2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

小野薬品工業株式会社

目次

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表 3
2.6.1　緒言 3

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

オピカポンは，BIAL-Portela & C[a]., S.A.社で創製された長時間作用型 Catechol-*O*-methyltransferase（COMT）阻害剤であり，パーキンソン病のレボドパ治療において，症状の進行に伴って生じる日内変動（Wearing-off 現象）の改善を目的に開発された．

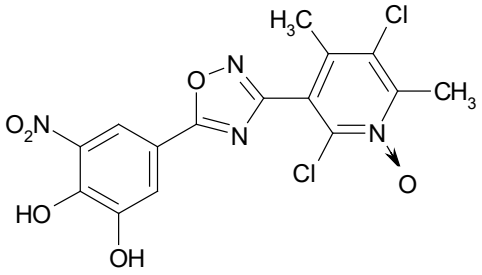
In vitro の薬理試験において，オピカポンは既存の COMT 阻害剤と比較して強力な COMT 阻害作用を有することが確認された．また，*in vivo* の薬理試験において，オピカポンは末梢の COMT 活性を持続的に阻害することで血漿中レボドパ濃度を持続させ，脳内へのレボドパの移行を向上させることが確認された．更に，臨床試験において，オピカポンは 1 日 1 回の投与により血漿中レボドパの曝露を持続させ，OFF 時間の短縮効果を示した．また，オピカポンは，*in vitro* 試験における肝細胞毒性がトルカポンに比べて弱く，毒性試験において高用量を長期間投与しても重篤な肝毒性を示唆する変化がないことに加え，臨床において既存の COMT 阻害剤であるトルカポンで発現した致死的な肝障害を認めなかった．以上より，持続的な COMT 阻害作用と高い安全性を特徴とするオピカポンは，既存の COMT 阻害剤の課題を克服し得る，優れた治療薬である．

オピカポンの化学名，構造式，効能・効果（案）及び用法・用量（案）を以下に記載する．

化学名：

2,5-Dichloro-3-[5-(3,4-dihydroxy-5-nitrophenyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-4,6-dimethylpyridine *N*-oxide

構造式：



効能・効果（案）：

レボドパ・カルビドパ又はレボドパ・ベンセラジド塩酸塩との併用によるパーキンソン病における症状の日内変動（wearing-off 現象）の改善

用法・用量（案）：

本剤は，レボドパ・カルビドパ又はレボドパ・ベンセラジド塩酸塩と併用する．通常，成人にはオピカポンとして 25mg を 1 日 1 回，レボドパ・カルビドパ又はレボドパ・ベンセラジド塩酸塩の投与前後及び食事の前後 1 時間以上あけて経口投与する．

2.6.2 薬理試験の概要文

小野薬品工業株式会社

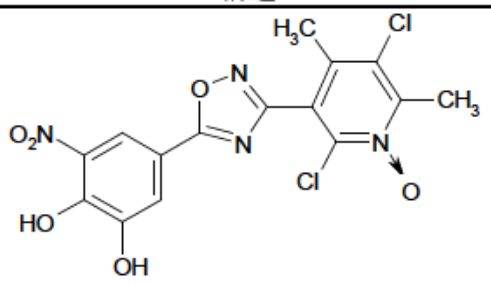
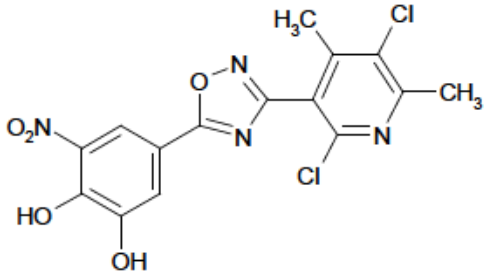
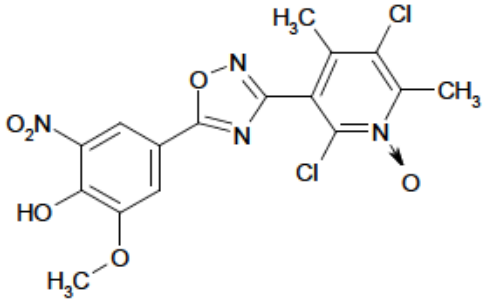
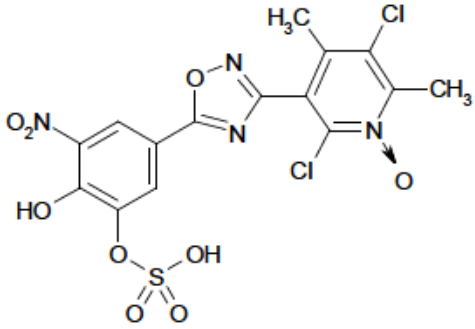
目次

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 6
2.6.2.3 副次的薬理試験 32
2.6.2.4 安全性薬理試験 33
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 38
2.6.2.6 考察及び結論 39

略号一覧

用語及び略号	内容あるいは日本語名称
3-OMD	3-*O*-メチルドパ
APA	活動電位振幅
APD	活動電位持続時間
APD_{30}	30%再分極時の活動電位持続時間
APD_{60}	60%再分極時の活動電位持続時間
APD_{90}	90%再分極時の活動電位持続時間
APT	活動電位三角化
AUC6h	時間 0 から 6 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUEC24h	時間 0 から 24 時間までの酵素活性－時間曲線下面積
Cmax	最高血漿中濃度
CMC	カルボキシメチルセルロース
COMT	Catechol-*O*-methyltransferase
DMSO	ジメチルスルホキシド
DOPAC	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPLC-ED	高速液体クロマトグラフィー／電機化学検出器
HPRT	ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ
HVA	ホモバニール酸
IC_{50}	50%阻害濃度
Kcat	代謝回転数
Ki	阻害定数
Kiapp	見かけの阻害定数
LC/MS	液体クロマトグラフィー／質量分析法
MB-COMT	膜結合型 catechol-*O*-methyltransferase
MPTP	1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン
PDE5A1	ホスホジエステラーゼ PDE5A1
Penh	気道抵抗
pH	水素イオン濃度指数
PP2A	セリン／スレオニン脱リン酸化酵素 PP2A
PPMRS	霊長類パーキンソン病運動症状評価尺度
QTcF	Fridericia 法で補正をした QT
QTcV	Van de Water 法で補正した QT
RMP	静止膜電位
S-COMT	細胞質可溶型 catechol-*O*-methyltransferase
TK	トキシコキネティクス
Tmax	最高血漿中濃度到達時間
TSPO	トランスロケータープロテイン 18 kDa
Vmax	活動電位最大立ち上がり速度
ZAP70	チロシンリン酸化酵素 ZAP70

関連化合物の一覧

名称	構造	説明及びその他の名称
オピカポン		BIA 9-1067 Opicapone
BIA 9-1079		オピカポンの *N*-オキシド還元体
BIA 9-1100		オピカポンの 3-*O*-メチル化体
BIA 9-1103		オピカポンの 3-*O*-硫酸抱合体
BIA 9-1104	[redacted]	[redacted]

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

有効性薬理試験において，オピカポンは遺伝子組み換えヒトS-COMT及びラット肝臓由来S-COMTを阻害し，その阻害定数（Ki）はそれぞれ0.02及び0.2 nmol/Lであった．オピカポンのヒト及びラットS-COMTに対する阻害様式は，強固に結合する機序（tight-binding 様式）であった．オピカポンは3 mg/kgでラットに単回経口投与したとき，投与後8時間まで肝臓のCOMTを阻害したが，脳のCOMTを阻害しなかった．レボドパ及びベンセラジド（12/3 mg/kg）を単回経口投与したときの血漿中及び脳内レボドパ濃度は，これらを投与する前にオピカポンを3 mg/kgで単回経口投与することで増加した．また，オピカポンは1，10及び100 mg/kg/日でサルに14日間反復経口投与したとき，初回投与後1時間から投与量に応じて赤血球COMT活性を阻害し，10及び100 mg/kg/日では最終投与後24時間でも有意に阻害した．オピカポンを100 mg/kg/日でサルに14日間反復経口投与し，最終投与後23時間にレボドパ及びベンセラジド（12/3 mg/kg）を単回経口投与すると，オピカポンを投与しない場合と比較して血漿中レボドパの曝露量が増加し，線条体中レボドパ曝露も増加傾向がみられた．MPTP誘発サルパーキンソン病モデルにおいて，オピカポンは100 mg/kg/日で14日間，単独で反復経口投与したとき，パーキンソン様症状及び自発運動量に影響を及ぼさなかった．一方，レボドパ及びベンセラジドをオピカポン投与後12時間に経口投与したときは，レボドパ及びベンセラジド（18/4.5 mg/kg及び24/6 mg/kg）によるパーキンソン様症状及び自発運動量に対する作用をオピカポンが増強した．

副次的薬理試験において，オピカポンはPP2A及びZAP70を阻害し，TSPOへのリガンドの結合を阻害した．ヒトの主代謝物であるBIA 9-1103は，PDE5A1を阻害し，TSPOへのリガンドの結合を阻害した．しかし，オピカポン及びBIA 9-1103の阻害濃度は，ヒトにオピカポン25 mg/日を投与したときのオピカポン及びBIA 9-1103のCmaxより高く，蛋白結合率を加味すると，臨床で問題となる可能性は低いと推察された．

安全性薬理試験において，中枢神経系ではラットの一般症状及び行動観察において30 mg/kgで活動性亢進などの軽度の興奮作用，300 mg/kg以上で活動性低下や筋緊張低下などの鎮静作用及び頭部攣縮が認められ，その無影響量は30 mg/kg未満であった．また，呼吸系ではラットにおいて300 mg/kg以上で呼吸数の減少，吸気時間，呼気時間及び弛緩時間の延長が認められ，その無影響量は30 mg/kgであった．オピカポンの中枢移行性は低く，ラットを用いた26週間までの反復投与毒性試験では最高投与量の1000 mg/kgまで中枢神経系及び呼吸系への影響を示唆する変化は認められていないことから，これらの中枢神経系及び呼吸系への影響はごく軽度であり，臨床において問題となる可能性は低いと考えられた．心血管系では，オピカポンのhERGチャネル電流に対するIC_{50}値は160.7 μ g/mLであり，イヌの摘出

心筋の活動電位に対して最高濃度の 10μg/mL まで影響しなかった．また，オピカポンは最高投与量の 600 mg/kg まで覚醒イヌの血圧，心拍数及び心電図に影響しなかった．その他，腎／泌尿器系及び胃腸管に対する作用を検討した結果，オピカポンはラットにおいて最高投与量の 1000 mg/kg まで尿量，尿 pH，尿中クレアチニン及び尿中電解質，並びに消化管輸送能に対する影響を示さなかった．

ヒトの主代謝物である BIA 9-1103 は，30μg/mL まで hERG チャネル電流に影響しなかったが，10μg/mL でイヌ摘出心筋の活動電位持続時間を延長し，その無影響量は 3μg/mL であった．BIA 9-1079 についても各種の安全性薬理試験を実施したが，ヒトにオピカポン 25 mg/日を投与したときの血漿中 BIA 9-1079 濃度は多くの時点で定量下限未満であった［2.7.6.15］．以上から，臨床における BIA 9-1103 及び BIA 9-1079 の安全性の懸念はないと考えられた．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

COMT は細胞質可溶型の S-COMT と膜結合型の MB-COMT の 2 つの分子種が存在する．細胞膜への固定を担う N 末端アミノ酸配列の有無が両者の相違点であるが，メチル基供与体である S-アデノシルメチオニン（SAM）への親和性やマグネシウムへの依存性は同程度である．また，末梢におけるタンパク発現量及び酵素活性は S-COMT の方が MB-COMT よりも高く，レボドパの代謝には主として S-COMT が寄与すると考えられている [1)]．したがって，オピカポンの COMT 阻害作用は，すべてヒト又はラット由来の S-COMT を用いて評価した．

2.6.2.2.1.1 ヒト COMT に対するオピカポンの阻害作用

［評価資料：4.2.1.1-1］

1） ヒト COMT 阻害に対するオピカポンの前処置の影響

［目的］

オピカポンのヒト S-COMT に対する時間依存的な阻害作用を検討した．

［方法］

大腸菌に発現させた遺伝子組み換えヒト S-COMT を酵素溶液として用いた．基質としてアドレナリン（1000μmol/L）を用い，37℃で 10 分間反応させたときに生成するメタネフリンを HPLC-ED で定量し，酵素活性の指標とした．オピカポン（30，60 及び 100 nmol/L）あるいはトルカポン（30，60 及び 100 nmol/L）は，酵素反応開始前 0～180 分に反応液と混合した．媒体は 0.1%DMSO とした．

［結果］

オピカポンの S-COMT 阻害作用は，トルカポンと同様に前処置時間の影響を受けなかった（図 2.6.2.2.1.1-1）．

［結論］

オピカポンの S-COMT 阻害作用は時間依存的でなかった．

2)　COMT によるオピカポンのメチル化

［目的］

COMT はカテコールを基質とし，3 及び [redacted] を生成する．カテコール骨格を有するオピカポンが COMT の基質となるか検討した．

［方法］

大腸菌に発現させた遺伝子組み換えヒト S-COMT を酵素溶液として用いた．オピカポン（50 μmol/L）と S-COMT（1.46 mg/mL）を混合し，37℃で 0，30，60 及び 120 分間反応させたときの生成物を LC/MS で定量分析した．

［結果］

オピカポンと COMT を反応させた結果，反応時間に応じてオピカポンのカテコール骨格の水酸基がメチル化され，3-*O*-メチル化体である BIA 9-1100 及び [redacted] である BIA 9-1104 が生成された（図 2.6.2.2.1.1-2）．

［結論］

オピカポンは COMT の阻害剤であると同時に，自らが COMT によってメチル化修飾を受ける基質であった．

3)　オピカポンのヒト COMT 阻害様式

［目的］

オピカポンのヒト S-COMT に対する阻害様式を検討した．

［方法］

大腸菌に発現させた遺伝子組み換えヒト S-COMT を酵素溶液として用いた．基質としてアドレナリン（1000 μmol/L）を用い，37℃で 10 分間反応させたときに生成するメタネフリンを HPLC-ED で定量し，酵素活性の指標とした．S-COMT 濃度は 0.005～0.04 mg/mL の 10 濃度を設定した．オピカポン（60，100 及び 140 nmol/L）あるいはトルカポン（60，100 及び 140 nmol/L）は，アドレナリン添加前 5 分に反応液と混合した．媒体は 0.03%DMSO とした．S-COMT 濃度（X 軸），並びにオピカポン及びトルカポン各濃度での反応速度（Y 軸）から

Ackermann-Potter プロットを作成し，阻害様式を検討した．また，反応速度論パラメーターを算出した．

［結果］

Ackermann-Potter プロットにおいて，オピカポン及びトルカポンはヒト S-COMT に対して tight-binding 様式の阻害作用を示した（図 2.6.2.2.1.1-3）．また，オピカポン及びトルカポンの阻害定数 Ki は，それぞれ 0.02 及び 0.2 nmol/L であった（表 2.6.2.2.1.1-1）．

［結論］

オピカポンは，ヒト S-COMT を tight-binding 様式で阻害した．また，オピカポンのヒト S-COMT 阻害作用はトルカポンに比べて 10 倍強かった．

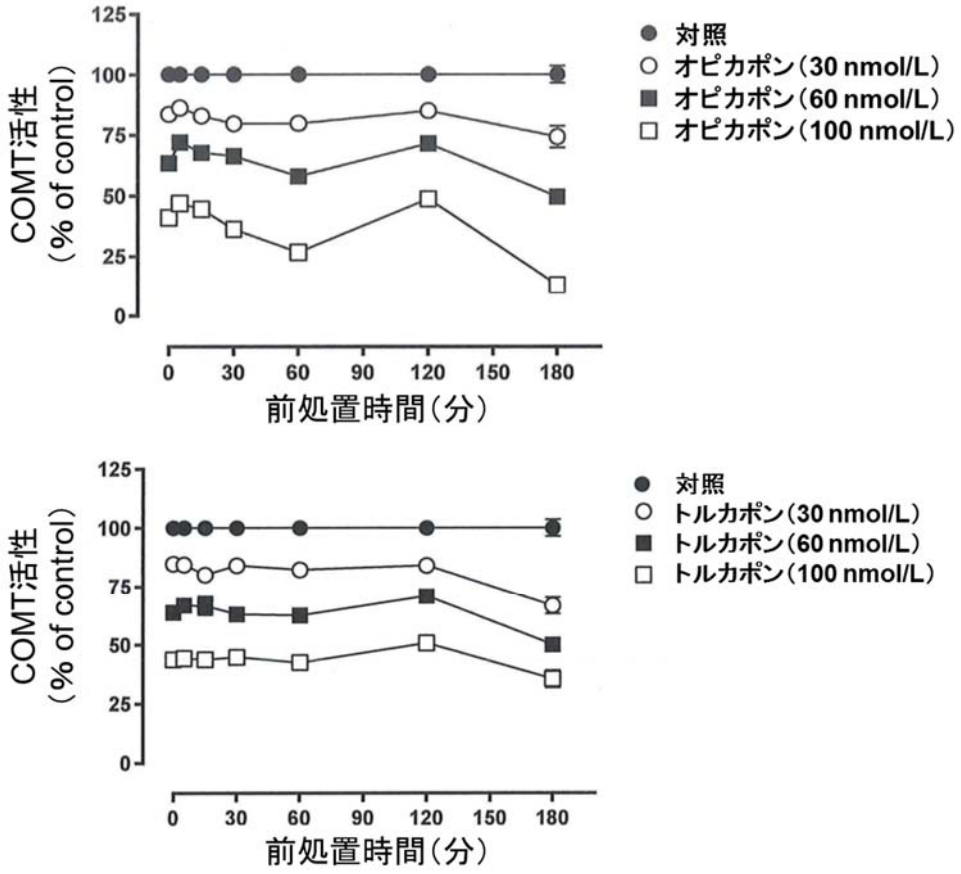


図 2.6.2.2.1.1-1　ヒト COMT 阻害に対するオピカポン及びトルカポンの前処置の影響
データは COMT 活性（% of control）を平均値で示した．

2.6.2 薬理試験の概要文
オピカポン

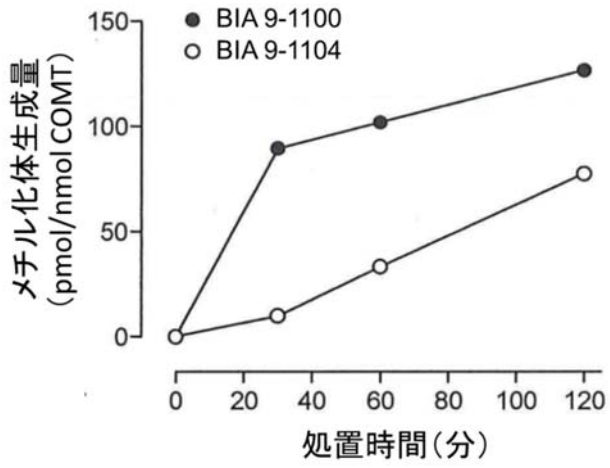


図 2.6.2.2.1.1-2　COMT によるオピカポンのメチル化
データはメチル化体生成量（pmol/nmol COMT）を平均値で示した.

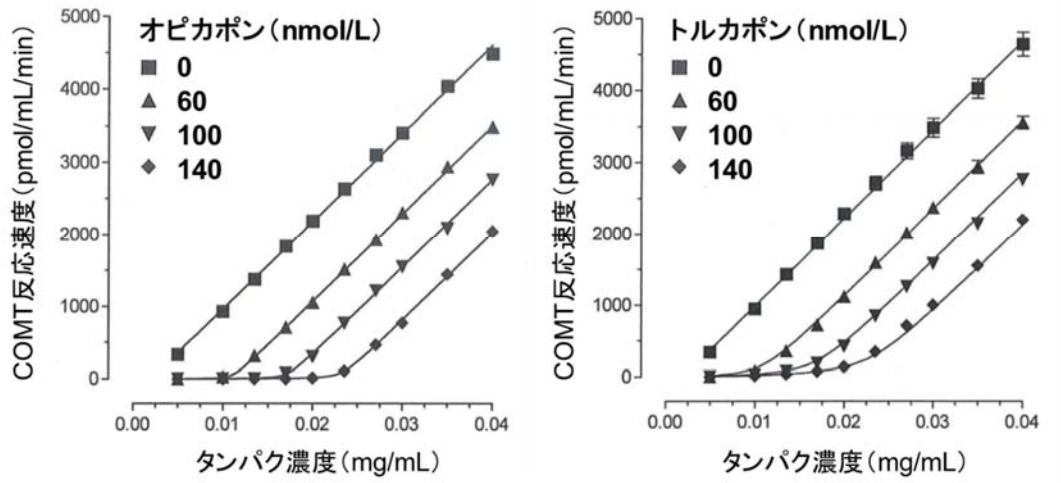


図 2.6.2.2.1.1-3　オピカポン及びトルカポンのヒト COMT 阻害様式（Ackermann-Potter プロット）
データは COMT 反応速度（pmol/mL/min）を平均値で示した.

表 2.6.2.2.1.1-1　オピカポンとトルカポンの反応速度論パラメーター

	オピカポン	トルカポン
Kcat（min^{-1}）	20	20
ε	6570	6645
Kiapp（nmol/L）	0.2	1.8
Ki（nmol/L）	0.02	0.2

Kcat：代謝回転数，ε：モル等量，Kiapp：見かけの阻害定数，Ki：阻害定数

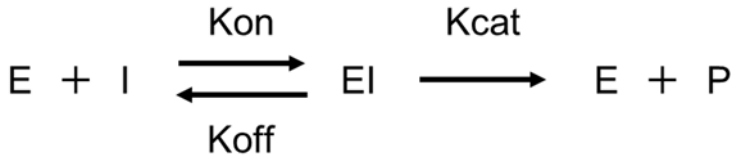


図 2.6.2.2.1.1-4　COMT に対するオピカポンの結合様式（推定）
COMT（E）とオピカポン（I）は tight binding 様式で結合し，Kon/Koff で示される平衡状態に達する．酵素阻害剤複合体（EI）は，遊離型 E と I に再解離するか，あるいは E により I が代謝され，メチル化体（P）を生成する．
Kon：結合速度定数，Koff：解離速度定数，Kcat：代謝回転数

2.6.2.2.1.2　　ラット COMT に対するオピカポンの阻害作用

［評価資料：4.2.1.1-2］

［目的］

オピカポンのラット S-COMT に対する阻害様式を検討した．

［方法］

Wistar 系ラットの肝臓から S-COMT を調製した．基質として，アドレナリン（1000 μmol/L）を用い，37℃で 5 分間反応させたときに生成するメタネフリンを HPLC-ED で定量し，酵素活性の指標とした．S-COMT 濃度は 0.2～1.0 mg/mL の 9 濃度を設定した．オピカポン（75，150，225 及び 300 nmol/L）は，アドレナリン添加前 5 分に反応液と混合した．媒体は 0.03%DMSO とした．S-COMT 濃度（X 軸），並びにオピカポン各濃度での反応速度（Y 軸）から，Ackermann-Potter プロットを作成し，阻害様式を検討した．

［結果］

Ackermann-Potter プロットにおいて，オピカポンはラット S-COMT に対して tight-binding 様式の阻害作用を示した（図 2.6.2.2.1.2-1）．また，オピカポンの Ki 値は 0.2 nmol/L であった．

［結論］

オピカポンは，ラット S-COMT を tight-binding 様式で阻害した．

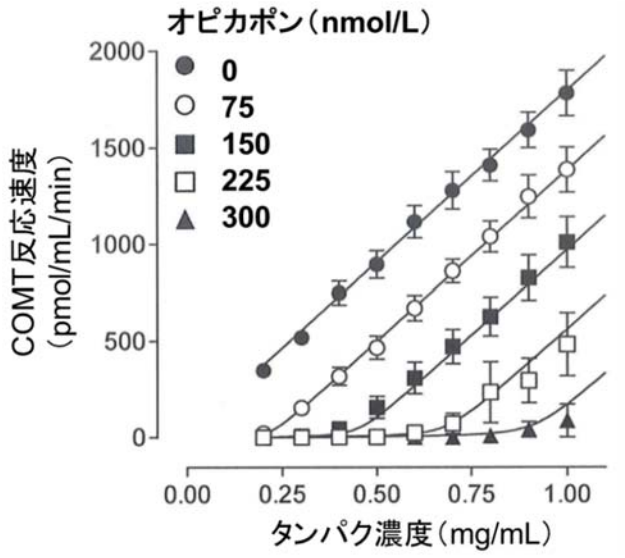


図 2.6.2.2.1.2-1　オピカポンのラット COMT 阻害様式（Ackermann-Potter プロット）
データは COMT 反応速度（pmol/mL/min）を平均値で示した.

2.6.2.2.2　*In vivo* 試験

2.6.2.2.2.1　ラット COMT に対するオピカポン単回投与の阻害作用

［評価資料：4.2.1.1-3］

1）　ラット肝臓 COMT に対するオピカポン単回投与の阻害作用（用量反応性）

［目的］

ラットにオピカポン，エンタカポン又はトルカポンを単回投与した際の肝臓の COMT 阻害作用を検討した.

［方法］

Wistar 系ラット（雄 4～12 例／群）にオピカポン（0.03～3 mg/kg），エンタカポン（0.3～30 mg/kg）あるいはトルカポン（0.1～10 mg/kg）を単回経口投与し，投与後 3 時間に肝臓の COMT 活性を評価した．媒体は 0.05 w/v%カルボキシメチルセルロース（CMC）溶液とした．肝臓のホモジネートと基質であるアドレナリンを反応し，メタネフリンの生成量を指標に COMT 活性を測定した．摘出した肝臓は 5 mmol/L リン酸緩衝液（pH7.8）でホモジナイズした．COMT 活性の測定のため，タンパク量として 2 mg の肝臓ホモジネートと基質であるアドレナリン（1000 μ mol/L）を混合し，37℃で 5 分間反応させた．反応生成物であるメタネフリン濃度は HPLC-ED で定量した.

［結果］

オピカポンは，肝臓の COMT 活性を 0.3 mg/kg で 23%，1 mg/kg で 46%，3 mg/kg で 99%阻害し，50%有効用量（ED_{50}）は 0.9 mg/kg であった．エンタカポン及びトルカポンの ED_{50} は，それぞれ 7.5 及び 1.4 mg/kg であった（図 2.6.2.2.2.1-1）.

［結論］

オピカポンは，肝臓の COMT 活性を投与量に応じて阻害した．

2） ラット各種組織の COMT に対するオピカポン単回投与の阻害作用

［目的］

ラットにオピカポンを単回投与した際の肝臓，腎臓，赤血球及び脳の COMT 阻害作用を経時的に評価し，エンタカポン及びトルカポンと COMT 阻害作用を比較した．

［方法］

Wistar系ラット（雄4～10例／群）にオピカポンを3 mg/kgの投与量で単回経口投与した．肝臓，腎臓及び赤血球の COMT 活性については投与後 0.25～48 時間まで，脳の COMT 活性については投与後 0.5～9 時間まで評価した．媒体は 0.5 w/v%CMC 溶液とした．

Wistar 系ラット（雄 4～12 例／群）にエンタカポンあるいはトルカポンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与した．肝臓及び脳の COMT 活性を投与後 0.5～24 時間まで評価した．媒体は 0.5 w/v%CMC 溶液とした．

生理食塩液で灌流後に摘出した肝臓，腎臓及び脳は，5 mmol/L リン酸緩衝液（pH7.8）でホモジナイズした．血液を遠心分離することにより調製した赤血球は，蒸留水を添加することにより溶血させ，遠心分離後の上清を COMT 活性測定用の検体とした．COMT 活性の測定のため，タンパク量として 2 mg の肝臓，腎臓，脳ホモジネートあるいは赤血球から調製した検体と基質であるアドレナリンを混合し，37℃で反応させた．アドレナリン濃度は，肝臓，腎臓及び赤血球の場合は 1000 μmol/L，脳の場合は 100 μmol/L とした．反応時間は，肝臓及び腎臓の場合は 5 分，脳の場合は 15 分，赤血球の場合は 10 分とした．反応生成物であるメタネフリン濃度は HPLC-ED で定量した．

［結果］

オピカポンは，投与後 1～8 時間までの間，肝臓及び腎臓の COMT 活性を 79%以上阻害し，その後 COMT 阻害作用は緩やかに減弱した．オピカポン投与後 48 時間の COMT 阻害率は，肝臓及び腎臓でそれぞれ 14 及び 30%であった．赤血球の COMT 活性に対する阻害作用も，肝臓及び腎臓と同様の時間推移を示した（図 2.6.2.2.2.1-2）．

エンタカポンは，投与後 0.5～1 時間までの間，肝臓の COMT 活性を 68%以上阻害したが，投与後 6 時間までには阻害作用が消失した．トルカポンは，投与後 0.5～1 時間までの間，肝臓の COMT 活性を 82%以上阻害したが，投与後 9 時間では阻害率は 16%にまで減少した（図 2.6.2.2.2.1-3）．

オピカポン及びエンタカポンは，評価期間中のすべての時点で脳の COMT 活性を阻害しなかった．トルカポンは，投与後 9 時間まで脳の COMT 活性を 40～50%阻害した（表 2.6.2.2.2.1-1）．

［結論］

オピカポンは，エンタカポン及びトルカポンと比べて，末梢において長時間作用する COMT 阻害剤であり，またトルカポンと異なり，脳の COMT 活性には影響しなかった．

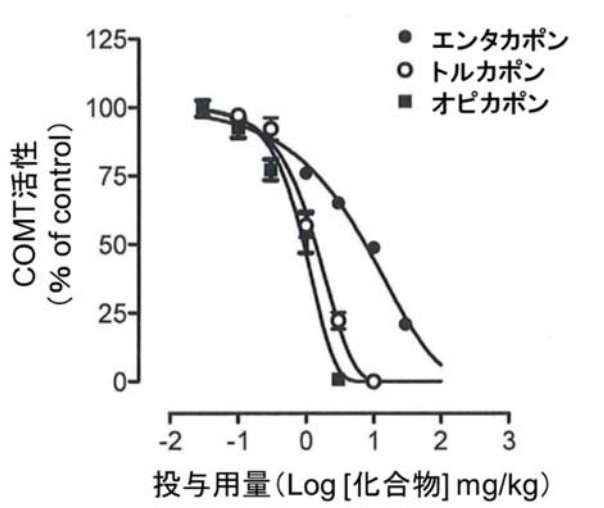


図 2.6.2.2.2.1-1　ラット肝臓 COMT 活性に対するオピカポン，エンタカポン及びトルカポン単回投与の作用

データは COMT 活性（% of control）を平均値±標準誤差で示した．

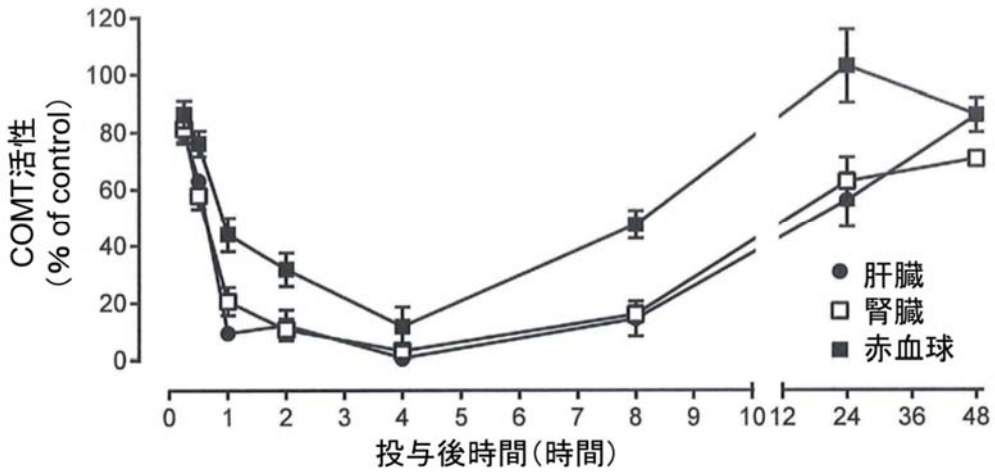


図 2.6.2.2.2.1-2　ラット各種組織の COMT 活性に対するオピカポン単回投与の作用

データは COMT 活性（% of control）を平均値±標準誤差で示した．

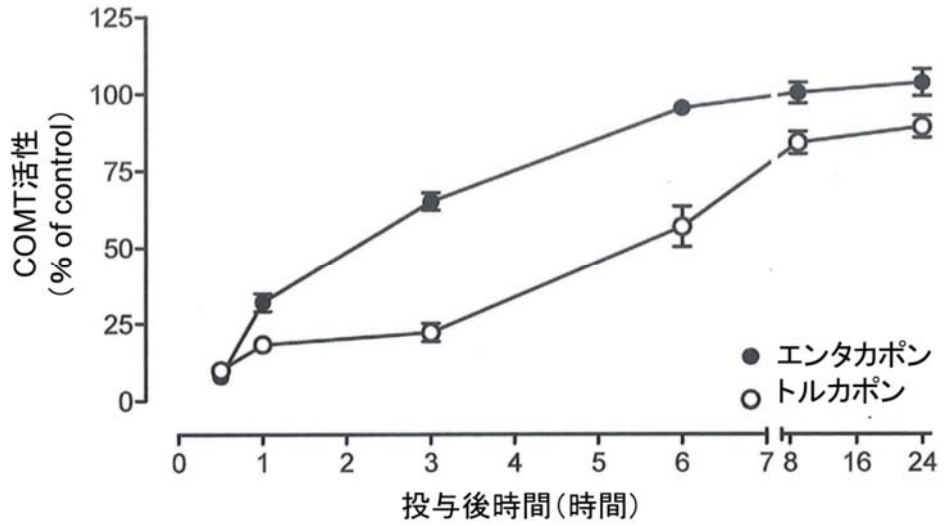


図 2.6.2.2.2.1-3　ラット肝臓 COMT 活性に対するエンタカポン及びトルカポン単回投与の阻害作用

データは COMT 活性（% of control）を平均値±標準誤差で示した.

表 2.6.2.2.2.1-1　ラット脳 COMT 活性に対するオピカポン，エンタカポン及びトルカポン単回投与の作用

投与後時間（時間）	オピカポン			エンタカポン			トルカポン		
	平均	標準誤差	例数	平均	標準誤差	例数	平均	標準誤差	例数
0.5	104.8	3.3	4	N.T.			N.T.		
1	99.6	3.9	4	90.9	3.6	4	51.7	4.7	4
3	92.5	2.9	8	100.4	1.1	8	49.9	2.2	8
6	96.1	3.4	4	101.6	6.8	4	54.9	4.2	4
9	93.1	3.0	4	115.8	1.8	4	59.9	3.5	4
24	N.T.			114.5	7.1	4	95.5	3.2	4

データは COMT 活性（% of control）を示した.
N.T.：実施せず.

2.6.2.2.2.2　ラット肝臓 COMT 活性及び発現に対するオピカポン反復投与の作用

［評価資料：4.2.1.1-2］

1）　ラット肝臓 COMT に対するオピカポン反復投与の阻害作用

［目的］

ラットにオピカポンを反復投与した際の肝臓及び赤血球の COMT 阻害作用を経日的に評価し，トルカポンと比較した．反復投与終了後の COMT 活性も経日的に評価し，COMT 阻害作用の持続性を検討した．

［方法］

Wistar 系ラット（雄 3～8 例／群）にオピカポンあるいはトルカポンを 3 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回 5 日間反復経口投与した．オピカポンは，連日の投与後 3 時間，並びに最終投与後の 1，2，3 及び 7 日に肝臓及び赤血球の COMT 活性を評価した．トルカポンは，最終投与後の 3 時間，並びに 1，2，3 及び 7 日の COMT 活性を評価した．媒体は 0.5 w/v%CMC 溶液とした．生理食塩液で灌流後に摘出した肝臓は，5 mmol/L リン酸緩衝液（pH7.8）でホモジナイズした．血液を遠心分離することにより調製した赤血球は，蒸留水を添加することにより溶血させ，遠心分離後の上清を COMT 活性測定用の検体とした．COMT 活性の測定のため，タンパク量として 2 mg の肝臓あるいは赤血球から調製した検体と基質であるアドレナリン（1000 μmol/L）を混合し，37℃で反応させた．反応時間は，肝臓の場合は 5 分，赤血球の場合は 10 分とした．反応生成物であるメタネフリン濃度は HPLC-ED で定量した．

［結果］

オピカポンは，反復投与の最終投与後 3 時間において肝臓及び赤血球の COMT 活性をそれぞれ 84 及び 47%阻害した．また，最終投与後 1 日でも肝臓の COMT 阻害作用は持続し，阻害率は 61%であった．最終投与後 1 日以降は，緩やかに COMT 阻害作用は減弱し，7 日目には COMT 活性が対照値付近に戻った．一方，トルカポンは，最終投与後 3 時間において肝臓及び赤血球の COMT 活性をそれぞれ 77 及び 30%阻害した．最終投与後 1 日では，肝臓の COMT 阻害率は 25%まで減弱し，2 日目には COMT 活性が対照値付近に戻った．赤血球の COMT 活性は，オピカポン，トルカポンともに最終投与後 1 日で対照値付近に戻った．（図 2.6.2.2.2.2-1）．

［結論］

オピカポンは，トルカポンに比べて肝臓の COMT 活性に対する持続的な阻害作用を示した．

2)　ラット肝臓 COMT 発現に対するオピカポン反復投与の影響

［目的］

ラットにオピカポンを反復投与した際の肝臓の COMT 発現への影響を検討した.

［方法］

Wistar 系ラット（雄 4 例／群）にオピカポンを 3 及び 30 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回 5 日間反復経口投与した．媒体は 0.5 w/v%CMC 溶液とした．最終投与後 3 時間に肝臓を摘出し，COMT の mRNA 発現量を定量 PCR 法で定量した．また，S-COMT 及び MB-COMT のタンパク量をウェスタンブロット法で定量した.

［結果］

肝臓の COMT の mRNA 発現量は，オピカポンの反復投与により変化しなかった（図 2.6.2.2.2.2-2）．また，S-COMT 及び MB-COMT のタンパク量も同様に変化しなかった（図 2.6.2.2.2.2-3）.

［結論］

オピカポンは，反復投与において COMT 遺伝子及びタンパク発現量に影響を与えなかった.

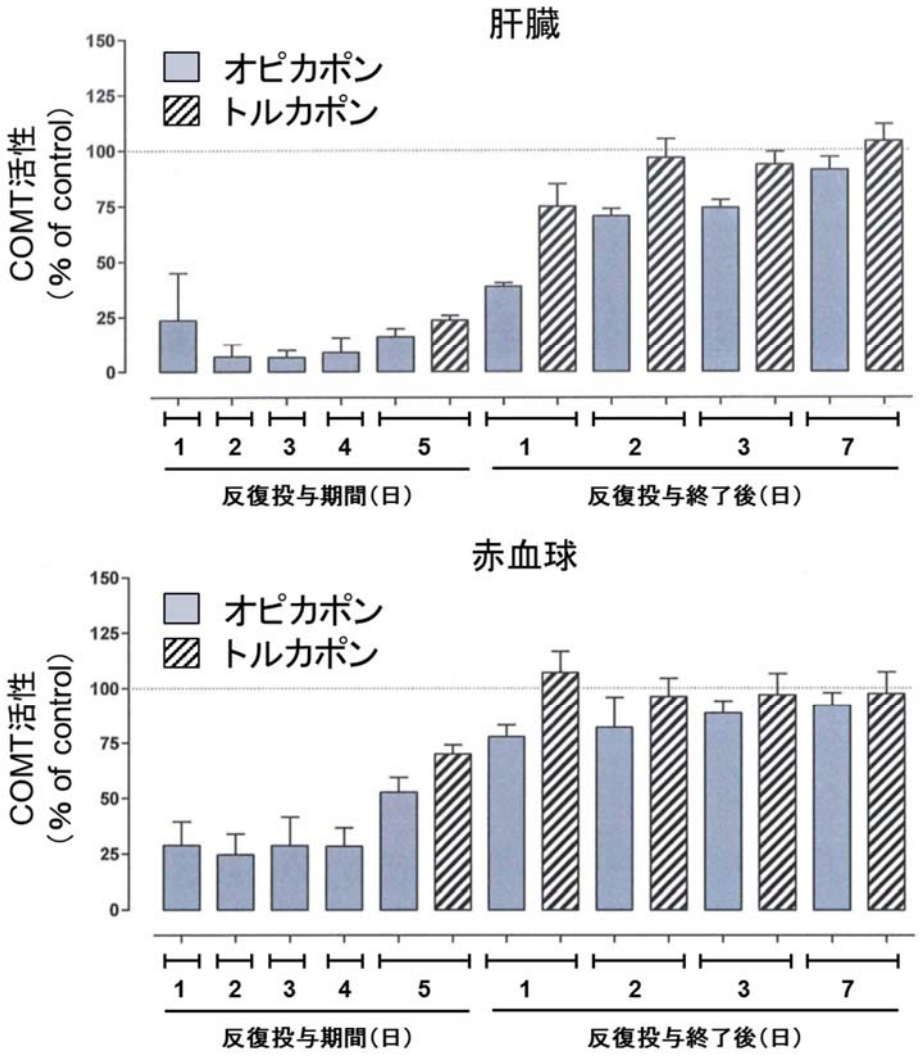


図 2.6.2.2.2.2-1　ラット肝臓及び赤血球 COMT 活性に対するオピカポン反復投与の作用
データは COMT 活性（% of control）を平均値±標準誤差で示した.

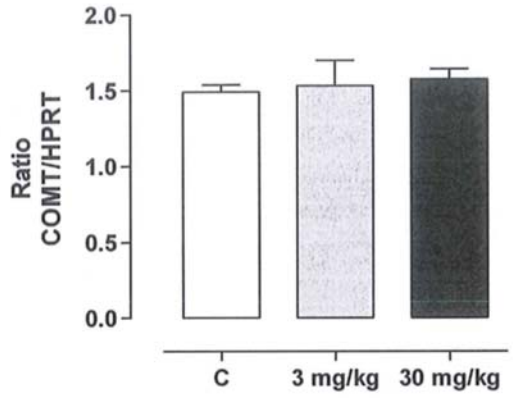


図 2.6.2.2.2.2-2　ラット肝臓 COMT 遺伝子発現に対するオピカポン反復投与の影響
データは COMT 遺伝子発現量（HPRT 遺伝子との発現量比）を平均値±標準誤差で示した.

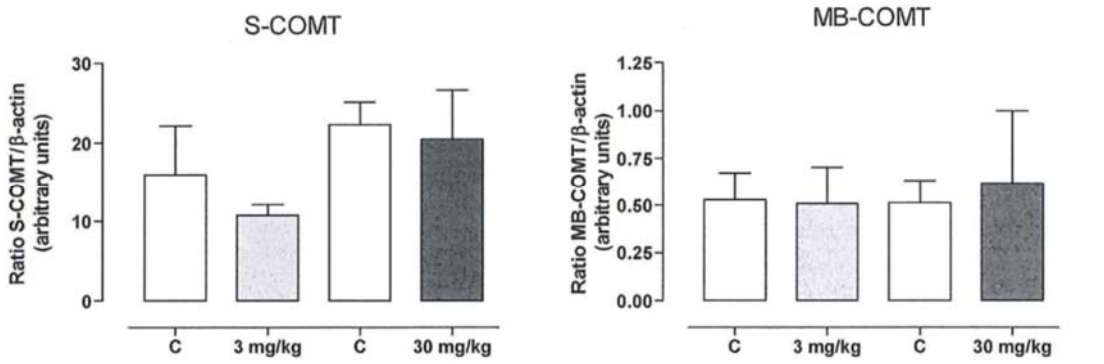


図 2.6.2.2.2.2-3　ラット肝臓 S-COMT 及び MB-COMT タンパク発現に対するオピカポン反復投与の影響

データは COMT タンパク発現量（β-actin タンパクとの発現量比）を平均値±標準誤差で示した．

2.6.2.2.2.3　　ラットにおけるレボドパ代謝に対するオピカポンの作用

［評価資料：4.2.1.1-3］

1）　ラットにおける血漿中レボドパ濃度に対するオピカポンの作用

［目的］

ラットにおいて，オピカポンとレボドパ及びベンセラジドとを併用投与した際の，血漿中レボドパ濃度に及ぼす影響を検討した．また，その作用をトルカポンと比較した．

［方法］

Wistar 系ラット（雄 6～8 例／群）にレボドパ（12 mg/kg/日）及びベンセラジド（3 mg/kg/日）を 3 日間反復経口投与した．反復投与 2 日目のレボドパ／ベンセラジド投与前 2 時間に，オピカポンあるいはトルカポンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与した．媒体は 0.5 w/v% CMC 溶液とした．反復投与 1 及び 3 日目には媒体を投与した．ラットの頸静脈に透析膜を留置し，各日のレボドパ／ベンセラジド投与前 40 分から投与後 380 分まで頸静脈から 20 分間隔で透析液を採取した．レボドパ及びその代謝物である 3-*O*-メチルドパ（3-OMD）濃度を測定し，それぞれ Cmax 及び AUC を求めた（図 2.6.2.2.2.3-1 及び表 2.6.2.2.2.3-1）．レボドパ及び 3-OMD 濃度を HPLC-ED で定量した．

［結果］

オピカポンは，レボドパ／ベンセラジドとの併用投与（反復投与 2 日目）において，血漿中レボドパ濃度の AUC を反復投与 1 日目と比較して 1.9 倍に増加させた．レボドパ／ベンセラジドの反復投与 3 日目において，血漿中レボドパ濃度の AUC は反復投与 1 日目と比較して 1.3 倍高かったが有意差はなかった．また，オピカポンは，血漿中 3-OMD 濃度の AUC を反復投与 1 日目の 17%まで低下させた．反復投与 3 日目の血漿中 3-OMD 濃度の AUC は，反復投与 1 日目の 63%であった．また，血漿中レボドパ濃度の Cmax は，反復投与 2 及び 3

日目において，それぞれ 1 日目と比較して 1.5 及び 1.4 倍高値であった．一方，トルカポンは，レボドパ／ベンセラジドとの併用投与（反復投与 2 日目）において，血漿中レボドパ濃度の AUC 及び Cmax を反復投与 1 日目と比較してそれぞれ 1.6 及び 1.2 倍に増加させたが，反復投与 3 日目の血漿中レボドパ濃度では作用が認められなかった．

［結論］

オピカポンは，単回経口投与によりレボドパ／ベンセラジド投与後の血漿中レボドパ濃度を増加させ，その作用は投与後 24 時間以降も持続する傾向が認められた．一方，オピカポンと同用量のトルカポンでは，作用の持続が認められなかった．

2） ラットにおける脳内レボドパ濃度に対するオピカポンの作用

［目的］

ラットにおいて，オピカポンとレボドパ及びベンセラジドとを併用投与した際の，脳内レボドパ濃度に及ぼす影響を検討した．また，その作用をトルカポンと比較した．

［方法］

Wistar 系ラット（雄 4～11 例／群）にオピカポンあるいはトルカポンを 3 mg/kg の投与量で経口投与し，投与後 1，2，7，12 及び 24 時間の各時点で脳を摘出した．媒体は 0.5 w/v% CMC 溶液とした．各個体，脳を摘出する 1 時間前にレボドパ／ベンセラジド（12/3 mg/kg）を単回経口投与し，脳中のレボドパ及び関連するカテコールアミン類（3-OMD，DOPAC，ドパミン及び HVA）の濃度を測定した．レボドパ，3-OMD，DOPAC，ドパミン及び HVA 濃度は HPLC-ED で定量した．

［結果］

オピカポンは，投与後 7 時間から媒体投与群と比較して有意に脳内レボドパ濃度を増加させ，最大で投与後 12 時間に 3.1 倍に達した．また，投与後 24 時間でも有意に脳内レボドパ濃度を増加させた．一方，トルカポンは，投与後 2 及び 7 時間に脳内レボドパ濃度をそれぞれ媒体投与群と比較して 4.6 及び 2.7 倍に増加させたが，投与後 12 及び 24 時間では有意な差はなかった．なお，DOPAC については，オピカポン及びトルカポンともにレボドパ濃度と同様の変化を示した．オピカポンはドパミン及び HVA の濃度を媒体投与群と比較してわずかに増加させたが，トルカポンは両者の濃度に影響しなかった（図 2.6.2.2.2.3-2）．

［結論］

オピカポンは，レボドパ／ベンセラジド投与後の脳内レボドパ及び関連するカテコールアミン類の濃度を増加させ，その作用はオピカポン投与後 24 時間まで持続した．一方，オピカポンと同用量のトルカポンでは，作用の持続が認められなかった．

2.6.2 薬理試験の概要文
オピカポン

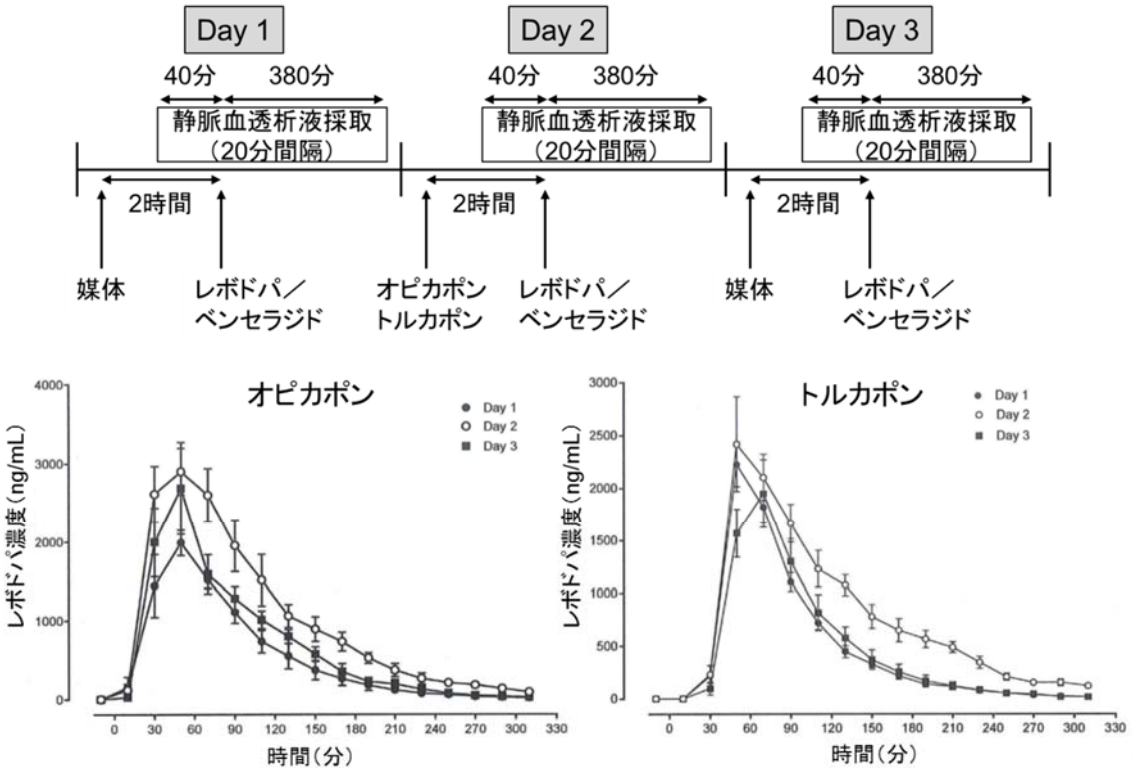


図 2.6.2.2.2.3-1　ラットにおける血漿中レボドパ濃度に対するオピカポン及びトルカポンの作用

データはレボドパ濃度（ng/mL）を平均値±標準誤差で示した.

表 2.6.2.2.2.3-1　ラットにおける血漿中レボドパ及び 3-OMD 濃度に対するオピカポン及びトルカポンの作用

		オピカポン		
		Cmax (ng/mL)	Tmax (min)	AUC (ng·min/mL)
レボドパ	Day 1	2196 (18.9)	50 (30～90)	172147 (28.4)
	Day 2	3318 (15.0) *	50 (30～70)	321822 (25.8) *
	Day 3	3023 (34.0)	30 (30～50)	220397 (17.1)
3-OMD	Day 1	2694 (20)	240 (130～310)	590287 (14.2)
	Day 2	662 (76) *	230 (-50～310)	98219 (116.4) *
	Day 3	2026 (23)	230 (170～310)	371667 (21.6) *

		トルカポン		
		Cmax (ng/mL)	Tmax (min)	AUC (ng·min/mL)
レボドパ	Day 1	2313 (18.4)	50 (50～70)	149679 (17.8)
	Day 2	2828 (28.7)	50 (50～90)	241643 (20.2) *
	Day 3	2078 (37.9)	70 (50～90)	147669 (44.7)
3-OMD	Day 1	2632 (15.0)	260 (150～310)	532621 (12.6)
	Day 2	789 (61.2) *	220 (-150～310)	53015 (86.2) *
	Day 3	2875 (23.6)	260 (110～310)	523437 (18.2)

Cmax 及び AUC は平均値で示した．また，変動係数を括弧内に示した．
Tmax は中央値で示した．また，範囲を括弧内に示した．
*p<0.05：媒体投与群とオピカポンあるいはトルカポン投与群間の post-hoc Dunnett 検定による一元配置分散分析（Cmax 及び AUC）
媒体投与群とオピカポンあるいはトルカポン投与群間の Kruskal-Wallis 検定（Tmax）

2.6.2 薬理試験の概要文
オピカポン

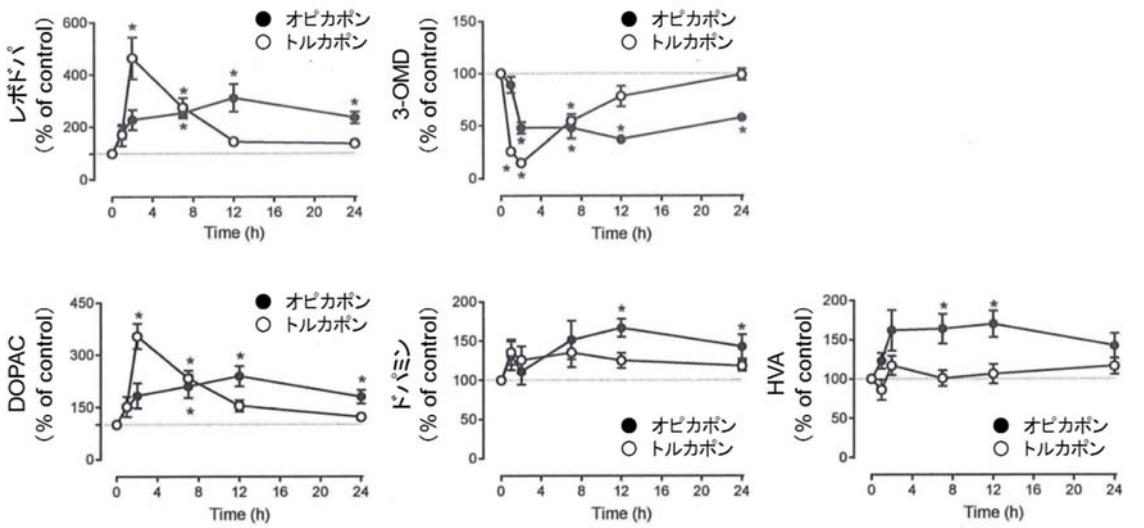


図 2.6.2.2.2.3-2　ラットにおける脳内レボドパ及びカテコールアミン類の濃度に対するオピカポン及びトルカポンの作用

データはレボドパ及びカテコールアミン類濃度（% of control）を平均値±標準誤差で示した．
*p<0.05：媒体投与群とオピカポンあるいはトルカポン投与群間の Tukey の post-hoc 検定による一元配置分散分析

2.6.2.2.2.4　サル赤血球 COMT に対するオピカポンの阻害作用

1）　サル赤血球 COMT に対するオピカポン反復投与の阻害作用

［参考資料：4.2.1.1-4，4.2.1.1-5］

［目的］

サルにオピカポンを反復投与した際の赤血球 COMT 阻害作用を検討した．

［方法］

カニクイザル（雌 3 例／群）にオピカポンを 100 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回 14 日間反復経口投与した．初回投与後 1，2，4 及び 24 時間及び最終投与後 24 時間に静脈血を採取し，オピカポンの血漿中濃度及び赤血球 COMT 活性を測定した．媒体は 0.2 w/v%ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）とした．血液を遠心分離することにより調製した赤血球は，凍結融解することにより溶血させ，遠心分離後の上清を COMT 活性測定用の検体とした．COMT 活性の測定のため，検体とメチル基受容基質である Protocatechuic acid（160 μmol/L）及びメチル基供与基質である S-(5’-Adenosyl)-L-methionine p-toluenesulfonate salt（SAM，^{14}C 標識及び非標識体の総濃度として 192.46～193.15 μmol/L）を混合し，37℃で 2 時間反応させた．反応生成物濃度は液体シンチレーションカウンターで定量し，検体中のヘモグロビン濃度で補正した．

［結果］

初回投与後の血漿中オピカポン濃度の Tmax は 1.3 時間であった．最終投与後 24 時間の血漿中オピカポン濃度は定量下限（1.00 ng/mL）未満であった．一方，オピカポンは赤血球の COMT 活性を初回投与後 1～24 時間まで持続して阻害し，その阻害率は 61～95%であった．また，最終投与後 24 時間の COMT 阻害率は 72%であった．

［結論］

サルにおいて，オピカポンは 1 日 1 回の反復経口投与で血漿中濃度は持続しなかったが，赤血球 COMT 活性を持続的に阻害した．

2） サル赤血球 COMT に対するオピカポン反復投与の阻害作用（用量反応性）

［評価資料：4.2.1.1-6］

［目的］

サルにオピカポンを反復投与した際の赤血球 COMT 阻害作用に対する用量反応性を検討した．

［方法］

カニクイザル（雌 3 例／群）にオピカポンを 1，10 及び 100 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回 14 日間反復経口投与した．初回投与後 1，2，4 及び 24 時間及び最終投与後 24 時間の静脈血を採取し，赤血球 COMT 活性を測定した．なお，媒体投与群を含む計 4 群をランダムに割り付け，4 期クロスオーバー法で実施した．クール間の休薬期間は 4 週間とした．媒体は 0.2 w/v%HPMC とした．血液を遠心分離することにより調製した赤血球は，凍結融解することにより溶血させ，遠心分離後の上清を COMT 活性測定用の検体とした．COMT 活性の測定のため，検体とメチル基受容基質である Protocatechuic acid（160 μ mol/L）及びメチル基供与基質である SAM（^{14}C 標識及び非標識体の総濃度として 192.81～194.18 μ mol/L）を混合し，37℃で 2 時間反応させた．反応生成物濃度は液体シンチレーションカウンターで定量し，検体中のヘモグロビン濃度で補正した．

［結果］

オピカポンは，初回投与後 1 時間から投与量に応じて赤血球 COMT 活性を阻害した．初回投与後 24 時間における最大阻害率は，1 mg/kg で 13%，10 mg/kg で 76%，100 mg/kg で 93%であった（図 2.6.2.2.2.4-1）．また，初回投与後 24 時間までの COMT 活性（AUEC24h）は，媒体対照群と比較して，1 mg/kg で 13%，10 mg/kg で 60%，100 mg/kg で 76%低下し，10 及び 100 mg/kg において有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.4-2）．最終投与後 24 時間の COMT 活性に対する阻害率は，1 mg/kg/日で 30%，10 mg/kg/日で 64%，100 mg/kg/日で 75%であり，10 及び 100 mg/kg/日において有意に低値であった（図 2.6.2.2.2.4-3）．

［結論］

サルにおいて，オピカポンは投与量に応じて赤血球 COMT 活性を強力かつ持続的に阻害した．

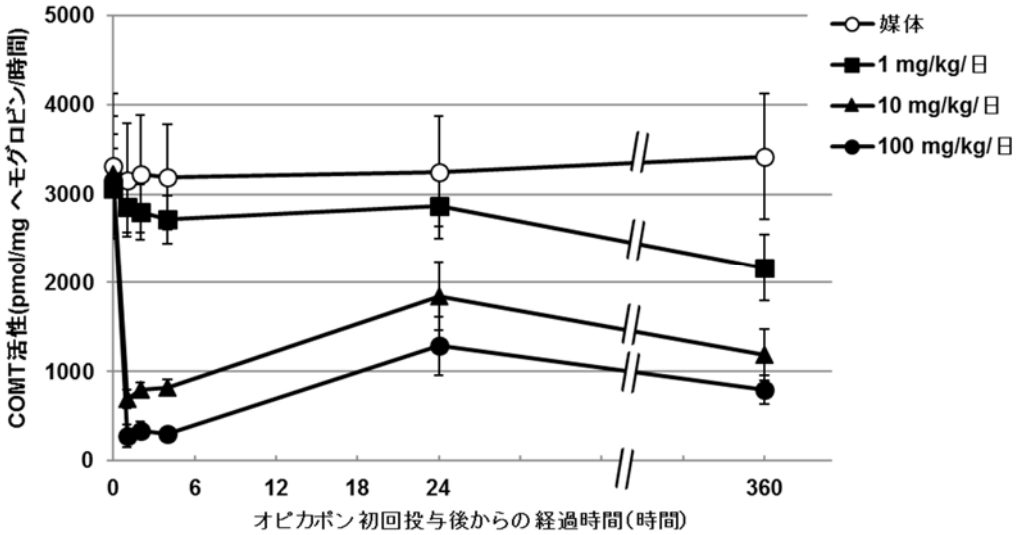


図 2.6.2.2.2.4-1　サル赤血球 COMT 活性に対するオピカポン反復投与の作用
データは COMT 活性（pmol/mg ヘモグロビン/時間）を平均値±標準誤差で示した．

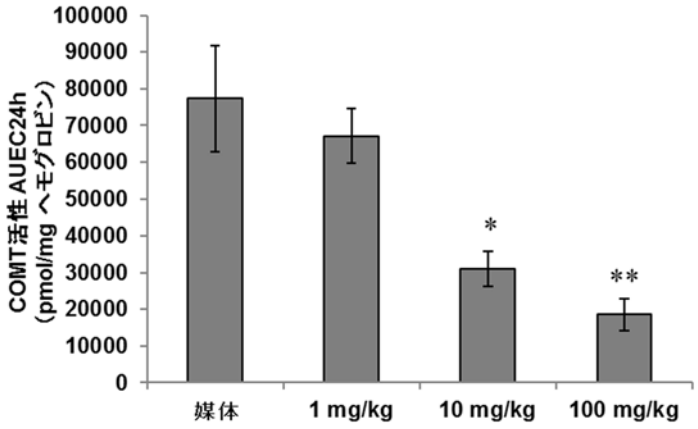


図 2.6.2.2.2.4-2　オピカポン初回投与後 24 時間までの赤血球 COMT 活性（AUEC24h）
データは COMT 活性 AUEC24h（pmol/mg ヘモグロビン）を平均値±標準誤差で示した．
*p<0.05，**p<0.01：媒体投与群とオピカポン投与群間の Dunnett 検定

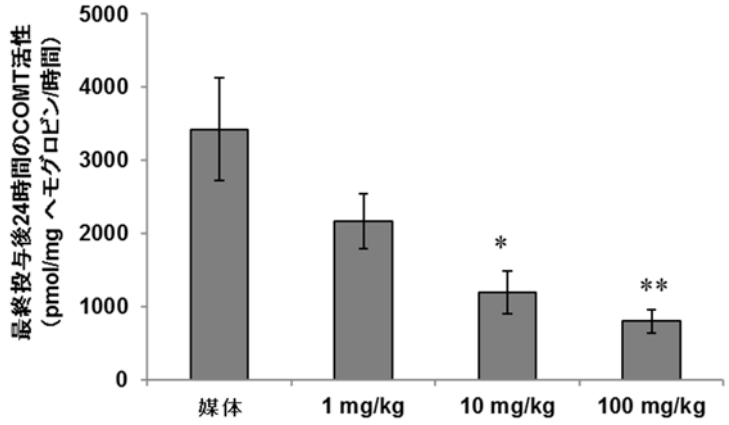


図 2.6.2.2.2.4-3　オピカポン最終投与後 24 時間の赤血球 COMT 活性
データは COMT 活性（pmol/mg ヘモグロビン/時間）を平均値±標準誤差で示した．
*p<0.05，**p<0.01：媒体投与群とオピカポン投与群間の Dunnett 検定

2.6.2.2.2.5　　サルにおけるレボドパ代謝に対するオピカポンの作用

［評価資料：4.2.1.1-7］

［目的］

サルにおいて，レボドパ及びベンセラジドを投与した際の，血漿中及び脳内におけるレボドパ並びに関連するカテコールアミン類の濃度に対するオピカポン反復投与の作用を検討した．

［方法］

カニクイザル（雌雄 3～4 例／群）にオピカポンを 100 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回 14 日間反復経口投与した．最終投与後 23 時間にレボドパ（12 mg/kg）及びベンセラジド（3 mg/kg）を経口投与した．レボドパ／ベンセラジド投与前及び投与後 360 分まで経時的に静脈血を採取し，赤血球 COMT 活性及びレボドパ濃度を測定した．また，予め透析膜を留置した背側線条体，黒質及び前頭前皮質から透析液を採取し，レボドパ及び関連するカテコールアミン類（3-OMD，DOPAC 及び HVA）の濃度を測定した．なお，媒体投与群及びオピカポン投与群の 2 期クロスオーバー法で実施し，クール間の休薬期間は 5 日間とした．媒体は 0.2 w/v%HPMC とした．

血液を遠心分離することにより調製した赤血球は，蒸留水を添加することにより溶血させ，遠心分離後の上清を COMT 活性測定用の検体とした．COMT 活性の測定のため，検体と基質であるアドレナリン（500 μmol/L）を混合し，37℃で 1 時間反応させた．反応生成物であるメタネフリン濃度は HPLC-ED で定量し，検体中のヘモグロビン濃度で補正した．

血漿中のレボドパ及び 3-OMD 濃度，脳の各部位における透析液中のレボドパ，3-OMD，DOPAC 及び HVA 濃度は HPLC-ED で定量した．

［結果］

オピカポンは赤血球 COMT 活性を阻害し，いずれの評価時点においてもオピカポン投与前の約 30%未満まで活性を低下させた（図 2.6.2.2.2.5-1）．オピカポンは，血漿中レボドパ濃度の AUC6h を媒体投与群と比較して 2.0 倍増加させた．線条体中レボドパ濃度の AUC6h は媒体投与群と比較して 1.7 倍高値であったが，有意差はなかった．一方，血漿及び線条体中の 3-OMD 濃度の AUC6h は，媒体投与群と比較して低下した（図 2.6.2.2.2.5-2 及び表 2.6.2.2.2.5-1）．線条体中の DOPAC 及び HVA 濃度は，オピカポン投与で変化しなかった．黒質及び前頭前皮質中のレボドパ及び 3-OMD 濃度についても，オピカポン投与で線条体と同様に線条体と同様に変化した（表 2.6.2.2.2.5-2）．

［結論］

オピカポンは，サルの末梢及び脳内においてレボドパ／ベンセラジド投与後のレボドパ濃度を増加させ，レボドパの利用率を高めた．

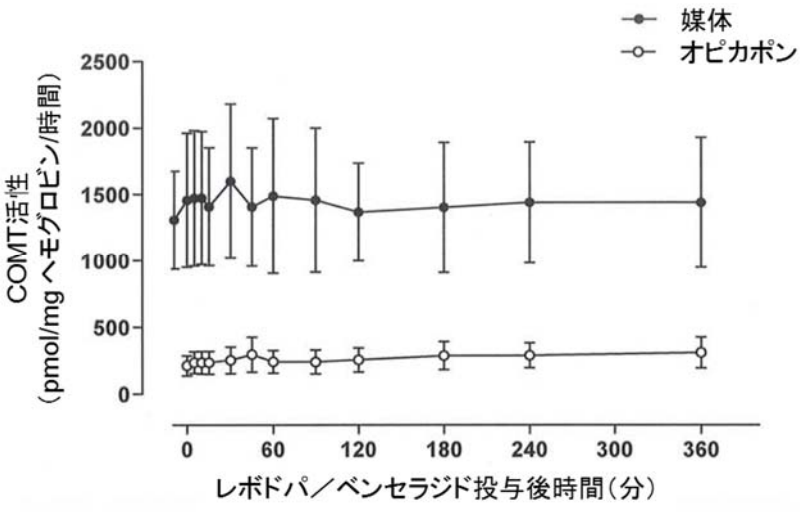


図 2.6.2.2.2.5-1　オピカポン 14 日間反復投与終了後のサル赤血球 COMT 活性
データは COMT 活性（pmol/mg ヘモグロビン/時間）を平均値±標準誤差で示した．

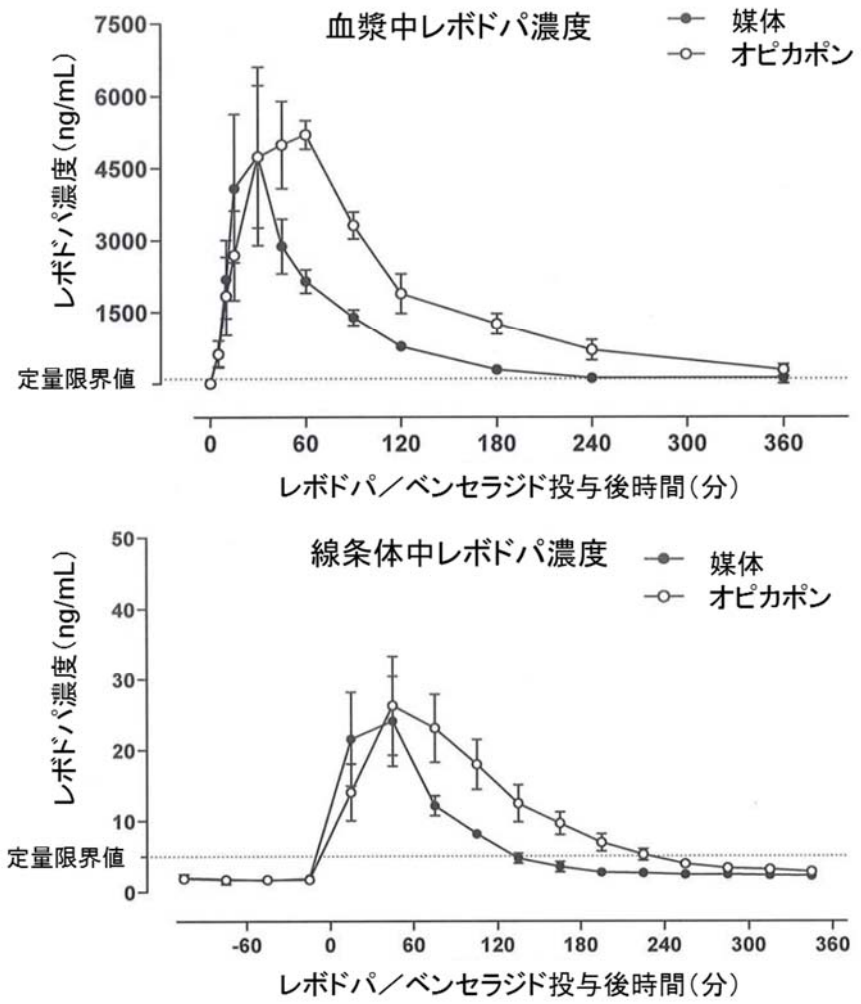


図 2.6.2.2.2.5-2　サル血漿及び線条体中レボドパ濃度に対するオピカポンの作用
データはレボドパ濃度（ng/mL）を平均値±標準誤差で示した.

表 2.6.2.2.2.5-1　サル血漿中レボドパ及び 3-OMD 濃度に対するオピカポンの作用

	AUC6h（ng·min/mL）	
	媒体	オピカポン
レボドパ	324485±58035	638463±45117 *
3-OMD	548056±130314	111675±38386.4 *

データはレボドパ及び 3-OMD 濃度の AUC6h（ng·min/mL）を平均値±標準誤差で示した.
*p<0.05：媒体投与群とオピカポン投与群間の t 検定

表 2.6.2.2.2.5-2　サル線条体，黒質及び前頭前皮質中レボドパ及びカテコールアミン類の濃度に対するオピカポンの作用

	AUC6h（ng·min/mL）					
	線条体		黒質		前頭前皮質	
	媒体	オピカポン	媒体	オピカポン	媒体	オピカポン
レボドパ	2031±370	3352±805	1243±512	1721±408	1337±294	3067±1168
3-OMD	8213±3288	1679±996	4165±1912	593±376	4716±1637	1963±1308
DOPAC	18737±12037	16828±6489	970±585	4239±997	未測定	未測定
HVA	381296±54392	304769±33566	103212±23842	144520±15560	27372±1285	25412±4026

データはレボドパ及びカテコールアミン濃度の AUC6h（ng·min/mL）を平均値±標準誤差で示した．

2.6.2.2.2.6　サルパーキンソン病モデルに対するオピカポンの作用

［評価資料：4.2.1.1-8］

［目的］

サルのパーキンソン病モデルのパーキンソン様症状及び自発運動量に対するオピカポンの単独作用を検討した．また，本モデルでのレボドパ及びベンセラジドの作用に対するオピカポンの影響を検討した．

［方法］

カニクイザル（雌 25 例）に 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン（MPTP）を 0.2 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回静脈内投与した．MPTP 投与直前，投与後 4 及び 8 時間に霊長類パーキンソン病運動症状評価スコア（PPMRS）を用いてパーキンソン病様症状を観察し，パーキンソン様症状を呈するまで MPTP を連日投与した．MPTP の投与期間は最大 14 日間とした．パーキンソン様症状を呈した個体について，MPTP 投与終了後も PPMRS でパーキンソン様症状を連日評価し，発症から 4 週間以上症状が持続した 10 例を試験に組み入れた．

オピカポンの単独作用について，オピカポンを 100 mg/kg/日の投与量で 1 日 1 回 14 もしくは 15 日間反復経口投与し，反復投与 14 日目まで PPMRS を連日評価した．また，反復投与 1～3，7～10 及び 14～15 日目に，飼育ケージ内での移動距離（自発運動量）をそれぞれ 30 分間測定した．媒体は 0.2 w/v%HPMC とした．

オピカポンとレボドパ及びベンセラジドとの併用投与よる影響を検討するため，オピカポン投与後 12 時間にレボドパ及びベンセラジドを 4:1 の用量比で経口投与し，投与後 1，2，3，4 及び 6 時間の PPMRS 及び自発運動量を評価した．オピカポンは 100 mg/kg/日で 1 日 1

回反復経口投与し，レボドパ（6～24 mg/kg）及びベンセラジド（1.5～6 mg/kg）は 5 段階で用量を漸増した．なお，試験は媒体投与群及びオピカポン投与群の 2 期クロスオーバー法で実施した（表 2.6.2.2.2.6-1）．媒体は 0.2 w/v%HPMC とした．

［結果］

オピカポンは，14 日間反復経口投与において，PPMRS によるパーキンソン様症状及び自発運動量に対して，いずれの評価期間においても影響を与えなかった（図 2.6.2.2.2.6-1）．

レボドパ／ベンセラジドは，投与量に応じて PPMRS を低下させ，自発運動量を増加させた．一方，オピカポンは，レボドパ／ベンセラジド投与前 12 時間投与において，レボドパ／ベンセラジド（18/4.5 mg/kg 及び 24/6 mg/kg）の PPMRS 及び自発運動量に対する作用を有意に増強した（図 2.6.2.2.2.6-2 及び図 2.6.2.2.2.6-3）．

［結論］

オピカポンは，サルパーキンソン病モデルのパーキンソン様症状及び自発運動量に対して単独では影響しなかったが，レボドパ／ベンセラジドの作用を増強した．

表 2.6.2.2.2.6-1　サルパーキンソン病モデルに対するオピカポンの評価スケジュール

第 1 クール									
グループ	投与薬物	投与時間	投与量（mg/kg）						
			Day 1～14	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20
1（n=5）	媒体	9 PM	媒体	媒体	媒体	媒体	媒体	媒体	投与なし
	レボドパ／ベンセラジド	9 AM	投与なし	6/1.5	9/2.25	12/3	18/4.5	24/6	24/6
2（n=5）	オピカポン	9 PM	100	100	100	100	100	100	投与なし
	レボドパ／ベンセラジド	9 AM	投与なし	6/1.5	9/2.25	12/3	18/4.5	24/6	24/6

第 2 クール									
グループ	投与薬物	投与時間	投与量（mg/kg）						
			Day 1～15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20	Day 21
2（n=5）	媒体	9 PM	媒体	媒体	媒体	媒体	媒体	媒体	投与なし
	レボドパ／ベンセラジド	9 AM	投与なし	6/1.5	9/2.25	12/3	18/4.5	24/6	24/6
1（n=5）	オピカポン	9 PM	100	100	100	100	100	100	投与なし
	レボドパ／ベンセラジド	9 AM	投与なし	6/1.5	9/2.25	12/3	18/4.5	24/6	24/6

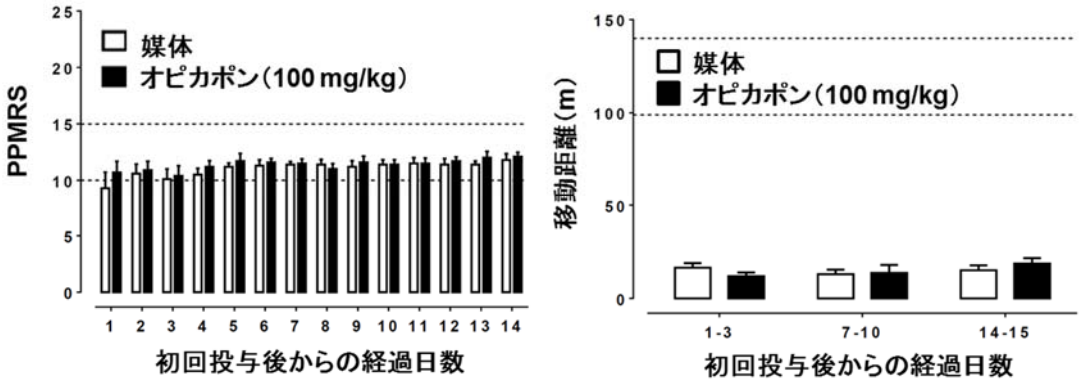


図 2.6.2.2.2.6-1　サルパーキンソン病モデルに対するオピカポンの単独作用
データは PPRMS 及び移動距離の平均値±標準誤差で示した.

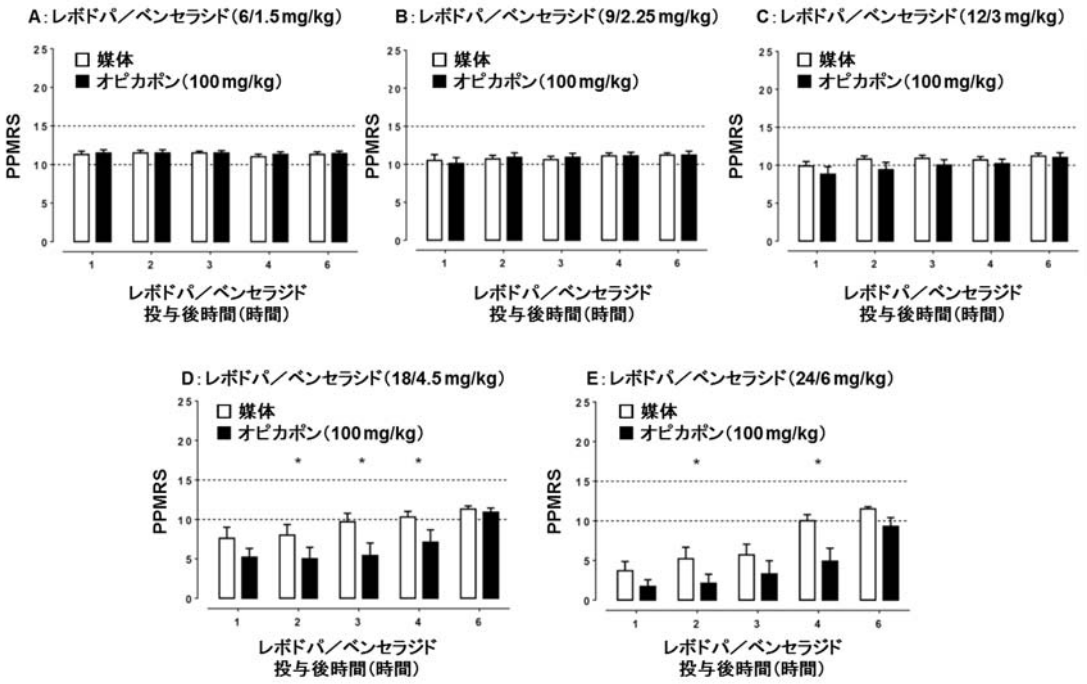


図 2.6.2.2.2.6-2　サルパーキンソン病モデルに対するレボドパ及びベンセラジドの作用に対するオピカポンの影響（PPMRS）

データは PPMRS の平均値±標準誤差で示した.
*p<0.05：媒体投与群とオピカポン投与群間の二元配置分散分析

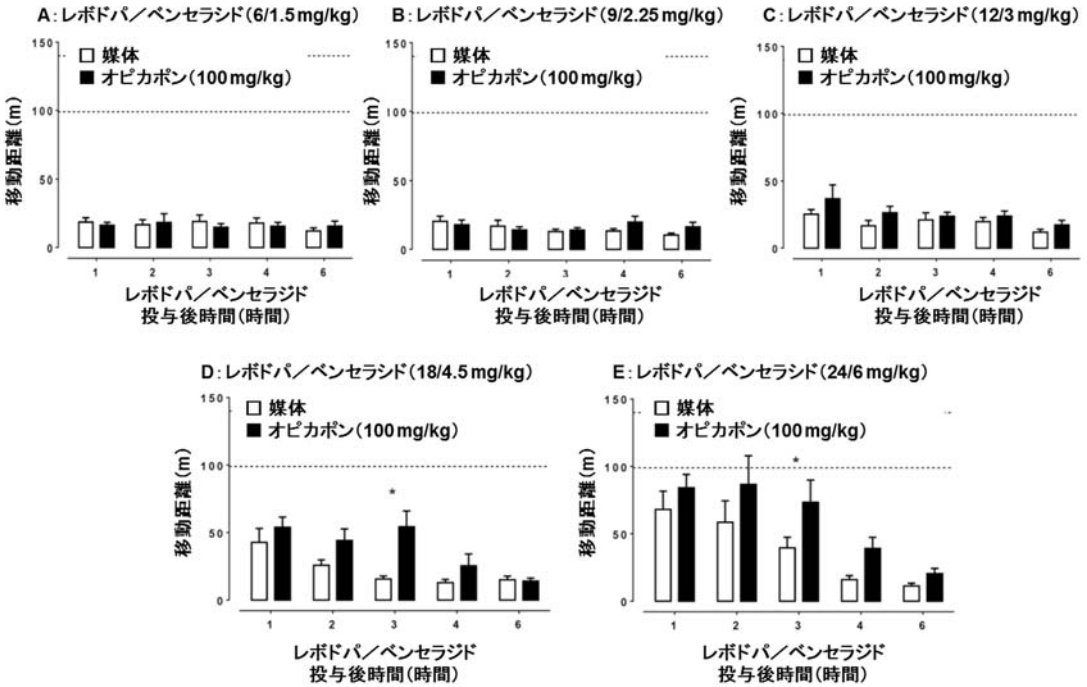


図 2.6.2.2.2.6-3　サルパーキンソン病モデルに対するレボドパ及びベンセラジドの作用に対するオピカポンの影響（自発運動量）

データは移動距離の平均値±標準誤差で示した.
*p<0.05：媒体投与群とオピカポン投与群間の二元配置分散分析

2.6.2.2.2.7 オピカポン代謝物の COMT 阻害作用

［評価資料：4.2.1.1-2，4.2.1.1-9］

［目的］

オピカポンの代謝物の COMT 阻害活性を検討した．代謝物として，ヒトの主代謝物である BIA 9-1103，動物の代謝物である BIA 9-1079，COMT により生成される 3-*O*-メチル化体である BIA 9-1100 及び [redacted] である BIA 9-1104 を評価した．

［方法］

Wistar 系ラットの肝臓から S-COMT を調製した．基質としてアドレナリン（1000 μmol/L）を用い，37℃で 5 分間反応したときに生成するメタネフリンを HPLC-ED で定量し，酵素活性の指標とした．オピカポン，BIA 9-1079，BIA 9-1100，BIA 9-1104（3，30，100，300，600，1000 及び 3000 nmol/L）及び BIA 9-1103（10，100，300，600，1000，1600，2300 及び 3000 nmol/L）は，アドレナリン添加前 20 分に反応液と混合した．媒体は 0.03%DMSO とした．

［結果］

オピカポン，BIA 9-1079 及び BIA 9-1104 の S-COMT に対する IC_{50} 値はそれぞれ 224，429 及び 128 nmol/L であった．一方，BIA 9-1103 及び BIA 9-1100 は S-COMT 阻害作用はなかった．

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 オピカポンの各種受容体，輸送体に対する結合及び各種酵素に対する阻害活性

［参考資料：4.2.1.2-1，4.2.1.2-2］

［目的］

オピカポンの各種受容体，輸送体に対する結合親和性及び各種酵素に対する阻害活性を検討した．

［方法］

オピカポン及びヒトの主代謝物である BIA 9-1103 の受容体，輸送体及び酵素の計 113 標的に対する結合親和性を 10 μmol/L で評価した．また，オピカポンが作用した酵素については，0.03～100 μmol/L で阻害活性を評価し，IC_{50} 値を算出した．

［結果］

オピカポンは，10 μmol/L の濃度でセリン／スレオニン脱リン酸化酵素 PP2A 及びチロシンリン酸化酵素 ZAP70 の標識基質への結合をそれぞれ 77 及び 49%阻害した．また，トラン

スロケータープロテイン 18 kDa（TSPO）への標識リガンドの結合を 82%阻害した．PP2A 及び ZAP70 の酵素活性に対する IC_{50} 値は，それぞれ 45 及び 17 μ mol/L であった．

BIA 9-1103 は，10 μ mol/L の濃度でホスホジエステラーゼ PDE5A1 の標識基質への結合をそれぞれ 55%阻害した．また，TSPO への標識リガンドの結合を 88%阻害した．PDE5A1 の酵素活性に対する IC_{50} 値は 63 μ mol/L であった．

2.6.2.4 安全性薬理試験

オピカポンの安全性薬理試験として，*in vivo* でラットを用いて中枢神経系，呼吸系，腎／泌尿器系及び胃腸管系に対する作用を，またイヌを用いて心血管系に対する作用を評価した．心血管系に対する作用については，*in vitro* で hERG チャネル電流及びイヌ摘出心筋の活動電位に対する作用も評価した．また，代謝物 BIA 9-1103 については，上記の *in vitro* の評価を，BIA 9-1079 については *in vivo* 及び *in vitro* の評価を行った．いずれの試験も GLP を遵守して実施した．

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 4 例／群）にオピカポンを 30，300 及び 1000 mg/kg の投与量で単回経口投与し，一般症状及び行動に対する作用を Irwin 法により検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．観察は投与前，投与後 15，30 分，1，2，3，24 及び 48 時間に実施した．

その結果，30 mg/kg で投与後 30 分から 1 時間にかけて軽度な活動性亢進及び接触過敏が認められ，軽度の興奮作用を示した．300 mg/kg 以上では投与量に応じた鎮静作用を示し，1000 mg/kg では投与後 15 分から 2 時間にかけて軽度な活動性及び筋緊張の低下が認められた．また，同投与量において頭部攣縮及び排便又は下痢も認められた．その他，1000 mg/kg で投与後 15 分に軽度の散瞳及び鼻からの出血が認められ，投与直後から投与後 48 時間にかけて投与液の高粘性に起因したと考えられる呼吸数の減少が認められた．

以上より，ラットの一般症状に対する無影響量は，30 mg/kg 未満と判断した．

2.6.2.4.2 心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1 hERG チャネル電流に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-2］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3 標本／濃度）を用いて，オピカポンの hERG チャネル電流に対する作用を検討した．オピカポンは DMSO に溶解して灌流液に添加し，3，10，30 及び 100 μmol/L の濃度で試験を実施した．

その結果，オピカポンは hERG チャネル電流を 30 μmol/L（12 μg/mL）で 12.7%，100 μmol/L（41 μg/mL）で 25.9%抑制した．hERG チャネル電流に対する IC_{50} 値は 388.9 μmol/L（160.7 μg/mL）と算出され，無影響量は 10 μmol/L（4.13 μg/mL）であった．

2.6.2.4.2.2 イヌ摘出心筋の活動電位に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-3，4.2.1.3-4］

雄ビーグル犬より摘出したプルキンエ線維（6 標本／濃度）を用いて，心筋の活動電位に対するオピカポンの作用を検討した．オピカポンは DMSO に溶解して灌流液に添加し，試験 1（試験番号：07.482/3）では 0.1，1 及び 10 μg/mL，試験 2（試験番号：11.0531）では 1，3 及び 10 μg/mL の濃度で試験を実施した．灌流開始前及び灌流開始後 30 分まで 5 分毎に，静止膜電位（RMP），活動電位最大立ち上がり速度（Vmax），活動電位振幅（APA），30，60 及び 90%再分極時の活動電位持続時間（APD_{30}，APD_{60} 及び APD_{90}）並びに活動電位三角化（APT＝APD_{90}-APD_{60}）を測定した．また，刺激頻度を変えて測定することにより，オピカポンの逆頻度依存性（高頻度刺激時に APD 延長作用が減弱すること）を検討した．

試験 1 では，10 μg/mL で APD_{90} 及び APT の延長が認められた．試験 2 では，1 μg/mL で RMP の低下，10 μg/mL で APD_{60} 及び APD_{90} の短縮が認められた．しかしながら，いずれも単発あるいは散発的に認められ，2 つの試験で一貫性のない変化であったことから，オピカポン投与に起因した変化ではないと判断した．また，オピカポンはいずれの投与量においても逆頻度依存性を示さなかった．

以上より，オピカポンは 10 μg/mL までイヌ心筋の活動電位に影響しないと判断した．

2.6.2.4.2.3 覚醒イヌにおける心血管系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-5］

9～18 カ月齢のビーグル犬（雄 4 例／群）を用いて，オピカポンの心血管系に対する作用をテレメトリーシステムにより検討した．オピカポンはゼラチンカプセルに充填し，60，200 及び 600 mg/kg の投与量で単回経口投与した．対照群には空カプセルを投与した．投与前，投与後 15，30 分，1，2，3，4，5，6，8，12，16，20 及び 24 時間における血圧（収縮期血圧，拡張期血圧及び平均血圧），心拍数及び心電図パラメータ（PR 間隔，QT 間隔，QTcF 及び QTcV）を測定した．また，投与後 2 及び 4 時間のオピカポン及び代謝物である BIA 9-1079 の血漿中濃度を測定した．

その結果，オピカポンは 600 mg/kg まで血圧，心拍数及び心電図パラメータに影響しなかった．

2.6.2.4.3 呼吸系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-6］

Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 8 例／群）にオピカポンを 30，300 及び 1000 mg/kg の投与量で単回経口投与し，全身プレチスモグラフィーを用いて呼吸系に対する作用を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．投与前，投与後 10，15，20，30，60，90，120，180 及び 240 分に吸気時間，呼気時間，最大吸気流量，最大呼気流量，1 回換気量，呼吸数，弛緩時間，呼吸休止及びエンハンスドポーズ（Penh）を測定した．

オピカポンは，300 mg/kg 以上で呼吸数を減少させ，吸気時間，呼気時間及び弛緩時間を延長した．また，有意な差ではないが 1 回換気量を軽度に上昇させた．いずれも軽度な変化であり，投与後 60 分までにほぼ回復した．オピカポンは最大吸気流量，最大呼気流量，呼吸休止及び Penh には影響しなかった．

以上より，オピカポンの呼吸系に対する無影響量は 30 mg/kg と判断した．

2.6.2.4.4 腎／泌尿器系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-7］

Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 12 例／群）にオピカポンを 30，300 及び 1000 mg/kg の投与量で単回経口投与し，腎／泌尿器系に対する作用を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．オピカポンの投与後 6 時間までの尿を採取し，尿量，尿 pH，尿中クレアチニン及び尿中電解質（ナトリウム，カリウム）を測定した．

その結果，オピカポンは 1000 mg/kg まで尿量，尿 pH，尿中クレアチニン及び尿中電解質に影響しなかった．

2.6.2.4.5 胃腸管系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-8］

Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 8 例／群）にオピカポンを 30，300 及び 1000 mg/kg の投与量で単回経口投与し，消化管輸送能に対する作用を検討した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．オピカポンの投与後 1 時間に活性炭懸

濁液を 2 mL/body の容量で経口投与し，その 20 分後に小腸を摘出し，小腸全長に対する炭末移行率を評価した．

その結果，オピカポンは 1000 mg/kg まで消化管輸送能に影響しなかった．

2.6.2.4.6 代謝物の安全性薬理試験

2.6.2.4.6.1 BIA 9-1103 の hERG チャネル電流に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-9］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3 標本／濃度）を用いて，BIA 9-1103 の hERG チャネル電流に対する作用を検討した．BIA 9-1103 は DMSO に溶解して灌流液に添加し，1，3，10 及び 30 μg/mL の濃度で試験を実施した．

その結果，BIA 9-1103 は 30 μg/mL まで hERG チャネル電流に影響しなかった．

2.6.2.4.6.2 BIA 9-1103 のイヌ摘出心筋の活動電位に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-10］

雄ビーグル犬より摘出したプルキンエ線維（6 標本／濃度）を用いて，心筋の活動電位に対する BIA 9-1103 の作用を検討した．BIA 9-1103 は DMSO に溶解して灌流液に添加し，1，3 及び 10 μg/mL の濃度で試験を実施した．灌流開始前及び灌流開始後 30 分まで 5 分毎に，静止膜電位（RMP），活動電位最大立ち上がり速度（Vmax），活動電位振幅（APA），30，60 及び 90%再分極時の活動電位持続時間（APD_{30}，APD_{60} 及び APD_{90}）並びに活動電位三角化（APT＝APD_{90}-APD_{60}）を測定した．また，刺激頻度を変えて測定することにより，オピカポンの逆頻度依存性（高頻度刺激時に APD 延長作用が減弱すること）を検討した．

その結果，BIA 9-1103 は 10 μg/mL でイヌ心筋の活動電位持続時間（APD_{60} 及び APD_{90}）を延長したが，いずれの投与量においても逆頻度依存性は示さなかった．

以上より，BIA 9-1103 のイヌ心筋の活動電位に対する無影響量は 3 μg/mL であった．

2.6.2.4.6.3 BIA 9-1079 の安全性薬理試験

［参考資料：4.2.1.3-11，4.2.1.3-12，4.2.1.3-13，4.2.1.3-14，4.2.1.3-15，4.2.1.3-16，4.2.1.3-17，4.2.1.3-18］

試験方法及び結果の概略を表 2.6.2.4.6.3-1 に示した．

中枢神経系に対しては，ラットにおいて 30 mg/kg で軽度な接触過敏，300 mg/kg で排便又は下痢を示した．1000 mg/kg では投与液の高粘性に起因したと考えられる常同行動（咀嚼）や呼吸数の減少，筋緊張の低下，鼻からの出血が認められた．ラットの一般症状に対する無影響量は 30 mg/kg 未満であった．

心血管系に対しては，hERG チャネル電流を 30 μ mol/L（12 μ g/mL）以上で抑制し，IC_{50} 値は 121.13 μ mol/L（48.11 μ g/mL）と算出された．また，1 μ g/mL 以上でイヌ心筋の APD_{30} 及び APD_{60} の短縮，APT の延長，3 μ g/mL 以上で RMP の上昇，Vmax の低下及び APA の減少，10 μ g/mL では APD_{90} の短縮を示し，無影響量は 0.1 μ g/mL であった．覚醒イヌの血圧，心拍数及び心電図に対しては，600 mg/kg（投与後 4 時間の血漿中濃度 7.08 μ g/mL）まで影響しなかった．

呼吸系に対しては，ラットにおいて 300 mg/kg 以上で軽度な呼気時間の減少及び最大呼気流量の増加を示し，無影響量は 30 mg/kg であった．

腎／泌尿器系に対しては，ラットにおいて 300 mg/kg 以上でナトリウムの排出の減少，カリウム及びクレアチニンの排出の増加を示した．1000 mg/kg では 9/12 例が死亡し，生存例 3 例では 300 mg/kg で認められた変化に加え，尿量の減少及び尿 pH の上昇を示した．無影響量は 30 mg/kg であった．

胃腸管系に対しては，300 mg/kg 以上で消化管輸送の減少傾向を示したが，対照群と比較して有意な変化ではなく，1000 mg/kg まで消化管輸送能に影響しないと判断した．

表 2.6.2.4.6.3-1　BIA 9-1079 の安全性薬理試験の概略

試験項目	試験系（例数）	評価濃度	結果	資料番号
中枢神経系に対する作用				
一般症状及び行動に対する作用（Irwin 法）	Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 4 例／群）	30，300 及び 1000 mg/kg [a]，単回経口投与	30 mg/kg：接触過敏 300 mg/kg：排便，下痢 1000 mg/kg：咀嚼，呼吸数の減少，筋緊張の低下，鼻からの出血	[4.2.1.3-11]
心血管系に対する作用				
hERG チャネル電流	hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3-4 標本／濃度）	3，10，30 及び 100 μ mol/L（1.2，4.0，12 及び 40 μ g/mL）[b]	30 μ mol/L：25.6%抑制 100 μ mol/L：45.5%抑制 IC_{50} 値：121.13 μ mol/L（48.11 μg/mL）	[4.2.1.3-12]
心筋活動電位	雄ビーグル犬より摘出したプルキンエ線維（6 標本／濃度）	0.1，1 及び 10 μ g/mL [b]	0.1 μ g/mL：無影響 1 μ g/mL 以上： APD_{30} 及び APD_{60} 短縮，APT の延長 10 μ g/mL： APD_{90} の短縮 RMP の上昇， Vmax の低下， APA の減少	[4.2.1.3-13]

a: 対照群には媒体である 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．
b: DMSO に溶解して灌流液に添加し，各濃度とした．

表 2.6.2.4.6.3-1　BIA 9-1079 の安全性薬理試験の概略（つづき）

試験項目	試験系（例数）	評価濃度	結果	資料番号
心血管系に対する作用				
心筋活動電位	雄ビーグル犬より摘出したプルキンエ線維（4-6 標本／濃度）	1，3 及び 10 μg/mL [a]	1 μg/mL 以上： APD_{30}，APD_{60} 及び APD_{90} の短縮 3 μg/mL 以上： RMP の上昇， Vmax の低下， APA の減少	[4.2.1.3-14]
テレメトリーシステム	ビーグル犬（雄 4 例／群）	60，200 及び 600 mg/kg [b]，単回経口投与	600 mg/kg まで心血管系パラメータに影響なし	[4.2.1.3-15]
呼吸系に対する作用				
呼吸機能に対する作用	Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 8 例／群）	30，300 及び 1000 mg/kg [c]，単回経口投与	30 mg/kg：無影響 300 mg/kg 以上： 軽度な呼気時間の減少，最大呼気流量の増加	[4.2.1.3-16]
腎／泌尿器系に対する作用				
利尿及び電解質排泄に対する作用	Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 12 例／群）	30，300 及び 1000 mg/kg [c]，単回経口投与	30 mg/kg：無影響 300 mg/kg 以上： ナトリウムの排出の減少，カリウム及びクレアチニンの排出の増加 1000 mg/kg： 尿量減少，尿 pH 上昇	[4.2.1.3-17]
胃腸管系に対する作用				
消化管輸送能に対する作用	Rj:Wistar(Han)系ラット（雄 8 例／群）	30，300 及び 1000 mg/kg [c]，単回経口投与	300 mg/kg 以上： 消化管輸送の減少傾向（対照群と比べ最大-10%，有意差なし）．影響なしと判断．	[4.2.1.3-18]

a: DMSO に溶解して灌流液に添加し，各濃度とした．
b: ゼラチンカプセルに充填した．対照群には空カプセルを投与した．
c: 対照群には媒体である 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．

2.6.2.5　　薬力学的薬物相互作用試験

レボドパ及びベンセラジドとの薬力学的薬物相互作用について，2.6.2.2.2 項に記載した．

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験

パーキンソン病治療のために投与されたレボドパは，末梢から中枢に移行した後にドパミンへ代謝され，線条体に発現するドパミン D_1 及び D_2 受容体に作用して抗パーキンソン病作用を示す．しかし，レボドパは末梢において速やかに代謝されるため，脳への移行率が低く，作用持続時間も短い．したがって，レボドパはその代謝酵素であるドパ脱炭酸酵素の阻害剤（ベンセラジドあるいはカルビドパ）との配合剤として臨床使用される．一方，レボドパの代謝には COMT も関与し，ドパ脱炭酸酵素が阻害された条件下では COMT がレボドパの主な代謝経路となる [2)]．COMT は，脳，肝臓，腎臓，腸管，赤血球などの組織に広く分布する酵素であり，レボドパのカテコール骨格上の水酸基をメチル化し，レボドパを薬理学的に不活性な 3-OMD へ代謝する．したがって，COMT を阻害することで，レボドパの作用持続時間をドパ脱炭酸酵素の阻害剤併用時よりも更に改善することができると考えられる．

In vitro 試験において，オピカポンは遺伝子組み換えヒト S-COMT 及びラット肝臓由来 S-COMT を阻害し，その Ki 値はそれぞれ 0.02 及び 0.2 nmol/L であった．また，オピカポンのヒト S-COMT に対する阻害は，トルカポンに比べて 10 倍強い作用であった．S-COMT 濃度に対する反応速度の解析から，オピカポンは tight-binding 様式でヒト及びラット S-COMT を阻害することが明らかとなった．一方，オピカポンと S-COMT を反応させると，オピカポンのカテコール骨格の水酸基がメチル化されたことから，オピカポンは COMT の阻害剤であると同時に，自らがメチル化修飾を受ける基質であった．

In vivo 試験において，オピカポンの COMT 阻害作用をラット及びサルを用いて検討した．

ラットにおいて，オピカポンは投与用量に応じて肝臓の COMT 活性を阻害し，3 mg/kg では単回経口投与後 8 時間まで阻害作用が持続した．一方，トルカポンやエンタカポンは，3 mg/kg の単回経口投与後 0.5～1 時間で肝臓の COMT 活性を強く阻害したが，投与後 9 時間には阻害作用が消失していた．したがって，オピカポンはトルカポンやエンタカポンよりも COMT 阻害の作用持続時間が長かった．オピカポンは 3 mg/kg の単回経口投与においてラット脳組織中の COMT 活性を阻害しなかった．ラットにおける薬物動態試験において，^{14}C-オピカポンを 10 mg/kg で単回経口投与した際の脳中放射能濃度はすべての時点で定量下限未満であった［2.6.4.4.1］．したがって，オピカポンは脳に移行しにくいため，中枢の COMT 活性には影響しないと考えられた．オピカポンを 5 日間反復経口投与したとき，最終投与後 1 日でも肝臓の COMT 活性を阻害したが，肝臓中の COMT 遺伝子及びタンパク発現量には変化がなかった．したがって，オピカポンによる持続的な COMT 活性の低下は，COMT 遺伝子及びタンパク発現量の低下によるものでなく，直接的な酵素阻害作用の持続によるものと考えられた．

サルにオピカポンを 14 日間反復経口投与した試験において，オピカポンは初回投与後 1 時間から投与量に応じて赤血球の COMT 活性を阻害した．また，最終投与後 24 時間でも投与量に応じた阻害作用が持続し，100 mg/kg/日での阻害率は 75%であった．同様に，100 mg/kg/日を 14 日間反復経口投与したとき，最終投与後 24 時間の血漿中オピカポン濃度は定量下限未満であったが，COMT 阻害率は 72%であった．Tight-binding する酵素阻害は，薬物濃度が検出限界以下まで低下した後も，酵素阻害が持続すると言われている [3),4)]．これらのことから，オピカポンは tight-binding 様式により COMT 活性阻害を発揮するため，血漿中からオピカポンが消失しても，COMT 阻害活性が持続すると考えられた．

オピカポンとレボドパ及びドパ脱炭酸酵素阻害剤のベンセラジドを併用投与したときの，血漿中及び脳内レボドパ濃度に及ぼす影響を，ラット及びサルを用いて検討した．

ラットにおいて，オピカポンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与した後，レボドパ／ベンセラジド（12/3 mg/kg）を経口投与すると，媒体投与群と比較して血漿中及び脳内レボドパ濃度が増加し，その作用はオピカポン投与後 24 時間まで持続した．一方，オピカポンと同用量のトルカポンでは，血漿中及び脳内レボドパ濃度に対して持続した作用を認めなかった．

サルにおいて，オピカポンを 100 mg/kg/日の投与量で 14 日間反復経口投与し，最終投与後 23 時間にレボドパ／ベンセラジドを経口投与すると，媒体投与群と比較して血漿中レボドパ濃度が増加するとともに，線条体，黒質及び前頭前皮質中のレボドパ濃度も増加した．血漿中レボドパ濃度の AUC6h は，媒体投与群と比較して 2.0 倍の増加し，線条体中レボドパ濃度の AUC6h も同様に増加傾向にあった．また，同評価期間中の赤血球 COMT 活性は，オピカポン投与開始前の 30%未満にまで低下した．したがって，オピカポンは末梢の COMT を持続的に阻害することで血漿中レボドパ濃度を増加かつ持続させ，その結果，パーキンソン病の運動症状改善に重要な線条体へのレボドパの移行を向上させると考えられた．

パーキンソン病モデルに対するオピカポンの作用を検討するため，サルの MPTP 誘発パーキンソン病モデルに，オピカポンを 100 mg/kg/日の投与用量で 14 日間反復経口投与し，経日的にパーキンソン様症状及び自発運動量を評価した．また，レボドパ／ベンセラジドの有効性に対するオピカポンの上乗せ効果を検討するため，レボドパ／ベンセラジド投与前 12 時間にオピカポンを投与した．オピカポンは，パーキンソン様症状及び運動症状に対して単独投与では効果を示さなかったが，レボドパ／ベンセラジド（18/4.5 mg/kg 及び 24/6 mg/kg）のパーキンソン様症状及び自発運動量に対する改善作用を有意に増強した．本作用は，オピカポンが COMT 阻害によりレボドパの血漿中濃度を増加かつ持続させ，脳内へのレボドパの移行を向上させた結果と考えられた．

オピカポンの主代謝物として，ヒトでは BIA 9-1103，動物では BIA 9-1079 が生成される．BIA 9-1103 は S-COMT を阻害しなかったが，BIA 9-1079 は S-COMT を阻害し，IC_{50} 値は 429

nmol/L（170 ng/mL）であった．同試験で，オピカポンは 224 nmol/L（93 ng/mL）の IC_{50} 値で S-COMT を阻害した．ラットにオピカポンを 10 mg/kg で単回経口投与したときの血漿中オピカポン及び BIA 9-1079 濃度の Cmax は，それぞれ 1423 及び 55.16 ng/mL であり［2.6.4.5.2］，ラットにおけるオピカポンの COMT 阻害作用に対する BIA 9-1079 の寄与は低いと考えられた．一方，サルにオピカポンを経口投与したときの BIA 9-1079 の Cmax は，オピカポンと同程度であり［2.6.4.3.3.2］，オピカポンの COMT 阻害作用に対して BIA 9-1079 は部分的に寄与すると考えられた．ヒトにおける血漿中 BIA 9-1079 濃度は多くの時点で定量下限未満と低かったため［2.7.6.15］，臨床におけるオピカポンの COMT 阻害作用に BIA 9-1079 は寄与しないと考えられた．また，オピカポンは COMT によりカテコール骨格の水酸基がメチル化され，3-*O*-メチル化体である BIA 9-1100 及び [redacted] である BIA 9-1104 が生成される．BIA 9-1100 は S-COMT を阻害しなかったが，BIA 9-1104 は S-COMT を阻害し，IC_{50} 値は 128 nmol/L（55 ng/mL）であった．しかし，ヒトにオピカポン 25 mg/日を 10 日間反復投与したときの BIA 9-1104 の血漿中濃度はすべての時点で定量下限未満であり［2.7.6.15］，オピカポンの COMT 阻害作用に BIA 9-1104 の寄与は低いと考えられた．

以上の有効性薬理試験の結果から，オピカポンは既存の COMT 阻害剤よりも強力かつ持続性に優れたパーキンソン病治療薬であると結論した．

2.6.2.6.2 副次的薬理試験

各種受容体，輸送体及び酵素に対する作用の検討において，オピカポンは PP2A 及び ZAP70 をそれぞれ 45 及び 17 μmol/L（18.54 及び 7.18 μg/mL）の IC_{50} 値で阻害した．また，オピカポンは 10 μmol/L（4.13 μg/mL）の濃度で TSPO の標識リガンドとの結合を 82%阻害した．ヒトの主代謝物である BIA 9-1103 は，PDE5A1 を 63 μmol/L（35.95 μg/mL）の IC_{50} 値で阻害した．また，BIA 9-1103 は 10 μmol/L（5.72 μg/mL）の濃度で TSPO への標識リガンドの結合を 88%阻害した．しかし，オピカポン及び BIA 9-1103 の各標的に対する作用濃度は，ヒトにオピカポン 25 mg/日を投与したときのオピカポンの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］及び BIA 9-1103 の Cmax 0.54 μg/mL［2.7.6.15］より高く，オピカポンと BIA 9-1103 の蛋白結合率が 99%以上［2.6.4.4.2］と高いことを加味すると，生体では更に乖離幅が広がると考えられた．したがって，これらの副次的薬理作用が臨床で問題となる可能性は低いと推察された．

2.6.2.6.3 安全性薬理試験

オピカポンの安全性薬理試験として，中枢神経系，心血管系，呼吸系，腎／泌尿器系及び胃腸管系に対する作用を検討した．

1）中枢神経系に対する作用

ラットの一般症状及び行動観察において，オピカポンの投与後 15 分から Tmax の 2 時間付近で，30 mg/kg で活動性亢進及び接触過敏といった軽度な興奮作用，300 mg/kg 以上では活動性低下や筋緊張低下などの鎮静作用及び頭部攣縮が認められ，その無影響量は 30 mg/kg 未満であった．一方，ラットを用いた 26 週間までの反復投与毒性試験では，最高投与量の 1000 mg/kg/日（初回投与時：Cmax：雄 16.47 μg/mL，雌 23.37 μg/mL）まで中枢神経系への影響を示唆する変化は認められず［2.6.6.3.5］，ヒトにオピカポン 25 mg/日投与したときの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］に対する中枢神経系に対する安全域は 17.0～24.1 倍であった．ラットにおける薬物動態試験において，^{14}C-オピカポンを 10 mg/kg で単回経口投与した際の脳中放射能濃度はすべての時点で定量下限未満であったことから［2.6.4.4.1］，オピカポンが中枢神経系に直接的に作用する可能性は低く，上記の一般症状の変化はオピカポンの中枢作用を示唆する変化ではないと考えられた．中枢神経系への影響がみられたラットの 30 mg/kg における Cmax は 1.24 μg/mL（ラット 26 週間反復投与毒性試験の 100 mg/kg の初回投与時の Cmax から算出）と推察され，ヒトにオピカポン 25 mg/日投与したときの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］はこの血中濃度より若干低いが，海外第 I 相試験（BIA-91067-101）においては最高投与量の 1200 mg（Cmax：4.9 μg/mL）まで中枢神経系に対する影響は認められなかった［2.7.2.2.2.1］．以上より，オピカポンの臨床における中枢神経系の安全性に対する懸念は低いと考えられた．

2）心血管系に対する作用

オピカポンは *in vitro* において 30 μmol/L（12 μg/mL）以上で hERG チャネル電流を抑制し，IC_{50} 値は 388.9 μmol/L（160.7 μg/mL）と算出された．ヒトにオピカポン 25 mg/日投与したときの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］であり，オピカポンのヒト血漿蛋白への結合率 99.9%［2.6.4.4.2.1］から非結合型濃度は 0.00097 μg/mL と算出され，hERG チャネル電流の IC_{50} 値に対して約 17 万倍の乖離があると考えられた．また，オピカポンは 10 μg/mL までイヌ心筋の活動電位に影響せず，覚醒イヌにおいて 200 及び 600 mg/kg（Cmax：6.94～7.62 μg/mL）において血圧，心拍数及び心電図に対する影響を示さなかった．ヒトに 25 mg/日投与したときの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］は，イヌの *in vivo* での心血管系に対する無影響量の Cmax に対し，7.8 倍の安全域があった．また，Thorough QT 試験（オピカポン 50 及び 800 mg）において，QTc の延長作用は認められなかった［2.7.2.2.6.1］．以上より，オピカポンの臨床における心血管系の安全性に対する懸念は低いと考えられた．

3）呼吸系に対する作用

オピカポンはラットにおいて 300 mg/kg 以上で呼吸数の減少並びに吸気時間，呼気時間及び弛緩時間の延長などの呼吸抑制作用を示したが，投与後 60 分までにほぼ回復した．無影

響量は 30 mg/kg であった．ラットを用いた 26 週間までの反復投与毒性試験では，最高投与量の 1000 mg/kg/日（Cmax：雄 16.47 μg/mL，雌 23.37 μg/mL）まで呼吸系への影響を示唆する変化は認められず［2.6.6.3.5］，ヒトに 25 mg/日投与したときの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］は，反復投与毒性試験における呼吸系に対する安全域は 17.0～24.1 倍であった．また，ラットの呼吸系への無影響量 30 mg/kg における Cmax は 1.24 μg/mL と推察され，ヒトにオピカポン 25 mg/日投与したときの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］を超えており，海外第 I 相試験（BIA-91067-101）において最高投与量の 1200 mg（Cmax：4.9 μg/mL）まで呼吸系に対する影響は認められなかった［2.7.2.2.2.1］．以上より，オピカポンの臨床における呼吸系の安全性に対する懸念は低いと考えられた．

4）胃腸管系及び腎／泌尿器系に対する作用

オピカポンはラットにおいて最高投与量である 1000 mg/kg まで消化管輸送能及び腎機能（尿量，尿 pH，尿中クレアチニン及び尿中電解質排泄）に影響を及ぼさなかった．ヒトにオピカポン 25 mg/日投与したときの Cmax 0.97 μg/mL［2.7.1.2.1.3］に対し，ラットに 1000 mg/kg 投与したときの Cmax：雄 16.47 μg/L，雌 23.37μg/L であることから［2.6.6.3.5］，安全域は 17.0～24.1 倍であった．以上より，オピカポンの臨床における胃腸管系及び腎／泌尿器系の安全性に対する懸念は低いと考えられた．

5）代謝物の安全性

ヒトの主代謝物である BIA 9-1103 について，hERG チャネル電流及びイヌ摘出心筋の活動電位に対する作用の検討を実施した．BIA 9-1103 は 30 μg/mL まで hERG チャネル電流に影響しなかったが，10 μg/mL でイヌ心筋の活動電位持続時間（APD_{60} 及び APD_{90}）を延長し，無影響量は 3 μg/mL であった．これに対し，ヒトにオピカポン 25 mg/日投与したときの BIA 9-1103 の Cmax 0.54 μg/mL［2.7.6.15］であり，ヒト血漿蛋白への結合率 99.51～99.68％［2.6.4.4.2.2］から，非結合型濃度は 0.00173～0.00265 μg/mL と算出されることから，安全域は 1100～1700 倍であった．イヌへの経口投与では血漿中に BIA 9-1103 は検出されなかったことから［2.6.5.10.3］，*in vivo* における安全域は確認できなかったが，上述の *in vitro* 試験の結果から，臨床おいて QT や心筋再分極に影響する可能性は低いと考えられた．また，ラットの 13 週間反復投与 TK 試験［2.6.6.3.4］における 1000 mg/kg の単回投与時の BIA 9-1103 の Cmax：雄 10.60 μg/mL，雌 3.26 μg/mL は，ヒトにオピカポン 25 mg を投与したときの Cmax 0.54 μg/mL［2.7.6.15］を超えており，中枢神経系，呼吸系，胃腸管系及び腎／泌尿器系に対する作用は，オピカポン投与によるラットの各試験で安全性が評価されていると考えられた．以上より，BIA 9-1103 が臨床において有害作用を示す可能性は低いと考えられた．

BIA 9-1079 は，開発初期段階の原薬に含まれる不純物であり，かつ動物の血漿中主代謝物の 1 つであるため，各種の安全性薬理試験を実施し，中枢神経系や呼吸系，腎／泌尿器系に

対する作用を認めたが，ヒトにオピカポン 25 mg/日投与したときの血漿中 BIA 9-1079 濃度は多くの時点で定量下限未満であり［2.7.6.15］，動物を用いた安全性薬理試験における各作用に対して，十分な安全域があることから，臨床において BIA 9-1079 による安全性の懸念はないと考えられた.

以上の結果から，オピカポンは安全性薬理試験において安全性が確認されており，代謝物による有害作用の可能性も低いことから，臨床において問題となる可能性は低いと結論した.

2.6.2.7 参考文献一覧

1） Myöhänen TT. Männistö PT. Distribution and functions of catechol-O-methyltransferase proteins: do recent findings change the picture? Int Rev Neurobiol 2010;95: 29-47.

2） Nissinen E. Introductory remarks: Catechol-O-methyltransferase inhibition--an innovative approach to enhance L-dopa therapy in Parkinson's disease with dual enzyme inhibition. Int Rev Neurobiol 2010;95:1-5.

3） Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. Nat Rev Drug Discov 2006;5:730-9.

4） Walkup GK, You Z, Ross PL, Allen EK, Daryaee F, Hale MR, et.al. Translating slow-binding inhibition kinetics into cellular and *in vivo* effects. Nat Chem Biol 2015;:11:416-23.

2.6.3 薬理試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.3 薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.3.3 副次的薬理試験 16
2.6.3.4 安全性薬理試験 18
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 28

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Type of Study	Test Article	Test System / or Species / Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
S-COMT inhibition (different pre-incubation times)	Opicapone Tolcapone	Human recombinant S-COMT	*In vitro*	Bial-Portela & C[a], S.A., Portugal	SROPC [redacted]0102	4.2.1.1-1
Evaluation of opicapone as substrate for S-COMT						
Inhibition constant determination						
S-COMT inhibition	Opicapone, tolcapone, BIA 9-1103, BIA 9-1079, BIA 9-1100, BIA 9-1104	Rat liver S-COMT	*In vitro*	Bial-Portela & C[a], S.A., Portugal	SROPC [redacted]0104	4.2.1.1-2
S-COMT inhibition (rat liver, erythrocytes)	Opicapone, tolcapone	Rat / Wistar	Oral gavage; 5 days	Bial-Portela & C[a], S.A., Portugal		
COMT gene expression and protein quantification	Opicapone					
COMT inhibition (rat liver, kidney, brain, erythrocytes)	Opicapone, tolcapone, entacapone	Rat / Wistar	Oral gavage; single dose	Bial-Portela & C[a], S.A., Portugal	SROPC [redacted]0103	4.2.1.1-3
Effects on levodopa systemic availability	Opicapone, tolcapone before levodopa/benserazide					
Effects on levodopa and catecholamine availability in brain	Opicapone, tolcapone before levodopa/benserazide					
COMT inhibition in erythrocytes	Opicapone	Monkey / Cynomolgus	Oral gavage;14 days	[redacted]	AL-6507	4.2.1.1-4
				ONO Pharmaceutical Co., Ltd.	Y[redacted]CA018	4.2.1.1-5
COMT inhibition in erythrocytes (dose response)	Opicapone	Monkey / Cynomolgus	Oral gavage;14 days	[redacted]	AL-6524-G	4.2.1.1-6

2.6.3.1 **薬理試験：一覧表（続き）**

Type of Study	Test Article	Test System / or Species / Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
COMT inhibition in erythrocytes	Opicapone before levodopa/benserazide	Monkey / Cynomolgus	Oral gavage;14 days	Bial-Portela & C[a], S.A., Portugal	SRMJB [redacted]1022	4.2.1.1-7
Levodopa pharmacokinetics in plasma	Opicapone before levodopa/benserazide	Monkey / Cynomolgus	Oral gavage;14 days			
Levodopa and catecholamine levels in brain	Opicapone before levodopa/benserazide	Monkey / Cynomolgus	Oral gavage;14 days			
Effects on behavioural defects in MPTP model	Opicapone before levodopa/benserazide	Monkey / Cynomolgus	Oral gavage;19/20 days	[redacted] Singapore	HSU0005	4.2.1.1-8
S-COMT inhibition (rat liver)	BIA 9-1103	Rat liver S-COMT	*In vitro*	Bial-Portela & C[a], S.A., Portugal	SRMJB [redacted]0522	4.2.1.1-9

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study	Test Article	Test System / or Species / Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics						
Binding assays	Opicapone BIA 9-1103	Receptor binding and enzyme inhibition	*In vitro*	[redacted] USA	[redacted]-8004	4.2.1.2-1
Determination of IC50	Opicapone BIA 9-1103	Enzyme inhibition	*In vitro*	[redacted] USA	[redacted]-8354	4.2.1.2-2

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study	Test Article	Test System / or Species / Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Safety Pharmacology						
Central Nervous System						
Behaviour and physiological function (Irwin test)	Opicapone	Rat/ Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted].090/2	4.2.1.3-1
Cardiovascular System						
hERG channel inhibition	Opicapone	HEK 293 cells	*In vitro*	[redacted] Switzerland	A0017	4.2.1.3-2
Action potential	Opicapone	Beagle dogs, Purkinje fibres	*In vitro*	[redacted] France	[redacted].482/3	4.2.1.3-3
Action potential	Opicapone	Beagle dogs, Purkinje fibres	*In vitro*	[redacted] France	[redacted].0531	4.2.1.3-4
Cardiovascular function	Opicapone	Dog / Beagle	Oral (capsule); single dose	[redacted] France	[redacted].094/3	4.2.1.3-5
Respiratory System						
Respiratory function	Opicapone	Rat / Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted].093/2	4.2.1.3-6
Renal System						
Diuresis and electrolyte excretion	Opicapone	Rat / Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted].092/2	4.2.1.3-7
Gastrointestinal System						
Gastrointestinal transit	Opicapone	Rat/ Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted].091/2	4.2.1.3-8

HEK: Human embryonic kidney; hERG: human-ether-a-go-go related gene
The Facility name "[redacted]" was changed to "[redacted]". Those are identical facilities.

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study	Test Article	Test System / or Species / Strain	Method of Administration	Testing Facility	Study No.	Location in CTD
Safety Pharmacology in Metabolite						
BIA 9-1103						
Central Nervous System						
hERG channel inhibition	BIA 9-1103	HEK 293 cells	*In vitro*	[redacted] Switzerland	A0539	4.2.1.3-9
Action potential	BIA 9-1103	Beagle dogs, Purkinje fibres	*In vitro*	[redacted] France	[redacted].0533	4.2.1.3-10
BIA 9-1079						
Cardiovascular System						
Behaviour and physiological function (Irwin test)	BIA 9-1079	Rat/ Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted]346/2	4.2.1.3-11
hERG channel inhibition	BIA 9-1079	HEK 293 cells	*In vitro*	[redacted] Switzerland	A0018	4.2.1.3-12
Action potential	BIA 9-1079	Beagle dogs, Purkinje fibres	*In vitro*	[redacted] France	[redacted].511/2	4.2.1.3-13
Action potential	BIA 9-1079	Beagle dogs, Purkinje fibres	*In vitro*	[redacted] France	[redacted].0532	4.2.1.3-14
Cardiovascular function	BIA 9-1079	Dog / Beagle	Oral (capsule); single dose	[redacted] France	[redacted].345/2	4.2.1.3-15
Respiratory System						
Respiratory function	BIA 9-1079	Rat / Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted].349/2	4.2.1.3-16
Renal System						
Diuresis and electrolyte excretion	BIA 9-1079	Rat / Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted].348/2	4.2.1.3-17
Gastrointestinal System						
Gastrointestinal transit	BIA 9-1079	Rat/ Rj: Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	[redacted] France	[redacted].347/2	4.2.1.3-18

HEK: Human embryonic kidney; hERG: human-ether-a-go-go related gene
The Facility name "[redacted]" was changed to "[redacted]". Those are identical facilities.
The Facility name "[redacted]" was changed to "[redacted]" in description. Those are identical facilities.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg) / Concentration	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
Inhibitory effects on S-COMT with varying pre-incubation times	Experiment 1: Opicapone and tolcapone: 0, 30, 60 and 100 nmol/L (incubation times of 0, 5, 15, 30, 60, 120 and 180 min)	Human recombinant S-COMT	*In vitro*	Opicapone and tolcapone showed no pre-incubation time dependent increase in the inhibition level with human recombinant S-COMT.	[4.2.1.1-1] SROPC [redacted]0102
Evaluation as substrate for S-COMT	Experiment 2: Opicapone: 50 µmol/L (incubation times of 0, 30, 60 and 120 min)	Human recombinant S-COMT	*In vitro*	There was a time dependent production of both the 3- and [redacted] opicapone (BIA 9-1100 and BIA 9-1104, respectively).	
Inhibition constant determination	Experiment 3: Opicapone and tolcapone: 0, 60, 100 and 140 nmol/L	Human recombinant S-COMT	*In vitro*	Opicapone and tolcapone are tight-binding human recombinant S-COMT inhibitors with K_i values of 0.02 and 0.2 nmol/L for opicapone and tolcapone, respectively.	

Ki: inhibition constant;

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg) / Concentration	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
S-COMT inhibition (*in vitro*)	Opicapone, BIA 9-1079 and BIA 9-1104: 3, 30, 100, 300, 600, 1000 and 3000 nmol/L	Rat liver S-COMT	*In vitro*	Opicapone, BIA 9-1079 and BIA 9-1104 IC_{50} values for rat S-COMT of 224, 429 and 128 nmol/L, respectively.	[4.2.1.1-2] SROPC [redacted]0104
	Opicapone: 0, 75, 150, 225 and 300 nmol/L	Rat liver S-COMT	*In vitro*	K_i determined for opicapone was 0.2 nmol/L.	
S-COMT inhibition (*in vivo*)	Opicapone: 3 mg/kg Animals sacrificed on Days 1-8 and Day 12 Tolcapone: 3 mg/kg Animals sacrificed on Days 5-8 and Day 12	Rat / Wistar N=3-8	Oral gavage; 5 days	The chronic administration of opicapone results in significant inhibition of liver and erythrocyte COMT, with no cumulative inhibitory effect. Hepatic enzyme activity was fully recovered only after a 7-day washout period, while the erythrocyte enzyme activity recovered after a 1-day washout period. Tolcapone caused marked inhibition of hepatic COMT on Day 5 with recovery of enzyme activity by Day 7 (48 h after last dose). Erythrocyte enzyme activity recovered after a 1-day washout period.	
COMT expression	Opicapone: 3 and 30 mg/kg	Rat / Wistar N=4	Oral gavage; 5 days	Daily administration of 3 or 30 mg/kg opicapone for a period of 5 days did not induce changes in COMT protein or RNA levels in liver.	

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg) / Concentration	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
COMT inhibition in liver, kidney and brain homogenates and in erythrocytes	Opicapone : 3 mg/kg Animals sacrificed 15 and 30 min, 1, 2, 4, 8, 24 and 48 h after dosing Tolcapone: 3 mg/kg Animals sacrificed 30 min, 1, 3, 6, 9 and 24 h after dosing Entacapone: 3 mg/kg Animals sacrificed 30 min, 1, 3, 6, 9 and 24 h after dosing	Rat / Wistar N = 4-12 per group	Oral gavage; single dose	Opicapone led to strong inhibition (> 80%) of COMT activity in liver and kidney from 1 to 8 h post-administration. Enzyme activity recovered slowly reaching 70-86% of control values at 48 h. The inhibitory profile in erythrocytes was similar but inhibition was lower than that of liver and kidney. Entacapone and tolcapone showed a more transient effect in inhibiting COMT than opicapone. Tolcapone produced sustained inhibition of liver COMT in the first hours after administration however at 8 h post-administration the enzyme has already recovered 84% of control levels, while entacapone had a very short-lived inhibitory effect upon liver COMT, with the enzyme recovering full activity at 6 h post-administration. Neither opicapone nor entacapone showed any inhibitory effect on brain COMT while tolcapone reduced the activity of the brain enzyme by about 50% over the first 9 h post-administration.	[4.2.1.1-3] SROPC [redacted]0103
	Opicapone:0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/kg Animals were sacrificed 3 h after dosing Tolcapone:0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg Animals were sacrificed 3 h after dosing Entacapone: 0.3, 1, 3, 10, 30 mg/kg Animals were sacrificed 3 h after dosing	Rat / Wistar N = 3-12 per group	Oral gavage; single dose	Opicapone inhibited liver COMT with an ED_{50} of 0.9 mg/kg at 3 h. Tolcapone inhibited liver COMT with an ED_{50} of 1.4 mg/kg. Entacapone is the least potent compound in inhibiting liver COMT with an ED_{50} of 7.5 mg/kg at 3 h.	

ED_{50}: median (50 %) effective dose;

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg) / Concentration	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
Effects on levodopa systemic availability (microdialysis)	Levodopa/benserazide: 12/3 mg/kg on Days 1-3 Vehicle: on Days 1 and 3 Opicapone: 3 mg/kg given 2 h before levodopa/benserazide on Day 2 Tolcapone: 3 mg/kg given 2 h before levodopa/benserazide on Day 2 Microdialysis samples were collected on Days 1, 2, 3	Rat / Wistar N = 6-8 per group	Oral gavage; single dose of opicapone and tolcapone; Levodopa /benserazide: 3 days	Opicapone increased the bioavailability of levodopa by 1.9- and 1.3-fold, respectively, when given 2 h and 24 h before levodopa/benserazide and reduced 3-OMD bioavailability by 6.3- and 1.6-fold, respectively. Levodopa C_{max} values were increased by 1.6- and 1.4-fold, respectively, when opicapone was given 2 h and 24 h before levodopa/benserazide. Tolcapone was only efficacious in increasing levodopa bioavailability (1.6-fold), levodopa C_{max} (1.2-fold) and reducing 3-OMD bioavailability (10-fold) when given 2 h before levodopa/benserazide, showing no effects when given 24 h before levodopa/benserazide.	[4.2.1.1-3] SROPC [redacted]0103
Effects on levodopa and catecholamine availability in brain	Opicapone: 3 mg/kg Tolcapone 3 mg/kg Animals were sacrificed 1, 2, 7, 12 and 24 h after administration; levodopa/benserazide: 12/3 mg/kg (administered 1 h before sacrifice)	Rat / Wistar N = 4-11 per group	Oral gavage; single dose	Tolcapone led to significant increase in levodopa levels at 2 h and 7 h post-administration (respectively 464% and 274% control values), whereas opicapone although not inducing significant increases in the first 2 h kept sustained increased levodopa levels (above 227% control values) up to 24 h post-dose. Similar results were observed for DOPAC. No effects on dopamine and HVA levels with tolcapone treatment, whereas opicapone produced a modest but significant increase in dopamine and HVA levels. Tolcapone significantly reduced 3-OMD levels in the first 7 h, with values completely recovered after 24 h, whereas opicapone reduced 3-OMD levels close to 50% of control values from 2 h until 24 h after administration.	

C_{max}: maximum observed plasma concentration; DOPAC: dyhydroxyphenylacetic acid; ED_{50}: median (50 %) effective dose;
HVA: homovanillic acid; 3-OMD: 3-O-methyl-L-dopa;

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg) / Concentration	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
Effect of repeated dosing with opicapone on erythrocyte COMT activity in cynomolgus monkeys.	Control: Vehicle (0.2% HPMC) Opicapone: 100 mg/kg Blood samples were collected 1, 2, 4, 24 h after administration on Day 1 and Day 15.	Monkey / Cynomolgus N=3,female (crossover design)	Oral gavage; 14 days	Opicapone inhibited erythrocyte COMT activities for 24 h on Day 1 and 15.	[4.2.1.1-4] AL-6507 [4.2.1.1-5] Y[redacted]CA018
	Control: Vehicle (0.2% HPMC) Opicapone: 1, 10, 100 mg/kg Blood samples were collected 1, 2, 4, 24 h after administration on Day 1 and Day 15.	Monkey / Cynomolgus N=3, female (crossover design)	Oral gavage; 14 days	Opicapone dose-dependently inhibited erythrocyte COMT activities in monkey. 10 and 100 mg/kg administration of opicapone significantly inhibited erythrocyte COMT activity in monkey on Day 15.	[4.2.1.1-6] AL-6524-G

HPMC: hydroxypropyl methylcellulose;

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg) / Concentration	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
COMT inhibition in erythrocytes	Control: Vehicle (0.2% HPMC) Opicapone: 100 mg/kg Levodopa/benserazide: 12/3 mg/kg Oral gavage; 14 days Oral gavage; single dose given 23 h after the last vehicle / opicapone dose	Monkey / Cynomolgus N=3-4 (crossover design)	Oral gavage of opicapone; 14 days Oral gavage of Levodopa/ benserazide; single dose given 23 h after the last vehicle / opicapon	Erythrocyte COMT activity, measured for 6 h after levodopa/benserazide administration, was decreased in opicapone treated animals.	[4.2.1.1-7] SRMJB [redacted]1022
Levodopa pharmacokinetics in plasma				In opicapone treated animals there was a significant increase in plasma levodopa AUC6h and significant decrease in plasma 3-OMD AUC6h compared to vehicle.	
Levodopa and catecholamine levels in the brain				Catecholamine analysis in the brain showed a trend for an increase in levodopa levels in dorsal striatum, *substantia nigra* and prefrontal cortex and for decreased 3-OMD levels in dorsal striatum, prefrontal cortex and *substantia nigra* in opicapone treated animals. There was also a trend in opicapone treated animals for increased DOPAC and HVA levels in *substantia nigra*.	

AUC6h: area under the concentration-time curve from time zero to 6 h; DOPAC: dyhydroxyphenylacetic acid; HPMC: hydroxypropyl methylcellulose; HVA: homovanillic acid; 3-OMD: 3-O-methyl-L-dopa;

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg)	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
Effect on behavioural defects in MPTP model	Vehicle or opicapone for 19/20 days (dosing at 9 pm), on Days 15/16-20/21 Levodopa/benserazide administered at 9 am Control: Vehicle (0.2% HPMC) Opicapone: 100 mg/kg Levodopa/benserazide: 6/1.5, 9/2.25, 12/3, 18/4.5 and 24/6 mg/kg	Monkey/ Cynomolgus N=10 (crossover design)	Vehicle or opicapone: Oral gavage; 19/20 days Levodopa/benserazide: Oral gavage; 5 days, given at least 12 h after vehicle/opicapone	Daily administration of opicapone for 14 days had no effect on Parkinson's-like behaviour, as shown by the PPMRS scores and locomotor behaviour evaluation. The combination levodopa/benserazide therapy was effective in reducing PPMRS score and increasing distance travelled (locomotor behaviour) but only for the higher doses. Opicapone enhanced levodopa/benserazide efficacy in reducing PPMRS score and in increasing distance travelled (locomotor behaviour).	[4.2.1.1-8] HSU0005

PPMRS: Primate Parkinsonism Motor Rating Scale;

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Organ Systems Evaluated	Test Article Doses (mg/kg) / Concentration	Test System	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
S-COMT inhibition (*in vitro*)	BIA 9-1103: 10, 30, 100, 600, 1000, 1600, 2300 and 3000 nmol/L	Rat liver S-COMT	*In vitro*	BIA 9-1103 had no modulatory effect upon the activity of rat S-COMT up to concentrations of 3000 nmol/L.	[4.2.1.1-9] SRMJB [redacted]0522

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 オピカポン

Organ Systems Evaluated	Test System	Test Article and Concentration	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
Receptor binding and enzyme inhibition	Enzyme inhibition and radioligand binding assays	Opicapone: 10 µmol/L	*In vitro*	Opicapone inhibited radioligand binding of Ser/Thr phosphatase (PP2A) by 76.66% and ZAP70 kinase by 49.00%. It also inhibited radioligand binding of TSPO by 82.15%.	[4.2.1.2-1] [redacted]-8004
IC_{50} determination	Enzyme inhibition assay	Opicapone: 30, 100, 300 nmol/L and 1, 3, 10, 30, 100 µmol/L	*In vitro*	Opicapone had IC_{50} of 44.88 µmol/L for PP2A and IC_{50} of 17.38 µM for ZAP70.	[4.2.1.2-2] [redacted]-8354

PP2A: protein phosphatase 2A; TSPO: mitochondrial translocator protein; ZAP70: tyrosine kinase; phosphodiesterase 5A1: PDE5A1.

2.6.3.3.2 代謝物

Organ Systems Evaluated	Test System	Test Article and Concentration	Method of Admin.	Noteworthy Findings	Location in CTD Study No
Receptor binding and enzyme inhibition	Enzyme inhibition and radioligand binding assays	BIA 9-1103: 10 µmol/L	*In vitro*	BIA 9-1103 inhibited radioligand binding to TSPO by 88.17% and PDE5A1 by 54.90%.	[4.2.1.2-1] [redacted]-8004
IC_{50} determination	Enzyme assay	BIA 9-1103: 30, 100, 300 nmol/L and 1, 3, 10, 30, 100 µmol/L	*In vitro*	BIA 9-1103 had IC_{50} of 62.82 µmol/L for PDE5A1.	[4.2.1.2-2] [redacted]-8354

TSPO: mitochondrial translocator protein; phosphodiesterase 5A1: PDE5A1

2.6.3.4 安全性薬理試験

2.6.3.4.1 オピカポンの安全性薬理試験

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Central Nervous System	Behaviour and physiological function (Irwin test)	Opicapone	Rat / Rj:Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	Opicapone: 0 (vehicle), 30, 300, 1000	M 4	30 mg/kg: Weak excitatory effects (excitation and increased reactivity to touch) observed. 300 mg/kg: Sedative effects (sedation and motor signs), head-twitches and defaecation/diarrhoea observed. 1000 mg/kg: Sedative effects (sedation and motor signs), head-twitches, defaecation/diarrhoea, mydriasis and occasional bleeding observed. Decreased respiration was attributed to the very high viscosity of the administered preparation. NOEL= <30 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-1] [redacted]090/2
Cardio-vascular System	hERG channel inhibition	Opicapone	HEK 293 cells	*In vitro*	Opicapone: 0 (vehicle), 3, 10, 30, 100 µM E-4031: 100 nM	3 cells treated/ condition	3 µM (1.24 µg/mL): None. 10 µM (4.13 µg/mL): None. 30 µM (12.40 µg/mL): Reduced hERG tail current (87.27±1.40%, $p<0.01$ vs vehicle) observed. 100 µM (41.32 µg/mL): reduced hERG tail current (74.15±2.14%, $p<0.01$ vs vehicle) observed. The IC_{50} value for opicapone was 388.93 µM (160.70 µg/mL). E4031: Reduced hERG tail current (7.48±1.48% vs vehicle) observed.	Yes	[4.2.1.3-2] A0017

HEK: Human embryonic kidney; hERG: human-ether-a-go-go related gene

2.6.3.4.1 オピカポンの安全性薬理試験（続き）

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Cardiovascular System	Action potential	Opicapone	Purkinje fibres isolated from Beagle dogs	*In vitro*	Opicapone: 0.1, 1, 10 µg/mL	M 6	0.1 µg/mL: None. 1 µg/mL: None. 10 µg/mL: Slightly increased APD_{90} (+3% vs control, $p<0.05$) and APT (+18% vs control, $p<0.01$) observed at T25 min.	Yes	[4.2.1.3-3] [redacted].482/3
Cardiovascular System	Action potential	Opicapone	Purkinje fibres isolated from Beagle dogs	*In vitro*	Opicapone: 1, 3, 10 µg/mL	M 6	1 µg/mL: Decreased RMP (-1.9 mV, $p<0.05$) observed at T25 min. 3 µg/mL: None. 10 µg/mL: Decreased APD_{60} (-4% and -3% at T5 and T10 min, $p<0.01$ and $p<0.05$, respectively) and APD_{90} (-2%, -2% and -2% at T5, T10 and T30 min, $p<0.01$, $p<0.01$ and $p<0.05$, respectively) observed.	Yes	[4.2.1.3-4] [redacted].0531

APD_{60}: Action potential duration at 60 % repolarisation; APD_{90}: Action potential duration at 90 % repolarisation; APT: Action potential triangulation; RMP: Resting membrane potential; T: Time point

2.6.3.4.1 オピカポンの安全性薬理試験（続き）

<table>
<tr><th>System</th><th>Organ Systems Evaluated</th><th>Test Article</th><th>Species / Strain</th><th>Method of Admin.</th><th>Test Article Dose (mg/kg)</th><th>Gender and No. per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>GLP</th><th>Location in CTD Study No</th></tr>
<tr><td>Cardiovascular System</td><td>Cardiovascular function</td><td>Opicapone</td><td>Dog / Beagle; telemetered, conscious</td><td>Oral (capsule); single dose</td><td>Opicapone: 0 (empty capsule), 60, 200, 600</td><td>M 4[a]</td><td><u>60 mg/kg:</u> No effects on cardiovascular parameters.
<u>200 mg/kg</u>: No effects on cardiovascular parameters. Orange coloured faeces in 2 dogs. Vomiting and diarrhoea 3 days after dosing in 1 dog.
<u>600 mg/kg</u>: No effects on cardiovascular parameters. Orange coloured faeces in 1 dog 4 h after dosing and then in all animals the day after administration.
NOEL= 600 mg/kg
Toxicokinetics:
<table>
<tr><td>Time Point</td><td colspan="3">Dose (mg/kg)</td></tr>
<tr><td></td><td>60</td><td>200</td><td>600</td></tr>
<tr><td colspan="4">Opicapne (µg/mL)</td></tr>
<tr><td>2h</td><td>2.48</td><td>7.62</td><td>6.94</td></tr>
<tr><td>4h</td><td>0.46</td><td>1.84</td><td>3.82</td></tr>
<tr><td colspan="4">BIA 9-1079 (µg/mL)</td></tr>
<tr><td>2h</td><td>0.44</td><td>0.65</td><td>0.78</td></tr>
<tr><td>4h</td><td>0.56</td><td>0.96</td><td>1.03</td></tr>
</table></td><td>Yes</td><td>[4.2.1.3-5] [redacted].094/3</td></tr>
</table>

a: Dosing: 4 animals were used in total; each animal received vehicle and then 60, 200 and 600 mg/kg Opicapone with at least a 5-day washout between doses.

2.6.3.4.1　　オピカポンの安全性薬理試験（続き）

<table>
<tr><th>System</th><th>Organ Systems Evaluated</th><th>Test Article</th><th>Species / Strain</th><th>Method of Admin.</th><th>Test Article Dose (mg/kg)</th><th>Gender and No. per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>GLP</th><th>Location in CTD Study No.</th></tr>
<tr><td>Respiratory System</td><td>Respiratory function</td><td>Opicapone</td><td>Rat / Rj:Wistar (Han)</td><td>Oral gavage; single dose</td><td>Opicapone: 0 (vehicle), 30, 300, 1000
Theophylline: 100</td><td>M 8</td><td><u>30 mg/kg:</u> None.
<u>300 mg/kg:</u> Slightly increased inspiratory time, expiratory time and relaxation time, and slightly decreased respiratory rate observed over the first mins following the administration.
<u>1000 mg/kg</u>: Slightly increased inspiratory time, expiratory time, relaxation time and slightly decreased respiratory rate observed over the first mins following the administration.
<u>Theophylline</u>: Decreased inspiratory, expiratory and relaxation time, increased peak inspiratory and expiratory flow and respiratory rate, and slightly decreased tidal volume, pause and enhanced pause observed.
NOEL= 30 mg/kg

<table>
<tr><th rowspan="2">Dose (mg/kg)</th><th colspan="5">Percent of change in 15 min after administration from pre-value (%)</th></tr>
<tr><th>Inspiratory time</th><th>Expiratory time</th><th>Relaxation time</th><th>Respir-atory rate</th><th>Tidal volume</th></tr>
<tr><td>0</td><td>-30</td><td>-26</td><td>-19</td><td>+58</td><td>+5</td></tr>
<tr><td>30</td><td>-31</td><td>-24</td><td>-16</td><td>+57</td><td>+9</td></tr>
<tr><td>300</td><td>-23</td><td>+10*</td><td>+9*</td><td>+17*</td><td>+24</td></tr>
<tr><td>1000</td><td>-15**</td><td>+1</td><td>+11**</td><td>+12*</td><td>+36</td></tr>
</table>
Dunnett's tests: *p<0.05, **p<0.01</td><td>Yes</td><td>[4.2.1.3-6] [redacted].093/2</td></tr>
</table>

2.6.3.4.1 オピカポンの安全性薬理試験（続き）

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Renal System	Diuresis and electrolyte excretion	Opicapone	Rat / Rj:Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	Opicapone: 0 (vehicle), 30, 300, 1000 Furosemide: 32	M 12	30 mg/kg: None. 300 mg/kg: None. 1000 mg/kg: None. Furosemide: Increased urinary volume, sodium and potassium excretion and decreased creatinine excretion and the urinary pH observed. NOEL= 1000 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-7] [redacted].092/2
Gastro-intestinal System	Gastrointestinal transit	Opicapone	Rat / Rj:Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	Opicapone: 0 (vehicle), 30, 300, 1000 Morphine HCl: 12	M 8	30 mg/kg: None. 300 mg/kg: None. 1000 mg/kg: None. Morphine HCl: Significantly reduced gastrointestinal transit observed. NOEL= 1000 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-8] [redacted].091/2

2.6.3.4.2 代謝物の安全性薬理試験

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Cardio-vascular System	hERG channel inhibition	BIA 9-1103	HEK 293 cells	*In vitro*	BIA 9-1103: 0 (vehicle), 1, 3, 10, 30 µg/mL E-4031: 100 nM	3 cells (6 cells at E4031)/ treated condition	1 µg/mL: None. 3 µg/mL: None. 10 µg/mL: None. 30 µg/mL: None. E4031: Marked inhibition of hERG tail current (5.85±0.89% vs control, N=6 cells, $p<0.01$)	Yes	[4.2.1.3-9] A0539
	Action potential	BIA 9-1103	Purkinje fibres isolated from Beagle dogs	*In vitro*	BIA 9-1103: 0 (vehicle), 1, 3, 10 µg/mL[a] (expressed as base)	M 6[a]	1 µg/mL: None. 3 µg/mL: None. 10 µg/mL: At 30 mins lengthened APD_{60} (+6%, $p<0.01$) and APD_{90} (+5%, $p<0.01$) observed.	Yes	[4.2.1.3-10] [redacted]0533

APD_{60}: action potential duration at 60 % repolarisation; APD_{90}: action potential duration at 90 % repolarization; HEK: Human embryonic kidney; hERG: human-ether-a-go-go related gene
a: Six fibers obtained from 4 dogs were studied.

2.6.3.4.2 代謝物の安全性薬理試験

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Central Nervous System	Behaviour and physiological function (Irwin test)	BIA 9-1079	Rat / Rj:Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	BIA 9-1079: 0 (vehicle), 30, 300, 1000	M 4	30 mg/kg: Increased reactivity to touch observed. 300 mg/kg: Defaecation/diarrhoea observed. 1000 mg/kg: Stereotypies (chewing), occasional decreased respiration and muscle tone and bleeding from the nose were related to the high viscosity of the preparation administered. NOEL= <30 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-11] [redacted]346/2
Cardio-vascular System	hERG channel inhibition	BIA 9-1079	HEK 293 cells	*In vitro*	BIA 9-1079: 0 (vehicle) 3, 10, 30, 100 µM E-4031: 100 nM	3-4 cells treated/ condition	3 µM (1.19 µg/mL): None. 10 µM (3.97 µg/mL): None. 30 µM (11.92 µg/mL): Reduced relative hERG tail current (74.41±3.53%, $p<0.01$ vs control, N=4) observed. 100 µM (39.72 µg/mL): Reduced hERG tail current (54.49±5.06%, $p<0.01$ vs control, N=4) observed. The IC_{50} value for BIA 9-1079 was 121.13 µM (48.11 µg/mL). E-4031: Reduced hERG tail current (5.62±0.95% vs vehicle, N=3) observed.	Yes	[4.2.1.3-12] A0018

HEK: Human embryonic kidney; hERG: human-ether-a-go-go related gene

2.6.3.4.2 代謝物の安全性薬理試験（続き）

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Cardio-vascular System	Action potential	BIA 9-1079	Purkinje fibres isolated from Beagle dogs	*In vitro*	BIA 9-1079: 0.1, 1, 10 µg/mL	M 6[a]	0.1 µg/mL: None. 1 µg/mL: Slight shortening of APD_{30} (-28%, p<0.01) and APD_{60} (-8%, p<0.01), and increased APT (+12%, p<0.01) observed at T30 min). 10 µg/mL: Decreased V_{max} (-74% at T25 min, p<0.01) and APA (-31% at T25 min, p<0.01) and increased RMP (+29% at T30 min, p< 0.01) observed. Progressive shortening in APD_{60} (maximal effect of -61% at T25 min, p<0.01) and APD_{90} (maximal effect of -43% at T30 min, p<0.01) observed. The APT increase was marked and occurred rapidly (maximal effect at T10 min: +41%, p<0.01).	Yes	[4.2.1.3-13] [redacted].511/2
		BIA 9-1079	Purkinje fibres isolated from Beagle dogs	*In vitro*	BIA 9-1079: 1, 3, 10 µg/mL	M 4-6 [a]	1 µg/mL: APD_{30} shortened (-26% vs control, p<0.05, T30 min), APD_{60} shortened (-8% vs control, p<0.01, T30 min) and APD_{90} shortened (-5% vs control, p<0.01, T30 min). 3 µg/mL: Increased RMP (+7.0 mV vs control, p<0.01, T30 min), decreased V_{max} (-23% vs control p<0.01, T25 min) and APA (-7% vs control, p<0.01, T30 min), shortened APD_{30} (-59% vs control, p<0.01, T30 min), APD_{60} (-48% vs control, p<0.01, T30 min), APD_{90} (-29% vs control, p<0.01, T30 min), increased APT (+47% vs control, p<0.01, T30 min). 10 µg/mL: Increased RMP (+18.8 mV vs control, p<0.01, T30 min) and decreased V_{max} (-66% vs control, p<0.01, T30 min) and APA (-21% vs control, p<0.01, T30 min) , shortened APD_{60} (-39% vs control, p<0.01, T30 min), APD_{90} (-34% vs control, p<0.01, T30 min), decreased APT (-31% vs control, p< 0.01, T15 min).	Yes	[4.2.1.3-14] [redacted].0532

APD_{60}: Action potential duration at 60 % repolarisation; APD_{90}: Action potential duration at 90 % repolarisation; APT: Action potential triangulation; RMP: Resting membrane potential; T: Time point; Vmax: Maximal upstroke velocity
a: Six fibers obtained from 4 dogs were studied.

2.6.3.4.2 代謝物の安全性薬理試験（続き）

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Cardio-vascular System	Cardiovascular function	BIA 9-1079	Dog / Beagle; telemetered, conscious	Oral (capsule); single dose	BIA 9-1079: 0 (empty capsule), 60, 200, 600	M 4[a]	60 mg/kg: No effects on cardiovascular parameters. Mean plasma concentration of BIA 9-1079 4 h after dosing was 3.95 µg/mL. 200 mg/kg: No effects on cardiovascular parameters. Mean plasma concentration of BIA 9-1079 4 h after dosing was 6.25 µg/mL. 600 mg/kg: No effects on cardiovascular parameters. Orange coloured faeces in all animals the day after administration. Mean plasma concentration of BIA 9-1079 4 h after dosing was 7.08 µg/mL. NOEL= 600 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-15] [redacted].345/2
Respiratory System	Respiratory function	BIA 9-1079	Rat / Rj:Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	BIA 9-1079: 0 (vehicle), 30, 300, 1000 Theophylline: 100	M 8	30 mg/kg: None. 300 mg/kg: Slightly decreased in expiratory time and slightly increased in peak expiratory flow observed. 1000 mg/kg: Slightly decreased in expiratory time and slightly increased in peak expiratory flow observed. Theophylline: Decreased inspiratory, expiratory and relaxation time, increased peak inspiratory and expiratory flow and respiratory rate, and decreased tidal volume, pause and enhanced pause observed. NOEL= 30 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-16] [redacted].349/2

a: Dosing: 4 animals were used in total; each animal received vehicle and then 60, 200 and 600 mg/kg BIA 9-1079 with at least a 5-day washout between doses.

2.6.3.4.2 代謝物の安全性薬理試験（続き）

System	Organ Systems Evaluated	Test Article	Species / Strain	Method of Admin.	Test Article Dose (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD Study No.
Renal System	Diuresis and electrolyte excretion	BIA 9-1079	Rat / Rj:Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	BIA 9-1079: 0 (vehicle), 30, 300, 1000 Furosemide: 32	M 12	30 mg/kg: None. 300 mg/kg: Reduced sodium excretion and a tendency for increased potassium and creatinine excretion observed. 1000 mg/kg: 9 rats died; increased respiratory rate, diarrhoea and secretion of porphyrine were observed prior to death. In the 3 surviving rats reduced urinary volume and sodium excretion and increased urinary pH, potassium excretion and creatinine excretion were detected. Furosemide: Increased urinary volume, sodium and potassium excretion and decreased creatinine excretion observed. NOEL= 30 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-17] [redacted]348/2
Gastro-intestinal System	Gastro-intestinal transit	BIA 9-1079	Rat / Rj:Wistar (Han)	Oral gavage; single dose	BIA 9-1079: 0 (vehicle), 30, 300, 1000 Morphine HCl: 12	M 8	30 mg/kg: None. 300 mg/kg: Slight tendency towards a decrease in gastrointestinal transit (-7% in transit time: NS) observed. 1000 mg/kg: Slight tendency towards a decrease in gastrointestinal transit (-10% in transit time: NS) observed. Morphine HCl: Significantly reduced gastrointestinal transit(-29% in transit time: $p<0.001$) observed. NOEL= 1000 mg/kg	Yes	[4.2.1.3-18] [redacted]347/2

NS: Not significant

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

オピカポンとレボドパ／ベンゼラジドを併用投与した実験結果は，2.6.3.2 効力を裏付ける試験に記載した.