 30, 100 及び 300 mg/kg の用量で, 雄性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 6 例) に単回経口投与し, 投与前並びに投与後 1, 2, 4 及び 8 時間の一般症状及び神経行動学的機能について, 機能観察総合評価法 (FOB) を用いて評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した.

ナルデメジントシル酸塩は, いずれの用量でも投与後 8 時間までの一般症状及び神経行動学的機能に対して影響を及ぼさず, 300 mg/kg までの用量で中枢神経系に影響を及ぼさないと考えられる.

2.6.2.4.2.2 ラットの呼吸系に対する作用

評価資料 4.2.1.3-04

概要表 2.6.3.4.4

ナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 30, 100 及び 300 mg/kg の用量で, 雄性 Sprague-Dawley 系ラット (各群 8 例) に単回経口投与し, 投与前並びに投与後 1, 2, 4 及び 8 時間の呼吸数, 1 回換気量及び分時換気量について, whole body plethysmography (WBP) 法を用いて無麻酔無拘束下で評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した.

ナルデメジントシル酸塩は, いずれの用量でも投与後 8 時間までの呼吸数, 1 回換気量及び分時換気量に影響を及ぼさず, 300 mg/kg までの用量で呼吸機能に影響を及ぼさないと考えられる.

2.6.2.4.2.3 イヌの心血管系に対する作用

評価資料 4.2.1.3-05

概要表 2.6.3.4.5

ナルデメジントシル酸塩を 0 (対照群), 10, 30 及び 100 mg/kg の用量で, 雄性ビーグルイヌ (4 例) に 6 あるいは 13 日の投与間隔で漸増投与し, 投与前並びに投与後 1, 2, 4, 8 及び 24 時間の血圧, 心拍数及び心電図 (PR 間隔, QRS 時間, QT 間隔及び補正 QT 間隔) について, テレメトリーシステムを用いて評価した. また, トキシコキネティクス試験を実施し, ナルデメジンの血漿中曝露との関係性を評価した. 対照群には媒体 (0.5 w/v% MC 水溶液) を投与した.

ナルデメジントシル酸塩は, 10, 30 及び 100 mg/kg におけるいずれの時点でも, 血圧, 心拍数及び心電図に影響を及ぼさなかった. また, すべての用量で不整脈は観察されなかった. 一般症状観察では, ナルデメジントシル酸塩は, 10 mg/kg における投与後 24 時間までの一般症状に影響を及ぼさなかった. ナルデメジントシル酸塩の 30 mg/kg の投与 4 時間後に 1 例で, 100 mg/kg の投与 1 時間後に 4 例で黄色吐物が観察されたものの, いずれの嘔吐も一過性であった. ナルデメジンの最高血漿中濃度 (C_{max}) は, 10, 30 及び 100 mg/kg で, それぞれ 6.86, 23.45 及び 35.70 $\mu\text{g/mL}$ であり, 時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24hr}) は,

それぞれ 21.85, 91.04 及び 182.70 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ であった。以上の結果から、ナルデメジントシル酸塩は、イヌにおける 10, 30 及び 100 mg/kg の単回経口投与で心血管系に影響を及ぼさないと判断した。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験なし。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける *in vitro* 試験

オピオイド鎮痛薬は、中等度から高度の痛みに対し広く使用されている。しかしながら、オピオイドの長期使用によって引き起こされる最も一般的な副作用として便秘が挙げられ、この副作用を低減することは、オピオイド鎮痛薬を必要とする患者にとって非常に重要である。日本では、オピオイド鎮痛薬としてモルヒネ、フェンタニル及びオキシコドンが汎用されている [3]。これらのオピオイドは μ オピオイド受容体選択的作動薬であり [4]、MNTX [5] のような末梢性 μ オピオイド受容体アンタゴニストは、オピオイド誘発性便秘 (OIC) 患者において排便回数を増加させることができる [6]。MNTX は、 δ 及び κ 受容体と比較して μ オピオイド受容体に対して高い選択的アンタゴニスト活性を有している。このことから、OIC は μ オピオイド受容体の活性化によって引き起こされ、その受容体の活性化を阻害することで抑制されると考えられる。一方、U-50488H のような κ 受容体作動薬による消化管輸送阻害惹起作用 [7] 及び [D-Ala²,Met⁵]enkephalinamide のような δ 受容体作動薬による催吐作用 [8] の報告があることから、 δ 及び κ オピオイド受容体は、それぞれ便秘及び嘔吐に関与していると考えられる。ナルデメジントシル酸塩は、 κ オピオイド受容体に対してアンタゴニスト活性を有するものの、臨床で使用されているオピオイドは、 μ オピオイド受容体選択的作動薬であることから、ナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用における κ オピオイド受容体の寄与は低いと考えられる。

結合キネティクス試験を評価した結果、ナルデメジントシル酸塩は、ナロキソンと比較して、ヒト又はラットの μ オピオイド受容体に対する結合速度並びに解離速度が、共に遅いことが示された。また、ナルデメジントシル酸塩は、DAMGO 及び臨床で使用されているオピオイド (モルヒネ、オキシコドン、ヒドロコドン及びフェンタニル) による μ オピオイド受容体の活性化を非競合的な様式で阻害した。一般に、解離速度の遅いアンタゴニストは、受容体を競合するアゴニストの濃度変化の影響を受け難く、低い濃度でアンタゴニストとしての作用を維持することが知られており [9, 10]、ナルデメジントシル酸塩も解離速度が遅いことから、幅広いオピオイドの用量に対しても抗便秘作用を発現する可能性が考えられる。

2.6.2.6.2 効力を裏付ける *in vivo* 試験

ナルデメジントシル酸塩は、強力な μ オピオイド受容体拮抗作用を有し、ヒト及びラット μ オピオイド受容体に対して、ほぼ同等のアンタゴニスト活性 (K_b 値：それぞれ 0.5 及び 0.56 nmol/L) を示したことから、オピオイドで誘発される小腸輸送能阻害作用はラットを用いてオピオイドで誘発される小腸輸送能阻害作用とラットヒマシ油誘発下痢モデルにおいて抗便秘作用を検討した。

ナルデメジントシル酸塩は、モルヒネ又はオキシコドン皮下投与で誘発される小腸輸送能阻害を用量依存的に抑制し、これらの薬効用量はほぼ同等であった (ED_{50} 値：それぞれ 0.03 及び 0.02 mg/kg)。さらに、ナルデメジントシル酸塩は、モルヒネ経口投与で誘発される小腸輸送能阻害も抑制した。また、ナルデメジントシル酸塩は、ラットヒマシ油誘発下痢モデルにおいて、オピオイド投与による便秘に対する拮抗作用を示し、 ED_{50} 値は 0.010 mg/kg であった。これらの結果は、ナルデメジントシル酸塩がオピオイドの種類及び投与経路にかかわらず、 μ オピオ

イド受容体を介した小腸輸送能の阻害を抑制できることを示している。ラット小腸輸送能試験 (モルヒネ 3 mg/kg 皮下投与) において、抗便秘作用の ED₅₀ 値である 0.03 mg/kg のナルデメジントシル酸塩の単回経口投与後 1 時間の血漿中ナルデメジン濃度は 2.51 ng/mL であった [2.6.4.3.2.1.項参照]。また、ラットヒマシ油誘発下痢モデル (モルヒネ 1 mg/kg 皮下投与) において、抗便秘作用の ED₅₀ 値である 0.010 mg/kg のナルデメジントシル酸塩投与後 2 時間における血漿中濃度は 0.974 ng/mL であった [2.6.4.3.2.2 項参照]。これらのラットで薬効を示す血漿中濃度 (0.974~2.51 ng/mL) は、予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるヒト C_{max} 値 (2 ng/mL) と同等であった [2.7.2.2.2.6 項参照]。これらの非臨床及び臨床の血漿中濃度の比較から、ナルデメジントシル酸塩は、動物種にかかわらず同等の血漿中濃度域で薬効を示すことが期待される。

2.6.2.6.3 副次的薬理試験

各種受容体、イオンチャネルあるいはトランスポーター及び酵素に対するナルデメジントシル酸塩の阻害作用を 10 µmol/L の濃度で検討した結果、オピオイド受容体以外の受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対する阻害率は 50%未満であった。このことから、ナルデメジントシル酸塩投与により、オピオイド受容体を除いた各種受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素を介する副作用が出現するリスクは低いと考えられる。ナルデメジントシル酸塩は、ラットテールフリック試験では 7 mg/kg まで、ラット術後痛モデルでは 3 mg/kg まで、モルヒネの鎮痛作用に影響を及ぼさなかった。ナルデメジントシル酸塩を 1 mg/kg の用量で投与したラットにおける定量的全身オートラジオグラフィ試験では、いずれの時点でも、ナルデメジントシル酸塩由来の放射能は脳内で検出されず、血液脳関門における放射能の透過性は極めて低いことが示唆された [2.6.4.4.2.1 項及び 2.6.4.4.2.2 項参照]。前述のとおり、ナルデメジントシル酸のラットにおける抗便秘作用の薬効血漿中ナルデメジン濃度は、予定臨床用量 (0.2 mg/日) における血漿中濃度の C_{max} 値 (2 ng/mL) とほぼ同じであることから、予定臨床用量で、ヒトにおいて、ナルデメジントシル酸塩がオピオイドによる鎮痛作用を抑制するリスクは低いと考えられる。なお、NKTR-118 (Movantik[®]) は、30 mg/kg まで有意な鎮痛抑制作用が認められないことから [11]、鎮痛抑制作用の無影響量は 30 mg/kg であると考えられる。また、NKTR-118 の抗便秘作用 (消化管輸送能試験) の ED₅₀ 値は 23.1mg/kg であった [11]。したがって、ナルデメジントシル酸塩の抗便秘作用の ED₅₀ 値と鎮痛抑制作用の無影響量との乖離は、NKTR-118 の乖離より大きい。

ナルデメジントシル酸塩は、抗便秘作用に加えて、オピオイドで誘発される嘔気嘔吐に対する制吐作用も示し、モルヒネを 0.6 mg/kg で皮下投与したフェレットにおける ED₅₀ 値は 0.033 mg/kg であった。したがって、ナルデメジントシル酸塩は、オピオイドで誘発される嘔気嘔吐に対する効果も期待できる。

ナルデメジントシル酸塩の代謝物 (nor-ナルデメジン、ナルデメジン 3-G、ナルデメジン 6-G、ナルデメジン-CA 及びベンズアミジン) のオピオイド受容体に対する結合親和性、アンタゴニスト活性及びアゴニスト活性を評価した *in vitro* 試験の結果、これらの代謝物は、ナルデメジントシル酸塩と比較して、µ オピオイド受容体に対する結合親和性及びアンタゴニスト活性は弱かった。また、ヒト血漿中で最も量が多い nor-ナルデメジン [2.7.2.2.1.3 項参照] は、δ オピオ

イド受容体に対してアゴニスト活性を有し、その EC₅₀ 値は 96.04 nmol/L であった。しかしながら、ナルデメジントシル酸塩の予定臨床用量 (0.2 mg/日) における nor-ナルデメジンの C_{max} 値は、0.146 ng/mL [2.7.2.3.3 項参照] であり、 δ オピオイド受容体に対する EC₅₀ 値 (96.04 nmol/L: 49.61 ng/mL) と比較して著しく低かった。さらに、他の代謝物 (ナルデメジン 3-G, ナルデメジン 6-G, ナルデメジン-CA 及びベンズアミジン) は、ヒト血漿中でほとんど又は全く検出されなかった [2.7.2.2.1.3 項参照]。これらの結果から、ナルデメジントシル酸塩を経口投与した際に認められるオピオイド誘発の便秘に対する抑制作用には、ナルデメジンが主に寄与しており、代謝物の関与は低いと考えられる。

2.6.2.6.4 安全性薬理

安全性薬理コアバッテリー試験として中枢神経系、呼吸系及び心血管系に対するナルデメジントシル酸塩の影響を検討した。

ラットの FOB 法を用いた中枢神経系に対する試験では、ナルデメジントシル酸塩は、300 mg/kg までの単回経口投与によって一般症状及び神経行動学的機能に影響を及ぼさなかった。また、ラットの WBP 法を用いた呼吸系に対する試験では、ナルデメジントシル酸塩は、300 mg/kg までの単回経口投与によって、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に影響を及ぼさなかった。ラットの中枢神経系及び呼吸系試験において、300 mg/kg 投与時の血漿中濃度は検討しなかったが、ラット 1 ヶ月反復経口投与毒性試験 (投与量: 30, 100 及び 1000 mg/kg/day) での 100 mg/kg/day 投与群の雄における投与 1 日目の C_{max} 値は 10.78 μ g/mL であった [2.6.6.3.1.2 項参照]。これらのことから、予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるヒト血漿中 C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] とラット中枢神経系及び呼吸系試験における無影響量 (300 mg/kg) でのラット C_{max} 値との安全性マージンは、少なくとも 5300 倍を超えると推定した。

イヌ心血管系に対する試験では、ナルデメジントシル酸塩は、10, 30 及び 100 mg/kg の経口投与 (単回漸増投与) で、血圧、心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさず、10, 30 及び 100 mg/kg 投与群の C_{max} 値は、それぞれ 6.86, 23.45 及び 35.70 μ g/mL であった。このことから、予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるヒト血漿中 C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] とイヌ心血管系に対する試験における無影響量 (100 mg/kg) でのイヌ血漿中 C_{max} 値との安全性マージンは、約 17850 倍と推定した。また、イヌ 1, 3 及び 9 ヶ月反復経口投与毒性試験においても、心電図に影響はなく、心臓に毒性を示唆する組織変化は認められなかった [2.6.6.3.4.2 項, 2.6.6.3.5.2 項及び 2.6.6.3.6.2 項参照]。In vitro 心血管系試験では、ナルデメジントシル酸塩は、30 μ mol/L (17.1 μ g/mL) で、モルモット乳頭筋標本の APD₉₀ 及び APD₃₀₋₉₀ を 10% 以上延長させた。また、ナルデメジントシル酸塩の hERG チャンネル発現細胞におけるカリウム電流 (hERG 電流) に対する IC₅₀ 値は、30 μ mol/L を超えると推定した。ナルデメジントシル酸塩のヒト血清たん白結合率 (93.2%~94.2%) [2.6.5.6.1 項参照] を考慮すると、予定臨床用量 (0.2 mg/日) におけるヒト血漿中フリー体濃度は 0.14 ng/mL 以下と推定される。したがって、APD₉₀ 及び APD₃₀₋₉₀ を延長させる濃度並びに hERG 電流に対する IC₅₀ 値は、予定臨床用量におけるヒト血漿中フリー体濃度に比べ、はるかに高い濃度 (12 万倍以上) であった。以上の心血管系に対する in vitro 及び in vivo 評価の結果から、ナルデメジントシル酸塩の心血管系機能に影響を及ぼすリスクは極めて低い

と考えられる。

上記の安全性薬理試験の成績から、ナルデメジントシル酸塩は、ラット中枢神経系及び呼吸系並びにイヌ心血管系に対して影響を及ぼさず、これら試験での無影響量における C_{max} 値とヒトに 0.2 mg/日を投与した時の C_{max} 値 (2 ng/mL) [2.7.2.2.2.6 項参照] との間に十分な安全マージン (5300 倍以上) があることが示された。したがって、ナルデメジントシル酸塩に中枢神経系、呼吸系及び心血管系に対する懸念はなく、生命維持機能に影響を及ぼすリスクは極めて低いことが示唆される。

2.6.2.6.5 結論

ナルデメジントシル酸塩は末梢性に作用する μ オピオイド受容体拮抗薬であり、効力を裏付ける試験から OIC に対する抗便秘作用が期待できる。また、副次的薬理試験又は安全性薬理試験の結果から、ナルデメジントシル酸塩を OIC を有する患者に経口投与したときに、鎮痛抑制作用を含め、懸念すべき薬理作用が生じる可能性は低いと考える。

2.6.2.7 図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1. Madsen, BW, Beglan CL, Spivak CE. Fluorescein-labeled naloxone binding to mu opioid receptors on live Chinese hamster ovary cells using confocal fluorescent microscopy. *J Neurosci Methods* 2000; 97 (2): 123-31.
2. Ngai SH, Berkowitz BA, Yang JC, Hempstead J, Spector S. Pharmacokinetics of naloxone in rats and in man: basis for its potency and short duration of action. *Anesthesiology* 1976; 44 (5): 398-401.
3. 鈴木 勉, 芝崎由美子. 緩和ケアで使われる薬剤の動向と現状 -オピオイド使用量など薬剤に関するデータ-. In 志真泰夫, 恒藤 暁, 松島たつ子, 宮下光令, 山崎章郎編. *ホスピス・緩和ケア白書 2012*. 公益財団法人 日本ホスピス・緩和ケア研究振興財団; 2012, p.85-9.
4. Peckham EM, Traynor JR. Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(3): 1195-201.
5. Murphy DB, EI Behiery H, Chan VW, Foss JF. Pharmacokinetic profile of epidurally administered methylnaltrexone, a novel peripheral opioid antagonist in a rabbit model. *British J Anaesthesia* 2001; 86 (1): 120-2.
6. Thomas J, Karver S, Cooney GA, et al. Methylnaltrexone for opioid-induced constipation in advanced illness. *N Engl J Med* 2008; 358: 2332-43.
7. Ramabadran K, Bansinath M, Turndorf H, Puig MM. Stereospecific inhibition of gastrointestinal transit by κ opioid agonists in mice. *Eur J Pharmacol* 1988; 155: 329-31.
8. Blancquaert JP, Lefebvre RA, Willems JL. Emetic and antiemetic effects of opioids in the dog. *Eur J Pharmacol* 1986; 128: 143-50.
9. Swinney DC. Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success? *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(9): 801-8.
10. Swinney DC. The role of binding kinetics in therapeutically useful drug action. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2009; 12(1): 31-9.
11. FDA Addendum to Pharmacology/Toxicology Review of NDA204,760 Dated 5/15/2014. Application number: 204760Orig1s000. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/204760Orig1s000PharmR.pdf

スインプロイク錠 0.2 mg

第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

塩野義製薬株式会社

目次

略号及び用語定義一覧表.....	4
2.6.3 薬理試験概要表.....	6
2.6.3.1 薬理試験： 一覧表.....	6
2.6.3.2 効力を裏付ける試験.....	10
2.6.3.2.1 <i>In Vitro</i> Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate and MNTX against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors.....	10
2.6.3.2.2 <i>In Vitro</i> Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate and MNTX against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors.....	12
2.6.3.2.3 <i>In Vitro</i> Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate against Rat Mu Opioid Receptor.....	14
2.6.3.2.4 <i>In Vitro</i> Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate against Rat Delta and Kappa Opioid Receptors.....	15
2.6.3.2.5 <i>In Vitro</i> Binding Kinetics of [³ H]-Naldemedine and [³ H]-Naloxone against Human Mu Opioid Receptor.....	16
2.6.3.2.6 <i>In Vitro</i> Binding Kinetics of [³ H]-Naldemedine and [³ H]-Naloxone against Rat Mu Opioid Receptor.....	17
2.6.3.2.7 Preliminary <i>In Vitro</i> Functional Assay of Naldemedine Tosylate against Mu Opioid Receptor Using Isolated Guinea Pig Ileum.....	18
2.6.3.2.8 <i>In Vitro</i> Functional Assay of Naldemedine Tosylate against Human Mu Opioid Receptor.....	19
2.6.3.2.9 Anti-Constipation Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats.....	20
2.6.3.2.10 Anti-Constipation Effect of Naldemedine Tosylate on Subcutaneously Administered Oxycodone-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats.....	22
2.6.3.2.11 Anti-Constipation Effect of Naldemedine Tosylate on Orally Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats.....	23
2.6.3.2.12 Anti-Constipation Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats.....	24
2.6.3.3 副次的薬理試験.....	26
2.6.3.3.1 <i>In Vitro</i> Selectivity Study of Naldemedine Tosylate Evaluated in Various Receptor, Channel, and Transporter Binding and Enzyme Assays.....	26
2.6.3.3.2 Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Analgesia in Rat Tail-Flick Test.....	31
2.6.3.3.3 Time-Course of Anti-Analgesic Effect of Naldemedine Tosylate in Rat Tail-Flick Test.....	32
2.6.3.3.4 Effects of Naldemedine Tosylate and Naloxone on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Analgesia in Rat Post-Operative Pain Model.....	34
2.6.3.3.5 <i>In Vivo</i> Opioid Receptor Occupancies by Naldemedine Tosylate in Rat Cerebral	

Cortex and Thalamus	36
2.6.3.3.6 Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Emesis in Ferrets.....	38
2.6.3.3.7 Duration of Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Emesis in Ferrets	39
2.6.3.3.8 Effect of Naldemedine Tosylate Evaluated on Orally Administered Morphine-Induced Emesis in Ferrets.....	40
2.6.3.3.9 <i>In Vitro</i> Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate Metabolites and Naloxone against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors	41
2.6.3.4 安全性薬理試験	42
2.6.3.4.1 <i>In Vitro</i> Effects of Naldemedine Tosylate on Myocardial Action Potential in Isolated Guinea Pig Papillary Muscle	42
2.6.3.4.2 <i>In Vitro</i> Effect of Naldemedine Tosylate on Potassium Current in Cells Expressing HERG Channels.....	43
2.6.3.4.3 Effects of Naldemedine Tosylate on Central Nervous System in Rats.....	44
2.6.3.4.4 Effects of Naldemedine Tosylate on Respiratory System in Rats	45
2.6.3.4.5 Effects of Naldemedine Tosylate on Cardiovascular System in Dogs.....	46
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	47

2.6.3 略号及び用語定義一覧表

略号	用語定義
APD ₃₀₍₉₀₎	30% (90%) 再分極時の活動電位持続時間 [action potential duration at 30% (90%) of repolarization]
AUC _{0-24hr}	0～24 時間までの濃度－時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours)
C _{max}	最高血漿中濃度 (maximum concentration)
CR	濃度比 (concentration ratio)
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]-enkephalin
DAMGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-enkephalin acetate salt
DMSO	ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide)
E _{max}	最大効果 (percent of the maximal stimulation in the [³⁵ S]-GTPγS binding)
EC ₅₀	50%有効濃度 (effective concentration that produced 50% stimulation of the [³⁵ S]-GTPγS binding)
ED ₅₀₍₈₀₎	50% (80%) 有効量 [50% (80%) effective dose]
GDP	guanosine 5-diphosphate sodium salt
GLP	Good Laboratory Practice
HEK293	ヒト胎児腎臓由来培養細胞 (human embryonic kidney 293)
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (human ether-à-go-go related gene)
IC ₅₀	50%阻害濃度 (concentration that reduce the efficacy of the reference agonist by 50% of its maximum effect)
K _b	結合定数 (functional binding constant)
K _d	解離定数 (dissociation constant)
K _i	阻害定数 (inhibition constant)
K _{obs}	見かけの結合速度定数 (observed association rate constant)
K _{off}	解離速度定数 (dissociation rate constant)
MNTX	メチルナルトレキソン (methylnaltrexone)
MPE	最大可能効果 (maximal possible effect)
naldemedine 3-G	ナルデメジン 3-O-β-D-グルクロナイド (naldemedine 3-O-β-D-glucuronide)
naldemedine 6-G	ナルデメジン 6-O-β-D-グルクロナイド (naldemedine 6-O-β-D-glucuronide)
naldemedine-CA	ナルデメジン-カルボン酸体 (naldemedine-carboxylic acid)
[³⁵ S]-GTPγS	guanosine-5'-O-(3-[³⁵ S]thio)triphosphate
S.E.	標準誤差 (standard error)
S.E.M.	標本平均の標準誤差 (standard error of the mean)

$t_{1/2}$	消失半減期 (time until the binding of [3 H]-ligand to human mu opioid receptor decreases to 50% after the addition of excess amount of unlabeled ligand)
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間 (time to maximum concentration)

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

Test Article: Naldemedine Tosylate, Nor-naldemedine,
Naldemedine 3-O-β-D-glucuronide (Naldemedine 3-G),
Naldemedine 6-O-β-D-glucuronide (Naldemedine 6-G),
Naldemedine-carboxylic acid (Naldemedine-CA),
Benzamidine

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number ^(a)	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
<i>In vitro</i> binding and functional assays of naldemedine tosylate and methylnaltrexone (MNTX) against human mu, human delta, and guinea pig kappa opioid receptors	Recombinant human mu and delta opioid receptors and guinea pig cerebrum and cerebellum membranes for kappa opioid receptor	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	R-297995-EB-074-N	4.2.1.1-01
<i>In vitro</i> binding and functional assays of naldemedine tosylate, its metabolites, and MNTX against human kappa opioid receptor	Recombinant human kappa opioid receptor	<i>In vitro</i>	██████████	S-297995-EF-284-N (██████████13850)	4.2.1.1-02
<i>In vitro</i> binding and functional assays of naldemedine tosylate against rat mu opioid receptor	Recombinant rat mu opioid receptor	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-225-N	4.2.1.1-03
<i>In vitro</i> binding and functional assays of naldemedine tosylate against rat delta and kappa opioid receptors	Recombinant rat delta and kappa opioid receptors	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-281-N	4.2.1.1-04
<i>In vitro</i> binding kinetics of [³ H]-naldemedine and [³ H]-naloxone against human mu opioid receptor	Recombinant human mu opioid receptor	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-224-N	4.2.1.1-05
<i>In vitro</i> binding kinetics of [³ H]-naldemedine and [³ H]-naloxone against rat mu opioid receptor	Recombinant rat mu opioid receptor	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-222-N	4.2.1.1-06
Preliminary <i>in vitro</i> functional assay of naldemedine tosylate against mu opioid receptor	Isolated guinea pig ileum	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	R-297995-EF-013-R	4.2.1.1-11
^(a) In parenthesis, CRO study number is shown.					

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

Test Article: [³H]-naldemedine, Naldemedine Tosylate

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number ^(a)	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics (Continued)					
<i>In vitro</i> functional assay of naldemedine tosylate against human mu opioid receptor	Recombinant human mu opioid receptor	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-311-R	4.2.1.1-12
Anti-constipation effects of naldemedine tosylate and MNTX on subcutaneously administered morphine-induced inhibition of small intestinal transit in rats	Rat, subcutaneously administered morphine-induced inhibition of small intestinal transit	Naldemedine tosylate: Oral MNTX: Subcutaneous	Shionogi & Co., Ltd.	R-297995-EB-071-N	4.2.1.1-07
Anti-constipation effect of naldemedine tosylate on subcutaneously administered oxycodone-induced inhibition of small intestinal transit in rats	Rat, subcutaneously administered oxycodone-induced inhibition of small intestinal transit	Oral	██████████	S-297995-EF-260-N (7620)	4.2.1.1-08
Anti-constipation effect of naldemedine tosylate on orally administered morphine-induced inhibition of small intestinal transit in rats	Rat, orally administered morphine-induced inhibition of small intestinal transit	Oral	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-221-N	4.2.1.1-09
Anti-constipation effect of naldemedine tosylate and MNTX on subcutaneously administered morphine-induced inhibition of castor oil-induced diarrhea in rats	Rat castor oil-induced diarrhea model using subcutaneous morphine administration	Naldemedine tosylate: Oral MNTX: Subcutaneous	Shionogi & Co., Ltd.	R-297995-EB-092-N	4.2.1.1-10
Secondary Pharmacodynamics					
<i>In vitro</i> selectivity study of naldemedine tosylate evaluated in various receptor, channel, and transporter binding and enzyme assays	Various receptors, channels, transporters and enzymes	<i>In vitro</i>	██████████	R-297995-EF-081-N (██████████ 3795-G)	4.2.1.2-01
Effects of naldemedine tosylate and MNTX on subcutaneously administered morphine-induced analgesia in rat tail-flick test	Rat tail-flick test, subcutaneously administered morphine-induced analgesia	Naldemedine tosylate: Oral MNTX: Subcutaneous	Shionogi & Co., Ltd.	R-297995-EB-072-N	4.2.1.2-02
^(a) In parentheses, CRO study numbers are shown.					

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate, Nor-naldemedine,
Naldemedine 3-G, Naldemedine 6-G,
Naldemedine-CA, Benzamidine

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number ^(a)	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics (Continued)					
Time-course of anti-analgesic effect of naldemedine tosylate in rat tail-flick test	Rat tail-flick test, subcutaneously administered morphine-induced analgesia	Oral	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-181-N	4.2.1.2-03
Effects of naldemedine tosylate and naloxone on subcutaneously administered morphine-induced analgesia in rat post-operative pain model	Rat post-operative pain model, subcutaneously administered morphine-induced analgesia	Naldemedine tosylate: Oral Naloxone: Subcutaneous	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-274-N	4.2.1.2-04
<i>In vivo</i> opioid receptor occupancies by naldemedine tosylate in rat cerebral cortex and thalamus	Rat	Oral	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-257-N	4.2.1.2-05
Effects of naldemedine tosylate and MNTX on subcutaneously administered morphine-induced emesis in ferrets	Ferret, subcutaneously administered morphine-induced emesis	Naldemedine tosylate: Oral MNTX: Subcutaneous	██████████	R-297995-EF-082-N (6250)	4.2.1.2-06
Duration of effects of naldemedine tosylate and MNTX on subcutaneously administered morphine-induced emesis in ferrets	Ferret, subcutaneously administered morphine-induced emesis	Naldemedine tosylate: Oral MNTX: Subcutaneous	██████████	R-297995-EF-083-N (6251)	4.2.1.2-07
Effect of naldemedine tosylate on orally administered morphine-induced emesis in ferrets	Ferret, orally administered morphine-induced emesis	Oral	██████████	S-297995-EF-253-N (7525)	4.2.1.2-08
<i>In vitro</i> binding and functional assays of naldemedine tosylate metabolites and naloxone against human mu, human delta, and guinea pig kappa opioid receptors	Recombinant human mu and delta opioid receptors and guinea pig cerebrum and cerebellum membranes for kappa opioid receptor	<i>In vitro</i>	Shionogi & Co., Ltd.	S-297995-EB-135-N	4.2.1.2-09
^(a) In parentheses, CRO study numbers are shown.					

(続く)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表 (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number ^(a)	Location in CTD
Safety Pharmacology					
<i>In vitro</i> effects of naldemedine tosylate on myocardial action potential in isolated guinea pig papillary muscle	Guinea-pig papillary muscle	<i>In vitro</i>	[REDACTED]	R-297995-SF-078-L (080434)	4.2.1.3-01
<i>In vitro</i> effect of naldemedine tosylate on ionic current in cells expressing human ether-à-go-go-related gene (hERG) channels	Human embryonic kidney 293 (HEK293) cells expressing hERG	<i>In vitro</i>	[REDACTED]	R-297995-SF-079-L (080435)	4.2.1.3-02
Effects of naldemedine tosylate on central nervous system in rats	Rat	Oral	[REDACTED]	R-297995-SF-075-L (080431)	4.2.1.3-03
Effects of naldemedine tosylate on respiratory system in rats	Rat	Oral	[REDACTED]	R-297995-SF-077-L (080433)	4.2.1.3-04
Effects of naldemedine tosylate on cardiovascular system in dogs	Dog	Oral	[REDACTED]	R-297995-SF-076-L (080432)	4.2.1.3-05
^(a) In parentheses, CRO study numbers are shown.					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate and MNTX against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors

Test Article: Naldemedine Tosylate

Receptors	Recombinant human mu opioid receptor (expressed in CHO-K1 cells), Recombinant human delta opioid receptor (expressed in HEK-293 cells), Guinea pig kappa opioid receptor (membranes prepared from the cerebrum or cerebellum of guinea pig [male, Slc:Hartley] by centrifugation method)
Radioligands	[³ H]-[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly ⁵ -ol]-Enkephalin acetate salt (DAMGO) for binding assay against mu opioid receptor, [³ H]-[D-Ala ² , D-Leu ⁵]-Enkephalin (DADLE) for binding assay against delta opioid receptor, [³ H]-U69593 for binding assay against kappa opioid receptor, Guanosine-5'-O-(3-[³⁵ S]thio) triphosphate ([³⁵ S]-GTPγS) for functional assay
Concentration (nmol/L)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000
Reference substance (Concentration)	MNTX (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000, 30000, 100000 nmol/L)
Vehicle	Dimethylsulfoxide (DMSO)
Evaluation items	Inhibition constant (K _i), Concentration that reduce the efficacy of the reference agonist by 50% of its maximum effect (IC ₅₀), Functional binding constant (K _b), Percent of the maximal stimulation in the [³⁵ S]-GTPγS binding (E _{max}), Effective concentration that produced 50% stimulation (EC ₅₀) of the [³⁵ S]GTPγS binding
Evaluation method	Bindings of naldemedine tosylate and MNTX to human mu, human delta, and guinea pig kappa opioid receptors were investigated. Mu, delta, and kappa binding sites were labeled by using [³ H]-DAMGO, [³ H]-DADLE, and [³ H]-U69593, respectively. The K _i values were calculated from the concentration that produced a 50% displacement of each radioligand at the specific binding site and each concentration and dissociation constant of radioligand. Functional assays against human mu, human delta, and guinea pig kappa opioid receptors were also conducted. The antagonistic activities against these opioid receptors were determined by K _b values which were calculated from the IC ₅₀ of naldemedine tosylate or MNTX, EC ₅₀ of each agonist (DAMGO for mu opioid receptor, [Met ⁵]-enkephalin for delta opioid receptor, and U-50488H for kappa opioid receptor), and concentration of each agonist that is being inhibited. The agonistic activity in [³⁵ S]-GTPγS binding was represented as the E _{max} and EC ₅₀ values. Basal activities were determined in the presence of 3 μmol/L guanosine 5-diphosphate sodium salt (GDP) and in the absence of an agonist. DAMGO, [Met ⁵]-enkephalin, and U-50488H were used as the assay positive control, and utilized as the 100% efficacy control.

(続く)

2.6.3.2.1 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate and MNTX against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results						
Substances	Receptors	Binding affinity	Antagonistic activity		Agonistic activity	
		K _i (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	K _b (nmol/L)	E _{max} (%) ^(a)	EC ₅₀ (nmol/L)
Naldemedine tosylate	Mu (human)	0.34 ± 0.03	25.57 ± 2.61	0.50 ± 0.05	-0.50 ± 0.65	> 10000
	Delta (human)	0.43 ± 0.08	7.09 ± 0.74	0.27 ± 0.03	2.32 ± 3.37	> 10000
	Kappa (guinea pig)	2.64 ± 0.19	69.35 ± 42.91	3.13 ± 1.94	-4.56 ± 26.05	> 10000
MNTX	Mu (human)	5.48 ± 1.11	2842.07 ± 308.94	55.86 ± 6.07	14.72 ± 2.12	> 100000
	Delta (human)	3458.86 ± 305.64	28256.28 ± 6114.89	1082.71 ± 234.31	18.39 ± 5.51	> 100000
	Kappa (guinea pig)	72.36 ± 8.59	37211.37 ± 5125.99	1681.42 ± 231.62	-9.14 ± 9.42	> 100000
Each value represents the mean ± standard error of the mean (S.E.M.) of 3 independent experiments carried out in duplicate.						
^(a) Values for naldemedine tosylate at 10 μmol/L and for MNTX at 100 μmol/L.						
Study number [Location in CTD]		R-297995-EB-074-N [4.2.1.1-01]				

2.6.3.2.2 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate and MNTX against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors

Test Article: Naldemedine Tosylate; Nor-naldemedine,
Naldemedine 3-G, Naldemedine 6-G,
Naldemedine-CA, Benzamidine

Receptors	Human/Recombinant human kappa opioid receptor (expressed in HEK-293 cells; PerkinElmer, Cat.# 6110558)
Radioligands	[³ H]-U69593 for binding assay, [³⁵ S]-GTPγS for functional assay
Concentration (nmol/L)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000
Reference substance (Concentration)	MNTX (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 nmol/L)
Vehicle	DMSO
Evaluation items	K _i , IC ₅₀ , K _b , E _{max} , EC ₅₀
Evaluation method	Bindings of naldemedine tosylate, nor-naldemedine, naldemedine 3-G, naldemedine 6-G, naldemedine-CA, benzamidine, and MNTX to human kappa opioid receptors were investigated. Kappa binding site was labeled by using [³ H]-U69593. The K _i values were calculated as described above. Functional assays against human kappa opioid receptor were also conducted. The antagonistic activities against kappa opioid receptor were determined by K _b values which were calculated as described above. The agonistic activities in [³⁵ S]-GTPγS binding were represented as the E _{max} and EC ₅₀ values. Basal activities were determined as described above. U-50488H was used as the assay positive control, and utilized as the 100% efficacy control.

(続く)

2.6.3.2.2 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate and MNTX against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate; Nor-naldemedine,
Naldemedine 3-G, Naldemedine 6-G,
Naldemedine-CA, Benzamidine

Results						
Substances	Receptor	Binding affinity	Antagonistic activity		Agonistic activity	
		K _i (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	K _b (nmol/L)	E _{max} (%) ^(a)	EC ₅₀ (nmol/L)
Naldemedine tosylate	Kappa (human)	0.940 ± 0.0835	16.1 ± 3.13	0.436 ± 0.0846	-6, -5	> 10000
Nor-naldemedine		60.8 ± 13.4	Not determined	> 270.68	6, 9	> 10000
Naldemedine 3-G		915 ± 320	Not determined	> 270.68	-2, -7	> 10000
Naldemedine 6-G		36.2 ± 8.34	1052 ± 269	28.5 ± 7.28	-7, -6	> 10000
Naldemedine-CA		151 ± 33.1	7443 ± 491	201 ± 13.3	6, 7	> 10000
Benzamidine		> 6250	Not determined	> 270.68	2, -4	> 10000
MNTX		32.1 ± 1.44	Not determined	> 270.68	34, 37	> 10000
Data are expressed as the mean ± S.E.M. in 2 independent experiments. ^(a) Values at 10 μmol/L. Data of 2 independent experiments are shown.						
Study number [Location in CTD]		S-297995-EF-284-N (CRO Study No. [REDACTED] 13850) [4.2.1.1-02]				

2.6.3.2.3 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate against Rat Mu Opioid Receptor

Test Article: Naldemedine Tosylate

Receptor	Recombinant rat mu opioid receptor (expressed in CHO-K1 cells)					
Radioligand	[³ H]-DAMGO for binding assay, [³⁵ S]-GTPγS for functional assay					
Concentration (nmol/L)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000					
Vehicle	DMSO					
Evaluation item	K _i , IC ₅₀ , K _b , E _{max} , EC ₅₀					
Evaluation method	Binding of naldemedine tosylate to rat mu opioid receptor was investigated. Mu binding site was labeled by using [³ H]-DAMGO. The K _i values were calculated as described above. Functional assay against rat mu opioid receptor was also conducted. The antagonistic activities against this opioid receptor were determined by K _b values which were calculated as described above. The agonistic activities of test substances in [³⁵ S]-GTPγS binding were represented as the E _{max} and EC ₅₀ values. Basal activities were determined as described above. DAMGO were used as the assay positive control, and utilized as the 100% efficacy control.					
Results						
Substance	Receptor	Binding affinity	Antagonistic activity		Agonistic activity	
		K _i (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	K _b (nmol/L)	E _{max} (%) ^(a)	EC ₅₀ (nmol/L)
Naldemedine tosylate	Mu (rat)	1.40 ± 0.24	161.08 ± 6.39	0.56 ± 0.02	-5.98 ± 1.04	> 10000
Each value represents the mean ± standard error (S.E.) from 3 independent experiments carried out in duplicate. ^(a) Values at 10 μmol/L.						
Study number [Location in CTD]	S-297995-EB-225-N [4.2.1.1-03]					

2.6.3.2.4 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate against Rat Delta and Kappa Opioid Receptors

Test Article: Naldemedine Tosylate

Receptors	Recombinant rat delta and kappa opioid receptors (expressed in CHO-K1 cells)					
Radioligands	[³ H]-DADLE for binding assay against delta opioid receptor, [³ H]-U69593 for binding assay against kappa opioid receptor, [³⁵ S]-GTPγS for functional assay					
Concentration (nmol/L)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000					
Vehicle	DMSO					
Evaluation items	K _i , IC ₅₀ , K _b , E _{max} , EC ₅₀					
Evaluation method	<p>Bindings of naldemedine tosylate to rat delta and kappa opioid receptors were investigated. Delta and kappa binding sites were labeled by using [³H]-DADLE and [³H]-U69593, respectively. The K_i values were calculated as described above. Functional assays against rat delta and kappa opioid receptors were also conducted. The antagonistic activities against these opioid receptors were determined by K_b values which were calculated as described above. The agonistic activities of test substances in [³⁵S]-GTPγS binding were represented as the E_{max} and EC₅₀ values. Basal activities were determined as described above. [Met⁵]-Enkephalin and U-50488H were used as the assay positive control for delta and kappa opioid receptors, respectively, and utilized as the 100% efficacy control.</p>					
Results						
Substance	Receptors	Binding affinity	Antagonistic activity		Agonistic activity	
		K _i (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	K _b (nmol/L)	E _{max} (%) ^(a)	EC ₅₀ (nmol/L)
Naldemedine tosylate	Delta (rat)	0.96 ± 0.06	10.64 ± 0.79	0.22 ± 0.02	10.56 ± 5.85	> 10000
	Kappa (rat)	2.16 ± 0.24	12.19 ± 0.57	0.49 ± 0.02	-9.26 ± 1.58	> 10000
Each value represents the mean ± S.E. from 3 independent experiments carried out in duplicate.						
^(a) Values at 10 nmol/L.						
Study number [Location in CTD]	S-297995-EB-281-N [4.2.1.1-04]					

2.6.3.2.5 *In Vitro* Binding Kinetics of [³H]-Naldemedine and [³H]-Naloxone against Human Mu Opioid ReceptorTest Article: [³H]-naldemedine

Receptor	Recombinant human mu opioid receptor (expressed in CHO-K1 cells)			
Concentration (nmol/L)	0.5			
Reference substance (Concentration)	[³ H]-naloxone (0.5 nmol/L)			
Vehicle	DMSO			
Evaluation items	Dissociation constant (K_d), Observed association rate constant (K_{obs}), Dissociation rate constant (K_{off}), Time until the binding of [³ H]-ligand ([³ H]-naldemedine or [³ H]-naloxone) to human mu opioid receptor decreases to 50% after the addition of excess amount of unlabeled ligand ($t_{1/2}$)			
Evaluation method	After the determination of a period of time required to reach binding equilibrium of [³ H]-ligand to human mu opioid receptor and the optimal concentration of the membrane protein to use, and the determination of the optimal concentration of [³ H]-ligand on the basis of K_d value calculated from the Scatchard plot, the association and dissociation rates of [³ H]-ligand were examined. The K_{obs} values were determined from nonlinear regression fits of the data to a 1-phase exponential association model; $B = Beq (1 - e^{-k_{obs}t})$ in which Beq is the specific binding (scintillation count) of [³ H]-ligand to the receptors at equilibrium, and B is the specific binding of radiolabeled ligand at a given incubation time t (up to 120 minutes). The K_{off} values were calculated from nonlinear regression fits of the data to a 1-phase exponential decay model using the following formula; $K_{off} = 0.693/t_{1/2}$.			
Results				
Substances	K_d (nmol/L)	K_{obs} (min^{-1})	K_{off} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
[³ H]-naldemedine	0.689 ± 0.003	0.045 ± 0.002	0.023 ± 0.000	30.687 ± 0.511
[³ H]-naloxone	1.133 ± 0.018	0.233 ± 0.007	0.266 ± 0.027	2.653 ± 0.249
Each value represents the mean \pm S.E.M. of 3 independent experiments carried out in duplicate.				
Study number [Location in CTD]	S-297995-EB-224-N [4.2.1.1-05]			

2.6.3.2.6 *In Vitro* Binding Kinetics of [³H]-Naldemedine and [³H]-Naloxone against Rat Mu Opioid ReceptorTest Article: [³H]-naldemedine

Receptor	Recombinant rat mu opioid receptor (expressed in CHO-K1 cells)			
Concentration (nmol/L)	0.5			
Reference substance (Concentration)	[³ H]-naloxone (0.5 nmol/L)			
Vehicle	DMSO			
Evaluation items	K_d , K_{obs} , K_{off} , $t_{1/2}$			
Evaluation method	After the determination of a period of time required to reach binding equilibrium of [³ H]-ligand ([³ H]-naldemedine or [³ H]-naloxone) to rat mu opioid receptor, the optimal concentration of the membrane protein to use, and the optimal concentration of [³ H]-ligand on the basis of K_d value calculated from the Scatchard plot, the association and dissociation rates of [³ H]-ligand were examined. The K_{obs} and K_{off} values were determined and calculated, respectively, by the same methods for human mu opioid receptor.			
Results				
Substances	K_d (nmol/L)	K_{obs} (min ⁻¹)	K_{off} (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
[³ H]-naldemedine	0.315 ± 0.017	0.070 ± 0.006	0.016 ± 0.000	43.778 ± 0.092
[³ H]-naloxone	1.219 ± 0.054	0.503 ± 0.009	0.397 ± 0.007	1.745 ± 0.029
Each value represents the mean ± S.E.M. of 3 independent experiments carried out in duplicate.				
Study number [Location in CTD]	S-297995-EB-222-N [4.2.1.1-06]			

2.6.3.2.7 Preliminary *In Vitro* Functional Assay of Naldemedine Tosylate against Mu Opioid Receptor Using Isolated Guinea Pig Ileum

Test Article: Naldemedine Tosylate

Study System	Electrically-induced twitch responses of the isolated guinea-pig ileum										
Concentration (nmol/L)	0.1, 1, 3, 10, 100										
Ligand (Concentration)	DAMGO (1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 nmol/L)										
Vehicle	Distilled water for injection										
Evaluation items	IC ₅₀ , Concentration ratio (CR), slope of Schild regression, pA ₂										
Evaluation method	The contractile responses of isolated guinea pig ileum were evoked by square-wave stimulation via a ring platinum electrode using an electrical stimulator and bus drive amplifier. After equilibration for about 60 minutes, electrical stimulation was given to the preparations (frequency: 0.1 Hz, duration: 5 msec, voltage: showing about 80% contractile responses) until stable contractile response to electrical stimulation is confirmed. After confirmation of stable contractile response, naldemedine tosylate was added for 20 minute treatment, and then DAMGO was cumulatively added to examine the effects on the contractile responses in the preparations. Contractile rates were calculated as the percentages of contraction elicited by electrical field stimulation before DAMGO addition. In the presence or absence of naldemedine tosylate, the IC ₅₀ value was calculated by nonlinear least square regression analysis (logistic regression, sigmoidal dose-response variable slope). The CR values were determined by the following equation: CR = IC ₅₀ of an agonist with the presence of test article/IC ₅₀ of an agonist alone. In the case that the slope of Schild regression was ≤ 0.8 or ≥ 1.2, the pA ₂ value was not determined.										
Results											
Naldemedine tosylate	Contractile rate (% , mean ± S.E. of 3 preparations)									IC ₅₀ (nmol/L)	CR
	Concentration of DAMGO (mol/L)										
	1.E-09	3.E-09	1.E-08	3.E-08	1.E-07	3.E-07	1.E-06	3.E-06	1.E-05		
Control (Agonist alone)	96.1 ± 1.8	86.6 ± 2.5	61.9 ± 4.2	32.1 ± 4.5	21.1 ± 2.1	/	/	/	/	16.98	/
1.E-10 mol/L	94.4 ± 2.7	86.9 ± 4.1	64.1 ± 1.3	43.5 ± 3.8	32.8 ± 1.3	/	/	/	/	26.92	1.59
1.E-09 mol/L	97.8 ± 0.2	92.8 ± 1.6	80.0 ± 0.4	62.3 ± 1.9	43.6 ± 3.4	31.6 ± 2.7	/	/	/	75.86	4.47
3.E-09 mol/L	98.9 ± 0.3	98.6 ± 0.6	97.3 ± 0.3	90.7 ± 2.3	77.5 ± 3.0	63.6 ± 3.2	53.8 ± 3.5	44.4 ± 2.8	37.5 ± 4.1	1862.09	109.66
1.E-08 mol/L	98.8 ± 1.2	98.2 ± 1.4	97.6 ± 1.1	97.3 ± 0.9	96.0 ± 0.9	92.4 ± 1.3	88.6 ± 3.8	80.7 ± 3.6	74.1 ± 1.4	N.C.	N.C.
1.E-08 mol/L (reproducibility test)	99.7 ± 0.3	98.5 ± 0.3	96.4 ± 0.9	94.2 ± 1.6	92.6 ± 1.3	86.5 ± 1.9	80.1 ± 1.6	77.5 ± 3.8	70.1 ± 4.7	N.C.	N.C.
1.E-07 mol/L	98.8 ± 0.6	98.8 ± 0.6	98.5 ± 0.8	97.9 ± 0.3	97.0 ± 0.5	98.1 ± 1.1	96.2 ± 2.9	90.4 ± 3.9	76.7 ± 6.6	N.C.	N.C.
The slope of Schild regression was 1.42, thus the pA ₂ value was not determined. N.C., Not calculated because a contractile rate inhibition was lower than 50%.											
Study number [Location in CTD]	R-297995-EF-013-R [4.2.1.1-11]										

2.6.3.2.8 *In Vitro* Functional Assay of Naldemedine Tosylate against Human Mu Opioid Receptor

Test Article: Naldemedine Tosylate

Receptor	Recombinant human mu opioid receptor (expressed in CHO-K1 cells)	
Radio ligands	[³⁵ S]-GTPγS	
Concentration (nmol/L)	3, 30, 300, 3000	
Reference substance (Concentration)	Naloxone (30, 300, 3000, 30000 nmol/L)	
Vehicle	DMSO	
Evaluation items	Slope of Schild regression	
Evaluation method	The [³⁵ S]-GTPγS binding induced by morphine, oxycodone, hydrocodone, or fentanyl was determined in the absence or presence of naldemedine tosylate or naloxone. To distinguish the antagonism, the slope of Schild regression and its 95% confidence interval were calculated. The criteria for competitive antagonism was that 95% confidence interval of the slope of Schild regression includes unity (1).	
Results		
Opioid	Slope of Schild regression (95% confidence interval of slope)	
	Naldemedine tosylate	Naloxone
Morphine	1.37 ± 0.02 (1.32 – 1.42)	1.00 ± 0.06 (0.89 – 1.11)
Oxycodone	1.29 ± 0.02 (1.25 – 1.34)	0.97 ± 0.02 (0.92 – 1.02)
Hydrocodone	1.43 ± 0.04 (1.35 – 1.51)	1.04 ± 0.03 (0.98 – 1.09)
Fentanyl	1.37 ± 0.05 (1.28 – 1.47)	1.00 ± 0.05 (0.90 – 1.09)
Each value represents the mean ± S.E. of 3 independent experiments carried out in duplicate.		
Study number [Location in CTD]	S-297995-EB-311-R [4.2.1.1-12]	

2.6.3.2.9 Anti-Constipation Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crlj:WI
Gender and No. per Group	Male and n = 10/Group
Feed Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension
Method of Administration	Single oral administration
Dose (mg/kg, as free)	0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10
Reference substance (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	MNTX (5% Xylitol/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 mg/kg])
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (3 mg/kg) or saline
Evaluation items	Percentage of the maximal possible effect (MPE), 50% Effective dose (ED ₅₀), 80% Effective dose (ED ₈₀)
Evaluation method	Rats were subcutaneously treated with morphine or saline at 15 minutes after a single oral administration of vehicle or naldemedine tosylate or after a single subcutaneous administration of vehicle or MNTX under fasted condition. Evans blue (0.5%) suspended in 2.5% carboxymethyl cellulose was given intragastrically at 30 minutes after morphine- or saline-treatment. The animals were sacrificed by cervical dislocation at 15 minutes after the Evans blue administration. Small intestinal transit was calculated as the percentage of the moved distance of Evans blue relative to the total length of the small intestine. The effect of naldemedine tosylate or MNTX on constipation induced by morphine was represented as the % MPE calculated using the small intestinal transit. The ED ₅₀ and ED ₈₀ values were determined with Sigmoid maximum effect model.

(続く)

2.6.3.2.9 Anti-Constipation Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results					
Substances	Dose (mg/kg)	Treatment	% MPE	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)
Naldemedine tosylate	Vehicle	Saline	99.98 ± 7.08	0.03	0.14
	Vehicle	Morphine	0.01 ± 9.50 **		
	0.01	Morphine	12.49 ± 11.46		
	0.03	Morphine	41.28 ± 11.40 †		
	0.1	Morphine	71.07 ± 5.87 ††		
	0.3	Morphine	88.54 ± 12.76 ††		
	1	Morphine	91.50 ± 8.22 ††		
	3	Morphine	90.55 ± 8.63 ††		
	10	Morphine	110.65 ± 6.44 ††		
	10	Saline	102.28 ± 4.29		
MNTX	Vehicle	Saline	100.01 ± 3.69	4.47	17.86
	Vehicle	Morphine	-0.01 ± 7.84 **		
	0.03	Morphine	-12.52 ± 6.16		
	0.1	Morphine	-8.50 ± 7.47		
	0.3	Morphine	4.57 ± 7.45		
	1	Morphine	20.27 ± 8.89		
	3	Morphine	19.76 ± 10.21		
	10	Morphine	56.10 ± 7.48 ††		
	30	Morphine	71.52 ± 10.83 ††		
	30	Saline	96.43 ± 4.28		
Data are expressed as the mean ± S.E.M.					
** P < 0.01 vs the respective vehicle + saline group (Welch's t-test).					
† P < 0.05, †† P < 0.01 vs the respective vehicle + morphine treatment group (Dunnett's test).					
Study number [Location in CTD]	R-297995-EB-071-N [4.2.1.1-07]				

2.6.3.2.10 Anti-Constipation Effect of Naldemedine Tosylate on Subcutaneously Administered Oxycodone-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crlj:WI				
Gender and No. per Group	Male and n = 10/Group				
Feed Condition	Fasted				
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension				
Method of Administration	Single oral administration				
Dose (mg/kg, as free)	0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3				
Treatment	Subcutaneous treatment with oxycodone (1 mg/kg) or saline				
Evaluation items	% MPE, ED ₅₀ , ED ₈₀				
Evaluation method	Rats were subcutaneously treated with oxycodone or saline at 30 minutes after a single oral administration of vehicle or naldemedine tosylate under fasted condition. Evans blue (0.5 w/v%) dissolved in 2.5 w/v% carboxymethyl cellulose was given intragastrically 15 minutes after oxycodone- or saline-treatment. The animals were sacrificed by cervical dislocation 15 minutes after the Evans blue administration. Small intestinal transit was calculated as the percentage of the moved distance of Evans blue relative to the total length of the small intestine. The effect of naldemedine tosylate on constipation induced by oxycodone was represented as the % MPE calculated using the small intestinal transit. The ED ₅₀ and ED ₈₀ values were determined with Sigmoid maximum effect model.				
Results					
Substance	Dose (mg/kg)	Treatment	% MPE	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)
Naldemedine tosylate	Vehicle	Saline	100.00 ± 3.25	0.02	0.13
	Vehicle	Oxycodone	0.01 ± 4.42 **		
	0.001	Oxycodone	9.90 ± 8.15		
	0.003	Oxycodone	20.19 ± 6.82		
	0.01	Oxycodone	21.46 ± 9.93		
	0.03	Oxycodone	60.99 ± 6.16 ††		
	0.1	Oxycodone	64.77 ± 7.44 ††		
	0.3	Oxycodone	73.62 ± 5.00 ††		
	1	Oxycodone	83.79 ± 4.44 ††		
3	Oxycodone	89.50 ± 3.96 ††			
Each value represents the mean ± S.E. ** P < 0.01 vs the vehicle + saline group (Welch's t-test). †† P < 0.01 vs the vehicle + oxycodone group (Dunnett's test).					
Study number [Location in CTD]	S-297995-EF-260-N (CRO Study No. 7620) [4.2.1.1-08]				

2.6.3.2.11 Anti-Constipation Effect of Naldemedine Tosylate on Orally Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crlj:WI				
Gender and No. per Group	Male and n = 12/Group				
Feed Condition	Fasted				
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension				
Method of Administration	Single oral administration for naldemedine tosylate and morphine				
Dose (mg/kg, as free)	0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10				
Treatment	Oral treatment with morphine (20 mg/kg) or saline				
Evaluation items	% MPE, ED ₅₀ , ED ₈₀				
Evaluation method	The oral administration of morphine for an antagonism study was determined to be 20 mg/kg, because this treatment showed an inhibitory effect of $54.48 \pm 3.62\%$ compared with the vehicle + distilled water group, which was similar to the inhibitory effect by the subcutaneous administration of morphine at 3 mg/kg. Rats were treated with morphine or distilled water orally 15 minutes after a single oral administration of vehicle or naldemedine tosylate under fasted condition. Evans blue (0.5 w/v%) dissolved in 2.5 w/v% carboxymethyl cellulose was given intragastrically 30 minutes after the morphine- or saline-treatment. The animals were sacrificed by cervical dislocation 15 minutes after the Evans blue administration. Small intestinal transit was calculated as the percentage of the moved distance of Evans blue relative to the total length of the small intestine. The effect of naldemedine tosylate on constipation induced by morphine was represented as the % MPE calculated using the small intestinal transit. The ED ₅₀ and ED ₈₀ values were determined with Sigmoid maximum effect model.				
Results					
Substance	Dose (mg/kg)	Treatment	% MPE	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)
Naldemedine tosylate	Vehicle	DW	99.99 ± 6.62	0.23	1.04
	Vehicle	Morphine	$0.01 \pm 3.86^{**}$		
	0.01	Morphine	15.79 ± 4.77		
	0.03	Morphine	13.54 ± 7.49		
	0.1	Morphine	$39.97 \pm 5.16^{††}$		
	0.3	Morphine	$56.17 \pm 10.39^{††}$		
	1	Morphine	$80.57 \pm 6.03^{††}$		
	3	Morphine	$85.57 \pm 6.61^{††}$		
	10	Morphine	$96.88 \pm 5.57^{††}$		
Each value represents the mean \pm S.E. (n = 12). ** P < 0.01 vs the vehicle + DW group (Welch's t-test). †† P < 0.01 vs the vehicle + morphine group (Dunnett's test).					
Study number [Location in CTD]	S-297995-EB-221-N [4.2.1.1-09]				

2.6.3.2.12 Anti-Constipation Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crl:CD(SD)
Gender and No. per Group	Male and n = 11/Group
Feed Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension
Method of Administration	Single oral administration
Dose (mg/kg, as free)	0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1
Reference substance (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	MNTX (5% xylitol/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg])
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (1 mg/kg) or saline
Evaluation items	Scoring of symptoms of diarrhea (0, without diarrhea; 1, mild diarrhea containing loose bowels; 2, intense liquefied diarrhea), ED ₅₀ , ED ₈₀
Evaluation method	Rats were treated with castor oil intragastrically 45 minutes after a single oral administration of naldemedine tosylate or a single subcutaneous injection of MNTX under fasted condition. Morphine or saline was subcutaneously injected 15 minutes after castor oil treatment. The castor oil-induced diarrhea was observed for 1 hour after the treatment of morphine or saline. The ED ₅₀ and ED ₈₀ values were determined based on the number of animals that exhibited diarrhea regardless of the score of 1 or 2.

(続く)

2.6.3.2.12 Anti-Constipation Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Inhibition of Small Intestinal Transit in Rats (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results								
Substances	Dose (mg/kg)	Treatment	Composition Rate (%)			Significant difference	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)
			Score 1	Score 2	Total			
Naldemedine tosylate	Vehicle	Saline	0.00	100.00	100.00		0.010	0.011
	Vehicle	Morphine	0.00	0.00	0.00	**		
	0.003	Morphine	0.00	0.00	0.00			
	0.01	Morphine	18.18	27.27	45.45			
	0.03	Morphine	18.18	81.82	100.00	††		
	0.1	Morphine	0.00	100.00	100.00	††		
	0.3	Morphine	0.00	100.00	100.00	††		
	1	Morphine	0.00	100.00	100.00	††		
	1	Saline	0.00	100.00	100.00			
MNTX	Vehicle	Saline	0.00	100.00	100.00		0.585	1.929
	Vehicle	Morphine	0.00	0.00	0.00	**		
	0.03	Morphine	9.09	0.00	9.09			
	0.1	Morphine	0.00	9.09	9.09			
	0.3	Morphine	18.18	9.09	27.27			
	1	Morphine	27.27	36.36	63.64	†		
	3	Morphine	18.18	63.64	81.82	††		
	10	Morphine	0.00	100.00	100.00	††		
10	Saline	0.00	100.00	100.00				
** P < 0.01 vs the vehicle + saline group (Wilcoxon rank sum test).								
† P < 0.05, †† P < 0.01 vs the vehicle + morphine group (Steel multiple comparison test).								
Study number [Location in CTD]	R-297995-EB-092-N [4.2.1.1-10]							

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 *In Vitro* Selectivity Study of Naldemedine Tosylate Evaluated in Various Receptor, Channel, and Transporter Binding and Enzyme Assays

Test Article: Naldemedine Tosylate

Receptors, channels, transporters, and enzymes	Human recombinant adenosine A1, adenosine A2a, angiotensin AT1, angiotensin AT2, bradykinin B1, bradykinin B2, cannabinoid CB2, cholecystokinin A, corticotropin releasing factor 1, dopamine D1, dopamine D2 short, dopamine D2 long, dopamine D3, estrogen α , estrogen β , endothelin ETA, endothelin ETB, histamine H1, histamine H2, histamine H3, leukotriene B4, neurokinin NK1, opiate ORL1, serotonin 5HT1A, serotonin 5HT2A, serotonin 5HT2B, serotonin 5HT2C, and serotonin 5HT3 receptors and dopamine and norepinephrine transporters/Human (non-recombinant) calcitonin gene related peptide, cholecystokinin B, testosterone, and vasoactive intestinal polypeptide receptors/Rat whole brain for α 1-adrenergic, β -adrenergic, γ -aminobutyric acid A (BZ Central), and glutamate (Kainate) receptors, Ca channel (Type N), K channel KATP, K channel SkCa, and Na channel Site 2/Rat cerebral cortex for α 2-adrenergic, glutamate (AMPA), glutamate (NMDA Agonist Site), glutamate (NMDA Glycine Site), glutamate (NMDA Phencyclidine Site), muscarinic, nicotinic Ni, and opiate receptors, Ca channel (Type L, Dihydropyridine), K channel KA, and γ -aminobutyric acid transporter/Rat cerebellum for γ -aminobutyric acid A (Agonist Site), γ -aminobutyric acid B, and D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate receptors/Rat spinal cord for glycine (Strychnine Sensitive) receptor/Rat liver for insulin and vasopressin V1 receptors/Rabbit platelet for platelet activating factor receptor/Guinea pig whole brain for sigma σ 1 and sigma σ 2 receptors Human recombinant cyclooxygenase-2, protein kinase C α , protein kinase C β 1, and protein kinase C β 2/ Ovine cyclooxygenase-1/Rat recombinant nitric oxide synthase/Electric eel acetylcholinesterase/Rat cerebrum monoamine oxidase-A/Rat liver monoamine oxidase-B
Concentration (nmol/L)	10
Vehicle	DMSO
Positive controls (Concentration)	Listed in the table of Results
Evaluation item	Inhibition effect (% inhibition) on radioligand binding to various receptors, channels, and transporters and on enzymes
Evaluation method for receptor, channel, and transporter	The inhibition ratio of naldemedine tosylate or positive control on the binding of tracer to each receptor, channel, or transporter was calculated to assess the binding potency. The assay solution was prepared by diluting the membrane fractions prepared from each clone or tissue with the appropriate assay buffer. Each replacement substance solution was added to tube for calculation of non-specific binding, and 10% DMSO was added to tube for calculation of total binding. The solution of naldemedine tosylate or positive control was added to tube for calculation of inhibition ratio. After addition of the assay buffer and tracer solution, the assay solution was added to each tube. The mixture was incubated under the appropriate conditions. The incubated mixture was filtered using a cell harvester or treated using dextran charcoal. The radioactivity of sample was counted using a liquid scintillation counter. In the assay system using ^{125}I tracer, the radioactivity was counted using a gamma counter.

(続く)

2.6.3.3.1 *In Vitro* Selectivity Study of Naldemedine Tosylate Evaluated in Various Receptor, Channel, and Transporter Binding and Enzyme Assays

(続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Evaluation method for enzyme	The inhibition ratio of naldemedine tosylate or positive control on each enzyme reaction was calculated to assess the inhibitory potency. The enzyme solution was prepared from each tissue or clone. Assay medium or 10% DMSO was added to tube or well for measurement of background value and 100% activity. The solution of naldemedine tosylate or positive control was added to the tube or well for calculation of inhibition ratio. The enzyme mixture was incubated under the appropriate conditions for each enzyme and the enzyme activity was measured by the appropriate method.		
Calculation of inhibition ratio	Inhibition ratio = $[1 - (B - N) / (B_0 - N)] \times 100$ (%). B, radioactivity, absorbance, or fluorescence intensity in the tube or well for calculation of inhibition ratio (individual value). B ₀ , radioactivity, absorbance, or fluorescence intensity in the tube or well for measurement of 100% activity (mean value). N, radioactivity, absorbance, or fluorescence intensity in the tube or well for measurement of background value (mean value).		
Results			
Inhibition effect (% inhibition) of naldemedine tosylate and positive control on radioligand binding to various receptors, channels, and transporters and on enzymes			
Assay Name	Naldemedine tosylate	Positive control	
Adenosine A1 (Human)	10.76	89.44 [8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (10 μmol/L)]	
Adenosine A2a (Human)	8.66	100.00 [CGS21680 (10 μmol/L)]	
α1-Adrenergic (Non-selective)	1.43	98.64 [Prazosin (10 μmol/L)]	
α2-Adrenergic (Non-selective)	0.82	99.84 [Yohimbine (10 μmol/L)]	
β-Adrenergic (Non-selective)	0.94	100.00 [(±)-Propranolol (10 μmol/L)]	
Angiotensin AT1 (Human)	7.87	100.00 [Angiotensin II (10 μmol/L)]	
Angiotensin AT2 (Human)	13.31	99.18 [Angiotensin II (10 μmol/L)]	
Bradykinin B1 (Human)	3.03	93.21 [Lys-(des-Arg ⁹ , Leu ⁸)-Bradykinin (10 μmol/L)]	
Bradykinin B2 (Human)	10.78	100.00 [HOE140 (1 μmol/L)]	
Ca Channel (Type L, Dihydropyridine)	18.51	98.86 [Nitrendipine (10 μmol/L)]	
Ca Channel (Type N)	5.68	100.00 [ω-Conotoxin GVIA (10 μmol/L)]	
Cannabinoid CB2 (Human)	21.59	96.34 [(R)-(+)-WIN55212-2 (10 μmol/L)]	
Calcitonin Gene Related Peptide (Human)	2.30	99.52 [Calcitonin Gene Related Peptide (1 μmol/L)]	
Cholecystokinin A (Human)	0.00	99.24 [Cholecystokinin-8 (10 μmol/L)]	
Cholecystokinin B (Human)	13.98	97.65 [Cholecystokinin-8 (10 μmol/L)]	
Corticotropin Releasing Factor 1 (Human)	5.72	100.00 [Urocortin (1 μmol/L)]	
Dopamine D1 (Human)	2.32	99.42 [R(+)-SCH-23390 (10 μmol/L)]	
Dopamine D2 Short (Human)	0.00	99.99 [(+)-Butaclamol (10 μmol/L)]	
Data are expressed as the mean values of duplicate samples.			

(続く)

2.6.3.3.1 *In Vitro* Selectivity Study of Naldemedine Tosylate Evaluated in Various Receptor, Channel, and Transporter Binding and Enzyme Assays

(続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Inhibition effect (% inhibition) of naldemedine tosylate and positive control on radioligand binding to various receptors, channels, and transporters and on enzymes (Continued)		
Assay Name	Naldemedine tosylate	Positive control
Dopamine D2 Long (Human)	3.30	99.07 [(+)-Butaclamol (10 µmol/L)]
Dopamine D3 (Human)	0.00	98.87 [(±)-7-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (10 µmol/L)]
Dopamine Transporter (Human)	0.00	100.00 [GBR12909 (10 µmol/L)]
Estrogen α (Human)	7.38	99.25 [β-Estradiol (10 µmol/L)]
Estrogen β (Human)	0.42	99.25 [β-Estradiol (10 µmol/L)]
Endothelin ETA (Human)	17.22	100.00 [Endothelin-1 (1 µmol/L)]
Endothelin ETB (Human)	1.16	98.02 [Endothelin-1 (1 µmol/L)]
γ-Aminobutyric Acid A (Agonist Site)	0.00	100.00 [Muscimol (10 µmol/L)]
γ-Aminobutyric Acid A (BZ Central)	1.42	100.00 [Diazepam (10 µmol/L)]
γ-Aminobutyric Acid B	7.68	98.81 [γ-Aminobutyric acid (10 µmol/L)]
γ-Aminobutyric Acid Transporter	4.19	99.04 [γ-Aminobutyric acid (10 µmol/L)]
Glutamate (AMPA)	0.00	100.00 [(S)-AMPA (10 µmol/L)]
Glutamate (Kainate)	5.22	100.00 [Kainic acid (10 µmol/L)]
Glutamate (NMDA Agonist Site)	3.65	98.32 [L-Glutamic acid (10 µmol/L)]
Glutamate (NMDA Glycine Site)	8.13	100.00 [MDL105,519 (10 µmol/L)]
Glutamate (NMDA Phencyclidine Site)	3.31	100.00 [(+)-MK-801 (10 µmol/L)]
Glycine (Strychnine Sensitive)	0.35	100.00 [Strychnine (10 µmol/L)]
Histamine H1 (Human)	5.88	100.00 [Pyrilamine (10 µmol/L)]
Histamine H2 (Human)	10.32	94.17 [Cimetidine (10 µmol/L)]
Histamine H3 (Human)	15.97	100.00 [(R)(-)-α-Methylhistamine (10 µmol/L)]
D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphate	0.00	98.17 [D-myo-Inositol-1,4,5-triphosphate (10 µmol/L)]
Insulin	0.00	100.00 [Insulin (1 µmol/L)]
K Channel KA	0.00	98.98 [α-Dendrotoxin (1 µmol/L)]
K Channel KATP	0.00	99.87 [Glybenclamide (10 µmol/L)]
K Channel SkCa	2.58	97.21 [Apamin (10 µmol/L)]
Leukotriene B4 (Human)	3.31	95.57 [Leukotriene B4 (1 µmol/L)]
Muscarinic (Non-selective)	0.51	100.00 [Atropine (10 µmol/L)]

Data are expressed as the mean values of duplicate samples.

(続く)

2.6.3.3.1 *In Vitro* Selectivity Study of Naldemedine Tosylate Evaluated in Various Receptor, Channel, and Transporter Binding and Enzyme Assays
(続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Inhibition effect (% inhibition) of naldemedine and positive control on radioligand binding to various receptors, channels, and transporters and on enzymes (Continued)		
Assay Name	Naldemedine tosylate	Positive control
Na Channel Site 2	41.68	100.00 [Dibucaine (10 µmol/L)]
Neurokinin NK1 (Human)	0.00	99.83 [L-703,606 (10 µmol/L)]
Norepinephrine Transporter (Human)	1.09	100.00 [Desipramine (10 µmol/L)]
Nicotonic Ni	15.96	98.06 [(±)-Nicotine (10 µmol/L)]
Opiate (Non-selective)	100.00	99.46 [Naloxone (10 µmol/L)]
Opiate ORL1 (Human)	42.69	100.00 [Orphanin FQ (10 µmol/L)]
Platelet Activating Factor	0.00	100.00 [1- <i>O</i> -Palmityl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (10 µmol/L)]
Serotonin 5HT1A (Human)	0.35	99.36 [Serotonin (10 µmol/L)]
Serotonin 5HT2A (Human)	0.00	98.05 [Ketanserin (10 µmol/L)]
Serotonin 5HT2B (Human)	11.35	100.00 [Serotonin (10 µmol/L)]
Serotonin 5HT2C (Human)	0.88	99.03 [Mianserin (10 µmol/L)]
Serotonin 5HT3 (Human)	1.01	100.00 [MDL72222 (10 µmol/L)]
Sigma σ1	8.54	100.00 [(+)-Pentazocine (10 µmol/L)]
Sigma σ2	1.49	99.21 [Haloperidol (10 µmol/L)]
Testosterone (Human)	1.03	97.94 [Testosterone (10 µmol/L)]
Vasopressin V1	0.00	100.00 [[Arg ⁸]-Vasopressin (10 µmol/L)]
Vasoactive Intestinal Polypeptide 1 (Human)	8.84	100.00 [Vasoactive Intestinal Polypeptide (1 µmol/L)]
Cyclooxygenase-1 (Ovine)	0.00	98.21 [SC-560 (10 µmol/L)]
Cyclooxygenase-2 (Human)	0.00	99.75 [DuP-697 (10 µmol/L)]
Nitric Oxide Synthase (Rat)	0.00	98.33 [N ^G -nitro-L-arginine (100 µmol/L)]
Acetylcholinesterase (Eel)	33.71	100.00 [Eserine (10 µmol/L)]
Monoamine Oxidase-A	6.59	97.77 [Clogyline (10 µmol/L)]
Monoamine Oxidase-B	0.00	93.46 [Ro16-6491 (100 µmol/L)]
Protein Kinase C α	5.38	95.64 [Staurosporine (10 µmol/L)]
Protein Kinase C β1	4.39	96.50 [Staurosporine (10 µmol/L)]
Protein Kinase C β2	2.07	96.45 [Staurosporine (10 µmol/L)]
Data are expressed as the mean values of duplicate samples.		
Study Number [Location in CTD]	R-297995-EF-081-N (CRO Study No. [REDACTED] 3795-G) [4.2.1.2-01]	

2.6.3.3.2 Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Analgesia in Rat Tail-Flick Test

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crlj:WI						
Gender and No. per Group	Male and n = 10/Group						
Feed Condition	Fasted						
Vehicle/Formulation	0.5% methylcellulose aqueous solution/Suspension						
Method of Administration	Single oral administration						
Dose (mg/kg, as free)	1, 3, 10, 30						
Reference substance (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	MNTX (5% Xylitol/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 1, 3, 10, 30 mg/kg])						
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (6 mg/kg) or saline						
Evaluation item	Normalized latency (second) = [Post-dose latency (second)] - [Baseline latency (second)]						
Evaluation method	The nociceptive threshold was evaluated in all groups by tail-flick method. Thermal stimulation (infrared rays) was applied to a portion of the tail. On the training day, tail withdrawal latency was measured in 2 trials per each animal. On the test day, baseline latency was calculated from the average of 3 trials, and the rats those showed the latency of 4 to 6 seconds were used for the test. The animals, which could not meet the criteria in 2 of 3 trials or moved the body during the measurement of latency, were excluded. The evaluation of naldemedine tosylate and MNTX was calculated from the average of 2 trials. A cut-off time of 20 seconds was used to prevent tissue damage. Naldemedine tosylate, MNTX, or vehicle was administered at 1 hour before the tail-flick test. Morphine or saline was administered at 45 minutes before the tail-flick test.						
Results							
Substance	Dose (mg/kg)	Treatment	Normalized latency (second) ^(a)	Substance	Dose (mg/kg)	Treatment	Normalized latency (second) ^(a)
Naldemedine tosylate	Vehicle	Saline	0.10 – 4.78	MNTX	Vehicle	Saline	-0.53 – 1.00
	Vehicle	Morphine	14.60 – 15.57		Vehicle	Morphine	14.93 – 15.53
	1	Morphine	14.00 – 15.83		1	Morphine	14.70 – 15.57
	3	Morphine	14.37 – 15.60		3	Morphine	14.70 – 15.80
	10	Morphine	14.70 – 15.43		10	Morphine	14.63 – 15.90
	30	Morphine	14.53 – 15.50		30	Morphine	2.52 – 15.47
	30	Saline	-0.45 – 2.10		30	Saline	-0.68 – 1.38
^(a) Data are expressed as "the minimum value – the maximum value."							
Study number [Location in CTD]		R-297995-EB-072-N [4.2.1.2-02]					

2.6.3.3.3 Time-Course of Anti-Analgesic Effect of Naldemedine Tosylate in Rat Tail-Flick Test

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crlj:WI
Gender and No. per Group	Male and n = 10 – 11/Group at each time-point
Feed Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension
Method of Administration	Single oral administration
Dose (mg/kg, as free)	3, 5, 7, 10, 30
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (6 mg/kg) or saline
Evaluation item	Normalized latency
Evaluation method	The nociceptive threshold was evaluated in all groups by tail-flick method. Thermal stimulation (infrared rays) was applied to a portion of the tail. Measurements for training and baseline tail withdrawal latency were performed on the day before the test substance. Baseline latency was calculated from the average of 3 trials, and the rats those showed the baseline latency of 4 to 6 seconds were used for the test. The animals, which could not meet the criteria in 2 or 3 of 3 trials or moved the body during the measurement of latency, were excluded. Naldemedine tosylate or vehicle was administered 1, 2, 4, 6, 8, or 24 hours before the tail-flick test. Morphine or saline was administered 45 minutes before the tail-flick test. The tail withdrawal latency was measured twice with an interval of 9 minutes in each rat, and individual sets of animals were used in each time point. A cut-off time of 20 seconds was used to prevent tissue damage.

(続く)

2.6.3.3.3 Time-Course of Anti-Analgesic Effect of Naldemedine Tosylate in Rat Tail-Flick Test (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results								
Substance	Dose (mg/kg)	Treatment	Normalized latency (second) ^(a)					
			1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr	24 hr
Naldemedine tosylate	Vehicle	Saline	1.82 (0.85 – 2.90)					
	Vehicle	Morphine	15.20 ** (14.77 – 15.60)	14.97 ** (14.77 – 15.57)	15.10 ** (14.73 – 15.57)	15.17 ** (14.93 – 15.40)	15.50 ** (15.17 – 15.70)	15.20 ** (14.77 – 15.30)
	3	Morphine	15.27 (14.73 – 15.67)	15.50 (14.57 – 15.57)	15.43 (15.20 – 15.67)	15.40 (15.07 – 15.70)	15.03 (14.70 – 15.47)	15.00 (14.70 – 15.50)
	5	Morphine	15.50 (15.00 – 15.83)	15.13 (14.67 – 15.53)	15.30 (14.83 – 15.50)	15.23 (14.93 – 15.60)	15.20 (14.83 – 15.37)	15.23 (14.70 – 15.37)
	7	Morphine	15.13 (14.60 – 15.77)	15.13 (14.83 – 15.83)	15.37 (15.00 – 15.60)	15.00 (14.50 – 15.63)	15.33 (15.17 – 15.53)	15.07 (14.77 – 15.23)
	10	Morphine	15.03 (14.80 – 15.60)	15.07 (14.30 – 15.77)	14.50 (9.17 – 15.30)	10.52 [†] (5.87 – 14.87)	14.60 (11.65 – 15.27)	14.87 (14.23 – 15.67)
	30	Morphine	15.30 (14.63 – 15.67)	14.17 (5.02 – 15.23)	3.65 ^{††} (2.77 – 4.87)	4.82 ^{††} (3.77 – 15.63)	4.50 ^{††} (4.23 – 5.47)	14.57 (11.40 – 15.10)
<p>The number of animals per group at each time-point was 11 except for the vehicle + morphine group 4, 6, and 8 hours post-dose (n = 10). ^(a) Data are expressed as the median. In parentheses, "the first quartile – the third quartile" data are shown. ** P < 0.01 vs the 1-hour data of the vehicle + saline group (Log-rank test). [†] P < 0.05, ^{††} P < 0.01 vs the vehicle + morphine group (Log-rank test followed by Dunn-Sidak method for multiplicity adjustments).</p>								
Study number [Location in CTD] S-297995-EB-181-N [4.2.1.2-03]								

2.6.3.3.4 Effects of Naldemedine Tosylate and Naloxone on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Analgesia in Rat Post-Operative Pain Model

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crlj:WI
Gender and No. per Group	Male and n = 10 – 12/Group at each time-point
Feed Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension
Method of Administration	Single oral administration
Dose (mg/kg, as free)	1, 3, 5, 7
Reference substance (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	Naloxone (Saline/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 0.1 mg/kg])
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (6 mg/kg) or saline
Evaluation item	Normalized latency
Evaluation method	Thermal stimulation (infrared rays) was applied to a portion of the plantar surface of hind paw, and the latency for the paw withdrawal response was measured. The withdrawal latency was the index of the analgesic effect. The data calculated as the normalized latencies [Post-dose paw withdrawal latency (second) – Pre-dose paw withdrawal latency (second)] and frequencies of cut-off (set to 20 seconds to prevent tissue damage) in each group were compared by statistical analyses. Naldemedine tosylate or vehicle was administered 1, 2, 4, 6, and 8 hours prior to the measurement at each time point. Naloxone was administered 1 hour prior to the measurement. Morphine or saline was administered 45 minutes prior to the measurement at each time point.

(続く)

2.6.3.3.4 Effects of Naldemedine Tosylate and Naloxone on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Analgesia in Rat Post-Operative Pain Model (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results							
Substance	Dose (mg/kg)	Treatment	Normalized latency (second) ^(a)				
			1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
Naldemedine tosylate	Vehicle	Saline	-1.23 (-2.00 – -0.10)	-0.55 (-1.50 – 1.30)	-0.65 (-1.60 – -0.20)	-0.33 (-1.45 – -0.60)	-0.30 (-1.30 – 0.55)
	Vehicle	Morphine	12.53 ** (4.75 – 13.35)	13.03 ** (5.20 – 14.05)	13.55 ** (12.15 – 14.45)	13.10 ** (12.40 – 14.90)	13.35 ** (12.45 – 14.45)
	1	Morphine	12.28 (2.20 – 13.35)	13.33 (12.25 – 14.10)	13.00 (12.40 – 13.85)	13.40 (12.70 – 14.10)	13.05 (5.30 – 14.30)
	3	Morphine	13.13 (8.90 – 14.05)	13.40 (13.15 – 13.65)	12.50 (5.70 – 13.40)	12.90 (3.45 – 14.40)	12.05 (5.65 – 13.70)
	5	Morphine	12.55 (9.05 – 14.15)	13.10 (8.45 – 14.15)	6.95 (4.35 – 12.80)	4.65 † (3.25 – 12.80)	12.70 (3.05 – 13.45)
	7	Morphine	12.45 (8.60 – 13.15)	12.30 (2.20 – 13.65)	5.38 † (4.20 – 10.13)	5.05 †† (3.10 – 6.80)	5.55 † (3.35 – 12.95)
Naloxone	0.1	Morphine	2.95 †† (2.05 – 4.35)				

The number of animals in each group is summarized in the following table:

Substance	Dose (mg/kg)	Treatment	Number of animals				
			1 hr	2 hr	4 hr	6 hr	8 hr
Naldemedine tosylate	Vehicle	Saline	10	10	11	10	10
	Vehicle	Morphine	10	10	11	10	11
	1	Morphine	10	10	11	10	11
	3	Morphine	10	10	11	11	11
	5	Morphine	11	10	11	11	11
7	Morphine	11	11	12	11	11	
Naloxone	0.1	Morphine	11				

^(a) Data are expressed as the median. In parentheses, "the first quartile – the third quartile" data are shown.

** P < 0.01 vs the vehicle + saline group (Log-rank test).

† P < 0.05, †† P < 0.01 vs the vehicle + morphine group (Log-rank test followed by Dunn-Šidák method for multiplicity adjustments).

‡ P < 0.01 vs the vehicle + morphine group (Log-rank test).

Study number [Location in CTD] | S-297995-EB-274-N [4.2.1.2-04]

2.6.3.3.5 *In Vivo* Opioid Receptor Occupancies by Naldemedine Tosylate in Rat Cerebral Cortex and Thalamus

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Rat/Crlj:WI
Gender and No. per Group	Male and n = 6 except for the control group at 1 hour post-dose (n = 4)/Group at each time-point
Feed Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension
Method of Administration	Single oral administration
Dose (mg/kg, as free)	3, 10, 30
Tracer	[³ H]Diprenorphine, a non-selective opioid antagonist (Specific radioactivity, 1850 GBq/mmol)
Evaluation items	Brain opioid receptor occupancy, Cerebral cortex, cerebellum, and plasma concentrations of naldemedine
Evaluation method	[³ H]diprenorphine was injected intravenously to rats at approximately 185 kBq/0.5 mL/rat 0.5, 3.5, 7.5, or 23.5 hours after a single oral administration of naldemedine tosylate, . Just before the scheduled time of sampling, the blood was collected to obtain the plasma under an anesthesia of isoflurane, and then the rat was immediately sacrificed by decapitation, and the brain was removed. Cerebral cortex, cerebellum, and thalamus were obtained by dissection of the brain. The radioactivity in the cerebral cortex, cerebellum, and thalamus was measured with a liquid scintillation analyzer. Specific binding in the cerebral cortex or thalamus was calculated subtracting the radioactivity concentration in the cerebellum from the radioactivity concentration in the cerebral cortex or thalamus. The receptor occupancy was calculated as follows: Receptor occupancy (%) = 100 × [1 - (specific binding in naldemedine tosylate-treated rats/mean specific binding in vehicle-treated rats)]. The cerebral cortex, cerebellum, and plasma concentrations of naldemedine were determined by a validated LC/MS/MS method.

(続く)

2.6.3.3.5 *In Vivo* Opioid Receptor Occupancies by Naldemedine Tosylate in Rat Cerebral Cortex and Thalamus (続き)

Test Article: Naldemedine Tosylate

Results					
Evaluation items	Naldemedine tosylate Dose (mg/kg)	Receptor occupancy (%)			
		1 hr	4 hr	8 hr	24 hr
Cerebral cortex	3	0.35 ± 21.53	-1.15 ± 22.18	-9.29 ± 37.05	-0.39 ± 9.00
	10	-7.06 ± 18.27	14.32 ± 11.17	27.79 ± 20.72	8.78 ± 7.02
	30	-8.45 ± 12.41	38.53 ± 11.25	57.09 ± 10.92	27.79 ± 15.41
Thalamus	3	-1.92 ± 23.05	3.98 ± 13.12	-0.90 ± 38.39	6.16 ± 16.77
	10	-15.85 ± 23.99	13.96 ± 11.39	27.98 ± 18.79	2.52 ± 8.07
	30	-21.84 ± 12.04	23.90 ± 8.56	34.60 ± 14.64	17.67 ± 14.10
Evaluation items	Naldemedine tosylate Dose (mg/kg)	Concentration of naldemedine (ng/mL)			
		1 hr	4 hr	8 hr	24 hr
Cerebral cortex	3	2.94 ± 0.99	3.40 ± 0.68	2.43 ± 0.72	1.20 ± 0.17
	10	9.69 ± 3.71	11.9 ± 3.3	7.88 ± 1.42	4.12 ± 0.44
	30	25.8 ± 12.3	28.5 ± 5.4	19.4 ± 4.2	8.49 ± 1.26
Cerebellum	3	8.14 ± 2.79	5.05 ± 0.49	1.78 ± 0.50	0.183 ± 0.043
	10	24.6 ± 10.3	20.1 ± 5.1	6.07 ± 1.49	0.387 ± 0.091
	30	58.2 ± 31.6	60.2 ± 12.3	20.5 ± 5.8	0.574 ± 0.093
Plasma	3	229 ± 98	104 ± 32	10.4 ± 5.6	0.104 ± 0.044
	10	950 ± 354	327 ± 123	39.7 ± 23.8	0.342 ± 0.055
	30	2590 ± 1170	1450 ± 531	177 ± 92.9	1.12 ± 0.30
Data are expressed as the mean ± standard deviation of 6 rats.					
Study number [Location in CTD]		S-297995-EB-257-N [4.2.1.2-05]			

2.6.3.3.6 Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Emesis in Ferrets

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Ferret/Marshall									
Gender and No. per Group	Male and n = 10/Group									
Feed Condition	Fasted									
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension									
Method of Administration	Single oral administration									
Dose (mg/kg, as free)	0.01, 0.03, 0.1, 0.3									
Reference substance (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	MNTX (5% Xylitol/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg])									
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (0.6 mg/kg)									
Evaluation items	Number of animals displaying signs of retching, vomiting, and emesis, ED ₅₀ , ED ₈₀									
Evaluation method	Morphine was subcutaneously administered to animals 30 minutes after a single oral administration of naldemedine tosylate or its vehicle, or subcutaneous injection of MNTX or its vehicle and emetic responses were monitored for 30 minutes. Signs of emesis were classified into retching (abdominal rhythmical constriction) and vomiting (act of excreting vomits or similar behavior). Each ED ₅₀ and ED ₈₀ values were calculated from a logistic model with presence/absence of incidence as the response variable, and treatment and affiliate as the explanatory variables.									
Results										
Substances	Doses (mg/kg)	Retching			Vomiting			Emesis		
		Responder/ Used	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)	Responder/ Used	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)	Responder/ Used	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)
Naldemedine tosylate	Vehicle	9/10	0.033	0.119	9/10	0.029	0.095	9/10	0.033	0.119
	0.01	9/10			9/10			9/10		
	0.03	4/10			4/10			4/10		
	0.1	2/10			1/10			2/10		
	0.3	1/10			1/10			1/10		
MNTX	Vehicle	10/10	0.694	1.175	8/10	0.269	1.620	10/10	0.694	1.175
	0.03	10/10			6/10			10/10		
	0.1	10/10			10/10			10/10		
	0.3	9/10			6/10			9/10		
	1	3/10			2/10			3/10		
	3	0/10			0/10			0/10		
Study number [Location in CTD]		R-297995-EF-082-N (CRO Study No. 6250) [4.2.1.2-06]								

2.6.3.3.7 Duration of Effects of Naldemedine Tosylate and MNTX on Subcutaneously Administered Morphine-Induced Emesis in Ferrets

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Ferret/Marshall				
Gender and No. per Group	Male and n = 10/Group				
Feed Condition	Fasted				
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension				
Method of Administration	Single oral administration				
Doses (mg/kg, as free)	0.3				
Reference substance (Vehicle/Formulation, Method of Administration)	MNTX (5% Xylitol/Solution, Single subcutaneous administration [Dose: 3 mg/kg])				
Treatment	Subcutaneous treatment with morphine (0.6 mg/kg)				
Evaluation item	Inhibition rate of the morphine-induced emetic responses				
Evaluation method	Morphine was subcutaneously given 0.5, 4, 6, or 8 hours after a single oral administration of naldemedine tosylate or a single subcutaneous injection of MNTX. The emetic responses were monitored for 30 minutes after the morphine administration, and the anti-emetic effect was calculated based on the ratio of the number of animals whose emetic response was completely inhibited.				
Results					
Substances	Doses (mg/kg)	Inhibition rate of the morphine-induced emetic responses (%) [Responder/Used]			
		0.5 hr	4 hr	6 hr	8 hr
Naldemedine tosylate	0.3	100 [0/10]	100 [0/10]	100 [0/10]	80 [2/10]
MNTX	3	100 [0/10]	50 [5/10]	40 [6/10]	10 [9/10]
Study number [Location in CTD]	R-297995-EF-083-N (CRO Study No. 6251) [4.2.1.2-07]				

2.6.3.3.8 Effect of Naldemedine Tosylate Evaluated on Orally Administered Morphine-Induced Emesis in Ferrets

Test Article: Naldemedine Tosylate

Species/Strain	Ferret/Marshall									
Gender and No. per Group	Male and n = 10/Group									
Feed Condition	Fasted									
Vehicle/Formulation	0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution/Suspension									
Method of Administration	Single oral administration									
Dose (mg/kg, as free)	0.01, 0.03, 0.1, 0.3									
Treatment	Oral treatment with morphine (1.2 mg/kg)									
Evaluation item	Number of animals displaying signs of retching, vomiting, and emesis, ED ₅₀ , ED ₈₀									
Evaluation method	Morphine was orally given 30 minute after a single oral administration of naldemedine tosylate or vehicle and emetic responses were monitored for 90 minutes. Signs of emesis were classified into retching (abdominal rhythmical constriction) and vomiting (act of excreting vomits or similar behavior). Each ED ₅₀ and ED ₈₀ values were calculated from a logistic model with presence/absence of incidence as the response variable, and treatment and affiliate as the explanatory variables.									
Results										
Substance	Doses (mg/kg)	Retching			Vomiting			Emesis		
		Responder/ Used	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)	Responder/ Used	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)	Responder/ Used	ED ₅₀ (mg/kg)	ED ₈₀ (mg/kg)
Naldemedine tosylate	Vehicle	10/10	0.016	0.023	8/10	0.013	0.020	10/10	0.016	0.023
	0.01	9/10			7/10			9/10		
	0.03	0/10			0/10			0/10		
	0.1	0/10			0/10			0/10		
	0.3	0/10			0/10			0/10		
Study number [Location in CTD]		S-297995-EF-253-N (CRO Study No. 7525) [4.2.1.2-08]								

2.6.3.3.9 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate Metabolites and Naloxone against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors

Test Article: Nor-naldemedine, Naldemedine 3-G,
Naldemedine 6-G, Naldemedine-CA,
Benzamidine

Receptors	Recombinant human mu opioid receptor (expressed in CHO-K1 cells), Recombinant human delta opioid receptor (expressed in HEK-293 cells), Guinea pig kappa opioid receptor (membranes prepared from the cerebrum or cerebellum of guinea pig [male, Slc:Hartley] by centrifugation method)
Radioligands	[³ H]-DAMGO for binding assay against mu opioid receptor, [³ H]-DADLE for binding assay against delta opioid receptor, [³ H]-U69593 for binding assay against kappa opioid receptor, [³⁵ S]-GTPγS for functional assay
Concentration (nmol/L)	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000
Reference substance (Concentration)	Naloxone (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nmol/L)
Vehicle	DMSO
Evaluation items	K _i , IC ₅₀ , K _b , E _{max} , EC ₅₀
Evaluation method	Bindings of nor-naldemedine, naldemedine 3-G, naldemedine 6-G, naldemedine-CA, benzamidine, and naloxone to human mu, human delta, and guinea pig kappa opioid receptors were investigated. Mu, delta and kappa binding sites were labeled by using [³ H]-DAMGO, [³ H]-DADLE, and [³ H]-U69593, respectively. The K _i values were calculated as described above. Functional assays against human mu, human delta, and guinea pig kappa opioid receptors were also conducted. The antagonistic activities against these opioid receptors were determined by K _b values which were calculated as described above. The agonistic activities of test substances in [³⁵ S]-GTPγS binding were represented as the E _{max} and EC ₅₀ values. Basal activities were determined as described above. DAMGO, [Met ⁵]-enkephalin, and U-50488H were used as the assay positive control for mu, delta and kappa receptor, respectively, and utilized as the 100% efficacy control.

(続く)

2.6.3.3.9 *In Vitro* Binding and Functional Assays of Naldemedine Tosylate Metabolites and Naloxone against Human Mu, Human Delta, and Guinea Pig Kappa Opioid Receptors (続き)

Test Article: Nor-naldemedine, Naldemedine 3-G,
Naldemedine 6-G, Naldemedine-CA,
Benzamidine

Results						
Substances	Receptors	Binding affinity	Antagonistic activity		Agonistic activity	
		K _i (nmol/L)	IC ₅₀ (nmol/L)	K _b (nmol/L)	E _{max} (%) ^(a)	EC ₅₀ (nmol/L)
Nor-naldemedine	Mu (human)	1.95 ± 0.28	7462.89 ± 2537.11	31.65 ± 10.76	32.98 ± 3.78	> 10000
	Delta (human)	10.23 ± 3.01	2405.25 ± 228.07	112.36 ± 10.65	79.90 ± 8.77	96.04 ± 20.52
	Kappa (guinea pig)	71.66 ± 47.51	1697.03 ± 33.00	80.14 ± 1.56	-22.16 ± 9.05	> 10000
Naldemedine 3-G	Mu (human)	191.78 ± 33.39	> 10000	> 42.41	-3.32 ± 0.69	> 10000
	Delta (human)	158.59 ± 38.14	6446.31 ± 2369.15	301.13 ± 110.67	-3.90 ± 5.53	> 10000
	Kappa (guinea pig)	1100.16 ± 444.57	> 10000	> 472.22	7.51 ± 2.89	> 10000
Naldemedine 6-G	Mu (human)	9.79 ± 1.03	3660.89 ± 231.76	15.53 ± 0.98	-5.36 ± 0.68	> 10000
	Delta (human)	0.51 ± 0.06	14.95 ± 4.28	0.70 ± 0.20	-3.75 ± 7.35	> 10000
	Kappa (guinea pig)	112.11 ± 21.27	1090.91 ± 115.64	51.52 ± 5.46	-3.93 ± 7.24	> 10000
Naldemedine-CA	Mu (human)	7.38 ± 1.10	3326.64 ± 764.21	14.11 ± 3.24	-6.01 ± 1.08	> 10000
	Delta (human)	2.05 ± 0.96	130.87 ± 28.15	6.11 ± 1.32	-9.86 ± 2.84	> 10000
	Kappa (guinea pig)	18.59 ± 15.01	2770.96 ± 316.24	130.85 ± 14.93	-8.08 ± 16.73	> 10000
Benzamidine	Mu (human)	> 2644.04	ND	ND	ND	> 10000
	Delta (human)	> 2942.93	ND	ND	ND	> 10000
	Kappa (guinea pig)	> 4012.08	ND	ND	ND	> 10000
Naloxone	Mu (human)	1.23 ± 0.18	261.90 ± 135.10	1.11 ± 0.57	5.94 ± 3.98	> 1000
	Delta (human)	93.80 ± 24.91	> 1000	> 46.71	1.47 ± 9.31	> 1000
	Kappa (guinea pig)	6.38 ± 2.47	> 1000	> 47.22	-17.32 ± 3.87	> 1000
<p>ND, Not determined because benzamidine did not show the binding affinities to mu, delta, and kappa opioid receptors.</p> <p>Each value represents the mean ± S.E.M. from 3 independent experiments carried out in duplicate except for the followings. The IC₅₀ and K_b values of nor-naldemedine to mu and delta opioid receptors represent the mean ± S.E.M. from 2 independent experiments carried out in duplicate. The EC₅₀ values of nor-naldemedine were calculated by excluding the values at 3000 and 10000 nmol/L, and the E_{max} values represent the mean ± S.E.M. from 2 independent experiments carried out in duplicate.</p> <p>^(a) Values for nor-naldemedine to mu, delta, and kappa opioid receptors at 300, 1000, and 10000 nmol/L, respectively. Values for naldemedine 3-G, naldemedine 6-G, and naldemedine-CA at 10000 nmol/L and for naloxone at 1000 nmol/L.</p>						
Study number [Location in CTD]		S-297995-EB-135-N [4.2.1.2-09]				

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 *In Vitro* Effects of Naldemedine Tosylate on Myocardial Action Potential in Isolated Guinea Pig Papillary Muscle

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Preparation	Method of Admin.	Concentration (μmol/L, as free)	No. of Preparations per Group	Noteworthy Findings	Good Laboratory Practice (GLP) Compliance	Study Number [Location in CTD]
Cardio-vascular system	Papillary muscles isolated from guinea pig	<i>In vitro</i>	0.3, 3, 30	5	Naldemedine tosylate prolonged the action potential duration at 90% of repolarization (APD ₉₀) and difference between APD ₉₀ and APD ₃₀ in isolated guinea pig papillary muscles by more than 10% at 30 μmol/L.	Yes	R-297995-SF-078-L (CRO Study No. ■080434) [4.2.1.3-01]

2.6.3.4.2 *In Vitro* Effect of Naldemedine Tosylate on Potassium Current in Cells Expressing HERG Channels

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Cells	Method of Admin.	Concentrations ($\mu\text{mol/L}$, as free)	No. of Cells per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number [Location in CTD]
Cardio-vascular system	HEK293 cells expressing hERG	<i>In vitro</i>	0.3, 3, 30	5	Naldemedine tosylate inhibited potassium currents (hERG currents) by 3.2%, 5.6%, and 33.1% compared to the pre-application values (corrected for the vehicle value) at 0.3, 3, and 30 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The IC_{50} was estimated to be more than 30 $\mu\text{mol/L}$.	Yes	R-297995-SF-079-L (CRO Study No. ■080435) [4.2.1.3-02]

2.6.3.4.3 Effects of Naldemedine Tosylate on Central Nervous System in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin. (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg, as free)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number [Location in CTD]
Central nervous system	Rat/ Crl:CD(SD)	Oral (0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution)	30, 100, 300	Male/6	No naldemedine tosylate treatment-related findings were observed in general behavior and neurobehavioral function at any time point up to 8 hours post-dose at 30, 100, or 300 mg/kg.	Yes	R-297995-SF-075-L (CRO Study No. [REDACTED]080431) [4.2.1.3-03]

2.6.3.4.4 Effects of Naldemedine Tosylate on Respiratory System in Rats

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin. (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg, as free)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number [Location in CTD]
Respiratory system	Rat/ Crl:CD(SD)	Oral (0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution)	30, 100, 300	Male/8	Naldemedine tosylate had no effects on respiratory rate, tidal volume, or minute volume at any time point up to 8 hours post-dose at 30, 100, or 300 mg/kg.	Yes	R-297995-SF-077-L (CRO Study No. ■080433) [4.2.1.3-04]

2.6.3.4.5 Effects of Naldemedine Tosylate on Cardiovascular System in Dogs

Test Article: Naldemedine Tosylate

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin. (Vehicle/ Formulation)	Doses (mg/kg, as free)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number [Location in CTD]
Cardio-vascular system	Dog/ Beagle	Oral (0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution)	10, 30, 100	Male/4	Naldemedine tosylate had no effects on blood pressure, heart rate, or electrocardiogram parameters at any time point up to 8 hours post-dose at 10, 30, or 100 mg/kg. Naldemedine tosylate did not induce arrhythmia up to 8 hours post-dose at 10, 30, or 100 mg/kg.	Yes	R-297995-SF-076-L (CRO Study No. ■080432) [4.2.1.3-05]
Toxicokinetics							
Dose (mg/kg)	Maximum concentration (C_{max}) (µg/mL)		Time to maximum concentration (T_{max}) (hr)		Area under the concentration-time curve from 0 to 24 hours (AUC_{0-24hr}) (µg·hr/mL)		
10	6.86		1		21.85		
30	23.45		1		91.04		
100	35.70		1		182.70		

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験なし.