TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES 1
1. 緒言 2
2. 参考文献 2

LIST OF FIGURES

Figure 1. エトラシモド L-アルギニンの化学構造式 2

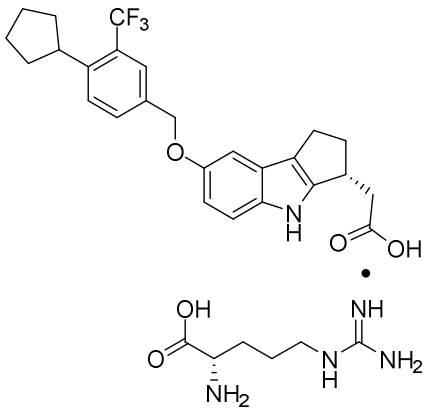
1. 緒言

エトラシモド（開発番号：APD334，AR401959，化学名：(*R*)-2-(7-(4-cyclopentyl-3-(trifluoromethyl)benzyloxy)-1,2,3,4-tetrahydrocyclopenta[*b*]indol-3-yl) acetic acid）は，中等症から重症の潰瘍性大腸炎（UC）の治療薬として開発された，スフィンゴシン 1-リン酸（S1P）受容体 1,4,5（$S1P_{1,4,5}$）選択的な調節薬である（Figure 1）。

今回の申請にあたり，エトラシモドの有効性および安全性に関する特徴を明らかにする目的で，薬理，薬物動態および毒性の各非臨床試験を実施した。

非臨床試験では，エトラシモド L-アルギニンまたはその遊離酸を使用した。特に記載のない限り，すべての in vivo 非臨床試験におけるエトラシモドの濃度および用量は，遊離酸相当量で表記した。

Figure 1.　エトラシモド L-アルギニンの化学構造式



エトラシモドは，細胞表面に発現しリンパ器官からのリンパ球移出を調節するタンパク質である $S1P_1$ の活性化を介して，主な薬理作用を示すと考えられる[1]。マウスおよびラットを用いた複数の免疫疾患モデルにおいて，エトラシモドは血中および炎症組織のリンパ球レベルを含む炎症反応を速やかにかつ用量依存的に低下させた。

エトラシモドの効能・効果および用法・用量は添付文書（案）（1.8.1 項）に記載した。

2. 参考文献

[1] Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature. 2004;427(6972):355-60.

TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 3
本項で使用する用語・略号 4
1. まとめ 6
2. 効力を裏付ける試験 8
2.1. In vitro 8
2.1.1. 非臨床動物種の組換え $S1P_1$ を発現する細胞株を用いたβアレスチン動員アッセイ 8
2.1.2. 遺伝子組換えラット $S1P_1$ を発現する細胞株における cAMP 蓄積に対する作用 9
2.1.3. 遺伝子組換えヒト $S1P_1$ を発現する細胞株における cAMP 蓄積に対する作用 9
2.1.4. ヒト組換え $S1P_{1-5}$ を発現する細胞株を用いたβアレスチン動員アッセイ 10
2.1.5. 組換えヒト $S1P_{1-5}$ を発現させた細胞株におけるβアレスチン動員および GTPγS 結合に対するエトラシモド，代謝物 M3 および M6 ならびにその他の S1P 受容体調節薬の作用 11
2.1.6. 遺伝子組換えヒト $S1P_1$ を発現させた CHO 細胞株およびヒト $S1P_1$ を自然発現する HUVEC における cAMP の蓄積および受容体内在化に対するエトラシモドおよびその他の S1P 受容体調節薬の作用 14
2.1.7. 組換えヒト $S1P_2$ および $S1P_3$ を発現させた細胞株における細胞内カルシウム放出に対するエトラシモドの作用 17
2.1.8. I_{KACh} チャネル GIRK 電流へのエトラシモドおよび S1P の作用 17
2.1.9. I_{KACh} チャネル GIRK 電流に対するエトラシモドおよびその他の S1P 受容体調節薬の作用 18
2.2. In vivo 19
2.2.1. エトラシモドのマウスの末梢血リンパ球に対する効果 19
2.2.2. エトラシモドの実験的大腸炎モデルマウスにおける効果 20
2.2.3. エトラシモドの自然発生性大腸炎モデルマウスにおける効果 23
2.2.4. コンカナバリン A 誘発肝炎モデルマウスにおけるエトラシモドの効果 23
2.2.5. MOG 誘発 EAE モデルマウスにおけるエトラシモドの予防効果 25
2.2.6. マウスの MOG 誘発 EAE に対するエトラシモドの治療効果 26
2.2.7. マウスの FITC 誘発接触過敏症に対するエトラシモドの効果 27
2.2.8. ラットのコラーゲン誘発性関節炎に対するエトラシモドの効果 28

3. 副次的薬理試験 28
3.1. エトラシモドの選択性 29
3.1.1. 受容体，イオンチャネルおよび神経伝達物質トランスポーターに対するエトラシモドの選択性 29
3.1.2. 特定の受容体パネルにおけるエトラシモドの結合親和性 29
3.1.3. エトラシモドの酵素活性に対する阻害作用 30
4. 安全性薬理試験 31
4.1. 心血管系 31
4.1.1. hERG カリウムチャネルに対する作用 31
4.1.2. テレメトリー装着ビーグル犬を用いた心血管系評価試験 32
4.2. 中枢神経系 32
4.2.1. 雄ラットを用いた中枢神経系評価試験 32
4.3. 呼吸系 33
4.3.1. 雄ラットを用いた呼吸系評価試験 33
5. 薬力学的薬物相互作用試験 33
6. 考察及び結論 33
7. 図表 37
8. 参考文献 37

LIST OF TABLES

Table 1. マウス，イヌおよびサルの $S1P_1$ を介したβアレスチン動員アッセイにおけるエトラシモドの EC_{50} 値および相対最大効力 9
Table 2. 遺伝子組換えヒトおよびラットの $S1P_1$ を発現する細胞株を用いた cAMP 蓄積アッセイにおけるエトラシモドの EC_{50} 値および相対最大効力 10
Table 3. ヒト $S1P_{1-5}$ を介したβアレスチン動員アッセイにおけるエトラシモドの EC_{50} 値および相対最大効力 11
Table 4. ヒト $S1P_{1-5}$ アゴニスト誘発性βアレスチン動員アッセイにおける EC_{50} および E_{max} 13
Table 5. ヒト $S1P_{1-5}$ アゴニスト誘発性 GTPγS 結合アッセイにおける EC_{50} および E_{max} 14
Table 6. ヒト $S1P_1$ を発現させた CHO 細胞株および初代 HUVEC 株を用いた cAMP 蓄積アッセイにおける S1P 受容体アゴニスト活性 16
Table 7. ヒト $S1P_1$ を発現させた CHO 細胞株を用いた S1P 内在化アッセイにおける S1P 受容体アゴニスト活性 16

Table 8. カルシウム放出アッセイにおけるエトラシモドの $S1P_2$ および $S1P_3$ に対するアゴニスト作用およびアンタゴニスト作用 17
Table 9. ヒト心筋細胞 GIRK 電流（I_{KACh}）に対する S1P 受容体調節薬の効果（10 µmol/L カルバコールによる活性の%相対活性） 18
Table 10. 種々の免疫細胞サブセットにおけるエトラシモド誘発性血中リンパ球減少 20
Table 11. コンカナバリン A 誘発血清 ALT 増加に対するエトラシモドの作用 24
Table 12. 肝臓における単核球の表現型（%） 24
Table 13. 血中における単核球の表現型（%） 25
Table 14. エトラシモドによる放射性リガンドに対する中等度～顕著な結合阻害 29
Table 15. 受容体に対するエトラシモドの親和性および K_i 値 30
Table 16. エトラシモドによる酵素阻害 31

LIST OF FIGURES

Figure 1. エトラシモドの T 細胞および骨髄系細胞の大腸への浸潤に対する作用 22
Figure 2. マウスの MOG 誘発 EAE 発現に対するエトラモドの予防効果 26
Figure 3. マウスの MOG 誘発 EAE に対するエトラモドの治療効果 27

本項で使用する用語・略号

略号，用語	省略していない表現または定義
$5\text{-}HT_{1A}$	serotonin 1A receptor：セロトニン 1A 受容体
$5\text{-}HT_3$	serotonin 3 receptor：セロトニン 3 受容体
ALT	alanine transaminase ：アラニンアミノトランスフェラーゼ
cAMP	cyclic adenosine monophosphate：環状アデノシン一リン酸
BSA	bovine serum albumin：ウシ血清アルブミン
CCK_2	cholecystokinin 2 receptor：コレシストキニン 2 受容体
CCK_B	cholecystokinin B receptor：コレシストキニン B 受容体
CHO	Chinese hamster ovary：チャイニーズハムスター卵巣
CI	confidence interval：信頼区間
C_{max}	maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
COX	cyclooxygenase：シクロオキシゲナーゼ
CXCR2	C-X-C motif chemokine receptor 2：C-X-C モチーフケモカイン受容体 2
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
EC_{50}	50% effective concentration：50%有効濃度
EGFR	epidermal growth factor receptor：上皮成長因子受容体
E_{max}	maximal effective concentration：最大有効濃度
ERK2	extracellular signal-regulated protein kinase 2
FITC	fluorescein isothiocyanate isomer I：フルオレセインイソチオシアネート異性体 I
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase：グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
GIRK	G-protein-gated inwardly rectifying potassium：G タンパク依存性内向き整流性カリウム
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 タンパク質共役受容体
GTPγS	guanosine 5′-O-[gamma-thio]triphosphate：グアノシン 5′-O-[γ-チオ]三リン酸
HA	Human influenza hemagglutinin：ヒトインフルエンザヘマグルチニン
HEK	human embryonic kidney：ヒト胎児由来腎臓
hERG	human ether-à-go-go-related gene：ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HTRF	homogeneous time-resolved fluorescence：均一時間分解蛍光法
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells：ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	50% inhibitive concentration：50%阻害濃度
I_{KACh}	acetylcholine-activated inward rectifying potassium channel：アセチルコリン活性化内向き整流性カリウムチャネル
I_{Kr}	rapidly activating delayed rectifier cardiac potassium current：急速活性化遅延整流性カリウム電流
IL	Interleukin：インターロイキン
$IL\text{-}8_B$	interleukin 8_B receptor：インターロイキン 8_B 受容体
JAK3	Janus kinase 3：ヤヌスキナーゼ 3
KO	knock out：ノックアウト
MMP	matrix metalloproteinase：マトリックスメタロプロティナーゼ
MOG	myelin oligodendrocyte glycoprotein：ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質
NK	natural killer (cells)：ナチュラルキラー（細胞）
NOAEL	no observed adverse effect level：無毒性量

略号，用語	省略していない表現または定義
PKCα	protein kinase C alpha：プロテインキナーゼ Cα
PDE	Phosphodiesterase：ホスホジエステラーゼ
PBS	phosphate-buffered saline：リン酸緩衝食塩水
qPCR	quantitative polymerase chain reaction：定量ポリメラーゼ連鎖反応
SCID	severe combined immunodeficient：重症複合型免疫不全
S1P	sphingosine 1-phosphate：スフィンゴシン 1-リン酸
$S1P_{1-5}$	sphingosine 1-phosphate receptor $_{1-5}$：スフィンゴシン 1-リン酸受容体 $_{1-5}$
TNFα	tumour necrosis factor alpha：腫瘍壊死因子 α
ZAP70	zeta-chain-associated protein kinase 70

1. まとめ

エトラシモド（APD334，AR401959）は中等症から重度の潰瘍性大腸炎（UC）の治療薬として開発中の低分子である。エトラシモドは，細胞表面に発現しリンパ器官からのリンパ球移出を調節するタンパク質であるスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）受容体 1（$S1P_1$）の活性化を介して，主な薬理作用を示すと考えられる[1]。マウスおよびラットを用いた複数の免疫疾患モデルにおいて，エトラシモドは血中および炎症組織のリンパ球レベルを含む炎症反応を速やかにかつ用量依存的に低下させた。

エトラシモドは，試験が実施された時期に応じて，試験報告書および試験ファイル内で 3 つの名称（Etrasimod，APD334，AR401959）が用いられている。試験報告書のタイトルを除き，薬理試験の概要文全体をとおして，本文および表に用いる名称はエトラシモドで統一した。特に記載のない限り，GLP 適用の安全性薬理試験を含むすべての非臨床試験において，エトラシモドは臨床で用いられる L-アルギニン塩として投与されている。なお，すべての in vivo 非臨床薬理試験におけるエトラシモドの濃度および用量は，遊離酸相当量で表記した。

効力を裏付ける試験および副次的薬理試験（M2.6.3 Table 2 および M2.6.3 Table 3）において，エトラシモドは $S1P_{1,4,5}$ を選択的に調節し（$S1P_{2,3}$ に対する選択性と比較し $S1P_1$ への選択性は 1000 倍超），広範な G タンパク質共役受容体（GPCR），トランスポーター，イオンチャネルおよび酵素など意図しない標的分子に対してほとんど作用を示さなかった。さらに，エトラシモドは $S1P_1$ に対して完全アゴニスト作用を示したが，$S1P_{4,5}$ に対しては部分アゴニスト作用を示した。βアレスチン動員アッセイおよび cAMP 蓄積アッセイを用いた in vitro 試験において，エトラシモドはマウス，ラット，イヌ，サルおよびヒトの $S1P_1$ に対して同等の完全アゴニスト作用を示し，50%有効濃度（EC_{50} 値）は約 0.2～9 nmol/L であった（報告書番号 DBR-[redacted]-002，DBR-[redacted]-003，DBR-[redacted]-004）。他の S1P 受容体調節薬［フィンゴリモド リン酸塩（フィンゴリモド-P），ozanimod，ozanimod ケトン体（ozanimod の主要な活性代謝物）およびシポニモド］と比較して，エトラシモドの $S1P_1$ に対する作用は，他の S1P 受容体調節薬よりも内因性の S1P の作用に類似していた。特に，エトラシモドおよび S1P の βアレスチン経路に対する効力は他の S1P 受容体調節薬と同等であったが，G タンパク質シグナル伝達経路（グアノシン 5′-O-[γ-チオ]三リン酸[GTP-γS]に対する結合を測定）に対する効力は他の S1P 受容体調節薬よりも低かった（報告書番号 APD334.TS.020）。この結果において重要な点は，各シグナル伝達経路における機能的な関連である。すなわち，βアレスチンの動員を介した機能的アンタゴニスト作用は末梢リンパ球の減少に関連し，一方，G タンパク質シグナル伝達は臨床で初回投与後に認められる心拍数の減少に関連すると考えられている[2,3,4]。

マウスおよびラットを用いた種々の in vivo 試験において，エトラシモドの作用を検討した。特記すべき点として，健常 C57BL/6 マウスへのエトラシモド単回経口投与（0.1～1 mg/kg；報告書番号 DBR-[redacted]-018）により血中リンパ球数が減少し，実験的大腸炎モデルマウス（3 mg/kg/日；報告書番号 APD334.TS.001）においては結腸のリンパ球レベルおよび炎症反応（サイトカインおよび免疫細胞発現レベル）の有意な減少ならびに体重減少の改善が認められた。さらに，MDR1a ノックアウト（KO）自然発生性大腸炎モデルマウスにエトラシモドを経口投与したところ，大腸炎の指標となる病理学的所見および炎症マーカーが改善した（報告書番号 APD334.TS.036）。これらの UC モデルに加え，コンカナバリン A 誘発急性肝炎モデルマウス（報告書番号 APD334.TS.003），多発性硬化症モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎

（EAE）モデル（報告書番号 DBR-[redacted]-013，DBR-[redacted]-017），接触過敏症モデル（報告書番号 APD334.TS.022），コラーゲン誘発関節炎ラットモデル（報告書番号 DBR-[redacted]-016）の多様な機序のモデルに，0.3～3 mg/kg/日のエトラシモドを単回あるいは反復経口投与したところ，エトラシモドにより炎症反応が減弱する可能性が示された。これらのモデルにおいて，エトラシモドの予防的投与または治療的投与により，炎症反応の抑制，炎症性サイトカインおよび局所炎症の減少，局所リンパ節からのリンパ球移出の減少あるいは血中および炎症組織におけるリンパ球レベルの減少が認められた。

ICH S7A/S7B ガイドラインに基づき，GLP 適用の安全性薬理コアバッテリー試験を実施した（M2.6.3 Table 4）。UC 治療のための臨床用量である 2 mg/日に相当する用量を超えるエトラシモドを投与しても，心血管系，中枢神経系および呼吸系への影響は認められなかった。

一連の非臨床薬理試験により，UC 治療のための臨床用量である 2 mg/日において，エトラシモドはヒト $S1P_1$ に対する選択的な完全アゴニストであり，ヒト $S1P_{4,5}$ に対する部分アゴニストであることが示されたが，ヒト $S1P_{2,3}$ に対する活性は認められなかった。副次的薬理試験ではオフターゲット作用は認められず，安全性薬理試験では心血管系，中枢神経系または呼吸系に対する有害作用は認められなかった。大腸炎モデルマウスにおいて，エトラシモドを経口投与したとき，対照群と比較してリンパ球レベルおよび炎症マーカーの減少が認められた。

これらの非臨床薬理試験結果は，エトラシモドが UC 治療に有用である可能性を裏付けるものであった。

2. 効力を裏付ける試験

エトラシモドの S1P 受容体に対する有効性，選択性，および複数の in vivo 疾患モデルにおける薬力学的作用を明らかにするために，エトラシモドの効力を裏付ける一連の in vitro および in vivo 試験を実施した（M2.6.3.1）。

2.1. In vitro

複数の評価系を用い，エトラシモドの S1P 受容体活性化作用を評価した。主な評価系として β アレスチン動員アッセイおよび GTPγS 結合アッセイを用いた。これらは，S1P 受容体の結合により生じる 2 つの主要なシグナル伝達カスケードの評価系として最も広く用いられている [3,5]。

β アレスチン動員アッセイにより，$S1P_1$ の内在化に必要と考えられている G タンパク質非依存性シグナル伝達経路の活性化における効力を測定することができる [3]。β アレスチン動員を介した受容体の内在化により内因性 S1P の標的が失われることが，エトラシモドおよび他の S1P 受容体調節薬の機能的アンタゴニスト作用の機序と考えられている。この機能的アンタゴニスト作用による S1P シグナル伝達の低下により，リンパ球の移出が減少する。そこで，エトラシモドによる $S1P_1$ の内在化の下流への影響をフローサイトメトリーアッセイにより評価した。

また，GTPγS 結合アッセイでは，G タンパク質シグナル伝達における効力を測定することができる。この G タンパク質シグナル伝達は，臨床において S1P 受容体調節薬を初回投与したときに心拍数減少を誘発すると考えられている。GTPγS 結合アッセイの結果を踏まえ，$S1P_1$ に対する受容体選択性，機能的活性および種間差に関してさらなる知見を得るため，G タンパク質シグナル伝達の下流への影響を測定する 2 つのアッセイ（カルシウム放出アッセイおよび cAMP 蓄積アッセイ）を実施した。

アッセイ系の妥当性は，標準化合物の文献報告値との比較により確認した。複数試験で認められた 50%有効濃度（EC_{50} 値）および 50%阻害濃度（IC_{50} 値）における差異は，特定のアッセイ法における違い（特にウシ血清アルブミン[BSA]の濃度）に起因すると考えられ，この差異は検討した複数の化合物でも認められた（報告書番号 DBR-[redacted]-002 および APD334.TS.020）。エトラシモドの選択性および機能的活性のプロファイルは上述のアッセイ間で一貫しており，$S1P_1$ に対して選択的アゴニスト活性および $S1P_{4,5}$ に対して弱い部分アゴニスト活性を示した一方，$S1P_{2,3}$ に対する検出可能なアゴニストおよびアンタゴニスト活性は認められなかった。

2.1.1. 非臨床動物種の組換え $S1P_1$ を発現する細胞株を用いた β アレスチン動員アッセイ

報告書番号 DBR-[redacted]-002

マウス，イヌおよびサルの $S1P_1$ を発現するヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞を用いた in vitro β アレスチン動員アッセイにおいて，エトラシモドの作用を評価した。

標準的な DiscoveRx PathHunter HEK293 細胞を用いて実施した。非臨床動物種の組換え $S1P_1$ を安定発現させた HEK293 細胞をウェルあたり 2000～5000 細胞（受容体の発現レベルによる）の密度で 0.05% BSA（脂肪酸不含）とともに一晩インキュベートした後，少なくとも 10 濃度のエトラシモドを添加し，室温で 2～3 時間インキュベートした。インキュベーション後に溶解/検出試薬を添加し，プレートを室温でさらに 2 時間インキュベートした後，プレートリーダーで測定した。

6 回の繰り返し測定からエトラシモドの EC_{50} 値を求め，また，相対的な最大効力を，内因性アゴニスト S1P による最大反応に対するエトラシモドによる最大反応の割合（%）で示した。

エトラシモドは，マウス，イヌおよびサルの $S1P_1$ に対する強力な完全アゴニストであり，EC_{50} 値は 3.65～8.70 nmol/L（相対最大効力は内因性 SIP の 80%超）であった（Table 1）。なお，ラット $S1P_1$ を用いたβアレスチン動員アッセイ法を確立することはできなかったため，ラット $S1P_1$ に対するエトラシモドの活性は cAMP 蓄積アッセイを用いて評価した（2.1.2 項）。

Table 1.　マウス，イヌおよびサルの $S1P_1$ を介したβアレスチン動員アッセイにおけるエトラシモドの EC_{50} 値および相対最大効力

受容体	EC_{50} 値 (nmol/L)	95%信頼区間 (nmol/L)	相対最大効力 (%S1P)	N 数
マウス $S1P_1$	3.65	2.06, 6.44	82	6
イヌ $S1P_1$	4.19	2.49, 7.02	101	6
サル $S1P_1$	8.70	6.51, 11.62	88	6

報告書番号 DBR-[redacted]-002 Table 5

2.1.2. 遺伝子組換えラット $S1P_1$ を発現する細胞株における cAMP 蓄積に対する作用

報告書番号 DBR-[redacted]-004

エトラシモドによるラット $S1P_1$ 活性化を介した cAMP 反応に対する作用を評価した。ラット $S1P_1$ を用いたβアレスチン動員アッセイ法を確立することはできなかったが（2.1.1 項），S1P は G タンパク質共役型 $S1P_1$ のアゴニスト作用を介して細胞内 cAMP 濃度も調節するため，βアレスチン動員アッセイに代わる機能活性評価法として，ラット $S1P_1$ を用いた cAMP 蓄積アッセイを開発した。

本アッセイでは，βアレスチン動員アッセイ（2.1.1 項）と同様に遺伝子組換えラット $S1P_1$ 発現細胞株を用い，均一時間分解蛍光法（HTRF）を用いた cAMP 蓄積アッセイを実施した。エトラシモドを DMSO に溶解して複数の濃度（最高濃度 10 µmol/L）に段階希釈し，さらに PBS で希釈して最終濃度の 2 倍濃度の保存溶液とした。次に，組換えラット $S1P_1$ を安定発現させた HEK293 細胞を分注したプレートにフォルスコリン存在下でエトラシモドを添加し，室温で 1 時間インキュベートした。インキュベーションおよび細胞溶解の後，マイクロプレートリーダーで時間分解蛍光測定を実施し，8 回の繰り返し測定から EC_{50} 値を求めた。相対最大効力は，内因性アゴニスト S1P による最大反応に対するエトラシモドによる最大反応の割合（%）で示した。

この cAMP 蓄積アッセイにおいて，エトラシモドはラット $S1P_1$ の完全アゴニストであり，EC_{50} 値は 0.319 nmol/L であった（Table 2）。

2.1.3. 遺伝子組換えヒト $S1P_1$ を発現する細胞株における cAMP 蓄積に対する作用

報告書番号 DBR-[redacted]-003

エトラシモドによるヒト $S1P_1$ 活性化を介した cAMP 反応に対する作用を評価した。

本アッセイでは，βアレスチン動員アッセイ（2.1.4 項）と同様に遺伝子組換えヒト $S1P_1$ 発現細胞株を用いた。HTRF を用いた cAMP 蓄積アッセイは上述（2.1.2 項）に従って実施し，11 回の繰り返し測定から EC_{50} 値を求めた。

ヒトおよびラット（2.1.2 項）の $S1P_1$ アゴニスト cAMP 蓄積アッセイの結果を Table 2 に示す。cAMP 蓄積アッセイにおいて，エトラシモドはヒト $S1P_1$ に対する完全アゴニスト作用を示し，EC_{50} 値は 0.199 nmol/L であった。ラットおよびヒトの cAMP 蓄積アッセイにおける標準アゴニストの有効性は類似しており，両アッセイにおけるエトラシモドの EC_{50} 値はほぼ同等であったことから，ヒトおよびラットの $S1P_1$ に対するエトラシモドの効力は同程度であることが示唆された。

Table 2.　遺伝子組換えヒトおよびラットの $S1P_1$ を発現する細胞株を用いた cAMP 蓄積アッセイにおけるエトラシモドの EC_{50} 値および相対最大効力

受容体	EC_{50} 値（nmol/L）	95%信頼区間（nmol/L）	相対最大効力（%S1P）	N 数
ラット $S1P_1$	0.319	0.188, 0.542	99	8
ヒト $S1P_1$	0.199	0.123, 0.321	96	11

ヒト：報告書番号 DBR-[redacted]-003 Table 3，ラット：報告書番号 DBR-[redacted]-004 Table 3

2.1.4. ヒト組換え $S1P_{1\text{-}5}$ を発現する細胞株を用いた β アレスチン動員アッセイ

報告書番号 DBR-[redacted]-001

各 S1P 受容体における β アレスチンを介したシグナル伝達に対するエトラシモドの影響を評価した。本試験では，ヒト S1P 受容体における β アレスチン動員アッセイを用い，アゴニスト作用（$S1P_{1\text{-}5}$）およびアンタゴニスト作用（$S1P_{2,3}$ に対する S1P による活性化との競合）について評価し，エトラシモドおよび標準化合物の EC_{50} 値を求めた。

非臨床動物種の S1P 受容体を用いた β アレスチン動員アッセイ（2.1.1 項）と同じ方法を用い，ヒト S1P 受容体の 5 つのサブタイプすべてについて検討した。すべての EC_{50} 値は，少なくとも 10 濃度からなる濃度反応曲線（各濃度で 3 回の繰り返し測定）に基づいて算出した。既知の $S1P_{1\text{-}5}$ アゴニストおよび $S1P_{2,3}$ アンタゴニストについても試験し，その EC_{50} 値をアッセイバリデーションとして公表値と比較した。相対最大効力は，内因性アゴニスト S1P による最大反応に対するエトラシモドによる最大反応の割合（%）で示した。アンタゴニスト作用については，S1P の EC_{90} 値［$S1P_2$：200 nmol/L（5 回繰り返し），$S1P_3$：300 nmol/L（8 回繰り返し）］で実施した。

エトラシモドは，$S1P_1$ に対して強力な完全アゴニスト作用を示し（EC_{50} 値：6.10 nmol/L），相対最大効力は S1P の 110%であった。また $S1P_4$ および $S1P_5$ に対しては部分アゴニスト作用を示し（EC_{50} 値：それぞれ 147 nmol/L および 24.4 nmol/L），相対最大効力は S1P のそれぞれ 63%および 73%であった（Table 3）。また，ヒト $S1P_2$ または $S1P_3$ については，10 µmol/L においても β アレスチンの動員を誘導せず，S1P 活性化も阻害しなかった。

これらの結果から，エトラシモドは選択的かつ強力な完全 $S1P_1$ 作動薬であり，ヒト $S1P_4$ および $S1P_5$ に対する作用と比較してそれぞれ 24 倍および 4 倍の選択性を有し，また，ヒト $S1P_2$ また

は $S1P_3$ に対してはアゴニスト作用およびアンタゴニスト作用を有さないこと（$S1P_{2,3}$ に対する選択性と比較し $S1P_1$ への選択性は 1000 倍超）が示された。

Table 3.　ヒト $S1P_{1-5}$ を介したβアレスチン動員アッセイにおけるエトラシモドの EC_{50} 値および相対最大効力

受容体	EC_{50} 値 (nmol/L)	95%信頼区間 (nmol/L)	相対最大効力 (%S1P)	N 数
ヒト $S1P_1$	6.10	3.36, 11.1	110	6
ヒト $S1P_2$	NR	ND	ND	8
ヒト $S1P_3$	NR	ND	ND	6
ヒト $S1P_4$	147	114, 190	63	9
ヒト $S1P_5$	24.4	17.4, 34.3	73	10

ND：測定せず，NR：作用なし
報告書番号 DBR-[redacted]-001 Table 7

2.1.5. 組換えヒト $S1P_{1-5}$ を発現させた細胞株におけるβアレスチン動員および GTPγS 結合に対するエトラシモド，代謝物 M3 および M6 ならびにその他の S1P 受容体調節薬の作用

報告書番号 APD334.TS.020

エトラシモドと血中に最も多くみられる 2 種類の代謝物 M3 および M6 の薬理プロファイルを評価した。これら 2 種類の代謝物は，[^{14}C]エトラシモドに次いで多かったが，ヒト血漿中の総放射能のそれぞれ 10%未満であったことから（APD334-107 試験），微量代謝物と考えられた（M2.7.2.2）。本検討では，βアレスチン動員アッセイおよび GTPγS 結合アッセイを用いて，ヒト $S1P_{1-5}$ に対するエトラシモドおよび両代謝物の作用を評価した。これらの 2 つのアッセイは，末梢血リンパ球数の減少をもたらすβアレスチン動員を介した機能的アンタゴニスト作用と，臨床での初回投与時に認められる心拍数の減少の機序と考えられる G タンパク質シグナル伝達の開始点としての 2 つの作用を評価するため選択した[2,3,4]。さらに，両アッセイにおけるエトラシモドの活性を，S1P および他の S1P 受容体調節薬（ozanimod，ozanimod の主な薬理活性物質であるケトン体，フィンゴリモド-P およびシポニモド）と比較した。

βアレスチン動員アッセイは，前述（2.1.1 項）の PathHunter βアレスチンアッセイプラットフォームを用いて実施した。すなわち，Prolink 標識ヒト S1P 受容体を安定発現させた HEK293 細胞を 5000 個/ウェルの密度で 0.1% BSA（脂肪酸不含）とともに一晩インキュベートした。被験物質（エトラシモド，M3 および M6）を添加した後に，室温で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後に溶解/検出試薬を添加し，プレートを室温でさらに 4 時間インキュベートした後，プレートリーダーで測定した。

GTPγS 結合アッセイでは，S1P 受容体を安定発現させた CHO-K1 細胞を用いた。細胞から調製した膜ホモジネートを，被験物質（エトラシモド，M3 および M6）を含有するプレートに分注し，プレートを室温で 5 分間インキュベートした後，0.4 nmol/L [^{35}S]-GTP を添加した。室温で 1 時間振とうした後，遠心分離し，シンチレーションカウンターを用いて測定した。

エトラシモドとその代謝物および他の S1P 受容体調節薬の EC_{50} 値および E_{max} 値を Table 4（βアレスチン動員アッセイ）および Table 5（GTPγS 結合アッセイ）に示す。

エトラシモドの想定される薬理作用，すなわち主にリンパ球数の減少に関与する $S1P_1$ を介したβアレスチンの動員を誘導する作用[1,6]は，ozanimod およびシポニモドと同程度であることが明らかにされている。しかしながら，エトラシモドの $S1P_1$ を介した GTPγS 結合の誘導作用は，ozanimod およびシポニモドと比較して顕著に弱かった。また，エトラシモドはβアレスチン動員アッセイで $S1P_4$ に対する部分アゴニスト作用を示したが，GTPγS 結合アッセイでは $S1P_4$ に対して活性を示さなかった。エトラシモドならびに代謝物である M3 および M6 は，$S1P_3$ に対して部分アゴニスト作用を示した。GTPγS 結合アッセイでは，エトラシモドの $S1P_3$ に対する EC_{50} 値（6050 nmol/L）は，エトラシモド 2 mg を 1 日 1 回 21 日間投与した健康被験者における定常状態における C_{max}（113 ng/mL：247 nmol/L，APD334-002 試験，M2.7.2.2.2）の 24.5 倍であった。この試験において，代謝物 M3 および M6 の EC_{50} 値はエトラシモドと概して同程度であり，これらの 2 つの代謝物はヒト血中の総放射能濃度の 10%未満であった（APD334-107 試験，M2.7.2.2.2）。

GTPγS 結合アッセイでは，M3 および M6 は評価した濃度において $S1P_1$ に対して完全アゴニスト作用を示し，$S1P_3$ に対しては弱い部分アゴニスト作用を示したが，$S1P_2$ および $S1P_4$ に対する活性は認められなかった（Table 5）。$S1P_5$ に対しては，エトラシモドおよび M6 は部分アゴニスト作用を示したが，M3 の作用は弱いアゴニスト作用であった。G タンパク質の活性化において，エトラシモドと比較して M3 の用量効力は $S1P_1$ に対して 1/10 倍，$S1P_5$ に対して 1/91 倍であった。同様に，エトラシモドと比較して M6 の用量効力は $S1P_1$ に対して 1/3 倍，$S1P_5$ に対して 2/3 倍であった。$S1P_3$ に対するエトラシモドおよびその代謝物 M3 および M6 の用量効力は非常に低かった。

$S1P_1$ に対するエトラシモドの効力プロファイルは，他の S1P 受容体調節薬と比較して内因性の S1P の効力プロファイルと類似していた。特記すべき点として，βアレスチン経路においてエトラシモドおよび内因性の S1P は他の S1P 受容体調節薬と同等の効力を示すが，G タンパク質シグナル伝達経路（GTPγS 結合により評価）における効力は他の S1P 受容体調節薬と比較して弱いことが示された。

Table 4.　ヒト $S1P_{1-5}$ アゴニスト誘発性 β アレスチン動員アッセイにおける EC_{50} および E_{max}

被験物質	パラメータ	$hS1P_1$	$hS1P_2$	$hS1P_3$	$hS1P_4$	$hS1P_5$
エトラシモド	EC_{50} (nmol/L)	44	NR	NR	141	63.4
	95% CI (nmol/L)	38.3, 50.5	NR	NR	97.5, 204	40, 101
	E_{max}[a]	120	NR	NR	54	86
	N	3	4	4	3	3
エトラシモド代謝物 M3	EC_{50} (nmol/L)	568	NR	NR	1410	NR
	95% CI (nmol/L)	433, 744	NR	NR	614, 3230	NR
	E_{max}[a]	118	NR	NR	84	NR
	N	4	4	4	4	4
エトラシモド代謝物 M6	EC_{50} (nmol/L)	136	NR	NR	428	698
	95% CI (nmol/L)	82.8, 224	NR	NR	240, 763	356, 1370
	E_{max}[a]	122	NR	NR	74	91
	N	3	4	4	4	3
Ozanimod	EC_{50} (nmol/L)	33.2	NR	NR	766	28.8
	95% CI (nmol/L)	19.8, 55.7	NR	NR	604, 971	12.6, 65.6
	E_{max}[a]	114	NR	NR	105	119
	N	4	4	3	4	4
Ozanimod ケトン体	EC_{50} (nmol/L)	73.9	NR	NR	588	58.5
	95% CI (nmol/L)	43.8, 124	NR	NR	404, 855	28.7, 119
	E_{max}[a]	123	NR	NR	89	115
	N	4	4	4	4	4
フィンゴリモド-P	EC_{50} (nmol/L)	11	NR	22.3	6.9	5.8
	95% CI (nmol/L)	7.9, 15.3	NR	10.2, 48.5	3.6, 13.5	4.4, 7.7
	E_{max}[a]	109	NR	9	78	48
	N	4	4	4	4	4
シポニモド	EC_{50} (nmol/L)	53.9	NR	NR	563	11
	95% CI (nmol/L)	12.7, 229	NR	NR	170, 1870	2.7, 44.6
	E_{max}[a]	111	NR	NR	93	107
	N	4	4	4	4	4
S1P	EC_{50} (nmol/L)	21	19	16.5	5.4	1.4
	95% CI (nmol/L)	9.7, 45.6	8.1, 44.5	9.4, 28.9	1.7, 17	0.9, 2.4
	E_{max}[a]	111	100	106	101	104
	N	4	4	4	4	3

フィンゴリモド-P：フィンゴリモド リン酸塩，ozanimod ケトン体：ozanimod の主要な活性代謝物
[a] E_{max}：S1P に対する相対最大効力(%)
M3：AR503641，M6：AR504344，NR：活性無し
報告書番号 APD334.TS.020 Table 1

Table 5.　ヒト $S1P_{1-5}$ アゴニスト誘発性 GTPγS 結合アッセイにおける EC_{50} および E_{max}

被験物質	パラメータ	$hS1P_1$	$hS1P_2$	$hS1P_3$	$hS1P_4$	$hS1P_5$
エトラシモド	EC_{50} (nmol/L)	57	NR	6050	NR	63.5
	95% CI (nmol/L)	18, 180	NR	2540, 14400	NR	17, 237.7
	E_{max}[a]	99	NR	42	NR	72
	N	4	4	4	4	4
エトラシモド代謝物 M3	EC_{50} (nmol/L)	545	NR	7020	NR	5804
	95% CI (nmol/L)	333, 892	NR	4590, 10700	NR	3824, 8808
	E_{max}[a]	89	NR	22	NR	51
	N	4	4	4	4	3
エトラシモド代謝物 M6	EC_{50} (nmol/L)	153	NR	5350	NR	97
	95% CI (nmol/L)	57, 408	NR	3370, 8480	NR	26.6, 354
	E_{max}[a]	101	NR	26	NR	64
	N	3	4	4	4	4
Ozanimod	EC_{50} (nmol/L)	1.2	NR	6820	NR	12.3
	95% CI (nmol/L)	0.7, 2.0	NR	3430, 13500	NR	6.8, 22
	E_{max}[a]	103	NR	52	NR	110
	N	4	4	4	4	4
Ozanimod ケトン体	EC_{50} (nmol/L)	7.3	NR	NR	NR	95.8
	95% CI (nmol/L)	2.7, 19.9	NR	NR	NR	38.4, 239
	E_{max}[a]	97	NR	NR	NR	105
	N	4	4	4	4	4
フィンゴリモド-P	EC_{50} (nmol/L)	1.3	1680	13.8	6.1	1.1
	95% CI (nmol/L)	0.4, 3.6	660, 4290	7.5, 25.4	2.6, 14.2	0.6, 2
	E_{max}[a]	86	35	39	38[b]	69
	N	4	4	4	4	4
シポニモド	EC_{50} (nmol/L)	3.7	NR	NR	510	0.5
	95% CI (nmol/L)	1.8, 7.7	NR	NR	293, 887	0.2, 1.5
	E_{max}[a]	93	NR	NR	42[b]	118
	N	4	4	3	4	4
S1P	EC_{50} (nmol/L)	156	115	323	140	49.7
	95% CI (nmol/L)	108, 226	32.6, 405	116, 900	74.1, 263	17.7, 139.4
	E_{max}[a]	101	108	113	31[b]	100
	N	4	4	4	4	4

フィンゴリモド-P：フィンゴリモド リン酸塩，ozanimod ケトン体：ozanimod の主要な活性代謝物
[a] E_{max}：S1P に対する相対最大効力(%)
[b] E_{max}：amiselimodP（amiselimod リン酸塩）に対する相対最大効力(%)
CI：信頼区間，M3：AR503641，M6：AR504344，NR：活性無し
報告書番号 APD334.TS.020 Table 2

2.1.6. 遺伝子組換えヒト $S1P_1$ を発現させた CHO 細胞株およびヒト $S1P_1$ を自然発現する HUVEC における cAMP の蓄積および受容体内在化に対するエトラシモドおよびその他の S1P 受容体調節薬の作用

報告書番号 APD334.TS.012

エトラシモドおよびその他の S1P 受容体調節薬によって惹起されるシグナル伝達について，G タンパク質シグナル伝達の下流（cAMP 蓄積アッセイ）およびβアレスチン動員の下流（受容体の内在化アッセイ）の評価を行った。

cAMP 蓄積アッセイでは，組換え $S1P_1$ を発現させた 2 つの CHO 細胞株（CHO-21BWc1 および CHO-21BWc2，2000 細胞/ウェル）および $S1P_1$ を自然発現するヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC，1000 細胞/ウェル）を，3-イソブチル-1-メチルキサンチンならびに種々の濃度の S1P 受容体調節薬（エトラシモド，ozanimod，フィンゴリモド-P，およびシポニモド）または S1P の存在下で，フォルスコリンを用いて 1 時間刺激し，HTRF を用いた cAMP 蓄積アッセイを実施した。

$S1P_1$ の内在化アッセイでは，ヒトインフルエンザヘマグルチニン（HA）標識ヒト $S1P_1$ を発現する組換え CHO 細胞を S1P 受容体調節薬または DMSO とともにウェルに添加した。プレートを 37°C において 5%二酸化炭素存在下でインキュベートした後，氷上でリン酸緩衝食塩水（PBS）を添加して 10 分間インキュベートした。インキュベーション後，細胞を遠心分離し，ヒト $S1P_1$ を抗体で標識し，フローサイトメトリーによりヒト $S1P_1$ を定量した。

組換え $S1P_1$ 発現細胞株における cAMP データの解析（Table 6）から，検討したすべての化合物の用量効力は，これまでに得られた β アレスチン動員アッセイ（2.1.4 項）および GTPγS アッセイ（2.1.5 項）での用量効力に比べて左方にシフトしていた。これは，これらの細胞株に cAMP 経路における余剰受容体があり，cAMP 蓄積アッセイにおける効力が過大評価された可能性が示唆される[7]。$S1P_1$ を自然発現する初代 HUVEC で cAMP 蓄積を測定したところ，これまでに得られた β アレスチン動員アッセイおよび GTPγS アッセイのデータと同等の結果が得られ，このアッセイ系に余剰受容体による影響は無いことが示唆された。なお，HUVEC における S1P 受容体（主に $S1P_{1,3}$）の発現パターンから，被験物質による cAMP 蓄積に対する作用は $S1P_1$ を介している可能性が最も高いが，他の受容体の寄与の可能性も否定できない。

他の S1P 受容体作動薬と比較して，エトラシモドは受容体の内在化に関して同等の効力および経時変化を示したが，cAMP の蓄積に対する効力は弱かった。以上のように，GTPγS アッセイおよび β アレスチン動員アッセイを用いた試験（2.1.5 項）と同様の結果が得られた。これらのデータはエトラシモドの活性の生理学的な意義をさらに裏付けるものであった。

Table 6.　ヒト $S1P_1$ を発現させた CHO 細胞株および初代 HUVEC 株を用いた cAMP 蓄積アッセイにおける S1P 受容体アゴニスト活性

被験物質	CHO-21BWc1		CHO-21BWc2		初代 HUVEC	
	平均 IC_{50} (95% CI) (nmol/L)	平均 E_{max} (% S1P)	平均 IC_{50} (95% CI) (nmol/L)	平均 E_{max} (% S1P)	平均 IC_{50} (95% CI) (nmol/L)	平均 E_{max} (% S1P)
エトラシモド	0.454 (0.326, 0.632)	103	0.465 (0.336, 0.643)	103	30.5 (19.9, 46.7)	101
フィンゴリモド-P	0.007 (0.005, 0.011)	101	0.008 (0.005, 0.012)	103	1.6 (1.2, 2.3)	94
Ozanimod	0.030 (0.020, 0.042)	104	0.039 (0.030, 0.053)	100	2.0 (1.2, 3.1)	102
シポニモド	0.028 (0.019, 0.041)	101	0.028 (0.017, 0.047)	103	1.6 (1.0, 2.4)	101
S1P	0.028 (0.020, 0.040)	101	0.028 (0.020, 0.039)	101	19.1 (9.5, 38.2)	96

フィンゴリモド-P：フィンゴリモド リン酸塩
E_{max}：S1P に対する相対最大効力(%)，CI：信頼区間
報告書番号 APD334.TS.012 Table 1, Table 2

Table 7.　ヒト $S1P_1$ を発現させた CHO 細胞株を用いた S1P 内在化アッセイにおける S1P 受容体アゴニスト活性

被験物質	CHO-21BWc1		CHO-21BWc2	
	平均 IC_{50} (95% CI) (nmol/L)	平均 E_{max} (% S1P)	平均 IC_{50} (95% CI) (nmol/L)	平均 E_{max} (% S1P)
エトラシモド	8.9 (3.9-20.0)	90	8.3 (4.1-16.6)	99
フィンゴリモド-P	3.7 (1.9-7.3)	103	1.4 (0.3-6.8)	99
Ozanimod	4.2 (2.4-7.3)	103	3.5 (2.1-5.6)	111
シポニモド	4.2 (0.8-22.6)	107	1.8 (0.9-3.9)	103
S1P	5211.9 (1482.5-18,323.1)	103	608.1 (35.4-10,447.2)	94

フィンゴリモド-P：フィンゴリモド リン酸塩
E_{max}：S1P に対する相対最大効力(%)，CI：信頼区間
報告書番号 APD334.TS.012 Table 3

2.1.7. 組換えヒト $S1P_2$ および $S1P_3$ を発現させた細胞株における細胞内カルシウム放出に対するエトラシモドの作用

報告書番号 DBR-[redacted]-005

ヒト $S1P_2$ または $S1P_3$ を発現した CHO 細胞の細胞内カルシウム放出試験を行い，エトラシモドの $S1P_2$ または $S1P_3$ に対する親和性および機能活性をさらに評価した。細胞内カルシウム放出アッセイは，Siehler および Guerini らの方法[8]を参照し，10 µmol/L のエトラシモドで評価した。

エトラシモドは，ヒト $S1P_2$ または $S1P_3$ を介した細胞内のカルシウム放出を刺激せず，またこれらのカルシウム放出アッセイにおいて，$S1P_2$ または $S1P_3$ の活性化を阻害しなかった（Table 8）。

Table 8.　カルシウム放出アッセイにおけるエトラシモドの $S1P_2$ および $S1P_3$ に対するアゴニスト作用およびアンタゴニスト作用

アッセイ [a]	参照化合物	刺激	エトラシモドの作用（10 µmol/L）	
			対照アゴニストの作用に対する相対阻害作用 (%)	対照アゴニストの作用に対する相対効力(%)
$S1P_2$（アゴニスト作用）	[redacted]	NR	-	8
$S1P_2$（アンタゴニスト作用）		S1P（30 nmol/L）	3	-
$S1P_3$（アゴニスト作用）		NR	-	8
$S1P_3$（アンタゴニスト作用）		S1P（3 nmol/L）	20	-

[a] すべてのアッセイでヒト組換え受容体を発現する CHO 細胞を用い，蛍光定量法により，22°C における細胞内カルシウム放出を測定した。
[b] 現時点で利用可能な $S1P_3$ アンタゴニストはない。
NR：反応なし
報告書番号 DBR-[redacted]-005 Table 7，Table 8，Table 9

2.1.8. I_{KACh} チャネル GIRK 電流へのエトラシモドおよび S1P の作用

報告書番号 ARN-[redacted]-01

単離ヒト心房心筋細胞における G タンパク依存性内向き整流性カリウム（GIRK）電流に対するエトラシモドの作用を検討し，エトラシモドによる活性化能を S1P と比較した。

冠動脈バイパス移植手術を受けた患者から採取したヒト心房の単一サンプル由来の初代心筋細胞を用いた。組織試料をホモジナイズし，コラゲナーゼ V 型とプロテアーゼ XXIV 型の存在下において，連続的に酸素でバブリング/攪拌して細胞を分離した。視覚的に心筋細胞を確認し，パッチクランプ法により電位固定下で全細胞記録を行った。G タンパク活性化カリウムチャネル（I_{KACh}）電流は，20 µmol/L のカルバコールの急速灌流（約 2～2.5 mL/分）および−90 mV の

保持電位から−100 mV への 500 ms 間のパルス刺激により惹起した。カルバコールをウォッシュアウト後に被験物質を灌流し，被験物質により惹起されたピーク内向き電流を 20 µmol/L のカルバコールにより惹起された電流のピーク振幅により補正した。

S1P は I_{KACh} を強力に活性化し，最大電流はカルバコールにより惹起される電流の約 90%まで増加した。エトラシモドの活性は S1P より弱く，最大活性はやや低値であった（カルバコールにより惹起される電流の 80%）。S1P による I_{KACh} 電流惹起作用の EC_{50} 値は 2.1 nmol/L であり，エトラシモドによる EC_{50} 値は 29.9 nmol/L であった。

より短い電圧パルスを用いて I_{KACh} 電流活性化の経時変化を評価したところ，S1P およびエトラシモドの作用の経時変化に実質的な違いはないことが示唆された。

2.1.9. I_{KACh} チャネル GIRK 電流に対するエトラシモドおよびその他の S1P 受容体調節薬の作用

報告書番号 APD334.TS.011

心筋細胞の GIRK 電流（I_{KACh} チャネル）に対する，エトラシモドおよびその他の S1P 受容体調節薬（ozanimod およびフィンゴリモド）の相対活性を評価した。

2.1.8 項に記載した方法と同様に，初代単離心筋細胞を用いてパッチクランプ法による電位固定下で全細胞記録を行った。この試験では，6 名のドナー（白人男性 1 名，白人女性 4 名，ヒスパニック系男性 1 名）の細胞を用いた。−70 mV の保持電位から+45 mV へ 1 段階でステップ刺激した後に 1 秒間に−140 mV まで変化させ（ランプ法），次のステップまで 2 秒間，−70 mV に保持した。カルバコール（10 µmol/L）を用いて I_{KACh} 電流を惹起し，細胞の安定性および応答性を確認した。被験物質は，0.1～1000 nmol/L の範囲で適用した。

エトラシモド，ozanimod，フィンゴリモドによる I_{KACh} 活性化の程度を下表に示す（Table 9）。エトラシモドは ozanimod およびフィンゴリモドと比べて I_{KACh} 活性化の程度は低かった。

Table 9.　ヒト心筋細胞 GIRK 電流（I_{KACh}）に対する S1P 受容体調節薬の効果（10 µmol/L カルバコールによる活性の%相対活性）

濃度（nmol/L）	エトラシモド	Ozanimod	フィンゴリモド
0.1	7.9 ± 2.1	11.1 ± 2.7	10.4 ± 4.9
1.0	12.6 ± 2.6	18.2 ± 3.8	20.0 ± 5.7
10	19.2 ± 4.0	31.2 ± 5.0	35.8 ± 8.2
100	27.1 ± 5.4	53.0 ± 5.0	45.3 ± 9.0
1000	39.0 ± 7.8	70.4 ± 7.1	53.3 ± 9.6

平均値±標準誤差
報告書番号 APD334.TS.011 Table 3，Table 6，Table 9

2.2. In vivo

経口投与したときのエトラシモドの主要な薬理作用について，マウスを用いた 7 つの in vivo 試験およびラットを用いた 1 つの in vivo 試験で検討した。全体として，これらの試験結果から以下のことが示された：

- エトラシモドは，健常マウスの血中リンパ球数を減少させ，これはリンパ節からのリンパ球移出の抑制作用に起因する可能性が考えられる
- UC/実験的大腸炎のモデルマウスにおいて，エトラシモドは免疫性の炎症に対して有効である
- エトラシモドは広範な疾患モデルにおいて有効性を示し，腸管外の UC の合併症およびより広範な免疫性疾患に適用できる可能性が示唆される
- エトラシモドは，コンカナバリン A 誘発急性肝炎モデルマウスにおける免疫性炎症に対して有効性を示す
- エトラシモドは多発性硬化症モデルマウスにおいて，リンパ球の移出および疾患進行に対して有効性を示す
- エトラシモドはフルオレセインイソチオシアネート異性体 I（FITC）誘発接触過敏症モデルにおいて，局所リンパ節からのリンパ球の移出を抑制し，炎症に起因する血中および局所組織中のリンパ球レベルの増加ならびにリンパ球表現型の変化を軽減する

2.2.1. エトラシモドのマウスの末梢血リンパ球に対する効果

報告書番号 DBR-[redacted]-018

健常雌 C57BL/6 マウスを用い，エトラシモドによる血中リンパ球減少作用を評価した。具体的には，陽性対照として S1P 受容体調節薬のフィンゴリモドを用い，エトラシモドのリンパ球サブセットに対する影響を評価した。雌 C57BL/6 マウス（5 匹/群）に，0.5%メチルセルロースを溶媒として調製したエトラシモド 0.1，0.3 または 1.0 mg/kg あるいはフィンゴリモド 1.0 mg/kg を単回経口投与し，投与後 5 時間および 48 時間に採血した。全血から白血球を分離，染色し，フローサイトメトリーで分析した。

エトラシモド 0.1，0.3 または 1.0 mg/kg を経口投与したとき，溶媒対照群と比較して $CD4^+$および $CD8^+$ T リンパ球ならびに B リンパ球の顕著で用量依存的な減少が認められたが，単球，顆粒球およびナチュラルキラー（NK）細胞数に明らかな影響は認められなかった（Table 10）。

さらに，エトラシモドによる種々のリンパ球サブタイプ減少作用の程度は，フィンゴリモドの 70～95%程度であることが示唆された。いずれの投与群においても，溶媒投与群と比較して，NK 細胞および骨髄系細胞の顕著な減少は認められなかった。

Table 10.　種々の免疫細胞サブセットにおけるエトラシモド誘発性血中リンパ球減少

被験物質	$CD4^+$ T 細胞	$CD8^+$ T 細胞	B 細胞	単球	NK 細胞	顆粒球
0.5% メチルセルロース	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.27	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.56
フィンゴリモド (1 mg/kg)	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.27 ± 0.06	1.17 ± 0.36	0.76 ± 0.23	1.05 ± 0.44
エトラシモド (0.1 mg/kg)	0.28 ± 0.06	0.29 ± 0.05	0.34 ± 0.11	0.90 ± 0.17	0.76 ± 0.20	1.42 ± 0.41
エトラシモド (0.3 mg/kg)	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.86 ± 0.12	0.66 ± 0.14	1.20 ± 0.27
エトラシモド (1 mg/kg)	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.20 ± 0.02	1.00 ± 0.18	0.72 ± 0.11	1.36 ± 0.23

データは総リンパ球数に対する割合の平均値±標準誤差として示す。
報告書番号 DBR-[redacted]-018 Table 1

2.2.2. エトラシモドの実験的大腸炎モデルマウスにおける効果

報告書番号 APD334.TS.001

CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T 細胞を重症複合型免疫不全（SCID）マウスに養子移入して誘発した実験的大腸炎モデルを用い，エトラシモドによる発症予防能を検討した。

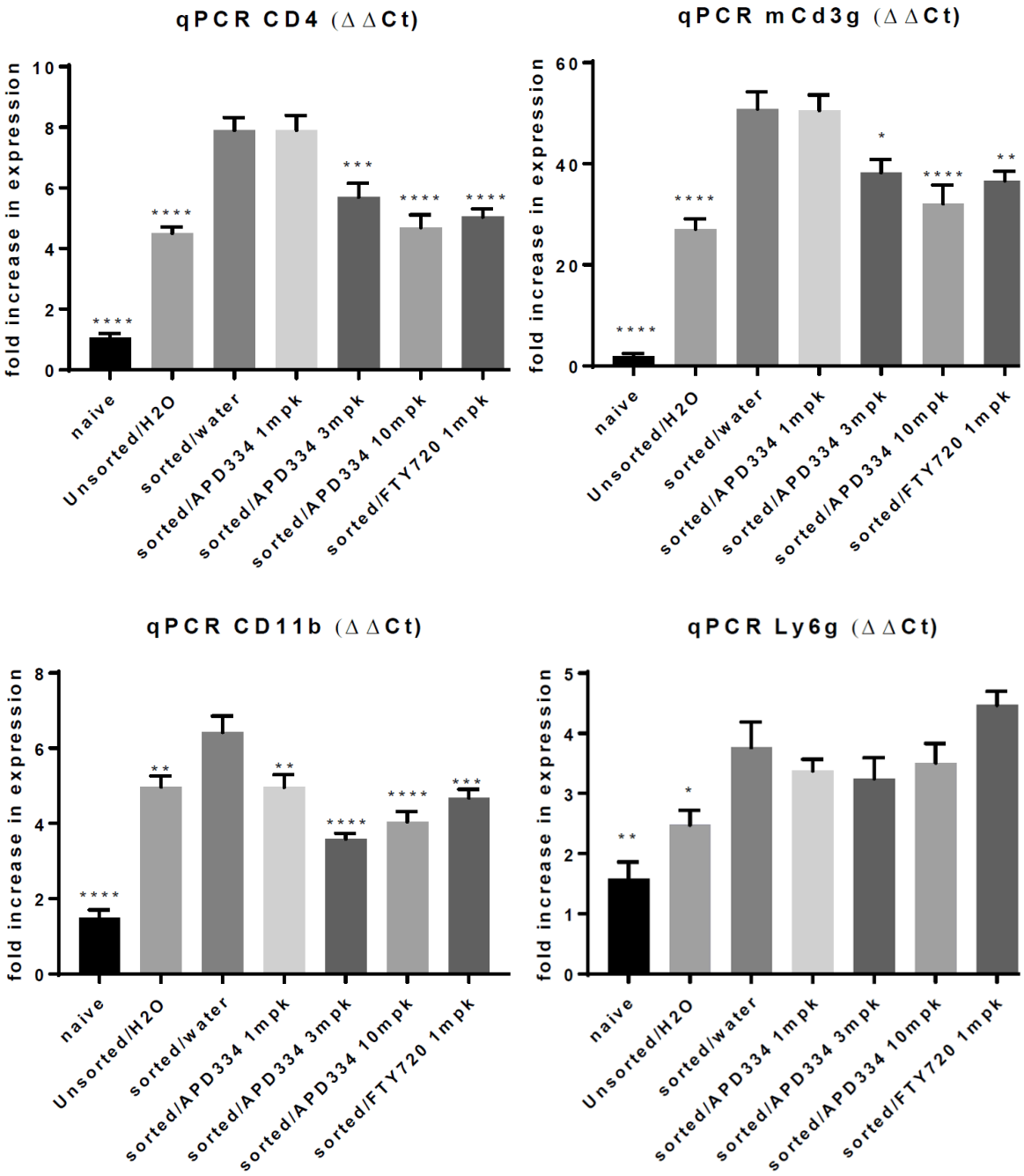
野生型マウスから分離した CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T 細胞を雌 SCID マウスに移入した大腸炎モデルでは，ヒト UC に類似した結腸の炎症および病理所見が誘発される。T 細胞移入日から剖検前日（試験 32 日）まで，エトラシモド（1，3 および 10 mg/kg/日），フィンゴリモド（1 mg/kg/日，陽性対照）または溶媒（陰性対照）を予防的に反復経口投与した（12 匹/群）。組織を採取する前に採血し，マウスを安楽殺した。その後，大腸切片および組織切片を採取し，病理組織学的検査により重症度を評価した。定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）により組織を分析し，標的組織の免疫細胞マーカーおよびサイトカインの RNA レベルを定量した。

大腸炎の誘発により，CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T 細胞移入 SCID マウスから採取した大腸組織における免疫細胞マーカーおよびサイトカインの発現量が増加した。CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T 細胞移入 SCID マウスの消化管組織において，エトラシモド投与群では溶媒対照群（CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T 細胞移入マウスに溶媒投与）と比較して $CD4^+$（T 細胞，NK 細胞，樹状細胞），CD3γ（T 細胞）および CD11b（単球，顆粒球，樹状細胞および一部の NK 細胞）の低値が認められたが，Ly6G（好中球）について変化は認められなかった（Figure 1）。エトラシモド（3 mg/kg/日以上）またはフィンゴリモド（1 mg/kg/日）を投与したところ，消化管組織中の T 細胞および単球マーカーの発現は溶媒対照群と比較していずれも同程度に有意に減少し，CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T 細胞移入 SCID マウスの大腸における T 細胞および単球の浸潤/拡散の減少が示唆された。エトラシモド 3 mg/kg/日群およびフィンゴリモド 1 mg/kg/日群では，溶媒対照群（CD4 陽性 $CD45RB^{high}$ T 細胞移入マウスに溶媒投与）と比較して消化管組織における炎症性サイトカイン［腫瘍壊死因子 α（TNFα），インターロイキン（IL）-1β，IL-6，IL-17A］の有意な減少および抗炎症性の IL-10 の増加が認められた。

病理組織学的検査では，CD4 陽性 CD45RB^{high} T 細胞移入マウスにエトラシモド（3 mg/kg/日）を投与した群およびフィンゴリモド（1 mg/kg/日）を投与した群において，ソートされた T 細胞を移入した溶媒対照群と比較して，粘膜肥厚の有意な減少および病理組織学的スコアの低下が認められた。大腸断面の病理組織学的検査では，対照群（CD4 陽性 CD45RB^{high} T 細胞移植マウスに溶媒投与）と比較して，エトラシモド群およびフィンゴリモド群のいずれにおいても炎症性細胞浸潤の抑制が認められた。

以上の結果から，エトラシモドの経口投与は，CD4 陽性 CD45RB^{high} T 細胞を養子移植した SCID マウスで誘発される大腸炎の抑制に有効であることが示された。3 mg/kg/日以上のエトラシモドの予防的投与により，体重減少，大腸の炎症，T 細胞および単球の浸潤などの重要な大腸炎の指標が有意に抑制された。また，エトラシモドにより大腸における炎症性サイトカイン産生が減少した。

Figure 1. エトラシモドのT細胞および骨髄系細胞の大腸への浸潤に対する作用



* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001
データはGAPDHと比較した相対値で記載した（対照群との比較，Dunnett検定）
ΔΔCt：比較Ct法，APD334：エトラシモド，CD4：CD4陽性T細胞/ナチュラルキラー細胞/樹状細胞，
CD3g：総T細胞，CD11b：単球/顆粒球/樹状細胞/数種のナチュラルキラー細胞，FTY720：フィンゴリモド，
mpk：mg/kg，H2O：水，Ly6g：好中球
報告書番号APD334.TS.001 Figure 4

2.2.3. エトラシモドの自然発生性大腸炎モデルマウスにおける効果

報告書番号 APD334.TS.036

MDR1a 遺伝子を KO した自然発生性大腸炎モデルマウスにおけるエトラシモドの効果を検討した。

SPF（specific pathogen-free）環境で飼育された MDR1a KO（MDR1a-/-）マウスは，自然発生的に重度の腸炎を発症することが報告されている。雌 MDR1a KO マウス（12 匹/群）にエトラシモドを 1 mg/kg または 3 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与したとき，炎症マーカーおよび病理組織学的所見が用量依存的かつ統計学的に有意に改善した。すなわち，体重増加量の減少，内視鏡スコアの重症度，結腸重量の増加，結腸の長さの短縮および結腸の重量/長さの比が改善し，3 mg/kg では，結腸における IL-10，CXCL9，IL-1β，CXCL10，IL-6，CXCL1，TNFα，IL-17A のレベルが溶媒対照群と比較して有意に低下した。また，有意差は認められなかったものの溶媒対照群と比較して IFNγも減少（$p = 0.053$）した。さらに蛋白濃度で補正した濃度では，3 mg/kg の結腸における IL-10，IL-1β，IFNγ，CXCL1，TNFαおよび IL-17A の濃度は，溶媒対照群と比較して有意に減少したが，IL-4 および IL-23 の濃度には有意差は認められなかった。また，結腸の炎症，腺欠損，過形成，浮腫，好中球スコアおよびリンパ球凝集体数などの複数のパラメータが改善し，すべてのエトラシモド投与群で血中リンパ球数が有意に減少した。脾臓を採取してフローサイトメトリーにより分析したところ，エトラシモド投与群においてリンパ球レベルの顕著な低下が示された。

以上の試験結果から，エトラシモド（1 mg/kg/日または 3 mg/kg/日）を MDR1a KO マウスに経口投与したとき，エトラシモドは自然発生性大腸炎の主要な指標である結腸重量，結腸の長さを含む種々の病理組織学的所見を改善し，また結腸における炎症性サイトカイン産生を抑制し，自然発生性大腸炎の軽減に有効であることが示された。

2.2.4. コンカナバリン A 誘発肝炎モデルマウスにおけるエトラシモドの効果

報告書番号 APD334.TS.003

自己免疫性肝炎などの炎症性肝疾患では炎症に T 細胞が重要な役割を果たしていることから，コンカナバリン A 誘発急性肝炎モデルを用い T 細胞が介在する炎症に対するエトラシモドの抑制作用を検討した。

雄 BALB/c マウス（10 匹/群）に溶媒，1 または 3 mg/kg のエトラシモドを単回経口投与，25 mg/kg のプレドニゾロン（陽性対照）を単回腹腔内投与，あるいは 1 mg/kg のフィンゴリモド（FTY720，陽性対照）を単回経口投与し，その後 12.5 mg/kg のコンカナバリン A を静脈内投与した。12 時間後にマウスを安楽殺し，採取した血液および肝臓を適宜固定または凍結し，血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）測定およびフローサイトメトリーによる肝臓および血中単核球における免疫細胞プロファイル評価（$CD3^+$，$CD4^+$，$CD8^+$，$CD19^+$および$CD11b^+$細胞の%割合）を行った。

エトラシモド（1 mg/kg および 3 mg/kg）ならびに陽性対照のプレドニゾロン（25 mg/kg）およびフィンゴリモド（1 mg/kg）は，コンカナバリン A による血清中 ALT 上昇を溶媒対照と比較して有意に抑制した（Table 11）。プレドニゾロンにより，肝臓における $CD3^+$および $CD11b^+$を除く全ての単核球型が減少したが，血中の単核球数に変化は認められなかった。フィンゴリモドにより，肝臓および血中における $CD11b^+$を除くすべての単核球型が減少した。1 mg/kg および 3 mg/kg のエトラシモドにより，肝臓における $CD11b^+$を除く全種類のリンパ球数が減少したが，血中においては $CD4^+$細胞数のみが減少した。3 mg/kg では，エトラシモドによる $CD19^+$細胞減少に統計学的有意差はみられなかったが，1 mg/kg エトラシモドと同様の傾向がみられた（Table 13）。

コンカナバリン A で炎症刺激した急性肝炎誘発モデルにおいて，エトラシモドは肝臓での単核球数を減少させたが，陽性対照であるフィンゴリモドと比較すると，有意な減少がみられた血中単核球の表現型の数は少なかった。

Table 11.　コンカナバリン A 誘発血清 ALT 増加に対するエトラシモドの作用

	溶媒	プレドニゾロン 25 mg/kg	エトラシモド 1 mg/kg	エトラシモド 3 mg/kg	フィンゴリモド 1 mg/kg
ALT（IU/L）	1183	38	69	63	65
標準誤差	289	1	14	22	14
p 値（溶媒との比較）	NA	0.0033	0.0039	0.0038	0.0038

NA：該当なし
報告書番号 APD334.TS.003 Table 4

Table 12.　肝臓における単核球の表現型（%）

細胞サブタイプ	溶媒	プレドニゾロン 25 mg/kg	エトラシモド 1 mg/kg	エトラシモド 3 mg/kg	フィンゴリモド 1 mg/kg
$CD3^+$	13.12 (3.93)	12.47 (3.41)	9.00[a] (3.62)	7.32 [a] (1.44)	4.47[a] (1.24)
$CD4^+$	5.65 (2.52)	2.54 [a] (0.93)	0.81 [a] (0.37)	0.69 [a] (0.13)	0.60 [a] (0.28)
$CD8^+$	2.40 (1.55)	1.18[a] (0.31)	0.35[a] (0.16)	0.36[a] (0.14)	0.14[a] (0.10)
$CD19^+$	6.16 (1.93)	4.00[a] (1.02)	4.24[a] (1.31)	4.69 (1.10)	3.27[a] (0.86)
$CD11b^+$	3.30 (1.22)	8.12[a] (2.96)	6.72[a] (3.75)	5.40[a] (1.55)	3.41 (0.94)

[a] $p < 0.05$（溶媒との比較）
平均値（標準偏差）
報告書番号 APD334.TS.003 Table 5

Table 13.　血中における単核球の表現型（%）

細胞サブタイプ	溶媒	プレドニゾロン 25 mg/kg	エトラシモド 1 mg/kg	エトラシモド 3 mg/kg	フィンゴリモド 1 mg/kg
$CD3^+$	3.50 (1.87)	2.88 (1.51)	4.56 (0.96)	4.00 (1.57)	1.81[a] (1.22)
$CD4^+$	0.48 (0.21)	0.56 (0.42)	0.29[a] (0.14)	0.14[a] (0.08)	0.15[a] (0.14)
$CD8^+$	0.04 (0.05)	0.09 (0.07)	0.04 (0.05)	0.01 (0.03)	0.00[a] (0.00)
$CD19^+$	9.92 (3.69)	13.05 (8.66)	9.83 (3.54)	9.47 (2.60)	4.38[a] (1.80)
$CD11b^+$	45.79 (13.38)	34.79 (18.89)	37.49 (11.23)	34.67 (14.50)	45.29 (21.21)

[a] $p < 0.05$（溶媒との比較）
平均値（標準偏差）
報告書番号 APD334.TS.003 Table 6

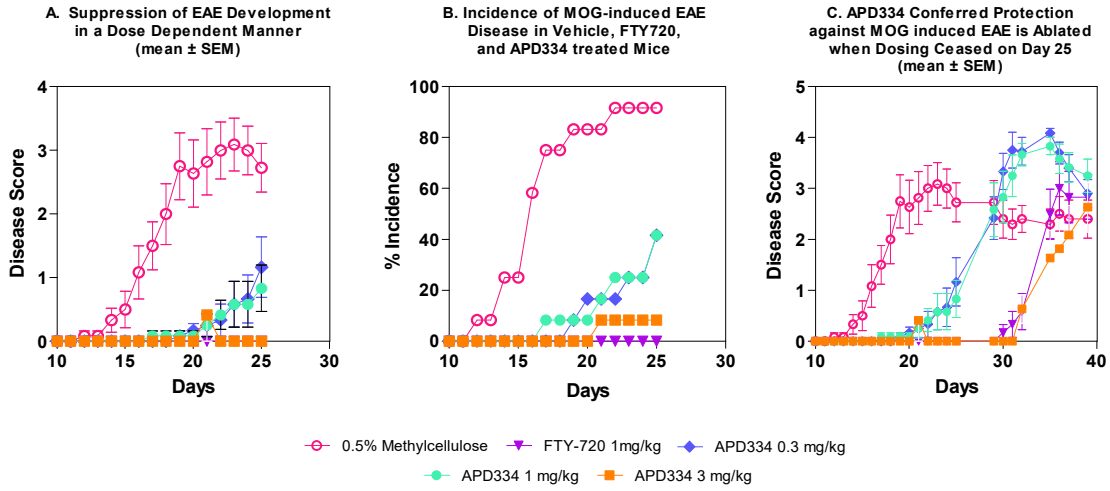
2.2.5. MOG 誘発 EAE モデルマウスにおけるエトラシモドの予防効果

報告書番号 DBR-[redacted]-013

マウスにおけるミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）誘発実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発症に対するエトラシモドの予防的投与の効果を検討した。試験初日に，雌 C57BL/6 マウスに MOG_{35-55} ペプチドおよび百日咳毒素を投与した。また，その 2 日後（48 時間後）にも百日咳毒素を投与した。その後，マウス（12 匹/群）にエトラシモド（0.3，1 および 3 mg/kg/日）またはフィンゴリモド（1 mg/kg/日）を試験 3 日から試験 25 日まで毎日予防的に経口投与した。投与後 7 日（試験 10 日）から試験 39 日まで症状のスコアリングを行った。

エトラシモドの予防的投与により，溶媒投与群と比較して用量依存的に MOG 誘発 EAE の発症が有意に抑制された（Figure 2）。陽性対照のフィンゴリモド（1 mg/kg/日）と同様に，エトラシモド（0.3 mg/kg/日以上）は投与期間中の疾患発症を抑制した。予定した投与終了時である試験 25 日以降に，全ての投与群でフィンゴリモドおよびエトラシモドによる予防効果が停止し，EAE の症状が進行した。これらの結果から，1 日 1 回のエトラシモド投与は野生型マウスの MOG 誘発 EAE に対する予防に有効であることが示された。

Figure 2.　マウスのMOG誘発EAE発現に対するエトラモドの予防効果



平均値 ± 標準偏差（12匹/群）
症状スコアリング：0 =健康，1 = 尾の下垂または後肢の筋力低下，2 =尾の下垂および肢の筋力低下または2肢以上の筋力低下，3 =肢の重度の筋力低下または肢の重度麻痺，4 = 2肢以上の麻痺，5 =死亡
報告書番号DBR-[redacted]-013 Figure 2，Figure 3，Figure 4

2.2.6. マウスの MOG 誘発 EAE に対するエトラシモドの治療効果

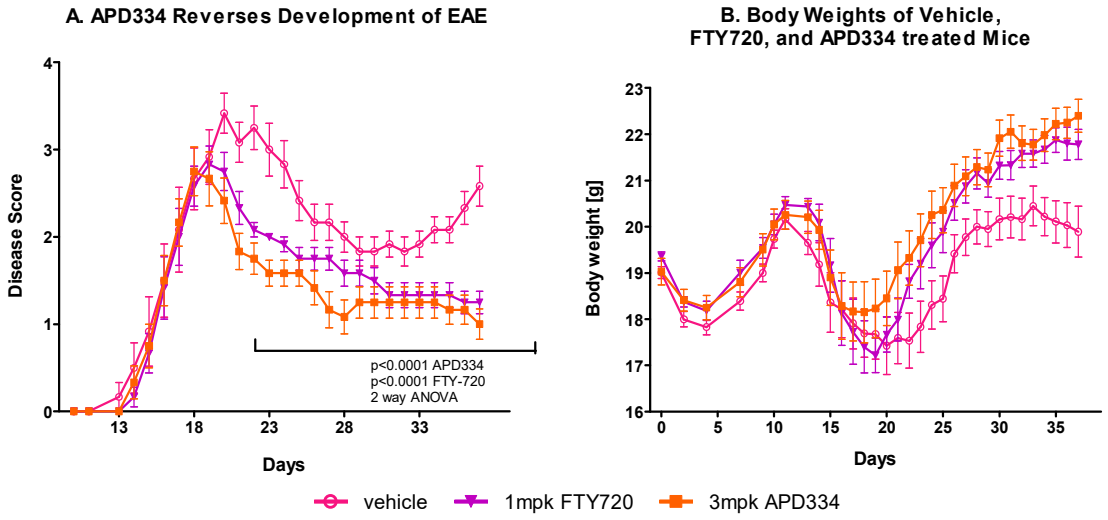
報告書番号 DBR-[redacted]-017

C57BL/6 マウスにおける MOG 誘発 EAE の病態が最大に達した時に，エトラシモドおよび他の $S1P_1$ 作動薬を治療的投与した場合の回復作用を評価した。

2.2.5 項と同様に，試験初日に雌 C57BL/6 マウス（12 匹/群）に MOG_{35-55} ペプチドおよび百日咳毒素を投与した。また，その 2 日後（48 時間後）にも百日咳毒素を投与した。EAE の病態が最大に達した試験 18 日から試験 37 日までエトラシモド（3 mg/kg/日）またはフィンゴリモド（1 mg/kg/日）を毎日反復経口投与した。試験 10 日から試験 37 日まで症状のスコアリングを行った。試験 37 日に脊髄，脳幹および小脳を採取し，蛍光顕微鏡検査により各種リンパ球表現型の分布を検討した。

フィンゴリモド（1 mg/kg/日）と同様に，エトラシモド（3 mg/kg/日）は溶媒対照群と比べて疾患スコアを有意に改善し（Figure 3），このモデルにおいてエトラシモドが MOG 誘発 EAE 症状の寛解に有効であることが示された。さらに，EAE の寛解は，フィンゴリモドおよびエトラシモド投与動物でみられた脊髄，脳幹および小脳における浸潤性 $CD4^+$ T リンパ球数の顕著な減少と相関していた。これらの結果から，エトラシモドが T 細胞の脊髄および脳幹への浸潤を阻害し，慢性疾患を抑制することが示唆された。

Figure 3.　マウスのMOG誘発EAEに対するエトラモドの治療効果



平均値±標準誤差（12匹/群）
症状スコアリング：0 =健康，1 = 尾の下垂または後肢の筋力低下，2 =尾の下垂および肢の筋力低下または2肢以上の筋力低下，3 =肢の重度の筋力低下または肢の重度麻痺，4 = 2肢以上の麻痺，5 =死亡
ANOVA：分散分析，APD334：エトラシモド，FTY720：フィンゴリモド，mpk：mg/kg
報告書番号DBR-[redacted]-017，Figure 1，Figure 2

2.2.7. マウスの FITC 誘発接触過敏症に対するエトラシモドの効果

報告書番号 APD334.TS.022

アトピー性皮膚炎の実験モデルである接触過敏症モデルマウスにおけるエトラシモドの予防的および治療的投与の有効性を評価した。このモデルでは，試験 0 日および試験 5 日に剃毛した動物の体側に FITC を塗布した後，試験 10 日から試験 12 日に両耳の背面に FITC を塗布し，接触過敏症を誘発した。

雌 BALB/c マウスを 15 匹/群に無作為に割り付け，試験-1 日（予防的投与群）または試験 7 日（治療的投与群）から試験 12 日まで溶媒またはエトラシモド（1 または 3 mg/kg/日）を反復経口投与した。また陽性対照として，試験-1 日～12 日までトファシチニブ（20 mg/kg/日）を反復経口投与した。試験 11 日～13 日に耳介の皮膚組織を採取した。試験 13 日に動物を安楽殺し，耳介，頚部リンパ節および血液を採取した。頚部リンパ節および耳介の組織をフローサイトメトリーにより分析し，血液は血球計数/白血球分類分析器により分析した。耳介検体中の炎症反応の変化をマルチプレックスサイトカイン解析により評価した。

無処置動物と比較して，試験 10～12 日に FITC を塗布したマウスでは，耳介の肥厚，血中単球数の増加およびリンパ球数の減少，頚部リンパ節および耳介組織中のリンパ球発現および表現型の変化［例，$CD45^{+}$細胞，B 細胞，T 細胞，好酸球および樹状細胞（頚部リンパ節のみ）の総

数の増加］ならびに耳介組織中におけるサイトカインレベルの変化（例，IL-4 および IL-5 の上昇，IL-10 の低下）といった本モデルで予測される過敏症の所見がみられた。

溶媒を投与した疾患モデルマウスと比較して，エトラシモド（1 mg/kg/日および 3 mg/kg/日）を予防的に投与した疾患モデルマウスで顕著な症状の改善が認められた。すなわち，耳介の肥厚の減弱ならびに耳介組織内の $CD4^+$および $CD8^+$ T 細胞の減少が認められ，炎症組織および血中のリンパ球数の減少，ならびに組織中の IL-4，IL-6 および TNF-αなどの炎症性サイトカインの産生低下を伴っていた。予防的投与と比較して治療的投与における全体的な効果は弱く，有効性は限定的であったが，免疫学的効果は類似していた。

以上，FITC 誘発過敏症皮膚炎モデルマウスにおいて，エトラシモドは耳介の皮膚炎を軽減し，これは，$CD4^+$および $CD8^+$ T 細胞を含む皮膚における複数の免疫細胞の顕著な減少，ならびに組織のサイトカイン産生の減少によって裏付けられた。エトラシモドの予防的および治療的投与における頚部リンパ節と耳介組織での効果に関する詳細は当該試験報告書に記載したが，予定される UC 適応に関連する主な作用は，局所組織における炎症の軽減，局所リンパ節からの免疫細胞の移出および炎症を起こした標的組織における免疫細胞の集積の抑制である。

2.2.8. ラットのコラーゲン誘発性関節炎に対するエトラシモドの効果

報告書番号 DBR-[redacted]-016

雌 Lewis ラットを用いて，不完全フロイントアジュバントおよびウシ由来コラーゲンの皮下投与により誘発される炎症，軟骨破壊および骨吸収に対するエトラシモドの抑制作用を検討した。

コラーゲン誘発性関節炎が進展する試験 0～16 日に，溶媒，エトラシモド（0.3，1 または 3 mg/kg/日），フィンゴリモド（1 mg/kg/日，陽性対照）またはメトトレキサート（0.075 mg/kg/日）を反復投与した（10 匹/群）。足関節の直径（試験 9 日より連日測定）および安楽殺した試験 17 日の後肢重量ならびに足関節，膝関節および坐骨神経の病理組織学的評価に基づいて有効性を評価した。

疾患モデルに溶媒対照を投与した群（溶媒対照群）と比較して，エトラシモドの予防的投与により，すべての用量で足関節の直径の有意な減少（溶媒対照群と比較して 3 mg/kg で最大 96%減少）が認められ，1 および 3 mg/kg/日で膝関節および足関節の病理組織学的スコアが改善した。用量依存的なエトラシモドの作用は，本試験で認められたメトトレキサートおよび陽性対照フィンゴリモドの作用と類似していた。なお，本試験におけるメトトレキサートおよびフィンゴリモド[9]の結果は公表文献の報告と一致していた。

3. 副次的薬理試験

各種 GPCR，イオンチャネル，トランスポーターおよび酵素の標準的なパネルを用い，エトラシモドのオフターゲット作用を評価した。これらの試験の結果，$S1P_1$ に対するエトラシモドの

高い親和性および特異性を考慮すると，エトラシモドのオフターゲット作用に関するさらなる評価は不要と考えられた。

3.1. エトラシモドの選択性

3.1.1. 受容体，イオンチャネルおよび神経伝達物質トランスポーターに対するエトラシモドの選択性

報告書番号 DBR-[redacted]-005

放射性リガンド結合アッセイにより 97 の受容体，イオンチャネルおよび神経伝達物質トランスポーターに対するエトラシモドの親和性を評価し，エトラシモドのオフターゲット作用を検討した。

遺伝子組換えにより標的分子を発現させた CHO 細胞または HEK293 細胞，あるいは内因性に標的発現するヒト細胞株を用いた。各アッセイについて，10 µmol/L のエトラシモドを用いて 3 回測定した。阻害が 50%を上回る場合，エトラシモドが標的に顕著な影響を及ぼすと考えられたが，20%～50%の阻害または活性が認められる場合，弱～中等度の影響を及ぼすと考えられ，20%未満の場合は影響なしと考えた。

アッセイ濃度を 10 µmol/L として試験した結果，9 つの標的に対してエトラシモドは放射性リガンド結合を中等度～顕著に阻害した（Table 14）。エトラシモドは 6 つの標的 GPCR［アデノシン A_{2a}，A_3，CCK_2（CCK_B），CXCR2（$IL\text{-}8_B$），$5\text{-}HT_3$ およびグルカゴン受容体］に対して，顕著に結合を阻害した。また，ドパミン D_{2S}，D_3 および $5\text{-}HT_{1A}$ の 3 つの標的に対して，中等度に結合を阻害した。その後の阻害定数（K_i）の測定では，µmol/L オーダーでのみ作用が認められた（3.1.2 項）。本試験で評価したイオンチャネルおよび神経伝達物質トランスポーターに対しては，エトラシモドはいずれも顕著な親和性を示さなかった。

Table 14.　エトラシモドによる放射性リガンドに対する中等度～顕著な結合阻害

受容体 [a]	阻害率（%）
アデノシン A_{2A}	62*
アデノシン A_3	99*
CCK_2 (CCK_B)	91*
CXCR2 ($IL\text{-}8_B$)	73*
ドパミン D_{2S}	45
ドパミン D_3	46
$5\text{-}HT_{1A}$	46
$5\text{-}HT_3$	60*
グルカゴン受容体	88*

[a] すべてのアッセイでヒト組換え受容体を用いた
* 50%超の阻害は，標的に対するエトラシモドの顕著な影響を示す。
報告書番号 DBR-[redacted]-005 Table 2

3.1.2. 特定の受容体パネルにおけるエトラシモドの結合親和性

報告書番号 DBR-[redacted]-005

3.1.1 項で特定された 9 つの標的に対するエトラシモドの結合親和性および K_i 値を求めるためのさらなる検討を行った。これらの標的に対するエトラシモドの結合の用量反応性を評価し，標的親和性を定量的に評価した。

各アッセイでは 8 濃度のエトラシモドについて，各濃度で 2 回測定した。グルカゴン受容体アッセイ（4℃で 6 時間インキュベート）を除き，すべての試料を室温で 60 分間または 120 分間インキュベートし，シンチレーションカウンターにより測定した。

評価した 9 つの受容体のいずれにおいても，エトラシモドは放射性リガンドと臨床的に意味のある濃度で競合しなかった。これらに対する K_i 値は 2.00 µmol/L（アデノシン A_3）～ 15.0 µmol/L（5-HT_3）であり，いずれに対しても低い結合親和性を示した（Table 15）。一方，エトラシモドの薬効の標的である $S1P_1$ に対する EC_{50} 値は 6.10 nmol/L（Table 3）であった。

Table 15. 受容体に対するエトラシモドの親和性および K_i 値

受容体 [a]	K_i (µmol/L)
5-HT_{1A}	11.0
5-HT_3[b]	15.0
アデノシン A_{2A}	8.80
アデノシン A_3	2.00
CCK_2 (CCK_B)	3.80
CXCR2 (IL-8_B)	4.00
ドパミン D_{2S}[b]	4.70
ドパミン D_3[b]	3.10
グルカゴン受容体 [c]	2.20

[a] 特に記載のない限り，アゴニスト型放射性リガンドおよび遺伝子組み換えヒト型受容体発現細胞から単離した膜を用いた。
[b] アンタゴニスト型放射性リガンド
[c] ヒト IM-9 細胞（細胞質）から単離された膜に発現する内因性受容体
報告書番号 DBR-[redacted]-005 Table 4

3.1.3. エトラシモドの酵素活性に対する阻害作用

報告書番号 DBR-[redacted]-005

13 種の酵素に対するエトラシモドの阻害活性を評価した。各アッセイについて，10 µmol/L のエトラシモドで 2 回測定した。

試験した 10 µmol/L において，評価した 13 種類の酵素のいずれに対してもエトラシモドによる顕著な阻害作用は認められなかった。すべての相互作用の程度は弱～中等度であり，さらなる評価は不要と判断した（Table 16）。

Table 16.　エトラシモドによる酵素阻害

酵素 [a]	参照化合物	阻害率（%：対照値との比較）
COX1	[redacted]	10
COX2		45
PDE4D		–5
エラスターゼ [b]		15
MMP-1		1
MMP-2		13
MMP-9		–5
トリプターゼ [c]		5
EGFR キナーゼ [d]		35
ERK2 (P42mapk)		–21
JAK3		8
PKCα		5
ZAP70 キナーゼ		10

[a] 特に記載のない限り，遺伝子組み換えヒト型酵素を用いた。
[b] ヒト白血球由来内因性酵素
[c] ヒト肺由来内因性酵素
[d] A-431 細胞由来内因性酵素
報告書番号 DBR-[redacted]-005 Table 5，Table 6

4. 安全性薬理試験

ICH S7A および S7B ガイドラインに記載される安全性薬理試験として一連のコアバッテリー試験を実施し，生命維持に重要な影響を及ぼす器官系（中枢神経系，呼吸系および心血管系）に対するエトラシモドの影響を検討した。すべての試験は GLP に準拠して実施した。In vitro および in vivo の安全性薬理試験を概要表 M2.6.3 Table 4 に記載する。

4.1. 心血管系

心血管系に対する安全性薬理について，in vitro hERG 試験および無麻酔イヌにおけるテレメトリー試験で評価した。

4.1.1. hERG カリウムチャネルに対する作用

報告書番号 TX[redacted]025

hERG カリウムチャネル電流（急速活性化遅延整流性カリウムチャネル電流，I_{Kr}）に対するエトラシモドの in vitro における作用を GLP 適用下で評価した。

hERG を安定発現させた HEK293 細胞を用い，溶媒対照（n=3），エトラシモド（1 または 3 µmol/L，n=3）および陽性対照としてテルフェナジン（60 nmol/L，n=2）を添加し，ピーク電流を測定した。

エトラシモド群では溶媒対照群と比較して，hERG 電流が 1 µmol/L で 31.4 ± 1.5%，3 µmol/L で 58.9 ± 2.0%増加した（平均値±標準誤差，n = 3）。より高濃度ではエトラシモドの溶媒への溶解性が不十分であったことから，他の濃度での評価は行わなかった。阻害ではなく，hERG チャネル電流の増加のみが認められたため，エトラシモドの hERG 電流阻害に対する IC_{50} 値は得られなかった。

4.1.2. テレメトリー装着ビーグル犬を用いた心血管系評価試験

報告書番号 TX[redacted]015

テレメトリー装着ビーグル犬を用い，エトラシモド経口投与時の心血管系に対する影響を GLP 適用下で評価した。

ビーグル犬（雌雄各 4 匹）に，ラテン方格法で 7 日の投与間隔でエトラシモドを経口投与した。各投与日に 0（溶媒），10，20 または 40 mg/kg のエトラシモドを，各動物に異なる順序で投与し，各投与日に 2 匹の動物に各用量が投与されるように割り当てた。各投与日の投与後約 4 時間および 24 時間に一般状態を観察した。投与 1 時間前から投与後 24 時間まで，心拍数，動脈圧，脈圧，心電図波形および体温を継続的に測定した。各データ収集期間（投与後約 24 時間）終了時に，血漿中エトラシモド濃度を測定するために採血した。

最高用量（40 mg/kg）のエトラシモドを単回経口投与したとき，投与後約 2～4 時間に収縮期血圧（11.7%），拡張期血圧（14.2%）および平均動脈圧（12.4%）の一過性で軽度の上昇（対照群との比較）が認められた。心拍数，脈圧，体温または心電図パラメータ（補正 QT 間隔を含む）は，いずれの用量においてもエトラシモドに関連する影響は認められなかった。

以上の結果に基づき，本試験における無毒性量（NOAEL）は検討した最高用量である 40 mg/kg と判断した。この用量における投与後 24 時間（心血管系パラメータ測定終了時）の血漿中エトラシモド濃度は，33.8～44.5 µg/mL であった。また，イヌを用いた 4 週間投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]008）の試験 1 日のトキシコキネティクス結果から，40 mg/kg/日を投与したときの C_{max} は 43.1 µg/mL（雄）および 41.8 µg/mL（雌）と予測された。

4.2. 中枢神経系

4.2.1. 雄ラットを用いた中枢神経系評価試験

報告書番号 TX[redacted]016

雄 Sprague Dawley ラットを用いた Irwin の変法により，エトラシモドを単回経口投与したときの中枢神経系への影響を GLP 適用下で評価した。

雄 Sprague Dawley ラット（6 匹/群）にエトラシモドを 0（溶媒），25，150 および 350 mg/kg の用量で単回経口投与し，Irwin の変法に基づく観察を，投与前，投与後 30，90，150，300 分および 24 時間後に行った。ケージ内の一般状態観察（自発運動など），ベンチトップにおける観察および手で捕捉した状態における観察（反射，ハンドリングに対する反応，行動試験ならびに握力および体温などの定量的パラメータなど）を行った。観察期間終了時（投与後約 24 時間）に採血し，血漿中エトラシモド濃度を測定した。

特記すべき中枢神経系への影響として，350 mg/kg で軽度かつ一過性の眼球突出が認められたが，投与後 150 分の観察期間終了時までに回復した。

以上の結果に基づき，本試験におけるエトラシモドの NOAEL は検討した最高用量である 350 mg/kg と判断した。本試験の NOAEL である 350 mg/kg における投与後 24 時間（観察期間終了時）における血漿中濃度は，15.3～116 µg/mL であった。ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]010）における試験 1 日のトキシコキネティクス結果から，350 mg/kg/日の雄ラットにおける C_{max} は 97.0 µg/mL と予測された。

4.3. 呼吸系

4.3.1. 雄ラットを用いた呼吸系評価試験

報告書番号 TX[redacted]017

Sprague Dawley ラットにエトラシモドを単回経口投与したときの呼吸系への影響を GLP 適用下で評価した。

雄 Sprague Dawley ラット（8 匹/群）に 0（溶媒），25，150 および 350 mg/kg の用量でエトラシモドを単回経口投与した。ラットをチャンバーに収容して，頭部を外部に出したヘッドアウト式プレチスモグラフ法を用いて，投与前に少なくとも 60 分間，投与後に少なくとも 5 時間および投与後 23 時間に約 1 時間，呼吸機能に関するデータを収集した。呼吸データの収集終了時（投与後約 24 時間）に採血し，血漿中エトラシモド濃度を測定した。

エトラシモドを 25，150 または 350 mg/kg の用量で単回経口投与したとき，呼吸数，一回換気量または分時換気量の呼吸機能に対するエトラシモドの影響は認められなかった。

以上の結果に基づき，本試験におけるエトラシモドの NOAEL は検討した最高用量である 350 mg/kg と判断した。本試験の NOAEL である 350 mg/kg における投与後 24 時間（データ収集終了時）における血漿中濃度は，52.6～108 µg/mL であった。ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験（報告書番号 TX[redacted]010）における試験 1 日のトキシコキネティクス結果から，350 mg/kg/日の雄ラットにおける C_{max} は 97.0 µg/mL と予測された。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

エトラシモドを用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6. 考察及び結論

免疫介在性炎症性疾患における免疫/炎症反応の調節およびリンパ組織からのリンパ球移出の制御には，S1P およびその受容体（特に $S1P_1$）が重要な役割を果たす。新規の低分子 S1P 受容体調節薬であるエトラシモドは，$S1P_1$ に対する選択的かつ完全なアゴニスト活性，$S1P_{4,5}$ に対する部分アゴニスト活性を示し，$S1P_{2,3}$ に対して活性を示さないことが明らかにされ，S1P 受容体ファミリーにおいて特徴的な薬理学的プロファイルを示した。

In vitro におけるエトラシモドによる $S1P_1$ 活性化試験（βアレスチン動員アッセイおよび GTPγS 結合アッセイ）では，内因性 S1P および他の S1P 受容体調節薬と比較して，エトラシモドは特徴的な活性バランスを示し，G タンパク質シグナル伝達よりもβアレスチン動員を優先的に活性化すると考えられる。In vivo では，βアレスチン動員を介した $S1P_1$ の内在化による機能的アンタゴニスト作用がリンパ節からのリンパ球移出の減少を誘導するのに対し，G タンパク質シグナル伝達は心臓細胞の GIRK I_{KACh} チャネル活性化を惹起し，S1P 受容体調節薬の初回投与時にみられる一過性の心血管系への影響の原因と考えられる[2,3,4]。I_{KACh} チャネルは GIRK1 および GIRK4 の 2 つのサブユニットで構成され，Gβγ と相互作用することでカリウムチャネルが活性化される[10]。初代ヒト心房心筋細胞においてエトラシモドは I_{KACh} を活性化したが，S1P およびエトラシモドによる I_{KACh} の活性化の経時変化に差は認められなかった。

In vitro で認められたエトラシモドの有効性，選択性および機能的活性を in vivo で評価するために，健常マウスおよび免疫介在性炎症性疾患のげっ歯類モデルを用いて検討した。健常マウスにおいて，エトラシモドは溶媒対照と比較して血中のリンパ球数（B 細胞および T 細胞）減少を誘導したが，血中の単球数，顆粒球数または NK 細胞数に影響はみられなかった。実験的大腸炎モデルマウスでは，エトラシモドは溶媒対照群に比べて T 細胞および単球の結腸への浸潤/拡散を減少させた。同モデルにおいて，疾患誘発マウスに溶媒を投与した時と比較して，エトラシモドは炎症性サイトカインを減少させ，抗炎症性サイトカインの IL-10 を増加させた。MDR1a KO 自然発生性大腸炎モデルマウスにおいても，エトラシモドは大腸炎の重要な指標である結腸重量，結腸の長さを含む種々の病理組織学的所見を改善し，また結腸における炎症性サイトカイン産生を抑制した。急性肝炎モデルマウスにおいて，エトラシモドは溶媒と比較してコンカナバリン A により誘導された血清中 ALT 放出を抑制し，肝臓への T 細胞浸潤および血中 T 細胞の割合を減少させた。疾患発現前の C57BL/6 マウスにエトラシモドを予防的に投与したところ，MOG 誘発 EAE の用量依存的な抑制が認められた。同 EAE モデルマウスに治療的に投与したとき，エトラシモドは速やかに疾患を抑制し，これは脊髄および脳への $CD4^+$ T 細胞浸潤の減少と関連していた。FITC 誘発接触過敏症モデルマウスにおいて，エトラシモドは無処置動物と比べて血中リンパ球数および組織炎症を減少させ，疾患症状を改善した。Lewis ラットに不完全フロイントアジュバントおよびウシ由来コラーゲンを皮下投与した後にエトラシモドを反復投与したところ，エトラシモドは関節炎の症状（膝および足首の限局性の腫脹および病理組織学的な炎症性変化）を予防した。

以上のように，エトラシモドを用いた in vitro および in vivo の薬理試験において，in vitro で受容体の内在化を誘発する $S1P_1$ に対する強力な活性が認められ，in vivo の複数の異なる疾患モデルにおける抗炎症作用が認められた。異なる標的組織においてそれぞれ異なる免疫応答および炎症の誘発法を用いたが，エトラシモドは上述の in vivo モデルにおいて一貫した薬理活性を示した。予防的投与または治療的投与により，エトラシモドは，免疫監視機構に必要な主要免疫細胞型へ影響を及ぼすことなく炎症反応を抑えた。この作用は，炎症性サイトカインおよび局所炎症の減少，リンパ器官からのリンパ球移出の抑制ならびに血中および炎症組織におけるリンパ球の減少により裏付けられた。

In vivo 試験を通して，$S1P_{1\text{-}5}$ に対する活性を有するフィンゴリモド（既承認の多発性硬化症の治療薬）を陽性対照として使用した。フィンゴリモドは主に評価の妥当性を裏付けるために用いたため，用量効力および最大効力をエトラシモドと直接比較するために最適化した投与経路お

よび投与量ではなかった。さらに，UC に対してフィンゴリモドを用いたときの主な望ましくない作用は，フィンゴリモドにより各 S1P 受容体が広く活性化されることに起因すると考えられているが[11]，エトラシモドを用いた薬理試験はこれらを直接検出するようにデザインされていない。

エトラシモドオフターゲット作用を評価するため，広範な GPCR（S1P 受容体以外），イオンチャネルおよび神経伝達物質トランスポーターに対する放射性リガンド競合アッセイならびに広範な酵素に対する阻害アッセイを行った。評価した 97 の標的分子のうち，高濃度（10 µmol/L）のエトラシモド（UC 患者に臨床最大用量である 2 mg を投与したときの非結合型 C_{max} の 1927 倍）は，9 つの標的 GPCR を中等度から顕著に阻害した。その後の K_i 値測定により，エトラシモドとこれら 9 つの標的との相互作用は µmol/L オーダーの濃度でのみ生じることが明らかになった。健康被験者における 2 mg/日での総 C_{max} は 0.113 µg/mL であり（APD334-002 試験），ヒトにおける血漿蛋白結合率は 97.9%（報告書番号 MPR-[redacted]-001）であったことから，非結合型 C_{max} は 0.00237 µg/mL（0.00519 µmol/L）であった。したがって，K_i 値は UC 治療に対する臨床推奨用量における非結合型 C_{max} の約 385 倍～2890 倍と考えられた。酵素阻害アッセイでは，エトラシモドによる顕著な阻害は認められなかった。これらの結果から，エトラシモドがオフターゲット活性を有する可能性は低いと考えられた。

エトラシモドの心血管系，中枢神経系または呼吸系への影響を，標準的な安全性薬理コアバッテリー試験で評価した。In vitro における hERG 試験において，エトラシモドは濃度依存的に I_{Kr} 電流を増加させ，1 µmol/L および 3 µmol/L でそれぞれ 31.4%および 58.9%増加した。このときの濃度は，UC 治療に対する臨床推奨用量における非結合型 C_{max} に対する約 193 倍および約 578 倍であった。hERG チャネル電流の阻害ではなく増加のみが認められたため，エトラシモドの hERG 電流阻害に対する IC_{50} 値は得られなかった。健康被験者を対象に実施した thorough QT 試験（APD334-008 試験）では，エトラシモドによる QT 延長のリスクは認められなかった。テレメトリー装着イヌで認められた被験物質に関連する作用は，最高用量である 40 mg/kg でのみ認められ，投与後 2～4 時間に一過性でわずかな収縮期血圧，拡張期血圧および平均動脈圧の上昇（対照群との比較）が認められたが，脈圧への影響は認められなかった。いずれの用量においても，心拍数，体温または心電図パラメータ（定性または定量的）にエトラシモドに関連した影響は認められなかった。選択的 $S1P_1$ 調節薬を初期投与後にヒトで認められる心拍数および房室伝導に対する一過性の影響は種特異的であり，イヌ，マウスおよびラットでは認められないことが明らかにされているため，エトラシモドをイヌに投与したときに心拍数への影響は認められなかったことは想定内である[12,13]。本試験の NOAEL は 40 mg/kg であり，イヌを用いた 4 週間投与毒性試験における曝露量に基づくと，NOAEL における曝露量は UC の治療を目的とした臨床推奨用量における総 C_{max} の約 376 倍である。

雄ラットに最大 350 mg/kg のエトラシモドを単回経口投与したとき，中枢神経系または呼吸系機能に対する影響は認められず，ラットを用いた 4 週間経口投与毒性試験の曝露量に基づくと，このときの曝露量は UC の治療を目的とした臨床推奨用量における総 C_{max} の約 858 倍である。

安全性薬理試験の結果から，UC 治療に対する臨床用量（2 mg）でエトラシモドを単回経口投与しても，ヒトで心血管系，中枢神経系または呼吸系の機能に対する薬力学的作用が生じる可能性は低いと考えられた。

一連の非臨床薬理試験結果から，エトラシモドは強力な $S1P_1$ アゴニストであり，$S1P_{1,4,5}$ に対する選択性が高く，免疫介在性炎症性疾患を顕著に改善する可能性が示唆された。エトラシモドが $S1P_1$ の内在化を誘導した結果生じる機能的アンタゴニスト作用は，血中 T 細胞サブセットの減少に重要な役割を果たしている。$S1P_1$ はリンパ節からのリンパ球の移出を S1P 勾配に従って調節し，消化管内外の炎症の程度に影響を及ぼす[11,14]。本項に記載したように，in vivo における免疫介在性疾患モデルの薬理試験結果から，エトラシモドはリンパ系器官からのリンパ球の移出を阻害し，血中および炎症組織のリンパ球を減少させることが明らかにされた。特に，大腸炎モデルマウスで認められたように，エトラシモドは大腸における炎症性サイトカインレベルを低下させ，炎症を抑制すると考えられる。さらにいくつかの免疫介在性炎症性疾患モデルにおいて，エトラシモドは免疫監視機構に必要な主要免疫細胞型への影響を及ぼすことなく，炎症部位のリンパ球レベルを低下させた。

以上，in vitro および免疫介在性炎症性疾患モデルを用いた in vivo 試験において，エトラシモドは $S1P_1$ に対する選択的な完全アゴニスト作用および機能的アンタゴニスト作用により抗炎症作用を誘導したが，検討した非臨床動物種では心血管系，中枢神経系または呼吸系に対するオフターゲット作用を示さなかった。UC は免疫介在性および炎症性の疾患であることから，in vitro および in vivo におけるエトラシモドの選択的な機能活性に基づき，UC に対する治療薬としてエトラシモドを臨床的に使用することの薬理学的根拠が裏付けられた。

7. 図表

図表は，本文の適切な箇所および薬理試験の概要表（M2.6.3）に記載した。

8. 参考文献

1 Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature. 2004;427(6972):355-60.

2 Camm J, Hla T, Bakshi R, et al. Cardiac and vascular effects of fingolimod: mechanistic basis and clinical implications. Am Heart J. 2014;168(5):632-44.

3 Sykes DA, Riddy DM, Stamp C, et al. Investigating the molecular mechanisms through which FTY720-P causes persistent $S1P_1$ receptor internalization. Br J Pharmacol. 2014;171(21):4797-807.

4 Taylor S, Gray JRJ, Willis R, et al. The utility of pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling in the discovery and optimization of selective $S1P_1$ agonists. Xenobiotica. 2012;42(7):671-86.

5 Lukas S, Patnaude L, Haxhinasto S, et al. No differences observed among multiple clinical $S1P_1$ receptor agonists (functional antagonists) in $S1P_1$ receptor down-regulation and degradation. J Biomol Screen. 2014;19(3):407-16.

6 Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. Pharmacol Ther. 2007;115(1):84-105.

7 Zhu BT. The competitive and noncompetitive antagonism of receptor-mediated drug actions in the presence of spare receptors. J Pharmacol Toxicol Methods. 1993;29:85-91.

8 Siehler S, Guerini D. Novel GPCR screening approach: indirect identification of S1P receptor agonists in antagonist screening using a calcium assay. J Recept Signal Transduct Res. 2006;26(5-6):549-75.

9 Matsuura M, Imayoshi T, Okumoto T. Effect of FTY720, a novel immunosuppressant, on adjuvant- and collagen-induced arthritis in rats. Int J Immunopharmacol. 2000;22(4):323-31.

10 Ivanova-Nikolova TT, Nikolov EN, Hansen C, et al. Muscarinic K^+ channel in the heart. Modal regulation by G protein βγsubunits. J Gen Physiol. 1998;112(2):199-210.

[11] Peyrin-Biroulet L, Christopher R, Behan D, et al. Modulation of sphingosine-1-phosphate in inflammatory bowel disease. Autoimmun Rev. 2017;16(5):495-503.

[12] Rey M, Hess P, Clozel M, et al. Desensitization by progressive up-titration prevents first-dose effects on the heart: guinea pig study with ponesimod, a selective $S1P_1$ receptor modulator. PLoS One. 2013;8(9):e74285.

[13] Yagi Y, Nakamura Y, Kitahara K, et al. Analysis of Onset Mechanisms of a Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator Fingolimod-Induced Atrioventricular Conduction Block and QT-Interval Prolongation. Toxicol Appl Pharmacol. 2014;281(1):39-47.

[14] Al-Shamma H, Lehmann-Bruinsma K, Carroll C, et al. The Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator Etrasimod Regulates Lymphocyte Trafficking and Alleviates Experimental Colitis. J Pharmacol Exp Ther. 2019;369(3):311-7.

TABLE OF CONTENTS

2.6.3.1. PHARMACOLOGY OVERVIEW 2
2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS 5
2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS 10
2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY 11
2.6.3.5. PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS 13

LIST OF TABLES

Table 1: Overview of Completed Nonclinical Pharmacology Studies 2
Table 2: Overview of Nonclinical Primary Pharmacodynamics Studies 5
Table 3. Overview of Nonclinical Secondary Pharmacodynamics Studies 10
Table 4: Overview of Nonclinical Safety Pharmacology Studies 11

2.6.3.1. PHARMACOLOGY OVERVIEW

Table 1: Overview of Completed Nonclinical Pharmacology Studies

Type of Study/Description	Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility
Primary Pharmacodynamics				
$S1P_1$ Functional Activity Across Species	DBR-[redacted]-002	β-arrestin recruitment in HEK293 cells expressing mouse, dog, and monkey $S1P_1$	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA
	DBR-[redacted]-004	cAMP accumulation assay in HEK293 cells expressing rat $S1P_1$	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA
	DBR-[redacted]-003	cAMP accumulation assay in HEK293 cells expressing human $S1P_1$	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA
Subtype Selectivity and Functional Activity	DBR-[redacted]-001	β-arrestin recruitment in HEK293 cells expressing human $S1P_{1-5}$	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA
	APD334.TS.020	β-arrestin recruitment and GTPγS binding assays in CHO cells expressing human $S1P_{1-5}$	In vitro	[redacted], USA
Receptor Signaling	APD334.TS.012	cAMP inhibition assay and $S1P_1$ internalization assay in CHO cells expressing human $S1P_1$ and HUVEC	In vitro	[redacted], USA
Functional Activity and Potency	DBR-[redacted]-005	Calcium release assay in CHO cells expressing $S1P_2$ and $S1P_3$	In vitro	[redacted], France
I_{KACh} Recordings	ARN-[redacted]-01	I_{KACh} recordings in primary human atrial cardiomyocytes.	In vitro	[redacted], USA
	APD334.TS.011	I_{KACh} recordings in primary human atrial cardiomyocytes.	In vitro	[redacted], USA
Primary Efficacy	DBR-[redacted]-018	Peripheral blood lymphocyte reduction in normal C57BL/6 mice	Oral	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA

Type of Study/Description	Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility
Primary Pharmacodynamics (Continued)				
Primary Efficacy in Ulcerative Colitis Model	APD334.TS.001	Adoptive transfer of wild-type $CD4^{+}$ $CD45RB^{high}$ T cells to SCID mice	Oral	Arena Pharmaceuticals, Inc./[redacted] San Diego, CA, USA
Efficacy in Liver Inflammation Model	APD334.TS.003	Concanavalin A-induced liver inflammation in mice	Oral	[redacted], USA
Efficacy in Multiple Sclerosis Model (Prophylactic Administration)	DBR-[redacted]-013	Experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice	Oral	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA
Efficacy in Multiple Sclerosis Model (Therapeutic Administration)	DBR-[redacted]-017	Experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice	Oral	Arena Pharmaceuticals, Inc. San Diego, CA, USA
Efficacy in Contact Hypersensitivity Model	APD334.TS.022	FITC-induced contact hypersensitivity in BALB/c mice	Oral	[redacted], USA
Efficacy in Colitis Model	APD334.TS.036	Experimental spontaneous colitis in FVB and MDR1a KO mice	Oral	[redacted], USA
Efficacy in Rheumatoid Arthritis Model	DBR-[redacted]-016	Collagen-inducted arthritis in rats	Oral	[redacted]/Arena Pharmaceuticals, Inc. [redacted], USA/San Diego, CA, USA
Secondary Pharmacodynamics				
Ligand Competition Profiling/Enzyme Assays	DBR-[redacted]-005	Radioligand binding assays in membrane preparations from human, rat, or mouse cell lines/In vitro enzyme assays	In vitro	[redacted], France

Type of Study/Description	Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility
Safety Pharmacology				
hERG Assay	TX[redacted]025[a]	HEK293 cells stably expressing hERG	In vitro	[redacted], USA
Cardiovascular Effects	TX[redacted]015[a]	Measurement of cardiovascular function in beagle dogs	Oral	[redacted], USA
Central Nervous System Effects	TX[redacted]016[a]	Irwin test in Sprague Dawley rats	Oral	[redacted], USA
Respiratory Effects	TX[redacted]017[a]	Measurement of respiratory function in Sprague Dawley rats	Oral	[redacted], USA
Pharmacodynamic Drug Interactions				
None Performed	NA	NA	NA	NA

[a] Study was conducted in compliance with US FDA Good Laboratory Practice Regulations (21 CFR Part 58).
cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CHO, Chinese hamster ovary; FITC, fluorescein isothiocyanate; GTPγS, guanosine 5'-O-(gamma-thio)triphosphate; HEK, human embryonic kidney; hERG, human ether-a-go-go-related gene; I_{KACh}, inward-rectifying K+ channel; $S1P_{(1-5)}$, sphingosine 1-phosphate receptors 1-5; NA, not applicable; SCID, severe combined immunodeficient

2.6.3.2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Table 2: Overview of Nonclinical Primary Pharmacodynamics Studies

Type of Study/Description	Arena Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Relevant Findings
In Vitro Primary Pharmacodynamics					
Mouse, Dog, and Monkey $S1P_1$ Agonist β-Arrestin Recruitment EC_{50} Determinations	DBR-[redacted]-002	Recombinant mouse, dog, and monkey, $S1P_1$	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc.	Etrasimod was a potent and full agonist at mouse, dog, and monkey $S1P_1$ with similar mean EC_{50} values ranging from 3.65 to 8.70 nM (mean efficacy > 80% S1P) across species in β-arrestin recruitment assays.
Recombinant Rat $S1P_1$ Agonist cAMP Accumulation EC_{50} Determinations	DBR-[redacted]-004	Recombinant rat $S1P_1$	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc.	Etrasimod was found to be a potent full agonist at rat $S1P_1$ in a cAMP accumulation assay with a mean EC_{50} value of 0.319 nM.
Recombinant Human $S1P_1$ Agonist cAMP Accumulation EC_{50} Determinations	DBR-[redacted]-003	Recombinant human $S1P_1$	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc.	Etrasimod was a full agonist at human $S1P_1$ in a cAMP accumulation assay with a mean EC_{50} value of 0.199 nM.
Human $S1P_{1\text{-}5}$ β-Arrestin Recruitment EC_{50} and Antagonist IC_{50} Determinations	DBR-[redacted]-001	Recombinant human $S1P_{1\text{-}5}$ (agonist) and $S1P_{2,3}$ (antagonist)	In vitro	Arena Pharmaceuticals, Inc.	**Agonist Configuration:** In β-arrestin recruitment assays, etrasimod was a potent full agonist at $S1P_1$ (6.10 nM EC_{50}) and a partial agonist at $S1P_4$ (147 nM EC_{50}) and $S1P_5$ (24.4 nM EC_{50}) with a relative efficacy of 110%, 63%, and 73% of the maximum S1P response, respectively. At 10 µM, etrasimod exhibited no agonist activity on human $S1P_{2,3}$. **Antagonist Configuration:** In antagonist β-arrestin recruitment assays, etrasimod had no antagonist activity on human $S1P_{2,3}$ at concentrations up to 10 µM.

Type of Study/Description	Arena Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Relevant Findings
In Vitro Primary Pharmacodynamics (Continued)					
Human $S1P_{1-5}$ GTPγS Binding and β-Arrestin Recruitment EC_{50} Determinations for Etrasimod, Metabolites, and Other S1P Modulators	APD334.TS.020	Recombinant human $S1P_{1-5}$	In vitro	[redacted]	Compared to the other S1P modulators tested (ozanimod, ozanimod ketone, fingolimod(P), 6iponimod, and S1P), etrasimod exhibited similar potency at inducing β-arrestin recruitment through $S1P_1$ but was significantly less potent at inducing GTPγS binding through the same receptor. Overall, the profile of $S1P_1$ receptor potency of etrasimod more closely matches that of native S1P than the other S1P receptor modulators tested. In addition, etrasimod was found to be a partial agonist of $S1P_4$ in the β-arrestin recruitment assay but had no activity at this receptor in the GTPγS binding assay. The minor metabolites of etrasimod, M3 and M6, were less potent than etrasimod in activation of β-arrestin and G-protein signaling through S1P receptors.
Human $S1P_1$ Internalization and cAMP Accumulation EC_{50} Determinations for Etrasimod and Other $S1P_1$ Receptor Modulators	APD334.TS.012	Recombinant human $S1P_1$	In vitro	[redacted]	In both CHO cells and primary HUVEC cells etrasimod demonstrated equivalent potency and kinetics for receptor internalization as compared to other S1P receptor modulators but had lower potency compared to other S1P receptor modulators for the induction of Gi signaling as measured by inhibition of cAMP.
Etrasimod $S1P_2$ and $S1P_3$ Agonist and Antagonist Calcium Release Assay	DBR-[redacted]-005	Recombinant human $S1P_2$ and $S1P_3$	In vitro	[redacted]	Etrasimod did not stimulate significant intracellular calcium release via human $S1P_2$ or $S1P_3$, nor did it prevent activation of either receptor by S1P in the same assay system.
EC_{50} Determination for Etrasimod Activation of I_{KACh}	ARN-[redacted]-01	Primary human atrial cardiomyocytes	In vitro	[redacted]	Etrasimod was 10× less potent than S1P in activation of I_{KACh} with EC_{50} values of 29.9 and 2.1 nM, respectively. Both S1P and etrasimod showed similar kinetics of I_{KACh} activation.

Type of Study/Description	Arena Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Relevant Findings
In Vitro Primary Pharmacodynamics (Continued)					
Effect of Etrasimod and Other S1P Receptor Modulators on GIRK Currents Using I_{KACh}	APD334.TS.011	Primary isolated cardiomyocytes	In vitro	[redacted]	Etrasimod activated I_{KACh} to a lower degree than both ozanimod and fingolimod.
Effect of Etrasimod on Peripheral Blood Lymphocytes in Mice	DBR-[redacted]-018	Mouse/ C57BL/6	Oral single dose	Arena Pharmaceuticals, Inc.	Compared to vehicle control, administration of etrasimod (0.1, 0.3, or 1.0 mg/kg) induced a significant dose-dependent reduction in levels of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and B lymphocytes without affecting monocyte, granulocyte, and NK cell numbers.
Effect of Etrasimod on Experimental Colitis in Mice	APD334.TS.001	Mouse/SCID	Oral qd, 32 days	Arena Pharmaceuticals, Inc. /[redacted]	Compared to vehicle control, prophylactic administration of etrasimod (3 mg/kg/day) reduced the expression of T cell and monocyte markers in the intestine, reduced proinflammatory cytokines, increased anti-inflammatory IL-10, produced improvement in histological scoring, and prevented weight loss in a T cell transfer model of experimental colitis in SCID mice.
Efficacy of Etrasimod on Concanavalin A-induced Hepatitis in Mice	APD334.TS.003	Mouse/BALB/c	Oral single dose	[redacted]	Compared to vehicle control, administration of etrasimod (1 and 3 mg/kg) resulted in a reduction in concanavalin A-induced serum ALT increase, the percentages of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, and $CD19^+$ immune cells in liver mononuclear cells, and the percentage of $CD4^+$ immune cells in peripheral blood.
Prophylactic Effect of Etrasimod on MOG-induced EAE in Mice	DBR-[redacted]-013	Mouse/ C57BL/6	Oral qd, 22 days	Arena Pharmaceuticals, Inc.	Compared to vehicle control, prophylactic administration of etrasimod (≥ 0.3 mg/kg/day) significantly suppressed onset of MOG-induced EAE in a dose-dependent manner. When dosing was suspended on Day 25, drug-induced lowering of disease score stopped and EAE disease progression resumed in all treated animals.

Type of Study/Description	Arena Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Relevant Findings
In Vitro Primary Pharmacodynamics(Continued)					
Therapeutic Effect of Etrasimod on MOG-induced EAE in Mice	DBR-[redacted]-017	Mouse/ C57BL/6	Oral qd, 19 days	Arena Pharmaceuticals, Inc.	Compared to vehicle control, administration of etrasimod (3 mg/kg/day) at the peak of disease significantly improved disease score and increased body weight in mice with chronic MOG-induced EAE. Disease remission was correlated with decreases in infiltrating $CD4^+$ T cells.
Effect of Etrasimod on FITC-induced Contact Hypersensitivity	APD334.TS.022	Mouse/ BALB/c	Oral qd, 6 or 14 days[a]	[redacted]	In a mouse model of contact hypersensitivity, both prophylactic and therapeutic administration of etrasimod (1 and 3 mg/kg/day) increased trafficking of dendritic cells into the lymph nodes and subsequent T cell activation which produced a downstream reduction in immune cells, cytokine production, and dermatitis in the skin, compared to vehicle control. Etrasimod generally had a greater effect when administered prophylactically than when administered therapeutically.
Effect of Etrasimod on Spontaneous Colitis in Mice	ADP334.TS.036	Mouse/FVB and MDR1a KO	Oral 28 or 35 days	[redacted]	In the murine MDR1a KO model of spontaneous colitis, once daily oral treatment with etrasimod (1 or 3 mg/kg) showed dose-dependent effects on clinical and histopathological disease parameters such as improvement in body weight gain, endoscope score, colon length, colon weight, colon weight/length ratios and improved parameters for inflammation, gland loss, hyperplasia, edema, neutrophil score, and lymphoid aggregate count. In addition, reduction of IL-10, CXCL9, IL-1β, CXCL10, IL-6, CXCL1, TNFα, IL-17A, and IFNγ was observed at 3 mg/kg.

Type of Study/Description	Arena Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Relevant Findings
Effect of Etrasimod on Collagen-Induced Arthritis	DBR-[redacted]-016	Rat/Lewis	Oral qd, 17 days	[redacted]/Arena Pharmaceuticals, Inc.	Compared to vehicle control, prophylactic administration of etrasimod (0.3, 1, and 3 mg/kg/day) resulted in a significant and dose-dependent reduction of ankle diameters and an improvement in histological scores in the knees and ankles of collagen-injected rats.

[a] Etrasimod was administered for 14 days (1 day prior to FITC sensitization) to the prophylactic group and 6 days to the therapeutic group

ALT, alanine aminotransferase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CHO, Chinese hamster ovary; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; EC_{50}, half-maximal effective concentration; fingolimod(P), fingolimod phosphate; FITC, fluorescein isothiocyanate; GTPγS, guanosine 5'-O-(gamma-thio)triphosphate; HUVEC, umbilical vein endothelial cells; IC_{50}, half-maximal inhibitory concentration; I_{KACh}, inward-rectifying K+ channel; IL-10, interleukin-10; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein; NK, natural killer; qd, once daily; S1P, sphingosine 1-phosphate; $S1P_{1-5}$, sphingosine 1-phosphate receptors 1-5; SCID, severe combined immunodeficient

2.6.3.3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS

Table 3. Overview of Nonclinical Secondary Pharmacodynamics Studies

Type of Study/Description	Arena Study Number	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Relevant Findings
In Vitro Secondary Pharmacodynamics					
Etrasimod Competition for Radioligand Binding at a Panel of GPCRs, Ion Channels, Enzymes, and Neurotransmitter Transporters	DBR-[redacted]-005	Recombinant or native human, mouse, or rat receptors	In vitro	[redacted]	In a panel of 97 targets (other than S1P receptors) assayed for potential interaction of etrasimod at 10 µM, significant inhibition of radioligand competition was noted for 6 receptors (A_{2A}, A_3, CCK_2 [CCK_B], $CXCR_2$ [IL-8_B], 5-HT_3, and glucagon) and moderate inhibition was noted for 3 receptors (D_{2S}, D_3, and 5-HT_{1A}). Subsequent competitive radioligand binding assays were used to calculate the K_i at each of these 9 receptors and found no appreciable competition for binding at any of the receptors evaluated (K_i values ranged from 2.0 - 15.0 µM). Etrasimod at 10 µM also had moderate to weak interactions with the 13 enzymes assayed for inhibitory activity, and none warranted further investigation.

5-HT_{1A}, serotonin 1A receptor; 5-HT_3, serotonin 3 receptor; A_{2A}, adenosine A_2 receptor; A_3, adenosine A_3 receptor; CCK_2, cholecystokinin 2 receptor; CCK_B, cholecystokinin B receptor; $CXCR_2$, CXC chemokine receptor 2; D_{2S}, dopamine D_2 receptor short isoform; D_3, dopamine D_3 receptor; GPCR, G protein-coupled receptor; IL-8_B, interleukin-8B receptor; K_i, inhibition constant; S1P, sphingosine 1-phosphate

2.6.3.4. SAFETY PHARMACOLOGY

Table 4: Overview of Nonclinical Safety Pharmacology Studies

Organ Systems Evaluated	Study Number	GLP[a]	Species/Strain	Method	Dose (mg/kg) or Test Concentration (µM)	Sex/n per group	Noteworthy Findings
Cardiovascular	TX[redacted]025	Yes	hERG stably transfected HEK293 cells	In Vitro	1 µM and 3 µM	n = 3	Etrasimod increased hERG channel current in human embryonic kidney cells by (mean ± SEM, n = 3) 31.4 ± 1.5% and 58.9 ± 2.0% at 1 µM and 3 µM, respectively, compared to inhibition of 0.5 ± 0.2% in vehicle treated control. Etrasimod only increased hERG current (ie, no inhibition), and therefore no IC_{50} was determined.
	TX[redacted]015	Yes	Dog/Beagle	Oral Gavage	0, 10, 20, 40 mg/kg	Male/n = 4 Female/n = 4	Transient, modest increases (compared to control) in systolic pressure (11.7%), diastolic pressure (14.2%), and mean atrial pressure (12.4%) were noted 2 - 4 hours postdose, with no change in pulse pressure at 40 mg/kg. No changes in heart rate, body temperature, or ECG parameters were attributed to the test article at any dose level. The NOAEL for etrasimod in this study was considered to be 40 mg/kg.

Organ Systems Evaluated	Study Number	GLP[a]	Species/Strain	Method	Dose (mg/kg) or Test Concentration (µM)	Sex/n per group	Noteworthy Findings
CNS	TX[redacted]016	Yes	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	0, 25, 150, or 350 mg/kg	Male/n = 6	Test article-related findings of mild, transient exophthalmos at 350 mg/kg occurred in 4/6 and 3/6 animals at 30 and 90 minutes postdose, respectively, which resolved by 150 minutes postdose. No other etrasimod-related behavioral, physiological, or neurological effects or changes in body temperature occurred at any dose level. The NOAEL for etrasimod in this study was considered to be 350 mg/kg.
Respiratory	TX[redacted]017[b]	Yes	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	0, 25, 150, or 350 mg/kg	Male/n = 8	No effects on respiratory system function (respiratory frequency, tidal volume, or the resulting minute volume) were noted at any dose level evaluated. The NOAEL for etrasimod in this study was considered to be 350 mg/kg.

[a] Study was conducted in compliance with US FDA Good Laboratory Practice Regulations (21 CFR Part 58).
[b] An amendment (Amendment 1) to Study TX[redacted]017 was issued as a result of publishing artifacts in the original report but had no impact on scientific validity or interpretation of study results.

CNS, central nervous system; ECG, electrocardiograms; HEK, human embryonic kidney cells; hERG, human ether-a-go-go-related gene; n, number; IC_{50}, half-maximal inhibitory concentration; NOAEL, no-observed-adverse-effect-level; SEM, standard error of the mean

2.6.3.5. PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS

None performed.