Table of Contents

1 非臨床試験計画概略 9
2 薬理試験 10
2.1 効力を裏付ける試験 11
2.1.1 In vitro 薬理試験 11
2.1.1.1 オザニモド及び代謝物の効力及び選択性 11
2.1.1.2 オザニモド及び代謝物のヒトスフィンゴシン 1–リン酸（S1P）受容体サブタイプ 1 及び 5 に対する放射性リガンドを用いた結合親和性及び結合部位に関する評価 11
2.1.1.3 ヒトスフィンゴシン 1–リン酸（S1P）受容体サブタイプ 1 及び 5 に対する内在化誘導能の評価 12
2.1.1.4 オザニモド及び代謝物による蛋白質キナーゼ B（AKT）及び細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）蛋白質のリン酸化評価 12
2.1.2 In vivo 薬理試験 12
2.1.2.1 マウスナイーブ T 細胞養子移入モデルにおけるオザニモドの薬効評価 13
2.1.2.2 ラット 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発大腸炎モデルにおけるオザニモドの有効性 13
2.1.2.3 げっ歯類炎症性腸疾患（IBD）モデルにおけるオザニモド投与の非臨床薬理試験結果の要約 13
2.1.2.4 循環血中リンパ球数に関連するオザニモド及び代謝物の薬物動態（PK）及び薬力学（PD）の統合解析 14
2.2 副次的薬理試験 14
2.2.1 オザニモド及び代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101442、RP101988 及び RP101124）の標的外結合 14
2.2.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスにおけるオザニモド並びに活性代謝物である RP101075、RP101442、RP101988 及び CC112273 の薬効評価 15
2.2.3 クプリゾン誘導マウス脱髄モデルでのオザニモドの神経保護作用及び再髄鞘形成作用 15
2.2.4 セロトニン症候群のマウスモデルにおけるオザニモド及び CC112273 の評価 15
2.3 安全性薬理試験 15
2.3.1 心血管系に関する試験 15
2.3.2 呼吸系に関する試験 16
2.3.3 中枢神経系に関する試験 16
3 薬物動態試験 16
3.1 分析法 16
3.2 吸収 17
3.3 分布 17
3.4 代謝 18

Approved v2.0

3.5 排泄 19
3.6 薬物動態学的薬物相互作用 19
4 毒性試験 20
4.1 反復投与毒性試験 24
4.1.1 ラット 24
4.1.1.1 28 日間反復投与毒性試験及び 14 日間回復性試験 24
4.1.1.2 13 週間反復投与毒性試験 24
4.1.1.3 26 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 24
4.1.2 サル 25
4.1.2.1 28 日間反復投与毒性試験及び 14 日間回復性試験 25
4.1.2.2 13 週間反復投与毒性試験 25
4.1.2.3 39 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験 25
4.1.3 サル及びラットの反復投与毒性試験のまとめ及び結論 26
4.2 遺伝毒性試験 26
4.3 がん原性試験 26
4.4 生殖発生毒性試験 27
4.5 その他の毒性試験 28
4.5.1 免疫毒性試験 28
4.5.2 依存性試験 29
4.5.3 代謝物の毒性試験 29
4.5.3.1 CC112273 の反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験 29
4.5.4 不純物の安全性評価 30
4.5.5 光毒性試験 30
5 総括及び結論 30
6 参考文献 37

List of Tables

Table 4-1: GLP 適用毒性試験の曝露量比 22

Approved v2.0

List of Figures

Figure 3.4-1: オザニモドの推定代謝経路..... 19

Approved v2.0

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
A3R	adenosine A3 receptor	アデノシン A3 受容体
Ab	antibody	抗体
ADH	alcohol dehydrogenase	アルコールデヒドロゲナーゼ
AKR	aldo-keto reductases	アルドケトレダクダーゼ
ALDH	aldehyde dehydrogenase	アルデヒドデヒドロゲナーゼ
ANOVA	analysis of variance	分散分析
AUC	area under the plasma concentration versus time curve	血漿中濃度時間曲線下面積
AUC(0-24h)	area under the plasma concentration versus time curve from time 0 to 24 hours	投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
BDC	bile duct cannulated	胆管カニューレ挿入
BLQ	below the limit of quantification	定量下限未満
CAC	Carcinogenicity Assessment Comittee	発がん性評価委員会
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン一リン酸
CBR	carbonyl reductase	カルボニルレダクダーゼ
CD	cluster of differentiation (immune cell marker)	分化抗原群
CDER	Center for Drug Evaluation and Research	医薬品評価研究センター
CHO	chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
Cmax	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CMC	carboxymethyl cellulose	カルボキシメチルセルロース
CNS	central nervous system	中枢神経系
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
EC50	concentration at which 50% of maximal activity is observed	50%有効濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
EDG	endothelial differentiation gene	内皮分化遺伝子
EFD	embryonic-fetal development	胚・胎児発生に関する

Approved v2.0

略号	英語	日本語
Emax	maximal response achieved relative to the internal positive control	最大薬理効果
ERK	extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
f	respiration rate	呼吸速度
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FEED	fertility and early embryonic development	受胎能及び着床までの初期胚発生に関する
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価
FR	frequency of respiration	呼吸数
GABA	gamma-aminobutyric acid	γアミノ酪酸
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GPCR	G protein-coupled receptor	G 蛋白質共役型受容体
[^{35}S]GTPγS	guanosine 5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate	グアノシン-5'-O-（3-[^{35}S]チオ三リン酸）
Gαi	inhibitory G protein alpha subunit	抑制性 Gα 蛋白質
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HCl	hydrochloride	塩酸塩
HED	human equivalent dose	ヒト等価用量
HSD	hydroxy steroid dehydrogenase	ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ
IA	intrinsic activity	固有活性
IBD	inflammatory bowel disease	炎症性腸疾患
IC50	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IFN-γ	interferon gamma	インターフェロンガンマ
Ig	immunoglobulin	免疫グロブリン
IL	interleukin	インターロイキン
I_{Kr}	delayed rectifier potassium channel	急速活性化遅延整流性カリウムチャネル電流
K_D	dissociation constant	解離定数
K_i	inhibition constant	阻害定数
KLH	keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン

Approved v2.0

略号	英語	日本語
MAO	monoamine oxidase	モノアミンオキシダーゼ
MATE	multidrug and toxin extrusion protein	多剤及び毒性化合物排出蛋白
MIF	maximum inspiratory flow	最大吸気流量
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
MT1	melatonin receptor 1	メラトニン 1 受容体
NAT	N-acetyl transferase	N-アセチルトランスフェラーゼ
NK	natural killer	ナチュラルキラー
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無作用量
NR	no response	無効
NS	not significantly different	有意差なし
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PD	pharmacodynamics	薬力学
PEF	peak expiratory flow	ピークフロー値
Penh	enhanced pause	気道収縮指標
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白
PIF	photo irritation factor	光毒性係数
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PlGF2	placental growth factor	胎盤増殖因子 2
PPND	pre- and postnatal development	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する
QD	once daily	1 日 1 回
S1P	sphingosine 1-phosphate	スフィンゴシン 1−リン酸
$S1P_1$	sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1	スフィンゴシン 1−リン酸受容体サブタイプ 1
SCID	severe combined immunodeficiency	重度複合免疫不全症
SEM	standard error of the mean	平均値の標準誤差
TDAR	T cell-dependent antibody response	T 細胞依存性抗体産生
Te	expiratory time	呼気時間
Tg	transgenic	トランスジェニック
Th	T helper cell	ヘルパーT 細胞

Approved v2.0

略号	英語	日本語
Ti	inspiratory time	吸気時間
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid	2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
UC	ulcerative colitis	潰瘍性大腸炎
UV	ultraviolet	紫外線
VE	minute volume	分時換気量
VEC	vascular endothelial cell	血管内皮細胞
VT	tidal volume	一回換気量
5-HT	5-hydroxytryptamine	5-ヒドロキシトリプタミン
5-HTP	5-hydroxytryptophan	5-ヒドロキシトリプトファン
5-HT2B	5-hydroxytryptamine receptor 2B	5-ヒドロキシトリプタミン受容体 2B

Approved v2.0

1 非臨床試験計画概略

オザニモド（開発コード：RPC1063）[a]は、スフィンゴシン 1–リン酸（S1P）受容体に作用する、経口投与が可能な受容体調節薬であり、S1P 受容体の 5 種類のサブタイプ（$S1P_1$、$S1P_2$、$S1P_3$、$S1P_4$及び $S1P_5$）のうち $S1P_1$ 受容体及び $S1P_5$ 受容体に高い親和性で選択的に結合する。オザニモドが $S1P_1$ 受容体に結合し受容体の活性化が生じると、$S1P_1$ 受容体への作動作用を介して細胞表面に発現する $S1P_1$ 受容体の内在化が誘導されるため、機能的な $S1P_1$ 受容体拮抗薬として作用する。その結果、リンパ球がリンパ組織と循環血液の間に存在する S1P 濃度勾配を感知することができなくなるため、リンパ球が末梢リンパ組織内に保持され、循環血中のリンパ球数が減少する。これらの作用により、潰瘍性大腸炎（UC）をはじめとする自己免疫疾患に関連する病理学的変化が改善すると考えられる[1,2,3]。

オザニモドはヒト及び非臨床試験で用いた動物種で広範に代謝され、循環血中に複数の活性代謝物を生成する。各動物種においては、オザニモド（未変化体）が循環血中で主要活性成分として存在する。一方、ヒト循環血中では代謝物 CC112273 及びその下流代謝物 CC1084037 が主要活性成分であり、げっ歯類で認められる割合よりも顕著に高い割合で存在する。オザニモド及びその代謝物の薬理作用を詳細に解析するために、ヒト、マウス、ラット及びサルの S1P 受容体各サブタイプを用いた複数の in vitro 評価系及び in vivo 薬理モデルを用いて、包括的な活性評価を実施した。検討した代謝物は、CC112273（別名 RP112273 又は RP-2273）、CC1084037、RP101124、RP101075（別名 1075）、RP101988、RP101442、RP112289 及び RP112509 であった。In vitro 系では、オザニモド及びその活性代謝物がヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対して同じ結合部位で相互作用するかどうかを検討するため、競合的放射性リガンド結合試験を実施した。$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体内在化誘導能は、各受容体をそれぞれ過剰発現するよう遺伝子導入した細胞系で評価した。また、S1P 受容体細胞内シグナルに対する作用を明らかにするために、ヒト、マウス及びラットのアストロサイト初代培養系を用い、リンパ球での $S1P_1$ 受容体内在化にも重要な S1P シグナル伝達経路の下流因子である蛋白質キナーゼ B（AKT）と細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）の蛋白質リン酸化レベルを測定した。In vivo 系では、広く使われている 2 種類のげっ歯類炎症性腸疾患（IBD）モデル［マウスナイーブ T 細胞養子移入モデル及びラット 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発大腸炎モデル］を用いて、オザニモドの作用を評価した。

副次的薬理試験では、オザニモド及びその代謝物について、55 種類又は 80 種類の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する標的外相互作用の可能性を検討した。$S1P_1$ 受容体を介する作用機序と有効性の関連が示されているマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルを用いて、オザニモド及びその代謝物（RP101075、RP101442、RP101988 及び CC112273）の 14 日間反復経口投与による循環血中リンパ球数減少と EAE 疾患スコアを指標とした用量反応性を評価し、マウスのクプリゾン誘発脱髄モデルでは、神経保護作用を指標として評価した。CC112273 は in vitro でモノ

[a] オザニモド（未変化体）は一部の試験報告書では別名（CC9101063、1063 又は RP101063）で記載。

Approved v2.0

アミンオキシダーゼ（MAO）-B 阻害作用が認められたため、マウスモデルを用いてオザニモド又は CC112273 を投与し、セロトニン作動化合物を併用投与した場合にセロトニン症候群の症状の増悪が観察されるかを検討した。

安全性薬理試験では、in vitro 系でヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル活性、in vivo 系でラット及びサルを用いた心血管系、呼吸系及び中枢神経系（体温、神経筋機能）に及ぼす影響を評価した。

オザニモドの吸収、分布、代謝及び排泄に関する in vitro 及び in vivo 試験を実施した。オザニモド及びその代謝物を測定するため、頑健かつ再現性のある生体試料中薬物濃度分析法を開発し、薬物動態（PK）及びトキシコキネティクス（TK）試験に使用した。オザニモドの非標識体及び 2 つの異なる部位［5’（オキサジアゾール環の酸素と窒素の間の炭素）部位及び 3’（オキサジアゾール環の 2 つの窒素の間の炭素）部位］にそれぞれ ^{14}C 標識した[^{14}C]-オザニモドを用いて、動物における吸収、分布、代謝及び排泄を評価した。また、オザニモドの代謝特性を明らかにし、薬物相互作用（DDI）の可能性を評価するための in vitro 試験を実施した。さらに、2 種のヒト主要活性代謝物 CC112273 及び CC1084037 を含む代謝物を用いた in vitro 及び in vivo 試験を実施し、薬物動態学的特性及び DDI 発現の可能性を評価した。

オザニモドの非臨床毒性試験として、ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、rasH2 トランスジェニック（Tg）マウス及びラットを用いたがん原性試験、ラット及びウサギを用いた生殖発生毒性試験、in vitro 光毒性試験、ラットを用いた免疫毒性試験及び依存性試験を実施した。さらに、一部の代謝物については、マウス及びラットを用いた反復投与毒性試験並びに in vitro 遺伝毒性試験、ウサギを用いた生殖発生毒性試験及び in vitro 光毒性試験を実施した。すべての重要な試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を遵守し、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインに従って実施した。

2 薬理試験

オザニモドは、$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に高い親和性で選択的に作用する受容体調節薬である。UC の発症には、炎症誘発性の S1P 受容体を介したシグナル伝達が関与することが示唆されている[4]。大腸炎の非臨床モデルにおいて、$S1P_1$ 受容体又は $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体を介した作用により、循環血中及び結腸のリンパ球数の減少と同時に、大腸炎の症状及び病理組織学的所見が改善したことが報告されている[5,6,7]。これらの報告では、非臨床モデルでの有効性が $S1P_1$ 受容体を介する薬理作用によることが示されているが、$S1P_5$ 受容体に対する作動作用も有効性に寄与する可能性がある[8,9,10,11]。$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する作動作用は、ニューロン及びオリゴデンドロサイト前駆細胞の生存及び血液脳関門を含む血管バリア維持に関与することも示されている[12]。このように、$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体作動作用は、局所組織の細胞及び循環血中の炎症系細胞に影響し、炎症応答を制御すると考えられている。

Approved v2.0

2.1 効力を裏付ける試験

2.1.1 In vitro 薬理試験

S1P は G 蛋白質共役型受容体（GPCR）ファミリーに属する S1P 受容体ファミリー（$S1P_{1\sim5}$受容体）に対する内因性リガンドである。$S1P_1$ 受容体は、抑制性 G 蛋白質（Gαi）のみに共役する GPCR であり、細胞内のアデニル酸シクラーゼ活性を低下させ、環状アデノシン一リン酸（cAMP）濃度を低下させる。$S1P_2$～$S1P_5$ 受容体も G 蛋白質と共役するため、S1P 受容体に対する活性は、グアノシン-5'-O-（3-[^{35}S]チオ三リン酸）（[^{35}S]GTPγS）結合アッセイ又は細胞内蛋白質リン酸化などの細胞内機能的シグナル伝達アッセイを用いて、in vitro で評価することが可能である。

2.1.1.1 オザニモド及び代謝物の効力及び選択性

オザニモド及びその代謝物（CC112273、CC1084037、RP101124、RP101075、RP101988、RP101442、RP112289 及び RP112509）の in vitro での効力及び固有活性は、遺伝子組換え S1P 受容体を発現させてクローン化したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞由来の調製膜画分を用いて、[^{35}S]GTPγS 結合を機能アッセイの評価指標として解析した。オザニモド及びその代謝物（RP101124 を除く）は、ヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体を発現させた CHO 細胞由来の調製膜画分において、強力な[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性を示した。ヒト S1P 受容体においては、他の S1P 受容体サブタイプ（$S1P_2$～$S1P_4$受容体）に比べ $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に選択的であることが示された。

げっ歯類及びサルの $S1P_1$ 受容体に対するオザニモド及びその代謝物の効力は、ヒト $S1P_1$ 受容体と類似していた。オザニモド及びその代謝物のサル $S1P_5$ 受容体に対する効力及び活性順位はヒト $S1P_5$ 受容体と同様であったが、$S1P_5$ 受容体に対するオザニモド及び代謝物の効力は、ヒト及びサルの $S1P_5$ 受容体に比べてマウス及びラットで低かった。この違いは、ヒト及びサルに比べてマウス及びラットの $S1P_5$ 受容体アミノ酸配列の相同性が低いことに関連すると考えられた。

RP101124 はいずれの条件でも活性を示さず、ヒト、マウス、ラット及びサルのいずれの S1P 受容体サブタイプにおいても、測定可能な作動作用の濃度反応性は認められなかった。

2.1.1.2 オザニモド及び代謝物のヒトスフィンゴシン 1–リン酸（S1P）受容体サブタイプ 1 及び 5 に対する放射性リガンドを用いた結合親和性及び結合部位に関する評価

ヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体を安定的に発現させた CHO 細胞由来の調製膜画分を用いて飽和結合試験と競合試験を実施し、[^{3}H]-オザニモドの解離定数（K_D）及びオザニモドとその代謝物（CC112273、CC1084037、RP101124、RP101075、RP101988、RP101442、RP112289 及び RP112509）の[^{3}H]-オザニモドの結合に対する 50%阻害濃度（IC50）値を検討した。飽和結合解析ではオザニモドの K_D 値は $S1P_1$ 受容体で 1.62 nM、$S1P_5$ 受容体で 6.56 nM と算出された。これらの K_D 値と IC50 値から阻害定数（Ki）値を算出したところ、全ての活性代謝物の $S1P_1$ 受容体に対する Ki 値はサブ nM の範囲内であることが確認された。$S1P_5$ 受容体に対する Ki 値は $S1P_1$ 受容体よりも大きく 1～40 nM の範囲内であった。RP101124 は $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体で[^{3}H]-オザニモドと競合しなかった。このことは RP101124

Approved v2.0

が $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体のオザニモド結合部位には結合しないことを示唆しており、[^{35}S]GTPγS 結合を用いた評価で機能活性が認められなかったこととも一致する。なお、S1P は[^{3}H]-オザニモドと競合的に結合したことから、オザニモドは $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体のオルソステリック結合部位（内因性リガンド結合部位）に結合することが示唆された。

2.1.1.3 ヒトスフィンゴシン 1–リン酸（S1P）受容体サブタイプ 1 及び 5 に対する内在化誘導能の評価

$S1P_1$ 受容体発現細胞をオザニモド及びその代謝物（CC112273、CC1084037、RP101124、RP101075、RP101988、RP101442、RP112289 及び RP112509）で処理し、$S1P_1$ 受容体内在化誘導能を評価した。オザニモド及びその代謝物（RP101124 を除く）はいずれも $S1P_1$ 受容体内在化を誘導し、効力は試験化合物の曝露時間の長さに伴い増大する傾向が認められた。活性代謝物による $S1P_1$ 受容体内在化応答はオザニモドと同程度であったが、RP101124 は、いずれの濃度又は評価した時点でも $S1P_1$ 受容体の内在化を示さなかった。以上より、活性を有するいずれの代謝物も受容体内在化の作用機序を介して有効性に寄与すると考えられた。一方、$S1P_5$ 受容体に対しては、オザニモドは 60 分間インキュベート直後又は化合物のウォッシュアウトから 23 時間の評価で内在化を誘導しなかった。

2.1.1.4 オザニモド及び代謝物による蛋白質キナーゼ B（AKT）及び細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）蛋白質のリン酸化評価

オザニモド並びに内在化誘導能を示すことを確認したヒトでの主要代謝物である CC112273 及び微量活性代謝物 RP101988 の S1P 受容体細胞内シグナルに対する作用を明らかにするために、S1P 受容体を発現している細胞であり、S1P 受容体の細胞内シグナル解析に広く用いられているアストロサイトの初代培養系を用い、リンパ球での $S1P_1$ 受容体内在化にも重要な S1P シグナル伝達経路の下流因子である AKT と ERK の蛋白質リン酸化レベルを測定した。オザニモド及びその代謝物である RP101988 及び CC112273 は、マウス、ラット及びヒトの初代培養アストロサイトにおいて AKT 及び ERK 蛋白質のリン酸化を誘導した。なお、オザニモドによる AKT 及び ERK 蛋白質リン酸化誘導は、$S1P_5$ 受容体ではなく $S1P_1$ 受容体を介して生じることが示唆された。

2.1.2 In vivo 薬理試験

広く使用されている 2 種類のげっ歯類 IBD モデルである重症複合免疫不全（SCID）マウスのナイーブ T 細胞養子移入モデル及びラットの TNBS 誘発大腸炎モデルを用いてオザニモドの有効性を評価した。ドナーマウスからのナイーブ分化抗原群（CD）4 陽性 CD45RB^{high} T リンパ球の SCID マウスへの養子移入では、移入後数週間で結腸炎症が生じる。TNBS モデルでは、ハプテンを直腸内投与することで粘膜免疫応答が開始され、ヘルパーT 細胞（Th）介在性免疫応答によって大腸炎を誘発する。なお、オザニモドの活性代謝物の直接的な有効性評価は実施しなかった。

Approved v2.0

2.1.2.1 マウスナイーブ T 細胞養子移入モデルにおけるオザニモドの薬効評価

本試験では、マウスの循環血中リンパ球数の減少に基づく推定有効用量（1 mg/kg）を参考に、オザニモドを 1.2 mg/kg で反復経口投与した。オザニモドを投与したマウスでは、結腸重量対長さ比が溶媒投与マウスに比較して統計学的有意に 71%減少し、陽性対照のシクロスポリン A 及びハムスター抗マウス腫瘍壊死因子（TNF）抗体（TN3-19.12）（48%～55%の減少）よりも高い効果を示した。オザニモドを投与したマウスでは、最終投与 24 時間後の解析で循環血中リンパ球数の減少が認められたことから、$S1P_1$ 受容体を介する薬理作用であることが示された。循環血中リンパ球数の減少は 41%であり、後述の EAE マウス及び正常ラットでの最終投与 24 時間後の値と同等であった。組織学的解析による炎症、腺消失、過形成、好中球スコア及び各組織学的スコアの解析では、いずれもオザニモド及び陽性対照で改善した。また、オザニモド投与により、養子移入した SCID マウスの遠位結腸粘膜厚が減少し、非移入及び陽性対照のシクロスポリン A 並びに TN3-19.12 と同程度に粘膜肥厚が改善することが示された。

さらに本モデルでのオザニモドの用量依存性試験（0.3、0.6 及び 1.2 mg/kg）を追加して実施した。その結果、上昇した結腸重量対長さ比が 1.2 mg/kg のオザニモド投与により統計学的有意に 40%低下し、陽性対照であるシクロスポリン A（49%低下）と同程度であった。0.3 mg/kg のオザニモド投与では、結腸重量対長さ比の低下傾向（34%低下）は認められたが、統計学的に有意ではなく、また、0.6 mg/kg 投与群では結腸重量対長さ比の低下は 5%であり、同様の低下傾向は認められなかった。結腸ホモジネートでの評価では、炎症性メディエーター［インターフェロンガンマ（IFN-γ）、インターロイキン（IL）-10、IL-12 p70、IL-1β、IL-6、IL-8 及び TNF-α］が用量依存的に減少することが示された。

2.1.2.2 ラット 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発大腸炎モデルにおけるオザニモドの有効性

本試験では、ラットの循環血中リンパ球数の減少に基づく推定有効用量（0.3 mg/kg）を参考に、オザニモド 0.1、0.3 及び 1 mg/kg を、反復経口投与した。オザニモドの投与により、溶媒対照群で認められた TNBS による体重減少は用量依存的に抑制された。一方、陽性対照であるプレドニゾロン投与群の体重減少は溶媒対照群とは差がなかった。オザニモドの 1 mg/kg 投与群では、体重の維持作用に加えて、溶媒対照群と比較して自発行動の改善も認められた。さらに、オザニモドの 1 mg/kg 投与群では、TNBS で誘発される結腸重量対長さ比の増加を約 70%、結腸の病理組織学的スコアの増加を 54%統計学的有意に減少させた。オザニモドの最高用量（1 mg/kg/day）では、結腸重量対長さ比及び病理組織学的スコアの改善程度はプレドニゾロン投与群（10 mg/kg/day）と同程度であった。

2.1.2.3 げっ歯類炎症性腸疾患（IBD）モデルにおけるオザニモド投与の非臨床薬理試験結果の要約

オザニモドは、後述する非臨床試験での循環血中リンパ球数の減少に基づき有効性を示すことが予測される用量（マウスでは 1.0 mg/kg、ラットでは 0.3 mg/kg）又はそれ以上の用量で、IBD の臨床病

Approved v2.0

態パラメータを統計学的有意に低下させた。オザニモド投与群では結腸の病理組織学的変化（浮腫、炎症、腺消失、過形成、粘膜肥厚）及び組織中サイトカイン濃度も統計学的有意に改善した。これらのマウスで認められた結腸組織での病理組織学的変化と組織中サイトカインレベルの改善は、自己免疫疾患モデルにおいて組織学的及び生化学的な観点でオザニモドが有効であることを示している。IBD モデルに対するオザニモドの有効性は、循環血中リンパ球数の減少とも関連しており、このことは $S1P_1$ 受容体を介する作用機序及び UC 患者を対象とした臨床試験での臨床所見とも一致した。

2.1.2.4 循環血中リンパ球数に関連するオザニモド及び代謝物の薬物動態（PK）及び薬力学（PD）の統合解析

循環血中リンパ球数の減少は、$S1P_1$ 受容体作動作用に基づく $S1P_1$ 受容体内在化の薬力学（PD）マーカーである。総活性薬物（投与した未変化体及び活性代謝物）の投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積（AUC(0-24h)）と血中リンパ球数減少の程度の間には、シグモイド型の PK/PD 関係が認められた。このことから、PD 作用の誘導には、投与した各化合物の 50%有効濃度（EC50）値との関連性は認められず、血漿中総活性薬物濃度が関連することが示唆された。また、この関連性は非臨床薬理試験及び毒性試験に使用した動物種（マウス、ラット、イヌ及びサル）において同様に認められたことから、各動物種に共通した $S1P_1$ 受容体を介する薬理作用が示された。これらのデータは、オザニモド投与後に循環血中リンパ球数の減少が認められた臨床所見とも一致した。

2.2 副次的薬理試験

2.2.1 オザニモド及び代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101442、RP101988 及び RP101124）の標的外結合

オザニモドとその代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101442、RP101988 及び RP101124）について、55 種類又は 80 種類の非標的受容体、トランスポーター及びチャネルへの放射性標識リガンド結合に対する阻害作用を検討した。

オザニモドは 1 μM の濃度で 5-ヒドロキシトリプタミン（5-HT）トランスポーターに対してのみ 50%超の結合阻害活性を示し、その IC50 値は 3.66 μM と算出された。CC1084037 は 10 μM の濃度でアデノシン A3 受容体（A3R）、メラトニン 1 受容体（MT1）及び 5-HT 受容体 2B（5-HT2B）を 50%超阻害し、IC50 値はそれぞれ 300 nM、590 nM 及び 1500 nM であった。CC112273、RP101124 及び RP101075 は 1 μM の濃度で、RP101988 は 2 μM、RP101442 は 3 μM の濃度で、評価した各種受容体、トランスポーター及びイオンチャネルのいずれに対しても阻害作用を示さなかった。臨床での定常状態における最高血漿中濃度（Cmax）推定値に対する臨床曝露マージンは、最小で CC1084037 の A3R に対する IC50 値の 76 倍超であった。これらの試験において、標的外相互作用の懸念は確認されなかった。

Approved v2.0

2.2.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスにおけるオザニモド並びに活性代謝物である RP101075、RP101442、RP101988 及び CC112273 の薬効評価

$S1P_1$ 受容体を介する作用機序と有効性の関連が示されている EAE モデルを用いて、オザニモド及びその代謝物（RP101075、RP101442、RP101988 及び CC112273）投与による循環血中リンパ球数減少と EAE 疾患スコアを指標とした用量反応性を評価した。その結果、概して $S1P_1$ 受容体を介する薬理作用と一致する循環血中リンパ球数減少と EAE 疾患スコアを指標とした有効性の関連が示された。

2.2.3 クプリゾン誘導マウス脱髄モデルでのオザニモドの神経保護作用及び再髄鞘形成作用

$S1P_1$ 受容体を介する作用機序と有効性の関連が示されているクプリゾン誘発マウス脱髄モデルを用いて、オザニモドを投与した際の循環血中リンパ球数減少と神経保護作用及び脱髄誘発後の再髄鞘化作用を有効性の指標として検討した。その結果、オザニモドは脱髄誘発開始時から 6 週間投与により循環血中リンパ球数の減少を伴う神経保護作用を示したが、脱髄誘発後に継続して 12 週間投与した際の再髄鞘形成については、改善は認められなかった。

2.2.4 セロトニン症候群のマウスモデルにおけるオザニモド及び CC112273 の評価

CC112273 は in vitro で MAO-B 特異的な基質代謝を IC50 値 5.72 nM で阻害し、MAO-A と比較し 1000 倍超高い阻害作用を示した。マウスを用いた試験により、オザニモド又は CC112273 を投与し、セロトニン作動化合物を併用投与した場合にセロトニン症候群の症状増悪が観察されるかを検討した。マウスにオザニモド又は CC112273 を、ヒトにオザニモド 0.92 mg を投与した際の定常状態における曝露量と同程度以上となるように投与したところ、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）で誘発されるセロトニン症候群の症状を増悪させなかった。同様に、別の試験で内因性セロトニンのみを有する正常マウスにオザニモド又は CC112273 を投与した場合でもセロトニン症候群の症状は発現しなかった。

2.3 安全性薬理試験

オザニモドの心血管系、呼吸系及び中枢神経系に及ぼす影響を評価した。

2.3.1 心血管系に関する試験

In vitro 試験では、オザニモド及びその代謝物（RP101075、RP101442、RP101988、RP101124、CC112273 及び CC1084037）が hERG チャネルを介した急速活性化遅延整流性カリウムチャネル電流（I_{Kr}）に及ぼす影響について検討した。オザニモド及び CC112273 の hERG 電流に対する IC50 値は、それぞれ 0.21 μM 及び 0.60 μM であり、また、CC1084037 の IC50 値は 3 μM を上回ると推定された。他の代謝物では 1 μM での hERG 電流阻害率は、RP101442、RP101988 及び RP101124 で 10%以下であり、RP101075 では約 25%であった。

In vivo 試験では、テレメトリー装置を装着した雄性カニクイザルにオザニモド（0.15、3 及び 30 mg/kg）を投与した。その結果、3 及び 30 mg/kg の用量で軽微かつ一過性の PR 間隔延長（最大

Approved v2.0

10%の延長）及び拡張期血圧低下（最大 20%の低下）が認められた。心拍数はオザニモド 30 mg/kg の投与 4 時間後に、投与前値と比較して最大で 29%減少した。オザニモド 3 mg/kg の投与時に認められた一過性の PR 間隔延長及び拡張期血圧低下に基づき、心血管系の影響に対する無作用量（NOEL）は 0.15 mg/kg と判断した。

2.3.2 呼吸系に関する試験

ラットにオザニモド（0.2、2 及び 30 mg/kg）を 1 日 1 回（QD）で 7 日間反復経口投与した際の呼吸系パラメータに対する影響を検討した。プレチスモグラフィーを用いた呼吸機能評価では、オザニモドを 30 mg/kg で投与した場合にベースライン値との比較で呼吸数（FR）の軽微な増加及び一回換気量（VT）の軽微な減少が認められたが、分時換気量（VE）に変化は認められなかった。他の呼吸系パラメータ［最大吸気流量（MIF）、ピークフロー値（PEF）及び気道収縮指標（Penh）］は影響を受けなかった。血液ガスの解析では、投与 6 時間後までの評価で影響が認められず、酸素供給及び呼吸ガス交換には影響しないことが示唆された。30 mg/kg/day の投与群では、溶媒投与群と比較して肺重量が約 90%増加し、最終投与前のベースライン測定時に統計学的有意ではない軽微なアシドーシスの徴候がみられたことから、オザニモド 30 mg/kg を QD で 7 日間反復経口投与することにより、呼吸機能に影響する肺構造変化が生じる可能性が示唆された。2 mg/kg/day の投与群では、呼吸機能又は呼吸ガス交換に差は認められなかったが、肺重量が約 40%増加し、この変化は毒性学的に意義があると考えられた。プレチスモグラフィー及び肺重量データに基づき、ラットにおけるオザニモドの NOEL は 0.2 mg/kg/day と判断した。

2.3.3 中枢神経系に関する試験

ラットにオザニモド（0.2、2 及び 30 mg/kg）を 28 日間反復経口投与し、機能観察総合評価（FOB）に基づく神経行動学的評価、握力試験及び体温測定を投与前（Day -1）及び投与最終週（Day 26）の投与約 4 時間後に実施した。

オザニモドを 30 mg/kg までの用量で反復投与した雌雄いずれのラットにおいても、FOB、握力及び体温に変化は認められなかった。得られた所見及び曝露マージンから、本薬の臨床使用において特記すべき安全性上の懸念は特定されなかった。

3 薬物動態試験

In vitro 及び in vivo 試験を実施し、オザニモド及びその代謝物の薬物動態を評価した。薬理試験及び毒性試験において、2 種のヒト主要活性代謝物 CC112273 及び CC1084037 並びに 1 種のヒト主要不活性代謝物 RP101124 の曝露量及び適用範囲の妥当性を明らかにする試験を実施した。また、一連の in vitro 試験でオザニモド又はその代謝物と併用薬との DDI 発現の可能性を検討した。

3.1 分析法

GLP 適用の毒性試験に使用した動物の血漿中オザニモド及びその主要代謝物（CC112273、CC1084037 及び RP101124）濃度を測定するため、液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクト

Approved v2.0

ロメトリー法を開発し、バリデーションを実施した。これらの分析法は、適用される GLP ガイドライン及び FDA の生体試料中薬物濃度分析法バリデーションガイダンス（FDA、2001）に準拠し、直線性、感度、回収率、真度、精度、安定性及び希釈の妥当性の判定基準を満たし、頑健性及び再現性が確認された。主要代謝物に加えて、その他の血漿中の微量代謝物（ヒトにおける総薬物関連曝露量の 5%未満）についても、バリデーションされた分析法を用いて毒性試験において評価した。

3.2 吸収

オザニモドはヒト結腸癌由来細胞である Caco-2 細胞を用いた in vitro 膜透過性モデルで高い膜透過性を示した。ラットでの単回投与 PK 試験において、中等度のクリアランス、大きな分布容積を示し、消失半減期は 24 時間未満、絶対的バイオアベイラビリティは 40%～60%であった。ラット、マウス、サル及びウサギにおいて、オザニモドは経口投与後速やかに吸収され、全身曝露量は用量に比例して又は用量依存的に増加した。反復投与 PK 及び TK 試験では、オザニモドの曝露量は検討した用量範囲で用量にほぼ比例して増加し、蓄積は認められなかった。反復投与 PK 及び TK 試験において、曝露量に顕著な性差は認められなかった。

オザニモドの薬物動態学的特性を明らかにするとともに、オザニモドの血漿中代謝物の曝露量を PK 及び TK 試験で評価した。特に、ヒトにおいて総薬物関連曝露量の 10%以上存在する 2 種の主要活性代謝物（CC112273 及び CC1084037）及び 1 種の主要不活性代謝物（RP101124）の曝露量を、バリデーションされた分析法を用いて反復投与 PK 及び TK 試験において評価した。げっ歯類及びサルにオザニモドを 14 日間反復投与したとき、代謝物の消失半減期は短く、オザニモドの血漿中代謝物の曝露量は定常状態に到達した。げっ歯類及びサルにオザニモドを反復投与したとき、これらの主要代謝物の曝露量は用量にほぼ比例して増加し、反復投与による蓄積は認められず、曝露量に性差は認められなかった。げっ歯類及びサルに活性代謝物 CC112273 を直接投与したところ、CC112273 のクリアランスが大きく、溶解性が低いことから、経口吸収は限定的であり、30 mg/kg 以上の用量で曝露量はプラトーに達した。ラットへの CC1084037 の直接投与でも同様の結果であった。代謝物を直接投与したときの曝露量とオザニモドを投与したときの代謝物の曝露量を比較したところ、オザニモドを投与したときの方が代謝物の曝露量が多かった。代謝物の全身投与に関しても、静脈内又は皮下投与に適した溶媒中の CC112273 及び CC1084037 の溶解性が低いことから、曝露量が改善する可能性は低いと考えられた。

3.3 分布

動物及びヒト血清又は血漿中におけるオザニモドの蛋白結合率は高く、82.6%～98.7%であった。また、CC112273 及び CC1084037 を含むすべての代謝物の蛋白結合率も高く、ヒトのオザニモドの蛋白結合率と同程度であった。オザニモドはラット及びサル血漿に対する血液中濃度比は約 2～4 であり、ラット及びサル血液中の血球成分に速やかに分布した。[^{14}C]-オザニモド由来の放射能は組織に広く分布し、概して血液中放射能の減少と並行して減少した。オザニモド及びその代謝物（RP101124 及び RP101988 を除く）は、ラット及びマウスの中枢神経系に分布した。妊娠ラットに

Approved v2.0

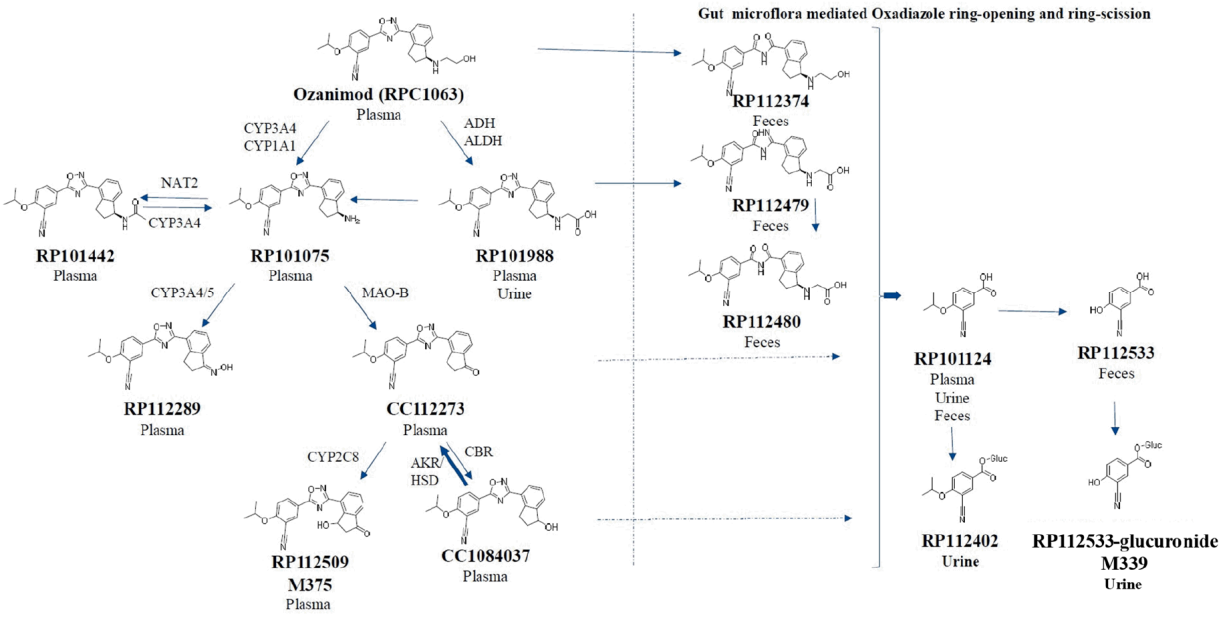
オザニモドを投与したとき、胎児はオザニモド及びその代謝物に曝露されたことから、オザニモド及びその代謝物の胎盤通過が示唆された。授乳ラットにオザニモドを投与したとき、乳汁中にオザニモド及びその代謝物は高濃度で検出され、オザニモド由来成分が乳汁を介して哺乳児の組織に分布することが示唆された。

3.4 代謝

In vitro 及び in vivo 代謝試験の結果から、オザニモドは複数の生体内変換経路を介して広範に代謝されることが示された（Figure 3.4-1）。動物とヒトとの間で代謝物曝露量の差が認められたが、ヒトに特有の代謝物はなく、毒性試験に使用したいずれかの動物種でヒト代謝物は検出された。ヒトの主要代謝物（総薬物関連曝露量の 10%以上）として 3 種の代謝物（CC112273、CC1084037 及び RP101124）が同定され、これら 3 種の主要代謝物のうち 2 種（CC112273 及び CC1084037）は $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対して、オザニモドと同程度の薬理活性を示し、残りの 1 種（RP101124）は不活性代謝物であった。オザニモドの主要な代謝には 3 つの異なる経路があり、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）／アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）を介した酸化による一級アルコール代謝物 RP101988 の生成、チトクローム P450（CYP）を介したメチレンヒドロキシ基の脱アルキル化によるインダミン代謝物 RP101075 の生成、及び腸内細菌を介したオキサジアゾール環の開裂による RP101124 の生成であった。代謝物 RP101075 は N-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）2 を介した N-アセチル化を受けて RP101442 を生成するが、これは CYP3A4 によって可逆的に RP101075 に再変換される。ヒトの主要活性代謝物である CC112273 は MAO-B を介した RP101075 の酸化的脱アミノ化により生成した。CC112273 はさらにカルボニルレダクダーゼ（CBR）を介したカルボニル基の還元による可逆的な代謝を受け CC1084037 を生成するが、これはアルドケトレダクダーゼ（AKR）及びヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（HSD）により速やかに酸化され、再び CC112273 を生成する。この相互変換反応は CC112273 側に有利に傾いており、CC1084037 の唯一の代謝経路は CC112273 の生成であった。その他の直接的な代謝物は認められなかった。CC1084037 の生成に加え、CC112273 はインダノン環上で CYP2C8 によるヒドロキシ化も受けて RP112509 を生成した。したがって、オザニモドの代謝は単一の代謝経路や代謝酵素系には依存せず、複数の代謝経路又は代謝酵素系を介して広範に代謝されると考えられた。

Approved v2.0

Figure 3.4-1: **オザニモドの推定代謝経路**



ADH = alcohol dehydrogenase; AKR = aldo-keto reductase; ALDH = aldehyde dehydrogenase; CBR = carbonyl reductase; CYP = cytochrome P450; HSD = hydroxysteroid dehydrogenase; MAO = monoamine oxidase; NAT = N-acetyltransferase.
Source: Metabolite identification data from Report RPC01-1909.

3.5 排泄

ラットに投与された[^{14}C]-オザニモド由来の放射能は主に糞中に排泄され、投与放射能の回収率は約83%を占めた。微量の投与放射能が尿中に排泄され、投与放射能の回収率は約 6%～8%であった。胆管カニューレ挿入（BDC）ラットを用いた検討では、吸収された投与放射能は主に胆汁中に排泄された。排泄された投与放射能は主に代謝物であり、未変化体の割合はわずかであったことから、吸収されたオザニモドは広範に代謝され、代謝物として胆汁を介して糞中排泄されることが示唆された。

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

オザニモド及びその代謝物のトランスポーターの基質性に関する検討から、オザニモドは P 糖蛋白（P-gp）の弱い基質であるが、乳癌耐性蛋白（BCRP）、多剤及び毒性化合物排出蛋白（MATE）1、腎臓特異的に発現する MATE2-K、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった。RP101988 は P-gp 及び BCRP の基質であるが、MATE1、MATE2-K、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった。RP101124 は BCRP 及び OATP1B1 の基質であるが、P-gp、MATE1、MATE2-K 及び OATP1B3 の基質ではなかった。RP101075 及び CC112273 は P-gp、BCRP、

Approved v2.0

MATE1、MATE2-K、OATP1B1 及び OATP1B3 のいずれの基質ではなく、CC1084037 は P-gp、BCRP、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった。

オザニモド及びその代謝物は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対する顕著な阻害作用を示さなかった。オザニモド、RP101124、CC112273 及び CC1084037 は、ヒト肝細胞中で CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 に対する顕著な誘導作用を示さなかった。

CC112273 及び CC1084037 は MAO-A に対する阻害作用を示さなかったが、MAO-B を阻害し、IC50 値はそれぞれ 5.7 及び 58 nM であった。RP101075 は MAO-A 及び MAO-B に対する阻害作用を示し、IC50 値はそれぞれ 1322 及び 56 nM であった。

オザニモドは P-gp 及び BCRP に対して弱い阻害作用を示し、IC50 値はそれぞれ 8.8 及び 3.5 μM であった。CC112273 及び CC1084037 は BCRP に対して阻害作用を示し、IC50 値はそれぞれ 25 及び 23 nM であった。オザニモド及びその代謝物はいずれも、臨床的に意義のある濃度で薬物排出トランスポーター（MATE1 及び MATE2-K）又は取込みトランスポーター［OATP1B1、OATP1B3、有機カチオントランスポーター（OCT）2、有機アニオントランスポーター（OAT）1 及び OAT3］を阻害しなかった。

4 毒性試験

オザニモド及びその代謝物の非臨床安全性は、GLP を遵守し、ICH ガイドラインに従った各種毒性試験により評価した。その結果、毒性試験に用いた動物種における安全性が確認された。これらの試験は、オザニモドの毒性評価に十分な全身曝露量が得られる用量を選択して実施した。

動物とヒトとの間で代謝物の曝露量の差が認められたが、ヒトに特有な代謝物はなく、ヒト主要代謝物は毒性試験に使用したいずれか 1 種以上の動物種において認められた。3 種類のヒト主要代謝物（CC112273、CC1084037 及び RP101124）が同定され、いずれもヒトにおける総薬物関連曝露量（オザニモドに関連するすべての物質の曝露量の合算値）に占める割合は 10%超であった。これらの代謝物のうち、2 種類のヒト主要活性代謝物（CC112273 及び CC1084037）は $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する活性及び選択性がオザニモドと同程度の活性代謝物であったが、がん原性試験実施後まで未測定であったため、毒性試験で用いた動物種（マウス、ラット、サル及びウサギ）を用いたオザニモドの 14 日間反復投与ブリッジング PK 試験を実施した。これらの試験ではオザニモドを GLP 適用反復投与毒性試験と同用量を投与したときの CC112273 及び CC1084037 の定常状態での曝露量を測定した。これらの試験の曝露量に基づいてヒト臨床用量（0.92 mg）の曝露量との比を算出し、Table 4-1 に示した。CC112273 及び CC1084037 の曝露量は毒性試験に用いた動物種ではげっ歯類においてヒトと比較して低値であるが、非ヒト霊長類のカニクイザルにおいてヒトにより類似している。末梢血リンパ球数の減少、胸腺の皮髄比の減少、白脾髄の萎縮及び細胞密度の減少の標的（$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体）作用が、いずれの動物種においても同程度の曝露量で認められた。これら

Approved v2.0

の所見は、オザニモド、CC112273 及び CC1084037 の S1P 調節作用の動物種間での活性プロファイルと一致している。また、標的外結合は認められない又は臨床曝露量と比較して曝露量比が大きいことから、標的外作用による毒性発現の可能性は低いと考えられた。

オザニモド及びその活性代謝物の S1P 調節作用は同程度であったことから、標的に対する過剰な薬理作用を評価する方法として活性成分の総曝露量（オザニモド、CC112273 及び CC1084037 の曝露量の総和）を検討することは有用であることが示唆された。標的とする S1P 調節作用を評価するため、活性成分（オザニモド、CC112273 及び CC1084037）の総曝露量に基づき、Table 4-1 に活性成分の総曝露量比を示す。

Approved v2.0

Table 4-1: GLP 適用毒性試験の曝露量比

Study Description (Study No.) Week or Day	Species	Dose (mg/kg/day)	Mean Exposure Multiples[a]				
			Ozanimod	CC112273[b]	CC1084037[b]	RP101124	Total Active Drug (Ozanimod, CC112273 and CC1084037)[c]
			Combined Sex[d]	Combined Sex	Combined Sex	Combined Sex	Sum Totals
26-week Repeated Dose (71357) Week 26 (Day 178)	Rat	0.2 (NOAEL)	6	0.02	0.001	18	0.2
		2	84	0.2	0.1	223	3
		30	1494	6	1	4229	61
39-week Repeated Dose (30477) Week 39 (Day 274)	Monkey	0.1 (NOAEL)	2	0.1	0.1	0.4	0.2
		1	24	1	1	16	2
		15	401	24	28	212	39
6-month Carcinogenicity (AE18BZ.7G8R.BTL) Week 26 (Day 177)	Mouse	8 (NOAEL)	984	1	0.6	107	38
		25	3050	5	2	300	119
		80	9539	14	6	912	373
2-year Carcinogenicity ([redacted]-72515) Week 27 (Day 185)	Rat	0.2	5	0.02	0.001	30	0.2
		0.7	22	--	--	96	1
		2 (NOAEL)	74	0.2	0.1	214	3
Embryo-fetal Development (AB03215) GD 17	Rat (maternal)	0.2	7	0.01	--	--	0.3
		1 (NOAEL)	35	0.1	0.02	--	1
		5	234	--	--	--	9
Embryo-fetal Development (AB03217) GD 6 or 19	Rabbit (maternal)	0.2 (fetal NOAEL)	1	0.04	0.1	--	0.1
		0.6 (maternal NOAEL)	5	0.1	0.3	--	0.3
		2	16	--	--	--	1

GD = gestation day; NOAEL = no-observed-adverse-effect-level; -- = not determined.

[a] Calculation = ratio of Animal Species Exposure (ng·h/mL)/Human Exposure (ng·h/mL).

[b] Nonclinical species exposure based on the analyte exposure concentration from 14-day bridging GLP-compliant PK Studies (rat [Report 1840-047 Day 14], mouse [Report 1840-040 Day 14], rabbit [Report 1840-054 Day 14] and monkey [Report 1840-043 Day 14]).

[c] Total active drug multiple is cumulative exposure of ozanimod+CC112273+CC1084037 divided by total human ozanimod+CC112273+CC1084037. These 3 contribute to 94% of total active exposure of the drug in humans (Report RPC01-1914).

[d] Combined Sex exposures for all studies except for EFD studies (Report AB03215 and Report AB03217) where female exposures are presented.

Note: Human Exposures of ozanimod and human metabolites referred to the following information. Predicted steady-state exposure measures of ozanimod and CC112273 in Japanese subjects with ulcerative colitis in Study RPC01-3103, based on the population PK analysis (CTD M272, Figure 3.6.4-1 and Figure 3.6.4-3). Predicted steady-state exposure measure of CC1084037 in Japanese subjects with ulcerative colitis in Study RPC01-3103, which was calculated by multiplying the predicted steady-state exposure of CC112273 based on the population PK analysis (CTD M272, Figure 3.6.4-3) with the conversion factor based on the strong correlation between CC112273 and CC1084037 concentrations in Study RPC01-1914 (CTD M5334-8, CSR Figure 14.2.1.6). RP101124 exposure on Day 12 in Japanese healthy subjects following multiple dose of ozanimod 0.92 mg QD in Study RPC01-1905 (CTD M5333-2, CSR Table 14.2.1.2.4b).

Approved v2.0

4.1 反復投与毒性試験

オザニモドの用量反応性及び曝露量を検討するための探索的反復投与毒性試験を、マウス（14 日間）、ラット（最長 14 日間）及びサル（最長 14 日間）を用いて実施した。また、ラット（最長 26 週間）及びサル（最長 39 週間）を用いた GLP 適用反復投与毒性試験を実施した。

4.1.1 ラット

28 日間、13 週間及び 26 週間の GLP 適用反復投与毒性試験におけるオザニモドの用量は、いずれも 0.2、2 及び 30 mg/kg/day とした。オザニモドの曝露量はこれらの試験で同程度であり、顕著な性差は認められなかった。また、オザニモドを同用量投与した 14 日間反復投与ブリッジング PK 試験で、ヒト活性代謝物（CC112273 及び CC1084037）の曝露量を評価した。

4.1.1.1 28 日間反復投与毒性試験及び 14 日間回復性試験

28 日間反復経口投与毒性試験及び 14 日間回復性試験において、全用量で血中白血球数、好塩基球数及びリンパ球数の減少が認められ、30 mg/kg/day で総蛋白及びグロブリンの減少も認められた。30 mg/kg/day で肺重量増加が認められたが、14 日間の回復期間終了時には対照群と同程度であった。また、肺で軽微～軽度の肺胞浮腫及び肺組織球症及び脾臓で細動脈周囲リンパ鞘の軽度のリンパ球枯渇が認められた。その他の変化として、乳腺で軽微～軽度のびまん性肥大及び腎臓で近位尿細管上皮細胞の細胞質及び核の大小不同及び壊死が認められた。回復期間終了時には、30 mg/kg/day で腎臓における近位尿細管上皮細胞の細胞質の大小不同及び再生のみが認められた。したがって、本試験の無毒性量（NOAEL）は 2 mg/kg/day 以上の用量で肺の変化がみられたことから、0.2 mg/kg/day と推定された。

4.1.1.2 13 週間反復投与毒性試験

13 週間反復経口投与毒試験において、全用量で血中白血球数及びリンパ球数の減少が認められ、総蛋白及びグロブリンの減少も認められた。2 mg/kg/day 以上の用量で脾臓重量減少及び肺重量増加がみられ、全用量で脾臓において細動脈周囲リンパ鞘の軽微～中等度のリンパ球枯渇、副腎で軽度～中等度の束状帯肥大、腎臓で近位尿細管上皮細胞の軽度の細胞質及び核の大小不同及び軽微な変性・再生が認められた。また、乳腺の軽微～中等度のびまん性肥大が認められた。したがって、本試験の NOAEL は 2 mg/kg/day 以上の用量で肺の変化がみられたことから、0.2 mg/kg/day と推定された。

4.1.1.3 26 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

26 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験において、全用量で血中白血球数、リンパ球数の減少が用量及び投与期間依存的に認められた。また、全用量で肺重量増加、脾臓で白脾髄のリンパ球密度の軽微～軽度の減少及び胸腺で皮髄境界の消失、30 mg/kg/day で肺において肺胞の軽微～中等度の泡沫状マクロファージ集簇及び浮腫が認められた。回復期間終了時にこれらの変化は認められないか、発現頻度及び程度が減少しており、これらの変化には回復性が認められた。したがっ

Approved v2.0

て、本試験の NOAEL は 2 mg/kg/day 以上の用量で肺の変化がみられたことから、0.2 mg/kg/day と推定された。

4.1.2 サル

28 日間及び 13 週間の GLP 適用反復投与毒性試験におけるオザニモドの用量はいずれも 0.15、3 及び 30 mg/kg/day とした。また、39 週間の GLP 適用反復投与毒性試験におけるオザニモドの用量は 0.1、1 及び 15 mg/kg/day とした。オザニモドの曝露量は同用量を投与した試験で同程度であり、顕著な性差は認められなかった。また、オザニモドを 39 週間試験と同用量投与した 14 日間反復投与ブリッジング PK 試験で、ヒトの主要活性代謝物（CC112273 及び CC1084037）の曝露量を評価した。

4.1.2.1 28 日間反復投与毒性試験及び 14 日間回復性試験

28 日間反復経口投与毒性試験及び 14 日間回復性試験において、血中白血球数、好塩基球数、好酸球数及びリンパ球数の用量依存的な減少、30 mg/kg/day で赤血球系パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値）の減少、0.15 mg/kg/day 以上で総蛋白の減少、3 mg/kg/day 以上の用量でアルブミン及びグロブリンの減少並びに塩素の軽微な増加及び 30 mg/kg/day で無機リンの減少が認められた。また、3 mg/kg/day 以上で脾臓重量減少及び肺重量増加が認められ、骨髄で軽微～軽度のびまん性顆粒球過形成、肺で軽微～中等度の多巣性肺胞マクロファージ及び脾臓で細動脈周囲リンパ鞘のリンパ球枯渇、30 mg/kg/day 以上で腎臓において軽度の集合管上皮のびまん性好塩基性化が認められた。これらの所見は回復期間終了時には認められず、回復性が認められた。したがって、本試験の NOAEL は 3 mg/kg/day 以上の用量で肺の変化がみられたことから、0.15 mg/kg/day と推定された。

4.1.2.2 13 週間反復投与毒性試験

13 週間反復経口投与毒性試験において、全用量で血中白血球数、リンパ球数及び好塩基球数の減少が認められた。また、全用量で脾臓重量の減少並びに肺及び肝臓の重量増加が認められ、3 mg/kg/day 以上で副腎の重量増加及び軽度～中等度のびまん性皮質肥大並びに腎臓で近位尿細管上皮細胞の軽微な細胞質及び核の大小不同及び好塩基性尿細管、30 mg/kg/day で脾臓において細動脈周囲リンパ鞘の軽度のリンパ球枯渇、肺で肺胞マクロファージの軽微～軽度の空胞化、十二指腸、空腸及び腸間膜リンパ節のマクロファージの軽度の空胞化、骨髄で顆粒球過形成並びに肝臓で軽微な肝細胞肥大及び肝細胞壊死が認められた。したがって、本試験の NOAEL は 3 mg/kg/day 以上の用量で副腎及び腎臓の変化がみられたことから、0.15 mg/kg/day と推定された。

4.1.2.3 39 週間反復投与毒性試験及び 6 週間回復性試験

39 週間反復経口投与毒性試験及び 6 週間回復性試験において、全用量で血中白血球数、リンパ球数、減少並びに好中球数及び好塩基球数の減少が認められた。また、1 mg/kg/day 以上で脾臓重量減少及び肺重量増加が認められ、胸腺で皮髄比の軽微～軽度の減少、脾臓で白脾髄の軽微～軽度の萎縮及び細胞密度の減少並びに肺で軽微～軽度の肺組織球症が認められた。これらの所見は回復期間終了

Approved v2.0

時にはみられなくなるか、発現頻度及び程度が減少し、回復性が認められた。したがって、本試験の NOAEL は 1 mg/kg/day 以上の用量で肺の変化がみられたことから、0.1 mg/kg/day と推定された。

4.1.3 サル及びラットの反復投与毒性試験のまとめ及び結論

慢性毒性試験で認められた大部分の所見は、標的を介した $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する作動作用と一致していた。ラット及びサルに共通した所見として、末梢血リンパ球数の減少、胸腺の皮髄比の減少及び脾臓の白脾髄の萎縮及び細胞密度の減少が認められた。また、両動物種の肺重量の増加及び肺胞の単核細胞浸潤の発現頻度の増加も認められた。これらの肺の有害な変化により、反復投与毒性試験の NOAEL を設定した。回復性試験終了後には、末梢血リンパ球、胸腺、脾臓及び肺の変化は消失又は発現頻度及び程度が減少し、回復性が認められた。

サルを用いた 39 週間反復投与毒性試験（最高用量 15 mg/kg/day）でいずれの用量でも心電図検査に変化は認められず、病理組織学的検査では心臓壁の肥厚、心筋の変性及び線維化並びに血管障害は認められなかった。また、ラット 26 週間及びサル 39 週間反復投与毒性試験で肝臓を安全性評価した結果、血液生化学的検査、肝臓重量及び病理組織学的検査において、オザニモドに関連した変化は認められなかった。

慢性毒性試験で認められた肺並びにリンパ系器官及び組織の変化は臨床試験での用法及び用量設定に有用であったが、UC 患者の治療薬としてのオザニモドの現時点でのリスク・ベネフィットを考慮すると、新たな懸念はないと考えられる。

4.2 遺伝毒性試験

オザニモド及び検討したすべての代謝物（CC112273、CC1084037、RP101124、RP101988、RP101075 及び RP101442）は細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）で陰性であった。オザニモドはマウスリンフォーマ試験で陰性、CC112273 はヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験で陰性、CC1084037 は TK6 細胞を用いた小核試験で陽性であった。また、オザニモドはラットを用いた骨髄小核試験で陰性、CC1084037 はラットを用いた骨髄小核試験及び肝コメット試験で陰性であった。これらの結果から、オザニモド及びその代謝物に遺伝毒性はないと結論された。

4.3 がん原性試験

rasH2-Tg マウスを用いた 26 週間経口投与がん原性試験及びラットを用いた 24 ヵ月間経口投与がん原性試験によりオザニモドのがん原性を評価した。がん原性試験の用量は、野生型マウスを用いた 28 日間用量設定毒性試験及びラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験結果に基づいて選択し、米国食品医薬品局（FDA）の医薬品評価研究センター（CDER）の発がん性評価委員会（CAC）の承認を受けた。しかし、その時点では活性代謝物（CC112273 及び CC1084037）はヒトにおける主代謝物として同定されていなかったため、用量設定は主に未変化体の曝露量に基づいて実施した。

Approved v2.0

rasH2-Tgマウスを用いた26週間経口投与がん原性試験（用量：8、25及び80 mg/kg/day）において、25 mg/kg/day 以上で複数の器官の血管肉腫の発現頻度が有意に増加したが、低用量（8 mg/kg/day）では試験実施施設の背景値の範囲内であった。マウスにおける血管肉腫は、$S1P_1$ 受容体［内皮分化遺伝子 1（EDG1）受容体としても知られる］を介した内皮細胞の慢性刺激によるものと考えられている [13]。この受容体は血管内皮細胞（VEC）に多く存在し、内皮細胞の遊走、分化及び生存に重要である。マウスでは、$S1P_1$ 受容体に対する作動作用により胎盤増殖因子 2（PlGF2）の産生が持続する結果、VEC の有糸分裂が持続する。対照的に、ラット及びヒトの VEC は PlGF2 を放出しない又は一過性にしか放出せず、ラット及びヒトでは、持続的な VEC 刺激や血管肉腫の形成は認められない [13]。ラットを用いた 24 ヵ月間経口投与がん原性試験（用量：0.2、0.7 及び 2 mg/kg/day）では、オザニモドのいずれの用量でも発がん性を示さなかった。

以上より、$S1P_1$ 受容体の活性作用による血管肉腫形成はマウスに特異的でヒトへの外挿性はないと考えられる。なお、オザニモドの最高用量 80 mg/kg/day を rasH2-Tg マウスに経口投与した際の曝露量比は、オザニモドで 9539 倍、ヒト主要代謝物である CC112273 で 14 倍、CC1084037 で 6 倍、RP101124 で 912 倍である。非発がん量（NOAEL）の 8 mg/kg/day における曝露量比は、オザニモドで 984 倍、CC112273 で 1 倍、CC1084037 で 0.6 倍、RP101124 で 107 倍であった。また、ラットの非発がん量（NOAEL）である最高用量（2 mg/kg/day）での曝露量比はオザニモドで 74 倍、CC112273 で 0.2 倍、CC1084037 で 0.1 倍、RP101124 で 214 倍であった。一部の主要代謝物の曝露量比は 1 倍未満であったが、ICH ガイドライン「がん原性試験ガイドライン（S1B(R1)）」に記載されているとおり、これらの代謝物の構造類似性が高く、オザニモドと類似した薬理活性を有しているため、未変化体及び代謝物を合算して曝露量を評価することは科学的に妥当であると考えられた。活性成分の総曝露量（オザニモド、CC112273 及び CC1084037 の曝露量の総和）から、ラットにおける曝露量比は NOAEL の 2 mg/kg/day で 3 倍である。さらに、ICH M3(R2)ガイドラインに記載されているように、1 種類以上の動物種のがん原性試験で代謝物の十分な曝露量が得られたため、代謝物のがん原性を評価することは可能であると考えられた。したがって、rasH2-Tg マウスにおいて、CC112273 及び CC1084073 への十分な曝露量が得られたことを考慮すると、これら 2 種類のヒト主要活性代謝物のがん原性は適切に評価されているものと考えられる。

4.4 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性を評価するために、ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する（FEED）試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する（EFD）試験及びラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する（PPND）試験を実施した。

FEED 試験（用量：0.2、2 及び 30 mg/kg/day）では、雌雌の交配成績及び受胎能への有害な影響はいずれの用量でも認められなかった。また、胚の生存率にも投与の影響は認められなかった。雌雄ラットの一般毒性並びに生殖機能及び初期胚発生に対する NOAEL は 30 mg/kg/day であった（オザニ

Approved v2.0

モドの曝露量比は 1494 倍）。ラットを用いた 14 日間によるブリッジング PK 試験に基づくと、曝露量比は CC112273 で 6 倍、CC1084037 で 1 倍、RP101124 で 4229 倍であった。

ラットを用いた EFD 試験（用量：0.2、1 及び 5 mg/kg/day）では、高用量（5 mg/kg/day）では母動物で体重への影響、胚・胎児死亡の発現頻度の増加、平均胎児体重のわずかな減少、骨化遅延及び形態変化（全身浮腫 3 例、精巣位置異常 2 例）が認められた。その他の用量では母動物及び胚・胎児に対する有害所見は認められなかった。母動物及び胚・胎児毒性に対する NOAEL（中用量の 1 mg/kg/day）の母動物の曝露量比は、オザニモドで 35 倍、CC112273 で 0.1 倍、CC1084037 で 0.02 倍であった。

ウサギを用いた EFD 試験（用量：0.2、0.6 及び 2 mg/kg/day）では、着床後死亡（早期及び後期吸収）の顕著な増加が認められた。2 mg/kg/day では 2 腹の胎児 8 例に大血管奇形（主に大動脈弓）又は動脈欠損、0.6 mg/kg/day では異腹の胎児 2 例に大血管奇形（主に大動脈弓）が認められた。本試験の胚・胎児発生に関する NOAEL（低用量の 0.2 mg/kg/day）に基づく母動物の曝露量比は、オザニモドで 1 倍、CC112273 で 0.04 倍、CC1084037 で 0.1 倍であった。$S1P_1$ 受容体は EDG1 として発見され、内皮細胞の構造、遊走及び成熟に関与している [14]。この受容体は血管の成熟に重要な役割を果たしている [15]。これらのラットでの全身浮腫及びウサギの胚で認められた大血管形成の異常は、オザニモドによる血管形成における $S1P_1$ 受容体の調節作用に関連したものと考えられた。

PPND 試験（用量：0.2、0.7 及び 2 mg/kg/day）では、母動物及び出生児（F0 及び F1）への有害な影響はいずれの用量でも認められなかった。本試験の NOAEL（最高用量の 2 mg/kg/day）の母動物の曝露量比は、オザニモドで 53 倍、CC112273 で 0.2 倍、CC1084037 で 0.1 倍、RP101124 で 126 倍であった。

4.5 その他の毒性試験

4.5.1 免疫毒性試験

オザニモド（用量：0.2、0.7 及び 2 mg/kg/day）をラットに 33 日間経口投与した。また、Day 7 及び 25 にキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）（1 mg/mL）の 700 µL を T 細胞依存性抗体産生（TDAR）群に皮下投与した。

全用量でリンパ球数減少を伴った白血球数減少及び 2 mg/kg/day で脾臓重量の減少が認められ、これらの変化は S1P 調節薬の薬理作用と一致した。一次及び二次抗原刺激による IgG 抗体産生に対する阻害作用が全用量で認められたが、抗 KLH IgM 抗体産生に対する阻害作用は 2 mg/kg/day の雌のみで認められた。0.2 mg/kg/day で認められた変化は軽微であったため、本試験における NOAEL は 0.2 mg/kg/day と推定された。

Approved v2.0

4.5.2 依存性試験

オザニモドは米国において UC のほか多発性硬化症（MS）治療薬としても上市されており [16]、他の S1P 調節薬と同様に中枢神経系に対し活性があると考えられること [12] から、ICHM3(R2)ガイドラインに従って依存性試験である薬物自己投与試験を実施した。

自己投与モデルラットを用いて、3 日間連日で 1 日 3 回連続測定を各 1 時間実施し、オザニモド及び CC112273 投与により、固定比率 10（レバー押し 10 回に対して 1 回の被験物質投与）の投与スケジュールでの自己投与開始及び維持は認められず、いずれの用量の薬物乱用傾向に関する行動指標にも変化は認められなかった。また、本試験の陽性対照であるコカインは、いずれの薬物乱用傾向に関する行動指標にも性差は認められなかった。

以上より、オザニモド及び CC112273 は、本試験で用いた雌雄ラットにおいて強化効果を示さなかった。したがって、オザニモド及び CC112273 の薬物乱用の可能性は極めて低いと考えられた。

4.5.3 代謝物の毒性試験

ヒトの定常状態での主要活性代謝物である C112273 の総曝露量に対する比率が 73%であったことから、本代謝物の毒性試験を実施した。CC112273 の半減期はヒトでは長いが、げっ歯類及びウサギでは比較的短く、反復投与による蓄積はごくわずかであった。CC112273 投与による毒性試験の実施可能性を検討するため、経口投与による全身曝露量の向上を検討する試験を実施した。

4.5.3.1 CC112273 の反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験

ヒト活性代謝物である CC112273 の毒性評価をマウス及びラットを用いた反復投与毒性試験で実施した。マウスを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験（用量：10、30 及び 100 mg/kg/day）において、いずれの検査項目についても変化は認められなかった。したがって、本試験の最大耐量（MTD）は 100 mg/kg/day 超と推定された。ラットを用いた 96 日間反復投与毒性試験及び 29 日間回復性試験（用量：10、30 及び 100 mg/kg/day）において、100 mg/kg/day で血中白血球数及びリンパ球数の軽度減少、グロブリン濃度の減少がみられたが、本変化は有害でない変化であり、回復性が認められた。したがって、本試験の NOAEL は 100 mg/kg/day と推定された。CC112273 の生殖発生毒性試験は、ウサギを用いた EFD 試験のための用量設定試験を実施した。60 mg/kg/day 以上で母動物の摂餌量減少及び流産が認められた。したがって、本試験における母動物及び胚・胎児発生に関する NOAEL は 30 mg/kg/day であると推定された。

CC112273 の毒性試験を実施したいずれの動物種においてもバイオアベイラビリティが低く、高用量を投与しても高い曝露量を得ることはできなかった。さらに、水系及び溶剤系溶媒における CC112273 の溶解性が低いため、非経口経路では全身曝露量の向上が期待できず、げっ歯類及びウサギではヒトに比べて速やかに代謝されるため、CC112273 を投与した際の全身曝露量は低かった。CC112273 投与試験を実施した結果、未変化体であるオザニモドを投与した際に CC112273 の最も良好な曝露量が得られると結論された。

Approved v2.0

4.5.4 不純物の安全性評価

原薬中に認められた不純物の安全性評価をラット 26 週間反復投与毒性試験（NOAEL：0.2 mg/kg/day）及びサル 39 週間反復投与毒性試験（NOAEL：0.1 mg/kg/day）で使用したものと同一のロットで実施した。「原薬の不純物に関するガイドライン（ICH Q3A(R2)）」に規定されている安全性確認の必要な閾値である 0.15%を超える不純物が 1 種類（*不純物B ）あり、その含有量は [redacted]%であった。ヒト等価用量（HED）は、「FDA Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers（2005）」に基づき、ヒト体重を 60 kg として算出した。

ラット 26 週間及びサル 39 週間の反復投与毒性試験の結果に基づき、*不純物B の安全性は [redacted]%まで担保されており、ヒト曝露限界量は [redacted] µg/day（ラット及びサルの NOAEL から算出した *不純物B の HED である [redacted] µg/kg/day×60 kg）と算出された。*不純物B の規格値である [redacted]%に基づくと、オザニモド塩酸塩のヒト推奨最大用量である 1 mg 中に *不純物B は [redacted] µg 含有される。したがって、安全性が確認された不純物量の安全係数は [redacted]（曝露限界量/最大規格値 = [redacted] µg/[redacted] µg）である。また、*不純物B は後述する in silico によるハザード評価により変異原性陽性の警告構造は認められず、非変異原性不純物であると判断された。

ICH ガイドライン「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインの補遺（M7(R1)）」に従い、20 種類の既知、潜在的及び理論上の不純物の in silico によるハザード評価を実施した。その結果、19 種類は警告構造が認められなかったが、1 種類（*不純物A ）で変異原性陽性の警告構造が認められた。そのため、*不純物A の細菌を用いた復帰突然変異試験を実施し、陰性であった。

4.5.5 光毒性試験

ICH ガイドライン「光毒性試験ガイドライン（S10）」に従い、オザニモド、CC112273、CC1084037 及び RP101124 の 290～700 nm の波長における紫外線（UV）吸収スペクトルを測定し、MEC が更なる検討が必要となる基準値である 1000 $Lmol^{-1}cm^{-1}$ を超えるか検討した。その結果、いずれの測定対象物質も 290～320 nm 付近に UV 吸収ピークを示し、MEC が更なる検討が必要となる基準値である 1000 $mol^{-1}cm^{-1}$ を超えた。したがって、Balb/c 3T3 細胞を用いた in vitro 光毒性試験を実施した。なお、CC112273、CC1084037 及び RP101124 はオザニモドと化学構造及び UV 吸収スペクトルが類似していたためオザニモドのみ評価した。その結果、オザニモド及びその代謝物に光毒性は認められなかった。微量代謝物である RP101075 及び RP101988 についても、同様の in vitro 光毒性試験を実施し、いずれも陰性であった。

5 総括及び結論

オザニモドは経口投与可能な $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体選択的な調節薬である。オザニモドは非臨床試験で用いた動物種及びヒトで広範に代謝され、循環血中に複数の活性代謝物が生成する。げっ歯類及

＊新薬承認情報提供時に置換え

びウサギでは、オザニモド（未変化体）が循環血中での主要活性成分である。一方、ヒト循環血中では代謝物 CC112273 及びその下流代謝物 CC1084037 が主要活性成分である。

オザニモド及び活性代謝物は、細胞膜に発現する $S1P_1$ 受容体の細胞膜表面からの発現低下を誘導するため、機能的な $S1P_1$ 受容体拮抗薬として作用する。その結果、リンパ球がリンパ組織と循環血液の間に存在する S1P 濃度勾配を感知できなくなるため、リンパ球が末梢リンパ組織内に保持され、循環血中リンパ球数が減少する。検討したすべての動物種（マウス、ラット、ウサギ及びサル）において、循環血中リンパ球数の減少を PD マーカーとして評価した。

In vitro 薬理試験では、オザニモド及びその活性代謝物はヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対して同程度の活性及び選択性を示した。$S1P_1$ 受容体のシグナル伝達活性化はヒト、マウス、ラット及びサルのいずれにおいても認められ、$S1P_1$ 受容体に対する活性は、$S1P_2$、$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体と比較して高かった。マウス及びラットの $S1P_5$ 受容体に対するオザニモド及び代謝物の活性は、ヒト及びサルの $S1P_5$ 受容体に比べて低く、この違いは、ヒト及びサルに比べてマウス及びラットの $S1P_5$ 受容体アミノ酸配列の相同性が低いことに関連すると考えられた。放射性リガンドとして[^{3}H]-オザニモドを用いた競合結合アッセイにより、オザニモドの活性代謝物は[^{3}H]-オザニモドのヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体内結合部位で競合すること、また、オザニモド及びその活性代謝物は、ヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対して、内因性アゴニストである S1P のオルソステリック結合部位（内因性リガンド結合部位）で結合することが確認された。In vitro の S1P 受容体内在化評価の結果では、オザニモド及びその活性代謝物は、ヒト $S1P_1$ 受容体発現細胞の細胞膜上の $S1P_1$ 受容体発現量を減少させ、その作用は曝露後 1 時間の段階で認められた。これは、$S1P_1$ 受容体に対する機能的な拮抗作用（内在化）によるものであり、リンパ球がリンパ組織と循環血液の間に存在する S1P 濃度勾配を感知できなくなるため、リンパ球が末梢リンパ組織内に保持され、in vivo での循環血中リンパ球数の減少につながったと考えられる。なお、オザニモドはヒト $S1P_5$ 受容体の内在化は誘導しなかった。

In vivo 薬理試験では、広く使われている 2 種類のげっ歯類 IBD モデル（マウスナイーブ T 細胞養子移入モデル及びラット TNBS 誘発大腸炎モデル）を用いて、オザニモドの作用を評価した。オザニモドは PD 試験の結果から有効性を示すと予測された用量で両大腸炎モデルの臨床病態パラメータを改善し、生化学的及び組織レベルでの有効性が示された。非臨床動物モデルにおけるオザニモド及び活性代謝物の有効性は循環血中リンパ球数の減少と関連しており、$S1P_1$ 受容体を介する薬理作用及び臨床所見とも一致した。

副次的薬理試験では、オザニモド及びその代謝物について、55 種類又は 80 種類の受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対する標的外作用の可能性を検討したが、臨床的意義があると考えられる作用は特定されなかった。ヒトの主要代謝物である CC112273 においては in vitro で MAO-B 阻害作用が認められたが、セロトニン症候群の in vivo マウスモデルを用いた検討では、ヒトで薬理学的作用が確認された用量のオザニモド又は CC112273 を投与しても、セロトニン症候群の症状の発現又は増悪を誘導しなかった。

Approved v2.0

安全性薬理試験では、心血管系、呼吸系及び中枢神経系（体温、神経筋機能）に対する影響を評価した。オザニモド及びその代謝物は hERG チャネルを介した I_{Kr} を阻害したが、その阻害濃度はオザニモド塩酸塩 1 mg（オザニモド 0.92 mg）投与時の定常状態における各代謝物の臨床曝露量を上回った。テレメトリー装置を装着した雄性サルにオザニモドを 30 mg/kg までの用量で単回経口投与したところ、軽微かつ一過性の PR 間隔延長及び拡張期血圧低下が臨床曝露量を上回る用量で認められた。プレチスモグラフィーを用いたラットの呼吸機能評価では、FR の軽微な増加及び VT の軽微な減少が認められたが、VE に変化は認められなかった。オザニモド 30 mg/kg を QD で 7 日間反復経口投与することにより、肺重量の増加が認められた。同様の所見は反復投与毒性試験でも認められた。ラット及びサルにオザニモドを 30 mg/kg までの用量で経口投与しても体温への影響は認められず、ラットの行動に及ぼす影響を検討した FOB 試験でも、30 mg/kg までの用量で影響は認められなかった。心血管系作用、呼吸機能及び神経行動学的機能の in vivo 評価では、特記すべき安全性上の懸念は特定されなかった。

非臨床試験に用いた各動物種及びヒトにおける薬物曝露量は、オザニモド及びその代謝物の総計として評価した。ヒトではオザニモドの 3 種の主要代謝物（総薬物曝露量の 10%超）が定常状態で存在している。このうち 2 種の代謝物（CC112273 及び CC1084037）は $S1P_1$ 受容体及び $S1P_5$ 受容体に対してオザニモドと同程度の薬理活性を示し、残りの 1 種の代謝物（RP101124）は不活性代謝物であった。ヒトに反復投与したとき、循環血中曝露量の大部分は CC112273（約 66%）であり、次いで CC1084037（約 13%）及びオザニモド（約 5%）であった。

オザニモドは膜透過性の高い化合物であり、速やかに吸収され、全身曝露量は用量に比例して増加した。いずれの動物種においても、オザニモドの曝露量は性別及び投与期間に依存しなかった。動物におけるオザニモド及びその代謝物の消失半減期と投与間隔の関係から、オザニモド及び代謝物は、14 日間までの反復投与で定常状態に到達した。代謝物 CC112273 及び CC1084037 の曝露量もほぼ用量に比例して増加し、顕著な性差及び反復投与による蓄積は認められなかった。

げっ歯類又はサルに活性代謝物（CC112273 又は CC1084037）を直接経口投与したところ、CC112273 又は CC1084037 のクリアランスは大きく、CC112273 又は CC1084037 の溶解性が低いため経口吸収は限定的であり、30 mg/kg 以上の用量では曝露量はプラトーに達した。代謝物を直接投与したときの曝露量とオザニモドを投与したときの代謝物の曝露量を比較したところ、CC112273 及び CC1084037 の曝露量は、オザニモドを投与したときの方が明らかに高かった。代謝物の全身投与も検討したが、静脈内又は皮下投与に適した溶媒への CC112273 及び CC1084037 の溶解性が低いため、曝露量が改善する可能性は低いと考えられた。

毒性試験に使用した動物種におけるオザニモド及びその主要代謝物の血清又は血漿中の蛋白結合率は、ヒトと同程度であった。オザニモドは血液中の血球成分に速やかに分布した。ラット及びマウスにおいて、オザニモドは速やかに脳内移行した。[^{14}C]-オザニモド由来の放射能は組織に広く分布し、概して血液中放射能の減少と平行して減少した。また、妊娠ラットでは、オザニモド由来成分

Approved v2.0

は胎盤関門を通過して胎児に移行した。授乳中のラットでは、オザニモド由来成分が乳汁を介して哺乳児の組織に分布することが示唆された。

オザニモドは複数の代謝経路又は代謝酵素系を介して広範に代謝される。オザニモドの主要な代謝には3つの異なる経路があり、ALDH／ADHを介した酸化による一級アルコール代謝物RP101988の生成、CYPを介したメチレンヒドロキシ基の脱アルキル化によるインダミン代謝物RP101075の生成、及び腸内細菌を介したオキサジアゾール環の開裂によるRP101124の生成であった。これらの一次代謝物はさらに二次及び三次代謝を受け、複数の活性及び不活性代謝物を生成する。ヒトの主要活性代謝物CC112273はMAO-Bを介して生成される。CC112273はさらに酸化還元酵素を介してCC1084037に可逆的に代謝された。この相互変換反応は、CC1084037よりもCC112273側の生成に有利に傾いており、ヒトの循環血中で前者の代謝物が優勢であることの根拠と考えられる。このように、オザニモドの代謝は単一の代謝経路や代謝酵素系には依存せず、複数の代謝経路又は代謝酵素系を介して広範に代謝されると考えられた。

ラットにおいて投与された放射能は主に糞中に排泄され、微量の投与放射能が尿中に排泄された。BDCラットを用いた検討では、吸収された投与放射能は主に胆汁中に排泄された。排泄された投与放射能の成分は主に代謝物であり、未変化体の割合はわずかであったことから、吸収されたオザニモドは広範に代謝され、代謝物として胆汁を介して糞中排泄されることが示唆された。

オザニモド及びその代謝物のトランスポーターの基質性に関する検討から、オザニモドはP-gpの弱い基質であるが、BCRP、MATE1、MATE2-K、OATP1B1及びOATP1B3の基質ではなかった。RP101988はP-gp及びBCRPの基質であるが、MATE1、MATE2-K、OATP1B1及びOATP1B3の基質ではなかった。RP101124はBCRP及びOATP1B1の基質であるが、P-gp、MATE1、MATE2-K及びOATP1B3の基質ではなかった。RP101075及びCC112273はP-gp、BCRP、MATE1、MATE2-K、OATP1B1及びOATP1B3のいずれの基質ではなく、CC1084037はP-gp、BCRP、OATP1B1及びOATP1B3の基質ではなかった。

オザニモド及びその代謝物は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A4/5に対する顕著な阻害作用を示さなかった。オザニモド（推定臨床血漿中濃度から推定腸管内濃度）又は代謝物RP101124、CC112273及びCC1084037（推定臨床血漿中濃度の10倍超）は、ヒト肝細胞中でCYP1A2、CYP2B6及びCYP3A4に対する顕著な誘導作用を示さなかった。

CC112273及びCC1084037はMAO-Aに対する阻害作用を示さなかったが、MAO-Bを阻害し、IC50値はそれぞれ5.7及び58 nMであった。RP101075はMAO-A及びMAO-Bに対する阻害作用を示し、IC50値はそれぞれ1322及び56 nMであった。

オザニモドはP-gp及びBCRPに対して弱い阻害作用を示し、IC50値はそれぞれ8.8及び3.5 μMであった。CC112273及びCC1084037はBCRPに対して阻害作用を示し、IC50値はそれぞれ25及び23 nMであった。CC112273及びCC1084037はBCRPを阻害したが、推定臨床血漿中濃度の非結合型Cmax

Approved v2.0

は IC50 値の 0.1 未満と予測された。したがって、いずれの代謝物の BCRP 阻害作用に起因した DDI が起こる可能性は低いと考えられた。オザニモド及びその代謝物はいずれも、臨床的に意義のある濃度で薬物排出トランスポーター（MATE1 及び MATE2-K）又は取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1 及び OAT3）を阻害しなかった。

慢性毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験で認められた大部分の所見は、標的を介した $S1P_1$ 受容体及び $S1P_5$ 受容体に対する作動作用と一致していた。ラット及びサルに共通した所見として、末梢血リンパ球数の減少、胸腺の皮髄比の減少及び脾臓の白脾髄の萎縮及び細胞密度の減少が認められた。これらの所見は S1P 調節薬の薬理作用と一致する変化であり、オザニモド単独でなく総活性薬物の曝露量（オザニモド、CC112273 及び CC1084037 の曝露量の総和）を用いることが、曝露量比を算出するための有用な方法であることを示唆している。また、両動物種の肺重量の増加及び肺胞の単核細胞浸潤の発現頻度の増加も認められた。これらの肺の有害な変化により、反復投与毒性試験の NOAEL を設定した。回復性試験終了後には、末梢血リンパ球、胸腺、脾臓及び肺の変化は消失又は発現頻度及び程度が減少し、回復性が認められた。反復投与毒性試験では、TK に顕著な性差は認められなかった。GLP 適用毒性試験及びブリッジング PK 試験における曝露量及び曝露量比の要約を Table 4-1 に示す。これらのデータから、ICH ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（M3(R2)）に記載されているように、毒性試験及びがん原性試験の 1 種類以上の動物種でオザニモド及びその代謝物の十分な曝露量が得られ、非臨床安全性が評価可能であることが示された。

オザニモド及び検討したすべての代謝物（CC112273、CC1084037、RP101124、RP101988、RP101075 及び RP101442）は細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）で陰性であった。オザニモドはマウスリンフォーマ試験で陰性、CC112273 はヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験で陰性、CC1084037 は TK6 細胞を用いた小核試験で陽性であった。また、オザニモドはラットを用いた骨髄小核試験で陰性、CC1084037 はラットを用いた骨髄小核試験及び肝コメット試験で陰性であった。これらの結果から、オザニモド及びその代謝物に遺伝毒性はないと結論された。

オザニモドのがん原性は、rasH2-Tg マウスを用いた 26 週間経口投与がん原性試験及びラットを用いた 24 ヵ月間経口投与がん原性試験で評価した。がん原性試験の用量は、野生型マウスを用いた 28 日間用量設定毒性試験及びラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験結果に基づいて選択し、FDA の CDER の CAC の承認を受けた。しかし、その時点では活性代謝物（CC112273 及び CC1084037）はヒトにおける主代謝物として同定されていなかったため、用量設定は主に未変化体の曝露量に基づいて実施した。rasH2-Tg マウスを用いた 26 週間がん原性試験では、中用量及び高用量（25 及び 80 mg/kg/day）で複数の器官の血管肉腫の発現頻度が有意に増加したが、低用量（8 mg/kg/day）では試験実施施設の背景値の範囲内であった。マウスにおける血管肉腫は、$S1P_1$ 受容体［内皮分化遺伝子 1（EDG1）受容体としても知られる］を介した内皮細胞の慢性刺激によるものと考えられている[13]。この受容体は血管内皮細胞（VEC）に多く存在し、内皮細胞の遊走、分化及び生存に重要であ

Approved v2.0

る。マウスでは、$S1P_1$受容体に対する作動作用により胎盤増殖因子 2（PlGF2）の産生が持続する結果、VEC の有糸分裂が持続する。対照的に、ラット及びヒトの VEC は PlGF2 を放出しない又は一過性にしか放出せず、ラット及びヒトでは、持続的な VEC 刺激や血管肉腫の形成は認められない[13]。ラットを用いた 24 ヵ月間経口投与がん原性試験では、オザニモドのいずれの用量（最高用量 2 mg/kg/day）でも発がん性を示さなかった。

オザニモドの生殖発生毒性については、FEED 試験（ラット）、EFD 試験（ラット及びウサギ）及び PPND 試験（ラット）により評価した。FEED 試験では、雌雄の交配成績及び受胎能への有害な影響はいずれの用量でも認められなかった。また、胚の生存率にも投与の影響は認められなかった。ラット及びウサギの EFD 試験では、両動物種でオザニモドの臨床用量（0.92 mg）を上回る曝露量で催奇形性が認められたが、代謝物である CC112273 及び CC1084037 は臨床曝露量を下回っていた。ラットで認められた変化は、胚・胎児死亡の発現頻度の増加、平均胎児体重のわずかな減少、骨化遅延及び形態変化（全身浮腫 3 例、精巣位置異常 2 例）であった。ウサギで認められた変化は、着床後死亡（早期及び後期吸収胚）の顕著な増加であった。血管に形態学的変化が発生し、2 mg/kg/day では 2 腹の胎児 8 例に大血管奇形（主に大動脈弓）又は動脈欠損、0.6 mg/kg/day では異腹の胎児 2 例に大血管奇形（主に大動脈弓）が認められた。$S1P_1$受容体は EDG1 受容体として発見され、内皮細胞の構造、遊走及び成熟に関与している[14]。この受容体は血管の成熟に重要な役割を果たしている[15]。これらのラットの全身浮腫及びウサギの胚で認められた大血管形成の異常は、血管形成における $S1P_1$受容体の役割に関連したものと考えられた。PPND 試験では、母動物及び出生児（F1 及び F0）への有害な影響はいずれの用量でも認められなかった。

免疫毒性試験では、薬理作用から予測された血中リンパ球減少が認められ、一次及び二次抗原刺激による免疫グロブリン（Ig）G 抗体産生に対する阻害作用が認められた。

In vitro 光毒性試験の結果、オザニモド及びその代謝物に光毒性は認められなかった。

オザニモドは米国において UC のほか MS 治療薬としても上市されており[16]、他の S1P 調節薬と同様に中枢神経系に対し活性があると考えられること[12]から、ICH M3(R2)ガイドラインに従って依存性試験である薬物自己投与試験を実施した。その結果、オザニモド及び CC112273 の強化効果は認められず、薬物乱用の可能性は極めて低いと考えられた。

これらの毒性試験により、オザニモド及びヒト主要代謝物を非臨床毒性試験で包括的に評価した。慢性毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験で認められた主な所見は、薬理学的標的である$S1P_1$体及び$S1P_5$受容体に対する作動作用によるものと考えられた。

以上の非臨床試験の結果、オザニモドの適応症に対する有効性を裏付ける作用が示された。また、動物において薬理作用を示す用量でヒト臨床用量における曝露量と比較して十分に高い総曝露量（オザニモド及びヒト主要活性代謝物の総和）での忍容性、有害所見及び回復性が確認された。こ

Approved v2.0

れらの成績は、本薬を UC 患者に長期間経口投与する場合の有効性及び安全性を支持するものであった。

Approved v2.0

6 参考文献

1 Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science 2002;296:346-9.

2 Sanna MG, Wang SK, Gonzalez-Cabrera PJ, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. Nat Chem Biol 2006;2:434-41.

3 Sanchez T, Estrada-Hernandez T, Paik J-H, et al. Phosphorylation and action of the immunomodulatory FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. J Biol Chem 2003;278:47281-90.

4 Izzo R, Figliuzzi MM, Monteleone G. Sphingosine-1-phosphate receptor: a novel therapeutic target in ulcerative colitis. Expert Rev Clin Immunol 2016;12:1137-9.

5 Sanada Y, Mizushima T, Kai Y, et al. Therapeutic effects of novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist W-061 in murine DSS colitis. PLoS One 2011;6:e23933.

6 Shimano K, Maeda Y, Kataoka H, et al. Amiselimod (MT-1303), a novel sphingosine 1-phosphate receptor-1 functional antagonist, inhibits progress of chronic colitis induced by transfer of $CD4^{+}CD45RB^{high}$ T cells. PLoS One 2019;14:e0226154.

7 Song J, Matsuda C, Kai Y, et al. A novel sphingosine 1-phosphate receptor agonist, 2-amino-2-propanediol hydrochloride (KRP-203), regulates chronic colitis in interleukin-10 gene-deficient mice. J Pharmacol Exp Ther 2008;324:276-83.

8 Debien E, Mayol K, Biajoux V, et al. S1PR5 is pivotal for the homeostasis of patrolling monocytes. Eur J Immunol 2013;43:1667-75

9 Drouillard A, Mathieu A-L, Marçais A, et al. S1PR5 is essential for human natural killer cell migration toward sphingosine-1 phosphate. J Allergy Clin Immunol 2018;141:2265-8

10 van Doorn R, Pinheiro MAL, Kooji G, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor 5 mediates the immune quiescence of the human brain endothelial barrier. J Neuroinflammation 2012;9:133.

11 Walzer T, Chiossone L, Chaix J, et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. Nature Immunology 2007;8:1337-44.

12 Groves A, Kihara Y, Chun J. Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy. J Neurol Sci. 2013;328:9-18.

13 Pognan F, Mahl JA, Papoutsi M, et al. Induction of hemangiosarcoma in mice after chronic treatment with S1P-modulator siponimod and its lack of relevance to rat and human. Arch Toxicol 2018;92:1877-91.

14 Hla T, Maciag T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. J Biol Chem 1990;265:9308-13.

[15] Liu Y, Wada R, Yamashita T, et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. J Clin Invest. 2000;106:951-61.

[16] ZEPOSIA® (ozanimod) capsules, for oral use: HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. Initial U.S. Approval: 2020.
Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/209899s005lbl.pdf

Approved v2.0