

ビクトーザ皮下注 18mg

2.4 非臨床に関する概括評価

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

2.4	非臨床試験の概括評価	4
2.4.1	非臨床試験計画概略	4
2.4.1.1	特徴及び分子設計	4
2.4.1.2	開発の経緯及び規制当局との協議	5
2.4.2	薬理試験	5
2.4.2.1	効力を裏付ける試験	7
2.4.2.1.1	GLP-1 受容体に対する作用	7
2.4.2.1.2	作用持続性に関するメカニズム	7
2.4.2.1.3	<i>In vitro</i> 試験での有効性	7
2.4.2.1.4	<i>In vivo</i> 試験での有効性	8
2.4.2.2	副次的薬理試験	10
2.4.2.3	安全性薬理試験	10
2.4.2.4	薬力学的薬物相互作用試験	11
2.4.2.5	考察及び結論	11
2.4.3	薬物動態試験	12
2.4.3.1	吸収	13
2.4.3.2	分布	14
2.4.3.3	代謝及び排泄	15
2.4.3.4	薬物動態学的相互作用	15
2.4.3.5	考察及び結論	16
2.4.4	毒性試験	17
2.4.4.1	一般毒性試験	17
2.4.4.1.1	単回投与毒性試験	17
2.4.4.1.2	反復投与毒性試験	17
2.4.4.2	遺伝毒性試験	18
2.4.4.3	がん原性試験	18
2.4.4.4	生殖発生毒性試験	20
2.4.4.5	局所刺激性試験	21
2.4.4.6	不純物プロファイル及び安全性の検討	22
2.4.4.7	考察及び結論	22
2.4.4.7.1	ヒトへの曝露に関連した曝露量	22
2.4.4.7.2	抗体産生の影響	23
2.4.5	総括及び結論	23
2.4.5.1	総括	23
2.4.5.2	結論	25
2.4.6	参考文献	26

略語一覧

AAGP	: α -acid glycoprotein (α-酸性糖たん白)
ADI	: Acceptable daily intake (推奨 1 日摂取量)
AUC	: Area under the curve (濃度-時間曲線下面積)
cAMP	: Cyclic AMP = Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (サイクリック AMP)
C _{max}	: Maximum plasma concentration (最高血漿中濃度)
DPP-IV	: Dipeptidyl peptidase IV (ジペプチジルペプチダーゼ IV)
EC ₅₀	: Effective concentration causing 50% maximal effect (最大効果の 50%を示す濃度)
ELISA	: Enzyme linked immune sorbent assay (酵素免疫吸着測定法)
EMEA	: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
FDA	: Food and Drug Administration
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)
GLP-1	: Glucagon-like peptide-1 (グルカゴン様ペプチド-1)
GLP-1R	: Glucagon-like peptide-1 receptor (グルカゴン様ペプチド-1 受容体)
HbA _{1C}	: Haemoglobin A _{1C} (ヘモグロビン A _{1C})
HSA	: Human serum albumin (ヒト血清アルブミン)
ICH	: International Conference of Harmonisation (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
MRHD	: Maximum recommended human dose (最大推奨臨床用量)
mRNA	: Messenger RNA (メッセンジャーRNA)
MTD	: Maximum tolerated dose (最大耐量)
NEP	: Neutral endopeptidase (中性エンドペプチダーゼ)
NOAEL	: No observed adverse effect level (無毒性量)
NOEL	: No observed effect level (無影響量)
PCE	: Polychromatic erythrocytes (多染赤血球)
PMDA	: Pharmaceuticals and Medical Device Agency (独立行政法人 医薬品医療機器総合機構)
RER	: Respiratory exchange ratio (呼吸交換率)
RIA	: Radio immuno assay (ラジオイムノアッセイ)
RT-PCR	: Reverse transcription polymerase chain reaction (逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応)
S.C.	: Subcutaneous (皮下)
TK	: Toxicokinetics (トキシコキネティクス)
t _{max}	: Time of maximal plasma concentration (最高血漿中濃度到達時間)

2.4 非臨床試験の概観評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

2.4.1.1 特徴及び分子設計

リラグルチドは GLP-1 誘導体に脂肪酸を付加した、作用持続型のヒト GLP-1 アナログで、1 日 1 回の注射に適した薬物動態学的特徴を有している。

本薬は、消失半減期の延長及び薬理作用を持続化させるための主要な分子メカニズムとして、アルブミンに結合するようにデザインされた。このことは、*in vitro* 試験では、リラグルチドのアルブミンとの結合試験のみならず cAMP 産生を指標としたヒト GLP-1 受容体活性化能試験においても認められ、アルブミンの添加で濃度 - 反応曲線を右方移動させた (図 2.4-1)。

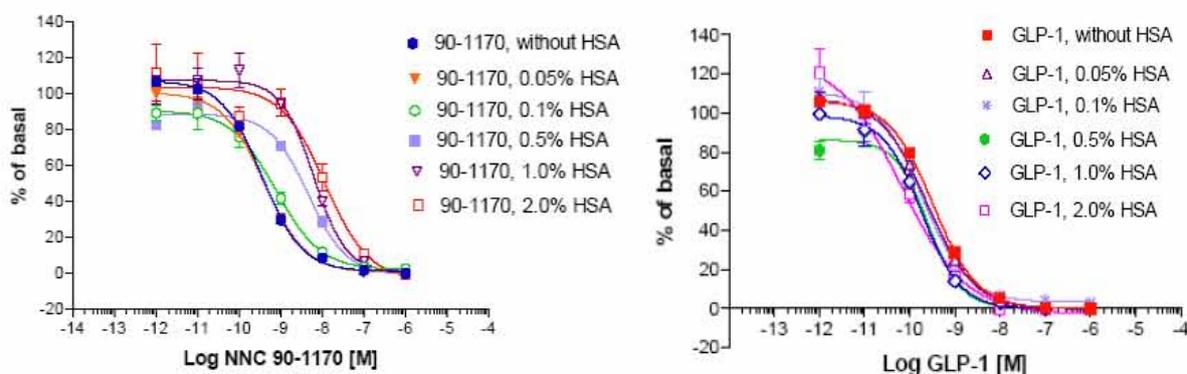


図 2.4-1 左：各種 HSA 濃度存在下の GLP-1 受容体発現 BHK467 細胞におけるリラグルチドの GLP-1 受容体結合プロファイル
右：各種 HSA 濃度存在下の GLP-1 受容体発現 BHK467 細胞における ¹²⁵I 標識 GLP-1 の GLP-1 受容体結合プロファイル

その後、*in vivo* 試験、*in vitro* 試験ともに、アルブミンの存在下で明らかにリラグルチド活性が低下することから、リラグルチドの遊離型のみが薬理作用の発現に関与していることが示された。さらに、リラグルチド製剤の開発では、ヒトに皮下投与できる物理的及び化学的に安定な製剤を目指した。その結果、リラグルチドは注射液中でミセル様の 7 量体として存在しており、これは分析用超遠心分離方法及び円二色性スペクトルにより確認された。この自己会合も、リラグルチドの持続的吸収に寄与していると考えられている。

消失半減期の延長は、DPP-IV 及び NEP による代謝速度の遅延と関連しているが、これも主に本薬とアルブミンとの結合に起因するものと考えられる。なお、代謝酵素に対する安定性は、DPP-IV 及び NEP を用いて示された。さらに、7 量体の形成により、代謝酵素を立体的に阻害することも関与していると考えられる。

リラグルチドは、26 位リジンの ε-アミノ基に N-パルミトイル-グルタミン酸を付加し、34 位がアルギニン酸に置換された GLP-1 アナログである。この構造式は Arg³⁴Lys²⁶-(N-ε-(γ-Glu (N-α-

hexadecanoyl)))-GLP-1[7-37]である。リラグルチドの分子式は $C_{172}H_{265}N_{43}O_{51}$ である。リラグルチドの理論的分子量は 3751.20Da である。

2.4.1.2 開発の経緯及び規制当局との協議

リラグルチドの非臨床開発は、新規物質に関する薬事規制の国際的ハーモナイゼーション (ICH) によって定められたガイドラインに従って実施した。重要な安全性試験はいずれも医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) に従って実施された。ラット及びサルを、薬理学的反応性が認められること及び代謝パターンが類似していることから、毒性試験のために適切な種として選択した。

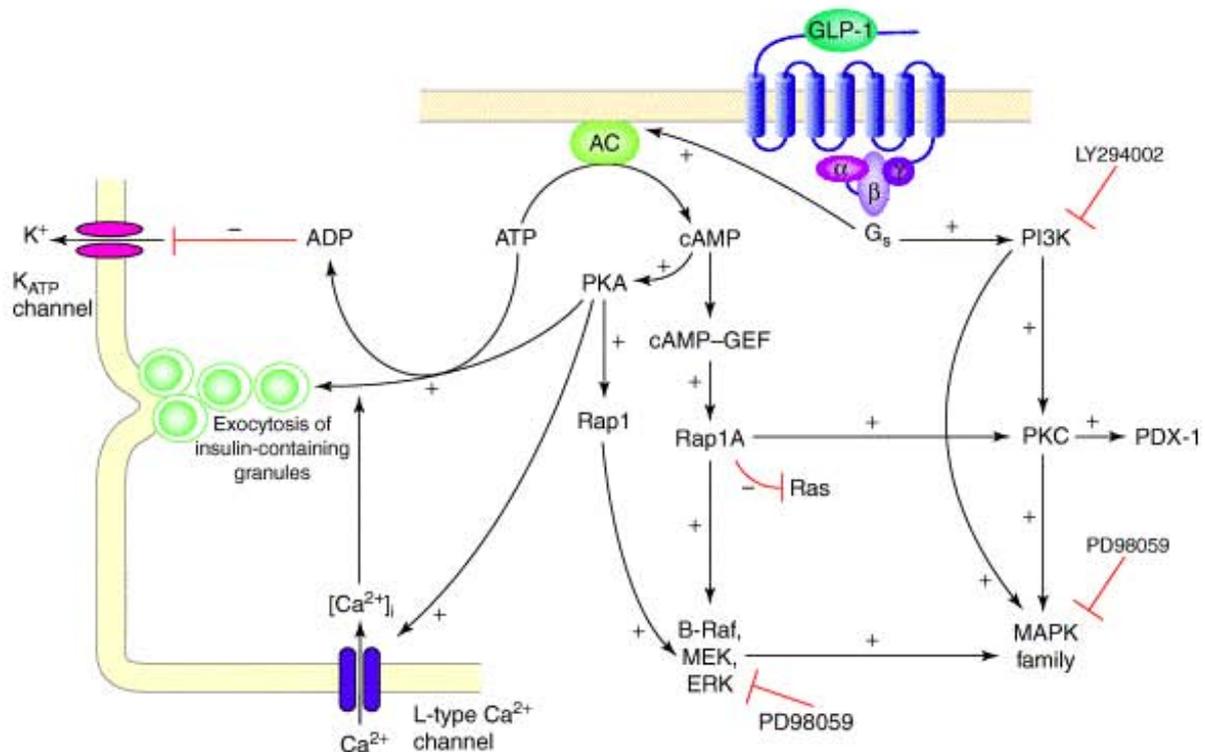
リラグルチド製剤中の不純物の存在量は安全上問題のない範囲内である。

リラグルチドの開発中に血漿中リラグルチドの定量に使用した方法は、ラジオイムノアッセイ (RIA) 法から高い感度及び特異性を有する酵素免疫吸着測定 (ELISA) 法へと変更された。ELISA 法は、動物における長期毒性試験及び全ての臨床試験で使用されている。ウサギの胚・胎児発生毒性試験のトキシコキネティクス (TK) は RIA 法によって分析した。両法を比較した試験では、RIA 法では血漿中濃度が低めに測定されることが示されたため、これらの試験では安全性マージンが低く評価されていることが明らかとなった。すなわち測定方法の変更は試験の結論に影響を及ぼすものではなかった。

開発期間中は、FDA、PMDA、EMA 及びその他の国の規制当局と定期的に協議を行い、助言を得てきた。

2.4.2 薬理試験

GLP-1 はグルカゴン関連ペプチドスーパーファミリーに属する。生理学的には、GLP-1 は腸及び脳に存在する L 細胞中でプレプログルカゴン遺伝子がプロセッシングを受けて生成される。GLP-1 の生理学及び薬理学研究に関して多くの文献が存在する^{1,2,3,4}。哺乳類の GLP-1 のアミノ酸配列は決定されており、GLP-1 受容体が唯一の受容体として確認されている。GLP-1 受容体は B ファミリーに属する G-たん白共役受容体である⁵。哺乳類の GLP-1 受容体は種間で相同性が認められており、ラットとヒトでは 90%、またサルとヒトでは 99%である⁶。GLP-1 の細胞作用は、Gs たん白、cAMP 産生を促進するアデニルシクラーゼ活性の促進、さらに膵 β 細胞内では、プロテインキナーゼ A (PKA) 活性、細胞質内 Ca^{2+} 濃度及び PI3-キナーゼ活性の増加^{7,8}、それに引き続いて起こるインスリン顆粒のエキソサイトシス及び細胞増殖経路の活性化を介して発現される。



TRENDS in Pharmacological Sciences

図 2.4-2 GLP-1 受容体を介した膵β細胞内シグナル伝達経路

膵臓内では、インスリン産生β細胞、ソマトスタチン産生δ細胞の他、おそらくグルカゴン産生α細胞の一部でもGLP-1受容体が発現している。また、導管細胞もGLP-1受容体を発現することが報告されている。GLP-1受容体は、胃を含む消化管内で広範囲に分布しており、これまでにラットの胃腺、胃小窩、幽門洞、壁細胞、結腸及び小腸にあることが知られている。また、中枢神経や、最後野の領域及び脳弓下器官等、末梢神経支配下の領域にもGLP-1受容体の明らかな分布がみられる。また、GLP-1受容体はガングリオン結節の多くのニューロンの中にも発現している。また、心臓、腎臓及び内皮細胞内のGLP-1受容体もある程度の重要性を有すると考えられている¹⁴。

GLP-1アナログの主要な薬理的標的部位は、膵臓(β細胞)、消化器系、脳幹の最後野の領域及び第3脳室の脳弓下器官であり、その他、脳幹の別部位や末梢感覚迷走神経も標的的部位である可能性が考えられる^{1,2,3,4}。

GLP-1は複数の薬理作用を有する。膵臓での機能的には、グルコース依存性インスリン分泌促進の他、インスリン生合成、グルコキナーゼ酵素及びグルコーストランスポーターのアップレギュレーションなどがみられる。その他の作用としては、a)膵β細胞の成長及び増殖、β細胞のアポトーシス抑制ならびに導管前駆細胞からのβ細胞新生、b)肝グルコース産生を低下させるグルコース依存性グルカゴン分泌の低下、c)胃酸分泌抑制及び胃内容物排出能の低下、ならびに胃内容物排出能の低下により起こる食後血漿中グルコース濃度の低下、d)体重低下をもたらす食欲抑制及び摂餌量の低下などが考えられる^{1,2,3,4}。

リラグルチドは1日1回投与のヒト GLP-1 アナログであり、GLP-1 と同様の経路で GLP-1 受容体を介して作用を発現している。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1 GLP-1 受容体に対する作用

cAMP を指標とした細胞系アッセイにおいて、リラグルチドはヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ及びカニクイザルのクローン化 GLP-1 受容体に対する強力なアゴニストであり、親和性及び効力について種差はごくわずかであることが示された⁹。

2.4.2.1.1.1 *In vitro* 試験における GLP-1 受容体活性化

リラグルチドは、アルブミン非存在下においてクローン化ヒト GLP-1 受容体に対する強力な GLP-1 受容体アゴニストであり、ヒト GLP-1 と同等の効力を有し、その EC₅₀ 値は 61±7 pmol/L であることが示された。リラグルチドは血漿たん白と結合するために、ブタ又はヒト血漿存在下の EC₅₀ 値はヒト GLP-1 の 58 倍～90 倍となった。

2.4.2.1.2 作用持続性に関するメカニズム

リラグルチドは、半減期の延長及び薬理作用の持続化のための主要な分子メカニズムとしてアルブミンに結合するようにデザインされたものである。このことは、*in vitro* 試験では、リラグルチドのアルブミンとの結合試験のみならず cAMP 産生を指標としたヒト GLP-1 受容体活性化能試験においても認められ、アルブミンの添加で濃度 - 反応曲線を右方移動させた。アルブミンの存在下で明らかにリラグルチド活性が低下することから、*in vivo* 試験においても *in vitro* 試験と同様に、リラグルチドの遊離型のみが薬理作用の発現に関与していることを示している。さらに、リラグルチドは注射液中でミセル様の 7 量体を形成し、その結果としてリラグルチドの皮膚からの緩徐な吸収に寄与している。

2.4.2.1.3 *In vitro* 試験での有効性

GLP-1 は、グルコースレベルの上昇に応じて膵 β 細胞からインスリン分泌を促進する^{1,2,3}。マウス単離膵ラ氏島及びラット灌流膵臓を用いた 2 試験で、インスリン分泌に対するリラグルチドの作用を検討した。リラグルチドは、マウス灌流膵ラ氏島において、濃度依存的ならびにグルコース依存的にインスリン分泌を促進し、その効力はヒト GLP-1 と同程度であることが示された。

リラグルチドは炎症性サイトカイン又は遊離脂肪酸によって誘発される β 細胞のアポトーシスを濃度依存的に抑制すること及びラットの初代培養 β 細胞の増殖を促進することが示された^{10,11}。

すなわち、*in vitro* 試験において、リラグルチドは膵 β 細胞に対しグルコース依存性インスリン分泌促進ならびに GLP-1 の作用から予想されるサイトカイン及び遊離脂肪酸に対する細胞保護作用を濃度依存的に発現していることが示された。

2.4.2.1.4 *In vivo* 試験での有効性

正常動物及び 2 型糖尿病肥満動物においてリラグルチドの効力、作用の持続性及び作用メカニズムを検討するために、多くの *in vivo* 試験が実施された。

2 型糖尿病動物である ob/ob マウス、db/db マウス、ZDF (Zucker Diabetic Fatty) ラット、肥満スナネズミ (*Psammomys Obesus*) 及びストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ブタを使用した。肥満モデル動物は ZO (Zucker Obese) ラット、摂食肥満ラット、肥満ミニブタ及び肥満アカゲザルを使用した。さらに、正常ラットにおけるリラグルチドの作用も検討した。

2.4.2.1.4.1 *In vivo* 効力試験及び持続的作用

リラグルチドの *in vivo* 試験での効力をいくつかの薬効薬理試験で検討した。リラグルチドは ob/ob マウスでは 30 µg/kg、ZDF ラットでは 6.6 µg/kg、スナネズミでは 25 µg/kg、グルコース負荷ミニブタでは 2.5 µg/kg の投与量でそれぞれ薬理活性を示した。なお、試験デザインが異なるために各モデル間で得られた上記の投与量での作用を直接比較することはできない。

リラグルチドは、単回皮下投与で db/db マウスの血漿中グルコース濃度に及ぼす持続的な作用を示した。最高投与量群では 24 時間以上にわたって血漿中グルコース濃度の有意な低下が認められた。

2.4.2.1.4.2 糖尿病モデルでの血漿中グルコース濃度及び摂餌量に及ぼす急性効果

血漿中グルコース濃度及び摂餌量に及ぼすリラグルチドの急性効果を、ob/ob マウス及び ZDF ラットを使用して検討した。さらに、ミニブタで血漿中グルカゴン及びインスリン濃度に及ぼす影響を検討した。これらの試験では、リラグルチドは速やかにかつ投与量依存的に血漿中グルコース濃度、摂餌量及び血漿中グルカゴン濃度を減少させることが示された。リラグルチドは正常ブタにおいて食後のインスリン分泌を促進させなかった。このことは、リラグルチドの胃内容物排出能に対する強い抑制作用に起因するインスリン反応の低下が考えられた。糖尿病ミニブタを用いたグルコースクランプ試験では、リラグルチドはグルコースクランプ施行中、グルコース注入量を増加させ、GLP-1 受容体アゴニストで予想されるグルコース依存性インスリン分泌を促進し、グルカゴン分泌を抑制した¹²。

2.4.2.1.4.3 糖尿病動物の血漿中グルコース濃度、摂餌量、体重、β細胞容積、血漿中インスリン濃度及び HbA_{1c} に及ぼすリラグルチド (長期投与) の効果

各種の糖尿病動物モデルにおけるリラグルチド (14~42 日長期投与) の有効性を評価するための *in vivo* 試験が実施された。ob/ob マウスにおいてリラグルチドは血漿中グルコース濃度を低下させた。β細胞容積の増加が関与する作用メカニズムにより、db/db マウスでも同様の作用がみられた¹³。db/db マウスにおいて投与 2 週間目に摂餌量が増加したにもかかわらず、体重が低下した。本所見は、投与第 1 週に生じた大幅な体重減少 (~63%)のため、二次的に摂餌量の増加が生じたものと考えられる。

糖尿病進行遅延に関する試験では、リラグルチドは ZDF ラットの血漿中グルコース濃度を溶媒投与群と比較して約 50%減少させた他、血漿中インスリン濃度を上昇させ、HbA_{1c} を低下させた (3.1%低下)¹⁴。リラグルチドはβ細胞容積を有意に増加させた。摂餌量をリラグルチド投与群に合わせた pair-fed 対照群では、血漿中グルコース濃度、血漿中インスリン濃度及び HbA_{1c} に及ぼす作用はリラグルチ

ド投与群と比較して小さかった。したがって、リラグルチドは摂餌量の減少の他に、インスリン分泌の促進、血漿中グルコース濃度の低下 (HbA_{1c}の低下) 及びβ細胞容積の増加に関係する作用メカニズムによって、糖尿病の進行を遅延した。

リラグルチドのβ細胞に及ぼす作用を、正常ラット及びZDFラットにおいて検討した。正常ラットにおいてリラグルチドの短期間投与(1週間)によりβ細胞容積のわずかな増加がみられたが、投与6週間では増加は認められなかった¹⁵。糖尿病発症前のZDFラットに対するリラグルチドの2週間投与は、耐糖能を正常化させたが、対照群と比較してβ細胞容積は26%、β細胞増殖は70%低下していた¹⁴。以上のβ細胞容積及び増殖に対する影響を検討した試験結果から、リラグルチドは、高血糖又は他の原因でβ細胞の機能及びβ細胞容積が低下している場合にのみβ細胞の増殖を亢進させるが、正常血糖の場合にはリラグルチドのβ細胞増殖への作用はないか又はごくわずかであると考えられる。

リラグルチドは投与量依存的に、2型糖尿病スナネズミ (*Psammomys Obesus*) の血漿中グルコース濃度及びHbA_{1c}を低下させた。最高投与量群では、血漿中グルコース濃度の完全な正常化が認められた。

STZ投与により糖尿病を発症したGöttingenミニブタを作製した。このミニブタは耐糖能が異常で、空腹時血漿中グルコース濃度が増加していた。リラグルチドの4週間投与後、ミニブタの血漿中グルコース濃度の低下及びOGTT中の耐糖能の改善がみられた。この作用メカニズムには、インスリン分泌の増加及び胃内容物排出能の抑制が関与していた¹²。

リラグルチドとピオグリタゾンとの併用により、血漿グルコース濃度が30mmol/Lを上回るような重症インスリン抵抗性糖尿病ZDFラットの血漿中グルコース濃度は明らかに低下した。投与42時間後、HbA_{1c}は対照群の9.7%に対し4.8%となった。

2.4.2.1.4.4 肥満動物の摂餌量及び体重に及ぼす効果

正常ラット及び肥満ミニブタ、サル及びラットの体重及び摂餌量に及ぼすリラグルチドの影響を検討した。正常ラット及びグルタミン酸ナトリウム投与による視床下部GLP-1受容体欠損ラットにおいて、リラグルチドは、摂餌量を投与後急激に低下させ、投与開始7日目以降に体重も減少させた¹⁶。

正常ラットでも視床下部GLP-1受容体欠損ラットでも同じような摂餌量の減少が観察されたことから、リラグルチドの摂餌量減少に関する作用メカニズムには、ラット視床下部GLP-1受容体が関与していないことを示唆している。

GLP-1による胃内容物排出能の抑制は胃の正常な迷走神経支配に依存しているため、このリラグルチドの作用メカニズムも迷走神経求心性の刺激に起因するものと考えられる。脳幹、特に最後野の領域における直接作用も可能性として考えられる。しかしながら、全身オートラジオグラフィ試験ではリラグルチドが特に検出される脳の領域は認められていない。

キャンディーを給餌した肥満ラットにおいて、リラグルチドは体重増加量及び摂餌量を減少させた。高脂肪飼料肥満ラットでは、摂餌量を減少させることにより、鼠径部皮下脂肪、腸間膜脂肪、精巣上体脂肪及び腎周囲脂肪の重量を減少させた¹⁷。

重度肥満ミニブタにおいて、リラグルチドは摂餌量を著しく減少させた¹⁸。定常状態で、1日の摂餌量は61%減少した。食事量、食事時間及び食事回数の減少に伴って、摂食パターンが変化した。この摂餌量は、正常ブタの体重維持の給餌量とほぼ同じであった。体重は、摂餌量の明らかな低下のため

に減少した。食欲の抑制はリラグルチド投与終了後 4 日以内に回復した。リラグルチドは肥満アカゲザルの摂餌量も減少させ、有意な体重の減少を引き起こした。ミニブタと同じように、投与終了後に摂餌量は正常化した。

摂餌量の増加による体重増加は、抗精神病薬で最もよくみられる副作用であり、この作用は耐糖能異常及び血漿中グルコース濃度の増加に関連している。ラットモデルでは、抗精神病薬オランザピンが体重、摂餌量、脂肪重量、空腹時血漿中グルコース濃度及び血漿中コレステロール濃度を増加させ、耐糖能を抑制し、リラグルチドはオランザピンで誘発される体重増加、摂餌量及び後腹膜脂肪重量の増加を正常化させ、鼠径部皮下脂肪重量を低下させた。さらに、リラグルチドはラットのオランザピン誘発性の空腹時血漿中グルコース及びコレステロール濃度の上昇及び耐糖能異常を正常化させた。

2.4.2.1.4.5 食物嗜好性及びエネルギー消費量に及ぼす影響

正常ラットでは、リラグルチド（単回投与）は O₂ 消費量、CO₂ 産生量、エネルギー消費量及び呼吸交換率（RER）に対して影響を及ぼさなかった。リラグルチドの 7 日間投与により、投与 2 日間まで体重が減少し、投与 3 日まで摂餌量が減少したが、リラグルチドは体重を減少させたにもかかわらずエネルギー消費量には影響を及ぼさなかった。

キャンディー及び飼料を給餌されたラットでは、体重、脂肪重量及びエネルギー消費量を増加させたが、リラグルチドの投与により体重は正常体重の対照群ラットのレベルにまで低下し、脂肪重量の増加が完全に改善された。リラグルチドはエネルギー摂取量を減少させ、さらに摂餌量を増加させ及びキャンディーの摂取量を減少させたことから、食物嗜好性の変化が示された。また、ラットの体重は減少したが、リラグルチド投与群のラットのエネルギー消費量はキャンディー給餌の対照群と比較して減少せず、このことはリラグルチドが、体重を減少させたにもかかわらず、エネルギー消費量に影響を及ぼさないことを示している。

2.4.2.2 副次的薬理試験

2.4.2.2.1 GLP-1 受容体選択性

リラグルチドは、最大推奨臨床用量（MRHD）でのヒトの最高血漿中濃度（C_{max}）よりも 500 倍以上高い 10 µmol/L で、さまざまな受容体、イオンチャネル及び神経伝達物質を含む 75 種類以上のスクリーニングアッセイからなる放射能リガンド結合試験で検討した。

リラグルチドはグルカゴン受容体、その他の受容体、イオンチャネル及び神経伝達物質に結合せず、また受容体を活性化させなかった。以上の結果から、リラグルチドは選択性の高い GLP-1 受容体アゴニストであることが示された。

2.4.2.3 安全性薬理試験

心血管系及び呼吸器系、腎機能のほか、自律神経系及び中枢神経系に及ぼすリラグルチドの作用を評価するために、薬理作用を示す動物種（マウス、ラット、ウサギ、モルモット及びカニクイザル）を用いて安全性薬理試験を実施した。また、*in vitro* 試験も心血管系試験で実施された。試験に用いた

最高投与量 (2 mg/kg) 及び最高濃度 (1.43 $\mu\text{mol/L}$) はそれぞれ MRHD (0.9 mg、体重 60 kg に対して $\sim 15 \mu\text{g/kg}$) の約 133 倍及び MRHD でのヒト C_{max} の約 78 倍であった。

リラグルチドは良好な忍容性を示した。げっ歯類の心血管系及び腎機能にみられる GLP-1 により発現される既知の影響のみがラットでみられた^{19,20,21}。この腎機能作用は尿比重及び重量モル浸透圧濃度に認められた。高投与量では電解質及び尿量がさらに増加した。リラグルチドは、0.2 mg/kg 及び 2.0 mg/kg の投与量で、投与後 24 時間まで投与量に関連した血圧の上昇及び心拍数の増加がみられた。0.2 mg/kg 投与群では体温がわずかに低下し、2.0 mg/kg 投与量群では 13.5 時間の間有意に低下した。自発運動がわずかに減少したが、この所見は GLP-1 受容体アゴニストの exendin-4 でも観察されている¹⁹。

MRHD でのヒト C_{max} は、ラットで心血管系及び腎機能に影響を引き起こす濃度よりも約 4.0 倍低い。テレメトリー測定したサルでは、ヒトの C_{max} の約 33 倍の濃度でも心血管系に対する作用はみられず、腎機能に対する作用はこれよりも高濃度に曝露されたサルの毒性試験でも観察されなかった。臨床試験において、リラグルチドはわずかな血圧低下と脈拍の最大 4 bpm の増加が認められたが、尿量を増加させなかった (NN2211-1149 及び NN2211-1189)。このため、ラットは特に GLP-1 受容体アゴニストに対して感受性が高いと考えられる。

結論として、安全性薬理試験では臨床的に問題となる所見はみられなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

In vitro 試験において、リラグルチドとグリピジドの併用は 8 mmol/L グルコース濃度の存在下で灌流ラット膵臓におけるインスリン分泌を相乗的に促進させた。*In vivo* における薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.4.2.5 考察及び結論

リラグルチドは、持続型ヒト GLP-1 アナログである。リラグルチドは *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験でみられた絶食時及び摂食後の血漿中グルコース濃度の低下を含む GLP-1 と類似の血糖コントロール作用を示した。また、リラグルチドの作用持続により HbA_{1c} も低下する。リラグルチドの作用は、主に膵 GLP-1 受容体を介する膵 β 細胞でのグルコース依存性インスリン分泌の促進であり、摂餌量及び胃内容物排泄能の抑制も部分的に介在している。

リラグルチドはヒト GLP-1 受容体に対して強力な選択的アゴニストであることが示された。リラグルチドは特異的な GLP-1 作用として文献で知られているような多くの *in vitro* 作用を発現することが示された。リラグルチドはラット及びマウスの組織を用いて膵ラ氏島からのインスリン分泌の促進、 β 細胞増殖の増加及びアポトーシスの抑制がみられた。また、リラグルチドはスルホニルウレア系薬剤グリピジドとの併用で相乗的にインスリン分泌を促進した。*In vivo* 試験において、リラグルチドは多くの 2 型糖尿病肥満動物モデルの血漿中グルコース濃度及び体重を低下させた。作用メカニズムとしては、インスリン分泌の促進、グルカゴン分泌の低下、 β 細胞増殖と β 細胞容積の増加、胃内容物排出能の抑制、摂餌量の減少、食物嗜好性の変化、エネルギー消費量の保持及び体脂肪の減少が考えられる。作用メカニズムは、特異的な GLP-1 作用と一致する。しかしながら、食物嗜好性の変化とエネルギー消費量の保持については、特異的な GLP-1 作用としてはこれまでに報告されていない。

まとめとして、リラグルチドの低血糖作用及びそれに続く HbA_{1c} の低下に関与する作用メカニズムとして、以下の 1) ~7) まで示された。

- 1) グルコース依存性インスリン分泌の促進
- 2) グルコース依存性グルカゴン分泌の抑制
- 3) 胃内容物排泄能の遅れ
- 4) 糖尿病状態におけるβ細胞容積の増加
- 5) 摂餌量の減少
- 6) 食物嗜好性及び摂食パターンの変化
- 7) 脂肪重量の減少に伴う明らかな体重減少にもかかわらずエネルギー消費量の保持

安全性薬理試験においては、リラグルチドは最高投与量 2 mg/kg でげっ歯類及びサルで高い忍容性が有していることが示された。したがって、安全性薬理試験でみられたいずれの所見もヒトの安全性に関連するものではないと考えられる。

2.4.3 薬物動態試験

リラグルチドは血清アルブミン結合率が高いこと及び GLP-1 の生体内でのクリアランスに関与することが知られているペプチダーゼ (DPP-IV 及び NEP) による代謝・分解に対し安定的であることからリラグルチドが持続的薬物動態を有する GLP-1 アナログであることが示された。また、投与部位からの緩徐な吸収には分子の自己会合が関係していると考えられる。このことも作用の持続化に寄与すると考えられた。

ADME 試験は、毒性試験及び安全性薬理試験と同じ動物種を用いて実施した。さらに、ブタにおけるバイオアベイラビリティ試験を実施した。反復投与時の薬物動態を毒性試験におけるトキシコキネティクス (TK) により評価した。血漿サンプルの解析には ELISA 法を用いており、リラグルチドのペプチド C 及び N 末端における異なるエピトープに結合する 2 種のモノクローナル抗体を使用した。GLP-1 との交差反応を、血漿サンプルを前処理 (■℃、■時間) し、GLP-1 を分解することにより排除した。これらの条件下では、リラグルチドは影響を受けないことが示されている。分布、代謝及び排泄については、¹²⁵I、¹⁴C 又は ³H のいずれかで放射能標識したリラグルチドを投与して検討した。放射能標識位置を図 2.4.3 に示す。単回投与時のリラグルチドの薬物動態パラメータは表 2.4.1 に示す。

位からの吸収が緩徐であることが関連していることが示された。みかけの分布容積 (V_z) は小さく、血漿容量に相当又はわずかに上回る程度であり、リラグルチドの大部分が血漿中を循環していることが示唆された。このことは、血清アルブミンと α -酸性糖たん白 (AAGP) が関与していることを示す高い血漿たん白結合率が認められたことに関連している。Sprague-Dawley (SD) 系ラットを除く全ての動物種で約 99%以上の血漿たん白結合率を示した。SD 系ラットにおいては、95.8~98.2%と低値であった。*In vitro* 試験で評価したリラグルチドのクリアランスはリラグルチドの非結合分画により決定されることが認められた。これは、ラットでの $t_{1/2}$ が短いことと一致するものであると考えられた。

投与量に対する AUC 及び体重に対する皮下投与時のクリアランス (CL/f) を評価した場合、反復投与時においてヒトを含む動物種間で良好な相関関係が認められた。サルでの長期反復皮下投与毒性試験での最高投与量群 (5 mg/kg) において投与 1 日目から試験終了までに曝露量 (C_{max} 及び AUC) の減少傾向が見られた他は、性、投与量又は時間依存性は認められなかった。曝露量の減少傾向と最高投与量群で認められたリラグルチド抗体の存在との相関性は認められなかった。マウス、ラット及びサルに 1 日 1 回反復皮下投与毒性試験を実施したところ、蓄積性は認められないか又はわずかであったが、これは半減期がヒト及びブタより短いこと及び試験中の投与間隔と整合的であった。ヒトにおける皮下投与時の蓄積率 (R_{ac}) は 1.4~1.6 と算出されたが、これは $t_{1/2}$ が長いこと及び投与間隔と一致するものであった。

2.4.3.2 分布

組織分布は、単回 (静脈内及び皮下) 及び反復皮下投与時に異なる位置で放射能標識したリラグルチド分子を用いてラットを対象に検討した (図 2.4.3)。リラグルチドはグルタミン酸と脂肪酸が結合したペプチド骨格から構成されているため、この種の分子では分布、代謝及び排泄データを解釈することは困難であるが、一般的には、代謝により数種のアミノ酸と 1 種の脂肪酸が生じることになる。アミノ酸及び脂肪酸が完全に代謝された場合、 CO_2 と H_2O が生成されるか又はアミノ酸及び脂肪酸がたん白質及び脂質の生成に再利用される。このことと一致するように、放射能の組織分布の差異が認められた。リラグルチドの放射能標識位置に依存した分布パターンが特に後期測定時点 (>4 時間) で認められた。放射能標識リラグルチドを用いた試験結果から、リラグルチドは内因性の異化作用及び同化作用を受けることが強く示唆された。ラットの半減期が 2.9~6.2 時間であることから早期測定時点 (≤ 4 時間) では、リラグルチドに関連した放射能を示す可能性がより高く、肝臓、肺、腎臓及び副腎では共通して高濃度の放射能が認められた。このことは、これらの器官は全て血管に富むことから、血漿たん白結合率が高いことと一致するものであった。早期測定時点では、放射能の組織/血漿比が全て 1 未満であったが、これは組織分布が低いことを裏付けるものであった。放射能が極めて低い組織・器官は、脳、筋肉、胸腺、眼及び前立腺であった。脳は血流量が多い器官であるため、脳において放射能が低値であるということは、リラグルチドが血液-脳関門を通過するとしても少量であることを示唆する。ラット及びウサギにおいて、リラグルチドは血液-胎盤関門を通過したが、リラグルチド及びその関連物質の羊水及び胎児への取り込みは低かった。リラグルチド及びその関連代謝物の乳汁中への排泄が認められた。児動物が乳汁を介して 1 日に摂取し得るリラグルチド及び構造類似の関連代謝物の最大量は母動物への投与量の 0.3%であると推定された。

2.4.3.3 代謝及び排泄

代謝試験及び排泄試験から、試験に用いた全動物種及びヒトにおいてリラグルチドは体内でペプチド鎖の段階的な切断により完全に代謝され、糞中又は尿中へのリラグルチドの排泄は認められず、構造類似の関連代謝物の排泄も非常に少量であることが認められた。糞中及び尿中にはリラグルチドのペプチド又はパルミチン酸部分の構成成分がわずかに認められた。ラットにおいて、皮下投与後の¹⁴C標識リラグルチドの広範な代謝により約70%の¹⁴CO₂が呼気中に排泄された。ヒトを含む全動物種の血漿中に、リラグルチドに比して低極性の代謝物が少量ではあるが認められている。これは、*in vitro*の肝細胞培養において同定され、かつDPP-IV又はNEP添加培養において同定された代謝物に一致している。なお、DPP-IV及びNEPはGLP-1の生体内での代謝に関与していることが知られている。リラグルチドは、生体内GLP-1で報告されている部位と類似の部位でDPP-IV及びNEPによる代謝を受けた。2種の少量の代謝物がヒト血漿中に認められた（試験番号NN2211-1699、Module 2.7.2.3.3.3参照）。ヒトでの主要な血漿中代謝物（総放射能AUC_{0-24h}の≤9%）は全ての試験動物種（マウス、ラット及びサル）において認められ、また、クロマトグラム上の保持時間はDPP-IVによりリラグルチドのN末端の2アミノ酸残基が切断されたものに相当した。この代謝物のGLP-1受容体との薬物相互作用は極めて弱いことが示されている。第2の代謝物（総放射能AUC_{0-24h}の1%）はラットにのみ認められた。ヒトでも認められた代謝物ピークの試験動物におけるクロマトグラムに占める比率は、いくつかの動物種では最高でヒトの9分の1であったが、毒性試験での動物種におけるリラグルチドの曝露量AUC_{0-24h}がMRHDでヒトの19~165倍であることから、これらのヒトの代謝物は毒性学的に評価されていると考えられる。

血漿中又はDPP-IV及びNEPによる分解に対して、リラグルチドは代謝的に極めて安定的であった。しかしながら、*in vitro*でのDPP-IV及びNEPを添加した培養後に得られた代謝物プロファイルと*in vivo*の血漿中代謝物プロファイルとを比較した結果、リラグルチドの代謝にこれらの酵素が関与していることが示唆された。リラグルチドの代謝は肝細胞ならびにDPP-IV及びNEPを発現する肝スライス及び腎スライスにおいても観察されている。しかしながら、ヒト血清アルブミン濃度が高い（6%）条件下でラットの腎臓及び肝臓にリラグルチドを灌流した際、リラグルチドの消失は認められなかった。このことは、腎臓及び肝臓はいずれもリラグルチドのクリアランスに関与する唯一の器官ではないことを示唆するものであった。DPP-IV及びNEPは体内に広く分布しており、リラグルチドのクリアランスには単一の器官ではなく複数の器官が関与していることが示唆される。このことは、肝及び腎機能障害を有する患者における薬物動態パラメータの変動が限定的であったことにより裏付けられる（Module 2.7.2.3.3.1参照）。

2.4.3.4 薬物動態学的相互作用

非臨床試験ではリラグルチドの薬物動態学的相互作用の可能性は低いことが示されている。*In vitro*で各種の高たん白結合性薬物ならびにミリスチン酸及びパルミチン酸の存在下では、リラグルチドのヒト血漿中たん白結合率に変化は認められなかった。ヒトではアルブミン濃度が500~700 µmol/Lであ

り、臨床使用上リラグルチドの血漿中濃度は低い (25~50 nmol/L) ことから、リラグルチドが他の薬物のたん白結合率の変化を引き起こす可能性は低いと考えられた。

分子構造から考えられるとおり、リラグルチドにはヒト肝ミクロゾームにおけるチトクローム P450 (CYP) 酵素の阻害能が認められない ($IC_{50} : >100 \mu\text{mol/L}$)。リラグルチドを最高 1 mg/kg の投与量でラットに 4 週間皮下投与したところ、*in vivo* ではリラグルチドの各種ラット CYP 分子種に及ぼす影響は極めて小さいものであった。CYP 誘導は、0.1 mg/kg/日投与時では検討した全てのアイソフォームに関して 1.6 倍以下であり、1 mg/kg/日投与時でもさらに増加することは認められなかった。最高投与量 (1 mg/kg/日) では、雄性ラットの CYP2A1 において統計学的に有意な減少 (約 1/2) が認められた。これらの変化の臨床的関連性はないと考えられる。

胃内容物排出能抑制作用は、既知の GLP-1 作用であり、リラグルチドについてはブタを用いた *in vivo* 試験でパラセタモールの薬物動態により検討した。また、パラセタモール等といった Biopharmaceutical classification system (Class I-IV) ²²に基づく各種薬物との相互作用の可能性についてヒトを対象に追加検討が行われている (試験番号 NN2211-1608、NN2211-1698、Module 2.7.2.3.3.2 参照)。本臨床試験では、リラグルチドの胃内容物排出能抑制作用が経口投与医薬品の吸収に臨床的に問題となるような影響を及ぼすことはなかったと結論された。

2.4.3.5 考察及び結論

リラグルチドはヒト GLP-1 アナログであり、高血漿たん白結合性と GLP-1 の生体内でのクリアランスに関与することが知られているペプチダーゼ (DPP-IV 及び NEP) による代謝的分解に対する安定性に基づき作用持続的な薬物動態を有する。分子の自己会合に関連するものと考えられる投与部位からの緩徐な吸収も作用の持続化に寄与する。 V_z は小さく、これはたん白結合率が高いことに一致するものである。薬物動態には動物種間での整合性が認められ、投与量に比例した又は投与量比よりわずかに高い曝露量増加が認められた。性差及び時間依存的変化は認められなかった。代謝及び排泄パターンは動物種間で類似しており、生体内ではリラグルチドは N 末端及び C 末端の短いペプチド断片及びアミノ酸への連続的な切断により完全に代謝・分解された。リラグルチド未変化体の排泄は認められず、少量の関連代謝物の排泄のみが認められた。緩徐ではあるが DPP-IV 及び NEP による代謝の結果、GLP-1 で認められたものと類似の部位で切断され、また、これらの代謝物の保持時間と全試験動物及びヒトにおいて認められた少量の血漿中代謝物の保持時間とに類似性がみられたことから、上記酵素の関与が確認された。2 種の代謝物が少量ヒト血漿中に認められた。主要なヒト血漿中代謝物は総放射能 (AUC_{0-24h}) の約 9%に相当し、この血漿中代謝物は全ての試験動物種 (マウス、ラット及びサル) においても認められた。クロマトグラムの比較から、この代謝物はリラグルチドにおける DPP-IV による N 末端での 2 アミノ酸残基が切断されたものに相当することが示唆された。第 2 の代謝物はヒト血漿中に少量 (AUC_{0-24h} の 5%以下) 存在しているが、ラット血漿中にも認められた。両代謝物の安全性は毒性試験においてリラグルチドと共に検討されている。リラグルチドのクリアランスは複数の器官・組織が関与することが示唆されており、CYP 及びたん白結合性に基づく薬物動態学的薬物相互作用が生じる可能性は低いことが明らかとなった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 一般毒性試験

一般毒性は、マウス及びラットを用いた単回静脈内投与試験及び単回皮下投与試験ならびに各々最長3、6及び12ヶ月のマウス、ラット又はサルを用いた反復皮下投与試験により評価した。

リラグルチドの一般毒性試験では、特に問題となる毒性はみられなかった。投与に関連した死亡は認められなかった。薬理作用として予測された摂餌量及び体重に対する影響が、全動物種でみられた。これらの作用により全動物種における投与量が制限された。甲状腺 C-細胞過形成が、マウスにおいて9週間投与以降に認められており、Module 2.4.4.3 に詳細を記す。甲状腺 C-細胞以外に毒性の標的部位は、一般毒性試験において認められなかった。

2.4.4.1.1 単回投与毒性試験

リラグルチドの単回投与後の静脈内及び皮下投与毒性は、マウス及びラットでは標準的な単回投与毒性試験、サルではクロスオーバー法による単回皮下及び単回静脈内投与試験により評価した。ラット及びマウスでは、10 mg/kg の投与量で単回静脈内又は単回皮下投与したが死亡は認められず、良好な忍容性を示した。サルでは、5 mg/kg の投与量で単回皮下及び単回静脈内投与したが死亡は認められず、良好な忍容性を示した。薬理学的作用を介した摂餌量及び体重の減少が、最も明確な所見として全動物種でみられた。

2.4.4.1.2 反復投与毒性試験

マウスでは、1ヶ月間及び3ヶ月間の反復投与毒性試験を、104週間がん原性試験の投与量設定試験として実施した。両試験における最高投与量は5 mg/kg/日で、定常状態における平均 AUC_{0-24h} に基づくと、日本人 MRHD との曝露量比で約147倍に相当する。摂餌量及び体重の減少が、投与2週まで認められた。尿量増加及び尿電解質の変化が、両試験の投与最終週で認められた。これらの作用はいずれも、既知の GLP-1 アナログの薬理作用である。3ヶ月間試験では、軽微～軽度の甲状腺 C-細胞過形成がリラグルチド投与全群で認められた。ヒトとの関連性を検討するために実施されたメカニズム検討試験について、要約を Module 2.6.6.8 に、詳細を Module 4.2.3.7.3.1 に示す。

リラグルチド抗体は認められなかった。甲状腺 C-細胞以外に毒性の標的部位は認められなかった。

ラットを用いて、1、3及び6ヶ月間の反復投与毒性試験を実施した。4週間の回復期間を3ヶ月間試験で設定した。各試験の最高投与量は1 mg/kg/日で、3試験から得られた定常状態における平均 AUC_{0-24h} に基づくと、日本人 MRHD との曝露量比で約19倍に相当する。薬理作用を介した摂餌量及び体重増加量の減少が、投与2～3週まで認められた。リラグルチド抗体は認められなかった。ラットでは毒性の標的部位は認められなかった。

サルを用いて、1、3及び12ヶ月間の反復投与毒性試験を実施した。3及び12ヶ月間試験では、対照群及び最高投与量群に雌雄各2匹からなる回復試験群を設け、剖検前に2及び4週間の回復期間を設定した。各試験の最高投与量は5 mg/kg/日で、1及び12ヶ月間試験から得られた定常状態における平均 AUC_{0-24h} に基づくと、日本人 MRHD との曝露量比で約94倍に相当する。なお、3ヶ月間試験の TK では、AUC は算出していない。薬理作用を介した体重及び摂餌量の減少が、3試験全てにおいてリラグ

ルチド投与全群で認められた。リラグルチド抗体は、12ヶ月間試験の最高投与量群の雄の2頭中1頭及び雌2頭中1頭で認められた。

サルを用いた1、3及び12ヶ月間反復投与毒性試験ならびにメカニズム検討試験の試験87週に膵臓重量を測定し、 β 細胞増殖に対する影響を観察した。膵 β 細胞はリラグルチドの薬理作用の標的の1つであり、 β 細胞増殖はリラグルチドの動物における薬理試験で確認されている^{14,15}。マウス及びラットでは腹膜から膵臓を精確に分離することが困難であることから、膵臓重量の測定は実施しなかった。サルでは、リラグルチドにより誘発された膵臓重量の増加は、12ヶ月間反復投与毒性試験でのみ認められた。当該試験では、雄のリラグルチド投与全群ならびに中間投与用量群及び最高投与量群の雌で膵臓重量の増加が観察された。膵臓重量に差異が認められる要因を検討するため、立体的解析試験により外分泌部の膵管及び腺房の容積を推定し無作為化比較を行った。その結果、重量増加は外分泌部の膵管及び腺房の質量がバランスよく増加したことに関連していることが示された。膵ランゲルハンス島(β 細胞及び非 β 細胞)容積の絶対値は対照群と高投与量群で同程度であった。また、このことと一致して、一般状態、臨床検査及び病理組織学的検査において投与に関連した変化は認められなかった。膵臓の機能的又は病理学的変化は認められていないこと、また、関連する所見が認められないことから、重量増加の毒性学的意義は低いものと考えられた。

病理学的検査では、対照群を含む全群の投与部位における局所刺激性が唯一の所見であり、リラグルチド投与群の方がわずかに強い反応で、試験期間とともに反応の強さが増加するといった傾向があった。サルでは、投与部位以外に毒性の標的部位は認められなかった。

包括的な結論として、反復投与毒性試験においてリラグルチドは比較的低毒性であることが明らかになった。すなわち、摂餌量及び体重に対する薬理作用が最も著明な所見であった。リラグルチド抗体は3ヶ月間を超える投与により数頭のサルで認められたが、抗体はリラグルチドの薬物動態を変化させず、薬理作用を減弱させなかった。マウスでは、甲状腺C-細胞が唯一の毒性標的部位であり、サルでは投与部位の局所刺激性が認められた。

2.4.4.2 遺伝毒性試験

ICHガイドラインの標準的組み合わせの遺伝毒性試験、すなわちAmes試験、ヒトリンパ球を用いた*in vitro*染色体異常試験及び*in vivo*のラットを用いた骨髄小核試験を実施した。さらに、ラットを用いた1ヶ月間反復投与毒性試験で採取した血液及び骨髄を用い、小核誘導を検討した。これらの試験において、リラグルチドの遺伝毒性を示唆する所見は認められなかった。

2.4.4.3 がん原性試験

マウス及びラットを用いた104週間試験によりリラグルチドのがん原性を評価した。投与に関連した甲状腺C-細胞腫瘍の増加が、両試験において観察された。その他に、投与に関連した腫瘍は認められなかった。

マウスでは、投与に関連した甲状腺C-細胞腺腫の増加が、1.0及び3.0 mg/kg/日投与群の雌雄でみられた。甲状腺C-細胞癌は、3 mg/kg/日投与群の雌でのみ認められた。C-細胞腺腫に関するNOAELは0.2 mg/kg/日、C-細胞癌に関するNOAELは1.0 mg/kg/日であると推察された。

ラットでは、投与に関連した甲状腺 C-細胞腺腫の増加が、0.25 及び 0.75 mg/kg/日投与群の雄及びリラグルチド投与全群の雌でみられた。甲状腺 C-細胞癌の増加が、リラグルチド投与全群の雄ならびに 0.25 及び 0.75 mg/kg/日投与群の雌でみられた。C-細胞腫瘍に関する NOAEL は、投与全群で腫瘍が認められたことから設定することができなかった。

しかしながら、安全性評価ではヒトとの関連性がないことを検討しており、安全性マージンの設定は必須ではないと考える。

C-細胞腫瘍のヒトとの関連性について、腫瘍形成のメカニズムの証明及び腫瘍に至るキー・イベントを特定することにより評価した。詳細は Module 4.2.3.7.3.1 に記す。

C-細胞腫瘍は 2 年間試験において観察された唯一の腫瘍であり、遺伝毒性に起因するものではない。文献情報及び実験データに基づく、C-細胞腫瘍形成のメカニズムは、以下の順序で発現するキー・イベントに要約される。

1. 体内を循環しているリラグルチドが C-細胞上の GLP-1 受容体に結合し活性化する。
2. GLP-1 受容体活性化により C-細胞からのカルシトニン分泌が亢進する。
3. 持続的なカルシトニン分泌が C-細胞のカルシトニン合成を促進する。
4. げっ歯類では、慢性的な C-細胞への刺激が C-細胞の過形成を誘導する。
5. げっ歯類では、長期的な C-細胞過形成から C-細胞腫瘍が誘導される。

各試験における所見は、上記のメカニズムを支持するものであり、以下に要約される大きな種差が存在することを示すものであった。

GLP-1 受容体の存在は、免疫組織学的染色によりマウス、ラット、サル及びヒトの甲状腺 C-細胞で確認された。2 種のラット C-細胞系では GLP-1 受容体が数多く発現していることが *in vitro* で確認されたが、ヒト C-細胞系では殆ど認められず、種差の存在が示された。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により、ラット C-細胞系における GLP-1 受容体 mRNA の相対的な量はヒト C-細胞系の 14 倍以上であることが示された。サル及びヒトの甲状腺以外の組織におけるカルシトニン mRNA 及び GLP-1 受容体 mRNA を十分に検出可能な *in situ* hybridisation 法によっても、ヒト及びサルの甲状腺組織における GLP-1 受容体 mRNA は検出限界以下であった。

GLP-1 受容体活性は、*in vitro* でラット C-細胞株に cAMP が蓄積することにより確認された。この反応は GLP-1 受容体アンタゴニストである exendin (9-39) により阻害される特異的なものであった。GLP-1 受容体アゴニストである GLP-1、リラグルチド又はエキセナチド処置による cAMP 蓄積はヒトよりもラットの C-細胞系において亢進し、ヒト C-細胞系においては殆ど反応がみられなかった。

カルシトニン分泌は、*in vitro* でラット C-細胞系への GLP-1、リラグルチド及びエキセナチド処置により確認された。ヒト C-細胞系では、これら 3 種の GLP-1 受容体アゴニストの何れによってもカルシトニン分泌は認められなかった。*In vivo* では、マウス及びラットへの投与初期から血漿中カルシトニンの増加が認められた。カルシトニンの増加は常に C-細胞の増殖性変化に先立って認められるものであった。血漿中カルシトニンの増加はマウスへのエキセナチド投与後にも認められており、この作用は GLP-1 受容体を介したものであることが示された。サルにおいては、日本人 MRHD との曝露量比で

100 倍以上に相当するリラグルチドを 20 ヶ月間投与しても、血漿中カルシトニンの増加は認められなかった。

また、国内外の第 I~III 相臨床試験においてリラグルチド投与により臨床的に意義のあるカルシトニンの変化は認められなかった。

リラグルチドの C-細胞受容体長期刺激による過形成がマウス及びラットでみられたが、サルでは認められなかった。マウスでは、9 週間投与後に軽微～軽度で可逆性の過形成が観察されたが、4 週間試験では日本人 MRHD との曝露量比で約 147 倍に相当する投与量を用いても過形成の兆候は認められなかった。市販されている GLP-1 受容体アゴニストであるエキセナチドをマウス皮下に 12 週間持続注入したところ C-細胞過形成が認められ、C-細胞過形成は GLP-1 受容体を介した反応であることが確認された。ラットでは、日本人 MRHD との曝露量比で約 14 倍に相当する投与量のリラグルチドを 26 週間投与しても、過形成の徴候は認められなかった。2 年間がん原性試験の死亡動物では、過形成は投与 40 週以降に認められた。サルにおいては、日本人 MRHD との曝露量比で 100 倍以上に相当するリラグルチドを 20 ヶ月間投与しても、血漿中カルシトニンの増加は認められず、種差が確認された。

リラグルチド及びエキセナチドをラットに投与したところ、GLP-1 受容体アゴニスト投与に関連した C-細胞腫瘍が誘発された。C-細胞腫瘍はマウスへのリラグルチド投与によっても誘発された。

以上の試験結果及び文献情報において、GLP-1 受容体アゴニストであるリラグルチド及びエキセナチドにより、一連のキー・イベントの各段階において同様の所見が一貫して認められていることから、C-細胞過形成は GLP-1 受容体を介した class effect であることが確認された。

GLP-1、リラグルチド又はエキセナチドの刺激による C-細胞系に対する直接的な細胞増殖誘発作用は認められなかった。また、リラグルチドは一般的な増殖反応や C-細胞の増殖反応に関連する受容体を含む広汎な受容体系に対し交差反応性を示さなかった。

In vitro 及び *in vivo* データは、げっ歯類とヒトを含む霊長類では GLP-1 受容体を介した甲状腺 C-細胞刺激に大きな種差があることを明確に一貫して支持するものであった。

また、血漿中カルシトニンはげっ歯類の C-細胞増殖に先立ち増加する鋭敏なバイオマーカーであることが分かったが、ヒト及び非ヒト霊長類ではリラグルチド長期投与によるカルシトニンの増加は認められていない。

げっ歯類へのリラグルチド投与により誘発された C-細胞腫瘍は、げっ歯類に特異的な非遺伝毒性の変化であり、マウス及びラットは感受性を示すが、サル及びヒトは感受性を示さない C-細胞 GLP-1 受容体を介したメカニズムによるものであると結論した。したがって、げっ歯類でリラグルチド投与により誘発される C-細胞の増殖性変化は、げっ歯類に特異的なものでありヒトに関連するものではないと考えられた。

2.4.4.4 生殖発生毒性試験

ラット及びウサギを用い、生殖能、早期及び後期胚・胎児発生ならびに出生前及び出生後の発生に関する試験により、生殖発生毒性を評価した。試験に用いた投与量は、排糞量減少、歩行失調、円背ならびに摂餌量及び体重の減少など、母動物に対する影響が認められており、十分に高いものであった。さらに、ラット及びウサギを用いた試験では、少量ではあるが、胎盤通過及び乳汁移行がみられ

2.4.4.6 不純物プロフィール及び安全性の検討

リラグルチドの開発期間中に、原薬製造及び製剤の製造工程に変更が加えられた (Module 2.3.S.2.6 及び 2.3.P.2.4 参照)。これらの変更は、収率、純度及び製剤の安定性向上のために行われたものである。全ての不純物は、開発期間に非臨床試験において評価が済み、規格に適合するものであると考えられた。使用期限終了時点及び in-use の規格で定められた不純物は、いずれもリラグルチドの集積物もしくは断片である。不純物の特性に関するさらに詳細な情報は Module 2.6.6.9.5 に記載した。幾つかの不純物の含有量規格値は、非臨床試験に用いた製剤中における濃度の 3~5 倍高いものであった。しかしながら、非臨床試験に用いた投与量 (0.01~5 mg/kg) を FDA ガイダンス (Estimating the maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers) にしたがって換算した HED (0.003~1.612 mg/kg) は MRHD (0.9 mg/日、体重 60 kg 換算で 15 µg/kg) の約 0.16~107.5 倍であり、非臨床試験で観察された所見はいずれも不純物プロフィールに起因するものではなかったことから、不純物の安全性に問題はないと考えられた。

2.4.4.7 考察及び結論

2.4.4.7.1 ヒトへの曝露に関連した曝露量

リラグルチドのトキシコキネティクス評価から、マウス、ラット及びサル of 反復投与毒性試験の最高投与量群における曝露量は、日本人 MRHD と比較し、AUC に基づくと約 19~147 倍、 C_{max} に基づくと約 31~303 倍に相当することが明らかになった。同様に、がん原性試験の最高投与量は、AUC に基づくと約 17~82 倍、 C_{max} に基づくと約 22~192 倍に相当する。ウサギ生殖発生毒性試験の最高投与量は、AUC に基づくと約 1.7 倍、 C_{max} に基づくと約 2.8 倍に相当する。各動物種及び試験における曝露量比を表 2.4-2 に要約する。

表 2.4-2 毒性試験の最高投与量と MRHD における曝露量比

Study type	Mouse		Rat		Monkey		Rabbit	
	AUC	C_{max}	AUC	C_{max}	AUC	C_{max}	AUC	C_{max}
Repeat dose toxicity	147	303	19	31	94	145	1.7	2.8
Carcinogenicity	82	192	17	22	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a: 該当せず

毒性試験における曝露量として NOAEL 投与時の定常状態における AUC_{0-24h} 及び C_{max} を、また、MRHD 投与時の推定曝露量との比を Module 2.6.6.9.2 の表 2.6.6-22 に示す。

なお、NOAEL は Module 2.6.6 の各毒性試験結果の項で推察したが、一般毒性試験に関しては十分な安全性マージンが確保された。なお、甲状腺 C-細胞腫瘍に関する NOAEL はマウスでは推察できたが、ラットでは推察することができなかった。しかしながら、安全性評価ではヒトとの関連性がないことを検討しており、この所見に関する安全性マージンの設定は必須ではないと考える。また、生殖発生毒性試験では、母動物における摂餌量及び体重増加量の減少に付随して認められる軽度の所見を考慮して NOAEL を推察したことから、十分な安全性マージンは設定できなかった。

2.4.4.7.2 抗体産生の影響

反復投与毒性試験においてリラグルチド抗体を測定した。抗体測定用の血漿サンプル中に残存するリラグルチドにより測定が妨害され、弱い抗体産生反応は検出できない可能性が考えられた。このことから、測定妨害を避けるのに十分な休薬期間を設定する必要性が考えられた。

マウス及びラットでは、残存リラグルチドによる測定妨害のない条件下で、それぞれ 2 年間及び 1 年間投与によるリラグルチド抗体産生は認められなかった。

サルでは、3 ヶ月間反復投与毒性試験において、リラグルチドによる測定妨害を排除するには十分な 4 週間の休薬期間を設定し測定したが、リラグルチド抗体は検出されなかった。12 ヶ月間反復投与毒性試験では、4 週間の休薬期間後に、雌雄各 2 頭中それぞれ 1 頭でリラグルチド抗体が検出された。各試験の最高投与量群の全動物において対照群と比較し体重増加量の減少が認められており、供試動物が薬理作用を発現するのに十分なリラグルチドに曝露されていることを示すものである。サル 20 ヶ月間投与メカニズム検討試験では、最終投与後 72 時間の測定で、リラグルチド抗体が最低投与量群の 10 頭中 1 頭及び最高投与量群の 10 頭中 4 頭で検出された。当該試験の最終投与後 60 時間における TK 評価では、最高投与量群では抗体測定を妨害する可能性がある血漿中リラグルチド濃度が認められたが、最低投与量群では妨害しないレベルであった。しかしながら、最高投与量群における体重増加量は対照群よりも低く、本試験においても供試動物は薬理作用を発現するのに十分なリラグルチドに曝露されていたことを支持するものと考えられた。

結論として、マウス及びラットを 2 年間曝露してもリラグルチド抗体は産生されなかった。サルでは、3 ヶ月を超える投与時に数例でリラグルチド抗体が検出されたが、リラグルチドの薬理作用の減弱は認められなかった。

2.4.5 総括及び結論

2.4.5.1 総括

非臨床安全性プログラムから、リラグルチドは低毒性であり、安全性所見はすべて GLP-1 受容体活性化と関係していることが示されている。リラグルチドは、GLP-1 と比較して作用時間が長く、投与部位から緩徐に吸収され、クリアランスが低く 1 日 1 回投与に適する薬物動態プロファイルを有する。

リラグルチドの薬効薬理試験は、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で広範囲に検討された。

リラグルチドのグルコース制御について *in vitro* 及び *in vivo* で、GLP-1 と類似の作用を示した。リラグルチドは、ヒト GLP-1 受容体の強力な、きわめて選択的かつ有効なアゴニストである。リラグルチドは、アルブミンの非存在下で GLP-1 と効力が同等であり、そのアルブミン結合性のため、アルブミン濃度の増加に伴い *in vitro* でその効力は減少する。リラグルチドは、*in vitro* で既知の GLP-1 作用の多くを発現し、膵ラ氏島からのインスリン分泌を促進し、 β 細胞増殖を刺激し、 β 細胞アポトーシスを抑制した。リラグルチドは、スルホニルウレア系薬剤グリピジドとの併用により相乗的にインスリン分泌を促進させた。

In vivo で、リラグルチドは、各種の 2 型糖尿病及び肥満の疾患動物モデルにおいて血漿中グルコース濃度及び HbA_{1c} ならびに体重を低下させた。*In vivo* の作用機序には、インスリン分泌の促進、グルカゴン分泌の抑制、β 細胞の増殖及び β 細胞容積の増加ならびに胃内容物排出能抑制が含まれる。これらの作用は脂肪重量の減少及び摂餌量の低下に帰結する。さらに、リラグルチドは食物嗜好性を変え、エネルギー消費量を保持した。作用メカニズム及び関連する作用は、特異的な GLP-1 作用と同一である。しかしながら、食物嗜好性の変化とエネルギー消費量の保持については、特異的な GLP-1 に関連する機序としては報告がない。

GLP-1 と比較したリラグルチドの作用の持続性は、クリアランスの低下をもたらすペプチダーゼによる代謝分解に対する安定性及び血漿たん白結合が関与している。さらに、自己会合が関連すると考えられる投与部位からの緩徐な吸収が作用の持続化に寄与する。試験に用いた全動物種において、投与量で調整した C_{max} 及び AUC (C_{max}/Dose 及び AUC/Dose) は投与量に比例するか又はわずかに増加した。性差及び時間依存性変化は認められなかった。ヒトを含む動物種間での良好な類似性が曝露量及びクリアランスにみられた。V_z は低く、血漿容量相当又はわずかに高い程度であり、血漿たん白結合率が高いことと一致するものであった。代謝及び排泄パターンは、ヒトも含む動物種間できわめて類似しており、リラグルチドは体内で完全に代謝され、リラグルチド又は類似の関連代謝物の排泄はないか又は少量であった。DPP-IV 及び NEP による代謝は緩徐ではあるが、GLP-1 と同様の部位で生じる、N 及び C 末端でのペプチド断片及びアミノ酸への段階的切断によって代謝される。これらの代謝物のクロマトグラム上の保持時間は、ヒトを含む全動物種で検出される少量の血漿中代謝物の保持時間と類似しており、上記の両酵素が関与していることが示唆された。ヒト血漿中で検出される 2 種の代謝物は、毒性試験で評価されていると考えられた。主要なヒト血漿代謝物は、クロマトグラム上でリラグルチドの DPP-IV による N 末端 2 アミノ酸残基が切断されたものに相当した。この代謝物の、GLP-1 受容体との相互作用は非常に弱いことが認められている。リラグルチドのクリアランスは、DPP-IV による急速な分解と腎濾過によって腎臓と血漿クリアランスが主要な役割をする生体内 GLP-1 とは異なり、複数の器官・組織で生じると考えられた。腎臓及び肝臓はリラグルチドのクリアランスに関与する唯一の器官ではないという事実は、臨床試験において、肝機能障害患者又は腎臓機能障害患者の薬物動態の変化が限定的であることにより支持される (Module 2.7.2.3.3.1 参照)。

CYP 及びたん白結合に関連した薬物動態学的相互作用の可能性は低いことが明らかになった。胃内容物排出能抑制は既知の GLP-1 作用であり、ブタを用いた *in vivo* 試験でリラグルチドについて確認された。臨床試験では、胃内容物排出能抑制に対するリラグルチドの作用は経口投与医薬品の吸収に臨床上的影響を及ぼさないことが示された。

リラグルチドは、安全性薬理試験ではヒトでの安全性に対する懸念は生じなかった。サルでは 2 mg/kg までの投与量では臨床的に関連した所見は認められなかったが、ラットでは 0.2 mg/kg 以上の投与量で心血管系の作用 (血圧及び心拍数の増加)、体温低下及び尿量の増加が認められた。これらの所見はラットでは一過性かつ既知の GLP-1 作用であり、同様の作用はヒトでは認められなかった。

毒性試験で認められた所見は、GLP-1 受容体刺激を介したもので、摂餌量及び体重増加量の減少はリラグルチド及び他の GLP-1 アナログにおいて薬理作用として明らかになっているものである。

甲状腺 C-細胞腫瘍が、マウス及びラットを用いたがん原性試験で認められた。ノボ ノルディスク社で実施されたメカニズム検討試験の結果及び文献情報に基づくと、マウス及びラットへのリラグルチド投与により誘発された C-細胞腫瘍は、げっ歯類に特異的な非遺伝毒性の変化であり、マウス及びラットは感受性を示すが、サル及びヒトは感受性を示さない、C-細胞 GLP-1 受容体を介したメカニズムによるものであることが示唆された。GLP-1、リラグルチド又はエキセナチドを添加して培養した 2 種のラット C-細胞系でカルシトニン分泌が確認されており、この作用が class effect であることが *in vitro* で確認された。また、*in vivo* では、血漿カルシトニン濃度の上昇及びそれに引き続く C-細胞過形成がリラグルチド及びエキセナチドを投与したマウスで、C-細胞腫瘍がリラグルチド及びエキセナチドを投与したラットにおいて認められた。また、カルシトニンは引き続き生じた C-細胞増殖に対する特異的で感受性の高いバイオマーカーであることが示唆された。マウスでは、カルシトニン分泌がリラグルチドの単回投与後にみられ、C-細胞過形成は 9 週間投与後に観察された。ラットでは、カルシトニンの上昇が 2 週間投与後にみられ、過形成が投与 40 週以降に認められた。一方、サルでは、リラグルチドを最長 20 ヶ月間投与したが、血漿カルシトニン濃度の上昇及び C-細胞過形成は認められなかった。カルシトニン濃度を、リラグルチドを 6~12 ヶ月間投与した 3000 例以上のヒト被験者で測定したが、投与に関連した血漿カルシトニン濃度の増加は認められず、この所見がげっ歯類特異的であることが確認された。

生殖発生毒性試験において、生殖能及び交配能に、投与に関連した影響は認められなかった。少量ではあるが、ラット及びウサギにおける胎盤通過ならびにラットにおける乳汁移行がみられた。初期胚死亡の増加がラットでみられた。胎児の異常として、軽微な肋骨彎曲を有する胎児のわずかな増加がラットで認められた。ウサギでは、上顎骨と頬骨の結合又は癒合を有する胎児数の背景データの上限をわずかに上回る増加ならびに過剰肋骨を有する胎児が認められた。ラットでは、リラグルチド投与全群の出生児で体重減少が離乳前に認められた。最高投与量群の出生児では、離乳後においてもこの所見が認められた。正常な発達、性成熟までの期間及び学習能力に対する投与に関連した影響はみられなかった。観察された軽度の変化はいずれも、母動物の摂餌量及び体重の減少に付随して認められる二次的な影響であると考えられた。

リラグルチド製剤に含まれる不純物の安全性に問題はないと考えられた。

2.4.5.2 結論

リラグルチドは、*in vitro* 及び *in vivo* で作用の持続性及び予想される薬理学的作用を有するきわめて選択的な GPL-1 受容体アゴニストであることが示された。薬物動態学的特性及び代謝経路は、この種のペプチド分子で予想されるものであり、動物種間でほぼ同様であった。非臨床試験での安全性に係る所見は、軽度であるか又は、げっ歯類に特異的であると考えられる既知の GLP-1 受容体活性化に関連するものであり、ヒトの安全性に影響するものではないと考えられた。

以上の非臨床試験の結果から、リラグルチドはヒトにおける慢性的な皮下投与について安全であると結論される。

2.4.6 参考文献

- ¹ Kiefer TJ, Habener JF. The Glucagon-Like Peptides. *Endocrine Reviews* 1999; 20: 876-913.
- ² Meier JJ, Nauck MA. Glucagon-like peptide1 (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21:91-117.
- ³ Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006; 3: 153-165.
- ⁴ Holst JJ. The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol Rev*, 2007; 87:1409-1439.
- ⁵ Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 8641-8645.
- ⁶ Thorens B. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*,1993; 42: 1678-1682.
- ⁷ Holz GG, Habener JF. Activation of a cAMP-regulated Ca²⁺-signalling pathway in pancreatic β -cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 17749-17757.
- ⁸ Egan JM, Bulotta A, Hui H, Perfetti R. GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 115-123.
- ⁹ Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NJ, Madsen K, Pedersen FZ, Thøgersen H, Wilken M, Agersøe H. Potent Derivatives of Glucagon-Like Peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *J Medicinal Chemistry* 2000;43:1664-1669.
- ¹⁰ Bregenholt S, Møldrup A, Blume N, Karlsen AE, Friedrichsen BN, Tornhave D, Knudsen LB, Petersen JS. The long-acting glucagon-like peptide-1 analogue, liraglutide, inhibits b-cell apoptosis in vitro . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 330: 577-584.
- ¹¹ Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, Gram VK, Blume N, Petersen JS, Nielsen JH, Møldrup A. Stimulation of pancreatic b-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *J Endocrinol* 2006; 188: 481-492.
- ¹² Ribel U, Larsen MO, Rolin B, Carr RD, Wilken M, Sturis J, Westergaard L, Deacon CF, Knudsen LB. NN2211: a long-acting glucagon-like peptide-1 derivative with antidiabetic effects in glucose-intolerant pigs. *Eur J Pharm* 2002; 451: 217-225.
- ¹³ Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB. The long-actingGLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases β -cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283: E745-E752.
- ¹⁴ Sturis J, Gotfredsen CF, Rømer J, Rolin B, Ribel U, Brand CL, Wilken M, Wassermann K, Deacon CF, Carr RD, Knudsen LB. GLP-1 derivative liraglutide in rats with β -cell deficiencies: Influence of metabolic state on β -cell mass dynamics. *Br J Pharm* 2003; 140: 123-132.
- ¹⁵ Bock T, Pakkenberg B, Buschard K. The endocrine pancreas in non-diabetic rats after short-term and long-term treatment with the long-acting GLP-1 derivative NN2211. *APMIS* 2003; 111:1117-1124.

- ¹⁶ Larsen PL, Fledelius C, Knudsen LB, Tang-Christensen M. Systemic Administration of the Long-Acting GLP-1 Derivative NN2211 Induces Lasting and Reversible Weight Loss in Both Normal and Obese Rats. *Diabetes* 2001; 50: 2530-2539.
- ¹⁷ Raun K, von Voss P, Gotfredsen CF, Golozoubova V, Rolin B, Knudsen LB. Liraglutide, a Long-Acting Glucagon-Like Peptide-1 Analog, Reduces Body Weight and Food Intake in Obese Candy-Fed Rats, Whereas a Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitor, Vildagliptin, Does Not. *Diabetes* 2007; 56: 8-15.
- ¹⁸ Raun K, von Voss P, Knudsen LB. Liraglutide, a Once-daily Human Glucagon-like Peptide-1 Analog, Minimizes Food Intake in Severely Obese Minipigs. *Obesity* 2007;15(7):1710-1716.
- ¹⁹ Mack C, Laugero K, Liu Q, Jodka C, Young A, Parkes D. Therapeutic Applications of Incretin Mimetics for Metabolic Diseases: Preclinical Studies. *Drug Development Research* 2006; 67: 553-558.
- ²⁰ Yamamoto H, Lee CE, Marcus JN, Williams TD, Overton JM, Lopez ME, Hollenberg AN, Baggio L, Saper CB, Brucker DJ, Elmquist JK. Glucagon-likepeptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest* 2002; 110: 43-52.
- ²¹ Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *European Journal of Pharmacology* 2002; 434: 163-167.
- ²² FDA 2000. Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for intermediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients based on a biopharmaceutics classification system. Rockville, MD: CDER. 2007.
- ²³ Kast A. "Wavy ribs". A reversible pathological finding in rat fetuses. *Exp Toxicol.pathol.* 1994 Aug;46(3): 203-210
- ²⁴ Branch S, Rogers JM, Brownie CF, Chernoff N. Supernumerary Lumbar Rib: Manifestation of Basic Alteration in Embryonic Development of Ribs. *Journal of Applied Toxicology* 1996; 16(2): 115-119.
- ²⁵ Rogers JM, Setzer RW, Branch S, Chernoff N. Chemically Induced Supernumerary Lumbar Ribs in CD-1Mice: Size Distribution and Dose Response. *Birth Defects Research* 2004; (part B) 71: 17-25.