用語及び略号一覧

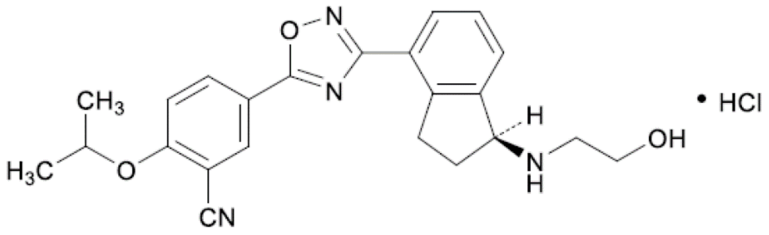
略号	英語	日本語
S1P	sphingosine 1-phosphate	スフィンゴシン 1–リン酸
$S1P_1$	sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1	スフィンゴシン 1–リン酸受容体サブタイプ 1
UC	ulcerative colitis	潰瘍性大腸炎

Approved v1.0

1 緒言

オザニモド（開発コード：RPC1063）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、自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎（UC）の病理学的変化が改善すると考えられる。

オザニモド塩酸塩の化学構造を以下に示す。



本申請における効能又は効果、用法及び用量の案を以下に示す。

【効能又は効果】

中等症から重症の潰瘍性大腸炎の治療

【用法及び用量】

通常、成人にはオザニモドとして 1～4 日目は 0.23 mg、5～7 日目は 0.46 mg、8 日目以降は 0.92 mg を 1 日 1 回経口投与する。

Approved v1.0

Table of Contents

1 まとめ....9
2 効力を裏付ける試験....12
2.1 In vitro 薬理試験....12
2.1.1 オザニモド及び代謝物の効力及び選択性....12
2.1.2 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....21
2.1.3 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....23
2.1.4 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....25
2.2 In vivo 薬理試験....28
2.2.1 炎症性腸疾患（IBD）のげっ歯類モデルにおけるオザニモドの薬効評価....28
2.3 循環血中リンパ球数に関連する薬物動態（PK）及び薬力学（PD）の統合解析....39
2.3.1 マウス及びラットにおけるオザニモド及び代謝物（RP101988）の評価....39
2.3.2 マウスにおける代謝物（CC112273）の評価....40
2.3.3 ラットにおけるオザニモド及び代謝物（RP101075、RP101442、RP101988、CC112273）の評価....41
2.3.4 マウス、ラット、イヌ及びカニクイザルにおけるにおけるオザニモド及び代謝物（RP101075、RP101442）の評価....45
3 副次的薬理試験....48
3.1 オザニモド及び代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101442、RP101988 及び RP101124）の標的外結合....48
3.2 In vivo モデルを用いた副次的薬理評価....49
3.2.1 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及び RP101075 の薬効評価....49
3.2.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスにおける RP101442 の薬効評価....50
3.2.3 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスにおける RP101988 及び CC112273 の有効性....51
3.2.4 クプリゾン誘発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....54
3.2.5 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....57
4 安全性薬理試験....59
4.1 心血管系に関する試験....60
4.1.1 In vitro 試験....60
4.1.2 In vivo 試験....63

Approved v2.0

4.2 呼吸系に関する試験 65
4.2.1 ラットを用いた呼吸機能解析（GLP 非適用） 65
4.2.2 ラットを用いた呼吸機能解析（GLP 適用） 65
4.3 中枢神経系に関する試験 67
4.3.1 ラットにおけるオザニモド投与による機能観察総合評価及び運動機能評価（GLP 適用） 67
5 薬力学的薬物相互作用試験 67
6 考察及び結論 67
7 参考文献 70

Approved v2.0

List of Tables

Table 2.1.1-1: ヒト S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価 16
Table 2.1.1-2: マウス S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価 17
Table 2.1.1-3: ラット S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価 18
Table 2.1.1-4: サル S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価 19
Table 2.1.2-1: ヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する S1P、オザニモド及び代謝物の結合阻害活性 22
Table 2.1.3-1: オザニモド及び代謝物の $S1P_1$ 受容体内在化における効力及び内在化応答 24
Table 2.1.4-1: マウス、ラット及びヒト初代培養アストロサイトをオザニモド、RP101988、CC112273 又は FTY720-P で処理した際の AKT 及び ERK 蛋白質リン酸化 26
Table 2.2.1.1-1: IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド 21 日間投与後の結腸ホモジネート中サイトカイン量 35
Table 2.2.1.3-1: げっ歯類 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 38
Table 2.3.3-1: 総活性薬物濃度算出に用いた未変化体及び活性代謝物 42
Table 2.3.4-1: 各動物種におけるオザニモド（RPC1063）及び代謝物がリンパ球数減少を示す血漿中薬物濃度と投与量の要約 47
Table 3.2.3-1: EAE モデルマウスでのオザニモド及び活性代謝物の薬効一覧 54
Table 3.2.4-1: クプリゾン誘発マウス脱髄モデルでのオザニモド投与による脱髄変化の要約 55
Table 3.2.5-1: セロトニン症候群のマウスモデルにおける試験結果要約 59
Table 4.1.1-1: オザニモド及び代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101988、RP101442 及び RP101124）の hERG チャネルへの影響 60

Approved v2.0

List of Figures

Figure 2.1.2-1: [^{3}H]-オザニモドを用いたヒト $S1P_1$ 又は $S1P_5$ 受容体を発現する CHO 細胞由来調製膜画分に対する飽和結合解析 22

Figure 2.1.3-1: オザニモド及び FTY720-P による $S1P_5$ 受容体内在化評価（1 及び 24 時間経過後の $S1P_5$ 受容体発現割合） 25

Figure 2.1.4-1: マウス初代培養アストロサイトにおける AKT 及び ERK 蛋白質リン酸化 27

Figure 2.1.4-2: オザニモド介在性 AKT 蛋白質リン酸化を指標とした $S1P_1$ 受容体選択的拮抗剤 W146 を用いた Schild 解析 28

Figure 2.2.1.1-1: IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモドによる結腸重量対長さ比に対する効果 30

Figure 2.2.1.1-2: IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド最終投与 24 時間後の循環血中リンパ球数 31

Figure 2.2.1.1-3: IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド投与後の結腸の病理組織学的スコア 32

Figure 2.2.1.1-4: IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド投与後の遠位結腸粘膜厚 33

Figure 2.2.1.1-5: 正常マウス及び IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド又は抗 TNF 抗体投与後の遠位結腸の組織学的顕微鏡写真（代表例） 34

Figure 2.2.1.2-1: IBD ラット（TNBS モデル）でのオザニモド投与による体重推移 36

Figure 2.2.1.2-2: IBD ラット（TNBS モデル）でのオザニモド投与による結腸重量対長さ比に対する効果 37

Figure 2.2.1.2-3: IBD ラット（TNBS モデル）でのオザニモド投与後の結腸の病理組織学的スコア 37

Figure 2.3.1-1: オザニモド又は RP101988 をラットに単回経口投与した際の循環血中 CD4 陽性 T リンパ球数の変化 40

Figure 2.3.2-1: マウスにおける CC112273 の 5 日間 QD 反復経口投与後 24 時間の PK/PD 41

Figure 2.3.3-1: オザニモド又は代謝物をラットに投与した際の血中総リンパ球数（実線）と血漿中の平均総活性薬物濃度（破線）の比較 43

Figure 2.3.3-2: オザニモド及び活性代謝物に関する血漿中総活性薬物濃度の AUC と循環血中リンパ球数の変化率の AUC の関連性 44

Approved v2.0

Figure 2.3.4-1: マウスにおけるオザニモド（RPC1063）1 mg/kg 単回経口投与後の PK/PD 解析 45
Figure 2.3.4-2: ラットにおけるオザニモド（RPC1063）5 日間 QD 反復経口投与時のリンパ球数の変化 46
Figure 2.3.4-3: イヌにおけるオザニモド（RPC1063）1.5 mg/kg 単回経口投与後の PK/PD 解析 46
Figure 2.3.4-4: サルにおけるオザニモド（RPC1063）単回経口投与後のリンパ球数の変化 47
Figure 3.2.1-1: オザニモド又は RP101075 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移 50
Figure 3.2.2-1: RP101442 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移 51
Figure 3.2.3-1: RP101988 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移 52
Figure 3.2.3-2: CC112273 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移 53
Figure 3.2.4-1: 試験開始 6 週での脳梁の神経変性に関する抗ニューロフィラメント H 染色による解析 56
Figure 3.2.4-2: 試験開始 6 週での脱髄に関する MRI/MTR による解析 56
Figure 3.2.4-3: 大脳皮質における PLP 染色の代表的画像 57

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
ANOVA	analysis of variance	分散分析
AUC	area under the plasma concentration time curve	血漿中濃度時間曲線下面積
AUC(0-24h)	area under the plasma concentration time curve over 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
BLQ	below the limit of quantification	定量下限未満
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	環状アデノシン一リン酸
CD	cluster of differentiation (immune cell marker)	分化抗原群
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
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
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
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
GFP	Green fluorescent protein	緑色蛍光蛋白質
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-[^{35}S]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
h or hr	hour	時間

Approved v2.0

略号	英語	日本語
HA	hemagglutinin	ヘマグルチニン
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
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
IFN-γ	interferon gamma	インターフェロンガンマ
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
MAO	monoamine oxidase	モノアミンオキシダーゼ
MFI	mean fluorescence intensity	平均蛍光強度
MIF	maximum inspiratory flow	最大吸気流量
Min	minute	分
MOG_{35-55}	myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55	ミエリンオリゴデンドロサイト糖蛋白質 35-55
MRI	magnetic resonance imaging	磁気共鳴画像法
MT1	melatonin receptor 1	メラトニン 1 受容体
MTR	magnetization transfer ratio	磁化移動率
NOEL	no observed effect level	無作用量
NR	no response	無効
NS	not significantly different	有意差なし
pA2	negative log of the concentration of antagonist required to shift an agonist dose response curve by a factor of 2	活性物質の用量―反応曲線を 2 倍だけ高用量側に平行移動させるのに必要な競合的遮断薬の用量（モル濃度）の負の対数
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
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PLP	myelin proteolipid protein	ミエリンプロテオリピド蛋白質
QD	once daily	1 日 1 回

Approved v2.0

略号	英語	日本語
QTc	corrected QT	補正した QT 間隔
RT	relaxation time	緩和時間
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
SD	standard deviation	標準偏差
SEM	standard error of the mean	平均値の標準誤差
SMI-32	anti-neurofilament H nonphosphorylated mouse monoclonal antibody (clone 32)	マウス抗非リン酸化ニューロフィラメント H モノクローナル抗体（クローン 32）
Te	expiratory time	呼気時間
Th	T helper cell	ヘルパーT 細胞
Ti	inspiratory time	吸気時間
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
VE	minute volume	分時換気量
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 まとめ

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、自己免疫疾患である潰瘍性大腸炎（UC）の病理学的変化が改善すると考えられる[1,2,3]。

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。したがって、S1P 受容体調節薬による $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体の作動作用は、UC の治療に有効性を示すと考えられる。

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（【M2.7.2、1.2.1.3 項】及び【M2.6.4、3.2 項】参照）。各動物種においては、オザニモド（未変化体）が循環血中での主要活性成分として存在する（【M2.6.4、3.2 項】参照）。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（【M2.7.2、3.5.1 項】及び試験番号 RPC01-1914 参照）、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（一部の試験報告書では RP112273 又は RP-2273 と記載）、CC1084037、RP101124、RP101075（一部の試験報告書では 1075 と記載）、RP101988、RP101442、RP112289 及び RP112509 であった。

In vitro 評価では、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

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

Approved v2.0

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、これ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る。オザニモド及びその活性代謝物はいずれもサル $S1P_5$ 受容体に対しても強力な作動作用を示すことから、主要な毒性試験にはサルを用いた。さらに、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。一方、不活性な代謝物である RP101124 は、[^{3}H]-オザニモドの $S1P_1$ 又は $S1P_5$ 受容体への結合と競合しなかったことから、受容体への結合活性がないために細胞内シグナル伝達活性化を示さないと考えられた。In vitro 評価の結果から、オザニモド及び循環血中の全ての活性代謝物が細胞膜に発現する $S1P_1$ 受容体の細胞膜表面からの発現低下を誘導したことから、リンパ球の末梢リンパ組織への保持に必要な $S1P_1$ 受容体内在化の作用機序が確認された。オザニモド及びヒトでの主要活性代謝物である CC112273 並びに微量活性代謝物 RP101988 は、S1P 受容体を発現していることが知られているヒト、マウス及びラットのアストロサイト初代培養系 [12] を用いた評価において、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細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）及び蛋白質キナーゼ B（AKT）のリン酸化[13]を強力に誘導した。この細胞内シグナル伝達活性化は $S1P_1$ 受容体を介しており、$S1P_5$ 受容体を介したものではないことが薬理学的に確認された。

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。げっ歯類大腸炎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関連することが示され、これらの結果は $S1P_1$ 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相互作用の可能性を検討した。1 μM のオザニモドで認められた標的外相互作用は、5-ヒドロキシトリプタミン（5-HT、セロトニン）トランスポーターのみであった。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）、5-HT 受容体 2B（5-HT2B）、σ 受容体、γアミノ酪酸（GABA）作動性 Cl^- チャネルの各受容体又はイオンチャネルに対する結合を 50%超阻害した。これらの受容体、トランスポーター及びイオンチャネルに対するオザニモド及び CC1084037 の活性をさらに検討した結果、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最高血漿中濃度（Cmax）の中央値（それぞれ 0.62 nM 及び 2.32 nM）（3.1 項参照）よりも極めて高い濃度条件でのみで活性が確認された。CC112273、RP101124 及び RP101075 は 1 μM の濃度で、RP101988 は 2 μM、RP101442 は 3 μM の濃度でその他の標的外相互作用は認められなかった。

Approved v2.0

$S1P_1$ 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[14,15]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たところ、概して用量依存的な循環血中リンパ球数の減少を伴う、疾患スコアの低下が示された。同様にクプリゾン誘発マウス脱髄モデル [12] においては、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、脱髄誘発期間終了後も継続して 12 週間投与した際の再髄鞘形成については改善しなかった。

オザニモド及び下流代謝物の酵素阻害活性に関する検討では、CC112273 は in vitro でモノアミンオキシダーゼ（MAO）-B 特異的な基質代謝を 50%阻害する濃度（IC50）値 5.72 nM で阻害し、MAO-A と比較して 1000 倍超高い阻害作用を示した。オザニモド投与によるセロトニン症候群誘発の可能性を検討するために、マウスモデルを用いてオザニモド又は CC112273 をヒトで薬理学的作用が確認された用量で投与し、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。

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ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（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}）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認められた。また、オザニモドの最高用量（30 mg/kg）での投与 4 時間後に心拍数が最大 29%減少した。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、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。肺重量は、30 mg/kg/day のラット反復投与試験での剖検時において溶媒投与群と比較して約 90%の増加が認められた。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なかった。ラットの行動に及ぼす影響を検討した機能観察総合評価（FOB）試験では、オザニモドを 30 mg/kg までの用量で投与しても影響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。

オザニモドと代謝物 CC112273 及び CC1084037 の構造は総じて類似している。これらの化合物はオザニモドと同様の標的活性及び選択性プロファイルを示し、いずれもヒト $S1P_1$ 受容体上の同じオルソステリック結合部位と相互作用する。各種動物モデルを用いたこれらの化合物の検討により、循

Approved v2.0

環血中リンパ球数の減少及び大腸の炎症に対する有効性が認められたことから、作動作用による $S1P_1$ 受容体内在化を介した作用機序が示された。

以上に示した薬理学的評価により、オザニモドが UC 患者に対する新規の薬理作用を有する治療薬となる可能性が示された。

2 効力を裏付ける試験

2.1 In vitro 薬理試験

2.1.1 オザニモド及び代謝物の効力及び選択性

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。

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 活性及び選択性について、4 動物種（ヒト、マウス、ラット及びサル）の S1P 受容体ファミリー（$S1P_1$、$S1P_2$、$S1P_3$、$S1P_4$ 及び $S1P_5$ 受容体）に対して評価した（試験番号 RP-PH-001-3.0、RP-PH-002-1.0、RP-PH-010、RP-PH-019 及び RP-PH-014）。RP-PH-001-3.0 試験及び RP-PH-002-1.0 試験では、ヒト $S1P_1$～$S1P_5$ 受容体に対するオザニモド及び各代謝物の効力について、受容体毎に異なる評価系を用いて評価した（データは示さず）。その他の試験では、オザニモド及び代謝物の直接比較評価を各動物種の $S1P_1$～$S1P_5$ 受容体について実施した。

オザニモド及びその代謝物の 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。各結果は、Table 2.1.1-1（ヒト）、Table 2.1.1-2（マウス）、Table 2.1.1-3（ラット）及び Table 2.1.1-4（サル）に示した。各試験化合物の $S1P_1$～$S1P_5$ 受容体における作動作用の濃度反応性を評価し、最大反応の 50%となる濃度（EC50）を効力［平均値 ± 標準誤差（SEM）として表示］とし、また、濃度反応曲線の最大値と最小値の差を作動作用の大きさを示す固有活性（平均値 ± SEM として表示）として算出した。いずれの試験でも、内因性リガンドである S1P を陽性対照とし、S1P の固有活性を基準としてデータを標準化した。オザニモド及び代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101988、RP101442、RP112289 及び RP112509）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。オザニモドの $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する EC50 値は、それぞれ 1.03 ± 0.16 nM 及び 10.66 ± 0.29 nM であり、$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する固有活性はそれぞれ S1P の固有活性に対して 91.9 ± 1.9%及び 97.4 ± 5.0%であった。オザニモドのヒト $S1P_2$ 受容体に対す

Approved v2.0

る固有活性は S1P の 28.1 ± 0.7%であり、評価した最高濃度 10 μM でのみ認められた。ヒト $S1P_3$ 受容体に対する EC50 値は 2618 ± 203 nM で、ヒト $S1P_1$ 受容体に対する効力と比較して 2541 分の 1 であり、また、固有活性は S1P の 47.5 ± 2.7%であった。オザニモドのヒト $S1P_4$ 受容体に対する固有活性も同様に弱く、評価した最高濃度の 10 μM で S1P の 37.1 ± 0.5%であった（Table 2.1.1-1）。したがって、オザニモドは、ヒトにおいては他の 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り、$S1P_1$ 受容体に対する選択性は $S1P_5$ 受容体の 10 倍程度であることが示された。

ヒト S1P 受容体では、オザニモドの代謝物は未変化体と同様の活性プロファイルを示し、$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対して強力かつ選択的な作動作用を示した。これら代謝物のうち、最も強力な CC1084037 の EC50 値はヒト $S1P_1$ 受容体に対して 0.20 ± 0.01 nM、ヒト $S1P_5$ 受容体に対して 3.02 ± 0.16 nM であり、また、活性が認められた代謝物の中で最も活性の弱い RP112509 で、EC50 値はヒト $S1P_1$ 受容体に対して 10.51 ± 1.53 nM、ヒト $S1P_5$ 受容体に対して 68.98 ± 5.67 nM であった。代謝物の固有活性もヒト $S1P_1$ 受容体では同様であり、RP112289 で 68.2 ± 1.8%とわずかに低かったことを除き、概して S1P に対する固有活性の 85%を上回った。ヒト $S1P_5$ 受容体では、代謝物の固有活性はやや変動幅が大きかったが、概して同様の傾向が認められ、活性が認められた代謝物の中で最も活性が低い RP112289 の固有活性は、S1P に対する応答の 38.4 ± 2.0%であった。オザニモドと同様に、代謝物はヒト $S1P_2$～$S1P_4$ 受容体に対しては弱い活性を示すか又は全く活性を示さなかった。このうち、RP101075 のみがヒト $S1P_2$ 受容体に対して測定可能な応答を示し、評価時最高濃度の 10 μM で S1P に対する固有活性の 36.8 ± 2.1%と算出された。ヒト $S1P_3$ 受容体では、RP101988 及び CC1084037 はいずれも弱い作動活性を示し、EC50 値はそれぞれ 2773 ± 379 nM 及び 2414 ± 749 nM であったことから、ヒト $S1P_1$ 受容体に対する選択性はヒト $S1P_3$ 受容体と比較してそれぞれ 8403 倍及び 12070 倍と示された。また、これらの代謝物もオザニモドと同様に固有活性は低かった（それぞれ 44.2 ± 9.0%及び 41.0 ± 13.0%）。ヒト $S1P_4$ 受容体に対する RP101075 の EC50 値は、1801 ± 317 nM であり、ヒト $S1P_1$ 受容体に対する選択性は 5145 倍と算出された。また、固有活性は S1P に対する応答の 54.1 ± 4.3%であった。RP101988 は、最高濃度の 10 μM でのみ、$S1P_4$ 受容体に対して S1P の固有活性の 21.2 ± 1.3%という弱い応答を示した（Table 2.1.1-1）。

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。オザニモドの $S1P_1$ 受容体に対する EC50 値はマウス、ラット及びサルでそれぞれ 0.90 ± 0.21 nM、1.02 ± 0.14 nM 及び 1.29 ± 0.05 nM であり、固有活性はマウス、ラット及びサルでそれぞれ S1P に対する応答の 92.0 ± 2.1%、90.9 ± 2.7%及び 93.3 ± 0.7%であった［マウス（Table 2.1.1-2）、ラット（Table 2.1.1-3）、サル（Table 2.1.1-4）］。また、代謝物では、マウス、ラット及びサルの $S1P_1$ 受容体に対する効力は、CC1084037 が最も強く、EC50 値はそれぞれ 0.16 ± 0.01 nM、0.17 ± 0.02 nM 及び 0.23 ± 0.01 nM であり、また、RP112509 が最も弱く、EC50 値はそれぞれ 10.59 ± 1.82 nM、10.89 ± 1.61 nM 及び 17.27 ± 1.02 nM であった。同様に、代謝物の固有活性もヒト

Approved v2.0

$S1P_1$ 受容体とマウス、ラット及びサルの $S1P_1$ 受容体で類似しており、RP112289 の固有活性が、マウス、ラット及びサルでそれぞれ 71.8 ± 1.3%、71.7 ± 3.9%及び 61.1 ± 5.3%とわずかに低かったことを除き、いずれの代謝物も S1P に対する固有活性の 80%を上回った［マウス（Table 2.1.1-2）、ラット（Table 2.1.1-3）、サル（Table 2.1.1-4）］。

$S1P_2$～$S1P_4$ 受容体に対する選択性はマウス、ラット及びサルでヒトと同様に維持されていた。例えば、マウス及びラットでは、オザニモド及びいずれの代謝物の EC50 値も 3.333 μM 超及び 10 μM 超であった［マウス（Table 2.1.1-2）、ラット（Table 2.1.1-3）］。同様に、サルでもオザニモド及び代謝物は選択的に作用し、$S1P_2$～$S1P_4$ 受容体での EC50 値（423 nM～10 μM 超）は、$S1P_1$ 受容体と比較して 1800 倍超であり、明確な用量反応性が認められた化合物の固有活性は S1P の 22%未満であった（Table 2.1.1-4）。

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効力は、ヒトの $S1P_5$ 受容体に比べて低かった。例えば、オザニモドは、マウス $S1P_5$ 受容体に対して 1048.80 ± 160.22 nM の EC50 値を示し、ヒト $S1P_5$ 受容体の 98 分の 1 の効力であったが、固有活性は S1P に対する応答の 86.4 ± 1.3%と同程度であった。同様に、オザニモドのラット $S1P_5$ 受容体に対する EC50 値は 1111 nM 超であったが、固有活性は S1P に対する応答の 78.9 ± 2.6%であった（Table 2.1.1-3）。ヒト血中代謝物の中で最も多く生成される CC112273 及び CC1084037 のマウス $S1P_5$ 受容体に対する EC50 値はそれぞれ 310.60 ± 28.93 nM 及び 164.07 ± 35.71 nM であり、固有活性はそれぞれ 15.0 ± 1.8%及び 70.3 ± 2.2%であった（Table 2.1.1-2）。ラット $S1P_5$ 受容体における CC112273 及び CC1084037 の活性は同様にヒト $S1P_5$ 受容体と比べて低く、EC50 値はそれぞれ 200.20 ± 32.95 nM 及び 205.47 ± 11.05 nM であり、また、固有活性はそれぞれ 11.1 ± 1.9%及び 70.3 ± 21.4%であった（Table 2.1.1-3）。

オザニモド及び代謝物のサル $S1P_5$ 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。サル $S1P_5$ 受容体における CC1084037、オザニモド及び CC112273 の EC50 値（6.93 ± 0.16 nM、23.55 ± 0.49 nM 及び 54.20 ± 3.89 nM、Table 2.1.1-4）は、いずれもヒト $S1P_5$ 受容体における EC50 値（3.02 ± 0.16 nM、10.66 ± 0.29 nM 及び 29.32 ± 1.98 nM、Table 2.1.1-1）の約 2 倍であった。オザニモド、CC112273 及び CC1084037 の固有活性の範囲も、サル $S1P_5$ 受容体（72.1～99.0%）とヒト $S1P_5$ 受容体（69.8～97.4%）で同程度であった。また、RP112289 はヒト $S1P_5$ 受容体と同様に、サル $S1P_5$ 受容体でも活性が認められた代謝物の中で最も低い固有活性を示し、S1P に対する応答の 26.9 ± 1.9%であった。

$S1P_5$ 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、ヒト及びサルと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（試験番号 RP-PH-019）。

RP101124 はいずれの条件でも活性を示さず、ヒト（Table 2.1.1-1）、マウス（Table 2.1.1-2）、ラット（Table 2.1.1-3）及びサル（Table 2.1.1-4）のいずれの S1P 受容体サブタイプにおいても測定可能な

Approved v2.0

作動作用の濃度反応性は認められなかった。例えば、ヒト $S1P_1$受容体においては、RP101124 の固有活性は S1P に対する応答の 11.8 ± 1.7%であり、同様にヒト $S1P_5$受容体においては S1P に対する応答の 15.8 ± 3.7%であった（Table 2.1.1-1）。

以上より、オザニモドの活性代謝物はいずれもヒト S1P 受容体に対する活性プロファイルがオザニモド（未変化体）と同様であり、$S1P_2$、$S1P_3$及び$S1P_4$受容体と比較して、$S1P_1$及び$S1P_5$受容体に対して高い選択性で強力な作動作用を示した。こうした選択性プロファイルは、マウス及びラットの$S1P_5$受容体に対する作動活性がヒト $S1P_5$受容体よりも低いことを除き、マウス、ラット及サルのいずれにおいても維持されていた。マウス及びラットの $S1P_5$受容体に対する低い活性は、げっ歯類（マウス及びラット）とヒト及びサルとの間でのアミノ酸配列の相同性の低さによる可能性が高いと考えられた。

Approved v2.0

Table 2.1.1-1: ヒト S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価

Compound	Human $S1P_1$		Human $S1P_2$		Human $S1P_3$		Human $S1P_4$		Human $S1P_5$	
	EC50 (nM)	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**
S1P	33.18 ± 0.83	100	213.06 ± 12.21	100	1.56 ± 0.11	100	550.90 ± 25.24	100	7.32 ± 0.83	100
Ozanimod	1.03 ± 0.16	91.9 ± 1.9	> 10000	*28.1 ± 0.7*	2618 ± 203	47.5 ± 2.7	> 10000	*37.1 ± 0.5*	10.66 ± 0.29	97.4 ± 5.0
CC112273	**2.99 ± 0.17**	**85.9 ± 2.9**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**29.32 ± 1.98**	**69.8 ± 5.0**
CC1084037*	**0.20 ± 0.01**	**85.3 ± 1.6**	**> 10000**	**NR**	**2414 ± 749**	**41.0 ± 13.0**	**> 10000**	**NR**	**3.02 ± 0.16**	**86.5 ± 6.8**
RP101124	**> 10000**	***11.8 ± 1.7***	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**15.8 ± 3.7**
RP101075	0.35 ± 0.01	85.6 ± 1.9	> 10000	*36.8 ± 2.1*	> 10000	NR	1801 ± 317	54.1 ± 4.3	4.49 ± 0.67	74.8 ± 6.4
RP101988	0.33 ± 0.01	85.8 ± 3.8	> 10000	NR	2773 ± 379	44.2 ± 9.0	> 10000	*21.2 ± 1.3*	29.15 ± 1.25	79.9 ± 5.3
RP101442	3.30 ± 0.25	87.0 ± 2.9	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	44.77 ± 5.10	69.0 ± 6.8
RP112289	9.28 ± 0.79	68.2 ± 1.8	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	43.51 ± 3.66	38.4 ± 2.0
RP112509	10.51 ± 1.53	87.6 ± 0.9	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	68.98 ± 5.67	54.2 ± 1.4

EC50 = concentration at which 50% of maximal activity is observed; IA = intrinsic activity (% relative to S1P response); NR = no response (Mean %Emax < 10% where Emax is the maximal response achieved relative to the internal positive control, sphingosine 1-phosphate); S1P = sphingosine 1-phosphate; $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$, or $S1P_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1, 2, 3, 4, or 5, respectively.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM), N = 3 to 6 independent experiments.
Italic = response achieved at the top test compound concentration of 10000 nM.
Bold = major human metabolites that contribute > 10% of the total drug-related exposure in the plasma.

*CC1084037 is a racemate. R and S enantiomers of CC1084037 are equally potent in in vitro assays (Report RP-PH-014).
Source: Report RP-PH-010.

Table 2.1.1-2: マウス S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価

Compound	Mouse $S1P_1$		Mouse $S1P_2$		Mouse $S1P_3$		Mouse $S1P_4$		Mouse $S1P_5$	
	EC50 (nM)	IA (%)	EC50 (nM)	IA (%)	EC50 (nM)	IA (%)	EC50 (nM)	IA (%)	EC50 (nM)	IA (%)
S1P	26.26 ± 2.38	100	35.84 ± 1.40	100	9.19 ± 0.97	100	455.6 ± 124.2	100	21.73 ± 2.13	100
Ozanimod	0.90 ± 0.21	92.0 ± 2.1	> 10000	*11.9 ± 0.6*	> 10000	NR	> 10000	48.5 ± 4.5	1048.80 ± 160.22	*86.4 ± 1.3*
CC112273	**2.77 ± 0.30**	**86.1 ± 4.1**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**310.60 ± 28.93**	**15.0 ± 1.8**
CC1084037*	**0.16 ± 0.01**	**83.2 ± 2.5**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**164.07 ± 35.71**	**70.3 ± 2.2**
RP101124	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**
RP101075	0.28 ± 0.02	85.8 ± 3.5	> 10000	*11.7 ± 0.8*	> 10000	*11.0 ± 1.2*	> 3333	77.0 ± 6.6	380.98 ± 125.24	67.9 ± 4.1
RP101988	0.38 ± 0.02	87.3 ± 2.3	> 10000	*NR*	> 10000	*12.0 ± 2.2*	> 10000	NR	> 3333	55.2 ± 8.6
RP101442	2.86 ± 0.13	86.5 ± 1.2	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	453.23 ± 240.61	9.2 ± 0.7
RP112289	8.43 ± 1.12	71.8 ± 1.3	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR
RP112509	10.59 ± 1.82	86.7 ± 3.3	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR

EC50 = concentration at which 50% of maximal activity is observed; IA = intrinsic activity (% relative to S1P response); NR = no response (Mean %Emax < 10%, where Emax is the maximal response achieved relative to the internal positive control, sphingosine 1-phosphate); S1P = sphingosine 1-phosphate; $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$, or $S1P_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1, 2, 3, 4, or 5, respectively.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM), N = 3 to 6 independent experiments.
Italic = response achieved at the top test compound concentration of 10000 nM.
Bold = major human metabolites that contribute > 10% of the total drug-related exposure in the plasma.
*CC1084037 is a racemate. R and S enantiomers of CC1084037 are equally potent in in vitro assays (Report RP-PH-014).
Source: Report RP-PH-010.

Table 2.1.1-3: ラット S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価

Compound	Rat $S1P_1$		Rat $S1P_2$		Rat $S1P_3$		Rat $S1P_4$		Rat $S1P_5$	
	EC50 (nM)	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**
S1P	21.72 ± 0.90	100	10.60 ± 0.57	100	3.30 ± 0.98	100	163.65 ± 23.66	100	180.78 ± 28.10	100
Ozanimod	1.02 ± 0.14	90.9 ± 2.7	> 10000	*13.3 ± 1.0*	> 10000	NR	> 3333	70.3 ± 5.2	> 1111	78.9 ± 2.6
CC112273	**2.82 ± 0.27**	**83.8 ± 3.0**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**200.20 ± 32.95**	**11.1 ± 1.9**
CC1084037*	**0.17 ± 0.02**	**81.2 ± 3.5**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**205.47 ± 11.05**	**70.3 ± 21.4**
RP101124	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**
RP101075	0.31 ± 0.02	88.7 ± 6.1	> 10000	*13.6 ± 1.1*	> 10000	NR	> 3333	72.6 ± 9.0	818.75 ± 86.51	76.4 ± 7.0
RP101988	0.40 ± 0.02	85.5 ± 0.4	> 10000	NR	> 10000	*20.8 ± 6.0*	> 10000	32.0 ± 7.3	> 3333	52.0 ± 2.6
RP101442	3.49 ± 0.23	89.2 ± 1.1	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	239.90 ± 6.86	8.7 ± 1.0

Table 2.1.1-3: ラット S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価

Compound	Rat $S1P_1$		Rat $S1P_2$		Rat $S1P_3$		Rat $S1P_4$		Rat $S1P_5$	
	EC50 (nM)	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**
RP112289	9.20 ± 0.48	71.7 ± 3.9	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR
RP112509	10.89 ± 1.61	86.2 ± 3.5	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR

EC50 = concentration at which 50% of maximal activity is observed; IA = intrinsic activity (% relative to S1P response); NR = no response (Mean %Emax < 10%,where Emax is the maximal response achieved relative to the internal positive control, sphingosine 1-phosphate); S1P = sphingosine 1-phosphate; $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$, or $S1P_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1, 2, 3, 4, or 5, respectively.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM), N = 3 to 6 independent experiments.
Italic = response achieved at the top test compound concentration of 10000 nM.
Bold = major human metabolites that contribute > 10% of the total drug-related exposure in the plasma.
*CC1084037 is a racemate. R and S enantiomers of CC1084037 are equally potent in in vitro assays (Report RP-PH-014).
Source: Report RP-PH-010, Report RP-PH-019.

Table 2.1.1-4: サル S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価

Compound	Cyno $S1P_1$		Cyno $S1P_2$		Cyno $S1P_3$		Cyno $S1P_4$		Cyno $S1P_5$	
	EC50 (nM)	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**
S1P	84.80 ± 7.24	100	54.65 ± 7.54	100	38.1± 2.79	100	255.50 ± 15.69	100	34.14 ± 1.18	100
Ozanimod	1.29 ± 0.05	93.3 ± 0.7	> 10000	*20.8± 2.3*	> 10000	*29.5 ± 2.3*	> 10000	*45.0 ± 1.6*	23.55 ± 0.49	*99.0 ± 3.3*
CC112273	**4.73 ± 0.19**	**84.0 ± 4.8**	**> 1000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**1747.0 ± 420.0**	**12.8 ± 4.6**	**54.20 ± 3.89**	**72.1 ± 54.2**

Table 2.1.1-4: サル S1P 受容体に対する[^{35}S]GTPγS 結合誘導活性評価

Compound	Cyno $S1P_1$		Cyno $S1P_2$		Cyno $S1P_3$		Cyno $S1P_4$		Cyno $S1P_5$	
	EC50 (nM)	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**
CC1084037*	**0.23 ± 0.01**	**85.6 ± 4.6**	**> 10000**	**NR**	**423.00 ± 247.86**	**10.4 ± 1.4**	**729.48 ± 122.66**	**21.8 ± 0.9**	**6.93 ± 0.16**	**92.2 ± 1.6**
RP101124	**> 10000**	***17.3 ± 4.6***	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	**NR**	**> 10000**	***5.8 ± 1.2***
RP101075	0.63 ± 0.02	86.8 ± 3.6	> 10000	33.8 ± 3.1	> 10000	*25.1 ± 1.6*	> 3333	*57.1 ± 2.4*	10.10 ± 0.91	91.1 ± 5.2
RP101988	0.49 ± 0.03	88.5 ± 4.6	> 10000	NR	> 10000	*25.6 ± 1.7*	2194.67 ± 113.95	21.3 ± 2.7	72.84 ± 11.82	91.8 ± 2.5
RP101442	5.14 ± 0.55	87.8 ± 4.4	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	75.59 ± 8.96	74.0 ± 0.8
RP112289	9.55 ± 0.55	61.1 ± 5.3	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	14.69 ± 1.49	26.9 ± 1.9
RP112509	17.27 ± 1.02	82.1 ± 4.9	> 10000	NR	> 10000	NR	> 10000	NR	86.40 ± 7.26	51.1 ± 1.4

EC50 = concentration at which 50% of maximal activity is observed; IA = intrinsic activity (% relative to S1P response); NR = no response (Mean %Emax < 10% where Emax is the maximal response achieved relative to the internal positive control, sphingosine 1-phosphate); S1P = sphingosine 1-phosphate; $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$, or $S1P_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1, 2, 3, 4, or 5, respectively.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM), N = 3 to 6 independent experiments.
Italic = response achieved at the top test compound concentration of 10000 nM.
Bold = major human metabolites that contribute > 10% of the total drug-related exposure in the plasma.
*CC1084037 is a racemate. R and S enantiomers of CC1084037 are equally potent in in vitro assays (Report RP-PH-014).
Source: Report RP-PH-019.

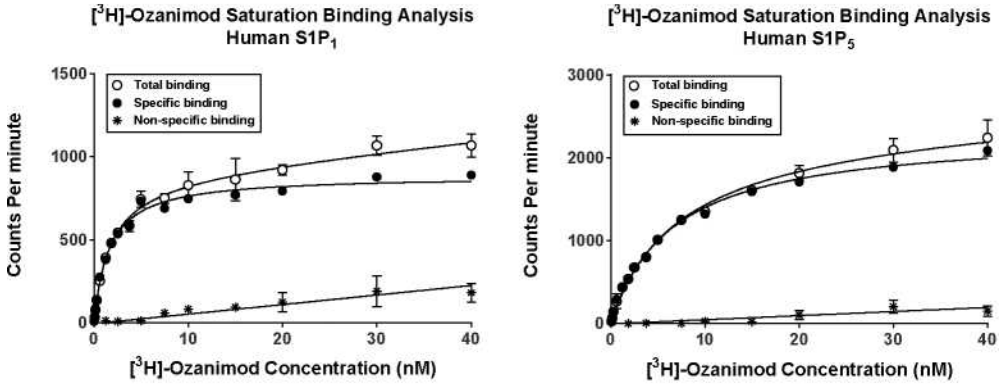
2.1.2 オザニモド及び代謝物のヒトスフィンゴシン 1–リン酸（S1P）受容体サブタイプ 1 及び 5 に対する放射性リガンドを用いた結合親和性及び結合部位に関する評価

オザニモドとその活性代謝物の $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する作動活性は同程度であり、$S1P_2$、$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体に比較し、$S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対する選択性も同様であったことから（2.1.1 項）、オザニモドとその代謝物が $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体の同じ部位に結合するかを検討した（試験番号 RP-PH-018）。ヒト $S1P_1$ 又は $S1P_5$ 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 IC50 値を検討した。これらの IC50 値と[^{3}H]-オザニモドの K_D 値から Cheng Prusoff 式を用いて阻害定数（Ki）を算出した。全ての試験において、内因性リガンドである S1P を対照として使用した。飽和結合解析（Figure 2.1.2-1）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 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。主要代謝物 CC112273 及び CC1084037 の $S1P_1$ 受容体に対する Ki 値はそれぞれ 0.29 ± 0.08 nM 及び 0.11 ± 0.03 nM であり、いずれもオザニモドの Ki 値（0.29 ± 0.04 nM）と同程度であった。$S1P_5$ 受容体に対する Ki 値は $S1P_1$ 受容体よりも大きく 1～40 nM の範囲内であり、CC112273 及び CC1084037 の $S1P_5$ 受容体に対する Ki 値はオザニモドの 5.54 ± 0.35 nM に対して、それぞれ 19.31 ± 1.11 nM 及び 1.99 ± 0.13 nM であった（Table 2.1.2-1）。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（Table 2.1.2-1）。このことは RP101124 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（Table 2.1.1-1）。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 $S1P_5$ 受容体の内因性リガンドのオルソステリック結合部位に結合することが示唆された。

以上より、オザニモドの活性代謝物は $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に存在するオザニモド（未変化体）の結合部位と同じ部位で競合するとともに、内因性リガンドである S1P と同じオルソステリック結合部位に結合することが示された。

Approved v2.0

Figure 2.1.2-1: **[^{3}H]-オザニモドを用いたヒト S1P$_1$又は S1P$_5$受容体を発現する CHO 細胞由来調製膜画分に対する飽和結合解析**



S1P$_1$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1; S1P$_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 5.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM), N = 3 to 4 independent experiments. Concentration response curves for the inhibition of binding were analyzed by nonlinear regression.
Source: Report RP-PH-018.

Table 2.1.2-1: **ヒト S1P$_1$及び S1P$_5$受容体に対する S1P、オザニモド及び代謝物の結合阻害活性**

Compound	**Human S1P$_1$**	**Human S1P$_5$**
	Ki (nM)	**Ki (nM)**
S1P	6.07 ± 0.71	5.36 ± 1.18
Ozanimod	0.29 ± 0.04	5.54 ± 0.35
CC112273	**0.29 ± 0.08**	**19.31 ± 1.11**
CC1084037	**0.11 ± 0.03**	**1.99 ± 0.13**
RP101124	**NR**	**NR**
RP101075	0.16 ± 0.02	3.21 ± 0.80
RP101988	0.30 ± 0.05	22.56 ± 4.25
RP101442	0.50 ± 0.05	26.36 ± 1.36
RP112289	0.35 ± 0.07	8.55 ± 2.18
RP112509	0.93 ± 0.24	39.04 ± 3.36

IC50 = concentration at which 50% of the [3H]-ozanimod was displaced; K_D = concentration of the radioligand which occupies 50% of the receptors at equilibrium), Ki = inhibition constant, the concentration of competing ligand that occupies 50% of the receptors if no radioligand were present (calculated from the K_D and IC50 using the Cheng-Prusoff equation); S1P = sphingosine 1-phosphate; S1P$_1$ or S1P$_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 or 5; NR = no response.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM), N = 3 to 4 independent experiments.
Bold = major human metabolite data.
Source: Report RP-PH-018.

Approved v2.0

2.1.3 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（試験番号 RP-PH-013）。

受容体の内在化は、緑色蛍光蛋白質（GFP）で C 末端を標識したヒト $S1P_1$ 受容体を過剰発現するよう遺伝子導入したヒト胎児腎臓（HEK）293 細胞を用いて測定した。細胞を試験化合物とインキュベートし、1、3、6 及び 24 時間経過後に抗 $S1P_1$ 受容体抗体を用いてフローサイトメトリーを行い、ジメチルスルホキシド（DMSO）を比較対照とした平均蛍光強度（MFI）の変化率を、受容体内在化指標として評価した。また、各試験化合物についての効力（EC50）及び固有活性（内在化応答）を各時点で算出した。

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（Table 2.1.3-1）。オザニモドは、1 時間の曝露で 17.38 ± 3.12 nM の EC50 値及び 72.08 ± 7.13%の内在化応答を示し、24 時間の曝露で 1.45 ± 0.23 nM の EC50 値及び 64.72 ± 0.61%の内在化応答を示した。このことは、曝露時間の延長に伴い効力が約 12 倍増大することを示している。オザニモドの各代謝物の EC50 値及び内在化応答はオザニモド（未変化体）と同程度であり、曝露 1 時間後の EC50 値は 3.69～24.65 nM、内在化応答は 60.17～77.83%、24 時間曝露後の効力は 0.41～3.79 nM、内在化応答は 54.71～65.53%であった。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、代謝物による $S1P_1$ 受容体活性化によって生じる受容体内在化はオザニモドと同様に生じることから、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。

Approved v2.0

Table 2.1.3-1: オザニモド及び代謝物の $S1P_1$ 受容体内在化における効力及び内在化応答

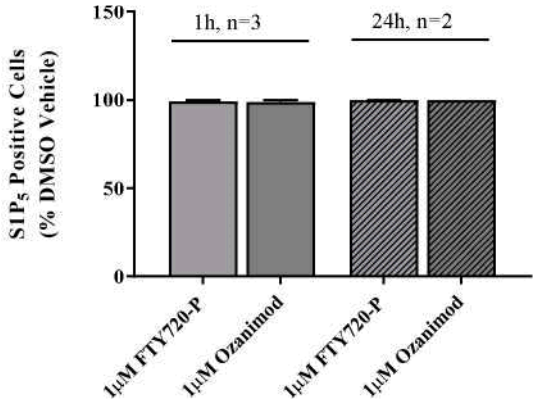
Compound	1 Hour		3 Hour		6 Hour		24 Hour	
	EC50 (nM)	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**	**EC50 (nM)**	**IA (%)**
Ozanimod	17.38 ± 3.12	72.08 ± 7.13	7.56 ± 1.21	75.57 ± 3.17	4.40 ± 1.04	73.18 ± 1.68	1.45 ± 0.23	64.72 ± 0.61
CC112273	**5.16 ± 1.37**	**77.83 ± 9.08**	**3.74 ± 1.21**	**77.03 ± 7.73**	**1.69 ± 0.75**	**86.64 ± 4.04**	**1.03 ± 0.27**	**54.71 ± 4.98**
CC1084037	**4.35 ± 1.04**	**67.08 ± 15.88**	**2.84 ± 0.48**	**83.06 ± 0.83**	**1.21 ± 0.33**	**77.60 ± 3.79**	**1.04 ± 0.16**	**58.23 ± 6.98**
RP101124	**NR**		**NR**		**NR**		**NR**	
RP101075	12.34 ± 3.13	76.88 ± 3.81	5.61 ± 0.75	76.68 ± 34.57	3.99 ± 0.83	69.73 ± 3.28	1.01 ± 0.08	65.25 ± 3.85
RP101988	3.69 ± 1.33	66.64 ± 1.55	1.53 ± 0.21	69.36 ± 8.96	1.10 ± 0.32	65.42 ±8.31	0.41 ± 0.07	65.53 ± 3.55
RP101442	6.08 ± 0.96	66.97 ± 4.68	3.70 ± 0.95	81.27 ± 4.91	3.22 ± 0.63	83.11 ± 10.35	1.28 ± 0.15	57.12 ± 6.75
RP112289	24.65 ± 10.36	60.17 ± 8.86	11.09 ± 4.40	76.92 ± 6.63	7.88 ± 0.36	74.73 ± 0.68	3.79 ± 0.29	59.06 ± 4.10
RP112509	18.44 ± 1.70	64.78 ± 6.14	9.99 ± 3.05	87.76 ± 3.74	5.50 ± 7.60	73.18 ± 1.68	1.49 ± 0.47	55.33 ± 7.29

EC50 = concentration at which 50% of maximal activity is observed; IA = intrinsic activity; NR= no response (no observed loss of sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1 [$S1P_1$] expression from the plasma membrane).
Data are shown as mean and standard error of the mean (SEM) (N = 3 or 4 for metabolites and N = 7 for ozanimod as it was included in all experimental runs) for EC50 for internalization of $S1P_1$ as measured by flow cytometry analysis and for IA, which is the difference between maximum and minimum percentage of internalization for each compound relative to dimethyl sulfoxide (DMSO) vehicle control.
Bold = major human metabolites that contribute > 10% of the total drug-related exposure in the plasma.
Source: Report RP-PH-013.

Approved v2.0

オザニモド及びその活性代謝物は、$S1P_5$ 受容体に対しても作動作用を示すため、$S1P_5$ 受容体の内在化誘導能についても評価した（試験番号 RP-PH-003-1.0）。N 末端をヘマグルチニン（HA）で標識したヒト$S1P_5$受容体を過剰発現するCHO細胞株を用いて、$S1P_5$受容体の内在化について検討した。細胞を 1 μM のオザニモド又は非選択的 S1P 受容体調節薬であるフィンゴリモドリン酸化体（FTY720-P）存在下で 60 分間インキュベートした後、直ちに又は化合物のウォッシュアウトから 23 時間後に、細胞表面の $S1P_5$ 受容体の発現を抗 HA タグ抗体を用いてフローサイトメトリーで評価した。アイソタイプコントロール抗体を用いた判別により $S1P_5$ 受容体発現細胞を同定し、$S1P_5$ 受容体内在化を $S1P_5$ 受容体発現細胞の割合変化として定量した。その結果、オザニモド又は FTY720-P による $S1P_5$受容体内在化は認められなかった（Figure 2.1.3-1）。同様の結果は $S1P_1$ 及び $S1P_5$受容体作動作用を持つ別の薬剤（シポニモド）でも示されている[16]。

Figure 2.1.3-1: **オザニモド及び FTY720-P による $S1P_5$受容体内在化評価（1 及び 24 時間経過後の $S1P_5$受容体発現割合）**



DMSO = dimethyl sulfoxide; h = hour; FTY720-P = FTY720 phosphate (fingolimod phosphate); $S1P_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 5.
Data shown are the mean and standard error of the mean number of intact live $S1P_5$ positive cells as expressed as the percent of the DMSO vehicle-treated cells for N = 3 independent experiments assessed after sixty-minutes of compound treatment, and for N = 2 independent experiments assessed a further 23-hours after the sixty-minute compound treatment.
Source: Report RP-PH-003-1.0.

2.1.4 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

アストロサイトは、S1P受容体を発現していることが知られている神経系の細胞であり、S1P受容体の細胞内シグナル解析に広く用いられている[14,15]。オザニモド並びに内在化誘導能を示すことが確認され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、マウス、ラット及びヒトの組織から調製したアストロサイトの初代培養細胞を用い、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[13] の蛋白質リン酸化レベルを測定した（試験番号 RP-PH-004-1.0、RP-

Approved v2.0

PH-009-1.0 及び RP-PH-12）。初代培養アストロサイトをアッセイの 5～7 日前に 96 ウェルプレートに播種し、無血清培地で 4 時間培養した後にオザニモド、RP101988、CC112273 又は非選択的 S1P 調節薬である FTY720-P で 10 分間処理を行った。10 分間経過後、アストロサイトを溶解し細胞溶解物中の AKT リン酸化蛋白質及び ERK リン酸化蛋白質を定量した。各化合物の AKT 及び ERK リン酸化誘導に対する EC50 値の平均値 ± SEM を（Table 2.1.4-1）に示す。

Table 2.1.4-1: マウス、ラット及びヒト初代培養アストロサイトをオザニモド、RP101988、CC112273 又は FTY720-P で処理した際の AKT 及び ERK 蛋白質リン酸化

Compound	EC50 (nM) AKT Phosphorylation Mean ± SEM			EC50 (nM) ERK Phosphorylation Mean ± SEM		
	Mouse	Rat	Human	Mouse	Rat	Human
Ozanimod	0.90 ± 0.43	2.03 ± 0.62	1.48 ± 0.19	2.42 ± 1.30	0.80 ± 0.30	1.93 ± 0.66
RP101988	0.13 ± 0.06	0.23 ± 0.08	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.11 ± 0.06	0.50 ± 0.15
CC112273	0.49 ± 0.22	0.66 ± 0.18	0.42 ± 0.05	0.87 ± 0.34	0.29 ± 0.15	2.12 ± 0.84
FTY720-P	0.09 ± 0.01	0.17 ± 0.09	0.05 ± 0.03	0.14 ± 0.05	0.16 ± 0.15	0.63 ± 0.26

AKT = protein kinase B; EC50 = concentration at which 50% of maximal activity is observed; ERK = extracellular signal-regulated kinase; FTY720-P = FTY720 phosphate (fingolimod phosphate).
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM).
Source: Report RP-PH-004-1.0; Report RP-PH-009-1.0; Report RP-PH-12.

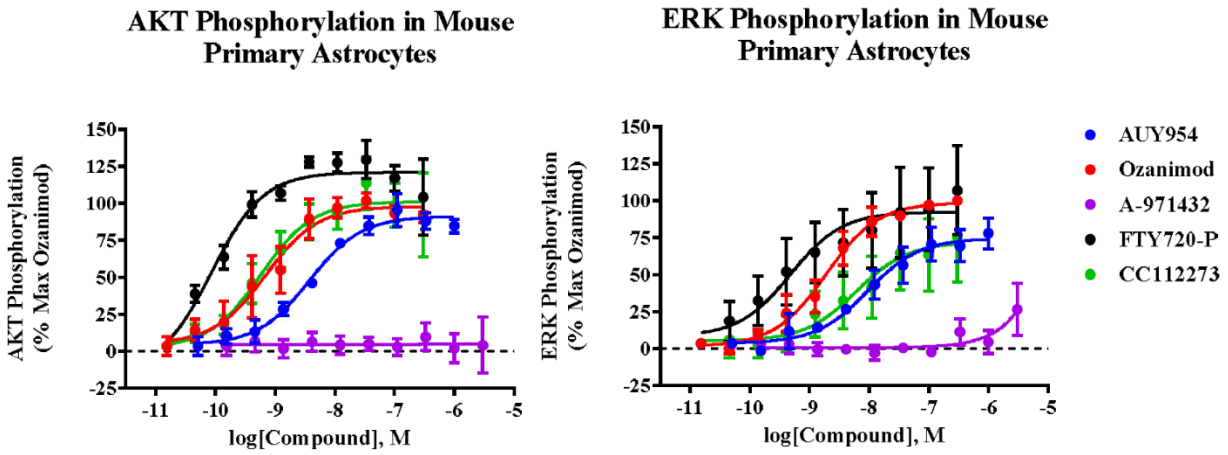
オザニモド及びその代謝物である RP101988 及び CC112273 は、マウス、ラット及びヒトの初代培養アストロサイトにおいて AKT 及び ERK 蛋白質のリン酸化をいずれも 3 nM 以下の EC50 値で誘導した。

次に、オザニモドによる AKT 及び ERK 蛋白質リン酸化誘導が、$S1P_1$ 又は $S1P_5$ 受容体のいずれを介するかを評価するための追加試験を実施した（試験番号 RP-PH-011）。$S1P_1$ 受容体選択的作動化合物（AUY954）及び $S1P_5$ 受容体選択的作動化合物（A-971432）[17]でマウス初代培養アストロサイトを処理したところ、AUY954 のみが強力かつ安定したリン酸化誘導活性を示し、AKT 及び ERK 蛋白質のリン酸化に対する EC50 値はそれぞれ 3.69 ± 0.70 nM 及び 11.85 ± 4.97 nM であった（Figure 2.1.4-1）。一方、A-971432 を用いた検討では、AKT 及び ERK 蛋白質のリン酸化の増加は認められなかった（Figure 2.1.4-1）。$S1P_1$ 受容体選択的拮抗剤（W146）をオザニモドとともに用いた AKT 蛋白質リン酸化の検討では、W146 の濃度の増加に伴いオザニモドの濃度反応曲線が右方に平行シフトした。この効果はオザニモドと W146 の受容体に対する競合的拮抗作用を示している（試験番号 RP-PH-011）。W146 による AKT 蛋白質のリン酸化を指標としたオザニモドの濃度反応曲線の右方シフトについて、Schild 解析を Figure 2.1.4-2 に示す。Schild 解析では、X 軸の切片は競合的拮抗薬（本試験の場合は W146）の pA2［活性物質の用量反応曲線を 2 倍だけ高用量側に平行移動させるのに必要な競合的拮抗薬の用量（モル濃度）の負の対数］を表し、pA2 は Ki 値を反映する[18]。AKT 蛋白質のリン

Approved v2.0

酸化を指標とした本評価では、オザニモドに対する W146 の pA2 は 7.89 であった。以上より、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。

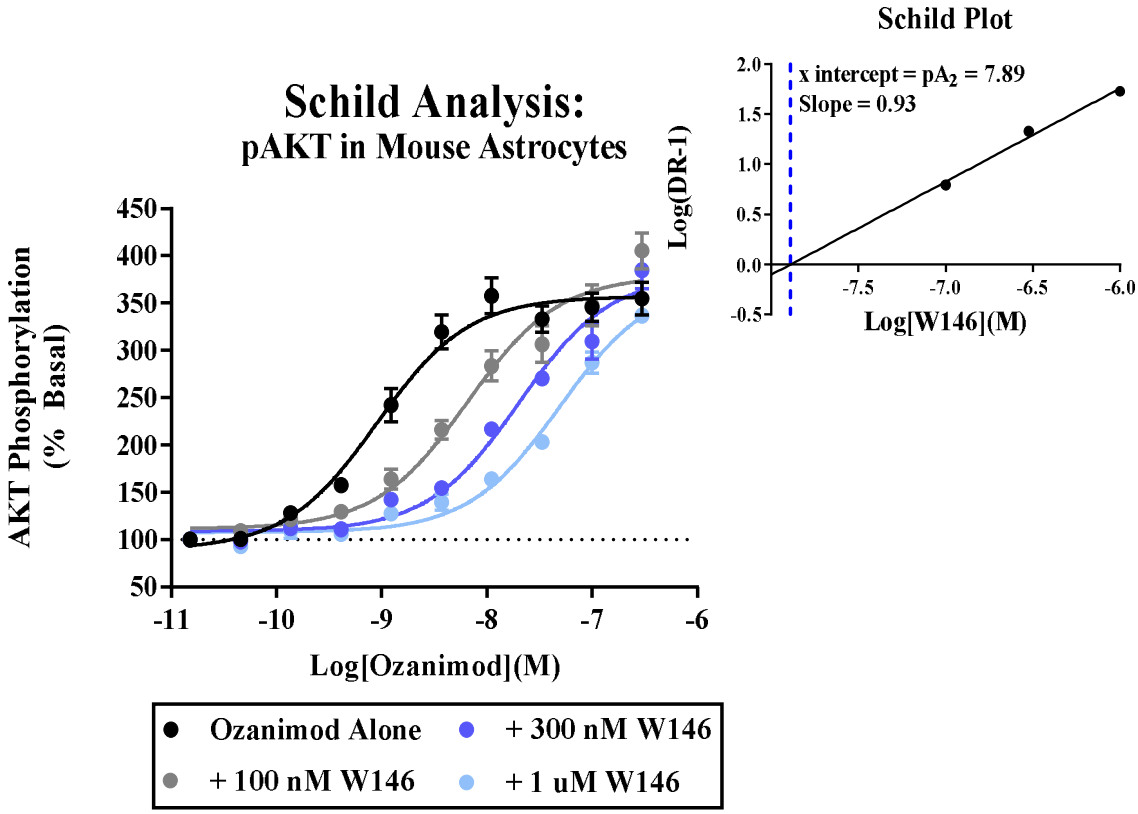
Figure 2.1.4-1: **マウス初代培養アストロサイトにおける AKT 及び ERK 蛋白質リン酸化**



AKT = protein kinase B; AUY954 = $S1P_1$-selective agonist; A-971432 = $S1P_5$-selective agonist; ERK = extracellular signal-regulated kinase; FTY720-P = FTY720 phosphate (fingolimod phosphate).
Data shown are mean percentage of maximum ozanimod-mediated ERK and AKT phosphorylation ± the standard error of the mean (SEM) for 3 independent experiments with each independent experiment run on an individual culture of mouse primary cortical astrocytes.
Source: Report RP-PH-011.

Approved v2.0

Figure 2.1.4-2: **オザニモド介在性 AKT 蛋白質リン酸化を指標とした $S1P_1$ 受容体選択的拮抗剤 W146 を用いた Schild 解析**



AKT = protein kinase B; DR = dose ratio (EC50 after antagonist/EC50 before antagonist); pAKT = phosphorylated AKT; pA2= negative log of the concentration required to shift the agonist dose response curve by a factor of 2.
The plot on the left shows the ozanimod-mediated concentration response curves with the data expressed as the mean percentage of dimethyl sulfoxide (DMSO) vehicle-mediated AKT phosphorylation ± the standard error of the mean (SEM) for 3 independent experiments with each independent experiment run on an individual culture of mouse primary cortical astrocytes. The plot on the right shows a Schild Plot of the W146 data (100 nM, 300 nM, and 1 µM) with the pA2 denoted by the dotted blue line (x intercept).
Source: Report RP-PH-011.

2.2 In vivo 薬理試験

2.2.1 炎症性腸疾患（IBD）のげっ歯類モデルにおけるオザニモドの薬効評価

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[19]。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

Approved v2.0

する。オザニモド投与によるげっ歯類 IBD モデルでの結果を Table 2.2.1.3-1 に要約した。なお、オザニモドの活性代謝物を用いた直接的な有効性評価は実施しなかった。

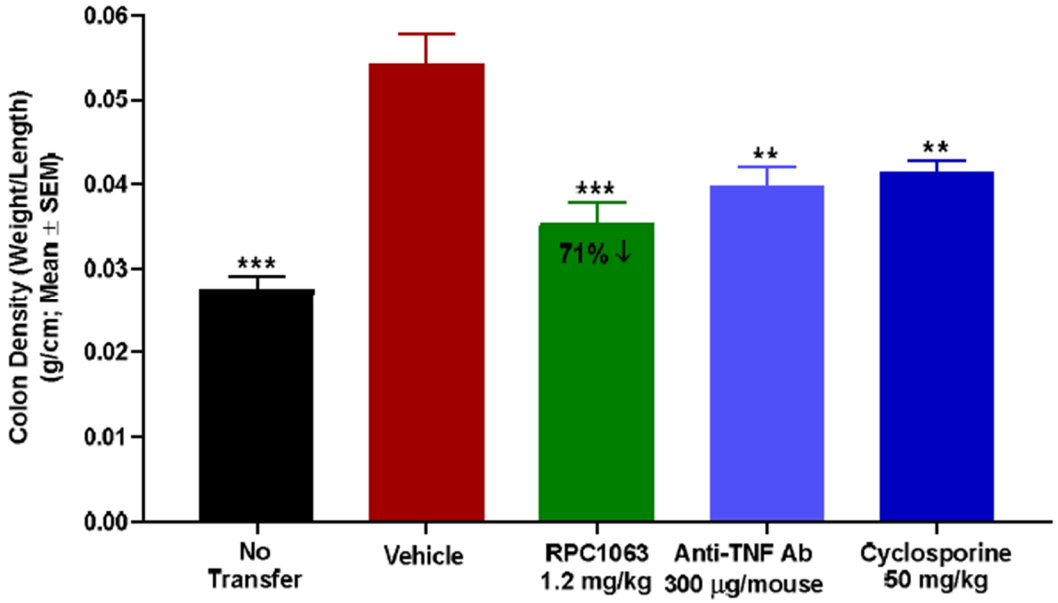
2.2.1.1 マウスナイーブ T 細胞養子移入モデルにおけるオザニモドの薬効評価

雌性 SCID マウスに、雌性 BALB/c マウスから単離した約 4×10^5 個の脾臓由来 CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T リンパ球を腹腔内投与した（試験番号 MCD4/RPT-1）。Day 21 に、Day 0 と比較した体重減少に基づいてマウスを 1 群あたり 10 匹となるように無作為に割り付けた。Day 21 より溶媒（5% DMSO/5% Tween 20）又は 1.2 mg/kg のオザニモドを 1 日 1 回（QD）で経口投与を開始し、21 日間反復投与した。陽性対照は、シクロスポリン A［50 mg/kg、1%カルボキシメチルセルロース（CMC）で調製］を用い、QD で経口投与した。また、同じく陽性対照として、ハムスター抗マウス腫瘍壊死因子（TNF）抗体（TN3-19.12）をマウスあたり 300 µg で週 1 回腹腔内投与を行った。マウスの体重及び一般状態は隔日で評価した。最終投与の約 24 時間後に循環血中のリンパ球数測定のために心臓穿刺により血液試料を採取し、結腸は長さ及び湿重量を測定するために切除した。結腸は遠位と近位部分に切開した後、病理組織学的評価用にホルマリンで固定した。

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）（2.3.4 項）を参考に、オザニモドを 1.2 mg/kg で経口投与した。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（Figure 2.2.1.1-1）、陽性対照のシクロスポリン A 及び 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（Figure 2.2.1.1-2）。循環血中リンパ球数の減少は 41%であり、後述の EAE マウス（Table 3.2.3-1）及び正常ラット（Figure 2.3.3-1）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を合計した結果を Figure 2.2.1.1-3 に示した。また、オザニモド投与により、養子移入した SCID マウスの結腸粘膜厚が統計学的有意に減少し、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（Figure 2.2.1.1-4）。組織学的スコアの算出に用いた、溶媒、オザニモド（1.2 mg/kg）又は TN3-19.12 を投与した SCID マウス及び正常マウスの遠位結腸の代表的な顕微鏡写真を Figure 2.2.1.1-5 に示す。また、オザニモドを投与した動物における炎症、腺消失及び浮腫への改善効果については、Table 2.2.1.3-1 に要約した。

Approved v2.0

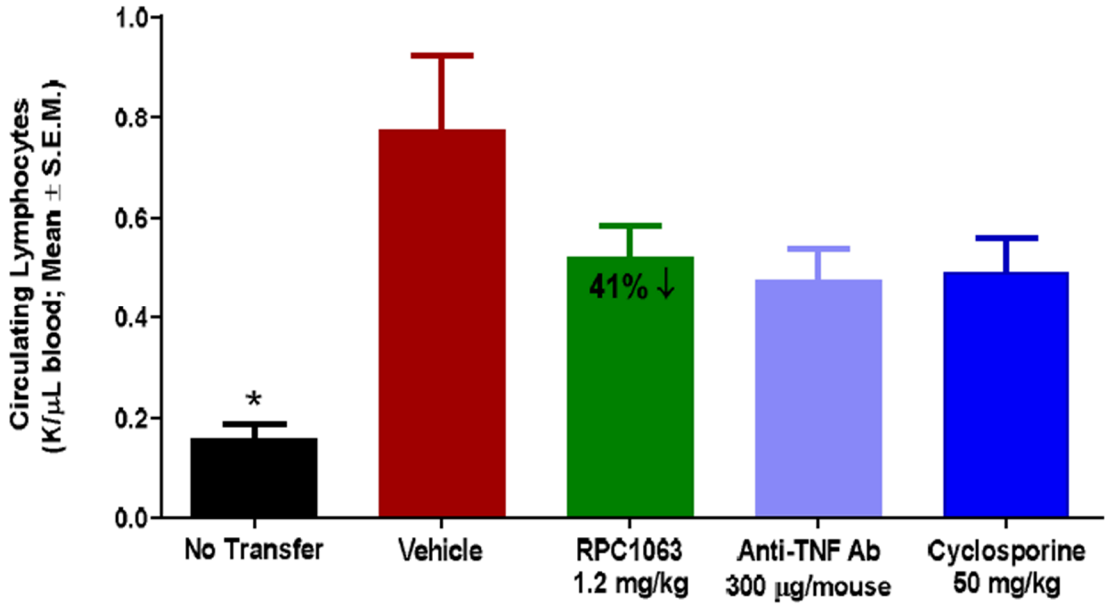
Figure 2.2.1.1-1: **IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモドによる結腸重量対長さ比に対する効果**



Ab = antibody; RPC1063 = ozanimod; TNF = tumor necrosis factor.
**, ***P < 0.01, 0.001, respectively, compared to Vehicle (one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons post-test); N = 10 except the no transfer group (N = 4). This study also included statistical analysis of additional investigative compounds. RPC1063 and cyclosporine A were administered by once-daily oral gavage. The anti-TNF Ab was administered by once-weekly intraperitoneal injection. Group mean values are displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM).
Source: Report MCD4/RPT-1.

Approved v2.0

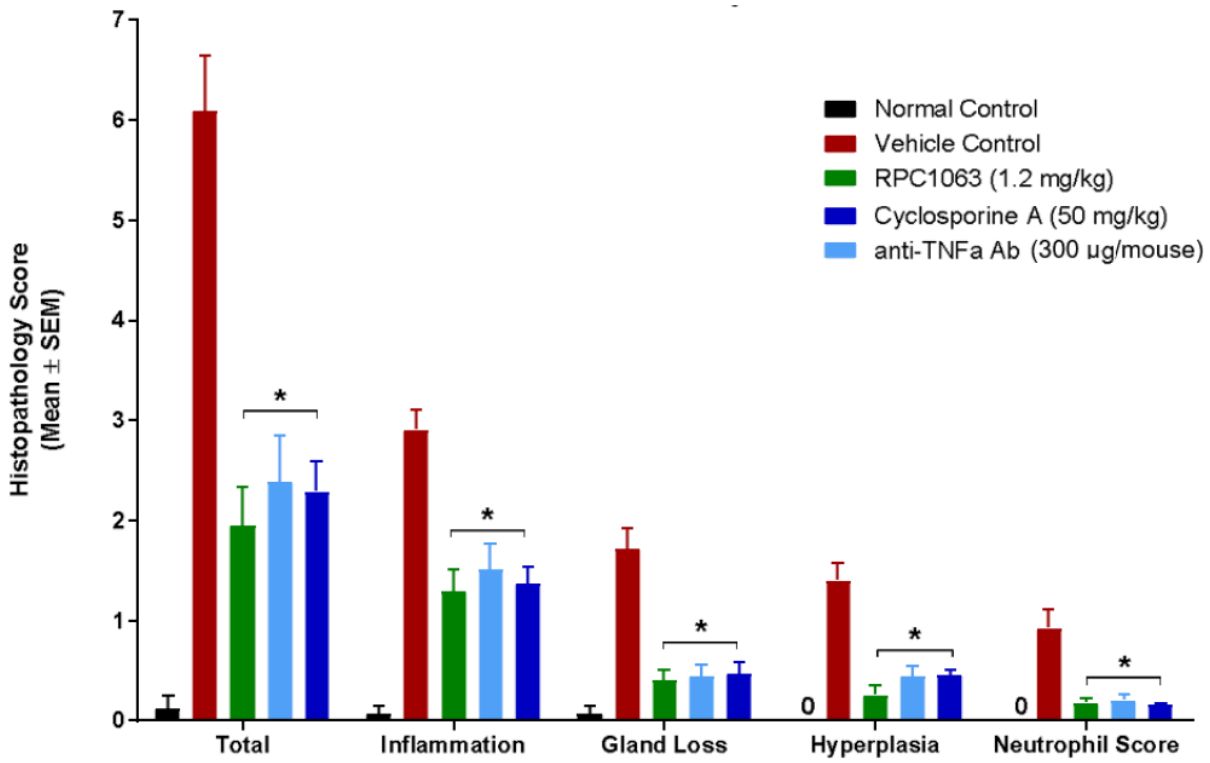
Figure 2.2.1.1-2: **IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド最終投与 24 時間後の循環血中リンパ球数**



Ab = antibody; K = thousand; RPC1063 = ozanimod; TNF = tumor necrosis factor.
*P ≤ 0.05, compared to Vehicle (one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons posttest); N = 10 except the no transfer group (N = 4). This study also included statistical analysis of additional investigative compounds. RPC1063 and cyclosporine were administered by once-daily oral gavage. The anti-TNF Ab was administered by once-weekly intraperitoneal injection. Group mean values are displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM).
Source: Report MCD4/RPT-1.

Approved v2.0

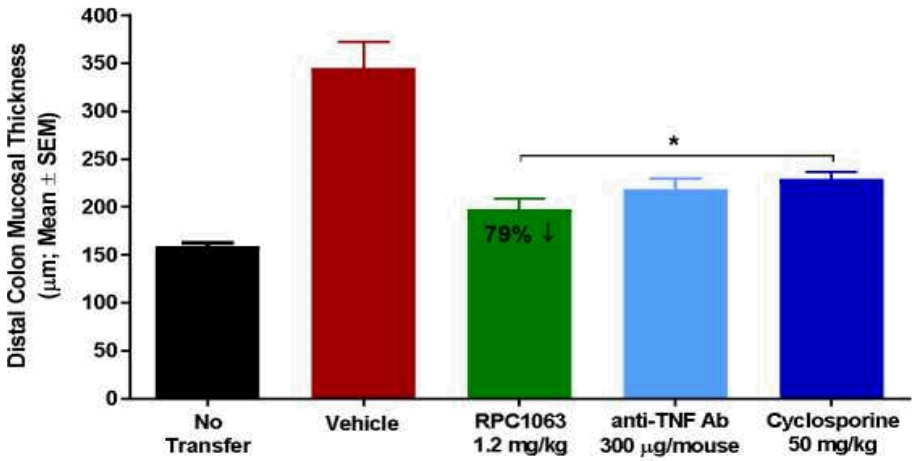
Figure 2.2.1.1-3: **IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド投与後の結腸の病理組織学的スコア**



Ab = antibody; RPC1063 = ozanimod; TNF = tumor necrosis factor.
*P < 0.05, compared to Vehicle (one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons posttest); N = 10 except the no transfer group (N = 4). This study also included statistical analysis of additional investigative compounds. RPC1063 and cyclosporine were administered by once-daily oral gavage. The anti-TNF Ab was administered by once-weekly intraperitoneal injection. Group mean values are displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM). Total score = sum of individual parameter scores for inflammation, gland loss, erosion and hyperplasia. '0' = score of 0 for the normal control group.
Source: Report MCD4/RPT-1.

Approved v2.0

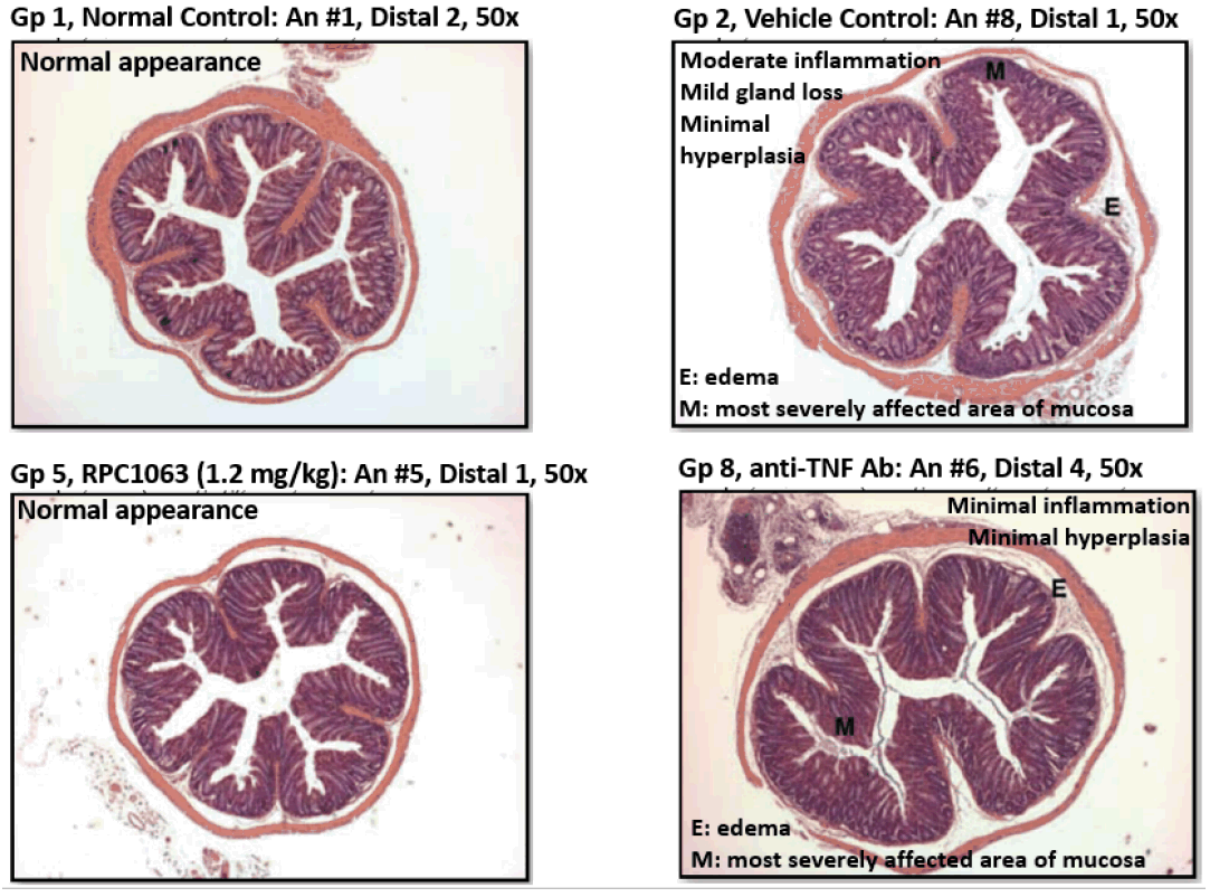
Figure 2.2.1.1-4: **IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド投与後の遠位結腸粘膜厚**



Ab = antibody; RPC1063 = ozanimod; TNF = tumor necrosis factor.
*P < 0.05, compared to Vehicle (one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons posttest); N = 10 except the no transfer group (N = 4). This study also included statistical analysis of additional investigative compounds. RPC1063 and cyclosporine were administered by once-daily oral gavage. The anti-TNF Ab was administered by once-weekly intraperitoneal injection. Group mean values are displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM).
Source: Report MCD4/RPT-1.

Approved v2.0

Figure 2.2.1.1-5: **正常マウス及び IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド又は抗 TNF 抗体投与後の遠位結腸の組織学的顕微鏡写真（代表例）**



An = animal; E = edema; Gp = group; M = most severely affected areas of mucosa with specific observations from the report summarized as text in the image; RPC1063 = ozanimod; 50× = original magnification.
All photomicrographs are representative of the approximate group average score.
Source: Report MCD4/RPT-1.

SCID マウスを用いたナイーブ T 細胞養子移入モデルでのオザニモドの評価は、さらに 2 試験追加して実施した（試験番号 MCD4/RPT-3 及び MCD4/RPT-4）。オザニモドの用量依存性（0.3、0.6 及び 1.2 mg/kg）を解析した試験（試験番号 MCD4/RPT-3）では、同様の試験条件で実施した試験（試験番号 MCD4/RPT-1）に比べ疾患の重症度は高かったが、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］が用量依存的かつ統計学的有意に減少することが示された（Table 2.2.1.1-1）。別

Approved v2.0

のナイーブ T 細胞養子移入モデルでの評価試験（試験番号 MCD4/RPT-4）は異なる条件（異なるベンダーより購入したマウス、試験期間 49 日）で実施したが、陽性対照であるシクロスポリン A の投与で統計学的に有意な効果が認められなかったことから、試験は不成立であった。

Table 2.2.1.1-1: IBD マウス（ナイーブ T 細胞養子移入モデル）でのオザニモド 21 日間投与後の結腸ホモジネート中サイトカイン量

Group	IFN-γ	IL-10	IL-12 p70	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
No Transfer	1.10 ± 0.72*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	26.64 ± 3.84*	1.39 ± 0.91*	52.99 ± 3.31*	0.09 ± 0.09*
Vehicle	456.16 ± 38.95	17.36 ± 3.18	11.33 ± 4.96	6416.43 ± 467.78	230.84 ± 32.76	6481.77 ± 746.40	123.95 ± 13.75
Cyclosporine A	154.14 ± 28.07*	2.53 ± 1.30*	0.00 ± 0.00*	1306.84 ± 334.16*	41.96 ± 8.86*	1267.21 ± 478.61*	23.44 ± 4.61*
Ozanimod (0.3 mg/kg)	388.85 ± 75.96	4.84 ± 2.11*	0.00 ± 0.00*	2811.88 ± 449.24*	137.51 ± 26.32*	4514.90 ± 772.25	82.06 ± 15.07*
Ozanimod (0.6 mg/kg)	398.97 ± 54.70	6.20 ± 3.27*	0.00 ± 0.00*	2240.51 ± 341.35*	157.59 ± 43.81	3657.83 ± 618.36*	58.48 ± 8.86*
Ozanimod (1.2 mg/kg)	266.49 ± 43.60*	0.00 ± 0.00*	0.00 ± 0.00*	802.59 ± 136.98*	49.12 ± 8.49*	3423.38 ± 650.64*	22.46 ± 3.89*

IFN-γ = interferon-gamma; IL = interleukin, TNF-α = tumor necrosis factor-alpha.
Units: pg/mL (200 mg distal colon tissue sample), mean ± the standard error of the mean (SEM).
*P < 0.05, ANOVA to vehicle control; N = ~10 per group
Source: Report MCD4/RPT-3.

2.2.1.2 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

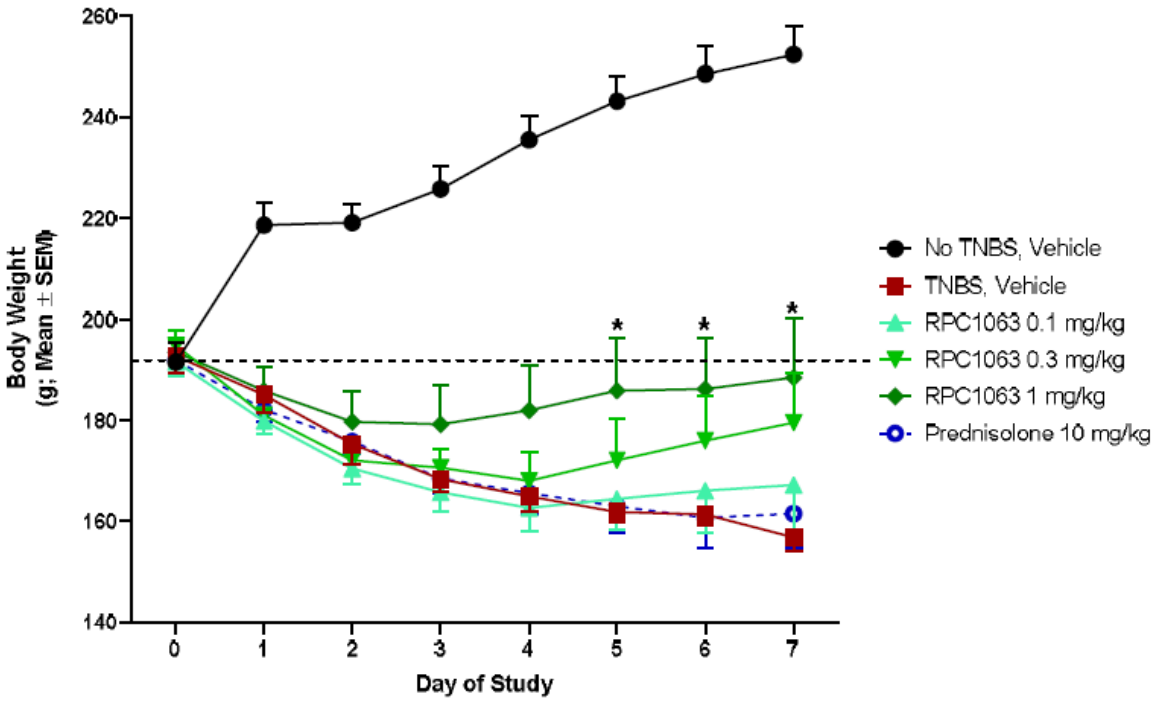
雄性 Sprague Dawley ラットを 24 時間絶食後に体重測定し、無作為に 1 群 8 匹になるよう群分けした後、麻酔下で TNBS（5.5% v/v ピクリルスルホン酸、50% v/v エタノール）64 mg/kg を直腸から結腸内に注入し炎症を誘導した。TNBS 注入 2 時間後から、各群のラットにそれぞれ溶媒（5% DMSO/5% Tween 20）、オザニモド 0.1、0.3 及び 1 mg/kg 若しくは水に溶解したプレドニゾロン 10 mg/kg（陽性対照）を、QD で 7 日間反復経口投与した。本試験では、ラットの循環血中リンパ球数の減少に基づく推定有効用量（0.3 mg/kg）（2.3.4 項）を参考に、オザニモドを 0.3 mg/kg を含む範囲でラットに投与した。体重、一般状態及び糞粒については毎日評価した。最終投与の約 24 時間後にラットを安楽死させ、結腸を切除した後、結腸の長さ、結腸内容物を除去した後の重量及び壁厚を測定した。結腸の病理組織学的スコアは、ラットごとに癒着及び狭窄の数、潰瘍の数及び大きさ並びに結腸壁の厚さを評価することにより算出した（試験番号 IBD-RPI-10）。試験中に TNBS 注入後にオザニモド 0.1 mg/kg 及び溶媒を投与した群でそれぞれ 2 例が死亡したが、重篤な TNBS 誘発腸炎の結果として腸管破裂に関連する死亡を伴うことが多い本モデルにおいては、ある程度予想された結果であった。溶媒対照群の死亡はいずれも腸管破裂によるものであり、オザニモドの 0.1 mg/kg 群では腸管破裂は

Approved v2.0

認められなかったが、概して開始時より体重が約 20～30%減少しており、計画屠殺の直前に死亡が確認された。

TNBS 注入後の溶媒対照群では、投与開始時と比較して試験期間中に約 20%の体重減少が認められた（Figure 2.2.1.2-1）。この体重減少は、オザニモド投与群で用量依存的に抑制され、1 mg/kg で統計学的に有意であった。一方、プレドニゾロン陽性対照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%（Figure 2.2.1.2-2）、結腸の病理組織学的スコアの増加を 54%（Figure 2.2.1.2-3）統計学的有意に減少させた。さらに追加のラット TNBS 試験（試験番号 IBD-RPI-11）が実施され、1 mg/kg のオザニモド投与による有効性を示した IBD-RPI-10 の結果が再現された。

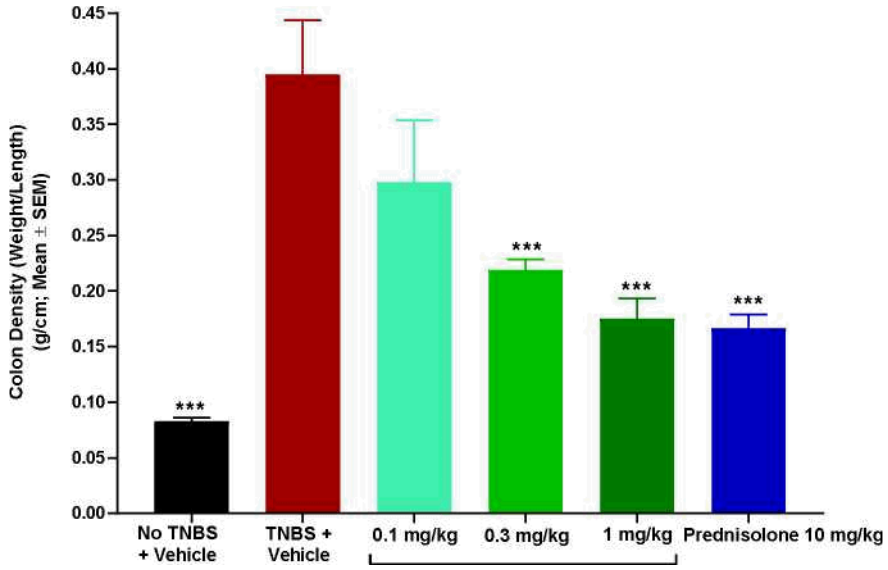
Figure 2.2.1.2-1: IBD ラット（TNBS モデル）でのオザニモド投与による体重推移



RPC1063 = ozanimod; TNBS = 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid.
*P < 0.05, compared to TNBS Vehicle (Student's t-test); N = 8 except the TNBS vehicle group (N = 6). This study also included statistical analysis of additional investigative compounds. RPC1063 and cyclosporine were administered by once-daily oral gavage. Group mean values are displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM).
Source: Report IBD-RPI-10.

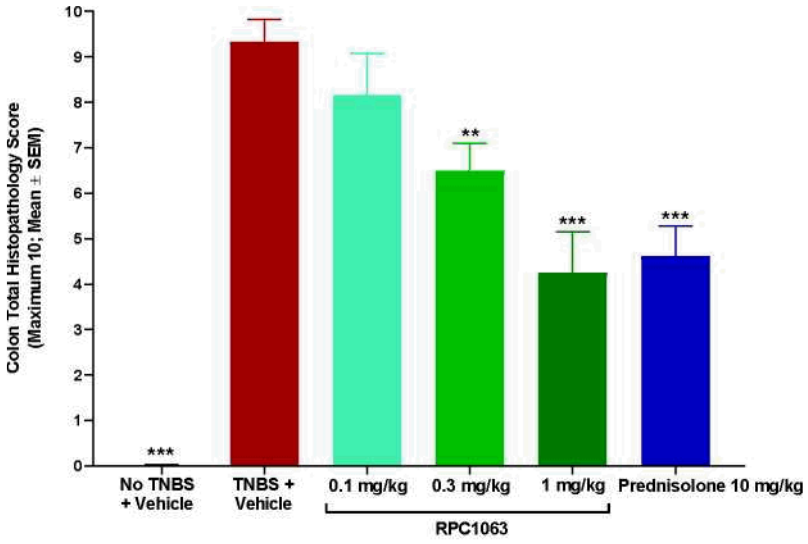
Approved v2.0

Figure 2.2.1.2-2: **IBD ラット（TNBS モデル）でのオザニモド投与による結腸重量対長さ比に対する効果**



RPC1063 = ozanimod; TNBS = 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid.
**, ***P < 0.01, 0.001, respectively, compared to TNBS Vehicle (Student's t-test); N = 8 except the TNBS vehicle group and 0.1 mg/kg (N = 6). This study also included statistical analysis of additional investigative compounds. RPC1063 and prednisolone were administered by once-daily oral gavage. Group mean values are displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM).
Source: calculated from length and weight data in Report IBD-RPI-10.

Figure 2.2.1.2-3: **IBD ラット（TNBS モデル）でのオザニモド投与後の結腸の病理組織学的スコア**



RPC1063 = ozanimod; TNBS = 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid.
**, ***P < 0.01, 0.001, respectively, compared to TNBS Vehicle (Student's t-test); N = 8 except the TNBS vehicle group and 0.1 mg/kg (N = 6). This study also included statistical analysis of additional investigative compounds. RPC1063

Approved v2.0

and prednisolone were administered by once-daily oral gavage. Group mean values are displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM). Total colon disease score (maximum = 10) is the summed total of individual scores for adhesions (maximum 2), strictures (maximum 3), ulcers (maximum 3) and thickness (maximum 2).
Source: Report IBD-RPI-10.

2.2.1.3 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

検討したげっ歯類 IBD モデルの結果を以下に要約した（Table 2.2.1.3-1）。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（2.3.4 項）］又はそれ以上の用量で、IBD の臨床病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（【M2.7.2、1.2.2.1 項】参照）。なお、検討したげっ歯類の IBD モデルにおけるオザニモドの有効性は、後述するマウス EAE モデルでの結果と同様であった（3.2.1 項）[20]。

Table 2.2.1.3-1: げっ歯類 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

Study/Report Number	Model	RPC1063 Dose Regimen	Findings Relevant to RPC1063 (vs. Vehicle Controls)
MCD4/RPT-1	CD4+ adoptive transfer in SCID mice	1.2 mg/kg QD PO (d21-d41)	Improved body weight, colon weight (74%) and density (71%) Reduced colon edema (77%), inflammation (57%), gland loss (79%), hyperplasia (81%), neutrophil score (81%), mucosal thickness (75%), summed histopathology score (70%) Efficacy associated with reduced ALC (41% 24 hr post-dose) Comparable results to cyclosporine, anti-TNF Ab positive controls
MCD4/RPT-3	CD4+ adoptive transfer in SCID mice	0.3, 0.6, 1.2 mg/kg QD PO (d21-d41)	Reduced colon density (1.2 mg/kg; 40%) Improved distal colon erosion (all doses; 80-90%) Reduced mucosal thickness (0.3 and 1.2 mg/kg; 45-49%) Reduced levels of multiple colon cytokines

Approved v2.0

Table 2.2.1.3-1: げっ歯類 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

Study/Report Number	Model	RPC1063 Dose Regimen	Findings Relevant to RPC1063 (vs. Vehicle Controls)
MCD4/RPT-4	CD4+ adoptive transfer in SCID mice	1.2 mg/kg QD PO (d21-d48)	The positive control, cyclosporine A did not significantly affect clinical or histopathological parameters. RPC1063 was without significant effect on clinical or histopathological parameters. The positive control's lack of effect classifies this as a failed study.
IBD-RPI-10	Rat TNBS	0.1, 0.3, 1 mg/kg QD PO (d0-d6)	Improved body weight and animal health/behavior Reduced total colonic score (1 mg/kg; ≤ 54%) Improved colon density (0.3, 1 mg/kg; ≤ 70%)
IBD-RPI-11	Rat TNBS	1 mg/kg QD PO (d0-d6)	Improved body weight and animal health/behavior Improved colon length and weight Reduced total colonic score (50%) Return to normal bowel function by d3

Ab = antibody; ALC = absolute lymphocyte count; CD4 = cluster of differentiation 4; d = study day; hr = hours; PO = oral; QD = once daily; SCID = severe combined immunodeficiency; TNBS = 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; TNF = tumor necrosis factor.

2.3 循環血中リンパ球数に関連する薬物動態（PK）及び薬力学（PD）の統合解析

2.3.1 マウス及びラットにおけるオザニモド及び代謝物（RP101988）の評価

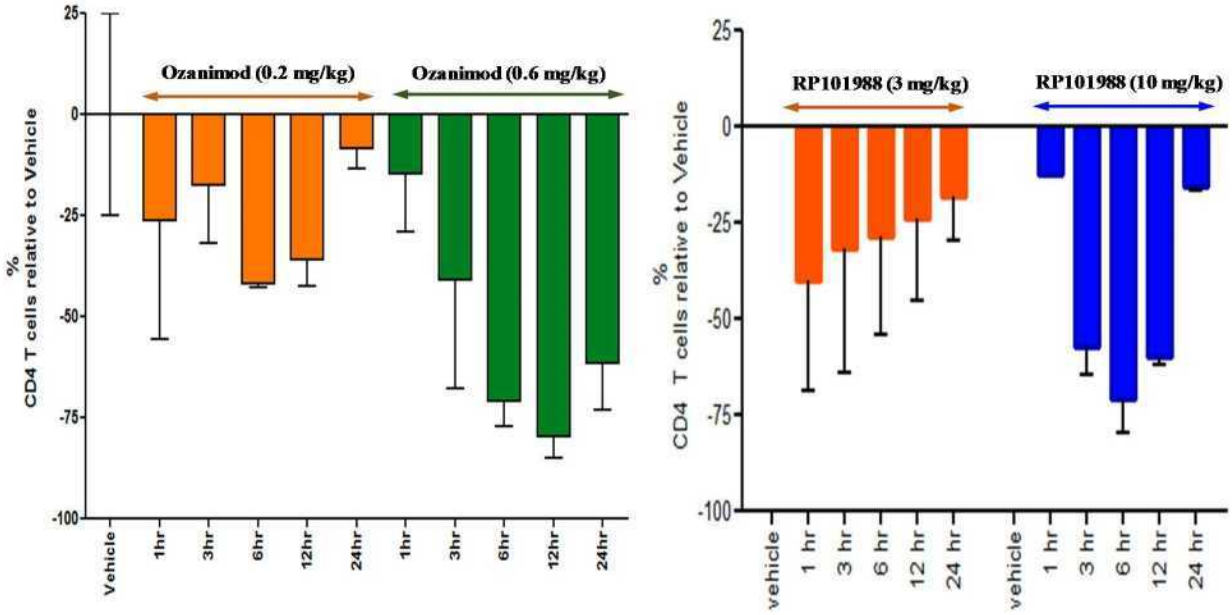
循環血中リンパ球数の減少は、$S1P_1$ 受容体作動作用に基づく $S1P_1$ 受容体内在化の PD マーカーである。本試験では、オザニモド及び活性代謝物である RP101988 の PK/PD をマウス及びラットで比較検討した（試験番号 RP-PK-016-1.0）。

雌性 C57BL/6 マウス及び雌性 Sprague Dawley ラットにオザニモド又は RP101988 を単回経口投与し、PK/PD を評価するために血液検体を経時的に採取した。

ラットにオザニモド（0.2 及び 0.6 mg/kg）又は RP101988（3 及び 10 mg/kg）を経口投与したところ、一過性で可逆的かつ用量に応じた循環血中 CD4 陽性 T リンパ球数の減少が認められた（Figure 2.3.1-1）。ラットに RP101988 を経口投与した際の絶対バイオアベイラビリティは 1%未満であるため、オザニモド（0.6 mg/kg）と同程度の循環血中リンパ球数の減少を生じさせるには、より高用量（10 mg/kg）の RP101988 が必要であった。マウスでも同様の試験［オザニモド（0.5 及び 2 mg/kg）、RP101988（2、6 及び 20 mg/kg）、いずれも単回経口投与］を実施した結果、オザニモド 0.5 mg/kg 単回投与と同程度の効果を得るためには、20 mg/kg の RP101988 を必要とした（データは示さず）。

Approved v2.0

Figure 2.3.1-1: **オザニモド又は RP101988 をラットに単回経口投与した際の循環血中 CD4 陽性 T リンパ球数の変化**



hr = hour.
The comparison between ozanimod and RP101988 is illustrated.
Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). N = 3 to 4
Source: Report RP-PK-016-1.0.

以上の試験より、ヒトで認められる活性代謝物である RP101988 は、in vivo で CD4 陽性 T 細胞をオザニモドと同程度に減少させたが、オザニモドに比べて高い用量が必要であることが示された。この差は、げっ歯類では RP101988 の経口バイオアベイラビリティが低いことと関連しており、薬物曝露量と $S1P_1$ 受容体を介する薬力学的作用との関係を反映していると考えられた。

2.3.2 マウスにおける代謝物（CC112273）の評価

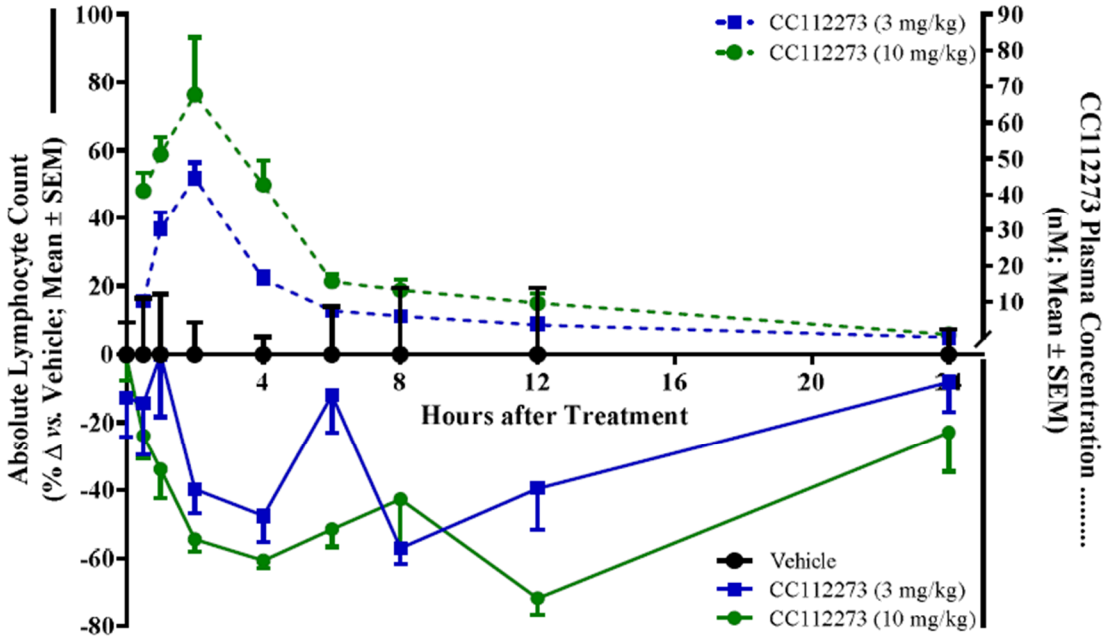
CC112273 は、ヒトにおいてはオザニモド投与後に S1P 受容体作動作用に寄与する主要代謝物である（【M2.7.2、1.2.1.3 項】参照）。雄性 C57BL/6 マウスに CC112273（3 及び 10 mg/kg）を QD で 5 日間反復経口投与したときの PK/PD 関係について、循環血中リンパ球数を $S1P_1$ 受容体作動作用の指標として評価した（試験番号 RP-PH-016）。

検討した CC112273 の用量は、副次的薬理試験で実施したマウス EAE モデルで有効性が示された範囲を含むように選択した（Figure 3.2.3-2）。10 mg/kg の CC112273 を投与したマウスでは 3 mg/kg で投与したマウスと比較して Cmax 及び投与後 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)）は高値を示し、検討した用量範囲で曝露量の用量に応じた増加が認められた（Figure 2.3.2-1）。10 mg/kg の CC112273 群で認められた循環血中リンパ球数の減少（投与 12 時間

Approved v2.0

後で 72%）と一致して、マウス EAE モデルでの 10 mg/kg の CC112273 群で概して大きな薬力学的作用を認めた（Figure 3.2.3-2）。なお、CC112273 の 3 mg/kg 投与群では投与 24 時間後でリンパ球数の減少は維持されなかったが、10 mg/kg 投与群では溶媒対照［0.5%（w/v）CMC］群に比べ、リンパ球数の減少傾向（23%減少）が認められた。これらのデータから、CC112273 を投与した条件では、5 日間反復投与後 24 時間にわたり $S1P_1$ 受容体を介する薬理作用と一致する循環血リンパ球数の減少が維持されることが示された。

Figure 2.3.2-1:　　マウスにおける CC112273 の 5 日間 QD 反復経口投与後 24 時間の PK/PD



%Δ = percent change. N = 5 to 6
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM).
Source: Report RP-PH-016.

2.3.3　　ラットにおけるオザニモド及び代謝物（RP101075、RP101442、RP101988、CC112273）の評価

雄性 Sprague Dawley ラットにオザニモド（0.6 mg/kg）又はその活性代謝物である RP101075（0.6 mg/kg）、RP101442（1 mg/kg）、RP101988（10 mg/kg）及び CC112273（2 mg/kg）を単回経口投与した際の PK/PD について、投与 3、6 及び 24 時間後の循環血中リンパ球数の変化を $S1P_1$ 受容体作動作用の指標として評価、比較した（試験番号 RP-PH-005-1.0）。経口投与した用量は、$S1P_1$ 受容体作動活性に基づき、循環血中リンパ球数を約 60%以上減少させると推定される条件で設定した。総活性薬物濃度は、個々に投与した化合物（オザニモド、RP101075、RP101442、RP101988 又は

Approved v2.0

CC112273）及びそれらの下流活性代謝物（CC112273、RP101075、RP101442、RP101988、RP112289又はCC1084037のうち1つ以上）の血漿中濃度を合計することで算出した（Table 2.3.3-1）。

Table 2.3.3-1: 総活性薬物濃度算出に用いた未変化体及び活性代謝物

Administered Parent Compound	Total Active Drug Measured as the Sum of Administered Parent Compound + Active Metabolites						
	Ozanimod	**CC112273**	**RP101075**	**RP101442**	**RP101988**	**RP112289**	**CC1084037**
Ozanimod	*Yes*	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	BLQ
RP101075	BLQ	Yes	*Yes*	Yes	BLQ	Yes	Yes
RP101442	BLQ	Yes	Yes	*Yes*	BLQ	BLQ	Yes
RP101988	BLQ	BLQ	Yes	Yes	*Yes*	BLQ	Yes
CC112273	BLQ	*Yes*	Yes	BLQ	BLQ	BLQ	Yes

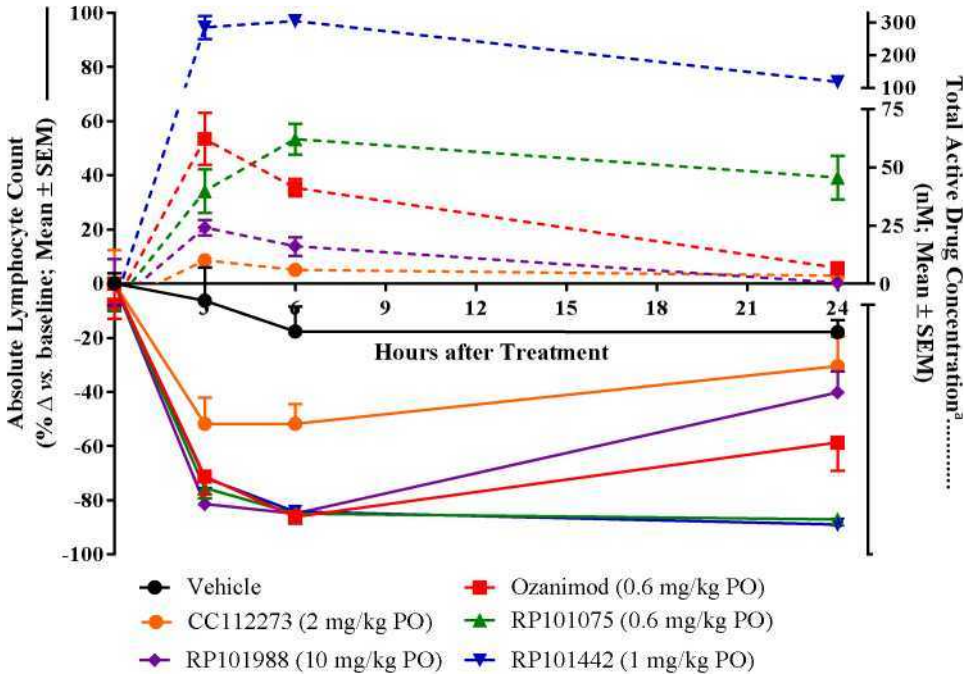
BLQ = below the limit of quantification.
RP101124, an inactive metabolite, was present in all groups at all time points.
Italics = administered parent compound.
Source: Report RP-PH-005-1.0.

フローサイトメトリーを用いて、循環血中のCD4陽性及びCD8陽性Tリンパ球並びにB220陽性Bリンパ球サブタイプの絶対数を評価した。各投与化合物及びそれらの下流活性代謝物の血漿中濃度は経時的な採血により定量した。

オザニモド、RP101075、RP101442、RP101988又はCC112273のラットへの経口投与により、循環血中総リンパ球数（CD4陽性、CD8陽性及びB220陽性の総数）が投与前値と比較して最大で52～89%減少した（Figure 2.3.3-1）。各リンパ球サブタイプに対する作用は同程度であり、CD4陽性、CD8陽性及びB220陽性の各リンパ球分画は最大でそれぞれ約68～96%、62～93%及び35～79%減少した。オザニモド、RP101075及びRP101442による作用は投与6時間後までに最大となり、オザニモドは投与24時間後までにリンパ球数減少作用は減弱した一方、RP101075及びRP101442の作用は投与24時間後まで維持された。一方、RP101988及びCC112273は概して24時間時点ではリンパ球数減少作用は維持されなかった。循環血中リンパ球数は各化合物投与後の総活性薬物濃度を反映しており、明らかなPK/PD関係が示された（Figure 2.3.3-1、Figure 2.3.3-2）。

Approved v2.0

Figure 2.3.3-1: **オザニモド又は代謝物をラットに投与した際の血中総リンパ球数（実線）と血漿中の平均総活性薬物濃度（破線）の比較**

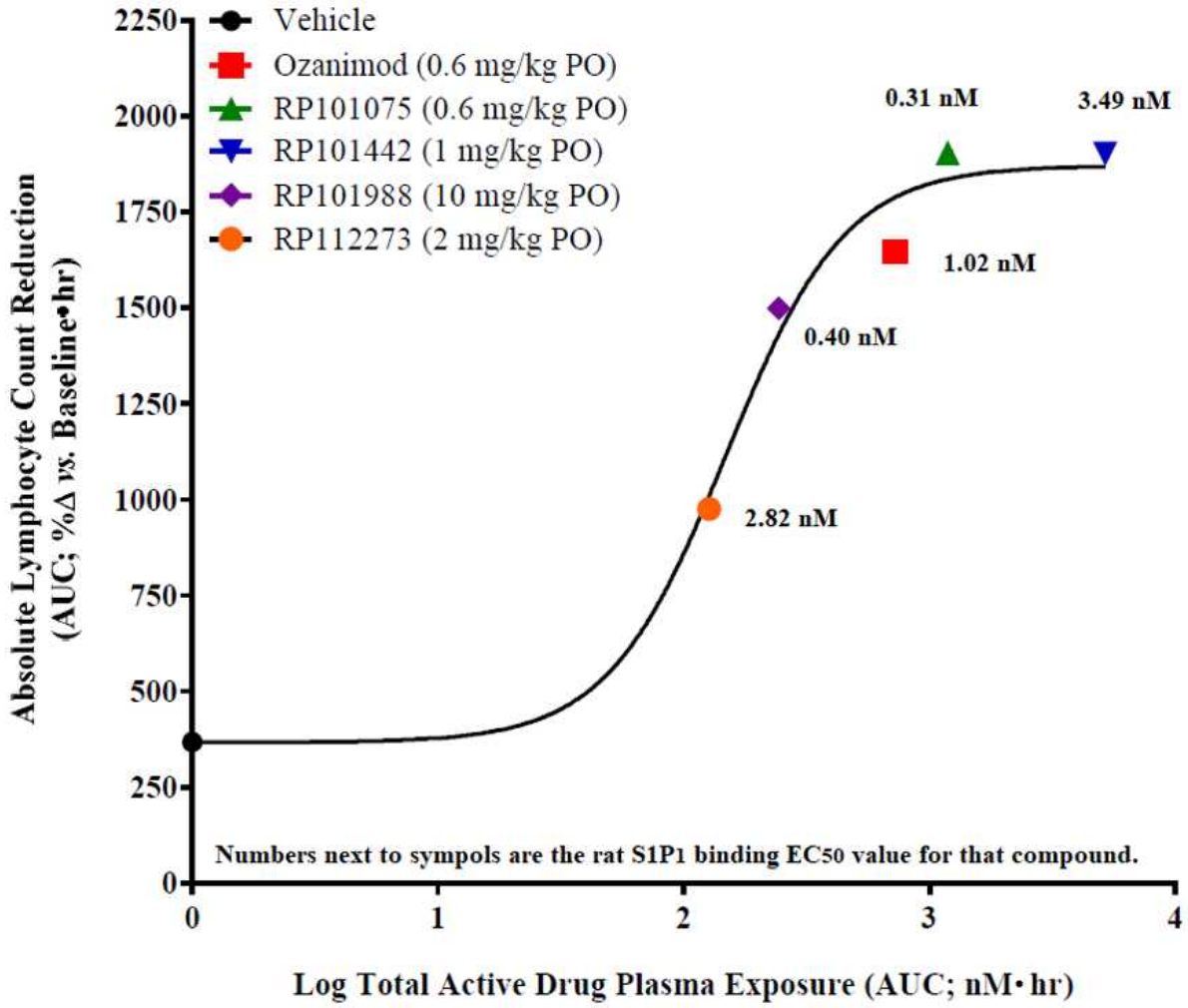


PO = oral; % Δ = percent change.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM), N = 5.
[a] Total active drug = administered compound plus active metabolite[s].
Source: Report RP-PH-005-1.0.

Figure 2.3.3-2 には、Figure 2.3.3-1 で示された 24 時間当たりの血漿中総活性薬物濃度の各 AUC(0-24h)の対数値と、それぞれの薬物投与後の循環血中リンパ球数に対するベースラインからの変化率の各 AUC(0-24h)を PD 作用を示す値としてプロットした。各薬剤投与時の血漿中総活性薬物濃度の AUC(0-24h)と PD 作用との間には明らかなシグモイド型の関係が認められ、ラットにおける総曝露量が約 1200 nM•hr の時に最大の PD 作用に達した。このようなプロファイルから、PD 作用の誘導には、投与した各化合物の EC50 値との関連性は認められず、血漿中総活性薬物濃度の AUC(0-24h)が関連することが示唆された。

Approved v2.0

Figure 2.3.3-2: **オザニモド及び活性代謝物に関する血漿中総活性薬物濃度の AUC と循環血中リンパ球数の変化率の AUC の関連性**



AUC = area under the curve over 24 hours; EC50 = concentration at which 50% of maximal activity is observed;PO = oral; $S1P_1$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1; %Δ = percent change.
Source: Report RP-PH-005-1.0 and modified with the addition of rat $S1P_1$ EC50 binding values from Report RP-PH-010.

以上の結果から、オザニモド又はその活性代謝物（RP101075、RP101442、RP101988 又は CC112273）の単回経口投与により、ラットの循環血中の CD4 陽性、CD8 陽性及び B220 陽性の各リンパ球数及び総リンパ球数が減少することが示された。また、血漿中総活性薬物濃度がリンパ球数減少の持続時間に関連し、血漿中総活性薬物濃度の AUC(0-24h)と PD 作用の AUC(0-24h)との間にシグモイド型の PK/PD 関係があることが示された。

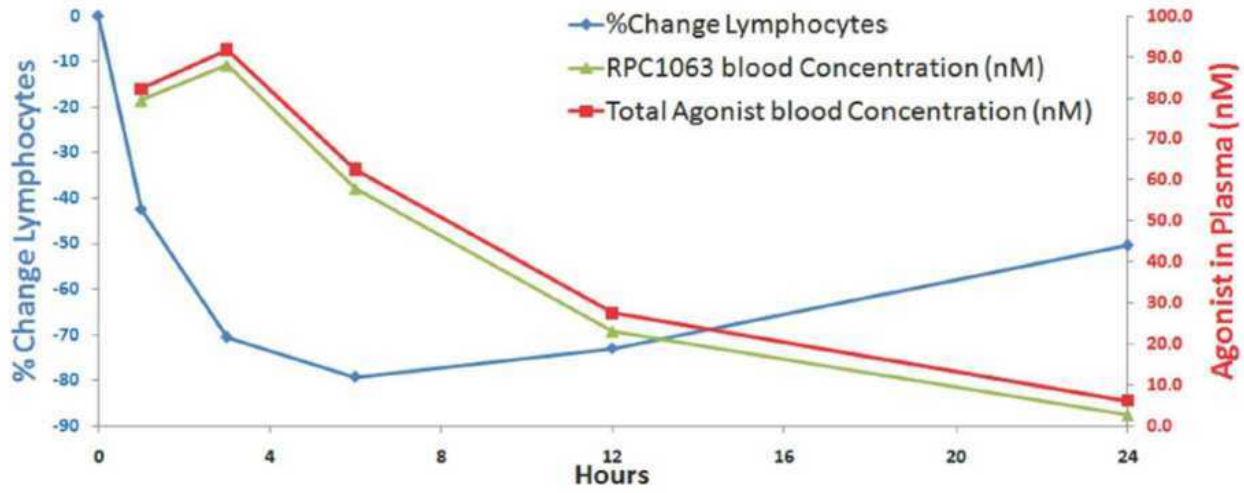
Approved v2.0

2.3.4 マウス、ラット、イヌ及びカニクイザルにおけるにおけるオザニモド及び代謝物（RP101075、RP101442）の評価

一般的に非臨床試験で用いられる動物種を用い、オザニモドを投与した際のオザニモド及び活性代謝物（RP101075 及び RP101442）の血中（マウスのみ）又は血漿中総活性薬物濃度と、$S1P_1$ 受容体の総薬物活性の指標である循環血中リンパ球数の減少との関係を評価した（試験番号 RP-PK-002-1.0）。

試験に用いた全ての動物種で、オザニモドの単回又は反復（ラットのみ）での経口投与後に循環血中総リンパ球数の顕著な減少が認められた。なお、マウス（Figure 2.3.4-1）及びラット（Figure 2.3.4-2）は、溶媒対照｛マウス（5% DMSO/5% Tween 20）、ラット［0.5%（w/v）CMC］｝群との比較、イヌ（Figure 2.3.4-3）及びサル（Figure 2.3.4-4）は、投与前値との比較で以下に示した。

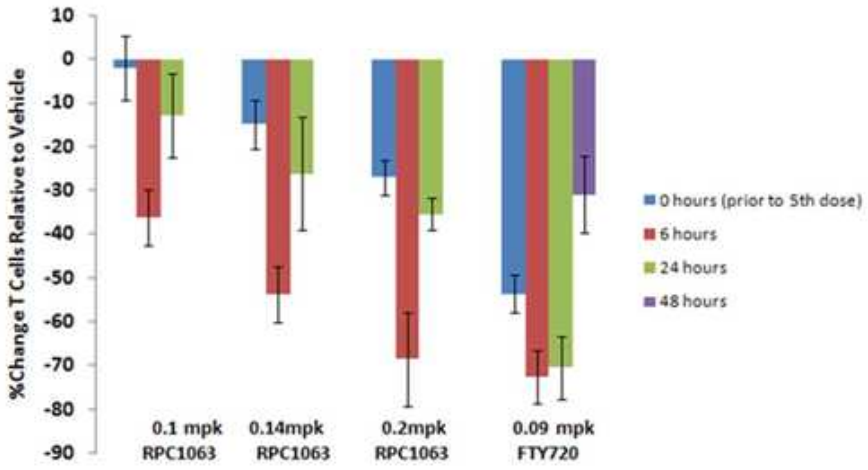
Figure 2.3.4-1: マウスにおけるオザニモド（RPC1063）1 mg/kg 単回経口投与後の PK/PD 解析



RPC1063 = ozanimod.
Data are the average of N = 3/time point.
Source: Report RP-PK-002-1.0.

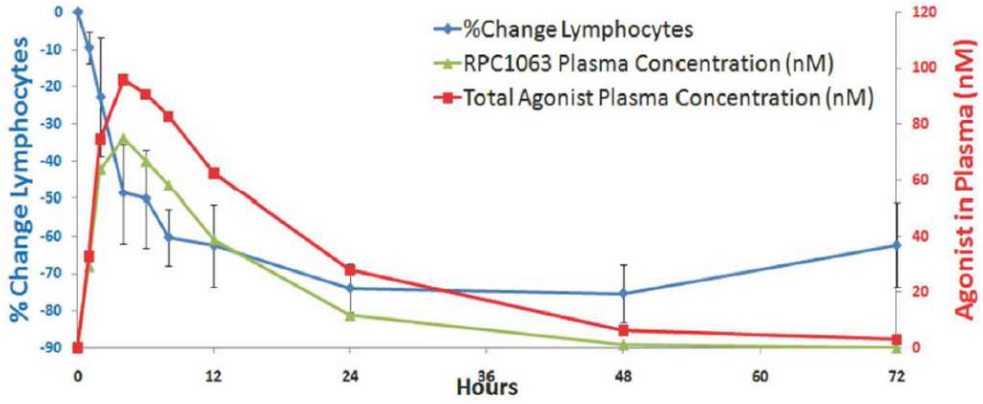
Approved v2.0

Figure 2.3.4-2: ラットにおけるオザニモド（RPC1063）5 日間 QD 反復経口投与時のリンパ球数の変化



RPC1063 = ozanimod; mpk = mg/kg.
Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) (N = 3/dose level). Each set of 4 bars for each dose is in the order of 0, 6, 24, and 48 hours (left to right), with the 4th bar (48 hours) missing for 0.1, 0.14, and 0.2 mpk doses. Original intended doses of RPC1063 were 0.1, 0.2, and 0.3 mpk, respectively. Actual analyzed doses were 0.1 mpk, 0.14 mpk, and 0.2 mpk in the formulation, respectively.
Source: Report RP-PK-002-1.0.

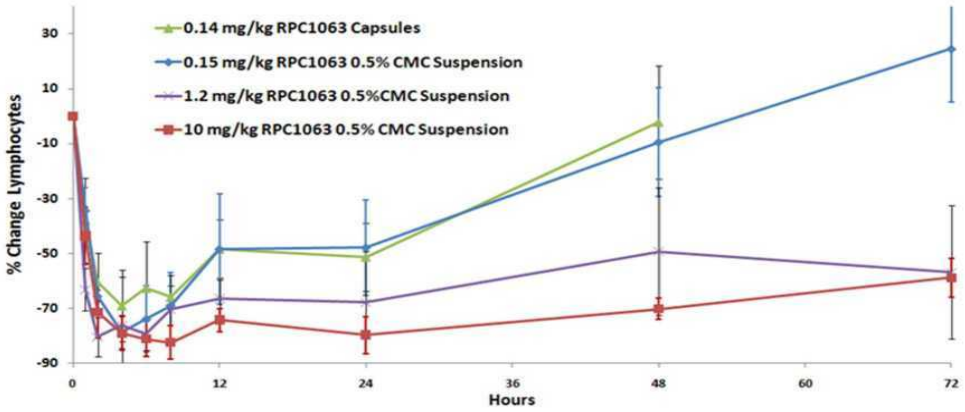
Figure 2.3.4-3: イヌにおけるオザニモド（RPC1063）1.5 mg/kg 単回経口投与後の PK/PD 解析



RPC1063 = ozanimod.
Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) (N = 4/time point).
Source: Report RP-PK-002-1.0.

Approved v2.0

Figure 2.3.4-4: サルにおけるオザニモド（RPC1063）単回経口投与後のリンパ球数の変化



CMC = carboxymethyl cellulose; RPC1063 = ozanimod.
Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) (N = 4/time point).
Source: Report RP-PK-002-1.0.

単回投与後に循環血中リンパ球数が最低値から回復し始める血漿中総活性薬物濃度のラット、イヌ及びサルの 3 動物種を合わせた平均値は 9.9 nM であり、また、全血中総活性薬物濃度を測定したマウスでは 27.5 nM であった（Table 2.3.4-1）。

Table 2.3.4-1: 各動物種におけるオザニモド（RPC1063）及び代謝物がリンパ球数減少を示す血漿中薬物濃度と投与量の要約

Species (RPC1063 Dose mg/kg)	Approximate Plasma Concentration (nM)			
	Beginning of Lymphocyte Recovery		At ~50% Lymphopenia	
	RPC1063	Total Agonist	RPC1063	Total Agonist
Mouse (1.0) [a]	23.1	27.5	2.6	6.1
Rat (0.3)	1.7	9.8	1.7	5.3
Dog (1.5)	1.3	6.4	0.07	3.1
Monkey (0.14)	2.3	4.8	0.72	3.2
Monkey (0.15)	5.9	9.6	1.1	2.7
Monkey (1.2)	7.4	12.3	1.3	6.0
Monkey (10)	7.0	16.6	1.3	4.2
Mean Values [b]	4.3	9.9	1.0	4.1
(± SD)	(2.8)	(4.2)	(0.6)	(1.3)

RPC1063 = ozanimod; SD = standard deviation

[a] Blood, and not plasma, concentrations were measured in the mouse.
[b] The mouse data were not included in the mean values since blood concentrations were measured.
Source: Report RP-PK-002-1.0.

Approved v2.0

以上より、オザニモドの経口投与により、げっ歯類（マウス、ラット）及び非げっ歯類（イヌ、サル）で同様の用量に応じた循環血中リンパ球数の減少が認められ、循環血中リンパ球数の減少に対する影響は、ラットでの反復投与後においても回復性を示した。

3 副次的薬理試験

3.1 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イオン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、CEREP Express Profile™ を用いて検討した［オザニモド（試験番号 16603 及び CC-DISC-ET-2926）、CC112273（試験番号 100040667）、CC1084037（試験番号 CC-DISC-ET-2889 及び CC-DISC-ET-2911）、RP101075（試験番号 16829）、RP101442（試験番号 17638）、RP101988（試験番号 100032946）及び RP101124（試験番号 100032946）］。

オザニモドは 1 μM の濃度で 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た。5-HT トランスポーターに対するオザニモドの 8 点濃度反応曲線を追加解析した結果、IC50 値は 3.66 μM と算出され（試験番号 CC-DISC-ET-2926）、オザニモドのヒトでの投与量である 0.92 mg（オザニモド塩酸塩 1 mg）に対する曝露マージンは約 3300 倍（日本人 UC 患者に QD でオザニモド塩酸塩 1 mg 投与時の定常状態における Cmax の幾何平均は 1.11 nM）であった（【M2.7.2、3.6.4 項】参照）。

CC1084037 は 10 μM の濃度で A3R、MT1 及び 5-HT2B に対する放射性リガンド結合を 50%超阻害した。8 点濃度反応曲線を追加解析した結果、CC1084037 の A3R、5-HT2B 及び MT1 に対する IC50 値はそれぞれ 300 nM、590 nM 及び 1500 nM と算出され（試験番号 CC-DISC-ET-2911）、CC1084037 の日本人 UC 患者での定常状態における Cmax 推定値［3.94 nM、CC112273 と CC1084037 の関係に基づいて算出（CC1084037 の Cmax 推定値＝0.193×CC112273 の Cmax 推定値）］（【M2.7.2、3.6.4 項】及び試験番号 RPC01-1914 参照）と A3R、5-HT2B 及び MT1 に対する IC50 値より算出した臨床曝露マージンはそれぞれ 76 倍、150 倍及び 381 倍であった。CC1084037 は 10 μM の濃度で σ 受容体及び GABA 作動性 Cl^- チャネルへの結合もそれぞれ 51%及び 53%阻害した（試験番号 CC-DISC-ET-2889）。CC1084037 の σ 受容体及び GABA 作動性 Cl^- チャネルに対する IC50 値は約 10 μM であり、臨床曝露マージンは約 2538 倍であった。

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。

以上の結果から、標的外結合評価で検討した化合物のうち、オザニモド及び CC1084037 のみが 50%超の結合阻害活性を示し、臨床での定常状態における Cmax 推定値に対する臨床曝露マージンは、

Approved v2.0

最小で CC1084037 の A3R に対する IC50 値の 76 倍であった。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。

3.2 In vivo モデルを用いた副次的薬理評価

3.2.1 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及び RP101075 の薬効評価

雌性 C57BL/6 マウスの EAE モデルを用い、非選択的 S1P 受容体調節薬である FTY720 を陽性対照として、オザニモド及び RP101075 を投与した際の循環血中リンパ球数減少と有効性（EAE 疾患スコアを指標とした治療効果）の関連を検討した（試験番号 20091001-1d）。マウスに完全フロイントアジュバントに懸濁した Myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55（MOG_{35-55}）を皮下投与し、その 2 及び 24 時間後に百日咳毒素を投与して発症を誘導した。マウスは毎日観察し、EAE の徴候が最初に現われた時点で各群に無作為に割り付けした後に試験化合物の投与を開始した。マウスに溶媒（5% DMSO/5% Tween 20）、試験化合物［オザニモド（0.2 及び 0.6 mg/kg）又は RP101075（0.05、0.1 及び 0.3 mg/kg）］又は陽性対照の FTY720（3 mg/kg）を QD で 14 日間反復経口投与した。有効性は、毎日の観察による EAE 疾患スコア［盲検者による目視観察で行い、各マウスの投与前及び投与後のスコアを 0.0（明らかな運動障害がない状態）から 5.0（ケージ内で自発的な横転、麻痺による死亡又は重度の麻痺のために安楽死が必要な状態）で評価］及び週 3 回体重変化を記録することによって評価した。最終投与の約 24 時間後に循環血中リンパ球の絶対数を評価するために血液検体を採取した。

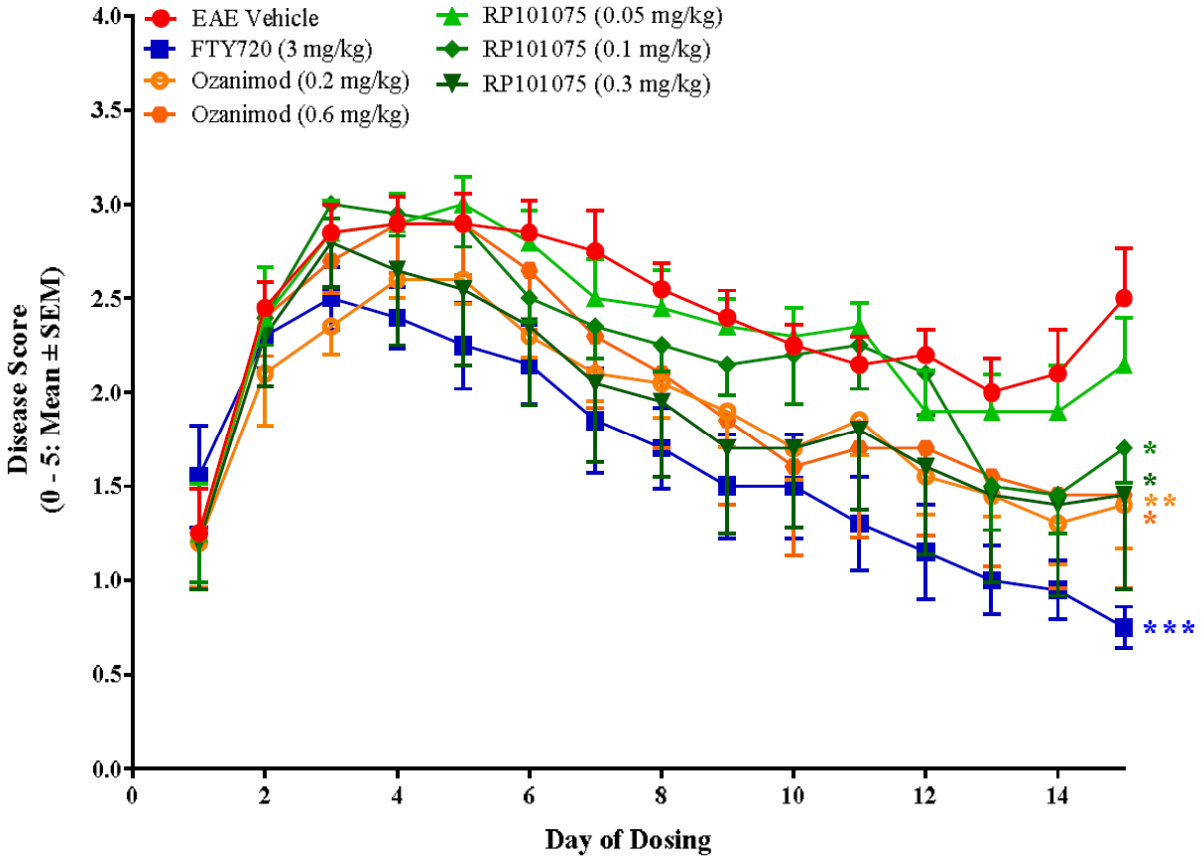
FTY720（3 mg/kg）の投与により、溶媒対照群と比較して、最終的な EAE 疾患スコアが統計学的有意に改善した（Figure 3.2.1-1）。また、体重減少の改善傾向が認められた。さらに、試験終了時の循環血中リンパ球数は、溶媒対照群と比較して 78%減少した。

溶媒投与群と比較した本モデルマウスでの体重減少の減弱効果は、オザニモド又は RP101075 を投与した全ての群で統計学的有意であった（$P < 0.05$、Student's t-test）。最終的な EAE 疾患スコアは、FTY720 と同様に、オザニモド（0.2 及び 0.6 mg/kg）又は RP101075（0.1 及び 0.3 mg/kg）の投与により統計学的有意に改善した（Figure 3.2.1-1）。また、検討した最高用量である、0.6 mg/kg（オザニモド）又は 0.3 mg/kg（RP101075）の条件で、循環血中リンパ球数が溶媒対照群と比較して、それぞれ 51%及び 45%減少した（Table 3.2.3-1）。

以上の結果から、オザニモド及び RP101075 の 14 日間の投与により、循環血中リンパ球数の減少を伴った EAE 疾患スコア及び体重減少の改善が認められた。

Approved v2.0

Figure 3.2.1-1: **オザニモド又は RP101075 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移**



EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM).
*, **, ***P < 0.05, 0.01, 0.001, respectively, compared to EAE Vehicle (Wilcoxon's nonparametric test; N = 10).
Source: Report 20091001-1d.

3.2.2 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスにおける RP101442 の薬効評価

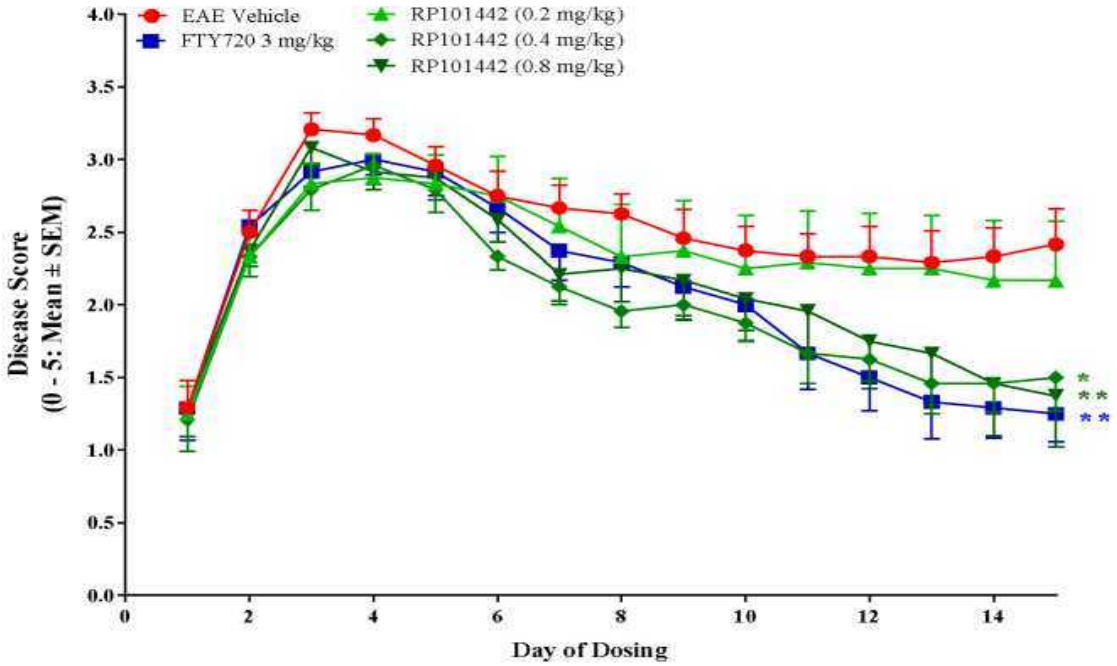
雌性 C57BL/6 マウスの EAE モデルを用い、オザニモドの代謝物である RP101442 を投与した際の循環血中リンパ球数減少と有効性（EAE 疾患スコアを指標とした治療効果）の関連を検討した（試験番号 20091203-2b）。EAE の誘発及び評価は、3.2.1 項と同様の方法で実施した。マウスに溶媒又は RP101442（0.2、0.4 及び 0.8 mg/kg）を QD で、14 日間反復経口投与した。

陽性対照の FTY720（3 mg/kg、経口投与）群では、溶媒対照群と比較して、最終的な EAE 疾患スコアは統計学的有意に低下し（Figure 3.2.2-1）、体重減少の改善傾向が認められた。FTY720 投与マウスの循環血中リンパ球数は、溶媒対照と比較して試験終了時で 82%減少した。RP101442 の 0.4 及び 0.8 mg/kg 投与では、FTY720 と同様に、最終的な疾患スコアが溶媒対照群と比較して統計学的有意に低下した（Figure 3.2.2-1）。体重減少の減弱効果は 0.4 mg/kg 群のみで溶媒対照群と比較して統計

Approved v2.0

学的有意（P < 0.05、Student's t-test）であった。循環血中リンパ球数は RP101442 の投与により用量依存的に減少し、最大減少率は 0.8 mg/kg 群で 69%であった（Table 3.2.3-1）。

Figure 3.2.2-1: RP101442 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移



EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis.
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM).
*, **P < 0.05 , 0.01, respectively, compared to EAE Vehicle (Wilcoxon's nonparametric test; N = 12).
Source: Report 20091203-2b.

以上の結果から、RP101442 の 14 日間の投与により、循環血中リンパ球数の減少を伴った EAE 疾患スコア及び体重減少の改善が認められた。

3.2.3 実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルマウスにおける RP101988 及び CC112273 の有効性

雌性 C57BL/6J マウスの EAE モデルを用い、オザニモドの代謝物である RP101988 及び CC112273 を投与した際の循環血中リンパ球数減少と有効性（EAE 疾患スコアを指標とした治療効果）の関連を検討した（試験番号 RP-PH-006-1.0）。EAE の誘発及び評価は、3.2.1 項及び 3.2.2 項と同様の方法で実施した。マウスに溶媒、FTY720（3 mg/kg）、RP101988（2、6 及び 20 mg/kg）又は CC112273（2、6 及び 10 mg/kg）を QD で 14 日間反復経口投与した。血液は最終投与の 1 又は 3 並びに 24 時間後に採取し、RP101988 及び CC112273 並びにそれらの下流の活性代謝物である CC1084037 及び RP101075 の血漿中濃度をそれぞれ測定した。

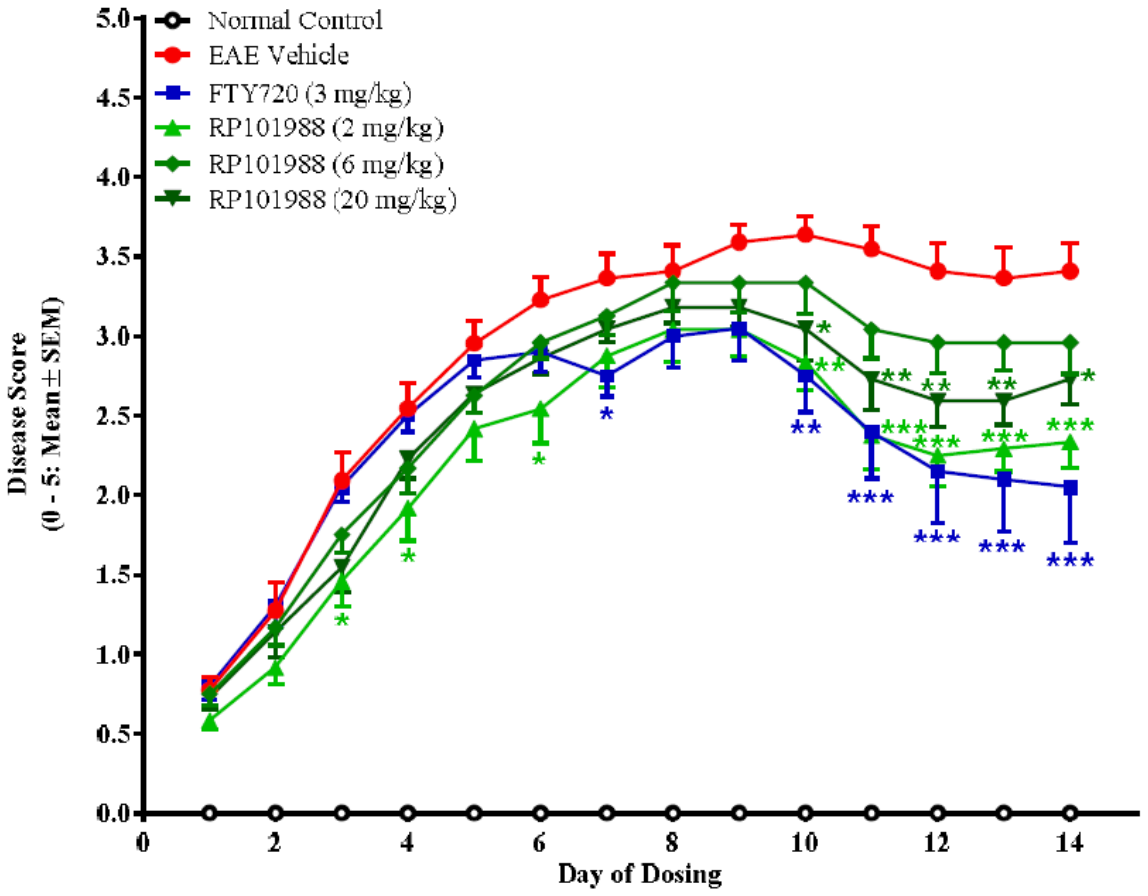
RP101988（2 及び 20 mg/kg）、CC112273（2、6 及び 10 mg/kg）及び FTY720（3 mg/kg）の投与により、溶媒対照群と比較して疾患スコアが統計学的有意に抑制された（Figure 3.2.3-1 及び Figure 3.2.3-

Approved v2.0

2）。RP101988（2 mg/kg）投与による疾患スコアの改善は、試験期間中を通じて FTY720 と同程度であったが、CC112273（10 mg/kg）では、投与 1 週目まで FTY720 と同程度であったもののその後は維持されなかった。体重減少への影響は、溶媒対照群と比較して CC112273 投与は減弱する傾向を示したのみであったが、RP101988（20 mg/kg）は FTY720 と同様に体重減少を統計学的有意に減弱した（$P < 0.05$、two-way ANOVA 後の Dunnett 検定）。

最終投与 24 時間後に測定した循環血中リンパ球数は、FTY720 による減少作用（42.5～53.9%）とは対照的に、CC112273 では溶媒対照群に対して統計学的有意な減少作用は認められなかった（RP101988 の 6、20 mg/kg 投与群では unpaired t-test でのみ $P < 0.05$）。最終投与 24 時間後では循環血中リンパ球数への顕著な影響が認められなかった理由としては、この時点で検出された RP101988 又は CC112273 及びその代謝物の血漿中濃度が低かった（3.6 nM 以下）ことが要因として考えられる。なお、CC112273 を 10 mg/kg で経口投与した別の試験（試験番号 RP-PH-016）で、正常な C57BL/6 マウスに 5 日間反復投与した際の最終投与 12 時間後の時点では、循環血中リンパ球数の統計学的有意な 72%の減少が認められており、$S1P_1$ 受容体を介する薬理作用が裏付けられている（2.3.2 項）。

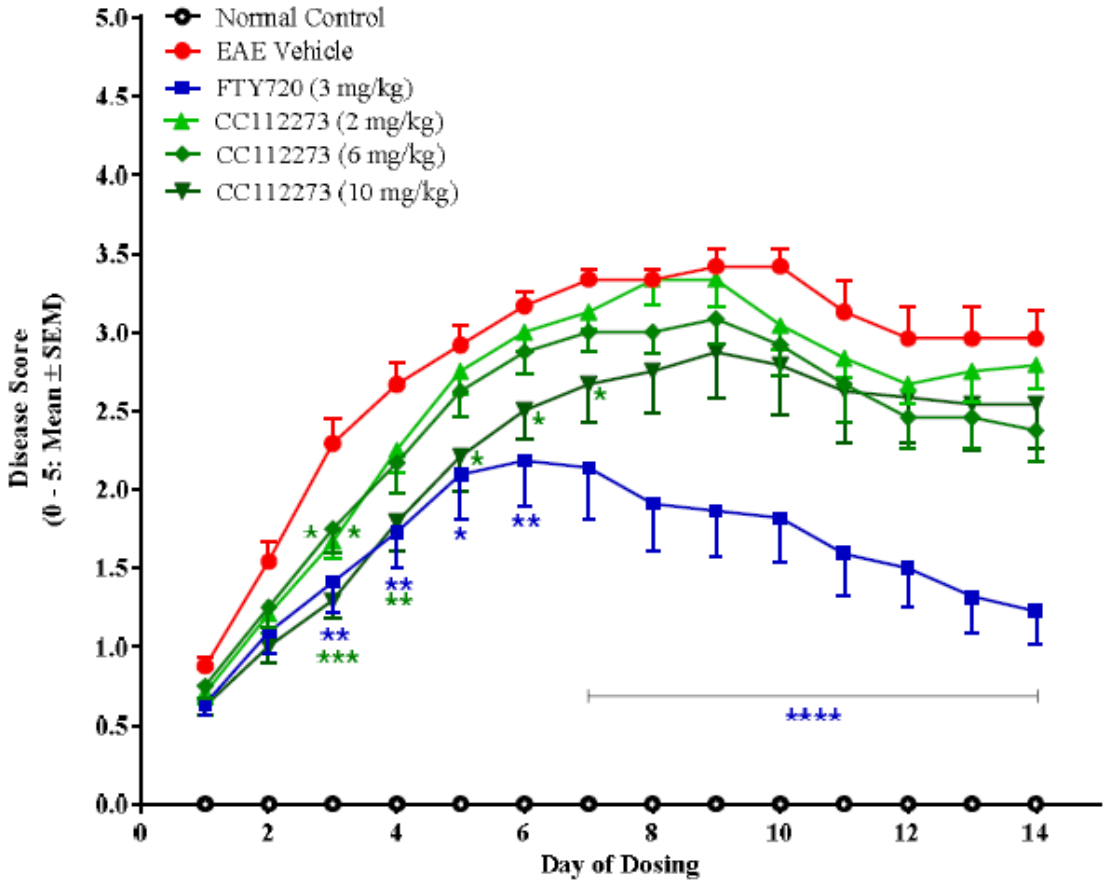
Figure 3.2.3-1: RP101988 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移



Approved v2.0

EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis.
*, **, ***P < 0.05, 0.01, 0.001, respectively, compared to EAE vehicle (two-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons post-test); N = 10 to 12.
Group mean disease score is displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM). Animals that did not complete the study but were still enrolled on Study Day 7 had their final in-life data points carried forward for the remainder of the study because the disease scores were at or near their maximum.
Source: Report RP-PH-006-1.0.

Figure 3.2.3-2: CC112273 投与による EAE モデルマウスにおける疾患スコアの推移



EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis.
*, **, ***, ****P < 0.05, 0.01, 0.001, 0.0001, respectively, compared to EAE Vehicle (two-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons post-test); N = 11 to 12.
Group mean disease score is displayed with error bars denoting the standard error of the mean (SEM). Animals that did not complete the study but were still enrolled on Study Day 7 had their final in-life data points carried forward for the remainder of the study because the disease scores were at or near their maximum.
Source: Report RP-PH-006-1.0.

以上の結果から、オザニモドの代謝物である RP101988 又は CC112273 の 14 日間反復投与により、マウスの疾患スコアは統計学的有意に改善されたものの、最終投与 24 時間後のリンパ球数減少は溶

Approved v2.0

媒対照群に対して統計学的有意ではなかった。CC1084037 については、マウス EAE モデルを用いた直接的な投与試験は実施していないが、CC112273（2～10 mg/kg）を投与したマウスでは代謝物としてヒトで薬理学的作用が確認された濃度（最終投与 1 時間後で 5.6～16.5 nM）に達しており、$S1P_1$ 受容体を介する薬力学的作用及び有効性に寄与することが示唆された（Table 3.2.3-1）。

Table 3.2.3-1: EAE モデルマウスでのオザニモド及び活性代謝物の薬効一覧

Treatment	Dose(s) (mg/kg/day)	Disease Score	Body Weight Loss	Absolute Lymphocyte Counts [a]
FTY720 [b]	3	Significantly attenuated (~ 55%)	Significantly attenuated	~ 64% ↓
Ozanimod	0.2, 0.6	Significantly attenuated (≤ 44%)		~ 51% ↓
RP101442	0.2, 0.4, 0.8			≤ 69% ↓
RP101075	0.05, 0.1, 0.3			≤ 45% ↓
RP101988	2, 6, 20			≤ 43% (NS)
CC112273	2, 6, 10	Significantly attenuated (≤ 43%) [c]	Trend for attenuation	5% (NS) [d]
CC1084037	CC1084037 was not tested directly but present at clinically relevant levels (≤ 16.5 nM) as a metabolite and likely contributed to efficacy in the CC112273 EAE study (Report RP-PH-006-1.0). Similarly, CC1084037 is anticipated to contribute to the PD effect in the mouse CC112273 study (Report RP-PH-016).			

EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; NS = not significantly different.

[a] absolute lymphocyte counts assessed 24 hours after final dose and compared with EAE vehicle control animals
[b] In all 4 experimental autoimmune encephalomyelitis model studies, 64% was the average lymphocyte reduction induced by FTY720.
[c] during the first 7 days of treatment
[d] A separate study (Report RP-PH-016) demonstrated significant (≤ 72 %) decrease in lymphocyte counts in C57BL/6 NTac mice after 5 days of dosing at 10 mg/kg, an efficacious dose in the EAE model.

Source: Report 20091001-1d, 20091203-2b, RP-PH-006-1.0.

以上の結果から、マウス EAE モデルを用いた解析において、オザニモド及びその活性代謝物（RP101442、RP101075、RP101988 及び CC112273）投与により、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。

3.2.4 クプリゾン誘発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（試験番号 RP-PH-015）。雄性 C57BL/6J マウスを用い、脱髄を誘発するためにクプリゾン［0.3%（w/w）］を含む餌を与え、同時に自然に生じる再髄鞘化を阻害するためにラパマイシン（10 mg/kg）を QD で 6 週間腹腔内投与した。6 週間の経過後、通常食に戻し、ラパマイシンの投与を中止した。溶媒（5% DMSO/5% Tween 20）又はオザニモド（5 mg/kg）

Approved v2.0

は、脱髄誘発時から QD で経口投与を行い、6 週間の経過以降も継続して 12 週間（合計 18 週間）投与した。対照群として、週齢が同じで通常食で飼育し薬剤非投与のマウスでのデータを用いた。本対照群及び脱髄誘発群のマウスの一部は脱随誘発期間の終了時に、神経保護作用［抗ニューロフィラメント H 抗体（SMI-32）染色］及び脳萎縮［磁気共鳴画像法（MRI）／磁化移動比（MTR）画像法］を評価した。脱髄誘発期間後も溶媒又はオザニモドを継続的に投与した群では、回復期間中の再髄鞘化［大脳皮質、海馬及び脳梁のミエリンプロテオリピド蛋白質（PLP）染色］及び脳萎縮への作用について、脱髄誘発期間終了の 3 週間後から 12 週間後まで評価を実施した。循環血中リンパ球（CD4 陽性及び CD8 陽性 T リンパ球、B220 陽性 B リンパ球）の絶対数は、フローサイトメトリーによりオザニモド投与開始後 6 週目及び 18 週目の血液試料を用いて評価した。

クプリゾン及びラパマイシンの 6 週間の投与により誘導された軸索の損傷（Figure 3.2.4-1）及び髄鞘含量の低下（Figure 3.2.4-2）は、オザニモドを同時投与したマウスで改善した。一方、この神経保護効果とは対照的に、脳梁の髄鞘染色で評価した再髄鞘化（脱髄誘発終了後）への作用は投与を 12 週間継続した場合でも認められなかった（Figure 3.2.4-3）（Table 3.2.4-1）。循環血中リンパ球数はオザニモドの投与により減少した（試験開始 6 週後及び 18 週後でそれぞれ最大 99.5%及び 86.9%低下）。

Table 3.2.4-1: クプリゾン誘発マウス脱髄モデルでのオザニモド投与による脱髄変化の要約

Group	Treatments	Neurodegeneration Measure (Week 6)	MRI Assessment of Brain Atrophy (Week 6)	MRI Assessment of Brain Atrophy (Week 18)	Remyelination Measures (Week 9 to 18)
2	Cup/Rapa + Vehicle	Approximately 130-fold increase in number of SMI-32+ axonal ovoids (N = 10)	37% loss of MRI signal [a] (N = 7)	16% loss of MRI signal (N = 8)	Lower levels of myelin staining in the cortex, hippocampus, and corpus callosum [a] (N = 5 to 12)
3	Cup/Rapa + ozanimod (5 mg/kg)	Approximately 60-fold increase in number SMI-32+ axonal ovoids [b]: 52% attenuation (N = 11)	22% loss of MRI signal [c] (N = 8)	20% loss of MRI signal (N = 7)	No increase in myelin content. Lower myelin levels in hippocampus (Week 9, 12) (N = 4 to 12)

Cup = cuprizone; MRI = magnetic resonance imaging; Rapa = rapamycin; SMI-32 = anti-neurofilament H nonphosphorylated mouse monoclonal antibody

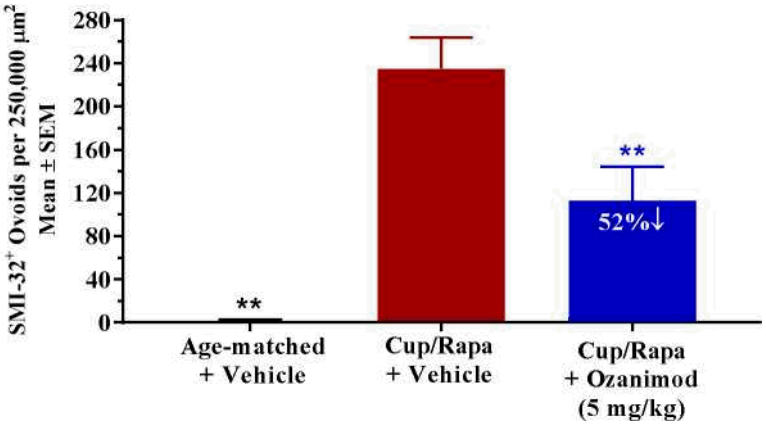
[a] P < 0.01, compared with Age-matched Vehicle Controls (one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons post-test).

[b] P < 0.01, compared with Cup/Rapa + Vehicle Controls (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons post-test).

Approved v2.0

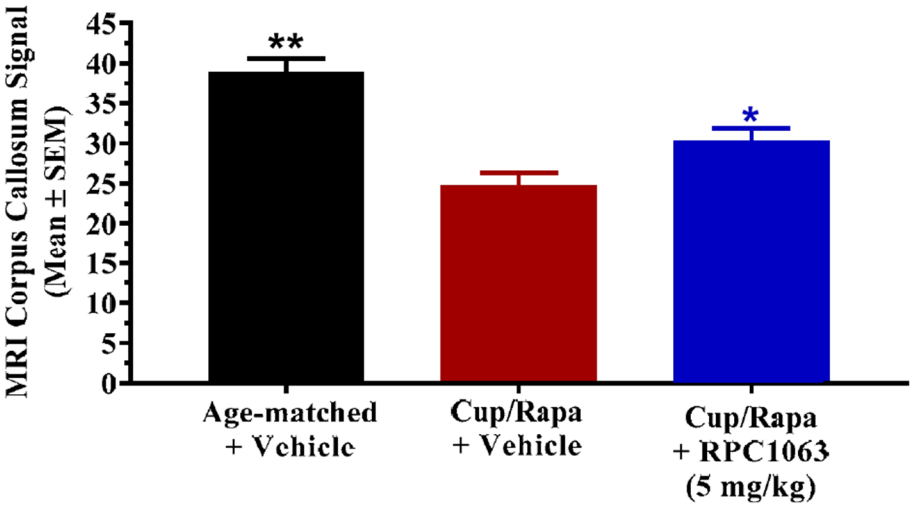
[c] P < 0.05, compared with Cup/Rapa + Vehicle Controls (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons post-test).
Source: Report RP-PH-015.

Figure 3.2.4-1: **試験開始 6 週での脳梁の神経変性に関する抗ニューロフィラメント H 染色による解析**



Cup = cuprizone; Rapa = rapamycin; SMI-32 = anti-neurofilament H nonphosphorylated mouse monoclonal antibody. Data shown are mean number of SMI-32+ ovoids per 250000 µm2 section with error bars denoting the standard error of the mean (SEM) for Age-matched (N = 6 [without Cup/Rapa]), Cup/Rapa + Vehicle (N = 10), and Cup/Rapa + ozanimod (N = 11).
**P < 0.01, compared to Cup/Rapa Vehicle Controls (one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons post-test).
Source: Report RP-PH-015.

Figure 3.2.4-2: **試験開始 6 週での脱髄に関する MRI/MTR による解析**

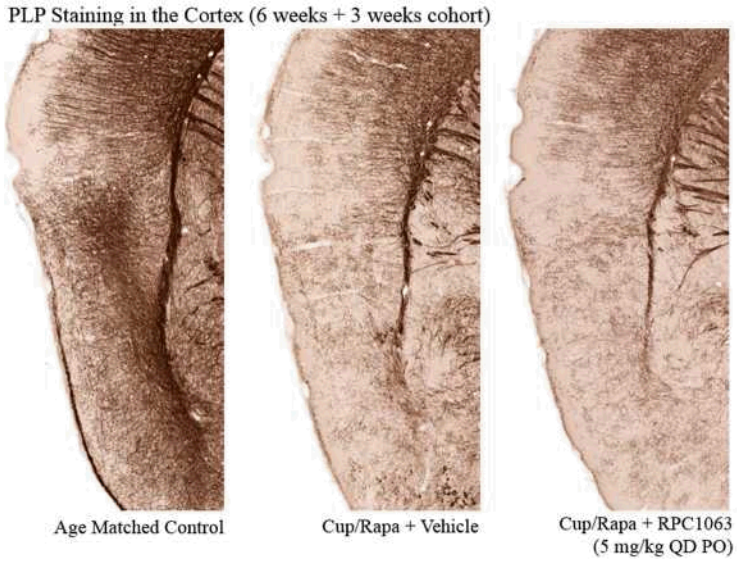


Cup = cuprizone; RPC1063 = ozanimod; MRI = magnetic resonance imaging; Rapa = rapamycin.

Approved v2.0

Data shown are mean MRI signal with error bars denoting the standard error of the mean (SEM) for age-matched (N = 8 [without Cup/Rapa]), Cup/Rapa + Vehicle (N = 7), and Cup/Rapa + ozanimod (N = 8) mice.
*, **P < 0.05, 0.01, respectively, compared to Cup/Rapa Vehicle Controls (one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons post-test).
Source: Report RP-PH-015.

Figure 3.2.4-3: 大脳皮質における PLP 染色の代表的画像



Cup = cuprizone; PLP = myelin proteolipid protein; PO = oral; QD = once daily; Rapa = rapamycin; RPC1063 = ozanimod.
Source: Report RP-PH-015.

以上の結果から、クプリゾン誘発マウス脱髄モデルにおいて、オザニモド投与により、$S1P_1$ 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を伴う神経保護作用が示されたが、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。

3.2.5 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 及びその下流代謝物である CC1084037 は、MAO-B に特異的な基質代謝を阻害（それぞれの IC50 値が 5.72 nM 及び 58 nM）することが示されている（【M2.6.4、7.3.3 項】、試験番号 RP-PK-026-1.0 及び RPC1063-DMPK-2859 参照）。マウスを用いた試験により、CC112273 をセロトニン作動化合物と併用投与した場合にセロトニン症候群の症状を誘発するかどうかを検討した。5-HTP 誘発 MAO-B 阻害剤感受性セロトニン症候群マウスモデルに対してオザニモド又は CC112273 を反復投与したときの影響を評価し（試験番号 RP-PH-008-1.0）、正常マウスに対してはオザニモドと CC112273 を同用量で投与し、5-HTP 誘発及び MAO-B 阻害を行わない条件下で同パラメータを評価した（試験番号 RP-PH-017）。

Approved v2.0

雄性 C57BL/6NTac マウスに溶媒［0.5%（w/v）CMC］、オザニモド（13.5 mg/kg）、CC112273（2.25 及び 10 mg/kg）又はセレギリン［MAO-B 阻害剤（10 mg/kg）］を QD で 5 日間投与（セレギリンは皮下、その他は経口）した（試験番号 RP-PH-008-1.0）。CC112273 の投与量は、オザニモドを 0.92 mg で投与したときのヒトでの定常状態における Cmax 中央値（12.0 nM）（【M2.7.2、3.6 項】参照）と同程度以上となるようにした。溶媒、セレギリン、オザニモド又は CC112273 の最終投与 4 時間後に、5-HTP 溶媒［1% ポリオキシル-35 ヒマシ油（cremophor ELP）］又は in vivo で 5-HT に変換されることが知られている 5-HTP（35 mg/kg）のいずれかを皮下投与した。陽性対照群には溶媒及び 5-HTP（35 及び 160 mg/kg）又はセレギリン（10 mg/kg）及び 5-HTP（35 mg/kg）を投与した（Table 3.2.5-1）。その後、マウスを 75 分間個別のオープンフィールドチャンバーに置き、垂直立ち上がり活動を連続的に記録した。深部体温は垂直立ち上がり活動をモニタリングした直後に測定し、血液は溶媒、オザニモド又は CC112273 の最終投与 6 時間後に採取し、血漿中の CC112273 を定量した。

溶媒を投与したマウスに 5-HTP（35 mg/kg 及び 160 mg/kg）を皮下投与したところ、垂直立ち上がり動作が統計学的有意かつ用量に応じて減少し［それぞれ 40%（$P < 0.05$）及び 73%（$P < 0.001$）、いずれも Group1（溶媒＋溶媒群）との比較］、この変化は 5-HTP 投与によるセロトニン濃度の上昇によって生じることが示唆された（Table 3.2.5-1）。セレギリン 10 mg/kg を 5 日間投与し、その後 5-HTP（35 mg/kg）を投与したマウスでは、垂直立ち上がり動作のさらなる低下［88%（$P < 0.01$）、5-HTP（35 mg/kg）群との比較］を示し、この変化は 5-HTP（35 mg/kg）を単独で投与した場合（40%）よりも大きかったことから、本セロトニン症候群モデルにおける MAO-B 阻害に対する応答を確認した。一方、オザニモド又は CC112273 を 5-HTP 誘発（35 mg/kg）の 5 日前から投与しても、溶媒を 5-HTP 誘発（35 mg/kg）5 日前から投与したマウスと比較して垂直立ち上がり動作の統計学的有意な低下は認められなかった。

深部体温と垂直立ち上がり動作に対する影響は同様の傾向を示し（Table 3.2.5-1）、溶媒投与マウスに 5-HTP（35 mg/kg 及び 160 mg/kg）を皮下投与した場合、深部体温が低下し［Group1（溶媒＋溶媒群）に対してそれぞれ−1.34°C 及び−3.71°C（$P < 0.001$）］、5-HTP（35 mg/kg）及びセレギリンを投与したマウスでも深部温度の統計学的有意な低下を示した［Group1（溶媒＋溶媒群）に対し-2.30°C、$P < 0.05$］。オザニモド又は CC112273 を 5-HTP 誘発（35 mg/kg）5 日前から投与しても、Group1（溶媒＋溶媒群）と比較して深部体温の統計学的有意な低下は認められなかった。なお、CC1084037 は、CC112273 と比較して MAO-B に対する IC50 値が 10 倍大きく、臨床曝露量も 5 分の 1（【M2.7.2、3.6 項】参照）であったことから、本試験では CC1084037 の評価は実施しなかった。

Approved v2.0

Table 3.2.5-1: セロトニン症候群のマウスモデルにおける試験結果要約

Group (N=8)	Test Article	Dose (mg/kg)	5-HTP Challenge on Day 4	Reduction in Vertical Rearing Activity	Core Body Temperature (°C; Mean ± SEM)
1	Vehicle [a]	NA	No (Vehicle [b])	NA	36.2 ± 0.5
2	Vehicle [a]	NA	Yes (35 mg/kg)	40% *	34.9 ± 0.6
3	Vehicle [a]	NA	Yes (160 mg/kg)	73% ***	32.5 ± 0.3***
4	Selegiline	10	Yes (35 mg/kg)	88% ***, ##	33.9 ± 0.6*
5	CC112273	2.25	Yes (35 mg/kg)	41%NS	34.9 ± 0.6NS
6	CC112273	10	Yes (35 mg/kg)	40%NS	34.8 ± 0.7NS
7	Ozanimod	13.5	Yes (35 mg/kg)	63%NS	34.2 ± 0.6NS

5-HTP = 5-hydroxytryptophan; NA = not applicable; NS = not significant, compared with Group 2 (Vehicle + 5-HTP [35 mg/kg]).
Data are expressed as mean and standard error of the mean (SEM).

[a] 0.5% (w/v) carboxymethyl cellulose (CMC) in milliQ water.
[b] 1% cremophor ELP in saline.
*,***P < 0.05, 0.001, respectively, compared with Group 1 Vehicle + Vehicle controls; one-way analysis of variance [ANOVA] with Dunnett's multiple comparisons post-test.
##P < 0.01, compared with Group 2 Vehicle + 5-HTP (35 mg/kg); one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons post-test.
Source: Report RP-PH-008-1.0.

別の試験（試験番号 RP-PH-017）では、正常 C57BL/6NTac マウスに同用量のオザニモド及び CC112273 を投与し、5-HTP 誘発及び MAO-B 阻害を行わない条件下で同パラメータを評価した。その結果、オザニモド及び CC112273 は、内因性セロトニンのみを有する正常マウスにおいては行動への影響を示さなかった。本試験では、CC112273 の脳内濃度は 27 nM 以下（最終投与後 54 時間）で、血漿中の濃度は 84 nM 以下（最終投与後 6 時間）となり臨床曝露量（12.0 nM）を上回った。

以上の結果から、CC112273 はヒトでの曝露量を上回る用量で、正常マウス及び 5-HTP によって誘発されたセロトニン症候群マウスのいずれにおいても、症状を悪化させないことが示された。

4 安全性薬理試験

心血管系（in vitro での心筋 hERG チャネル活性、in vivo でのラット及びサルを用いた心血管系機能）、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。

オザニモド及び代謝物の安全性薬理試験から得られた試験結果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。

Approved v2.0

4.1 心血管系に関する試験

4.1.1 In vitro 試験

オザニモド及びその代謝物（RP101075、RP101442、RP101988、RP101124、CC112273 及び CC1084037）が I_{Kr} に及ぼす影響について検討した（試験番号 062-0001、062-0003、062-0008、062-0013、077-0012、100503.SJD、170602.SFD、170531.SFD 及び CC-DISC-ET-2880）。試験内容、特記すべき所見、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）への適合性及び試験番号の一覧を Table 4.1.1-1 に示す。

Table 4.1.1-1: オザニモド及び代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101988、RP101442 及び RP101124）の hERG チャネルへの影響

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Test Article (Concentration or Dose)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	Ozanimod (1 µM)	10% inhibition of hERG current	Non GLP	062-0001
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	RP101075 (1 µM)	25% ± 16% inhibition of hERG current	Non GLP	062-0003, 062-0008
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	RP101442 (1 µM)	< 10% inhibition of hERG current	Non GLP	062-0013
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	RP101988 (1 µM), RP101124 (1 µM)	< 10% inhibition of hERG current	Non GLP	077-0012
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	Ozanimod (0.060, 0.12, 0.32, 5.3 µM)	Ozanimod dose-related inhibition of hERG current: IC50 = 0.21 µM	GLP	100503.SJD
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	CC112273 (0.3, 1, 3, 10 µM)	CC112273 dose-related inhibition of hERG current: IC50 = 4.9 µM	Non GLP	170602.SFD
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	CC112273 (0.2, 0.9, 2.9 µM)	CC112273 dose-related inhibition of hERG current: IC50 = 0.60 µM	GLP	170531.SFD

Approved v2.0

Table 4.1.1-1: オザニモド及び代謝物（CC112273、CC1084037、RP101075、RP101988、RP101442 及び RP101124）の hERG チャネルへの影響

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Test Article (Concentration or Dose)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	CC1084037 (0.3, 1.0, 3.0 μM)	CC1084037 dose-related inhibition of hERG current: IC50 > 3.0 μM	Non GLP	CC-DISC-ET-2880

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = good laboratory practice; hERG = human Ether-à-go-go-related gene; HEK = human embryonic kidney; I_{Kr} = delayed rectifier potassium current

4.1.1.1 オザニモド、RP101075、RP101442、RP101988 及び RP101124 の CHO 細胞に発現させた hERG チャネルに対する影響

オザニモド及びその代謝物（RP101075、RP101442、RP101988 及び RP101124）について、hERG チャネルに対するスクリーニングアッセイを実施した（試験番号 062-0001、062-0003、062-0008、062-0013 及び 077-0012）。hERG 相補的 DNA が安定的に発現するよう遺伝子導入された CHO 細胞を用い、自動化電気生理学システム（PX 7000A、Axon Instruments 社）を用いて測定した。

安定したベースライン電流が得られることを確認した後、溶解性を高めるために 0.1% DMSO 及び 0.01% Pluronic を含有する溶媒をチャンバーに添加し、3～10 分間静置して電流を安定化させた後、各試験化合物を最終濃度が 1 μM となるよう細胞チャンバーに添加した。その後、電流を再び 12 分間かけて安定させた。試験化合物を添加後に強力な hERG チャネル阻害剤であるシサプリド（陽性対照）を添加し、細胞の反応性を確認した。1 μM での hERG 電流阻害率はオザニモド、RP101442、RP101988 及び RP101124 で 10%以下であり、RP101075 では約 25%であった。

4.1.1.2 オザニモドの HEK293 細胞に発現させた hERG チャネルに対する影響（GLP 適用）

本試験（試験番号 100503.SJD）では、I_{Kr} に対するオザニモドの作用について、hERG チャネルを安定発現させた HEK293 細胞株を用いて検討した。オザニモド［0.060（N = 3）、0.12（N = 4）、0.32（N = 3）及び 5.3 μM（N = 3）］の評価は生理的温度に近い温度条件で実施した。hERG 電流は、全ての濃度において溶媒対照群［HEPES-buffered physiological saline（N = 3）］と比較して統計学的有意に阻害された（$P < 0.05$、one-way ANOVA 後の Dunnett 検定）。オザニモドの hERG 電流に対する阻害作用の IC50 値は 0.21 μM（ヒル係数 = 1.3）であった。同条件下で、陽性対照（テルフェナジン 60 nM）は hERG 電流を 84.5 ± 4.8%（平均値 ± SD、N = 2）阻害したことから、本試験系の hERG 阻害に対する感受性が確認された。なお、オザニモドの臨床曝露量に対する hERG 電流阻害作用の IC50 値は 10000 倍超の曝露マージンがあることが示された（日本人 UC 患者にオザニモド塩酸塩

Approved v2.0

1 mg を QD で投与したときの定常状態における非結合型オザニモドの Cmax 推定値は 0.0198 nM）（【M2.6.4、4.1 項】及び【M2.7.2、3.6.4 項】参照）。

4.1.1.3 CC112273 の HEK293 細胞に発現させた hERG チャネルに対する影響（GLP 適用）

本試験（試験番号 170531.SFD）では、I_{Kr} に対する CC112273 の作用について、GLP 非適用の試験（170602.SFD）で実施した検討（0.3、1、3 及び 10 µM で評価）を参考にした追加評価として実施した。

hERG チャネルを安定的に発現させた HEK293 細胞を用いて、hERG 電流に対する CC112273 の影響を検討した。CC112273［0.2（N = 3）、0.9（N = 4）及び 2.9 µM（N = 3）］の評価は生理的温度に近い温度条件で実施した。hERG 電流は、全ての濃度において溶媒対照群と比較して統計学的有意に阻害された（P < 0.05、one-way ANOVA 後の Dunnett 検定）。CC112273 の hERG 電流に対する阻害作用の IC50 値は 0.60 µM（ヒル係数 = 0.8）であった。同条件下で、陽性対照（テルフェナジン 60 nM）は hERG 電流を 85.5 ± 5.7%（平均値 ± SD、N = 2）阻害したことから、本試験系の hERG 阻害に対する感受性が確認された。なお、CC112273 の臨床曝露量に対する hERG 電流阻害作用の IC50 値は約 3200 倍の曝露マージンがあることが示された（日本人 UC 患者にオザニモド塩酸塩 1 mg を QD で投与したときの定常状態における非結合型 CC112273 の Cmax 推定値は 0.184 nM）（【M2.6.4、4.1 項】及び【M2.7.2、3.6.4 項】参照）。

4.1.1.4 CC1084037 の HEK293 細胞に発現させた hERG チャネルに対する影響

本試験（試験番号 CC-DISC-ET-2880）では、I_{Kr} に対する CC1084037 の作用について、hERG チャネルを安定発現させた HEK293 細胞を用いて検討した。また、0.3% DMSO 含有 HEPES 緩衝生理食塩液に対する CC1084037 の溶解限度を比濁法により評価した結果、同限度は約 3 µM と推定された。

CC1084037 は hERG 電流を 0.3 µM で 0.1 ± 1.2%、1 µM で 5.0 ± 2.7%、3 µM で 15.4 ± 1.9%阻害した（平均値 ± SEM、N = 3）。10 µM では調製液中に肉眼で確認可能な沈殿物が生じたため、評価は実施しなかった。hERG 電流に対する CC1084037 の IC50 値は算出しなかったが、検討した最高溶解濃度である 3 µM を上回ると推定された。同条件下で陽性対照であるシサプリドは、90 nM で hERG カリウム電流を 85.9 ± 9.2%阻害したことから（平均値 ± SD、N = 2）、本試験系の hERG 阻害に対する感受性が確認された。

なお、CC1084037 の臨床曝露量に対する hERG 電流阻害作用の IC50 値は 100000 倍超の曝露マージンがあることが示された［日本人 UC 患者にオザニモド塩酸塩 1 mg を QD で投与したときの定常状態における非結合型 CC1084037 の Cmax 推定値は 0.0276 nM。CC112273 と CC1084037 の関係に基づいて算出（CC1084037 の Cmax 推定値 = 0.193 × CC112273 の Cmax 推定値）］（【M2.6.4、4.1 項】、【M2.7.2、3.6.4 項】及び試験番号 RPC01-1914 参照）。

Approved v2.0

4.1.2 In vivo 試験

4.1.2.1 カニクイザルを用いた心血管系パラメータ解析（GLP 非適用）

本試験（試験番号 1840-002）では、雌雄のカニクイザルを用いて無麻酔下でオザニモドの心血管系に対する影響を検討した。心血管系データのベースライン取得のため、測定装置（生理的モニタリングのためのラジオテレメトリー送信機）を装着したカニクイザルへの初回投与 2 日前に 22 時間以上継続的にモニタリングした。最初の 22 時間のデータを用いて補正 QT（QTc）間隔を算出した。非拘束下で、収縮期、拡張期血圧並びに心拍数［血圧波形及び心電図（ECG）波形から算出］を測定した。ECG は、投与の 2 時間以上前から投与 48 時間以降まで継続的にモニタリングした。全てのデータは 1 分間隔で継続的に収集し、解析に用いた。試験 1 日目にカニクイザルに溶媒［0.5%（w/v）CMC］を経口投与し、6 日間のウォッシュアウト期間後に 1 群雌雄各 1 匹にオザニモドを 0.15、3 又は 10 mg/kg の用量で単回経口投与した。一般状態は、投与前、投与約 2 時間後及び心血管系モニタリング期間終了後（投与約 48 時間後）に遠隔カメラを用いて観察した。体重は各投与の前日に測定して記録した。ECG パラメータは、RR 間隔、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc 間隔について解析した。QTc 間隔は、心拍数及び QT 間隔実測値を用いて、既報の方法に基づいて算出した[21,22]。

試験終了時まで全例が生存し、一般状態及び体温にオザニモドに関連した変化は認められなかった。3 及び 10 mg/kg のオザニモドを投与した雌では、投与 1.5 時間以内に収縮期及び拡張期血圧の軽度の低下（概してベースライン値から 15%未満の変化）が認められた。また、3 及び 10 mg/kg 投与後 3.5 時間以内に主に雌で心拍数の軽度な減少が認められた。体重は試験期間を通じて特記すべき変化は認められなかった。

試験期間中、PR 間隔を除き、いずれの ECG パラメータにも大きな変化は認められなかった。10 mg/kg 投与群のカニクイザルでは、PR 間隔の延長（雄で約 26%、雌で約 18%）が認められたことから、オザニモドに関連した心臓の房室結節を介する電流の伝導遅延が示唆された。なお、個々のカニクイザルの QT 間隔と RR 間隔の関係及び QTc 間隔と RR 間隔の関係の散布図解析では、データポイントは概して溶媒投与群の 95%信頼区間内にあった。全てのサルで洞調律又は洞性不整脈を認めたが、いずれも正常範囲内であった。また、ECG は全て定性的に正常範囲内であった。

以上の結果から、オザニモドを 0.15、3 及び 10 mg/kg の用量でカニクイザルに単回経口投与することにより、RR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc 間隔に影響は認められなかったが、10 mg/kg の用量では、PR 間隔の延長が認められたことから、オザニモドに関連した心臓の房室結節を介する電流の伝導遅延が示唆された。また、3 及び 10 mg/kg の用量では主に雌で軽度の血圧及び心拍数の低下が認められた。

4.1.2.2 カニクイザルを用いた心血管系パラメータ解析（GLP 適用）

本試験（試験番号 026002）では、雄性カニクイザルを用いて無麻酔下でオザニモドの心血管系に対する影響を検討した。テレメトリー装置を外科的に装着した雄性カニクイザル 4 匹に対し、動脈圧

Approved v2.0

カテーテルを大動脈に留置し、1 対の ECG 電極をリード II 配置で皮下に挿入した。各々のサルに溶媒［0.5%（w/v）CMC］及びオザニモド（0.15、3 及び 30 mg/kg）を、各投与の間に 7 日間の休薬期間をおいて経口投与を継続的に実施した。テレメトリー信号は、0、7、14 及び 21 日目の投与 1.5 時間以上前から投与約 24 時間後にわたって記録した。健康状態及び死亡の確認は 1 日 2 回以上実施し、一般状態については毎日観察した。全身状態の検査は毎週実施し、投与開始前及び全投与終了後には、直腸温の測定を含む詳細な診察を実施した。体重は−3、4、11、18、25 及び 31 日目に記録した。各テレメトリー記録日（0、7、14 及び 21 日目）の投与前及び投与 6 時間 30 分後に、血液学的検査のための採血を行った。30 mg/kg を投与したサルのみでトキシコキネティクス評価用の採血を 28 日目の投与前並びに投与 0.5、1、2、4、8、12、24 及び 48 時間後に採取した。

オザニモドを 0.15、3 又は 30 mg/kg の用量で経口投与したとき、試験期間を通して動物の一般状態、体重増加量及び体温に特記すべき変化は認められなかった。オザニモド 0.15 mg/kg の投与では、投与後 24 時間の拡張期、収縮期血圧及び心拍数に変化は認められなかった。一方、3 及び 30 mg/kg の投与では、オザニモドの投与 30 分後に拡張期血圧の軽度かつ一過性の低下が認められた。拡張期血圧の最大変化は、投与前値と比較した場合で 20%の低下であり、溶媒対照群と比較した場合で 18%の低下であった。3 及び 30 mg/kg での血圧変化は同程度であった。30 mg/kg の用量では、投与約 2 時間後から 24 時間後にかけて軽度かつ持続的な心拍数の減少が認められ、投与 4 時間後に最大となった。30 mg/kg 投与後の心拍数の最大変化は、投与前値と比較した場合で 29%の減少であり、溶媒対照群と比較した場合で 27%の減少であった。

オザニモドの 0.15 mg/kg 及び 3 mg/kg の投与では、用いた心拍数補正式にかかわらず、溶媒投与との比較で、投与 24 時間後の RR 間隔、QT 間隔及び QTc 間隔に変化は認められなかった。一方、30 mg/kg の投与では、RR 間隔、QT 間隔、QTc 間隔（Fridericia 式で補正）の軽度かつ持続的な延長が認められ、これに伴い心拍数の減少も認められた。一方、カニクイザルでの解析に広く用いられている Bazett の補正式[23]を用いて補正した QTc 間隔は、検討したいずれの用量でもオザニモド投与による影響を受けなかったことから、QT 間隔延長はオザニモドの心室再分極に対する内因性の有害作用ではなく、心拍数減少に関連している可能性が高いことが示唆された。QRS 間隔については 0.15、3 又は 30 mg/kg のいずれの用量でも変化は認められなかった。一方、PR 間隔については 3 及び 30 mg/kg の用量で、わずかながら統計学的有意な延長が認められた。この延長は、3 mg/kg 投与群では投与 1、2 及び 3 時間後に統計学的有意（$P \leq 0.05$、one-way ANOVA 後の Dunnett 検定）であり、30 mg/kg 投与群では投与 1 時間後でのみ統計学的有意（$P \leq 0.01$、one-way ANOVA 後の Dunnett 検定）であった。PR 間隔の最大変化量は投与前値と比較して 10%の増加であり、3 及び 30 mg/kg での変化は同程度であった。不整脈は 30 mg/kg までの用量で認められなかった。

トキシコキネティクス評価用に採取した血液の解析から、オザニモドの AUC(0-24h)は 8530 ng•hr/mL であり、この曝露量はオザニモドの臨床曝露量（AUC(0-24h)の中央値：4776 pg•h/mL）の 1786 倍に相当した（試験番号 RPC01-1001）。

Approved v2.0

以上の結果から、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（約 10%の延長）及び拡張期血圧低下（約 20%の低下）に基づき、カニクイザルでの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。

4.2 呼吸系に関する試験

4.2.1 ラットを用いた呼吸機能解析（GLP 非適用）

本試験（試験番号 1275RR32.001）では、ラットを用いてオザニモドを単回及び反復経口投与した際の呼吸機能に対する影響を検討した。

雌雄 Sprague Dawley ラットを用い、溶媒［0.5%（w/v）CMC］又はオザニモド（0.1、2 及び 8 mg/kg）の QD での 5 日間経口投与による呼吸系パラメータへの影響を検討した。試験開始前日までに 2 回、ラットをヘッドアウトプレチスモグラフィー用チャンバーで 15 分間以上馴化させた。また、投与 1 日目及び 5 日目の投与前には各ラットをチャンバーに入れ約 5 分間馴化させた後に、5 秒ごとに 10 分間測定を行いベースライン値を算出した。その後、ラットをチャンバーから取り出して溶媒又はオザニモドを経口投与した。投与 1 日目及び 5 日目の投与後に再びラットをチャンバーに戻し、投与の 1、3、6、9 及び 24 時間後に呼吸系パラメータ（VT、VE 及び FR）を測定し、オザニモド投与群の測定値を溶媒対照群及びベースライン値と比較した。5 日目の投与 24 時間後の呼吸系パラメータ測定後にラットを CO_2 で吸入麻酔し、血液学的検査［全血算及び血球分画］用の血液を心穿刺により採取した。採血後、ラットを安楽死させ、肺を摘出して重量を測定した。

オザニモド（0.1、2 及び 8 mg/kg）の投与 1 日目及び 5 日目のいずれにおいても、溶媒対照群と比較して VT、VE 及び FR に統計学的有意な変化は認められなかった。

血液学的検査では、オザニモドを 2 及び 8 mg/kg の用量で投与したときに、$S1P_1$ 受容体を介する薬理作用と一致する白血球、リンパ球及び好塩基球の減少並びに単球（8 mg/kg のみ）及び好中球の割合の増加が認められた。なお、単球及び好中球の絶対数は溶媒対照群とオザニモド投与群で同様であった。オザニモドの 2 及び 8 mg/kg 投与群では溶媒対照群と比較して肺重量の増加傾向が認められたが、統計学的有意な差ではなかった。

4.2.2 ラットを用いた呼吸機能解析（GLP 適用）

本試験（試験番号 026003）では、雄性 Sprague Dawley ラットに溶媒［0.5%（w/v）CMC］又はオザニモド（0.2、2 及び 30 mg/kg）を 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。また、別群のラットを用い、酸素供給に対する影響を動脈血液ガス分析により検討した。

プレチスモグラフィー評価を実施した各日（初回及び最終投与日）の投与前にラットをプレチスモグラフィー用チャンバーで 30 分間以上馴化させた後、動物の呼吸系パラメータ変化をさらに 30 分間以上記録し、ベースライン値とした。その後、チャンバーを再び開いてラットに溶媒又はオザニ

Approved v2.0

モドを経口投与した。各日投与後に再びラットをチャンバーに戻し、0～6 時間のプレチスモグラフィーセッションを継続して実施した。投与後 12 及び 24 時間のプレチスモグラフィーセッションでは、各ラットをチャンバーに入れてから 30 分間以上馴化させた後に測定を実施した。測定した呼吸系パラメータは、呼吸速度（f）、吸気時間（Ti）、呼気時間（Te）、緩和時間（RT）、VT、VE、最大吸気流量（MIF）、ピークフロー値（PEF）及び気道収縮指標｛Penh、［（Te/RT）−1］×（PEF/MIF）｝であった。24 時間のプレチスモグラフィーセッション終了後に安楽死させて肺組織を採取した。

血液ガス評価用のラットには、動脈カテーテルを外科的に留置した。1 回目の測定では、溶媒又はオザニモドの 1 回目投与前（ベースライン値）及び投与 1 時間後並びに 6 時間後に血液ガスを評価した。2 回目の測定では、オザニモドを 6 日間又は 7 日間連続投与した投与最終日に同様の方法で血液ガスを評価した。各回の投与前及び投与 1 時間後並びに 6 時間後に、大動脈留置カテーテル又は心臓内穿刺（カテーテルによる採血が不可能な場合）により血液を採取し、全ての動物は最後の採血が終了した後に安楽死させた。

呼吸系パラメータの解析から、オザニモドを 30 mg/kg で投与した場合にのみベースライン値との比較で FR の軽度かつ進行性の増加が認められ、投与 12 及び 24 時間後に最大となった。これらの時点では、VT の有意ではない軽度な減少が認められたが、VE は変化しなかった。他の呼吸系パラメータ（MIF、PEF 及び 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。

以上の結果から、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 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（【M2.6.6、3.1 項】参照）。この NOEL（0.2 mg/kg/day）は、臨床曝露マージンとしてオザニモドで 10.4 倍、RP101124 で 17.7 倍、CC112273 で 0.03 倍、CC1084037 で 0.01 倍未満に相当した（【M2.6.4、3.2.1.2 項】、【M2.6.6、3.1.4 項】、【M2.7.2、3.5.1 項】、試験番号 RPC01-1001 及び試験番号 RPC01-1914 参照）。

Approved v2.0

4.3 中枢神経系に関する試験

4.3.1 ラットにおけるオザニモド投与による機能観察総合評価及び運動機能評価（GLP 適用）

本試験（【M2.6.6、3.2.2 項】及び試験番号 026004-1 参照）では、ラットの機能観察総合評価（FOB）及び運動機能評価によりオザニモドの中枢神経系に対する影響を検討した。

雌雄の Sprague Dawley ラットを用い、溶媒［0.5%（w/v）CMC］又はオザニモド（0.2、2 及び 30 mg/kg）を 28 日間反復経口投与した。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。FOB の盲検性を担保するため、投与前に動物を無作為化した。FOB では、ホームケージ及びオープンフィールド内での観察、ハンドリングによる評価を実施した。

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。この NOEL（30 mg/kg/day）は、臨床曝露マージンとしてオザニモドで 2547 倍、RP101124 で 4179 倍、CC112273 で 9.7 倍、CC1084037 で 2.0 倍に相当した（【M2.6.4、3.2.1.2 項】、【M2.6.6、3.2.2 項】、【M2.7.2、3.5.1 項】、試験番号 RPC01-1001 及び試験番号 RPC01-1914 参照）。

5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

6 考察及び結論

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（【M2.7.2、1.2.1.3 項】及び【M2.6.4、3.2 項】参照）。オザニモドとその主要活性代謝物 CC112273 及び CC1084037 の活性を中心に、複数の薬理試験で評価した。

In vitro 薬理試験では、オザニモド及びその活性代謝物は、ヒト及びサルの $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体に対して同程度の作動活性及び選択性を示した。オザニモド及びその活性代謝物のマウス、ラットでの $S1P_1$ 受容体に対する作動活性は、ヒト $S1P_1$ 受容体に対する作動活性と同程度であり、また、ヒト及びサルと同様に $S1P_2$、$S1P_3$ 及び $S1P_4$ 受容体と比較し、$S1P_1$ 受容体への選択性は保たれていた。一方、マウス及びラットの $S1P_5$ 受容体に対する作動活性はヒト及びサルの $S1P_5$ 受容体よりも弱く、これは受容体の化合物結合部位のアミノ酸配列が動物種間で異なるためと考えられる。放射性リガンド結合試験により、オザニモドと全ての活性代謝物は、内因性リガンドである S1P のヒト $S1P_1$ 及び $S1P_5$ 受容体の結合部位と同じオルソステリック結合部位で競合することが示された。In vitro の S1P 受容体内在化評価の結果から、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

Approved v2.0

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。オザニモド及びヒトでの主要代謝物である CC112273 は、いずれも強力な S1P 受容体作動活性を示し、S1P 受容体を発現していることが知られているマウス、ラット及びヒトの初代培養アストロサイトにおいて ERK 及び AKT の活性化を誘導した。本試験系において、オザニモドの作用に寄与する S1P 受容体は主に $S1P_1$ 受容体であることが確認され、$S1P_5$ 受容体の寄与は認められなかった。

2 種類のげっ歯類大腸炎モデル（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）を用いた in vivo 薬理試験では、いずれのモデルにおいてもオザニモドの有効性が示された。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。非臨床薬理試験及び毒性試験に用いたげっ歯類（マウス及びラット）及び非げっ歯類（イヌ及びサル）にオザニモドを経口投与したところ、循環血中リンパ球数が用量依存的に減少したことから、各動物種に共通した $S1P_1$ 受容体を介する薬理作用が寄与していることが裏付けられた。

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、標的外相互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。また、$S1P_1$ 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 EAE モデルを用いて、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検討した。オザニモドは疾患スコアを統計学的有意に改善し、PD マーカーである循環血中リンパ球数についても減少作用を示した。EAE モデルでの有効性及び循環血中リンパ球数の減少は、活性代謝物 RP101075、RP101442、RP101988 及び CC112273 を投与した場合でも認められ、いずれの化合物も PK と $S1P_1$ 受容体を介する PD 作用との間の明らかな関連性を示した。さらに、循環血中リンパ球数の減少が認められた条件で、オザニモドはクプリゾン及びラパマイシンによる脱髄誘発に対して神経保護作用を示した。セロトニン作動性モデルマウスにおいては、オザニモドが 5-HTP 誘発性セロトニン症候群の症状を悪化させることはなく、また、内因性セロトニンのみを有する正常マウスでもセロトニン症候群の症状は発現しなかった。

安全性薬理試験では、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。さらに、反復投与毒性試験に使用した動物種（ラット及びサル）を用いて心血管系、呼吸系及び中枢神経系の in vivo 評価を実施した。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 までの用量で投与したところ、軽微かつ一過性の PR 間隔延長（約 10%の延長）及び拡張期血圧低下（約 20%の低下）が認められた。心拍数はオザニモドを 30 mg/kg で投与した 4 時間後に最大で 29%減少した。無麻酔のサルを用いた心血管系の評価では、オザニモドの NOEL は 0.15 mg/kg と判断した。プレチスモグラフィーを用いた呼吸機能評価では、検討した最高用量の 30 mg/kg/day で、FR の軽微な増加及び VT の減少が認められたのみで、VE に変化は認められなかっ

Approved v2.0

た。一方、肺重量の増加（反復投与毒性試験でも同様の所見）が認められたため、NOEL は 0.2 mg/kg/day と判断した。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なかった。ラットの行動に及ぼす影響を検討した FOB 試験では、オザニモドを 30 mg/kg までの用量で投与しても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。

以上より、オザニモドは、$S1P_1$ 受容体への作動作用により細胞表面の $S1P_1$ 受容体を内在化させることで機能的な $S1P_1$ 受容体拮抗薬として作用し、循環血中のリンパ球数を減少させることにより、自己免疫疾患である UC に対して有効性を示す新たな治療薬となることが期待される。

Approved v2.0

7 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 Jo E, Sanna MG, Gonzalez-Cabrera PJ, et al. S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. Chem Biol 2005;12:703-15.

Approved v2.0

[14] Choi JW, Gardell SE, Herr DR, et al. FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:751-6.

[15] Groves A, Kihara Y, Jonnalagadda D, et al. A functionally defined in vivo astrocyte population identified by c-fos activation in a mouse model of multiple sclerosis modulated by S1P signaling: Immediate-early astrocytes (ieAstrocytes). eNeuro 2018;5:2-13.

[16] Bigaud M, Tisserand S, Fuchs-Loesle P, et al. The S1P5 receptor is not down-modulated in response to selective agonists. 34th Congress of the European Committee for the Treatment and Research in Multiple Sclerosis. ECTRIMS Online Library 2018: Electronic Poster# EP1617.

[17] Hobson AD, Harris CM, Van Der Kam EL, et al. Discovery of A-971432, an orally bioavailable selective sphingosine-1-phosphate receptor 5 (S1P5) agonist for the potential treatment of neurodegenerative disorders. J Med Chem 2015;58:9154-70.

[18] Arunlakshana O, Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. Br J Pharmacol Chemother 1959;14:48-58.

[19] Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 2015;1:154-70.

[20] Scott FL, Clemons B, Brooks J, et al. Ozanimod (RPC1063) is a potent sphingosine-1-phosphate receptor-1 (S1P1) and receptor-5 (S1P5) agonist with autoimmune-disease modifying activity. Br J Pharmacol 2016;173:1778-92.

[21] Spence S, Soper K, Hoe CM, et al. The heart rate-corrected QT interval of conscious beagle dogs: a formula based on analysis of covariance. Toxicol Sci 1998;45:247-58.

[22] Miyazaki H, Tagawa M. Rate-correction technique for QT interval in long-term telemetry ECG recording in beagle dogs. Exp Anim 2002;51:465-75.

[23] Soloviev MV, Hamlin RL, Barrett RM, et al. Different species require different correction factors for the QT interval. Cardiovasc Toxicol 2006;6:145-57.

Table of Contents

1 薬理試験：一覧表 2
2 効力を裏付ける試験 11
3 副次的薬理試験 25
4 安全性薬理試験 30
5 薬力学的薬物相互作用試験 34

Approved v1.0

1 薬理試験：一覧表

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Primary Pharmacodynamics: In Vitro					
Potency/Selectivity for Human $S1P_{1-5}$; Ozanimod, RP101075, RP101442, RP101988, RP101124	CHO cells, HEK293T cells and U2OS cells	In vitro: Incubation	Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-001-3.0	M4.2.1.1-1
Potency/Selectivity for Human $S1P_{1-5}$; Ozanimod, RP101075, RP101442, RP101988, CC112273, RP101124	CHO cells, HEK293T cells and U2OS cells	In vitro: Incubation	Celgene-Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-002-1.0	M4.2.1.1-2
Potency/Selectivity for Human, Mouse, and Rat $S1P_{1-5}$; Ozanimod, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273, RP112509, CC1084037, RP101124	CHO cells overexpressing $S1P_{1-5}$ for human and mouse, $S1P_{1-4}$ for rat	In vitro: Incubation	Celgene, San Diego, CA, USA	RP-PH-010	M4.2.1.1-3

Approved v1.0

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Potency/Selectivity of Ozanimod and Metabolites at Cynomolgus Monkey $S1P_{1-5}$ and Rat $S1P_5$; Ozanimod, CC112273, CC1084037, RP101124, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, RP112509	CHO cells expressing recombinant cynomolgus $S1P_{1-5}$ and rat $S1P_5$	In vitro: Incubation	Celgene, San Diego, CA, USA	RP-PH-019	M4.2.1.1-4
Potency/Selectivity for Human $S1P_{1-5}$; Ozanimod, Racemic RP100798 (CC1084037), and Enantiomers RP100812 and RP100813	CHO cells expressing recombinant human $S1P_{1-5}$	In vitro: Incubation	Celgene, San Diego, CA, USA	RP-PH-014	M4.2.1.1-5
Radioligand Binding Affinity Assessment for Human $S1P_1$ and $S1P_5$; Ozanimod, CC112273, CC1084037, RP101124, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, RP112509	Membranes from CHO cells expressing recombinant human $S1P_1$ and $S1P_5$ Radioligand competition binding with [^{3}H]ozanimod	In vitro: Incubation	Celgene, San Diego, CA, USA	RP-PH-018	M4.2.1.1-6
Comparison of $S1P_1$ Internalization; Ozanimod, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, RP101124 CC112273, RP112509, CC1084037	HEK293 cells	In vitro: Incubation	Celgene, San Diego, CA, USA	RP-PH-013	M4.2.1.1-7

Approved v1.0

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Comparison of $S1P_1$ and $S1P_5$ Internalization; Ozanimod, RP101075, RP101442, RP101988, CC112273, RP101124	CHO cells and HEK293 cells	In vitro: Incubation	Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-003-1.0	M4.2.1.1-8
Pharmacology in Rat Cortical Astrocytes; Ozanimod, RP101988, CC112273	Primary rat cortical astrocyte cultures	In vitro: Incubation	Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-004-1.0	M4.2.1.1-9
Pharmacology in Human and Mouse Cortical Astrocytes; Ozanimod, RP101988, CC112273	Primary human and mouse cortical astrocyte cultures	In vitro: Incubation	Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-009-1.0	M4.2.1.1-10
Pharmacology in Human Cortical Astrocytes; Ozanimod, RP101988, CC112273	Primary human cortical astrocyte cultures	In vitro: Incubation	Celgene, Summit, NJ, USA	RP-PH-12	M4.2.1.1-11
Pharmacological Characterization in Mouse Cortical Astrocytes; Ozanimod, CC112273	Primary mouse cortical astrocyte cultures	In vitro: Incubation	Celgene, San Diego, CA, USA	RP-PH-011	M4.2.1.1-12
Primary Pharmacodynamics: In Vivo					
Efficacy in the $CD4^+$ Adoptive Transfer Model of Colitis in SCID Mice; Ozanimod	Mouse/Fox Chase C.B-17 SCID	In vivo: PO, QD	[redacted], USA	MCD4/RPT-1	M4.2.1.1-13

Approved v1.0

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Efficacy in the $CD4^+$ Adoptive Transfer Model of Colitis in SCID Mice; Ozanimod	Mouse/Fox Chase C.B-17 SCID	In vivo: PO, QD	[redacted], USA	MCD4/RPT-3	M4.2.1.1-14
Efficacy in the $CD4^+$ Adoptive Transfer Model of Colitis in SCID Mice; Ozanimod	Mouse/Fox Chase C.B-17 SCID	In vivo: PO, QD	[redacted], USA	MCD4/RPT-4	M4.2.1.1-15
Efficacy in the TNBS Model of Colitis; Ozanimod	Rat/Sprague Dawley	In vivo: PO, QD	[redacted], USA	IBD-RPI-10	M4.2.1.1-16
Efficacy in the TNBS Model of Colitis; Ozanimod	Rat/Sprague Dawley	In vivo: PO, QD	[redacted], USA	IBD-RPI-11	M4.2.1.1-17
PK/PD After Single Oral Administration in Mice and Rats; Ozanimod, RP101988	Mouse/C57BL/6, Rat/Sprague Dawley	In vivo: PO, single dose except for 0.2 mg/kg RP101988: IV, single dose	Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PK-016-1.0	M4.2.1.1-18
PK/PD Effects of Repeated Oral Dosing on Absolute Lymphocyte Counts in Normal Mice; CC112273	Mouse/C57BL/6NTac	In vivo: PO, QD×5	Celgene-Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-016	M4.2.1.1-19

Approved v1.0

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
PK/PD After Single Oral Administration on Absolute Lymphocyte Counts in Rats; Ozanimod, RP101075, RP101442, RP101988, CC112273	Rat/Sprague Dawley	In vivo: PO, single dose	[redacted], USA Celgene-Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-005-1.0	M4.2.1.1-20
PD Effects in the Mouse, Rat, Dog and Monkey; Ozanimod	Mouse/C57BL/6 Rat/Sprague Dawley Dog/Beagle Monkey/Cynomolgus	In vivo: PO, single dose or QD×5 (for rats)	Receptos, San Diego, CA, USA [redacted], Canada [redacted], USA	RP-PK-002-1.0	M4.2.1.1-21
Secondary Pharmacodynamics					
Off-target Binding; Ozanimod	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	In vitro: Incubation	[redacted], France	16603	M4.2.1.2-1
Serotonin Receptor and Uptake; Ozanimod	Human Serotonin Transporter	In vitro: Incubation	[redacted], Taiwan	CC-DISC-ET-2926	M4.2.1.2-2
Off-target Binding; CC112273	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	In vitro: Incubation	[redacted], France	100040667	M4.2.1.2-3

Approved v1.0

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Off-target Binding; CC1084037	80 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	In vitro: Incubation	[redacted] France	CC-DISC-ET-2889	M4.2.1.2-4
Off-target Binding and Functional Assay; CC1084037	Transfected CHO and HEK293 cells	In vitro: Incubation	[redacted], France	CC-DISC-ET-2911	M4.2.1.2-5
Off-target Binding; RP101075	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	In vitro: Incubation	[redacted], France	16829	M4.2.1.2-6
Off-target Binding; RP101442	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	In vitro: Incubation	[redacted], France	17638	M4.2.1.2-7
Off-target Binding; RP101988, RP101124	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	In vitro: Incubation	[redacted], France	100032946	M4.2.1.2-8
Efficacy in the EAE Model; Ozanimod, RP101075	Mouse/C57BL/6	In vivo: PO, QD×14	[redacted], USA	20091001-1d	M4.2.1.2-9
Efficacy in the EAE Model; RP101442	Mouse/C57BL/6	In vivo: PO, QD×14	[redacted], USA	20091203-2b	M4.2.1.2-10

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Efficacy in the EAE Model; CC112273, RP101988	Mouse/C57BL/6J	In vivo: PO, QD×14	[redacted], USA Celgene-Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-006-1.0	M4.2.1.2-11
Assessment of Neuroprotection and Remyelination in the Cuprizone Model of Demyelination; Ozanimod	Mouse/C57BL/6J	In vivo: PO, QD (6, 7, 9, 12, or 18 weeks)	Celgene-Receptos, San Diego, CA, USA [redacted], USA	RP-PH-015	M4.2.1.2-12
Assessment of Repeated Oral Dosing in a Model of Serotonin Syndrome; Ozanimod, CC112273	Mouse/C57BL/6NTac	In vivo: PO, QD×5	[redacted], USA Celgene-Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-008-1.0	M4.2.1.2-13
Assessment of Repeated Oral Dosing and Washout on Locomotor Activity; Ozanimod, CC112273	Mouse/C57BL/6NTac	In vivo: PO, QD×5	[redacted], USA Celgene-Receptos, San Diego, CA, USA	RP-PH-017	M4.2.1.2-14
Safety Pharmacology					
Cardiovascular-hERG; Ozanimod	Transfected CHO cells	In vitro	[redacted], USA	062-0001	M4.2.1.3-1

Approved v1.0

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Cardiovascular-hERG; RP101075	Transfected CHO cells	In vitro	[redacted], USA	062-0003, 062-0008	M4.2.1.3-2, M4.2.1.3-3
Cardiovascular-hERG; RP101442	Transfected CHO cells	In vitro	[redacted], USA	062-0013	M4.2.1.3-4
Cardiovascular-hERG; RP101988, RP101124	Transfected CHO cells	In vitro	[redacted], USA	077-0012	M4.2.1.3-5
Cardiovascular-hERG; Ozanimod	Transfected HEK cells	In vitro	[redacted], USA	100503.SJD	M4.2.1.3-6
Cardiovascular-hERG; CC112273	Transfected HEK cells	In vitro	[redacted], USA	170602.SFD	M4.2.1.3-7
Cardiovascular-hERG; CC112273	Transfected HEK cells	In vitro	[redacted], USA	170531.SFD	M4.2.1.3-8
Cardiovascular-hERG; CC1084037	Transfected HEK cells	In vitro	[redacted], USA	CC-DISC-ET-2880	M4.2.1.3-9
Cardiovascular-Telemetry; Ozanimod	Monkey/Cynomolgus	In vivo: PO, single dose	[redacted], USA	1840-002	M4.2.1.3-10

Approved v1.0

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Articles: Ozanimod (RPC1063[a]) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273 [RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Cardiovascular-Telemetry; Ozanimod	Monkey/Cynomolgus	In vivo: PO, QW	[redacted] France	026002	M4.2.1.3-11
Respiratory; Ozanimod	Rat/Sprague Dawley	In vivo: PO, QD×5	[redacted], USA	1275RR32.001	M4.2.1.3-12
Respiratory; Ozanimod	Rat/Sprague Dawley	In vivo: PO, QD×7	[redacted] France	026003	M4.2.1.3-13

[a] Ozanimod, a free base, has been referred to as CC9101063 or 1063 in some nonclinical studies.

$CD4^+$ = cluster of differentiation 4 positive; CHO = chinese hamster ovary; CNS = central nervous system; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; GTPγS = guanosine 5'-O-(γ-thio)triphosphate; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go–related gene; IV = intravenous; PD = pharmacodynamics; PK = pharmacokinetics; PO = oral; QD = once daily; QW = once weekly; $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$, and $S1P_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1, 2, 3, 4, and 5, respectively; SCID = severe combined immunodeficiency; TNBS = 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid.

Approved v1.0

2 効力を裏付ける試験

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
In Vitro						
Potency/Selectivity for Human $S1P_{1-5}$	CHO cells, HEK293T cells and U2OS cells	NA	In vitro: Incubation	0.0004 nM to 100 nM (10 point dose response curve) Ozanimod, RP101075, RP101988, RP101442, RP101124 2 to 5 hours	Ozanimod was a potent $S1P_1$ agonist with an EC50 = 0.150 nM (cAMP/β-lactamase signaling) and 0.44 nM (GTPγS binding). Also, Ozanimod was active on the $S1P_5$ by GTPγS binding (EC50 = 11.11 nM). Ozanimod had little activity on the $S1P_{2-4}$ (> 20000-fold selectivity). RP101075 and RP101442 showed a similar potency and selectivity profile to ozanimod. RP101988 was approximately 9-fold more potent towards $S1P_1$ on cAMP/β-lactamase compared with ozanimod. RP101124 was not active at any of the evaluated receptors.	RP-PH-001-3.0

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Potency/Selectivity for Human $S1P_{1-5}$	CHO cells, HEK293T cells and U2OS cells	NA	In vitro: Incubation	For GTPγS binding: 10 point serial half log dilution with top concentration of 300 nM to 10 µM For β-lactamase activity: 10 point serial 1:4 dilution with top concentration of 100 nM to 10 µM Ozanimod, CC112273, RP101988, RP101075, RP101442, RP101124 70 minutes to 5 hours	Ozanimod $S1P_1$ EC50 = 1.16 ± 0.14 nM and 0.6 ± 0.07 nM ($[^{35}S]$GTPγS binding and β-lactamase activity, respectively). Ozanimod $S1P_5$ EC50 = 5.14 ± 0.20 nM and 14.98 ± 5.33 nM ($[^{35}S]$GTPγS binding and β-lactamase activity, respectively). Ozanimod was weak/inactive at the other S1P, showing greater than 1000-fold selectivity for $S1P_1$ over $S1P_2$, $S1P_3$, and $S1P_4$ using both $[^{35}S]$GTPγS binding and β-lactamase activity assays, and greater than 100-fold selectivity for $S1P_5$ over $S1P_2$, $S1P_3$, and $S1P_4$ using both assays. Metabolites RP101075, RP101442, RP101988, and CC112273 demonstrated a similar selectivity profile to ozanimod for $S1P_1$ and $S1P_5$, while RP101124 was inactive across $S1P_{1-5}$.	RP-PH-002-1.0

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Potency/Selectivity for Human, Mouse, and Rat $S1P_{1-5}$	CHO cells over-expressing $S1P_{1-5}$ for human and mouse, and $S1P_{1-4}$ for rat	NA	In vitro: Incubation	0.0015 nM to 30 nM for most potent; 0.51 nM to 10000 nM for least potent. Ozanimod, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273, RP112509, CC1084037, RP101124 70 minutes	All compounds (except inactive metabolite RP101124) were potent agonists for $S1P_1$ and $S1P_5$ with demonstrated selectivity over $S1P_2$, $S1P_3$ and $S1P_4$ for human, mouse, and rat ($[^{35}S]GTP\gamma S$ binding). Rat $S1P_5$ was not able to be cloned and therefore not evaluated.	RP-PH-010

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Potency and Selectivity of Ozanimod and Metabolites at Cynomolgus Monkey $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$, $S1P_5$ and Rat $S1P_5$	Membranes from CHO cells expressing recombinant cynomolgus $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$ and $S1P_5$ Membranes from CHO cells expressing recombinant rat $S1P_5$	NA	In vitro: Incubation	Concentrations tested at cynomolgus $S1P_{1-5}$: 10-point, 1:3 serial dilutions with the highest concentration of 30 nM to 10 µM Concentration tested at rat $S1P_5$: 10-point, 1:3 serial dilutions with the highest concentration of 10 µM. Ozanimod, CC112273, CC1084037, RP101124, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, RP112509 70 minutes	Similar $S1P_1$ potency for ozanimod and metabolites at mouse, rat, cynomolgus and human. Activity at mouse and rat $S1P_5$ was right-shifted and lower than monkey and human. Ozanimod and active metabolites shared a similar activity profile in the cynomolgus monkey with potent agonism at $S1P_1$ and $S1P_5$ and selectivity against $S1P_2$, $S1P_3$ and $S1P_4$. The finding that ozanimod and its metabolites shared consistent activity at human and cynomolgus monkey $S1P_{1-5}$ is supportive of the cynomolgus monkey in toxicology assessments.	RP-PH-019

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Potency/Selectivity for Human $S1P_{1-5}$	CHO cells expressing recombinant human $S1P_1$-$S1P_5$	NA	In vitro: Incubation	0.015 nM to 300 nM for most potent to 0.51 nM to 10000 nM for least potent Ozanimod, RP100798 (CC1084037, racemate) Individual enantiomers RP100812, RP100813 70 minutes	Racemate RP100798 and individual enantiomers RP100812 and RP100813 displayed a similar in vitro pharmacological profile to the parent molecule, ozanimod, demonstrating selectivity for $S1P_1$ and $S1P_5$. The individual enantiomers displayed similar potency and intrinsic activity to the racemate.	RP-PH-014

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Radioligand Binding Affinity of Ozanimod and Metabolites for Human $S1P_1$ and $S1P_5$	Membranes from CHO cells expressing recombinant human$S1P_1$ and $S1P_5$	NA	In vitro: Incubation	0.1325 nM to 40 nM for [^{3}H]ozanimod saturation analysis of human $S1P_1$ and $S1P_5$ [^{3}H]ozanimod: 3 nM for $S1P_1$ and 5 nM for $S1P_5$ for competitive binding analysis 1:3 serial dilutions with the highest concentration of 0.3 µM to 10 µM for $S1P_1$ and 1 µM to 10 µM for $S1P_5$ for Ki determination Ozanimod, CC112273, CC1084037, RP101124, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, RP112509 60 minutes	Ozanimod and active metabolites CC112273, CC1084037, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, and RP112509 competed with [^{3}H]ozanimod to bind to human $S1P_1$ and $S1P_5$. RP101124 (functionally inactive metabolite) did not compete with [^{3}H]ozanimod binding to human $S1P_1$ or $S1P_5$, suggestive that it neither physically binds to the receptors nor elicits a functional response. Ozanimod and its metabolites competed for the same binding site. Ozanimod and its metabolites bound to the orthosteric binding site of S1P, the endogenous agonist.	RP-PH-018

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Comparison of $S1P_1$ Internalization	HEK293 cells	NA	In vitro: Incubation	7-point 1:5 serial dilution starting at 1 μM, 200 nM, or 40 nM based on compound potency Ozanimod, RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273, RP112509, CC1084037, RP101124 1, 3, 6, or 24 hours	Robust concentration-dependent internalization of $S1P_1$ at all time points for all compounds (except inactive metabolite RP101124) with a trend towards increased potency with longer duration of test compound exposure.	RP-PH-013
Comparison of $S1P_1$ and $S1P_5$ Internalization	CHO cells and HEK293 cells	NA	In vitro: Incubation	$S1P_1$: 0.64 nM to 10000 nM $S1P_5$: 1000 nM (Ozanimod only) Ozanimod, RP101075, RP101442, RP101988, CC112273, RP101124 60 minutes	Ozanimod and metabolites RP101075, RP101442, RP101988, and CC112273 caused robust loss of $S1P_1$ from the plasma membrane following 60 minutes of incubation (EC50 = 84, 94, 76, 59, and 272 nM, respectively) which persisted up to 24 hours (EC50 = 8, 5, 47, 13, and 13 nM, respectively). RP101124 did not trigger $S1P_1$ internalization. Ozanimod treatment assessed after 1 hour or 24 hours after the 1 hour treatment of cells overexpressing $S1P_5$ did not induce $S1P_5$ internalization.	RP-PH-003-1.0

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Pharmacology in Rat Cortical Astrocytes	Primary rat cortical astrocytes cultures	NA	In vitro: Incubation	Ozanimod: 0.046 nM to 100 nM; RP101988 and CC112273: 0.005 nM to 10 nM 10 minutes	Ozanimod and the metabolites RP101988 and CC112273 were potent activators of AKT phosphorylation (EC50 = 2.03 ± 0.62, 0.23 ± 0.08, and 0.66 ± 0.18 nM, respectively) and ERK phosphorylation (EC50 = 0.80 ± 0.30, 0.11 ± 0.06, and 0.29 ± 0.15 nM, respectively) signaling pathways in primary rat cortical astrocytes.	RP-PH-004-1.0
Pharmacology in Human and Mouse Cortical Astrocytes	Primary human and mouse cortical astrocyte cultures	NA	In vitro: Incubation	0.0046 nM to 90 nM Ozanimod, RP101988, CC112273 10 minutes	Ozanimod and the metabolites RP101988 and CC112273 were potent activators of AKT phosphorylation (EC50 = 0.90 ± 0.43, 0.13 ± 0.06, and 0.49 ± 0.22 nM, respectively) and ERK phosphorylation (EC50 = 2.42 ± 1.30, 0.23 ± 0.05, and 0.87 ± 0.34 nM, respectively) signaling pathways in primary mouse cortical astrocytes. Ozanimod and the metabolites RP101988 and CC112273 were potent activators of the ERK phosphorylation responses (EC50 = 1.93 ± 0.66, 0.50 ± 0.15, and 2.12 ± 0.84 nM, respectively) signaling pathways in primary human cortical astrocytes. Potencies were similar for ozanimod and the metabolites between mouse and human, demonstrating consistent activity across both species.	RP-PH-009-1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Pharmacology in Human Cortical Astrocytes	Primary human cortical astrocyte cultures	NA	In vitro: Incubation	0.0038 nM to 1000 nM Ozanimod, RP101988, CC112273 10 minutes	Ozanimod, RP101988, and CC112273 activated AKT phosphorylation signaling pathways (EC50 = 1.48 ± 0.19, 0.14 ± 0.03, and 0.42 ± 0.05 nM, respectively) in primary human cortical astrocytes.	RP-PH-12
Pharmacological Characterization in Mouse Cortical Astrocytes	Primary mouse cortical astrocytes cultures	NA	In vitro: Incubation	0.015 nM to 3000 nM Ozanimod, CC112273 10 minutes	Ozanimod and CC112273 elicited phosphorylation of ERK (EC50 = 2.39 ± 0.96 and 7.34 ± 2.56 nM, respectively) and AKT (EC50 = 1.02 ± 0.47 and 0.58 ± 0.06 nM, respectively) whereas $S1P_5$ agonism did not. A selective $S1P_1$ antagonist shifted the ozanimod-mediated AKT phosphorylation response curve to the right. These data suggested the ERK and AKT phosphorylation responses are $S1P_1$, not $S1P_5$, mediated.	RP-PH-011
In Vivo						
Efficacy in the $CD4^+$ Adoptive Transfer Model of Colitis in SCID Mice	Mouse/Fox Chase C.B-17 SCID	Female n = 10/group (n = 4 normal control)	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 1.2 mg/kg) 21 days	Improved body weight, colon weight (74%) and density (71%) Reduced colon edema (77%), inflammation (57%), gland loss (79%), hyperplasia (81%), neutrophil score (81%), mucosal thickness (75%), summed histopathology score (70%) Efficacy associated with reduced ALC (41%); 24 hours post dose	MCD4/RPT-1

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
					Comparable results to cyclosporine A, anti-TNF Ab positive controls	
Efficacy in the $CD4^+$ Adoptive Transfer Model of Colitis in SCID Mice	Mouse/Fox Chase C.B-17 SCID	Female n = 10/group (n = 4 normal control)	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 0.3, 0.6, 1.2 mg/kg) 21 days	Reduced colon density (1.2 mg/kg: 40%) Improved distal colon erosion (all doses: 80-90%) Reduced mucosal thickness (0.3 and 1.2 mg/kg: 45-49%) Reduced levels of multiple colon cytokines	MCD4/RPT-3
Efficacy in the $CD4^+$ Adoptive Transfer Model of Colitis in SCID Mice	Mouse/Fox Chase C.B-17 SCID	Female n = 10/group (n = 5 normal control)	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 1.2 mg/kg) 28 days	The positive control, cyclosporine A did not significantly affect clinical or histopathological parameters. RPC1063 was without significant effect on clinical or histopathological parameters. The positive control's lack of effect classifies this as a failed study.	MCD4/RPT-4
Efficacy in the Rat TNBS Model of Colitis	Rat/Sprague Dawley	Male n=8/group	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 0.1, 0.3, 1 mg/kg) 7 days	Improved body weight (Day 5-7) and animal health/behavior 1 mg/kg Reduced total colonic score 1 mg/kg: 54% Improved colon density (0.3, 1 mg/kg: ≤ 70%)	IBD-RPI-10
Efficacy in the Rat TNBS Model of Colitis	Rat/Sprague Dawley	Male n=8/group	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 1 mg/kg) 7 days	Improved body weight (Day 1 - 4, 6) and animal health/behavior Improved colon length and weight (≤ 66%) Reduced total colonic score (50%) confirming results from IBD-RPI-10 Returned to normal bowel function by Day 3	IBD-RPI-11

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
PK/PD After Single Oral Administration in Mice and Rats	Mouse/C57BL/6	Female n = not specified	In vivo: PO, single dose	Ozanimod (0, 0.5, 2 mg/kg), RP101988 (0, 2, 6, 20 mg/kg) Assessed up to 24 hours post dose	Ozanimod and RP101988 caused transient, dose-related and reversible reduction of lymphocyte counts. The absolute oral bioavailability of RP101988 was less than 1% in rats and thus, higher doses were required (10 mg/kg RP101988) to reduce circulating lymphocytes comparably to ozanimod (0.6 mg/kg), which has ~60% oral bioavailability in rats. Observations were similar in mice with 20 mg/kg RP101988 required to approximate the effect of a single 0.5 mg/kg dose of ozanimod.	RP-PK-016-1.0
	Rat/Sprague Dawley	Female n = not specified	In vivo: PO, single dose for all groups except 0.2 mg/kg RP101988 (IV, single dose)	Ozanimod (0, 0.2, 0.6 mg/kg), RP101988 (0.2, 3, 10 mg/kg) Assessed up to 24 hours post dose		

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
PK/PD Effects of Repeated Oral Dosing on Absolute Lymphocyte Counts in Normal Mice	Mouse/C57BL/6N Tac	Male n = 5 or 6/time point	In vivo: PO, QD×5	CC112273 (0, 3 or 10 mg/kg) 5 days	The PK profile was dose-related with Cmax and AUC0-24h exposure values of 45 nM and 68 nM and 168 nM•hr and 400 nM•hr in mice dosed at 3 and 10 mg/kg, respectively. The PD effect was dose-related with up to a 72% (10 mg/kg) and 57% (3 mg/kg) decrease in circulating lymphocyte numbers at 12 and 8 hours post dose, respectively. The 10 mg/kg dose induced significantly greater lymphopenia compared to 3 mg/kg assessed 6 hours post final dose. Neither dose of CC112273 maintained statistically significant lymphopenia 24 hours post dose.	RP-PH-016

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
PK/PD After Single Oral Administration in Rats	Rat/Sprague Dawley	Male n = 5/group	In vivo: PO, single dose	Ozanimod (0.6 mg/kg), RP101075 (0.6 mg/kg), RP101442 (1 mg/kg), RP101988 (10 mg/kg), CC112273 (2 mg/kg) Assessed 3, 6, and 24 hours post dose	Single dose oral administration of ozanimod, RP101075, RP101442, RP101988 or CC112273 significantly reduced total circulating lymphocyte counts ($CD4^+$, $CD8^+$ and $B220^+$) by 52% to 89%. Maximum effect was observed by 6 hours post dose for ozanimod, RP101075 and RP101442 and maintained up to 24 hours for RP101075 and RP101442, but not for ozanimod. RP101988 and CC112273 were typically without significant effect at the 24-hour time-point. The plasma concentrations of total active drug (parent plus active metabolites) reflected both the duration of lymphocyte reduction and a sigmoidal PK/PD relationship.	RP-PH-005-1.0

Approved v1.0

Table 2.6.3.2: Primary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, RP112289, CC112273[RP112273], RP112509, CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Species/Strain	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
PD Effects in the Mouse, Rat, Dog and Monkey	Mouse/C57BL/6	Female n = 3/sampling time)	In vivo: PO, single dose	Ozanimod (0, 0.1, 0.3, 1 mg/kg) Assessed up to 24 hours post dose	In all species, single oral doses of ozanimod produced a marked and reversible decrease in circulating absolute lymphocyte counts. Decreased absolute lymphocyte counts correlated best with concentrations of total active drug in plasma (i.e, ozanimod + active metabolites [RP101075 + RP101442]). The average trough concentration of total active drug required to maintain 50% lymphopenia across species was estimated to be 4 nM.	RP-PK-002-1.0
	Rat/Sprague Dawley	Female n = 3 to 4/dose level	In vivo: PO, single dose or QD×5	Ozanimod (0, 0.1, 0.2, 0.3 mg/kg) Assessed up to 24 hours post final dose		
	Dog/Beagle	Male and Female n = 2 each	In vivo: PO, single dose	Ozanimod (1.5 mg/kg) Assessed up to 72 hours post dose		
	Monkey/Cynomolgus	Male and Female n = 2 to 4/dose level	In vivo: PO, single dose	Ozanimod (0.14, 0.15, 1.2, 10 mg/kg) Assessed up to 72 hours post dose		

Ab = antibody; AKT = protein kinase B; ALC = absolute lymphocyte count; AUC0-24h = area under the plasma concentration time curve from time 0 to 24 hours; $B220^+$ = B cell specific isoform of cluster of differentiation 45 positive; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; $CD4^+$ = cluster of differentiation 4 positive; $CD8^+$ = cluster of differentiation 8 positive; CHO = chinese hamster ovary; Cmax = maximum plasma concentration; EC50 = half-maximal response; ERK = extracellular signal-regulated kinase; GTPγS = guanosine 5'-O-(γ-thio)triphosphate; HEK = human embryonic kidney; hr = hours; IV = intravenous; Ki = inhibitory constant; NA = not applicable; PD = pharmacodynamics; PK = pharmacokinetics; PO = oral; QD = once daily; $S1P_1$, $S1P_2$, $S1P_3$, $S1P_4$, $S1P_5$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1, 2, 3, 4, and 5, respectively; SCID = severe combined immunodeficiency; TNBS = 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid; TNF = tumor necrosis factor.

3 副次的薬理試験

Table 2.6.3.3: Secondary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273[RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro Binding Assays (Off-target binding)	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	NA	In vitro: Incubation	Ozanimod (1 μM)	Ozanimod inhibited binding to 5 of 55 receptors by ≥ 40%, namely, histamine type 2 receptor, 5-HT2B, Na^+ channel, norepinephrine transporter, and 5-HT transporter.	16603
Serotonin Receptor and Uptake	Human Serotonin transporter	NA	In vitro: Incubation	Ozanimod (8-point, 1:3 serial dilutions with the highest concentration of 10 μM)	IC50 for 5-HT transporter = 3.66 μM IC50 for 5-HT uptake = 1.74 μM	CC-DISC-ET-2926
In vitro Binding Assays (Off-target binding)	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	NA	In vitro: Incubation	CC112273 (1 μM)	CC112273 had no nonspecific effects.	100040667
In vitro Binding Assays (Off-target binding)	80 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	NA	In vitro: Incubation	CC1084037 (10 μM)	CC1084037 inhibited binding > 50% at the following receptors or ion channels: human A3R, MT1, 5-HT2B, sigma, Cl^- channel GABA gated.	CC-DISC-ET-2889

Approved v1.0

Table 2.6.3.3: Secondary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273[RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
In vitro Binding and Functional Assays (Off-target)	CHO cells and HEK293 cells	NA	In vitro: Incubation	CC1084037 (8-point, 1:3 or 1:10 serial dilutions with the highest concentration of 30 μM or 100 μM)	CC1084037 had IC50 values of 300, 590, and 1500 nM (antagonist) at the A3R, 5-HT2B, and MT1 receptors	CC-DISC-ET-2911
In vitro Binding Assays (Off-target binding)	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	NA	In vitro: Incubation	RP101075 (1 μM)	RP101075 had no nonspecific effects.	16829
In vitro Binding Assays (Off-target binding)	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	NA	In vitro: Incubation	RP101442 (1 μM)	RP101442 had no nonspecific effects.	17638
In vitro Binding Assays (Off-target binding)	55 receptors, ion channels, and neurotransmitter transporters	NA	In vitro: Incubation	RP101988 (2 μM), RP101124 (3 μM)	RP101988 and RP101124 had no nonspecific effects.	100032946

Table 2.6.3.3: Secondary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273[RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Efficacy in the EAE Model of Multiple Sclero-sis	Mouse/C57BL/6	Female n = 10/group	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 0.2, 0.6 mg/kg), RP101075 (0, 0.05, 0.1, 0.3 mg/kg) 14 days	EAE disease scores at the end of the study were significantly reduced by the higher doses of RP101075 (0.1 and 0.3 mg/kg/day) and both doses of ozanimod (0.2 and 0.6 mg/kg) compared to vehicle control. RP101075 and ozanimod reduced absolute lymphocyte counts compared to vehicle control up to 45% and 51%, respectively.	20091001-1d
Efficacy in the EAE Model	Mouse/C57BL/6	Female n = 12/group	In vivo: PO, QD	RP101442 (0, 0.2, 0.4, 0.8 mg/kg) 14 days	EAE disease scores at the end of the study were significantly reduced by the 0.4 and 0.8 mg/kg doses of RP101442 compared to vehicle control. The 0.8 mg/kg dose of RP101442 reduced absolute lymphocyte counts compared to vehicle control by 69%.	20091203-2b
Efficacy in the EAE Model	Mouse/C57BL/6J	Female n = 9 to 12/group	In vivo: PO, QD	CC112273 (0, 2, 6, 10 mg/kg), RP101988 (0, 2, 6, 20 mg/kg) 14 days	CC112273 and RP101988 significantly improved EAE disease scores. Neither CC112273 nor RP101988 significantly decreased lymphocyte counts 24 hours after the last dose; however, the higher doses of RP101988 did reduce lymphocyte counts by up to 43%.	RP-PH-006-1.0

Approved v1.0

Table 2.6.3.3: Secondary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273[RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Assessment of Neuroprotection and Remyelination in the Cuprizone Model of Demyelination	Mouse C57BL/6J	Male n = 44 to 51/group (5 to 15/termination group)	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 5 mg/kg) 6, 7, 9, 12, 18 weeks	Ozanimod treatment resulted in significant neuroprotective effects on cuprizone/rapamycin induced demyelination over 6 weeks (attenuated myelin loss and reduced formation of SMI-32^{+} ovoids in the corpus callosum). There was no improvement in remyelination when treatment continued for up to 12 weeks after the demyelinating challenge. Significant decreases in number of circulating lymphocytes throughout the study, consistent with engagement of $S1P_1$ pharmacology.	RP-PH-015
Assessment of Repeated Oral Dosing in a Model of Serotonin Syndrome	Mouse/C57BL/6N Tac	Male n = 8/group	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 13.5 mg/kg), CC112273 (0, 2.25, 10 mg/kg) 5 days	The doses of ozanimod and CC112273 assessed led to plasma levels of CC112273 comparable to or greater than at clinical steady state (1 mg dose). Repeated administration of ozanimod or CC112273 did not significantly exacerbate the serotonin syndrome (changes to vertical rearing activity and core temperature) induced by 5-HTP (35 mg/kg). In contrast, treatment of mice with selegiline (a selective and irreversible inhibitor of MAO-B; 10 mg/kg) and 5-HTP (35 mg/kg) did significantly reduce vertical rearing activity and core temperature.	RP-PH-008-1.0

Approved v1.0

Table 2.6.3.3: Secondary Pharmacodynamics

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273[RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Type of Study	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Dose/ Duration	Noteworthy Findings	Study Number
Assessment of Repeated Oral Dosing and Washout on Locomotor Activity	Mouse/C57BL/6N Tac	Male n = 8 to 12/group	In vivo: PO, QD	Ozanimod (0, 13.5 mg/kg), CC112273 (0, 1, 2.25, 10 mg/kg) 5 days	Ozanimod or CC112273 dosing in normal mice did not induce significant changes to vertical rearing activity or core temperature (symptoms of serotonin syndrome) at levels of circulating CC112273 up to 84 nM at 6 hours post final dose (4-fold steady state clinical levels) and brain exposure up to 27 nM that was comparable to circulating clinical steady state Cmax. In contrast, positive control mice treated with selegiline (an MAO-B inhibitor) and 5-HTP (35 mg/kg) exhibited symptoms consistent with serotonin syndrome. Further, there were no changes in rearing activity after the 54 hour washout period in mice treated with ozanimod or CC112273, despite ozanimod treated mice continuing to exhibit clinically relevant plasma levels of CC112273 (29 nM).	RP-PH-017

A3R = A3 adenosine receptor; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; GABA = gamma-aminobutyric acid; IC50 = half maximal inhibitory concentration; MAO = monoamine oxidase; MT1 = melatonin receptor subtype 1; NA = not applicable; PO = oral; QD = once daily; $S1P_1$ = sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1; SMI-32 = anti-neurofilament H nonphosphorylated mouse monoclonal antibody (clone 32); 5-HT = 5-hydroxytryptamine; 5-HTP = 5-hydroxytryptophan; 5-HT2B = 5-hydroxytryptamine receptor 2B.

Approved v1.0

4 安全性薬理試験

Table 2.6.3.4: Safety Pharmacology

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273 [RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Organ Systems Evaluated	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Test Article (Concentration or Dose)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	NA	In vitro	Ozanimod (1 μM)	10% inhibition of hERG current	NonGLP	062-0001
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	NA	In vitro	RP101075 (1 μM)	25 ± 16% inhibition of hERG current	NonGLP	062-0003, 062-0008
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	NA	In vitro	RP101442 (1 μM)	< 10% inhibition of hERG current	NonGLP	062-0013
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected CHO cells	NA	In vitro	RP101988 (1 μM), RP101124 (1 μM)	< 10% inhibition of hERG current	NonGLP	077-0012
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	NA	In vitro	Ozanimod (0.060, 0.12, 0.32, 5.3 μM)	Ozanimod dose-related inhibition of hERG current: IC50 = 0.21 μM	GLP	100503.SJD
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	NA	In vitro	CC112273 (0.3, 1, 3, 10 μM)	CC112273 dose-related inhibition of hERG current: IC50 = 4.9 μM	NonGLP	170602.SFD
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	NA	In vitro	CC112273 (0.2, 0.9, 2.9 μM)	CC112273 dose-related inhibition of hERG current: IC50 = 0.6 μM	GLP	170531.SFD
hERG Channel (I_{Kr})	Transfected HEK cells	NA	In vitro	CC1084037 (0.3, 1.0, 3.0 μM)	CC1084037 dose-related inhibition of hERG current: IC50 > 3.0 μM	NonGLP	CC-DISC-ET-2880

Table 2.6.3.4: Safety Pharmacology

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273 [RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Organ Systems Evaluated	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Test Article (Concentration or Dose)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular (Telemetry)	Monkey/Cyno-molgus	M:1-3, F:1-3	In vivo; PO, single dose on Day 7 (each animal received vehicle PO single dose on Day 1)	Ozanimod (0, 0.15, 3, 10 mg/kg)	No effect on ECG parameters with the exception of the PR interval. Animals dosed 10 mg/kg exhibited notable increases in the PR interval, suggestive of a delay in the conduction of electrical current through the AV node of the heart (i.e., first degree AV block). Ozanimod produced no cardiovascular effects in cynomolgus monkeys at doses up to and including 3 mg/kg. NOEL = 3 mg/kg	NonGLP	1840-002

Approved v1.0

Table 2.6.3.4: Safety Pharmacology

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273 [RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Organ Systems Evaluated	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Test Article (Concentration or Dose)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular (Telemetry)	Monkey/Cyno-molgus	M:4	In vivo; PO, QW, 21 days: Each animal received 4 doses, serving as its own vehicle control along with each of the 3 doses with a 7 day washout period in between each dose	Ozanimod (0, 0.15, 3, 30 mg/kg)	3 and 30 mg/kg: minor and transient effects on the duration of the PR interval (increased by about 10%) and diastolic blood pressure (decreased by about 20%). At 30 mg/kg, heart rate was depressed from about 2 to 24 hours post dosing with a maximal decrease of ~29% at 4 hours post dosing. NOEL = 0.15 mg/kg	GLP	026002
Respiratory Function	Rat/Sprague Dawley	M:2, F:2	In vivo; PO, QD, 5 days	Ozanimod (0, 0.1, 2, 8 mg/kg)	No biologically relevant effects on respiratory rate, tidal volume or minute volume in conscious rats following a single dose and after 5 days of dosing.	NonGLP	1275RR32.001

Approved v1.0

Table 2.6.3.4: Safety Pharmacology

Test Article: Ozanimod (RPC1063) and/or Metabolites (RP101075, RP101988, RP101442, CC112273 [RP112273], CC1084037 [RP100798], and/or RP101124)

Organ Systems Evaluated	Test System (in vitro) or Species/Strain (in vivo)	Sex and No. per Group	Method of Administration	Test Article (Concentration or Dose)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Respiratory Function (Conscious, Freely Moving Rat by Whole Body Plethysmography)	Rat/Sprague Dawley	M:18	In vivo; PO, QD, 7 days	Ozanimod (0, 0.2, 2, 30 mg/kg)	No respiratory functional or haematosis changes observed at 2 mg/kg, but lung weights were elevated by approximately 40% at this dose level and this change was considered to be toxicologically relevant Based on plethysmographic evaluation and the lung weights data, NOEL = 0.2 mg/kg/day	GLP	026003

AV = atrioventricular; CHO = Chinese hamster ovary; ECG = electrocardiogram; F = female; FOB = functional observational battery; GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; IC50 = half maximal inhibitory concentration; IKr = delayed rectifier potassium current; M = male; NA = not applicable; NOEL = no observed effect level; PO = oral; QD = once daily; QW = once weekly.

Approved v1.0

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし

Approved v1.0