ジロキシメルフマラート

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 3
1　緒言 4
2　ジロキシメルフマラート（DRF）及び代謝物の非臨床評価 5
3　参考文献 7

s

略語・略号一覧表

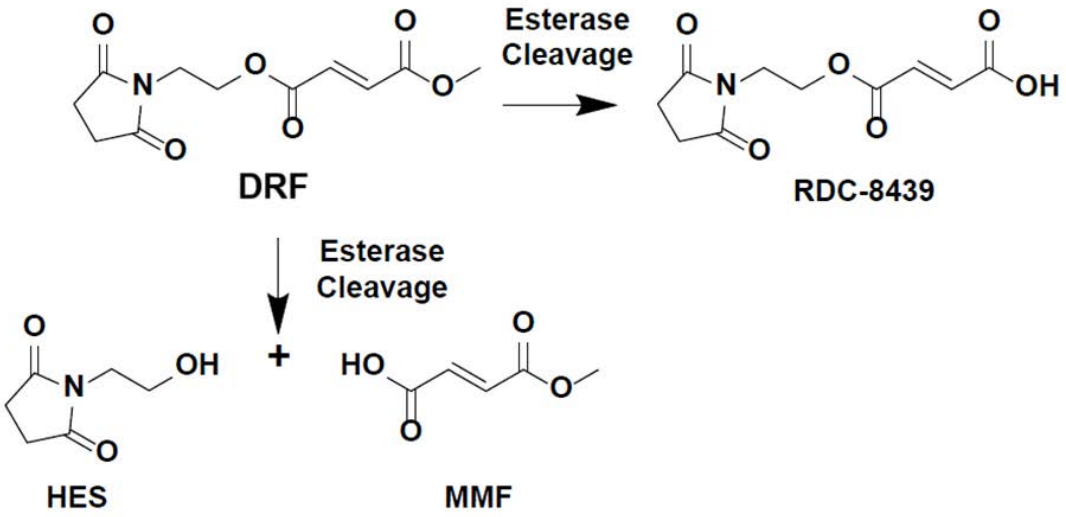
略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
AUC	area under the concentration-time curve	濃度時間曲線下面積
BID	bis in die	1 日 2 回
C_{max}	maximum observed concentration	最高血漿中濃度
DMF	dimethyl fumarate	フマル酸ジメチル
DRF	diroximel fumarate	ジロキシメルフマラート
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HES	2-hydroxyethyl succinimide	2-ヒドロキシエチルスクシンイミド
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
MMF	monomethyl fumarate	フマル酸モノメチル
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
PK	pharmacokinetics	薬物動態
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis	再発寛解型多発性硬化症

1 緒言

ジロキシメルフマラート（DRF、別名 BIIB098、ALKS 8700 又は RDC-5108）は、再発寛解型多発性硬化症（RRMS）の再発予防及び身体的障害の進行抑制を適応とする治療薬として開発した。DRF は経口投与後、全身循環に入る前に速やかに加水分解され、主活性代謝物のフマル酸モノメチル（MMF）、主不活性代謝物の 2-ヒドロキシエチルスクシンイミド（HES、別名 RDC-6567）及びマイナーな代謝物の RDC-8439（ヒトに DRF を投与したときの総全身曝露量の 1%未満）を生成する（図 1）。

DRF 462 mg を経口投与すると、多発性硬化症の再発予防及び身体的障害の進行抑制を適応として現在市販されているテクフィデラ®（フマル酸ジメチル［DMF］）240 mg の経口投与と生物学的に同程度の MMF 曝露量を示した［M2.7.1.2.3.1、ALK8700-A103 試験］;［M2.7.1.2.3.2、ALK8700-A104 試験］。DRF 及び DMF は両者とも、経口投与後全身循環に入る前にエステラーゼにより速やかに加水分解されて主活性代謝物である MMF に変換され、血漿中では定量できない［M2.7.1.2.3.1、ALK8700-A103 試験］;［M2.7.1.2.3.2、ALK8700-A104 試験］。そのため、DMF で実施された薬物動態（PK）解析と同様に、DRF に関するすべての PK パラメータは、その代謝物である MMF 及び HES の血漿中濃度から算出した。

図 1 ジロキシメルフマラート（DRF）の生体内代謝経路



DRF = diroximel fumarate; HES = 2-hydroxyethyl succinimide; MMF = monomethyl fumarate

2 ジロキシメルフマラート（DRF）及び代謝物の非臨床評価

DRF の非臨床試験では、DRF 及びその代謝物の薬理、安全性薬理、吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）、毒性並びに薬物乱用性に関する評価を包括的に行った（M2.6.3.1、M2.6.5.1 及び M2.6.7.1 に試験一覧を示した）。

活性代謝物である MMF に関しては、DMF（テクフィデラ®）の開発時に広範にその特性が解析されており、DMF 開発時に MMF を用いて実施された関連試験に加え、DMF に対して実施された他の複数の関連試験の概要を DRF の申請資料に記載した（M2.4.1.2 及び M2.4.1.2 表 1 参照）。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した試験、並びに GLP 非適用で実施した用量設定試験及び探索的試験を含むすべての非臨床試験結果を M2.6 に示した。

DRF 及びその代謝物（MMF、HES 及び RDC-8439）の安全性評価では、非臨床と臨床での曝露量の比較解析も行った。ヒトの定常状態での曝露パラメータは、DRF の最大推奨臨床用量（MRHD）924（462 1 日 2 回［BID］）mg/日［ALK8700-A107 試験］を用いて算出した。すべての非臨床安全性試験で、DRF、MMF 及び RDC-8439 の曝露量を測定した。一方、HES の曝露量は、バリデートされた生体試料中薬物濃度分析法が利用可能になった開発後期の非臨床安全性試験で評価した。開発前期の非臨床安全性試験の HES 曝露量に関しては、既存の試験（ウサギ）の曝露量データを用いて推定するか、毒性学的に意義のある用量範囲の DRF を投与した GLP 適用の PK 試験をラット［M2.6.4.3.2.3、AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）とサル［M2.6.4.3.3.1、AT-5108-28 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-4）で得られた HES の曝露量を外挿することにより推定した。

多発性硬化症患者の定常状態における血漿中 HES の最高血漿中濃度（C_{max}）及び濃度時間曲線下面積（AUC）は、MMF よりもそれぞれ 6.6 倍及び 21 倍高かったため［M2.7.2.2.10、ALK8700-A301 試験］、HES の薬理、毒性及び ADME に焦点をあててさらに評価した。

HES の薬理学的特性を明らかにし、MMF の効力に対する HES の影響も評価した。試験結果は M2.6.2 に記載しており、HES は不活性であり、MMF の効力を妨げないことが確認された。

HES の安全性に関しては、ヒトの主代謝物に対して必要とされる非臨床試験［ICH 2012］を検討した。この安全性評価では、主要な非臨床毒性試験の適切な安全性評価で HES の曝露量を、DRF の MRHD での臨床曝露量［ALK8700-A107 試験］と比較した非臨床／臨床曝露量比（AUC に基づく）を算出した。その結果、非臨床試験（長期反復投与毒性、胚・胎児発生、幼若動物毒性、がん原性試験など）での HES 曝露量は MRHD での HES 曝露量を上回っており、十分な安全性評価が可能であることが示された。さらに、副次的薬理作用及びヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）イオンチャネル阻害作用を in vitro 試験で評価し、細菌を用いる復帰突然変異試験及びほ乳類細胞を用いる染色体異常試験を実施して in vitro 遺伝毒性を評価した［ICH 2009］;［ICH 2012］。

HES は in vitro 試験バッテリー（代謝、トランスポーター及びチトクローム P450 相互作用、等）でも包括的に評価し（M2.6.4）、試験結果から薬物動態学的薬物相互作用のリスクは低いことが示された。

非臨床試験の概括評価を M2.4 に示した。概要文及び概要表に記載した試験報告書及び参考文

献をモジュール 4 に添付した。

M2.4 及び M2.6 で使用した DRF 及びその代謝物の命名法を表 1 に示す。

表 1　　ジロキシメルフマラート（DRF）及び代謝物の命名法

Common Name	**Sponsor Number/Alternative Names**	**Abbreviation**
Diroximel fumarate	BIIB098, ALKS 8700, RDC-5108	DRF
Monomethyl fumarate	Not applicable	MMF
2-Hydroxyethyl succinimide	RDC-6567	HES
RDC-8439	RDC-8439	Not applicable
Dimethyl fumarate	BG00012	DMF

3 参考文献

ICH guideline. Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals, M3(R2). 2009.

ICH guideline M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals: questions & answers (R2). 2012.

ジロキシメルフマラート

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 4
1 まとめ 6
2 効力を裏付ける試験 11
2.1 ジロキシメルフマラート（DRF）、フマル酸ジメチル（DMF）及びフマル酸モノメチル（MMF）の実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）発症に対する作用 11
2.2 Nrf2 経路の活性化 13
2.2.1 ジロキシメルフマラート（DRF）、DMF 及び MMF の薬理学的特性の要約 13
2.2.2 DMF 及び MMF の免疫系に対する作用 15
2.2.3 DMF 及び MMF の中枢神経系に対する作用 16
3 副次的薬理試験 18
3.1 ジロキシメルフマラート（DRF） 18
3.2 MMF 18
3.3 2-ヒドロキシエチルスクシンイミド（HES） 18
3.4 BioMAP®アッセイパネルを用いた MMF 誘発性の細胞応答に対する HES の作用の評価 19
4 安全性薬理試験 22
4.1 In vitro 安全性薬理試験 22
4.1.1 ヒト胎児腎細胞 293（HEK293）に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対するジロキシメルフマラート（DRF）の作用（GLP 適用） 22
4.1.2 HEK293 細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する MMF の作用（GLP 適用） 22
4.1.3 HEK293 細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する HES の作用（GLP 適用） 23
4.2 In vivo 安全性薬理試験 23
4.2.1 雄性テレメトリー装着カニクイザルを用いた心血管系に対するジロキシメルフマラート（DRF）の経口投与による作用の安全性薬理評価（GLP 適用） 23
4.2.2 雄性ラットを用いた中枢神経系に対するジロキシメルフマラート（DRF）経口投与の作用の安全性薬理評価（機能観察総合評価［FOB］）（GLP 適用） 24
4.2.3 雄性ラットを用いた呼吸系に対するジロキシメルフマラート（DRF）経口投与の作用の安全性薬理評価（GLP 適用） 25
5 薬力学的薬物相互作用 26
6 考察と結論 27
6.1 効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験 27
6.2 安全性薬理試験 28
6.2.1 心血管系に対するジロキシメルフマラート（DRF）の経口投与の作用 28

6.2.2 呼吸系及び神経行動に対するジロキシメルフマラート（DRF）経口投与の作用 29
6.3 HES の安全性薬理評価 29
6.4 効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験の総合評価 29
7 図表 31
8 参考文献 34

略語・略号一覧表

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
Akr1b8	aldo-keto reductase family 1 member B8	アルドーケト還元酵素 1B8（マウス）
AKR1B10	aldo-keto reductase family 1 member B10	アルドーケト還元酵素 1B10（ヒト）
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid	α-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸
AUC	area under the concentration-time curve	濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間までの濃度時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the concentration-time curve from time 0 to time of the last measurable concentration	0 時間から最終定量可能時間までの濃度時間曲線下面積
BID	bis in die	1 日 2 回
CASM3C	coronary artery smooth muscle cell	冠動脈平滑筋細胞
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	—
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	—
CD	cluster of differentiation	—
C_{max}	maximum observed concentration	最高血漿中濃度
DMF	dimethyl fumarate	フマル酸ジメチル
DMSO	dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRF	diroximel fumarate	ジロキシメルフマラート
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価（法）
GABA	gamma amino butyric acid	γ-アミノ酪酸
GFAP	glial fibrillary acidic protein	神経膠細胞線維性酸性タンパク質、星状膠細胞マーカー
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
GSR	glutathione-disulfide reductase	グルタチオン還元酵素
HEK293	human embryonic kidney cells 293	ヒト胎児腎細胞 293
hERG	human ether-a-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HES	2-hydroxyethyl succinimide	2-ヒドロキシエチルスクシンイミド
HMOX1	heme oxygenase 1	ヘムオキシゲナーゼ 1
IBA-1	ionized calcium binding adapter molecule 1	—
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical	医薬品規制調和国際会議

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
	Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	
Ik_r	rapidly activating delayed rectifier potassium current	急速活性型遅延整流カリウム電流
IL	interleukin	インターロイキン
LPS	lipopolysaccharide	リポ多糖
MBP	myelin basic protein	ミエリン塩基性タンパク質
MDO	median day of onset	発症日の中央値
MMF	monomethyl fumarate	フマル酸モノメチル
MMS	mean maximal score	平均最大スコア
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
MS	multiple sclerosis	多発性硬化症
MRHD	maximum recommended human dose	最大推奨臨床用量
NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（リン酸）
NMDA	N-Methyl-D-aspartate	N-メチル-D-アスパラギン酸
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	no observed effect level	無影響量
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)	NAD(P)H デヒドロゲナーゼ（キノン 1）
Nrf2	nuclear factor erythroid-derived 2-like 2	－
OSGIN1	oxidative stress induced growth inhibitor 1	酸化ストレス誘導成長阻害因子 1
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
QTc	QT interval corrected for heart rate	心拍数で補正した QT 間隔
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis	再発寛解型多発性硬化症
SD	Sprague-Dawley (rat)	－
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TNF	tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子

1 まとめ

ジロキシメルフマラート（DRF）（別名 BIIB098、ALKS 8700 又は RDC-5108）は、再発寛解型多発性硬化症（RRMS）の再発予防及び身体的障害の進行抑制を適応とする治療薬として開発した。DRF は経口投与後、全身循環に入る前に速やかに加水分解され、主活性代謝物のフマル酸モノメチル（MMF）、主不活性代謝物の 2-ヒドロキシエチルスクシンイミド（HES、別名 RDC-6567）及びマイナーな代謝物の RDC-8439（ヒトに DRF を投与したときの総全身曝露量の 1%未満）を生成する。

DRF 462 mg を経口投与すると、多発性硬化症（MS）の再発予防及び身体的障害の進行抑制を適応として現在市販されているテクフィデラ®（フマル酸ジメチル［DMF］）240 mg の経口投与と生物学的に同程度の MMF 曝露量を示した［M2.7.1.2.3.1、ALK8700-A103 試験］；［M2.7.1.2.3.2、ALK8700-A104 試験］。DRF 及び DMF は両者とも、経口投与後全身循環に入る前にエステラーゼにより速やかに加水分解されて主活性代謝物である MMF に変換される［M2.7.1.2.3.1、ALK8700-A103 試験］；［M2.7.1.2.3.2、ALK8700-A104 試験］。

DRF の主活性代謝物である MMF の薬理作用については、DMF（テクフィデラ）の開発時に広範に解析されている。DRF の製造販売承認申請では、DMF の承認申請資料に記載した MMF 及び DMF の薬理試験結果が含まれる。DMF の効力を裏付ける薬理試験では、細胞の抗酸化応答を制御するマスター転写因子である nuclear factor erythroid-derived 2-like 2（Nrf2）の活性化を同定し［RSCH-20[redacted]-024 試験］（テクフィデラ申請資料）、DMF の作用機序、組織学的な遺伝子発現及びメッセンジャーRNA（mRNA）発現を正常ラットで評価した［RSCH-20[redacted]-025 試験］（テクフィデラ申請資料）。さらに DMF の用量反応性を評価したラット実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルの組織を用いて、Nrf 2 標的遺伝子の活性化を解析した。その結果、疾患動物に対する DMF の連日投与の薬理応答（32 日間）［RSCH-20[redacted]-030 試験］（テクフィデラ申請資料）は、正常動物（ラット）に対する単回投与の薬理応答［RSCH-20[redacted]-025 試験］（テクフィデラ申請資料）と類似し、試験期間中に Nrf2 依存性の薬理作用に耐性は生じなかった。さらに、DMF は、慢性再発性 EAE ラットモデルで臨床症状スコア（行動及び運動能力）の改善［RSCH-20[redacted]-029 試験］（テクフィデラ申請資料）に加えて、神経炎症の組織学的プロファイル及び mRNA 発現プロファイルの改善を示した。DMF は白質の構造的完全性の保持にも有効であり、DMF 投与動物で、脊髄の神経変性を有意に減少させた［RSCH-20[redacted]-030 試験］（テクフィデラ申請資料）。

本概要文では、DRF、MMF、HES 及び DMF を用いて実施した効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の結果を要約し、その概要表を M2.6.3 に示した。EAE モデルで DRF、DMF 及び MMF の in vivo での有効性を比較し、DRF、DMF 及び MMF は、同程度の MMF 曝露量（濃度時間曲線下面積［AUC］に基づく）を示す投与量で同程度の有効性を示すことが確認された［LSC[redacted]-069 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-1）。In vivo モデルで DRF 及び DMF の投与により、Nrf2 抗酸化応答遺伝子の発現量が増加した［RSCH-20[redacted]-018 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-2）。

包括的な非臨床試験を実施して、DRF 及び代謝物の作用を評価した。HES はヒトの主不活性代謝物であり、MS 患者では活性代謝物 MMF を上回る曝露量が生成される（M2.7.1 及び M2.7.2）ため、HES の副次的薬理作用及び HES が MMF の薬理作用に及ぼす影響をさらに検討した。その結果、HES は in vitro 及び in vivo 試験で薬理作用を示さず、MMF の薬理作用にも影響を示さなか

った［ALK003-02-b-00001-000-00 試験］（添付資料番号 4.2.1.2-3）；［LSC[redacted]-069 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-1）。

DRF、主活性代謝物 MMF 及び主不活性代謝物 HES の非臨床安全性評価の一環として、安全性薬理試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A 安全性薬理試験ガイドライン［ICH 2000］、ICH S7B ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価［ICH 2005］及び ICH M3(R2) 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイドライン［ICH 2009］に従った。

本項に記載した効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の一覧を表 1 に示した。要約を以下に示す。

- MS のラット標準病態モデル（EAE モデル）で、DRF は疾患重症度を低下させ、DMF 及び MMF と同程度の有意な疾患重症度の低下作用を示した［LSC[redacted]-069 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-1）。

- DRF 及び DMF は、マウスの脳、空腸、腎臓及び脾臓で Nrf2 を安定化し Nrf2 標的遺伝子の mRNA を増加した［RSCH-20[redacted]-024 試験］（テクフィデラ申請資料）；［RSCH-20[redacted]-025 試験］（テクフィデラ申請資料）；［RSCH-20[redacted]-028 試験］（テクフィデラ申請資料）；［RSCH-20[redacted]-030 試験］（テクフィデラ申請資料）；［RSCH-20[redacted]-018 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-2）。

- サルに DMF を投与すると脳脊髄液に MMF の移行が認められた［RSCH-1881-120 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-3）。

- 臨床で認められた曝露量と同程度以上の濃度の HES は、以下に示す評価に基づき生物学的に不活性であった。

  - HES（300 µmol/L）は、[redacted] 社 BioPrint パネルを用いた 134 種類の受容体・イオンチャネル・トランスポーター・酵素結合及び酵素・取り込みアッセイで有意な薬理活性を示さなかった［AT-6567-01 試験］（添付資料番号 4.2.1.2-2）。
  - HES は、多数の免疫経路を網羅する BioMAP® Diversity PLUS アッセイ（DiscoverX 社）で 148 種類のヒト細胞応答のパネルに対して作用を示さず、MMF による応答に対しても影響を及ぼさなかった［ALK003-02-b-00001-000-00 試験］（添付資料番号 4.2.1.2-3）。
  - HES は、ラット MS モデル（EAE モデル）で MMF の作用に影響を及ぼさなかった。DRF、MMF 及び DMF の投与は、同程度の有意な疾患重症度の低下作用を示した［LSC[redacted]-069 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-1）。

- DRF は、[redacted] 社 BioPrint パネルで 135 種類の受容体・イオンチャネル・トランスポーター・酵素結合試験及び酵素・取り込みアッセイに対して有意な副次的薬理作用を示さなかった［AT-5108-01 試験］（添付資料番号 4.2.1.2-1）。
- MMF は、76 種類の in vitro 受容体・イオンチャネル・トランスポーター及び酵素結合試験で、有意な副次的薬理作用を示さなかった［RSCH-20[redacted]-023 試験］（テクフィデラ申請資料）。
- DRF は、in vivo の安全性薬理試験で、心血管系、呼吸系及び神経行動に対して許容可能な

安全性プロファイルを示した［AT-5108-08 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-3）；［AR5108-10 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-4）；［AT-5108-09 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-5）。

- DRF、MMF 及び HES は、in vitro の安全性薬理試験で、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル電流を阻害する可能性が低いことが示された［AT-5108-02 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-1）；［PD03-21 試験］（テクフィデラ申請資料）；［AT-6567-02 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-2）。

薬理評価では MS 動物モデル（EAE モデル）で DRF の有効性が確認され、in vivo 及び in vitro のいずれでも HES は阻害作用を示さないことが確認された。さらに、安全性薬理試験では、DRF 及び HES で認められた心血管系、呼吸系及び神経行動に対する安全性プロファイルは許容可能であった。

表 1　　薬理試験の一覧表

（ジロキシメルフマラート［DRF］、MMF、HES 及び DMF を用いた非臨床試験）

Type of Study	Test System	Method/Route of Administration	GLP Compliance	Study Number/ Location in CTD
Primary Pharmacodynamics				
EAE model (HES[a] and DRF interaction)	Lewis rats	Oral	No	LSC[redacted]-069/ 4.2.1.1-1
DMF activates Nrf2[b]	DLD-1 & 293FT immortalized cells; primary human astrocytes; primary human fibroblasts; primary mouse astrocytes; primary rat astrocytes	In vitro	No	RSCH-20[redacted]-024[c]
PD response to DMF in rodents[b]	C57BL/6 wild-type mice C57BL/6 Nrf2 knockout mice Brown Norway rats	Oral gavage In vitro	No	RSCH-20[redacted]-025[c]
Fumarates promote cytoprotection of CNS cells against oxidative stress via the Nrf2 pathway (DMF and MMF)[b]	C57BL/6 wild-type mice C57BL/6 Nrf2 knockout mice Primary human astrocytes; primary rat cortical neurons	Oral gavage In vitro	No	RSCH-20[redacted]-028[c]
Analysis of cellular and molecular effects of DMF treatment in rat EAE[b]	Brown Norway rats (EAE)	Oral gavage	No	RSCH-20[redacted]-030 [c]
Measure DRF exposure (PK) and Nrf2-dependent transcriptional (PD) responses including DMF as a positive control	C57BL/6 mice	Oral gavage	No	RSCH-20[redacted]-018/ 4.2.1.1-2
Anti-inflammatory effects of DMF in vitro[b]	RAW264.7 immortalized macrophage cells; primary mouse bone marrow derived macrophages; primary rat astrocytes	In vitro	No	RSCH-20[redacted]-023[c]
Efficacy of DMF in the Brown Norway rat chronic EAE model of MS[b]	Brown Norway rats (EAE)	Oral gavage	No	RSCH-20[redacted]-029[c]
DMF reduces the extent of malonate induced striatal lesion volume in Sprague-Dawley rat brain[b]	Sprague-Dawley rats, striatal malonate lesion	Oral gavage	No	RSCH-20[redacted]-027[c]
PK and distribution of DMF to target tissues within the brain and spine[b]	Cynomolgus monkeys	Intraduodenal	No	RSCH-1881-120/ 4.2.1.1-3

Type of Study	Test System	Method/Route of Administration	GLP Compliance	Study Number/ Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics				
DRF activity ([redacted] BioPrint panel)	In vitro binding and enzyme/ uptake assays	In vitro	No	AT-5108-01/ 4.2.1.2-1
MMF activity ([redacted] radioligand binding assays)[b]	In vitro binding and enzyme activity assays	In vitro	No	RSCH-20[redacted]-023[c]
HES[a] activity ([redacted] BioPrint panel)	In vitro binding and enzyme/ uptake assays	In vitro	No	AT-6567-01/ 4.2.1.2-2
Biological activity assay (MMF, MMF + HES[a]) (BioMAP®)	Human primary cells	In vitro	No	ALK003-02-b-00001-000-00/ 4.2.1.2-3
Safety Pharmacology				
hERG (DRF)	HEK293 cells	In vitro	Yes	AT-5108-02/ 4.2.1.3-1
hERG (MMF)[b]	HEK293 cells	In vitro	Yes	PD03-21[c]
hERG (HES[a])	HEK293 cells	In vitro	Yes	AT-6567-02/ 4.2.1.3-2
Cardiovascular assessment (DRF)	Cynomolgus monkeys	Oral	Yes	AT-5108-08/ 4.2.1.3-3
CNS or neurobehavioral assessment (DRF)	Sprague-Dawley rats	Oral	Yes	AT-5108-10/ 4.2.1.3-4
Respiratory assessment (DRF)	Sprague-Dawley rats	Oral	Yes	AT-5108-09/ 4.2.1.3-5

CNS = central nervous system; DMF = dimethyl fumarate; DRF = diroximel fumarate; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; GLP = Good Laboratory Practice; HEK293 = human embryonic kidney cells 293; hERG = human ether-a-go-go–related gene; HES = 2-hydroxyethyl succinimide; MMF = monomethyl fumarate; MS = multiple sclerosis; Nrf2 = nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; PD = pharmacodynamic; PK = pharmacokinetics.

[a] HES is a major inactive human metabolite of DRF.

[b] Studies were conducted for DMF to support the development of DMF.

[c] Studies have been submitted at the filing of Tecfidera.

2 効力を裏付ける試験

MS 病態モデルの Lewis ラット EAE モデルで 3 成分（DRF、DMF 及び MMF）の MMF 曝露量（AUC）が同程度となる投与量を設定し、DRF の作用を DMF 及び MMF の作用と比較検討した。結果、DRF 投与での疾患重症度の低下は、MMF 投与又は DMF 投与での低下と同程度であった。さらに、この試験結果から、HES の AUC が MMF の AUC の 12 倍でも、HES は MMF の作用に影響を及ぼさないことが示された。さらに、この HES の AUC は、臨床試験で報告された曝露量の 3 倍であった。このことから、HES は MMF の臨床での治療効果に影響を及ぼさないことが予想される。

2.1 ジロキシメルフマラート（DRF）、フマル酸ジメチル（DMF）及びフマル酸モノメチル（MMF）の実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）発症に対する作用

LSC[redacted]-069（添付資料番号 4.2.1.1-1）

DRF、DMF 及び MMF の in vivo の有効性を、Lewis ラット EAE モデルで比較した。ラットで DRF は速やかに MMF 及び HES に代謝されるため、このモデルでは MMF の作用に及ぼす HES の影響も評価することが可能であった。雌性ラットにミエリン塩基性タンパク質（MBP）由来ペプチド MBP_{69-88} をアジュバントと共に投与して免疫し、EAE 症状を惹起した。ラット（n = 15/群）に溶媒、DMF、MMF 又は DRF を EAE の誘発日から 1 日 1 回、23 日間連日経口投与した。3 化合物すべての MMF 曝露量（AUC）が同程度となる用量を選択した（DRF 354 mg/kg、DMF 200 mg/kg 及び MMF 181 mg/kg）［M2.6.4.3.2.2、LSC17-033 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-2）。また、この EAE モデルでは、DRF 投与後の HES 曝露量は MMF 曝露量の 12 倍であり、臨床で DRF を 924（462 1 日 2 回［BID］）mg/日投与したときの HES 曝露量［M2.7.2.2.9、ALK8700-A107 試験］の 3 倍に相当した。疾患誘発後 9 日目から、0 点～5 点の上行性麻痺評価スコアリングシステムを用いて盲検下でスコア評価を実施した。全投与動物で EAE の疾患症状が発現し、死亡はみられなかった。

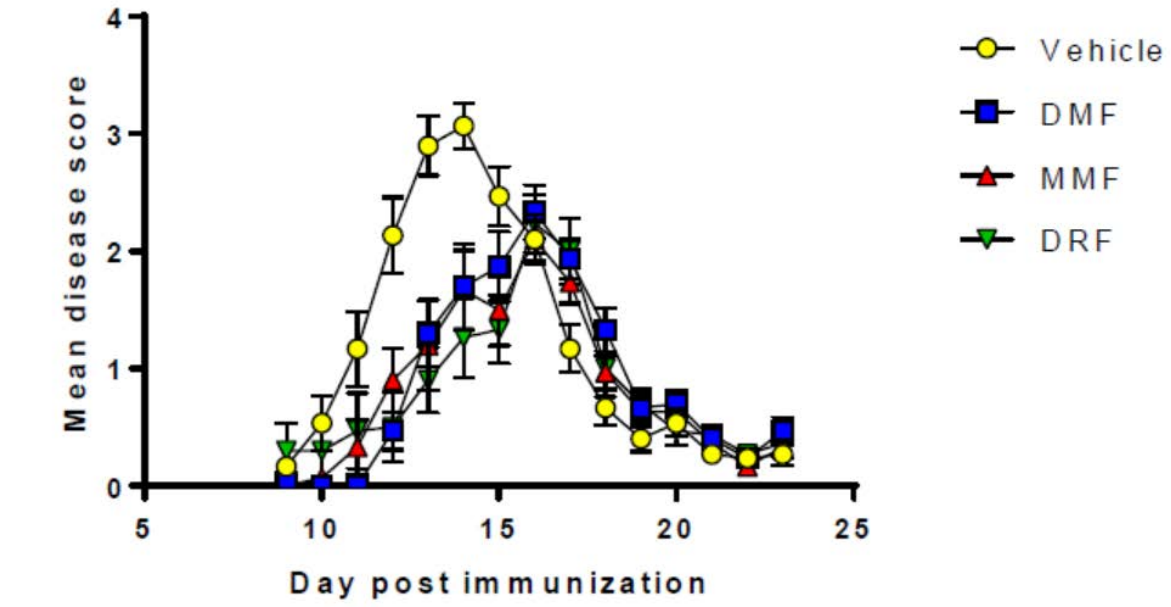
図 1 に示すように、DRF、DMF 又は MMF 投与群は、溶媒投与群と比較して疾患発症の遅延及び全体的な疾患重症度の低下を示した。疾患重症度は、発症日（中央値）（MDO）、平均疾患スコアの AUC（各動物の試験中の全スコアを合計し、各群のスコアの平均値を求めて算出した曲線下面積）及び平均最大スコア（MMS）などの複数のパラメータで評価した。

発症日（中央値）（MDO）及び AUC パラメータの解析から、溶媒投与群と DRF、DMF 又は MMF 投与群との間に統計学的な有意差（$p < 0.05$、Wilcoxon の生存率検定、Wilcoxon のノンパラメトリック検定）が示された（表 2）。実薬投与群間での有意差は認められず、すべてのフマル酸エステル（DRF、DMF 及び MMF）の作用が同程度であることが確認された（表 3）。平均最大スコア（MMS）の解析では、溶媒投与群と各化合物投与群との間の平均最大スコア（MMS）の差は、3 つの化合物投与群で類似した（表 2）。溶媒投与群と MMF 又は DMF 投与群との間で平均最大スコア（MMS）に統計学的な有意差が認められた。溶媒投与群と DRF 投与群との間では平均最大スコア（MMS）に有意差は認められなかったが（表 2）、DRF 投与群の平均疾患スコアの推移は DMF と類似しており（図 1）、DRF 投与群の群内変動に起因すると考えられた。

これらのデータに基づき、ラット EAE モデルで、DRF、DMF 及び MMF は同程度の MMF 曝露量（AUC）を示す投与量で同程度の有効性を示すことが確認された。さらに、臨床［M2.7.2.2.9、ALK8700-A107 試験］で認められる濃度の 3 倍の HES 曝露量でも、MMF の治療効果に影響は認められなかった。

ラットを用いた試験のすべての用量で、MMF に対する HES の平均 AUC 比は 11.7～39.6、平均最高血漿中濃度（C_{max}）比は 2.6～5.7 であった［M2.6.4.3.2.2、LSC17-033 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-2）；［M2.6.4.3.2.3、AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）；［M2.6.4.9、M2.6.6.3.5、AT-5108-15 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-5）。MS 患者の定常状態で、MMF に対する HES の AUC 及び C_{max} はそれぞれ 21 倍及び 6.6 倍高く［M2.7.2.2.10、ALK8700-A301 試験］、非臨床試験で認められた値と同程度であった。

図 1　　Lewis ラット EAE モデルを用いたジロキシメルフマラート（DRF）、DMF 及び MMF 投与の平均疾患スコアに対する作用



DMF = dimethyl fumarate; DRF = diroximel fumarate; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; MMF = monomethyl fumarate.
Note: Animals induced for EAE disease received oral doses of vehicle, MMF (181 mg/kg), DMF (200 mg/kg), or DRF (354 mg/kg) starting on the day of EAE induction and continuing through the remainder of the study. Scoring assessments were performed daily starting on Day 9 after disease induction.
Each value shows the mean ± SD (Standard deviation) (n = 15)
Source: LSC[redacted]-069 (M 4.2.1.1-1)

表 2　　EAE 試験結果の要約

Group	Treatment	EAE Incidence	MDO	MMS ± SD	AUC ± SD
1	Vehicle[a]	100.0%	11.0	3.40 ± 0.21	18.07 ± 3.68
2	DMF, 200 mg/kg	100.0%	12.0 (p < 0.0001)	2.80 ± 0.84 (p = 0.0297)	13.43 ± 3.56 (p = 0.0031)
3	MMF, 181 mg/kg	100.0%	12.0 (p = 0.0007)	2.63 ± 0.74 (p = 0.0029)	12.60 ± 3.41 (p = 0.0007)
4	DRF, 354 mg/kg	100.0%	13.0 (p = 0.0002)	2.80 ± 0.86 (p = 0.0568)	12.56 ± 4.83 (p = 0.0013)

AUC = area under the curve calculated by summing all scores during the study for each animal and taking the mean of these scores for each group; DMF = dimethyl fumarate; DRF = diroximel fumarate; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; MDO = median day of onset; MMF = monomethyl fumarate; MMS = mean maximal score; SD = standard deviation.
n = 15, Significant difference at p < 0.05 (for MDO, Wilcoxon's survival test; for MMS and AUC, Wilcoxon's non-parametric test).
[a] 50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% (w/w) Methocel E50 Premium LV and 0.2% (w/w) polysorbate 20, pH 4
Source: LSC[redacted]-069 (M 4.2.1.1-1)

表 3　　ジロキシメルフマラート（DRF）、DMF 及び MMF 投与群間の統計学的有意差（p 値）

Group	Treatment	MDO		MMS		AUC	
		vs. DMF	vs. MMF	vs. DMF	vs. MMF	vs. DMF	vs. MMF
2	DMF, 200 mg/kg	NA	0.7941	NA	0.6172	NA	0.5463
3	MMF, 181 mg/kg	0.7941	NA	0.6172	NA	0.5463	NA
4	DRF, 354 mg/kg	0.0865	0.1381	0.8785	0.5870	0.4545	0.8353

AUC = area under the curve calculated by summing all scores during the study for each animal and taking the mean of these scores for each group; DMF = dimethyl fumarate; DRF = diroximel fumarate; MDO = median day of onset; MMF = monomethyl fumarate; MMS = mean maximal score; vs. = versus. NA = not applicable.
p < 0.05 Statistically significant by Wilcoxon's non-parametric test for MMS and AUC, and Wilcoxon's survival test for MDO.
Source: LSC[redacted]-069 (M 4.2.1.1-1)

2.2　　Nrf2 経路の活性化

2.2.1　　ジロキシメルフマラート（DRF）、DMF 及び MMF の薬理学的特性の要約

RSCH-20[redacted]-024（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-20[redacted]-025（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-20[redacted]-028（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-20[redacted]-030（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-20[redacted]-018（添付資料番号 4.2.1.1-2）

フマル酸エステル（MMF 及び DMF）の作用機序の一つとして、Nrf2 抗酸化応答経路の活性化が示唆され［Carlström 2019］；［Gopal 2017］；［Majkutewicz 2022］、in vitro 及び in vivo 試験で、DRF、DMF 及び MMF による Nrf2 抗酸化応答遺伝子の発現量の増加及び抗酸化応答を評価した。

In vitro 試験では、DMF（3～30 µmol/L）又は MMF（150 µmol/L）でヒト及びマウス初代培養星状膠細胞又はヒト真皮線維芽細胞を処理すると Nrf2 を安定化し、DMF（30 µmol/L）又は MMF

（150 µmol/L）で DLD-1（ヒト結腸腺癌由来）細胞を処理すると Nrf2 は核内に移行し、ARE プロモーター配列に結合し、Nrf2 の標的遺伝子として知られる NAD(P)H デヒドロゲナーゼ（キノン 1）（*NQO1*）、グルタチオン還元酵素（*GSR*）及びアルドーケト還元酵素 1B10（*AKR1B10*）の発現が誘導された［RSCH-20[redacted]-024 試験］（テクフィデラ申請資料）。また、ヒト初代培養星状膠細胞で MMF（0.12、0.37、1.1、3.3、10、及び 30 µmol/L）の濃度依存的な酸化還元電位及びグルタチオン濃度の増加が認められ（n = 8）、抗酸化作用が示された［RSCH-20[redacted]-028 試験］（テクフィデラ申請資料）。In vivo 試験では、DMF（500 mg/kg）を C57BL/6 マウス（n = 5）に投与すると、4 時間後に *Nqo1* が脾臓で、アルドーケト還元酵素 1B8（*Akr1b8*）が十二指腸で高発現した。空腸では *Nqo1* 及び *Akr1b8* の両方の発現量が増加し、*Akr1b8* はより高発現した［RSCH-20[redacted]-025 試験］（テクフィデラ申請資料）。ラット EAE モデルに DMF を反復投与すると、正常げっ歯類を用いた DMF の単回投与での薬理作用評価結果［RSCH-20[redacted]-025 試験］（テクフィデラ申請資料）と一致して DMF の投与量に依存した *Nqo1* 及び *Akr1b8* 発現量の増加が認められ、小脳及び脊髄では *Nqo1* 及び *Akr1b8* 発現量の 3 倍未満の増加が認められた。DMF の連日投与による薬理作用（32 日）が単回投与の急性作用と類似したことから、試験期間中に Nrf2 依存性の薬理作用に耐性は生じなかったことが示唆された［RSCH-20[redacted]-030 試験］（テクフィデラ申請資料）。また、C57BL/6 野生型及び Nrf2-/-ノックアウトマウスを用いて DMF を 0、50 又は 200 mg/kg の用量で強制経口投与すると、4 時間後に野生型マウスでのみ脾臓で *Akr1b8* 及び脳で *Nqo1* 発現量の用量依存的な増加が認められた［RSCH-20[redacted]-028 試験］（テクフィデラ申請資料）。

次に in vivo 試験で、DRF による Nrf2 抗酸化応答遺伝子の発現量の増加を評価した［RSCH-20[redacted]-018 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-2）。

表 4　RSCH-20[redacted]-018 試験（添付資料番号 4.2.1.1-2）デザイン

Group	Treatment	Animal Number	Evaluation Point after Dosing		
			15 min	2 hrs	6 hrs
1	DMF Vehicle[a]	18	6	6	6
2	DMF, 100 mg/kg	18	6	6	6
3	DRF Vehicle[b]	18	6	6	6
4	DRF, 192.5 mg/kg	18	6	6	6

DMF = dimethyl fumarate; DRF = diroximel fumarate.
[a] 0.8% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)
[b] 10 mmol/L citric acid, pH 5, 0.5% carboxymethylcellulose (CMC), 0.02% Tween 80

雌性 C57BL/6 マウス（11～13 週齢）に DRF（192.5 mg/kg）を経口投与し、曝露量（AUC 及び C_{max}）及び Nrf2 活性化を介した転写応答を評価した。陽性対照として DMF（100 mg/kg、DRF のモル当量）を経口投与した。

マウスは投与後 15 分、2 時間又は 6 時間でそれぞれ安楽死させ、組織（血漿、脳、脾臓、腎臓及び空腸）を採取し、投与後 15 分、2 時間及び 6 時間の曝露量（AUC 及び C_{max}）、並びに投与後 2 時間及び 6 時間の Nrf2 活性化を評価した。定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法を用いて下流の Nrf2 標的遺伝子（*Akr1b8*、ヘムオキシゲナーゼ 1［*Hmox1*］及び酸化ストレス誘導成長阻害因子 1［*Osgin1*］）の mRNA 量を定量した。統計的比較は Mann-Whitney 検定を用いて行い、有意差は p 値が 0.5 未満と定義した。DRF 経口投与 2 時間及び 6 時間後に、脳、空腸、腎臓及び脾臓で *Akr1b8*、*Hmox1* 及び *Osgin1* mRNA 量の溶媒対照に対する増加が認められた。脳では、溶媒対照動物に対して 1.5 倍を超える *Akr1b8* 及び *Hmox1* の増加は認められなかった。DMF

投与では、DRF 投与と比較して投与 2 時間（1.232 ± 0.097 vs 1.102 ± 0.049 倍）及び 6 時間後（1.140 ± 0.055 vs 1.062 ± 0.042 倍）に *Akr1b8* の僅かな統計学的に有意な増加（$p < 0.05$）が認められた。投与 2 時間後に *Osgin1* は、溶媒対照に対して脳で DRF（2.680 ± 0.553 倍）が DMF（2.088 ± 0.202 倍）より高値を示した（$p < 0.05$）が、脾臓では、DMF（1.99 ± 0.306 倍）が DRF（1.438 ± 0.231 倍）より高値を示した（$p < 0.05$）。脳及び脾臓の残りの転写プロファイルに統計学的に有意差は認められなかった。

MS 患者に DMF を 12 週間又は 48 週間経口投与後、Nrf2 活性化のバイオマーカーである *NQO1* の血中発現量の上昇が確認されている［Gopal 2017］。この臨床試験結果は、非臨床試験で DMF 投与により複数の組織で Nrf2 抗酸化応答遺伝子の発現量の増加が認められた試験結果と一致している。しかし、MS 患者に対して DMF 及び MMF が効果を示す作用機序と *NQO1* の血中発現量との関連性は明らかでない。

2.2.2 DMF 及び MMF の免疫系に対する作用

RSCH-20[redacted]-023（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-20[redacted]-029（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-20[redacted]-030（テクフィデラ申請資料）

DMF 及び MMF は、非臨床試験及び臨床試験で抗炎症作用及び免疫調節作用を示した。DMF 及び MMF は、免疫細胞の活性化とその後放出される炎症性サイトカインの産生を有意に減少させた。

RAW264.7 細胞株を DMF（0、3、10、又は 30 µmol/L）で 2 時間処理後にリポ多糖（LPS）（10 ng/ml）で 4 時間刺激すると、溶媒対照（ジメチルスルホキシド［DMSO］）で認められた腫瘍壊死因子（*Tnf*）、インターロイキン（*Il*）*1b*、*Cxcl10* 及び *Ccl4* mRNA 発現量が増加する炎症応答が DMF の濃度依存的に抑制された（qRT-PCR 法）。同様に、ラットの星状膠細胞でも、LPS 刺激で誘導される炎症性サイトカインの発現が DMF 前処理によって抑制された［RSCH-20[redacted]-023 試験］（テクフィデラ申請資料）。

げっ歯類 EAE モデルで DMF は、最小有効投与量 100 mg/kg/日で EAE 臨床症状スコア（行動及び運動能力）の部分的改善を示し、200 mg/kg/日では EAE 症状を完全に消失させた［RSCH-20[redacted]-029 試験］（テクフィデラ申請資料）；［Linker 2011］。さらに、採取した脊髄を用いた星状膠細胞（GFAP）の活性化マーカー、小膠細胞（IBA-1）の活性化マーカー及び CD3 の免疫染色で、DMF 投与による星状膠細胞及び小膠細胞の活性化・動員並びに T 細胞の浸潤の減少が認められ、神経炎症の組織学的プロファイル及び mRNA 発現プロファイルの改善が認められた。また、DMF は白質の構造的完全性の保持にも有効で、脊髄の神経変性の有意な抑制が認められた［RSCH-20[redacted]-030 試験］（テクフィデラ申請資料）。DMF 及び MMF は、インターフェロン γ 及び IL-17 を産生する炎症誘発性ヘルパーT 細胞サブセットを減少させ、IL-4 及び IL-10 を産生する抗炎症性ヘルパーT2 細胞に偏向させる［Ghoreschi 2011］；［Mehta 2019］。主活性代謝物が DMF と同じ MMF である DRF でも同様の作用が期待される。

2.2.3 DMF 及び MMF の中枢神経系に対する作用

RSCH-20[redacted]-027（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-20[redacted]-028（テクフィデラ申請資料）、
RSCH-1881-120（添付資料番号 4.2.1.1-3）

ラットを用いて、神経変性作用を誘導することが知られるマロン酸の線条体内投与 1 日前及び投与後 4 日間に、DMF（75 又は 100 mg/kg/日）を投与すると、MMF が中枢神経系に移行して関連する細胞保護反応及び神経保護反応を示し、病変体積の有意な減少（それぞれ 44%及び 61%の減少）が認められた。ラットの脳及び脳脊髄液中の MMF 濃度は、血漿中 MMF 濃度のそれぞれ約 8%及び 15%であった［RSCH-20[redacted]-027 試験］（テクフィデラ申請資料）。ヒト初代培養星状膠細胞を 11 µmol/L の MMF で処理すると、50 µmol/L の H_2O_2 による細胞毒性に対して Nrf2 依存性の細胞保護作用を示した［RSCH-20[redacted]-028 試験］（テクフィデラ申請資料）。

さらに、サルを用いて脳及び脊髄の標的組織での DMF の薬物動態及び分布を検討した［RSCH-1881-120 試験］（添付資料番号 4.2.1.1-3）。

表 5 RSCH-1881-120 試験（添付資料番号 4.2.1.1-3）デザイン

Group	Phase[a]	Dose Route	No. of Male Animals	DMF Dose Level			End Points
				mg/kg	µCi/kg	mL/kg	
1	1	Intraduodenal	4[b]	25	~20	10	Plasma and CSF concentration
	2	Intraduodenal	2[b]	25	~40	10	Plasma, CSF, and bone marrow concentration and autoradiography

CSF = cerebrospinal fluid; DMF = dimethyl fumarate
[a] Three additional animals were utilized for a pilot phase to determine catheterization procedure.
[b] Two of the animals from Phase 1 were selected and utilized for Phase 2.

動物の健康状態、死亡、傷害、並びに摂餌量及び水の摂取を 1 日 2 回観察した。体重は各フェーズの投与前に測定した。フェーズ 1 では投与前並びに投与 0.5、1、1.5、2、3、4、及び 6 時間、フェーズ 2 では投与前並びに投与 1、1.5、2、3、及び 4 時間（3 及び 4 時間は 1 例のみ採取）に血液及び脳脊髄液試料を採取し、血漿及び脳脊髄液の放射能を測定した。投与後約 2 時間及び 4 時間でフェーズ 2 の動物を安楽死させ、骨髄試料を採取し放射能濃度を測定した。骨髄採取後フェーズ 2 の動物の定量的全身オートラジオグラフィー解析を行った。

投与後 1 時間の 1 例（フェーズ 1）の脳脊髄液試料以外のすべての採取試料（血漿及び脳脊髄液）で放射能が検出された。脊椎の腰部及び頸部から採取した試料の放射能濃度は、おおむね同程度であり、放射能が脳脊髄液全体に均一に分布していることが示唆された。サルでは、MMF の AUC での脳脊髄液対血漿比の平均値は 14%～32%であった。前頭葉皮質、基底核及び視床で高い放射能が認められ、白質、視神経及び脊髄で認められた放射能の 2～3 倍であった。

サルに DMF を投与すると脳脊髄液で放射能が検出され、中枢神経系に移行することが確認された。マウスのハンチントン病態モデルで、神経変性疾患状態で認められる神経損傷及び機能損傷が DMF の投与により減少することが示されている［Ellrichmann 2011］。非臨床試験結果並びに

臨床試験の画像評価及び機能評価を総合すると、DMF 投与による中枢神経系の神経保護作用が示唆され、主活性代謝物が DMF と同じ MMF である DRF でも同様の作用が示唆された。

3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用下で、[redacted]社 BioPrint パネルを用いて、約 135 種の受容体・イオンチャネル・トランスポーター・酵素結合、酵素・取り込みアッセイに対する DRF 及び HES の in vitro 活性、76 種の受容体・酵素・イオンチャネル・トランスポーターに対する MMF の in vitro 活性を評価した。DRF、MMF 及び HES は、受容体・酵素・トランスポーターのパネルに対して有意な結合及び阻害作用を示さず、オフターゲット活性は認められなかった。さらに、MMF の細胞応答に対する HES の in vitro 阻害作用を評価した。DiscoverX 社の BioMAP® Diversity PLUS アッセイパネルを用いて HES 単独の作用及び MMF との併用作用を検討し、in vitro で HES は MMF の活性を阻害しないことが示された。

3.1 ジロキシメルフマラート（DRF）

AT-5108-01（添付資料番号 4.2.1.2-1）

DRF の副次的薬理作用は、[redacted]社 BioPrint パネルを用いて 10 μmol/L の濃度で評価した。50%超の阻害又は増強（無刺激で実施するアッセイ）を有意な作用と判断した。DRF は 10 μmol/L の濃度で、薬物乱用の可能性との関連が知られているドパミン、セロトニン、γ-アミノ酪酸（GABA）、カンナビノイド、N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体を含む受容体・イオンチャネル・トランスポーター・酵素結合及び酵素・取込みアッセイのいずれに対しても有意な阻害又は増強作用を示さなかった。

3.2 MMF

RSCH-20[redacted]-023（テクフィデラ申請資料）

放射性標識リガンドの受容体結合、リガンド依存性イオンチャネル又は選択された酵素活性に対する MMF の作用の可能性を in vitro 試験で幅広く評価した。リガンド結合及び酵素活性に対する有意な阻害又は増強作用は、溶媒対照 DMSO と比較して 50%超の阻害又は増強作用と定義した。MMF は、10 及び 30 μmol/L の濃度で評価され、薬物乱用の可能性との関連が知られているドパミン、セロトニン、GABA、オピオイド、NMDA、α-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾールプロピオン酸（AMPA）、モノアミン、ナトリウムチャネル、カルシウムチャネル及びカンナビノイドなどの受容体又はトランスポーターを含む 76 種類のアッセイすべてに対して、いずれの濃度でも有意な阻害又は増強作用を示さなかった。MMF の 30 μmol/L の濃度は、DRF の最大推奨臨床用量（MRHD）での MMF の血漿中 C_{max}［ALK8700-A107 試験］の約 2.4 倍である。

3.3 2-ヒドロキシエチルスクシンイミド（HES）

AT-6567-01（添付資料番号 4.2.1.2-2）

ヒト主要代謝物である HES が薬理作用を示す可能性を、[redacted]社 BioPrint パネルを用いて、300 μmol/L の濃度で評価した。50%超の阻害又は増強（無刺激で実施するアッセイ）を有意な作用と判断した。HES は 300 μmol/L で、薬物乱用の可能性との関連が知られているドパミン、セロトニン、GABA、カンナビノイド、NMDA 受容体を含む受容体、トランスポーター又は酵素結合・

阻害アッセイのいずれに対しても有意な結合阻害又は増強作用を示さなかった。HES の 300 µmol/L の濃度は、DRF の MRHD（924［462 BID］mg/日）での HES の C_{max}［ALK8700-A107 試験］の約 4 倍である。

3.4 BioMAP®アッセイパネルを用いた MMF 誘発性の細胞応答に対する HES の作用の評価

ALK003-02-b-00001-000-00（添付資料番号 4.2.1.2-3）

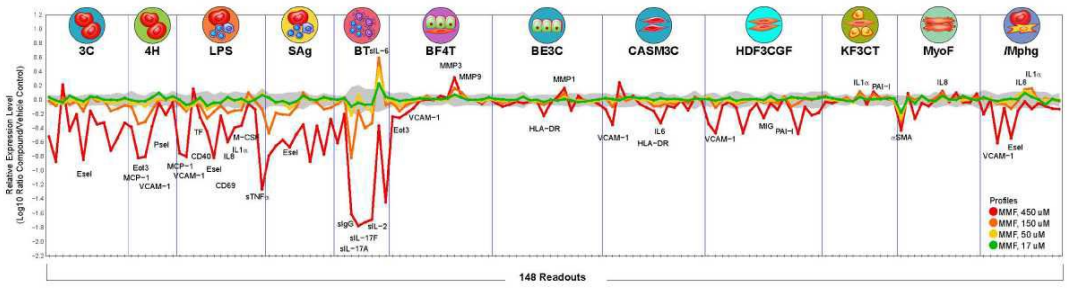
DiscoverX 社の BioMAP® Diversity PLUS アッセイパネルを用いて、MMF 誘発性細胞応答の HES による阻害を評価した。BioMAP® Diversity PLUS アッセイパネルは、多様な細胞型（リンパ球、単球、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞、平滑筋細胞など）のヒト初代培養細胞を用い血管、免疫、炎症、肺、皮膚及び組織の細胞応答をモデル化し、148 種類のタンパク質バイオマーカー及び機能活性に対する包括的な作用を解析する、薬剤及び被験物質のフェノタイプ（表現型）の in vitro スクリーニングパネルである。

MMF 及び HES は、最大 450 µmol/L までの濃度で単独及び併用（MMF + HES）で評価した。図 2 に示すように、ヒト初代培養細胞を用いた BioMAP® Diversity PLUS アッセイパネルで、MMF は単独で高い活性を示したが、HES の単独での作用は認められなかった（図 3）。本試験で MMF に認められた結果は公表論文の知見［Gillard 2015］と一致したことから、BioMAP®システムを用いた細胞活性プロファイリングの結果の再現性が示された。

MMF（450 µmol/L）単独と MMF（450 µmol/L）＋HES（450 µmol/L）の併用の作用を直接比較したところ、2 つのプロファイルは非常に類似した（図 4 参照）。148 種類のバイオマーカー評価項目で確認された違いは唯一、冠動脈平滑筋細胞（CASM3C）の炎症反応をモデル化した BioMAP® CASM3C システムでウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体に対する作用に認められた。作用は中程度であり他に対応するシグナルが認められなかったことから、この作用が臨床的に意義のある可能性は低いと考えられた。プロファイル間の相対的類似性を評価する指標として、BioMAP®プロファイルの相関分析を用いた。この解析では、相関係数 0.7 超のプロファイルは作用機序が類似していると判断された。MMF（450 µmol/L）の単独のプロファイルと MMF（450 µmol/L）＋HES（17～450 µmol/L）併用のプロファイルは高い相関（相関係数 $r > 0.9$）を示した。MMF（450 µmol/L）単独と MMF（450 µmol/L）＋HES（450 µmol/L）併用とのピアソン相関係数 r は 0.98 を示し、これにより HES は MMF 活性全般に対して作用しないことが確認された。

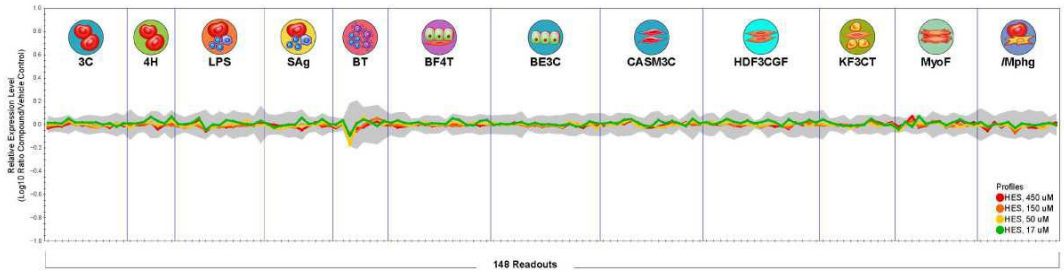
以上、ヒト初代培養細胞システムを用いた BioMAP® Diversity PLUS アッセイパネルで疾患モデル評価項目を評価し、HES は単独で作用を示さず MMF の作用に対して影響を及ぼさないことが示された。

図 2　　MMF の BioMAP®プロファイル



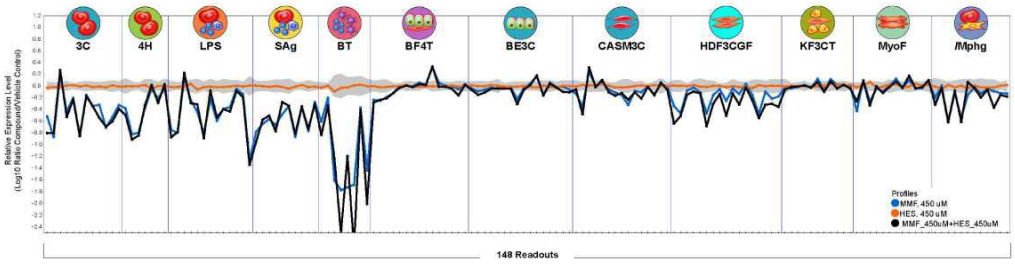
3C = markers of cardiovascular disease and chronic inflammation; 4H = markers of allergy, asthma, and autoimmunity; BE3C = markers of COPD and lung inflammation; BF4T = markers of allergy, asthma, fibrosis and lung inflammation; BT = markers of allergy, asthma, autoimmunity, and oncology; CASM3C = markers of cardiovascular inflammation, and restenosis; HDF3CGF = markers of chronic inflammation and fibrosis; KF3CT = markers of dermatitis and psoriasis; LPS = markers of cardiovascular disease and chronic inflammation; MMF = monomethyl fumarate; /Mphg = markers of cardiovascular disease, chronic inflammation, and restenosis; MyoF = markers of chronic inflammation, fibrosis, matrix remodeling, and wound healing; SAg = markers of autoimmune disease and chronic inflammation.
BioMAP® profile of MMF in the Diversity PLUS panel of human primary cell systems tested at 17 to 450 µmol/L. The Y-axis represents a log-transformed ratio of the biomarker readouts for the test agent-treated sample (n = 1) over vehicle controls (n > 6). The grey region around the Y-axis represents the 95% significance envelope generated from the historical vehicle controls. Biomarker activities are annotated when 2 or more consecutive concentrations change in the same direction relative to vehicle controls, are outside the significance envelope, and have at least 1 concentration with an effect size > 20% ($|\log_{10}$ ratio$| > 0.1$).
Source: ALK003-02-b-00001-000-00 (M 4.2.1.2-3)

図 3　　HES の BioMAP®プロファイル



3C = markers of cardiovascular disease and chronic inflammation; 4H = markers of allergy, asthma, and autoimmunity; BE3C = markers of COPD and lung inflammation; BF4T = markers of allergy, asthma, fibrosis and lung inflammation; BT = markers of allergy, asthma, autoimmunity, and oncology; CASM3C = markers of cardiovascular inflammation, and restenosis; HDF3CGF = markers of chronic inflammation and fibrosis; HES = 2-hydroxyethyl succinimide; KF3CT = markers of dermatitis and psoriasis; LPS = markers of cardiovascular disease and chronic inflammation; /Mphg = markers of cardiovascular disease, chronic inflammation, and restenosis; MyoF = markers of chronic inflammation, fibrosis, matrix remodeling, and wound healing; Sag = markers of autoimmune disease and chronic inflammation.
BioMAP® profile of HES tested at 17 to 450 µmol/L in the Diversity PLUS panel. The Y-axis represents a log-transformed ratio of the biomarker readouts for the drug-treated sample (n = 1) over vehicle controls (n > 6). The grey region around the Y-axis represents the 95% significance envelope generated from historical vehicle controls. Biomarker activities are annotated when 2 or more consecutive concentrations change in the same direction relative to vehicle controls, are outside the significance envelope, and have at least 1 concentration with an effect size > 20% ($|\log_{10}$ ratio$| > 0.1$.
Source: ALK003-02-b-00001-000-00 (M 4.2.1.2-3)

図 4　　MMF 及び HES の単独、並びに併用（MMF+HES）の BioMAP®プロファイルの比較



3C = markers of cardiovascular disease and chronic inflammation; 4H = markers of allergy, asthma, and autoimmunity; BE3C = markers of COPD and lung inflammation; BF4T = markers of allergy, asthma, fibrosis and lung inflammation; BT = markers of allergy, asthma, autoimmunity, and oncology; CASM3C = markers of cardiovascular inflammation, and restenosis; HDF3CGF = markers of chronic inflammation and fibrosis; HES = 2-hydroxyethyl succinimide; KF3CT = markers of dermatitis and psoriasis; LPS = markers of cardiovascular disease and chronic inflammation; MMF = monomethyl fumarate; /Mphg = markers of cardiovascular disease, chronic inflammation, and restenosis; MyoF = markers of chronic inflammation, fibrosis, matrix remodeling, and wound healing; Sag = markers of autoimmune disease and chronic inflammation.
Comparison of the BioMAP® profiles of MMF (450 µmol/L), HES (450 µmol/L), and the combination MMF (450 µmol/L) + HES (450 µmol/L). In this analysis, the profile of the combination has a high degree of similarity (Pearson's correlation, r = 0.98) with the profile of MMF (450 µmol/L) alone.
Source: ALK003-02-b-00001-000-00 (M 4.2.1.2-3)

4 安全性薬理試験

DRF の心血管系、呼吸系及び神経行動に対する安全性薬理試験は、GLP に準拠して in vitro 及び *in vivo* で評価した。心血管系に対する評価項目は、サルを用いた反復投与毒性試験の一般毒性評価にも組み入れて評価した（M2.6.6.3）。さらに、GLP 適用下で、ヒト主要代謝物である MMF 及び HES の作用を in vitro の hERG 試験で評価した。

4.1 In vitro 安全性薬理試験

4.1.1 ヒト胎児腎細胞 293（HEK293）に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対するジロキシメルフマラート（DRF）の作用（GLP 適用）

AT-5108-02（添付資料番号 4.2.1.3-1）

ヒト胎児腎細胞 293（HEK293 細胞株）を用いて in vitro hERG パッチクランプ試験を実施して、心筋活動電位の QT 延長に対する DRF の作用を評価した。hERG は急速活性型遅延整流カリウム電流（IKr）を形成する成分であり、このカリウム電流が阻害されると心筋活動電位及び QT 間隔が延長される可能性がある。

最大 300 µmol/L までの濃度の DRF は、溶媒対照（137 mmol/L NaCl、4.0 mmol/L KCl、1.8 mmol/L $CaCl_2$、1 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L グルコース、0.3% DMSO、pH 7.4）と比較して hERG 電流を有意に阻害しなかった。DRF は 10 µmol/L で 0.8%（n = 3）、300 µmol/L で 1.1%（n = 4）の hERG 電流の阻害を示し、溶媒対照は 1.8%（n = 3）の阻害を示した。同一試験条件で、陽性対照（60 nmol/L のテルフェナジン）は hERG カリウム電流を 75.7%阻害し（n = 2）、溶媒対照と比較して顕著な阻害が認められ、この試験系の hERG 阻害に対する感度が確認された。hERG カリウム電流阻害作用に対する DRF の 50%阻害濃度（IC_{50}）値は算出できなかったが、300 µmol/L 超と推定した。

4.1.2 HEK293 細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する MMF の作用（GLP 適用）

PD03-21（テクフィデラ申請資料）

HEK293 細胞を用いた in vitro hERG パッチクランプ試験を実施して、主活性代謝物である MMF の心筋活動電位の QT 延長に対する作用を評価した。最大 1500 µmol/L までの濃度の MMF は、溶媒対照（137 mmol/L NaCl、4.0 mmol/L KCl、1.8 mmol/L $CaCl_2$、1 mmol/L $MgCl_2$、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L グルコース、0.1% DMSO、pH 7.4）と比較して hERG 電流の有意な阻害を示さなかった。MMF は 60 µmol/L で 1.0%、180 µmol/L で 0.5%、600 µmol/L で 0.1%、1500 µmol/L で 1.2%の hERG 電流の阻害を示し、溶媒対照は 0.2%の阻害を示した（各 n = 3）。同一試験条件で、陽性対照（60 nmol/L のテルフェナジン）は hERG カリウム電流を 86.1%阻害し（n = 2）、溶媒対照と比較して顕著な阻害が認められ、この試験系の hERG 阻害に対する感度が確認された。この試験系での MMF の IC_{50} は 1500 µmol/L 超と推定した。

4.1.3 HEK293 細胞に発現させたクローン化 hERG カリウムチャネルに対する HES の作用（GLP 適用）

AT-6567-02（添付資料番号 4.2.1.3-2）

HEK293 細胞を用いた in vitro hERG パッチクランプ試験を実施して、HES の心筋活動電位の QT 延長に対する作用を評価した。最大 300 µmol/L の濃度までの HES は、溶媒対照（137 mmol/L NaCl、4.0 mmol/L KCl、1.8 mmol/L CaCl2、1 mmol/L MgCl2、10 mmol/L HEPES、10 mmol/L グルコース、0.3% DMSO、pH 7.4）と比較して hERG 電流を有意に阻害しなかった。HES は、hERG 電流を 10 µmol/L で 1.6%、300 µmol/L で 0.9%阻害し、溶媒対照は 0.6%の阻害を示した（各 n = 3）。同一試験条件下で、陽性対照（60 nmol/L のテルフェナジン）は hERG カリウム電流を 90.3%（n = 2）阻害し、溶媒対照と比較して顕著な阻害が認められた。HES の hERG カリウム電流阻害に対する作用の IC_{50} 値は算出できなかったが、300 µmol/L（42900 ng/mL）超と推定した。

4.2 In vivo 安全性薬理試験

DRF は、サルを用いた心血管系、並びにラットを用いた呼吸系及び中枢神経系（神経行動）に対する作用などの一連の安全性薬理試験で評価した。In vivo 試験で DRF の調製に使用した溶媒は、0.5%（重量/重量［w/w］）Methocel E50 Premium LV、0.2%（w/w）ポリソルベート 20、50 mmol/L クエン酸緩衝液、pH 4.0 ± 0.1 であった。安全性薬理試験で選択した用量は、DRF のヒト初回投与試験を裏付けるラット及びサルの 2 週間毒性試験で使用した用量と同じ用量を用いた。高用量の 400 mg/kg の DRF を投与したサルでは、体温の軽微な変化及び心拍数で補正した QT 間隔（QT_c）の軽微な延長が認められたが、これらの体温変化及び QT_c の変化は生理学的に意義のある変化ではないと考えられ、有害ではないと判断された。ラットでは、DRF を 600 mg/kg まで投与しても、中枢神経系及び呼吸系に対して有害な作用は認められなかった。

4.2.1 雄性テレメトリー装着カニクイザルを用いた心血管系に対するジロキシメルフマラート（DRF）の経口投与による作用の安全性薬理評価（GLP 適用）

AT-5108-08（添付資料番号 4.2.1.3-3）

無麻酔非拘束雄性カニクイザル（約 3.9～6.1 歳、4.65～6.90 kg）（n = 4）を用いて、ラジオテレメトリー法で DRF の心血管系に対する作用を評価した。各投与間で 3 日間の休薬期間を設け、ラテン方格法を用いて、投与を割り当てた。0、25、75 又は 400 mg/kg の DRF を単回経口投与し、心血管系パラメータ（収縮期、拡張期及び平均血圧、心拍数、心電図の間隔及び波形）、一般状態及び体温、並びに DRF 及びその代謝物（MMF 及び RDC-8439）のトキシコキネティクス（TK）を評価した。

400 mg/kg 投与群では、DRF 投与に関連する嘔吐、活動性低下及び円背位の一般状態の変化、軽微な体温の変化（上昇及び低下）、並びに投与後 10～18 時間に統計学的に有意な QT_c 延長が認められた（溶媒対照投与群と比較して 3%～6%）。QT_c の延長は高用量の DRF 投与に関連する可能性があると考えられたが、MMF の C_{max}（投与 0.25～0.75 時間後）及び HES の C_{max}（投与 2 時間後）との相関は認められなかった。さらに、QT PRODACT 試験（QT 間隔延長に関するデータベース構築のためのプロジェクト）の結果に基づき、ヒトで QT 間隔延長を引き起こすことが知

られている薬剤は、サルでは 10%を超える平均 QT_c 延長を引き起こすことが明らかになっている［Ando 2005］。したがって、本試験で認められた QT_c の変化は生理学的に意味のあるものではないと考えられた。追加の詳細な説明を 6.2.1 項に記載した。

本試験の評価項目に関して、DRF の経口投与に対する無毒性量（NOAEL）は 400 mg/kg と判断された。NOAEL での MMF の C_{max} は 63400 ng/mL、0 時間から 24 時間までの濃度時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24h}$）は 193000 ng*h/mL、RDC-8439 の C_{max} は 762 ng/mL、0 時間から最終定量可能時間までの濃度時間曲線下面積（AUC_{last}）は 1250 ng*h/mL であった。また、本試験では HES の全身曝露量は測定していないが、DRF を用いたサルの薬物動態（PK）試験［M2.6.4.3.3.1、AT-5108-28 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-4）より NOAEL での HES の C_{max} は 117000 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$ は 1650000 ng*h/mL と推定される。DRF の測定可能な全身曝露は認められなかった。

4.2.2 雄性ラットを用いた中枢神経系に対するジロキシメルフマラート（DRF）経口投与の作用の安全性薬理評価（機能観察総合評価［FOB］）（GLP 適用）

AT-5108-10（添付資料番号 4.2.1.3-4）

雄性 Sprague-Dawley（SD）ラット（約 6 週齢、183～218 g）（n = 10/群）に、0、60、150 又は 600 mg/kg の DRF を単回経口投与後に FOB で神経行動に対する急性毒性の可能性を評価した。死亡、FOB 及び一般状態の変化を評価し、FOB では活動性・覚醒・行動、神経筋機能、感覚運動機能、自律神経機能及び生理学的パラメータを、投与前（Day 1）、投与後 15 分及び 24 時間に評価した。

DRF の投与に関連した死亡は認められず、興奮作用、鎮静作用、一般状態の変化及び神経行動に対する作用の誘発は認められなかった。神経筋、感覚運動、自律神経機能領域及び一般的な生理学的パラメータに対する作用は認められなかった。600 mg/kg 投与の 24 時間後に軽微な体重減少（同時に実施した溶媒対照群と比較して約 5%の減少）が認められた。この所見は DRF の投与に関連すると考えられたが、変化の程度が軽微であったため、有害な作用とは判断されなかった。本試験の MMF 及び HES の曝露量（DRF の MRHD での曝露量 C_{max} のそれぞれ 29 倍及び 14 倍、AUC のそれぞれ 14 倍及び 8 倍［ALK8700-A107 試験］）では、活動性・行動（興奮及び鎮静作用の両方）、神経筋機能、感覚運動機能、自律神経機能及び生理学的パラメータの FOB 評価に対して作用は認められなかった。また、本試験中、他に DRF の投与に関連する変化は認められなかった。

マウス、ラット、ウサギ及びサルを用いた DRF の非臨床 in vivo 毒性試験で、投与及び無投薬観察期間中に投与に関連した中枢神経系に対する作用及び神経行動変化（興奮又は鎮静作用）は認められなかった（M2.6.6）。すべての試験及び動物種の一般状態の変化の観察で一貫性なく認められた活動性低下は、中枢神経系に対する作用ではなく、標的臓器毒性に関連した全身性の作用に起因するものであった。また、DRF を評価した臨床試験で薬物乱用の可能性を示す所見は認められなかった（M2.7.4.5.7）。

本試験で評価した評価項目に関して、DRF の経口投与に対する NOAEL は 600 mg/kg と判断された。本試験では、DRF、MMF、RDC-8439 及び HES の血漿中濃度は測定しなかった。DRF、MMF 及び RDC-8439 の全身曝露量は、同用量の DRF を評価した呼吸系に対する安全性薬理試験［4.2.3

項、AT-5108-09 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-5）より推定し、HES の全身曝露量はラットで実施した DRF の PK 試験［M2.6.4.3.2.3、AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）より推定した。NOAEL での MMF の C_{max} は 46700 ng/mL、AUC_{0-24h} は 90800 ng*h/mL、HES の C_{max} は 159000 ng/mL、AUC_{0-24h} は 1810000 ng*h/mL、RDC-8439 の C_{max} は 877 ng/mL、AUC_{last} は 1380 ng*h/mL と推定される。DRF の測定可能な全身曝露は認められなかった。

4.2.3 雄性ラットを用いた呼吸系に対するジロキシメルフマラート（DRF）経口投与の作用の安全性薬理評価（GLP 適用）

AT-5108-09（添付資料番号 4.2.1.3-5）

雄性 SD ラット（約 6 週齢、174～220 g）（n = 8/群）に、0、60、150 又は 600 mg/kg の DRF を単回経口投与後に呼吸系に対する作用を評価した。死亡、一般状態の変化及び呼吸機能（呼吸数、1 回換気量、毎分換気量）を評価した。雄性動物（対照群 n = 3、各 DRF 投与群 n = 6）のサテライト群を設けて、DRF 及び 2 種類の代謝物（MMF 及び RDC-8439）の TK を評価した。本試験では HES の全身曝露量は測定しなかったが、HES の全身曝露量はラットで実施した DRF の PK 試験［M2.6.4.3.2.3、AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）より推定した。

60、150 又は 600 mg/kg の投与量では、DRF の投与に関連した死亡は認められず、一般状態の変化及び呼吸機能に対する明らかな作用も認められなかった。600 mg/kg 投与群に呼吸数の軽微な増加及び一回換気量の軽微な減少が認められたが、DRF の投与に関連するものではないと判断された。したがって、本試験で評価した評価項目に関して、DRF の経口投与の無影響量（NOEL）は 600 mg/kg と判断された。NOEL での MMF の C_{max} は 46700 ng/mL、AUC_{0-24h} は 90800 ng*h/mL であり、HES の C_{max} は 159000 ng/mL、AUC_{0-24h} は 1810000 ng*h/mL、RDC-8439 の C_{max} は 877 ng/mL、AUC_{last} は 1380 ng*h/mL と推定された。DRF の測定可能な全身曝露は認められなかった。

5 薬力学的薬物相互作用

非臨床薬力学的相互作用試験は実施していない。

6 考察と結論

6.1 効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験

ジロキシメルフマラート（DRF）は、RRMS の再発予防及び身体的障害の進行抑制を適応とする治療薬として開発した。DRF の主活性代謝物であるフマル酸モノメチル（MMF）の薬理学的プロファイルは、現在市販されているテクフィデラ®（フマル酸ジメチル［DMF］）の開発時に広範に解析されている。その作用機序は、細胞の抗酸化応答を制御するマスター転写因子である Nrf2 の活性化を伴い［RSCH-20[redacted]-024 試験］（テクフィデラ申請資料）、多数のシグナル伝達経路の活性化により炎症性メディエーターを低下させ、酸化ストレスから細胞を保護することが提唱されている。

ヒトのデータから、DRF 投与後の主要代謝物である HES の全身曝露量は MMF の全身曝露量を上回ることが示されている。したがって、HES が MMF の作用に影響を及ぼさないことを示すために効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験を実施した。

Lewis ラット標準病態モデル（EAE モデル）で、DRF は疾患重症度を低下させ、MMF の曝露量を一致させた用量を投与したとき、DRF 投与による疾患重症度の低下は DMF 又は MMF で観察された低下と同程度であった。DRF、DMF 及び MMF が同程度の MMF 曝露量（AUC）を示す投与量で同程度の有効性を示したことから、DRF の不活性代謝物である HES が in vivo で MMF の作用を阻害しないことが示された。ラットを用いた試験のすべての用量で、MMF に対する HES の平均 AUC 比は 11.7～39.6、平均 C_{max} 比は 2.6～5.7 であった［M2.6.4.3.2.2、LSC17-033 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-2）；［M2.6.4.3.2.3、AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）；［M2.6.4.9、M2.6.6.3.5、AT-5108-15 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-5）。MS 患者の定常状態で、MMF に対する HES の AUC 及び C_{max} はそれぞれ 21 倍及び 6.6 倍高く［M2.7.2.2.10、ALK8700-A301 試験］、非臨床試験で認められた値と同程度であった。

DRF の副次的薬理作用を検討するために、10 µmol/L の濃度を用い、in vitro の [redacted] 社 BioPrint パネルで評価した。DRF は 135 種類の in vitro 受容体・イオンチャネル・トランスポーター・酵素結合、酵素・取り込みアッセイのいずれでも、結合及び活性に対して有意な阻害又は増強作用を示さなかった。同様に、MMF は 10 及び 30 µmol/L の濃度で同様の 76 種類の in vitro 結合試験パネルに対して有意な阻害又は増強作用を示さなかった。

HES を用いて追加の in vitro アッセイを実施して、HES の単独の副次的薬理作用及び MMF の薬理作用に及ぼす影響を検討した。[redacted] 社 BioPrint パネルで、HES は DRF の MRHD（924［462 BID］mg/日）での C_{max}［ALK8700-A107 試験］の約 4 倍高い 300 µmol/L の濃度で、受容体結合、酵素・取り込みアッセイ（総標的数 134 種）に対して有意な結合阻害又は増強作用を示さなかった。また、DiscoverX 社の BioMAP® Diversity PLUS パネルで、HES は単独で作用を示さず、MMF により誘発される細胞応答に対しても 450 µmol/L（MRHD での HES の C_{max} の約 6 倍）まで阻害作用を示さなかった。

以上、効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験結果から、HES は薬理学的に不活性であり、in vitro 及び in vivo のいずれでも MMF の作用を阻害しないことが示された。このことから、HES は臨床で、MMF の作用に影響を及ぼさないことが予想された。

In vitro で、DRF、MMF 及び HES は、薬物乱用性と関連する可能性が知られている受容体、リガンド依存性イオンチャネル及び酵素に対して有意な作用を示さなかった。DRF の MRHD での DRF、MMF 及び HES の血漿中 C_{max}［ALK8700-A107 試験］と比較すると、DRF は経口投与後速やかに MMF に変換され血漿中で定量できないため比較はできないが、MMF 及び HES はそれぞれ 2.4 倍及び 4 倍の濃度まで有意な作用を示さなかった［AT-5108-01 試験］（添付資料番号 4.2.1.2-1）；［RSCH-20[redacted]-023 試験］（テクフィデラ申請資料）；［AT-6567-01 試験］（添付資料番号 4.2.1.2-2）。

6.2 安全性薬理試験

以下の項では、DRF 及びヒトでの主要代謝物である MMF 及び HES の心血管系、呼吸系又は神経行動に対する安全性薬理試験で作用が認められた全身曝露量を、DRF の MRHD での臨床曝露量と比較した。安全性薬理試験では HES のバリデートされた測定法が利用できなかったため、HES の全身曝露量パラメータは、ラット［M2.6.4.3.2.3、AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）及びサル［M2.6.4.3.3.1、AT-5108-28 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-4）を用いて DRF で実施した PK 試験の曝露量データより推定した。臨床曝露量データは ALK8700-A107 試験結果を用いた。安全性薬理試験で認められた主な所見及び曝露量の安全域を表 6 に示す。MRHD での MMF 及び HES 臨床曝露量（AUC 及び C_{max}）に比較して、それぞれ約 14 倍以上及び 7 倍以上の曝露量（AUC 及び C_{max}）比で、心血管系、呼吸系及び神経行動に対して明らかな有害な作用は認められなかった。

6.2.1 心血管系に対するジロキシメルフマラート（DRF）の経口投与の作用

MMF 及び HES の心血管系に対する主な作用及び関連する全身曝露量パラメータを表 6 に示す。

DRF 及び主不活性代謝物 HES は、in vitro で hERG 電流を阻害しなかった（IC_{50} 値は 300 µmol/L 超、DRF 及び HES でそれぞれ 76600 及び 42900 ng/mL 超）。また、DRF の活性代謝物である MMF は、hERG 電流を阻害しなかった（IC_{50} 値は 1500 µmol/L［195000 ng/mL］超）。DRF の MRHD での各臨床 C_{max} 値（DRF は測定不能、HES は 11000 ng/mL、MMF は 1620 ng/mL［ALK8700-A107 試験］）に対して IC_{50} 値を比較すると、DRF は経口投与後速やかに MMF に変換され血漿中で定量できないため比較できないが、HES 及び MMF の濃度比はそれぞれ約 4 倍及び 120 倍であった。DRF、HES 及び MMF の hERG 試験の結果から、DRF の MRHD で、QT_c がヒトで延長する可能性は低いことが示唆された。

サルを用いた単回投与の心血管系に対する安全性薬理試験［AT-5108-08 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-3）では、DRF の MRHD での MMF 及び HES の臨床曝露量［ALK8700-A107 試験］のそれぞれ約 30 倍以上及び 7 倍以上の曝露量（AUC 及び C_{max}）で、わずかではあるが統計学的に有意な QT_c 延長が認められた。サルを用いた毒性試験では、DRF の反復投与による QT_c に対する作用を評価した（M2.6.6.3.9 表 2）。2 週間経口投与毒性試験では、高用量（400 mg/kg）投与群の雌に統計学的に有意な QT_c のわずかな延長が認められた（AT-5108-07 試験、添付資料番号 4.2.3.2-7）が、これは同用量を投与した心血管系に対する安全性薬理試験の結果と一致している。AT-5108-07 試験で MMF 及び HES の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、DRF の MRHD での臨床曝露量［ALK8700-

A107 試験］のそれぞれ約 32 倍以上及び 5 倍以上であった。その後に実施したサルの 91 日間［AT-5108-14 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-8）及び 39 週間［AT-5108-16 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-9）経口投与毒性試験では、いずれの用量（MMF の曝露量［AUC 及び C_{max}］は臨床曝露量のそれぞれ約 15 倍以上及び 9 倍以上、HES の曝露量［AUC 及び C_{max}］は臨床曝露量のそれぞれ 4 倍以上及び 3 倍以上）でも QT_c に対する作用は認められなかった。安全性薬理試験及び毒性試験で認められた QT_c に対する作用は DRF に関連するものであったが、10%未満の変化で、生理学的意義はないと考えられた［Ando 2005］。

QT 評価試験を含む完了した臨床試験の解析から、DRF 投与はヒトの QT_c に対して臨床的に意義のある影響を及ぼさないことが示された。これらの結果は M2.7.2.3.6 に要約している。

6.2.2 呼吸系及び神経行動に対するジロキシメルフマラート（DRF）経口投与の作用

雄性ラットを用いて DRF の呼吸系［AT-5108-09 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-5）及び神経行動［AT-5108-10 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-4）に対する作用を評価し、表 6 に要約した。最大 600 mg/kg までの用量で、呼吸系及び神経行動学的パラメータに対して DRF の投与に関連した作用は認められなかった。DRF の MRHD での MMF 及び HES 臨床曝露量［ALK8700-A107 試験］に比較して、600 mg/kg 投与の C_{max} 値はそれぞれ約 29 倍及び 14 倍、AUC 値はそれぞれ約 14 倍及び 8 倍であった。

DRF、並びに in vivo 代謝物である MMF 及び HES は、ラットを用いた FOB に基づく中枢神経系に対する安全性薬理試験［4.2.2 項、AT-5108-10 試験］（添付資料番号 4.2.1.3-4）並びにその他の in vivo 非臨床試験及び臨床試験で、中枢神経系に対する作用及び神経行動変化（興奮又は鎮静作用）を示さなかった。

6.3 HES の安全性薬理評価

非臨床安全性薬理試験でのヒト主要代謝物の曝露量に関する情報を 1 項に記載している。HES は DRF の主不活性代謝物であり、非臨床安全性薬理試験の心血管系、呼吸系又は神経機能に対する DRF 投与による所見と HES の曝露量（AUC 及び C_{max}）を、DRF の MRHD での HES の臨床曝露量と比較した（表 6 参照）。In vivo 安全性薬理試験の NOAEL 又は NOEL での HES の曝露量は、MRHD 投与での臨床曝露量（AUC 及び C_{max}）の 7 倍以上であり、ICH M3(R2)［ICH 2009］及び ICH M3(R2)に関する質疑応答集［ICH 2012］に記載されているヒトの主要代謝物に対して非臨床試験で適切な安全性評価を行うために必要とされる曝露量よりも高かった。さらに、HES の副次的薬理作用・オフターゲット作用及び hERG 阻害作用の可能性に対する in vitro 評価、並びに HES が作用を示さないことを、6.1 項及び 6.2.1 項で考察した。

6.4 効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験の総合評価

Lewis ラット EAE モデルを用いた効力を裏付ける試験では、このモデルで観察される麻痺性疾患に対して DRF 投与で経時的に認められた疾患重症度の低下は、MMF 及び DMF で認められた疾患重症度の低下と同程度であることが示された。副次的薬理試験では、HES の副次的薬理作用

及び細胞活性に対する阻害作用を評価し、HES が薬理作用を示さず、正常な細胞活性又は MMF 誘導性の細胞活性を阻害しないことが示された。また、DRF、MMF 及び HES は、薬物乱用性との関連が知られている受容体、リガンド依存性イオンチャネル、酵素及びトランスポーターに対して結合活性を示さなかった。また、ラットを用いた FOB に基づく中枢神経系に対する安全性薬理試験並びにその他の in vivo 非臨床試験及び臨床試験で、DRF は中枢神経系に対する作用及び神経行動変化（興奮又は鎮静作用）を示さなかった。

GLP 及び ICH ガイドラインに準拠した一連の in vitro 及び in vivo の安全性薬理試験で、DRF の心血管系、呼吸系及び神経行動に対する作用を評価した。検討した最高用量まで、in vivo で心血管系、呼吸系及び神経行動に対する明らかな作用は認められなかった。最高用量での MMF 及び HES の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、MRHD での臨床曝露量［ALK8700-A107 試験］のそれぞれ約 14 倍以上及び 7 倍以上であった。

7 図表

表 6 ジロキシメルフマラート（DRF）、MMF 及び HES を評価した安全性薬理試験から得られた所見の要約

Study Type and Duration (Reference Number/ Location in CTD)	**Species/Route of Administration/ Doses**	**Key Findings**	**Systemic Exposure of MMF[a,b] at NOEL/NOAEL (AUC [ng*h/mL]/ C_{max} [ng/mL])**	**MMF Nonclinical to Clinical Exposure Multiple (AUC/C_{max})**	**Systemic Exposure of HES[c,d] at NOEL/NOAEL (AUC [ng*h/mL]/ C_{max} [ng/mL])**	**HES Nonclinical to Clinical Exposure Multiple (AUC/C_{max})**
Cloned hERG potassium channels patch clamp assay (AT-5108-02/ 4.2.1.3-1)	HEK293 cells/ in vitro/ 10 and 300 µmol/L	DRF IC_{50} > 300 µmol/L	NA	NA	NA	NA
Cloned hERG potassium channels patch clamp assay (PD03-21[i])	HEK293 cells/ in vitro/ 60, 180, 600, and 1500 µmol/L	MMF IC_{50} > 1500 µmol/L	NA	NA/120[e]	NA	NA
Cloned hERG potassium channels patch clamp assay (AT-6567-02/ 4.2.1.3-2)	HEK293 cells/ in vitro/ 10 and 300 µmol/L	HES IC_{50} > 300 µmol/L	NA	NA	NA	NA/4[e]
Cardiovascular assessment in monkeys (AT-5108-08/ 4.2.1.3-3)	Monkey/PO/ 0, 25, 75, and 400 mg/kg	NOAEL = 400 mg/kg[f] Vomitus, ↓ activity, and hunched posture; slight changes in body temperature (↑ followed by ↓); and slight ↑ in QTc at 400 mg/kg (QTc changes not considered physiologically relevant).	193000 (M)/ 63400 (M)	30 (M)/ 39 (M)	1650000 (M)/ 117000 (M)	7 (M)/ 11 (M)

Study Type and Duration (Reference Number/ Location in CTD)	**Species/Route of Administration/ Doses**	**Key Findings**	**Systemic Exposure of MMF[a,b] at NOEL/NOAEL (AUC [ng*h/mL]/ C_{max} [ng/mL])**	**MMF Nonclinical to Clinical Exposure Multiple (AUC/C_{max})**	**Systemic Exposure of HES[c,d] at NOEL/NOAEL (AUC [ng*h/mL]/ C_{max} [ng/mL])**	**HES Nonclinical to Clinical Exposure Multiple (AUC/C_{max})**
CNS or neurobehavioral (FOB) assessment in rats (AT-5108-10/ 4.2.1.3-4)	Rat/PO/ 0, 60, 150, and 600 mg/kg	NOAEL = 600 mg/kg Slight ↓ in body weight	90800 (M)[g]/ 46700 (M)[g]	14 (M)/ 29 (M)	1810000 (M)/ 159000 (M)	8 (M)/ 14 (M)
Respiratory assessment in rats (AT-5108-09/ 4.2.1.3-5)	Rat/PO/ 0, 60, 150, and 600 mg/kg	NOEL = 600 mg/kg[h]	90800 (M)/ 46700 (M)	14 (M)/ 29 (M)	1810000 (M)/ 159000 (M)	8 (M)/ 14 (M)

AUC = area under the concentration-time curve; AUC_{0-24h} = area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours; AUC_{last} = area under the concentration-time curve from time 0 to time of the last measurable concentration; BID = bis in die; C_{max} = maximum observed concentration; CNS = central nervous system; DRF = diroximel fumarate; FOB = functional observation battery; HEK293 = human embryonic kidney cells 293; hERG = human ether-a-go-go–related gene; HES = 2-hydroxyethyl succinimide; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; M = male; MMF = monomethyl fumarate; NA = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level; NOEL = no observed effect level; PK = pharmacokinetic; PO = per os; QTc = QT interval corrected for heart rate.

[a] AUC (reported as AUC_{last} or AUC_{0-24h}) and C_{max} values for MMF were calculated from plasma concentration data on the day of dosing for all studies.

[b] Clinical exposure parameters for MMF were obtained from Study ALK8700-A107 at a daily dose of 924 (462 BID) mg/day of DRF; AUC_{0-24h} and C_{max} values were 6470 ng*h/mL and 1620 ng/mL, respectively.

[c] Clinical exposure parameters for HES were obtained from Study ALK8700-A107 at a daily dose of 924 (462 BID) mg/day of DRF; AUC_{0-24h} and C_{max} values were 227000 ng*h/mL and 11000 ng/mL, respectively.

[d] Plasma concentrations of HES were not measured in in vivo safety pharmacology studies. Accordingly, systemic exposure parameters for HES were estimated by linearly extrapolating the AUC and C_{max} values using data from respective bridging PK studies with DRF in rats [M2.6.4.3.2.3, AT-5108-27] (M 4.2.2.2-3) and monkeys [M2.6.4.3.3.1, AT-5108-28] (M 4.2.2.2-4). Day 1 data from the bridging PK studies were used for the estimations, as safety pharmacology parameters were evaluated after a single dose of DRF.

[e] Exposure multiple was calculated by dividing the hERG IC_{50} value (> 1500 µmol/L and > 300 µmol/L, respectively, for MMF and HES) by the respective C_{max} for MMF and HES at the maximum recommended human dose of DRF (1620 ng/mL or 12.45 µmol/L for MMF using a molecular weight of 130.1 and 11000 ng/mL or 76.8 µmol/L for HES using a molecular weight of 143.14).

[f] The Study Director at the test facility did not interpret the slight QTc increases at 400 mg/kg physiologically significant/adverse in nature; consequently, the NOAEL was considered to be 400 mg/kg. A more conservative interpretation of the findings suggests a NOAEL of 75 mg/kg.

[g] MMF exposure data are from Study AT-5108-09 (M 4.2.1.3-5), as dose levels used in both studies were identical.
[h] The Study Director at the test facility did not interpret the slight increases in respiratory rate and slight decreases in tidal volume at 600 mg/kg as clear DRF-related effects; consequently, the 600 mg/kg dose was identified as a NOEL rather than a NOAEL.
[i] The study has been submitted at the filing of Tecfidera.

8 参考文献

Ando K, Hombo T, Kanno A, et al. QT PRODACT: in vivo QT assay with a conscious monkey for assessment of the potential for drug-induced QT interval prolongation. J Pharmacol Sci. 2005;99(5):487-500. doi: 10.1254/jphs.qt-a4.

Carlström KE, Ewing E, Granqvist M, et al. Therapeutic efficacy of dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis associates with ROS pathway in monocytes. Nat Commun. 2019;10(1):3081. doi: 10.1038/s41467-019-11139-3.

Ellrichmann G, Petrasch-Parwez E, Lee DH, et al. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. PLoS One. 2011;6(1):e16172. doi: 10.1371/journal.pone.0016172.

Ghoreschi K, Brück J, Kellerer C, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. J Exp Med. 2011;208(11):2291-303. doi: 10.1084/jem.20100977. Epub 2011 Oct 10.

Gillard GO, Collette B, Anderson J, et al. DMF, but not other fumarates, inhibits NF-κB activity in vitro in an Nrf2-independent manner. J Neuroimmunol. 2015;283:74-85. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.04.006. Epub 2015 Apr 23.

Gopal S, Mikulskis A, Gold R, et al. Evidence of activation of the Nrf2 pathway in multiple sclerosis patients treated with delayed-release dimethyl fumarate in the Phase 3 DEFINE and CONFIRM studies. Mult Scler. 2017;23(14):1875-83. doi: 10.1177/1352458517690617. Epub 2017 Feb 3.

ICH guideline. Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2). 2009.

ICH guideline. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A. 2000.

ICH guideline M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals: questions & answers (R2). 2012.

ICH guideline. The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals S7B. 2005.

Linker RA, Lee DH, Ryan S, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. Brain. 2011;134(Pt 3):678-92. doi: 10.1093/brain/awq386.

Majkutewicz I. Dimethyl fumarate: a review of preclinical efficacy in models of neurodegenerative diseases. Eur J Pharmacol. 2022;926:175025. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175025. Epub 2022 May 13.

Mehta D, Miller C, Arnold DL, et al. Effect of dimethyl fumarate on lymphocytes in RRMS: Implications for clinical practice. Neurology. 2019;92(15):e1724-38. doi: 10.1212/WNL.0000000000007262. Epub 2019 Mar 27.

ジロキシメルフマラート

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 3
1　薬理試験：一覧表 4
2　効力を裏付ける試験 6
3　副次的薬理試験 8
4　安全性薬理試験 9
5　薬力学的薬物相互作用試験 11

略語・略号一覧表

表の脚注に記載。

1 薬理試験：一覧表

Test Articles: DRF[a], DMF, MMF and HES[b]					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**GLP Compliance**	**Study Number/ Location in CTD**
Primary Pharmacodynamics					
EAE Model (DRF, DMF, MMF)	Lewis rats	PO	[redacted], [redacted], [redacted], USA	No	LSC[redacted]-069/ 4.2.1.1-1
Measure DRF exposure (PK) and Nrf2-dependent transcriptional (PD) responses including DMF as a positive control (DRF, DMF)	C57BL/6 mice	PO	Biogen Inc., MA, USA	No	RSCH-20[redacted]-018/ 4.2.1.1-2
PK and distribution of DMF to target tissues within the brain and spine (DMF)	Cynomolgus monkeys	Intraduodenal	[redacted], [redacted], [redacted], USA	No	RSCH-1881-120/ 4.2.1.1-3
Secondary Pharmacodynamics					
Enzyme and receptor binding assay (DRF)	Multiple receptors and enzymes	In vitro	[redacted], [redacted], [redacted], France	No	AT-5108-01/ 4.2.1.2-1
Enzyme and receptor binding assay (HES)	Multiple receptors and enzymes	In vitro	[redacted], [redacted], [redacted], France	No	AT-6567-01/ 4.2.1.2-2
Biological activity assay (MMF, HES and MMF + HES) (BioMAP®)	Human primary cells	In vitro	DiscoverX Corporation, CA, USA	No	ALK003-02-b-00001-000-00/ 4.2.1.2-3
Safety Pharmacology					
In Vitro					
hERG (DRF)	HEK293 cells	In vitro	[redacted], [redacted], [redacted], USA	Yes	AT-5108-02/ 4.2.1.3-1
hERG (HES)	HEK293 cells	In vitro	[redacted], [redacted], [redacted], OH, USA	Yes	AT-6567-02/ 4.2.1.3-2
In Vivo					

Test Articles: DRF[a], DMF, MMF and HES[b]					
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**GLP Compliance**	**Study Number/ Location in CTD**
Cardiovascular assessment (DRF)	Cynomolgus monkeys	PO	[redacted], [redacted], USA	Yes	AT-5108-08/ 4.2.1.3-3
CNS or neurobehavioral assessment (DRF)	Sprague-Dawley Rats	PO	[redacted], [redacted], USA	Yes	AT-5108-10/ 4.2.1.3-4
Respiratory assessment (DRF)	Sprague-Dawley Rats	PO	[redacted], [redacted], USA	Yes	AT-5108-09/ 4.2.1.3-5
Pharmacodynamic Drug Interactions	NA	NA	NA	NA	NA

CNS = central nervous system; DMF = dimethyl fumarate; DRF = diroximel fumarate; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; GLP = Good Laboratory Practice; hERG = human ether-a-go-go-related gene; HEK293 = human embryonic kidney cells 293; HES = 2-hydroxyethyl succinimide (also known as RDC-6567); MMF = monomethyl fumarate; PD = pharmacodynamics; PK = pharmacokinetics; PO = per os; NA = not applicable.

[a]DRF is also referred to as BIIB098, RDC-5108, and ALKS 8700.

[b]HES is a major inactive human metabolite of DRF.

2 効力を裏付ける試験

Test Articles: DRF[a], DMF and MMF						
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses**	**Number and Gender per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number/ Location in CTD**
EAE Model[b](DRF, DMF, MMF)	Rat/ Lewis	PO	Vehicle[c]: 0 mg/kg, DMF: 200 mg/kg, MMF: 181 mg/kg, DRF: 354 mg/kg	15 F/ group	DRF, DMF, and MMF demonstrated similar efficacy in the rat EAE model when achieving similar MMF exposure on an AUC basis. Exposure to HES[d] did not interfere with the therapeutic effects of MMF.	LSC[redacted]-069/ 4.2.1.1-1
Measure DRF exposure (PK) and Nrf2-dependent transcriptional (PD) responses including DMF as a positive control (DRF, DMF)	Mouse/ C57BL/6	PO	DRF Vehicle[e]: 0 mg/kg, DRF: 192.5 mg/kg DMF Vehicle[f]: 0 mg/kg, DMF: 100 mg/kg	18 F/ group	DRF at 192.5 mg/kg administered orally to C57BL/6 mice was demonstrated to activate the Nrf2 pathway within the brain, spleen, kidney, and jejunum. The Nrf2 activation profiles of DRF and DMF are very similar.	RSCH-20[redacted]-018/ 4.2.1.1-2
PK and distribution of DMF to target tissues within the brain and spine (DMF)	Monkey/ Cynomolgus	Intraduodenal	25 mg/kg	4 M/ group	Detectable concentrations of radioactivity were observed in both the plasma and the CSF in all time points, excluding the 1-hour CSF collection for 1 animal. Radioactive concentration between collections performed at the lumber region vs. the cervical region of the spine did not appear to be substantially different. This may indicate that the distribution of radioactivity was homogenously distributed throughout the CSF. The QWBA data showed that the highest concentration in tissue was observed in the frontal lobe cortex with high concentrations also observed in the basal ganglia and thalamus; roughly a 2-fold increase in concentration when compared to the sub-divisions of the spine.	RSCH-1881-120/ 4.2.1.1-3

AUC = area under the concentration-time curve; CSF = cerebrospinal fluid; DMF = dimethyl fumarate; DRF = diroximel fumarate; EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; F = female; HES = 2-hydroxyethyl succinimide (also known as RDC-6567); M = male; MMF = monomethyl fumarate; Nrf2 = nuclear factor erythroid-derived 2-like 2; PD = pharmacodynamic; PK = pharmacokinetic; PO = per os; QWBA = quantitative whole-body autoradiography/autoradioluminography.

[a] DRF is also referred to as RDC-5108 and ALKS 8700.

[b] Rats were administered the test articles orally (by gavage) daily for 23 days, consecutively.

[c] 50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% (w/w) Methocel E50 Premium LV and 0.2% (w/w) polysorbate 20, pH 4.

[d] HES is a major inactive human metabolite of DRF.

[e] 10 mmol/L citrate buffer containing 0.5% (w/w) carboxymethylcellulose (CMC) and 0.02% (w/w) Tween 80, pH 5.

[f] 0.8% hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)

3 副次的薬理試験

Test Articles: DRF[a], MMF and HES[c]						
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses**	**Number and Gender per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study Number/ Location in CTD**
Enzyme and receptor binding assay ([redacted] BioPrint panel) (DRF)	NA	In vitro	10 µmol/L	NA	No significant inhibition of receptor binding or activity in enzyme/uptake assays[b]. No significant inhibition of receptor binding or activity in enzyme/uptake assays[b], which included receptors known to be associated with abuse potential (e.g., dopamine, serotonin, gamma-aminobutyric acid [GABA], cannabinoid, and N-methyl-D-aspartate [NMDA] receptors).	AT-5108-01/ 4.2.1.2-1
Enzyme and receptor binding assay ([redacted] BioPrint panel) (HES)	NA	In vitro	300 µmol/L	NA	No significant inhibition of receptor binding or activity in enzyme/uptake assays[b]. No significant inhibition of receptor binding or activity in enzyme/uptake assays[b], which included receptors known to be associated with abuse potential (e.g., dopamine, serotonin, gamma-aminobutyric acid [GABA], cannabinoid, and N-methyl-D-aspartate [NMDA] receptors).	AT-6567-01/ 4.2.1.2-2
Biological activity assay (BioMAP®) (MMF, HES and MMF + HES)	Human primary cells	In vitro	up to 450 µmol/L	NA	No activity with HES alone. HES in combination with MMF (450 µmol/L each) demonstrated a profile of responses with high similarity to MMF alone. A single modest difference on uPAR was noted in the BioMap® CASM3C system.	ALK003-02-b-00001-000-00/ 4.2.1.2-3

CASM3C = coronary artery smooth muscle cell; DRF = diroximel fumarate; HES = 2-hydroxyethyl succinimide (also known as RDC-6567); MMF = monomethyl fumarate; NA = not applicable; uPAR = urokinase plasminogen activator receptor.

[a] DRF is also referred to as BIIB098, RDC-5108 and ALKS 8700.

[b] Significant inhibition in the [redacted] BioPrint panel was considered to be a response > 50%.

[c] HES is a major inactive human metabolite of DRF.

4 安全性薬理試験

Test Articles: DRF[a)] and HES[b)]							
Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)[c)]**	**Number and Gender per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number/ Location in CTD**
In Vitro							
Cardiovascular (DRF)	HEK293 cells transfected with h*ERG*	In vitro	10 and 300 µmol/L	3-4 cell preparations	IC_{50} > 300 µmol/L	Yes	AT-5108-02/ 4.2.1.3-1
Cardiovascular (HES)	HEK293 cells transfected with h*ERG*	In vitro	10 and 300 µmol/L	3 cell preparations	IC_{50} > 300 µmol/L	Yes	AT-6567-02/ 4.2.1.3-2
In Vivo							
Cardiovascular (DRF)	Monkey/ Cynomolgus	PO	0, 25, 75, 400	4 M/ group[d)]	Vomitus, decreased activity, and hunched posture; slight changes in body temperature (increased from 15 to 45 minutes and subsequently decreased from 3.25 to 4 hours, following dosing with 400 mg/kg); and slight increases in QTc at 400 mg/kg (QTc changes not considered physiologically relevant); NOAEL = 400 mg/kg[e)].	Yes	AT-5108-08/ 4.2.1.3-3
CNS or neuro-behavioral (DRF)	Rat/ Sprague-Dawley	PO	0, 60, 150, 600	10 M/ group	Slight decreases in body weight 24 hours following dosing with 600 mg/kg; NOAEL = 600 mg/kg. No effects on activity/behaviour (both excitatory and sedative), neuromuscular function, sensorimotor function, autonomic function, or physiological parameters were observed at MMF and HES exposures.	Yes	AT-5108-10/ 4.2.1.3-4

Test Articles: DRF[a)] and HES[b)]							
Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (mg/kg)[c)]**	**Number and Gender per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study Number/ Location in CTD**
Respiratory (DRF)	Rat/ Sprague-Dawley	PO	0, 60, 150, 600	8 M/ group; TK cohorts: 3 M/ control group; 6 M/ group	No clear effects on respiratory function were noted; NOEL = 600 mg/kg[f)].	Yes	AT-5108-09/ 4.2.1.3-5

CNS = central nervous system; DRF = diroximel fumarate; GLP = Good Laboratory Practice; HEK293 = human embryonic kidney cells 293; h*ERG* = human ether-a-go-go-related gene; HES = 2-hydroxyethyl succinimide (also known as RDC-6567); IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; M = male; MMF = monomethyl fumarate; NOAEL = no observed adverse effect level; NOEL = no observed effect level; PO = per os; QTc = QT interval corrected for heart rate; TK = toxicokinetic.

[a)] DRF is also referred to as BIIB098, RDC-5108 and ALKS 8700.

[b)]HES is a major inactive human metabolite of DRF.

[c)] Doses are in mg/kg unless specified otherwise.

[d)] DRF doses for cardiovascular (Treatments 1 to 4) and TK evaluations (Treatments 5 to 8) were administered according to a Latin square design with a minimum 3-day washout between treatments.

[e)] [redacted] did not consider the slight QTc increases at 400 mg/kg physiologically significant/adverse in nature; Consequently, the NOAEL was considered to be 400 mg/kg. A more conservative interpretation of the findings suggests a NOAEL of 75 mg/kg.

[f)] [redacted] did not consider the slight increases in respiratory rate and slight decreases in tidal volume at 600 mg/kg as clear DRF-related effects; Consequently, the 600 mg/kg dose was identified as a NOEL versus NOAEL.

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ていない。