

オングリザ錠 2.5 mg
オングリザ錠 5 mg

医薬品製造販売承認申請書添付資料
第2部(モジュール2) : CTD の概要(サマリー)

2.6.2 薬理試験の概要文

大塚製薬株式会社

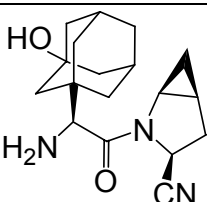
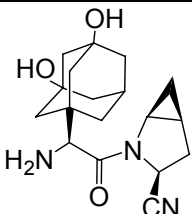
目次

目次	2
略号一覧	3
2.6.2 薬理試験の概要文	6
2.6.2.1 まとめ	6
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験	6
2.6.2.1.2 副次的薬理試験	9
2.6.2.1.3 安全性薬理試験	9
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	11
2.6.2.2.1 DPP 阻害作用 (<i>in vitro</i>)	11
2.6.2.2.2 経口投与後の血漿中 DPP 活性に対する阻害作用	19
2.6.2.2.3 活性型 GLP-1 濃度上昇に対する増強作用	23
2.6.2.2.4 病態モデルにおける血糖値低下作用	25
2.6.2.2.5 代謝物の薬理作用	32
2.6.2.3 副次的薬理試験	36
2.6.2.3.1 ヒト T リンパ球の DPP 活性と DNA 合成促進に対する作用	36
2.6.2.3.2 T リンパ球活性化に対する作用 (混合リンパ球反応による評価)	37
2.6.2.3.3 <i>In vitro</i> 受容体/イオンチャネル結合及び酵素活性	37
2.6.2.3.4 結論	38
2.6.2.4 安全性薬理試験	39
2.6.2.4.1 サキサグリプチンの安全性薬理試験	39
2.6.2.4.2 主要代謝物の安全性薬理試験	41
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験	42
2.6.2.6 考察及び結論	43
2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験の考察及び結論	43
2.6.2.6.2 安全性薬理試験の考察及び結論	48
2.6.2.7 図表	48

略号一覧

略号	省略していない表現
ala-pro-AFC	alanyl-prolyl-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin
AUC	反応－時間曲線下面積
BMS-477118	サキサグリプチン
BMS-510849	サキサグリプチンの水酸化代謝物
CD	分化抗原群 (cluster of differentiation)
C _{max}	最大血漿中濃度
DPP	dipeptidyl peptidase
DPP-2	dipeptidyl peptidase-2
DPP-4	dipeptidyl peptidase-4
DPP-8	dipeptidyl peptidase-8
DPP-9	dipeptidyl peptidase-9
ECG	心電図 (Electrocardiogram)
ED ₅₀	50%効果用量
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FAP	線維芽細胞活性化タンパク質- α (fibroblast activation protein)
GLP-1	グルカゴン様ペプチド-1 (Glucagon-like peptide-1)
GLP-1(7-36)	活性型グルカゴン様ペプチド-1
GLP-2	グルカゴン様ペプチド-2 (Glucagon-like peptide-2)
gly-pro-pNA	glycyl-prolyl-p-nitroanilide
³ H	トリチウム (tritium)
HbA1c	ヘモグロビン A1c (Hemoglobin A1c)
hERG	human ether-a-go-go related gene
HPLC	高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography)
HMVEC	ヒト微小血管内皮細胞 (Human microvascular endothelial cell)
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cell)
IC ₅₀	50%抑制濃度
I _{Kr}	急速活性化遅延整流性カリウム電流 (rapid delayed rectifier potassium current)
K _i	阻害定数
kg	kilogram
k _{off}	解離速度定数
k _{on}	結合速度定数
K _m	Michaelis 定数

LAF-237	ビルダグリプチン
LC/MS/MS	高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LLQ	定量下限 (lower limit of quantitation)
mg	milligram
mL	milliliter
MLR	混合リンパ球反応 (mixed lymphocyte reaction)
μL	microliter
μmol	micromolar
nm	nanometer
nM	nanomolar (nmol/L)
NPY	ニューロペプチド Y (Neuropeptide Y)
NT	not tested
OGTT	経口グルコース負荷試験 (oral glucose tolerance test)
pNA	para-nitroanilide
pYY	ペプチド YY (peptide YY)
S	基質濃度
SD	Sprague-Dawley
STZ	ストレプトゾトシン (streptozotocin)
t _{1/2}	消失半減期
ZDF	Zucker diabetic fatty

名称（由来）	構造式
サキサグリプチン Saxagliptin BMS-477118 （未変化体）	
一水酸化体 M2 BMS-510849 （代謝物）	

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

サキサグリブチンの薬理作用に関して、*in vitro* 及び *in vivo* の試験系を用いて検討した。試験として、効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験を実施した。更に、サキサグリブチンの主要代謝物に関して効力を裏付ける試験を実施した。これらの試験の結果、サキサグリブチンは DPP-4 阻害作用に基づく活性型 GLP-1 レベル上昇作用を介してインスリン分泌を促進させ、食後高血糖を抑制し、2 型糖尿病の改善作用を有することが示唆された。また、サキサグリブチンの心循環系、中枢神経系、呼吸器系に対する *in vitro* 及び *in vivo* の安全性薬理評価を、主要な毒性試験の一項目としてあるいは特定の安全性薬理試験として実施し、主要代謝物の心循環系への作用についても *in vitro* の系で評価した。結果は、ヒトにおける潜在的な懸念を何ら示唆するものではなかった。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

サキサグリブチンは DPP-4 阻害薬であり、目的とする効果である「2 型糖尿病の改善」に対する効力を裏付ける試験として、一連の *in vitro* 及び *in vivo* の試験を実施した。サキサグリブチンのヒト DPP-4 に対する阻害作用を検討すると共に、アイソザイムである DPP-8、DPP-9 に対する阻害作用を検討し、DPP-4 に対する阻害作用との選択性について評価した。これらについては他の DPP-4 阻害薬との比較を行った。血漿中に含まれる DPP 活性に対する阻害作用についても複数の動物種由来の血漿を用いて検討を行った。更に、複数の動物種に経口投与し、投与後の血漿中 DPP 活性に対する阻害作用について *ex vivo* で評価した。DPP-4 の阻害によって想定される血漿中活性型 GLP-1 濃度の上昇については、経口投与後の血漿中 DPP-4 活性抑制との関連性と共に正常ラットを用いて評価した。食後の血糖値上昇に対する抑制作用については、耐糖能異常を呈する Zucker fa/fa ラットを用いて OGTT 時の血糖値上昇に対するサキサグリブチンの抑制作用を評価すると共に、活性型 GLP-1 濃度の上昇によって想定されるインスリン分泌亢進との関連性についても評価した。更に、高血糖状態の進展がみられる ZDF ラットに対して反復投与を行い、OGTT 時の血糖値上昇に対するサキサグリブチンの作用を検討すると共に、空腹時血糖値に対する影響についても評価した。また、正常マウスに高脂肪食を摂取させかつストレプトゾトシン (STZ) を投与した病態モデルに対して反復投与を行い、OGTT 時の血糖コントロール、空腹時血糖値、HbA1c 及び β 細胞量に対する影響を評価した。サキサグリブチンの主要代謝物についてもサキサグリブチンと同様にヒト DPP アイソザイムに対する阻害作用を評価した。この代謝物にも DPP-4 阻害作用が認められたことから、*in vivo* における薬理作用を確認し、その作用をサキサグリブチンと比較した。

2.6.2.1.1.1 DPP 阻害作用 (*in vitro*)

ヒト DPP アイソザイムに対するサキサグリブチンの阻害作用を検討した。サキサグリブチンは DPP-4 に対して強力な阻害作用を示し、その阻害定数 (K_i 値) は 1.3 ± 0.31 nmol/L (平均値 \pm 標準偏差、注釈のない限り以降同じ) であった。サキサグリブチンは DPP-8 や DPP-9 に対しても阻害作用を示したが、それぞれに対する K_i 値は 508 ± 174 nmol/L 及び 98 ± 44 nmol/L であり、いず

れも DPP-4 に対する阻害作用よりも弱いものであった。サキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害選択性（それぞれの酵素に対する K_i 値の比）は、DPP-8 に対して約 391 倍、DPP-9 に対して約 75 倍と算出され、サキサグリブチンは DPP-4 に対して選択的な阻害作用を示した。また、DPP アイソザイムに対するサキサグリブチンの阻害作用を、DPP-4 阻害薬として知られているビルダグリブチン、シタグリブチン、アログリブチンと同じ条件で比較したところ、DPP-4 に対する阻害作用を K_i 値で比較した場合には、サキサグリブチンは他の DPP-4 阻害薬よりも約 10 倍強い阻害作用を示した。検討した他の阻害薬の DPP-4 に対する阻害選択性は、DPP-8 に対して 401~7692 倍以上、DPP-9 に対して 20~7692 倍以上であった。カニクイザルの DPP アイソザイムに対する阻害作用についても、サキサグリブチンは他の DPP-4 阻害薬よりも 6 倍以上強い作用を示した。別の条件を用いてサキサグリブチンの DPP アイソザイムに対する阻害作用を検討したところ、FAP や DPP-2 に対しては DPP-8 や DPP-9 に比べて弱い阻害作用を示し、この条件下でも DPP-4 に対して選択的な阻害作用を示した。更には、サキサグリブチンは DPP-4 の生理的な基質である GLP-1 の分解に対しても、人工基質を用いた場合と同じ強さで阻害作用を示すことが確認され、また細胞によって差はみられるものの、細胞表面に局在する DPP 活性に対しても阻害作用を示すことが分かった。また、ヒト DPP-4 に対するサキサグリブチンの酵素反応速度論的解析を実施し、結合速度定数及び解離速度定数を算出して他の DPP-4 阻害薬と比較した。サキサグリブチンの解離速度定数はビルダグリブチン、シタグリブチンと比べて低い値を示し、また算出された解離半減期は他の DPP-4 阻害薬と比べて長いことが示されたことから、サキサグリブチンは DPP-4 に結合した後解離する速度が遅く、比較的長時間に亘って DPP-4 に対する阻害作用が持続すると考えられた。

ヒト及びラットの血漿を用いて血漿中に含まれる DPP 活性に対するサキサグリブチンの阻害作用について検討を行った。サキサグリブチンは添加濃度に応じた血漿中 DPP 活性に対する阻害作用を示した。また、あらかじめ血漿とサキサグリブチンを共存させてから酵素反応を開始することで濃度－阻害曲線は低濃度側にシフトし、酵素とサキサグリブチンの共存時間の長さによって阻害作用が強くなると考えられた。その際の IC_{50} 値はヒト及びラット血漿でそれぞれ約 15 nmol/L 及び約 6 nmol/L と推定された。カニクイザル及びアカゲザルの血漿を用いた場合でも同様の阻害作用が観察され、サキサグリブチンは複数の動物種において、血漿中に含まれる DPP 活性に対して類似した添加濃度で阻害作用を示すと考えられた。

2.6.2.1.1.2 経口投与後の血漿中 DPP 活性に対する阻害作用

経口投与後の血漿中 DPP 活性に対する阻害作用を *ex vivo* で経時的に評価するため、ラット、イヌにサキサグリブチンを経口投与した後に経時的に採血し、血漿中の DPP-4 活性を測定した。

SD 系ラットに 0.04~4 $\mu\text{mol/kg}$ (0.01~1.26 mg/kg ; 以降 mg/kg 表示の数値は特記しない限りフリー体重量換算値) の用量でサキサグリブチンを投与した場合には、投与用量に応じた血漿中 DPP-4 に対する阻害作用が認められた。1 $\mu\text{mol/kg}$ (0.32 mg/kg) 以上の用量で投与した場合には、投与 6 時間後でも 60%以上の阻害作用が認められた。経過時間ごとの ED_{50} 値は、投与 0.5, 2, 4, 6 時間後でそれぞれ 0.12, 0.2, 0.3, 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ (0.04, 0.06, 0.09, 0.16 mg/kg) と推定された。

イヌにサキサグリブチンを 0.01~0.2 mg/kg の用量で経口投与し、サキサグリブチンの血中濃度と血漿中 DPP-4 活性に対する阻害作用の関連性について検討を行った。サキサグリブチンの血中

濃度が約 5 ng/mL までの濃度範囲では、血中濃度に応じた阻害作用の増大が認められたが、これ以上の濃度範囲では阻害作用に飽和がみられた。血漿中 DPP-4 活性を 50%阻害する血中濃度は 4 ng/mL (12 nmol/L) と推定された。

2.6.2.1.1.3 活性型 GLP-1 濃度上昇に対する増強作用

血漿中 DPP-4 阻害作用と血漿中活性型 GLP-1 レベルとの関連性を評価するため、サキサグリプチンを SD 系ラットに 0.03~10 $\mu\text{mol/kg}$ (0.01~3.15 mg/kg) の用量で経口投与し、経時的に血漿中 DPP-4 活性と活性型 GLP-1 濃度の測定を行った。サキサグリプチンの単回投与により、0.3 $\mu\text{mol/kg}$ (0.09 mg/kg) 以上の用量で OGTT 時にみられる血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇が増強され、投与 0.5 時間後及び 4 時間後でそれぞれ最大でコントロールの 470%, 360%に達した。また同じ用量範囲で血漿中 DPP-4 活性の阻害作用も同時に認められた。

2.6.2.1.1.4 病態モデルにおける血糖値低下作用

2 型糖尿病の病態に対する改善作用を評価するため、インスリン抵抗性及び耐糖能異常を呈することが知られている Zucker fa/fa ラット、また更に病態の進展がみられる ZDF ラットを用いて OGTT 時の血糖値上昇あるいは空腹時血糖値に対するサキサグリプチンの作用を検討した。また、正常マウスに高脂肪食を摂取させ、かつ STZ を投与した病態モデルを用いて、反復投与による OGTT 時の血糖コントロール、空腹時血糖値、HbA1c、 β 細胞量に対する作用を検討した。

Zucker fa/fa ラットに 3 $\mu\text{mol/kg}$ (0.95 mg/kg) の用量で単回投与した場合に、サキサグリプチンは OGTT 時にみられる血中インスリン濃度上昇を増強し、同時に血糖値の上昇に対して投与用量 (0.3~3 $\mu\text{mol/kg}$; 0.09~0.95 mg/kg) に応じた抑制作用を示した。3 $\mu\text{mol/kg}$ (0.95 mg/kg) の用量ではグルコース AUC (血糖値推移下面積) でコントロール群と比べて 47%抑制する作用が認められた。

ZDF ラットにおいては、サキサグリプチンは単回投与 (10 $\mu\text{mol/kg}$; 3.15 mg/kg) で OGTT 時の血糖値上昇を抑制し、35 日間反復投与した後も同様の抑制作用を示した。また、反復投与中の投与 14 日目にはコントロール群と比較して 17%の空腹時血糖値の低下がみられた。

STZ 投与マウスにおいては、血糖値、空腹時血糖値、HbA1c の上昇が認められ、また OGTT 時のグルコース AUC の上昇も認められた。サキサグリプチンの反復投与 (10 mg/kg) により 11 日間投与した後の血糖値及び 35 日間投与した後の空腹時血糖値及び HbA1c に対して改善作用が認められた。また、STZ 投与による OGTT 時のグルコース AUC の上昇に対して抑制作用を示した。更には STZ 投与によって減少した β 細胞量に対して、サキサグリプチンの 35 日間反復投与後には細胞量の部分的な回復が認められた。

2.6.2.1.1.5 代謝物の薬理作用

サキサグリプチンの主要代謝物である BMS-510849 について、DPP アイソザイムに対する阻害作用及び阻害選択性を評価した。BMS-510849 は DPP-4 に対して強い阻害作用 (K_i 値 : 2.6 ± 1.0 nmol/L) を示したが、 K_i 値で比較するとサキサグリプチンと比べて約 1/2 の阻害作用であった。BMS-510849 は DPP-8 や DPP-9 に対しても阻害作用を示し、それぞれに対する K_i 値は 2495 ± 727 nmol/L 及び 423 ± 64 nmol/L であり、いずれも DPP-4 に対する阻害作用よりも弱いものであった。

BMS-510849 の DPP-4 に対する阻害選択性（それぞれの酵素に対する K_i 値の比）は、DPP-8 に対して約 948 倍、DPP-9 に対して約 163 倍と算出され、この代謝物も DPP-4 に対して選択的な阻害作用を示した。

BMS-510849 に DPP-4 阻害作用が認められたため、*in vivo* での薬理作用を検討した。SD 系ラット及び Zucker fa/fa ラットにサキサグリブチンと BMS-510849 を動脈内投与し、OGTT 時のグルコース AUC（血糖値推移下面積）と血中濃度との関連性を比較した。一定の薬理作用（グルコース AUC を 25%低下させる作用）を示すために必要な血中濃度をサキサグリブチンと比較した場合には、BMS-510849 の方が最低でも 20 倍（SD 系ラット）、5 倍（Zucker fa/fa ラット）必要であることが示された。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

サキサグリブチン及び BMS-510849 の T リンパ球が有する DPP-4 活性に対する阻害作用と T リンパ球の活性化（放射標識チミジンの取り込みを指標とした増殖促進）に対する作用との関連性を評価するため、ヒト T リンパ球を用いて外来刺激による活性化に対する DPP-4 阻害薬の影響を検討した。混合リンパ球反応試験においては、T リンパ球の活性化に対してサキサグリブチン及び BMS-510849 を 10 $\mu\text{mol/L}$ 添加した際の抑制率はそれぞれ 8%及び 6%であった。また、ヒト T リンパ球が有する DPP-4 活性と抗 CD3 抗体刺激時の T リンパ球活性化に対するサキサグリブチンの阻害作用を検討したところ、それぞれの項目に対する IC_{50} 値は約 30 nmol/L 及び約 20 $\mu\text{mol/L}$ と推定され、600 倍以上の乖離が認められた。他の DPP-4 阻害薬でも同様の結果が得られたことから、DPP-4 阻害薬で T リンパ球が有する DPP-4 活性が阻害された場合でも、T リンパ球の活性化に与える影響は小さいものと考えられた。

また、*in vitro* での受容体／イオンチャネル結合及び酵素活性に対して、サキサグリブチンは意味のある影響を示さなかった。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

2.6.2.1.3.1 サキサグリブチンの安全性薬理試験

心循環系に及ぼす影響を、*in vitro* human ether-a-go-go-related gene アッセイ（hERG, I_{Kr} ）及びウサギプルキンエ線維アッセイ、イヌにおける単回経口投与心循環テレメトリー試験、並びにラット、イヌ及びサルにおける毒性試験の一部として評価した。サキサグリブチンは 30 $\mu\text{mol/L}$ までの濃度（フリー体として 9.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下）において hERG/ I_{Kr} 電流及びプルキンエ線維活動電位にほとんど作用を示さず、テレメトリー試験では 10 mg/kg 投与（ C_{max} は約 3 $\mu\text{g/mL}$ ）でも心循環系パラメーターに変化を示さなかった。ラットにおける 6 ヶ月経口投与毒性試験において、投与第 1 週には 20 及び 100 mg/kg （安息香酸塩の用量；フリー体重量換算では 14.4 及び 72 mg/kg 、以降 2.6.2.1.3.1 の（ ）内に表示される用量はフリー体重量換算値）の雄で、投与第 13 週には 100 mg/kg （72 mg/kg ）の雄で平均収縮期血圧が 17%～19%低下した（心拍数に影響はなし）が、投与第 25 週では、血圧、心拍数に何ら影響は見られなかった。イヌの経口投与毒性試験（2 週間投与は 25 mg/kg （18 mg/kg ）まで、12 ヶ月投与は 10 mg/kg （7.2 mg/kg ）までの用量を投与）及びサルの経口投与毒性試験（単回投与は 25 mg/kg （18 mg/kg ）まで、4 週間までの投与は 30/20 mg/kg 、3 ヶ

月投与は 3 mg/kg までの用量を投与) において、心電図 (ECG)、血圧、心拍数にサキサグリブチン投与に関連した作用はみられなかった。これらの経口投与毒性試験において影響のみられなかった用量における暴露 AUC は、臨床推奨用量 5 mg でのヒト暴露 AUC (78 ng·h/mL) と比べて、最大でラットは 618 倍、イヌは 651 倍、サルは 176 倍であった。

中枢神経系に及ぼす影響をラット及びイヌを用いて評価した。ラットは単回経口投与 (100 mg/kg までの用量を投与)、イヌは 2 週間経口投与毒性試験 (25 mg/kg (18 mg/kg) までの用量を投与) において評価したが、サキサグリブチン投与に関連した作用はみられなかった。この用量における暴露 AUC は、ヒト暴露 AUC と比べてラットでは最大 465 倍、イヌでは最大 651 倍であった。

呼吸器系に及ぼす影響を、イヌの経口投与毒性試験 (25 mg/kg (18 mg/kg) までの 2 週間投与、10 mg/kg (7.2 mg/kg) までの 12 ヶ月投与) 及びサルの経口投与毒性試験 (3 mg/kg までの 3 ヶ月投与) において評価したが、呼吸器系パラメーターにサキサグリブチン投与に関連した作用はみられなかった。この用量における暴露 AUC は、ヒト暴露 AUC と比べて最大でイヌは 651 倍、サルは 28 倍であった。

2.6.2.1.3.2 主要代謝物の安全性薬理試験

サキサグリブチンの主要代謝物である BMS-510849 について、30 µmol/L までの濃度 (フリー体として 9.5 µg/mL 以下) で hERG アッセイ及びウサギプルキンエ線維アッセイを実施したが、いずれにおいても意味のある作用はみられなかった。

2.6.2.1.3.3 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 DPP 阻害作用 (*in vitro*)

2.6.2.2.1.1 ヒト DPP アイソザイムに対する阻害作用及び阻害選択性

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 021944)

目的: サキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害作用及び他の DPP アイソザイムに対する阻害作用の選択性を評価するため、ヒト DPP-4 (ヒト腎臓由来), DPP-8, DPP-9 (COS-7 細胞での一過性発現によるヒト組換えタンパク) を用いてこれらの酵素活性に対するサキサグリブチンの阻害作用を検討した。また、この阻害作用及び阻害選択性について、他の DPP-4 阻害薬であるビルダグリブチン, シタグリブチン, アログリブチンと比較した。

方法: 酵素基質としてジペプチド人工基質である gly-pro-pNA を用い、様々な DPP-4 阻害薬を添加し、ヒト DPP-4, DPP-8, DPP-9 活性を測定した。37°C で酵素反応を行い、DPP 活性によって生成する pNA の量を 405 nm の吸光度で測定した。10 種類の異なる阻害剤濃度で活性測定を行い、濃度阻害曲線から IC₅₀ 値を算出した。阻害定数 (K_i 値) は $K_i = IC_{50} / (1 + S/K_m)$ より算出した (S: 用いた基質濃度 K_m: 各酵素の人工基質に対する K_m 値) 報告書番号 021944。

成績: サキサグリブチンのヒト DPP-4 に対する K_i 値は 1.3 ± 0.31 nmol/L (平均値 ± 標準偏差, 以降注釈のない限り同じ) であり、DPP-4 に対して強力な阻害作用を示した (表 2.6.2-1)。ビルダグリブチン, シタグリブチン, アログリブチンも DPP-4 に対して阻害作用を示したが、サキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害作用を他の DPP-4 阻害薬と K_i 値で比較した場合には、約 10 倍強いことが示された。サキサグリブチンは DPP-8 や DPP-9 に対しても阻害作用を示し、その K_i 値はそれぞれ 508 ± 174 nmol/L 及び 98 ± 44 nmol/L であったが、いずれの作用も DPP-4 に対する阻害作用よりも弱いものであった。サキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害選択性 (それぞれの酵素に対する K_i 値の比) は、DPP-8 に対して約 391 倍、DPP-9 に対して約 75 倍と算出され、サキサグリブチンは DPP-4 に対して選択的な阻害作用を示した。また、ビルダグリブチン, シタグリブチン, アログリブチンの DPP-4 に対する阻害選択性は、DPP-8 に対してそれぞれ 401 倍, 1913 倍, 7692 倍以上、DPP-9 に対してそれぞれ 20 倍, 3063 倍, 7692 倍以上であった。

表 2.6.2-1 ヒト DPP アイソザイムに対する DPP-4 阻害薬の阻害作用及び阻害選択性

薬剤	DPP-4 K _i (nmol/L)	DPP-8 K _i (nmol/L)	DPP-9 K _i (nmol/L)
	平均値±標準偏差 (例数)	平均値±標準偏差 (例数)	平均値±標準偏差 (例数)
サキサグリブチン	1.3 ± 0.31 (12)	508 ± 174 (13)	98 ± 44 (11)
		選択性: 391	選択性: 75
ビルダグリブチン	13 ± 2.8 (12)	5218 ± 2319 (14)	258 ± 93 (12)
		選択性: 401	選択性: 20
シタグリブチン	18 ± 1.6 (12)	33780 ± 5532 (12)	55142 ± 19414 (11)
		選択性: 1913	選択性: 3063
アログリブチン	13 ± 2.3 (12)	>100000 (6)	>100000 (12)
		選択性: >7692	選択性: >7692

数値はいずれも平均値±標準偏差 (nmol/L) , 数値右側の () 内の数値は例数。選択性は DPP-4 に対する K_i 値に対するそれぞれの酵素に対する K_i 値の比で示した。

<資料番号 4.2.1.1-01 : Table 2 より抜粋>

2.6.2.2.1.2 カニクイザル DPP アイソザイムに対する阻害作用及び阻害選択性

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 021944)

目的: サキサグリプチンの DPP-4 に対する阻害作用及び他の DPP アイソザイムに対する阻害作用の選択性を評価するため, カニクイザルの DPP-4, DPP-8, DPP-9 を用いてこれらの酵素活性に対する阻害作用を検討した。また, この阻害作用及び阻害選択性について, 他の DPP-4 阻害薬であるビルダグリプチン, シタグリプチン, アログリプチンと比較した。

方法: 酵素基質として, ジペプチド人工基質である gly-pro-pNA を用い, 様々な DPP 阻害薬を添加して, カニクイザルの DPP-4, DPP-8, DPP-9 活性を測定した。37°C で酵素反応を行い, DPP 活性に伴って生成する pNA の量を 405 nm の吸光度で測定した。10 種類の異なる阻害剤濃度で DPP 活性測定を行い, 濃度阻害曲線から IC_{50} 値を算出した。阻害定数 (K_i 値) は $K_i = IC_{50} / (1 + S/K_m)$ より算出した (S: 用いた基質濃度 K_m : 各酵素の人工基質に対する K_m 値) 報告書番号 021944。

成績: サキサグリプチンのカニクイザル DPP-4 に対する K_i 値は 1.1 ± 0.2 nmol/L であり, DPP-4 に対して強力な阻害作用を示した (表 2.6.2-2)。ビルダグリプチン, シタグリプチン, アログリプチンも DPP-4 に対して阻害作用を示したが, サキサグリプチンの DPP-4 に対する阻害作用を他の DPP-4 阻害薬と K_i 値で比較した場合には, 6 倍以上強いことが示された。サキサグリプチンはカニクイザルの DPP-8 や DPP-9 に対しても阻害作用を示し, その K_i 値はそれぞれ 390 ± 82 nmol/L 及び 61 ± 5 nmol/L であったが, いずれの作用も DPP-4 に対する阻害作用よりも弱いものであった。サキサグリプチンの DPP-4 に対する阻害選択性 (それぞれの酵素に対する K_i 値の比) は, DPP-8 に対して約 355 倍, DPP-9 に対して約 55 倍と算出され, サキサグリプチンは DPP-4 に対して選択的な阻害作用を示した。また, ビルダグリプチン, シタグリプチンの DPP-4 に対する阻害選択性は, DPP-8 に対してそれぞれ 543 倍, 1407 倍, DPP-9 に対してそれぞれ 18 倍, 4215 倍であった。

表 2.6.2-2 カニクイザル DPP アイソザイムに対する DPP-4 阻害薬の阻害作用及び阻害選択性

薬剤	DPP-4 K_i (nmol/L) 平均値±標準偏差 (例数)	DPP-8 K_i (nmol/L) 平均値±標準偏差 (例数)	DPP-9 K_i (nmol/L) 平均値±標準偏差 (例数)
サキサグリプチン	1.1 ± 0.2 (14)	390 ± 82 (6) 選択性: 355	61 ± 5 (6) 選択性: 55
ビルダグリプチン	6.8 ± 2.0 (14)	3692 ± 917 (7) 選択性: 543	125 ± 39 (7) 選択性: 18
シタグリプチン	15.6 ± 3.6 (14)	21949 ± 17461 (6) 選択性: 1407	65757 ± 7966 (6) 選択性: 4215
アログリプチン	9.0 ± 1.6 (12)	>1000000	>1000000

数値はいずれも平均値±標準偏差 (nmol/L) 。数値右側の () 内の数値は例数を示す。選択性は DPP-4 に対する K_i 値に対するそれぞれの酵素に対する K_i 値の比で示した。

<資料番号 4.2.1.1-01 : Table 7 より作成>

2.6.2.2.1.3 ヒト DPP アイソザイムに対する阻害作用及び阻害選択性（室温での結果）

（概要表 2.6.3.2，報告書番号 019423）

目的：サキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害作用及び他の DPP アイソザイムに対する阻害作用の選択性を評価するため，ヒト DPP-4，DPP-8，DPP-9，FAP，DPP-2 を用いてこれらの酵素活性に対するサキサグリブチンの阻害作用を室温（約 22℃）で検討し，更にこれらの酵素に対する阻害作用をサキサグリブチンの主要代謝物である BMS-510849 及びビルダグリブチン（LAF-237）と比較した。

方法：酵素基質としてジペプチド人工基質である gly-pro-pNA を用い，サキサグリブチン，BMS-510849，ビルダグリブチンを添加し，ヒト DPP-4，DPP-8，DPP-9，FAP，DPP-2 活性を測定した。あらかじめ室温で酵素と阻害薬を 40 分間インキュベーションした後（阻害薬の酵素阻害作用が酵素とのインキュベーション時間に依存することから，十分な前処理時間を用いた），酵素基質を添加し，室温（約 22℃）で酵素反応を行った。DPP 活性に伴って生成する pNA の量を 405 nm の吸光度で測定した。10 種類の異なる阻害剤濃度で活性測定を行い，濃度阻害曲線から IC₅₀ 値を算出した。阻害定数（K_i 値）は $K_i = IC_{50} / (1 + S/K_m)$ より求めた（S：用いた基質濃度 K_m：各酵素の人工基質に対する K_m 値）報告書番号 019423。

成績：室温で酵素反応を行わせた場合には，サキサグリブチンのヒト DPP-4 に対する K_i 値は 0.45 nmol/L と推定され，DPP-4 に対して強力な阻害作用を示した（表 2.6.2-3）。この条件下でサキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害作用をビルダグリブチンと K_i 値で比較した場合には，10 倍以上強いことが示された。また，サキサグリブチンの主要代謝物である BMS-510849 に対しても 10 倍以上強い DPP-4 阻害作用を示した。サキサグリブチンは DPP-8 や DPP-9 に対しても阻害作用を示し，その K_i 値はそれぞれ 47 nmol/L 及び 12 nmol/L であったが，いずれの作用も DPP-4 に対する阻害作用よりも弱いものであった。サキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害選択性（それぞれの酵素に対する K_i 値の比）は，DPP-8 に対して約 104 倍，DPP-9 に対して約 27 倍であった。また，FAP や DPP-2 に対するサキサグリブチンの阻害作用は，K_i 値で比較した場合にいずれも DPP-4，DPP-8，DPP-9 に対する阻害作用と比べると弱く，それぞれの酵素に対する DPP-4 との阻害選択性は 1000 倍以上と推定された。

表 2.6.2-3 ヒト DPP アイソザイムに対する DPP-4 阻害薬の阻害作用（室温での測定結果）

薬剤	DPP-4 K _i (nmol/L)	DPP-8 K _i (nmol/L)	DPP-9 K _i (nmol/L)	FAP K _i (nmol/L)	DPP-2 K _i (nmol/L)
サキサグリブチン	0.45 ± 0.1 (5)	47 ± 8 (5)	12 ± 1 (5)	4300 (1)	>10000 (2)
BMS-510849	5 ± 0.3 (6)	450 ± 114 (3)	72 ± 23 (3)	10206 (1)	>10000 (2)
ビルダグリブチン	7 ± 2 (5)	740 ± 320 (8)	19 ± 5 (8)	15603 (1)	>10000 (2)

表中の数値は，計算が可能なものについては平均値±標準偏差で示した。（ ）内の数値は検討した例数を示す。図中”>10000”は検討した阻害薬の最大添加濃度で 50%以上の阻害作用が得られず，K_i 値の推定が困難であったことから K_i 値は 10000 nmol/L 以上であると推定されることを示す。

<資料番号 4.2.1.1-02：Table 3 及び BMS 社より得られた情報に基づき表を作成>

2.6.2.2.1.4 DPP による生理的基質の分解に対する阻害作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 021944)

目的：DPP はその基質となる様々な生理活性ペプチドの分解を通して、これらのペプチドが有する生理機能を制御すると考えられている¹。DPP-4 による生理的基質の分解に対する阻害薬の作用を検討するため、また人工基質を用いた場合の阻害薬の作用が、生理的基質を用いた場合の作用と一致するかどうかを確認するため、生理的基質として GLP-1 (DPP-4 により効率的に分解される) を用い、DPP-4 による分解に対するサキサグリプチン、シタグリプチン、ビルダグリプチンの阻害作用を検討し、人工基質を用いた場合と比較した。また、DPP-4, DPP-8, DPP-9 によるサブスタンス P (DPP-4, 8, 9 による分解効率があまり変わらない) の分解に対するサキサグリプチン及びビルダグリプチンの阻害作用を人工基質の分解に対する阻害作用と比較した。

方法：酵素基質として GLP-1 とサブスタンス P を用い、ヒト DPP-4, DPP-8, DPP-9 を添加して 22°C で酵素反応を行った。これらの基質の分解は LC/MS/MS (GLP-1) 及び HPLC (サブスタンス P) を用いて測定した。人工基質 (gly-pro-pNA) を用いた酵素反応に対する阻害作用の検討も 22°C で実施した^{報告書番号 021944}。

成績：*in vitro* において DPP-4 の基質となることが知られている様々な生理活性ペプチドを DPP-4, DPP-8, DPP-9 の酵素基質として酵素反応を行った場合の酵素反応速度論的解析から、GLP-1 は DPP-4 によって DPP-8 や DPP-9 と比べて 500 倍以上効率よく分解されることが示された^{報告書番号 021944}。この結果から、GLP-1 の分解に対しては DPP-4 の寄与が大きいと考えられたことから、阻害薬を添加した場合の DPP-4 に対する阻害作用のみを検討し、人工基質を用いた場合の阻害作用と比較した (表 2.6.2-4)。基質として GLP-1 を用いた場合の DPP-4 に対するサキサグリプチンの阻害作用は、 K_i 値で見た場合に人工基質を用いた場合とほぼ一致することが分かった。阻害薬としてシタグリプチン及びビルダグリプチンを用いた場合でも、GLP-1 の分解に対する阻害作用は人工基質を用いた場合と若干の相違は見られるものの、ほとんど変わらないと考えられた。また、人工基質を用いた場合には、サキサグリプチンは K_i 値で比較するとシタグリプチン及びビルダグリプチンに比べてより強い阻害作用を示していたが^{報告書番号 021944}、この傾向は酵素基質として GLP-1 を用いた場合でも同様であることが示された。

表 2.6.2-4 DPP-4 による GLP-1 分解に対する阻害作用の比較

薬剤	GLP-1	gly-pro-pNA
サキサグリプチン	0.43 ± 0.1 (7)	0.4 ± 0.1 (5)
シタグリプチン	2.5 ± 0.7 (4)	8 ± 1 (5)
ビルダグリプチン	2 ± 0.5 (4)	7 ± 1 (5)

表中の数値はいずれも K_i 値 (nmol/L; 平均値 \pm 標準偏差) を示す。() 内の数値は検討した例数を示す。

<資料番号 4.2.1.1-01 : Table 5 及び BMS 社より得られた情報に基づき表を作成>

一方で、前述の酵素反応速度論的解析から、酵素基質としてサブスタンス P を用いた場合には、DPP-4, DPP-8, DPP-9 による分解効率にほとんど差がみられなかった^{報告書番号 021944}。このような酵素基質を用いた場合でも DPP-4 阻害薬によって人工基質を用いた場合と同様の阻害作用がみられるかどうかを確認するため、酵素基質としてサブスタンス P を用い、これらの DPP アイソザイ

ムによる分解に対するサキサグリブチン及びビルダグリブチンの阻害作用を検討し、同時に人工基質を用いた場合の阻害作用との比較を行った（表 2.6.2-5）。サキサグリブチンの DPP-4 に対する阻害作用（ K_i 値）は、人工基質を用いた場合とほぼ一致していることが示された。また、検討したその他の DPP アイソザイムに対する阻害作用においてもこの傾向は維持されていた。阻害薬としてビルダグリブチンを用いた場合でも、基質としてサブスタンス P を用いた場合と人工基質を用いた場合とで DPP アイソザイムに対する阻害作用（ K_i 値）に大きな変動はみられなかった。この傾向は DPP-8 に対する阻害作用を除いてほぼ維持されていると考えられた。また、人工基質を用いた場合の DPP-4 阻害作用では、サキサグリブチンはビルダグリブチンに比べてより強い阻害作用を示していたが^{報告書番号 021944}、この傾向は基質としてサブスタンス P を用いた場合でも維持されていることが示された。

表 2.6.2-5 DPP-4, DPP-8, DPP-9 によるサブスタンス P の分解に対する阻害作用の比較

薬剤	DPP-4 K_i (nmol/L)		DPP-8 K_i (nmol/L)		DPP-9 K_i (nmol/L)	
	SubP	gly-pro-pNA	SubP	gly-pro-pNA	SubP	gly-pro-pNA
サキサグリブチン	0.3 (1)	0.4 ± 0.1 (5)	23 (1)	47 ± 8 (5)	5 (1)	12 ± 1 (5)
ビルダグリブチン	8 (1)	7 ± 1 (5)	613 (1)	740 ± 320 (8)	12 (1)	19 ± 5 (8)

表中の数値はいずれも K_i 値 (nmol/L；計算可能なものについては平均値 \pm 標準偏差)を示す。() 内の数値は検討した例数を示す。(SubP：サブスタンス P)

<資料番号 4.2.1.1-01：Table 6 及び BMS 社より得られた情報に基づき表を作成>

2.6.2.2.1.5 DPP-4 阻害作用の酵素反応速度論的解析

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 021944)

目的：サキサグリブチンの DPP-4 に対する結合及び解離速度を調べるため、酵素反応時の反応速度論的指標を測定し、他の DPP-4 阻害薬（ビルダグリブチン、シタグリブチン）と比較を行った。

方法：ヒト DPP-4 を用い、阻害薬共存下で一定の酵素基質濃度における酵素反応生成物の生成速度を 37°C で測定し、結合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off})、解離半減期 ($t_{1/2}$) を算出した^{報告書番号 021944}。

成績：サキサグリブチンの解離速度定数の推定においては、比較した他の DPP-4 阻害薬と比べて解離速度定数 (k_{off}) が小さく ($23 \times 10^{-5}/s$)、また解離半減期 ($t_{1/2}$) が他の DPP-4 阻害薬と比べて長いことが示された ($t_{1/2}$: 50 分) (表 2.6.2-6)。この結果から、サキサグリブチンは DPP-4 に結合した後解離速度が遅く、検討した他の DPP-4 阻害薬と比べて長時間にわたって DPP-4 に対する阻害作用が持続すると考えられた。

表 2.6.2-6 DPP-4 に対する阻害薬の結合及び解離速度定数, 解離半減期

薬剤	$k_{on}, 10^5 M^{-1} s^{-1}$	$k_{off}, 10^{-5} s^{-1}$	$t_{1/2}$ (分)
サキサグリブチン	4.6 ± 0.6	23 ± 1	50
ビルダグリブチン	1.2 ± 0.2	330 ± 30	3.5
シタグリブチン	>100	>580	<2

k_{on} ：結合速度定数, k_{off} ：解離速度定数 $t_{1/2}$ ：解離半減期をそれぞれ示す。表中の数値は、計算可能なものについては平均値 \pm 標準誤差で示した。

<資料番号 4.2.1.1-01 : Table 8 より抜粋及び BMS 社より得られた情報に基づき表を作成>

2.6.2.2.1.6 細胞表面に存在する DPP-4 活性に対する阻害作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 019417, 019419)

目的: DPP-4 は組織を構成する細胞表面にも局在することが知られており, これらの DPP-4 も活性型 GLP-1 を含む生理活性ペプチドの分解に寄与していると考えられていることから², 各種培養細胞あるいは初代培養細胞を用いて, これらの細胞が有する DPP-4 活性に対するサキサグリプチンの阻害作用について検討を行った。

方法: HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞), HMVEC (ヒト微小血管内皮細胞), CaCo2, THP-1 は 96 穴プレートに播種し, 単層を形成するまで 2 日~3 日培養を行った。ヒト T リンパ球は供与者から採血を行った後緩衝液に懸濁し, 96 穴プレートに一定量の細胞懸濁液を加えた。細胞にサキサグリプチンを含む緩衝液を添加し, 37°C で前処理した後更に蛍光基質 (ala-pro-AFC) を含む緩衝液を添加し, 直ちに蛍光光度計で蛍光強度の測定を行った (励起波長: 360 nm, 蛍光波長: 530 nm)。酵素活性は初期の 20 分の蛍光強度変化を読み取ることで測定した^{報告書番号 019417, 019419}。

成績: 検討した全ての細胞表面に存在する DPP-4 活性に対して, サキサグリプチンは添加濃度に応じて阻害作用を示したが, 用いる細胞によってサキサグリプチンの阻害作用に差がみられた (図 2.6.2-1)。単球/マクロファージ系の培養細胞株である THP-1 の DPP-4 活性に対しては, サキサグリプチンの阻害作用は比較的弱く (推定 IC₅₀ 値: 250 nmol/L) また最大添加濃度での阻害作用も他の細胞を用いた場合と比べて弱かった。HMVEC, HUVEC, CaCo2 細胞, ヒト T リンパ球の DPP-4 活性に対してサキサグリプチンは比較的強い阻害作用を示し, 各細胞の DPP-4 活性に対するサキサグリプチンの IC₅₀ 値は, それぞれ約 30 nmol/L, 30 nmol/L, 10 nmol/L, 10 nmol/L と推定された。

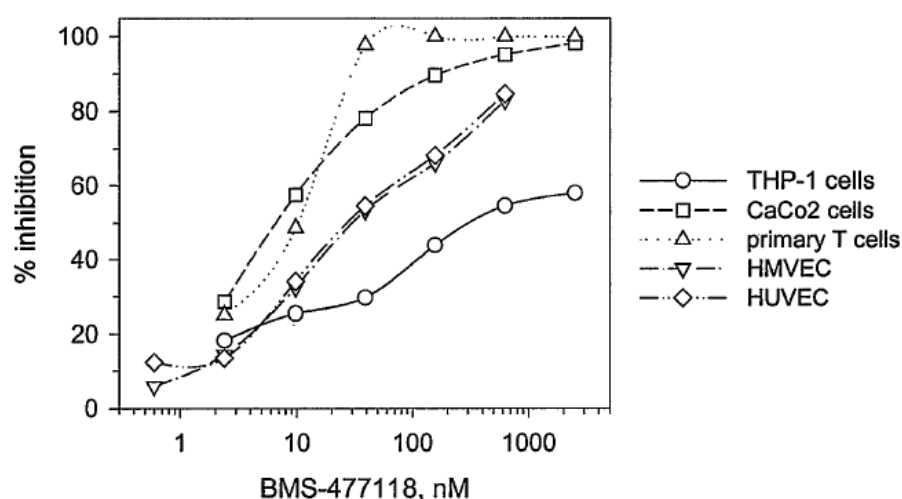


図 2.6.2-1 様々な細胞の DPP 活性に対するサキサグリプチンの阻害作用

培養細胞あるいは細胞懸濁液にサキサグリプチン (BMS-477118) を添加した後人工基質を添加し, 酵素反応を開始した。生成物の蛍光強度変化を指標として DPP-4 活性を測定した。縦軸には各細胞が有する DPP-4 活性に対する阻害率を%で表示し, 横軸にはサキサグリプチンの添加濃度 (nM ; nmol/L) を示した。

<資料番号 4.2.1.1-03 : Figure 11>

2.6.2.2.1.7 血漿中に含まれる DPP 活性に対する阻害作用

(1) ヒト及びラット血漿中 DPP-4 活性に対する阻害作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 019417)

目的: DPP-4 は血漿中あるいは組織を構成する細胞表面に局在することが知られており, 血漿中に含まれる DPP-4 もまた活性型 GLP-1 の生理的な分解に寄与している³。そこで, 血漿中に含まれる DPP-4 活性に対するサキサグリブチンの阻害作用について検討を行った。

方法: ヒト及びラットの EDTA 血漿を用い, DPP-4 活性を検出するため, 基質として ala-pro-AFC を用いた。血漿に様々な濃度のサキサグリブチンを添加し, 20°C で 0, 30, 60 分間あらかじめ共存させた後, 基質を添加して酵素反応を開始した。酵素反応生成物由来の蛍光強度変化を指標として DPP-4 活性を測定した^{報告書番号 019417}。

成績: ヒト血漿を用いた場合, サキサグリブチンは添加濃度の増加に応じた DPP-4 活性阻害作用を示した (図 2.6.2-2)。また, 血漿とサキサグリブチンをあらかじめ共存させた場合には, 前処理しない場合 (0 分) と比べて濃度阻害曲線が低濃度側にシフトすることが示された。あらかじめ共存させた場合のヒト血漿中 DPP-4 活性に対するサキサグリブチンの IC₅₀ 値は約 15 nmol/L と推定された。ラット血漿においてもサキサグリブチンの添加濃度の増加に応じた DPP-4 活性阻害作用の増大が認められ, またヒトの場合と同様, サキサグリブチンと血漿をあらかじめ共存させることにより濃度阻害曲線が低濃度側にシフトすることが示された。あらかじめ共存させた場合のラット血漿中 DPP-4 に対するサキサグリブチンの IC₅₀ 値は約 6 nmol/L と推定された。

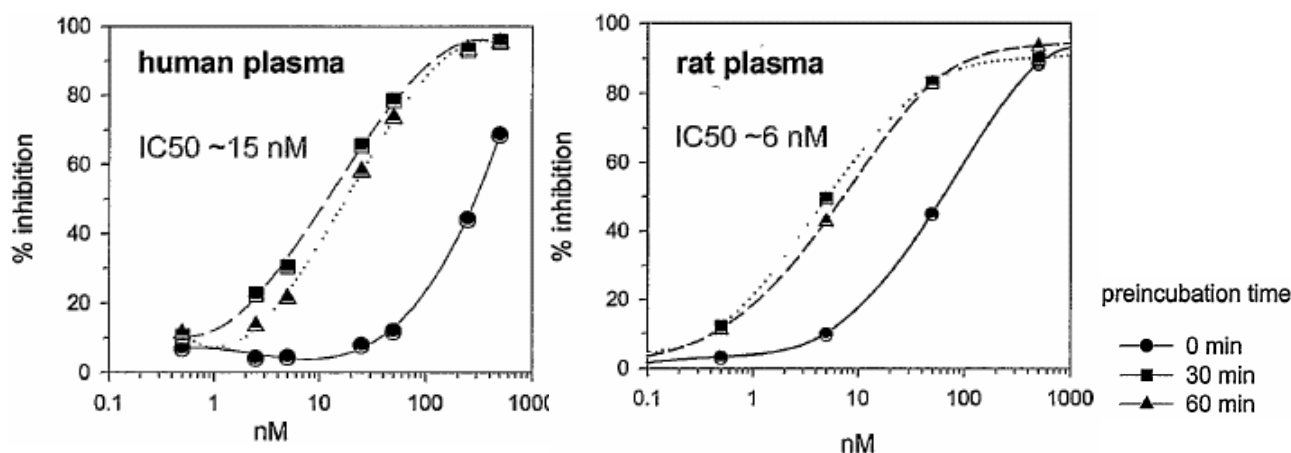


図 2.6.2-2 ヒト及びラット血漿中 DPP-4 活性に対するサキサグリブチンの阻害作用

ヒト及びラット血漿と, 図の横軸に示した濃度のサキサグリブチンを 20°C で 0, 30 及び 60 分間それぞれあらかじめ共存させた後, 酵素反応を開始した。反応生成物の蛍光強度の変化を指標として DPP-4 活性を測定した。縦軸には各添加濃度における阻害率を%で表示した。図中の nM は nmol/L を示す。

<資料番号 4.2.1.1-03 : Figure 10 より抜粋>

(2) サル血漿中 DPP 活性に対する阻害作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 021945)

目的：サル血漿中に含まれる DPP 活性に対する DPP-4 阻害薬の作用を *in vitro* で調べるため、様々な DPP-4 阻害薬共存下でカニクイザル及びアカゲザル血漿中に含まれる DPP 活性に対する作用を検討した。またヒト血漿でも同様の測定を行い、同じ条件下での DPP-4 阻害薬の阻害作用を比較した。(なお、ヒト及びラットにおいては、血漿にサキサグリブチンを添加すると最大で 90% 以上の阻害作用が認められ^{報告書番号 019417}、イヌの *ex vivo* においても最大で 90% 以上の阻害作用が認められた^{報告書番号 019514}。これに対して、サルの血漿にサキサグリブチンや他の DPP-4 阻害薬を添加すると、最大でも 80% 程度の阻害作用しか得られなかった^{報告書番号 021945}。この結果から、サルの血漿中には選択的 DPP-4 阻害薬では阻害できない DPP 由来の活性が存在すると考えられる。このことから、サル由来の検体を用いる試験では「DPP 活性」と表記し、それ以外の動物種の検体を用いる試験では「DPP-4 活性」と表記する。)

方法：カニクイザル及びアカゲザルの血漿、及びヒト血液から調製された血漿を用い、基質として ala-pro-AFC を用いて DPP 活性の検討を行った。血漿に様々な濃度の DPP-4 阻害薬を添加し、22°C であらかじめ 15 分ないし 20 分前処理を行った後、酵素基質を添加して酵素反応を開始した。酵素反応生成物由来の蛍光強度変化を指標として DPP 活性を測定した^{報告書番号 021945}。

成績：ヒト血漿中 DPP-4 活性に対するサキサグリブチンの IC₅₀ 値は 12.8 ± 0.6 nmol/L と推定され、前項のヒト血漿を用いた検討結果^{報告書番号 019417} とほぼ同様の阻害作用を示すことが確認された。カニクイザル及びアカゲザルの血漿中 DPP 活性に対するサキサグリブチンの IC₅₀ 値はそれぞれ 9.0 ± 0.4 nmol/L 及び 8.5 ± 0.8 nmol/L と推定され、ヒト血漿中 DPP-4 に対する阻害とほぼ同様の作用を示した(表 2.6.2-7)。ビルダグリブチンはサキサグリブチンとほぼ同様の阻害作用を示したが、シタグリブチンの IC₅₀ 値はこれらの DPP-4 阻害薬のものよりも高い値を示し、同じ添加濃度での血漿中 DPP 活性に対する阻害作用はこれらの動物種においてはサキサグリブチンに比べて弱いことが示された。

表 2.6.2-7 サル及びヒト血漿中 DPP 活性に対する DPP-4 阻害薬の作用

薬剤	ヒト (IC ₅₀ ; nmol/L)	カニクイザル (IC ₅₀ ; nmol/L)	アカゲザル (IC ₅₀ ; nmol/L)
サキサグリブチン	12.8 ± 0.6	9.0 ± 0.4	8.5 ± 0.8
ビルダグリブチン	12.4 ± 0.5	11.7 ± 1.1	12.0 ± 1.2
シタグリブチン	149 ± 11	176 ± 37	162 ± 47

値はいずれも 3 例の平均値 ± 標準誤差 (nmol/L)。

<資料番号 4.2.1.1-04 : Table 5 より作成>

2.6.2.2.1.8 結論

サキサグリブチンはヒト DPP-4 に対して強力な阻害作用を示し、その IC₅₀ 値は 1.3 nmol/L と推定された。また、K_i 値で比較した場合、他の DPP-4 阻害薬と比較して 10 倍以上強い阻害作用を示した。他の DPP アイソザイムに対する阻害作用についても検討を行ったが、DPP-8 や DPP-9 に対する K_i 値で比較した場合には、それぞれ約 391 倍、約 75 倍の阻害選択性を示し、サキサグリ

プチンは DPP-4 に対して選択的に阻害作用を示すと考えられた。カニクイザルの DPP アイソザイムを用いた場合でも、サキサグリブチンは他の DPP-4 阻害薬よりも 6 倍以上強い阻害作用を示した。DPP-4 の基質として生理的な基質を用いた場合でも、サキサグリブチンは人工基質を用いた場合と同様に阻害作用を示し、検討した他の DPP-4 阻害薬でもほぼ一貫した結果が得られた。酵素反応速度論的解析においては、サキサグリブチンの DPP-4 酵素に対する解離速度定数は他の DPP-4 阻害薬と比べて小さい値を示したことから、DPP-4 に結合したサキサグリブチンの解離速度は遅く、サキサグリブチンの DPP-4 阻害作用は他の DPP-4 阻害薬よりも比較的長時間持続する可能性が考えられた。ヒト、ラット、カニクイザル、アカゲザルの血漿中に含まれる DPP-4 活性に対してもサキサグリブチンは強い阻害作用を示し、それぞれの IC₅₀ 値は 15, 6, 9, 9 nmol/L であった。ヒト及びラット血漿ではあらかじめ血漿とサキサグリブチンを共存させた場合により強い阻害作用を示した。これらの結果から、サキサグリブチンは *in vitro* において DPP-4 に対して選択的かつ強力な阻害作用を示し、検討した動物種の血漿中に含まれる DPP 活性に対しても一貫して阻害作用を示すことが分かった。

2.6.2.2.2 経口投与後の血漿中 DPP 活性に対する阻害作用

経口投与後に血漿中に含まれる DPP-4 酵素活性に対してサキサグリブチンが阻害作用を示すかどうか、複数の動物種を用いて *ex vivo* での検討を行った。

2.6.2.2.2.1 ラットへの経口投与後の血漿中 DPP-4 阻害作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 019417)

目的：サキサグリブチンの経口投与後に血漿中 DPP-4 活性が阻害されるかどうかを確認するため、正常ラットにサキサグリブチンを経口投与し、経時的に採血して血漿中に含まれる DPP-4 活性の測定を行った。

方法：絶食した SD 系ラット（雄）を用い、サキサグリブチンを 0.04, 0.1, 0.4, 1, 4 $\mu\text{mol/kg}$ (0.01, 0.03, 0.13, 0.32, 1.26 mg/kg) の用量で単回経口投与した（各時点、各用量ごとに 4 例ずつ）。経口投与 0.5, 2, 4, 6 時間後に採血を行い、血漿中に含まれる DPP-4 活性の測定を行った。コントロール群には薬剤の代わりに水を経口投与した^{報告書番号 019417}。

成績：サキサグリブチンは投与する用量に応じて血漿中 DPP-4 活性を阻害し、4 $\mu\text{mol/kg}$ (1.26 mg/kg) の投与では、投与から 0.5～4 時間経過した後で最大 80～85%程度の阻害作用が認められた（図 2.6.2-3）。また、サキサグリブチンを 1 $\mu\text{mol/kg}$ (0.32 mg/kg) 以上の用量で投与した場合には、投与 6 時間後においても 60%以上の阻害作用が認められた。投与後の経過時間ごとの ED₅₀ 値は、投与 0.5, 2, 4, 6 時間後でそれぞれ 0.12, 0.2, 0.3, 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ (0.04, 0.06, 0.09, 0.16 mg/kg) と推定された。

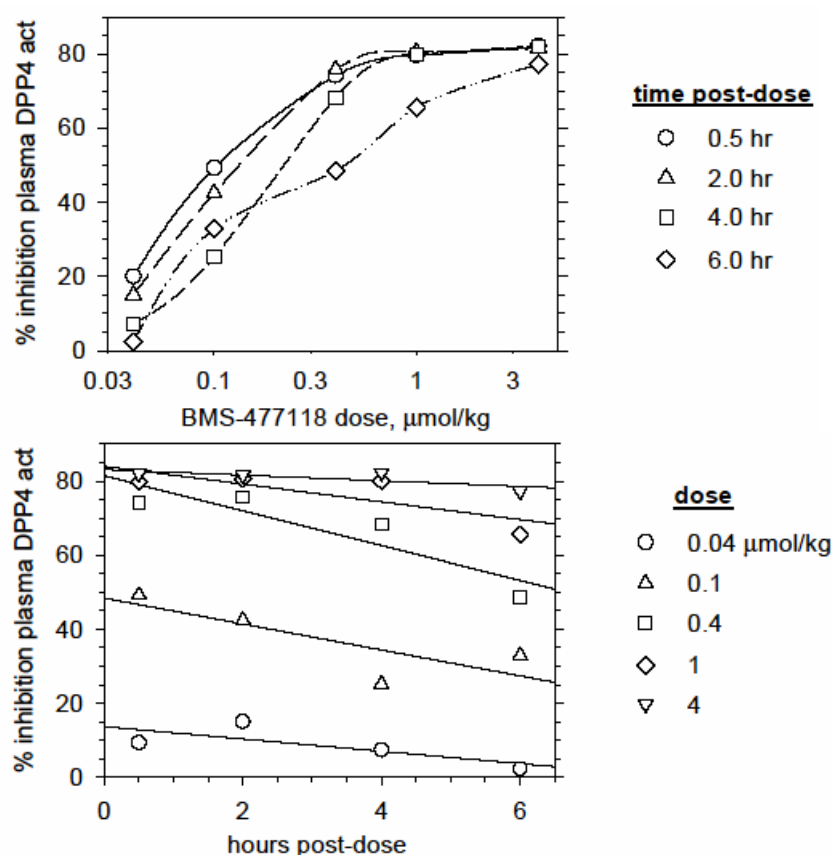


図 2.6.2-3 ラット血漿中に含まれる DPP-4 活性に対するサキサグリプチンの阻害作用（用量及び投与後経過時間による変化）

絶食した SD 系ラットを用い、図中に示した各用量のサキサグリプチン（BMS-477118）を経口投与した（各時点、各用量ごとに 4 例ずつ）。図中に示した時間経過後に採血を行い、*ex vivo* で血漿中の DPP-4 活性測定を行った。コントロール群（薬剤の代わりに水を経口投与）に対する阻害率の平均値を縦軸にとり、%で表示した。上の図は各用量における血漿中 DPP-4 活性に対するサキサグリプチンの阻害作用を投与後の経過時間ごとに示し、下の図は各用量投与後の各経過時間での血漿中 DPP-4 活性に対するサキサグリプチンの阻害作用を用量ごとに示している。

<資料番号 4.2.1.1-03 : Figure 13 より抜粋>

2.6.2.2.2.2 イヌへの経口投与後の血漿中 DPP-4 阻害作用

（概要表 2.6.3.3，報告書番号 019514）

目的：サキサグリプチン経口投与後の血中濃度と DPP-4 活性阻害との関連性を調べるため、正常イヌにサキサグリプチンを経口投与し、経時的に採血して血漿中に含まれる DPP-4 活性の測定を *ex vivo* で行った。

方法：一晩（10 時間）絶食したイヌ（雄）を用い、0.01, 0.05, 0.2 mg/kg の用量でサキサグリプチンを単回経口投与した（各用量ごとに 2 例ずつ）。投与前及び経口投与 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 24 時間後に頸静脈よりヘパリン採血（1 mL）を行った。なお、投与 4 時間後に給餌を行った。採取した血液は遠心分離後血漿を採取し、活性測定まで -20℃ にて保存した。DPP-4 活性測定は、保存しておいた血漿を 37℃ に加温し、ala-pro-AFC を酵素基質として添加し、蛍光強度の変化を指標として行った。サキサグリプチンの血中濃度測定は、血漿（25 μL）に 2 倍量の

メタノール（0.1%のギ酸及び0.5 µg/mLの類縁物質F*（内部標準物質）を含む）を添加し、沈降したタンパク質を遠心分離後、10 µLの上清をLC/MS/MSにて分析を行った^{報告書番号 019514}。

成績：サキサグリプチン経口投与後の血漿中濃度と、その際の血漿中DPP-4阻害作用を用量ごとにまとめた（表 2.6.2-8）。また、血漿中濃度及びDPP-4阻害作用について、投与後の経時的推移を示した（図 2.6.2-4 及び図 2.6.2-5）。サキサグリプチンをイヌに単回経口投与した場合には速やかな血中移行性が認められ、その後時間経過と共に徐々に減少した。これに伴い、血漿中DPP-4活性に対しては、経口投与後の早い時間から最大で95%、最小用量でも85%以上のDPP-4阻害作用が認められた。血漿中DPP-4に対する阻害作用は、0.01 mg/kg投与時でも投与後4時間まで60%以上、0.2 mg/kg投与時には投与後8時間までほぼ90%程度の阻害作用が認められた。

表 2.6.2-8 イヌ経口投与後のサキサグリプチン血漿中濃度及び血漿中DPP-4阻害率

投与後経過 時間（時間）	0.01 mg/kg		0.05 mg/kg		0.2 mg/kg	
	血漿中濃度 (ng/mL)	DPP-4 阻害 率 (%)	血漿中濃度 (ng/mL)	DPP-4 阻害 率 (%)	血漿中濃度 (ng/mL)	DPP-4 阻害 率 (%)
0.25	4.9	88.0	9.2	82.0	152.0	95.0
0.5	3.8	86.0	22.5	95.0	131.0	95.5
0.75	3.2	85.5	22.5	94.5	127.5	95.0
1	2.4	83.0	20.0	94.0	107.0	95.0
2	1.6	76.5	13.5	93.0	75.0	95.0
4	1.1	60.0	5.7	91.5	31.0	94.5
6	0.8	38.0	3.1	85.5	14.0	93.0
8	0.5	31.5	1.7	69.0	5.6	89.5
24	0.1	-2.0	0.2	14.0	0.8	49.5

表中の数値はそれぞれ2例の平均値を示す。血漿中濃度の測定限界は1 ng/mL。

<資料番号 4.2.2.2-01：APPENDIX Fより作成>

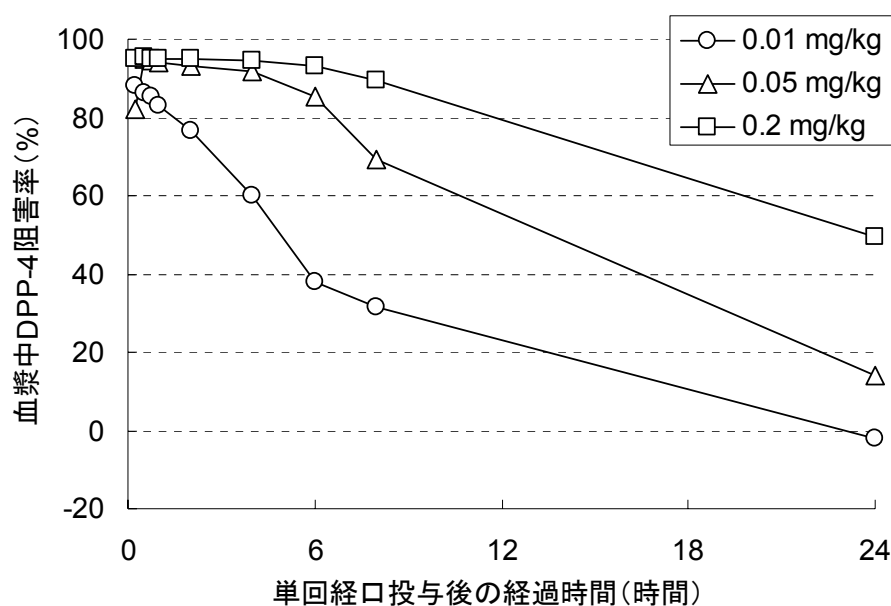


図 2.6.2-4 サキサグリプチン単回投与後のイヌ血漿中DPP-4阻害率の経時的変化

<資料番号 4.2.2.2-01 : APPENDIX F より作成>

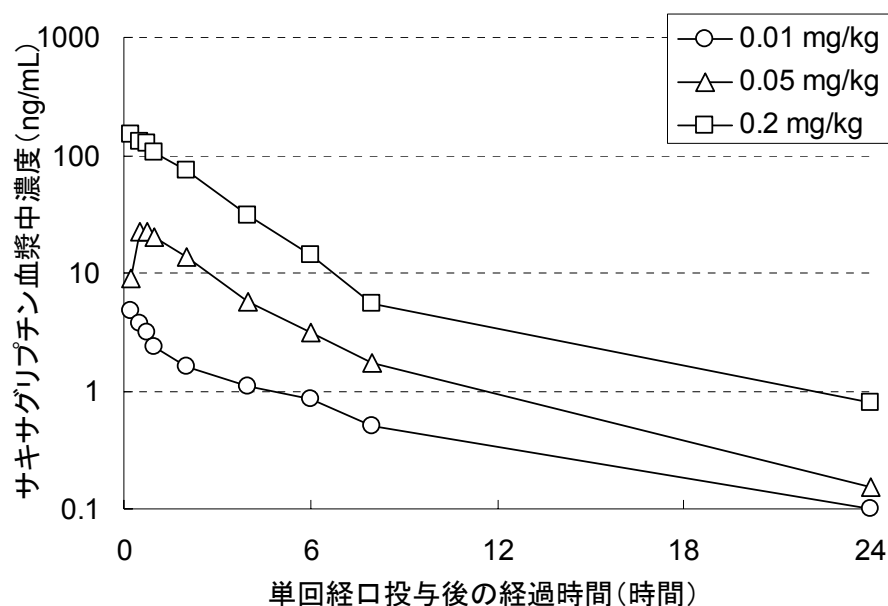


図 2.6.2-5 サキサグリブチン単回投与後のイヌ血漿中濃度の経時的変化

横軸は単回経口投与後の経過時間を，縦軸はサキサグリブチンの血漿中濃度を対数目盛で示した。血漿中濃度の測定限界は 1 ng/mL。

<資料番号 4.2.2.2-01 : APPENDIX F より作成>

これらの結果に基づき，イヌへのサキサグリブチン経口投与後の血漿中濃度（横軸）と，同じサンプルでの DPP-4 阻害作用（縦軸）の相関を示した（図 2.6.2-6）。サキサグリブチンの血中濃度が約 5 ng/mL までの範囲においては，サキサグリブチンの血漿中濃度の上昇に応じて血漿中の DPP-4 に対する阻害作用の増大が認められ，これ以上の血漿中濃度では 80%以上の阻害作用を示した。イヌ血漿中 DPP-4 活性に対して 50%の阻害作用を示すサキサグリブチンの血中濃度 (IC₅₀) は約 4 ng/mL と推定された。

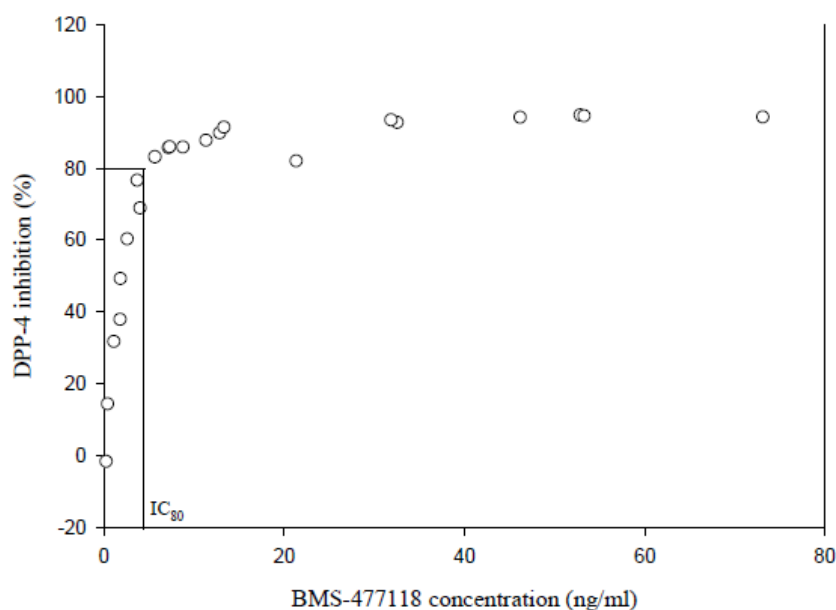


図 2.6.2-6 イヌ経口投与後のサキサグリブチン血中濃度と血漿中に含まれる DPP-4 活性阻害作用との関連性

絶食したイヌを用い、0.01, 0.05, 0.2 mg/kg の用量でサキサグリブチンを経口投与した（各用量ごとに 2 例ずつ）。投与前及び経口投与 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 24 時間後に頸静脈よりヘパリン採血（1 mL）を行った。横軸にサキサグリブチン（BMS-477118）の血中濃度（ng/mL），縦軸に同じサンプルでの血漿中 DPP 活性に対する阻害作用（投与前の血漿に含まれる DPP 活性に対する阻害率）を％で表示し、各用量時点の結果をグラフ上にプロットした。

<資料番号 4.2.2.2-01 : Figure 8>

2.6.2.2.2.3 結論

サキサグリブチンを経口投与した際には、検討した複数の動物種（ラット、イヌ）の血漿中 DPP-4 活性に対して *ex vivo* で阻害作用を示すことが確認された。ラットにおいては、4 $\mu\text{mol/kg}$ （1.26 mg/kg）の投与で、投与後 4 時間経過した後でも 80%以上の阻害作用が認められた。投与後の経過時間ごとの ED_{50} 値は、投与 0.5, 2, 4, 6 時間後でそれぞれ 0.12, 0.2, 0.3, 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ （0.04, 0.06, 0.09, 0.16 mg/kg）と推定された。イヌを用いた DPP-4 阻害作用と血中濃度との関連性検討においては、血中濃度が約 5 ng/mL を超えない範囲で血漿中 DPP-4 活性に対する阻害作用と血中濃度との間に関連性がみられ、血中濃度の上昇に応じた阻害作用の増大がみられた。50%の DPP-4 活性を阻害するサキサグリブチンの血中濃度は約 4 ng/mL と推定された。これらの結果から、検討した動物種においてサキサグリブチンは経口投与により血漿中に含まれる DPP-4 に対して阻害作用を有することが *ex vivo* で確認された。

2.6.2.2.3 活性型 GLP-1 濃度上昇に対する増強作用

（概要表 2.6.3.2, 報告書番号 019417, 019421）

目的：DPP-4 阻害作用を有するサキサグリブチンが、*in vivo* において血漿中の活性型 GLP-1 濃度を上昇させる作用を有するかどうかを評価するため、正常ラットを用い、OGTT 後にみられる血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇に対するサキサグリブチンの増強作用について検討を行った。また同時に、血漿中 DPP-4 活性に対する阻害作用との関連性についても検討を行った。

方法：SD 系ラット（雄；各群 6～8 例）を一晩絶食後、サキサグリブチン（0.03～10 $\mu\text{mol/kg}$ ；0.01～3.15 mg/kg）及び水（コントロール群）を単回経口投与し、投与 0.5 及び 4 時間後に OGTT を実施した。グルコース投与 10 分後に採血を行い、血漿中 DPP-4 活性の測定を行った。また、酵素免疫測定法 (ELISA) を用いて、同じ血漿中の活性型 GLP-1 濃度の測定を実施した^{報告書番号 019421}。

成績：サキサグリブチンは投与する用量に応じて血漿中 DPP-4 活性を抑制し、0.3 $\mu\text{mol/kg}$ (0.09 mg/kg) 以上の用量で *ex vivo* での DPP-4 活性はコントロール群と比べて 60%以上阻害されることが示された (図 2.6.2-7)。この抑制作用は投与 0.5 時間後と 4 時間後ではほとんど変わらなかった。

血漿中 DPP-4 活性の阻害が認められる同じ用量範囲 (0.3～10 $\mu\text{mol/kg}$ ；0.09～3.15 mg/kg) で、サキサグリブチンは OGTT 後の血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇を増強する作用を示した。血漿中活性型 GLP-1 濃度は、サキサグリブチン投与 0.5 時間後及び 4 時間後でコントロール群の 470%及び 360% (いずれも最大値) に増大した。用量反応曲線から算出された最大作用の 50%を示す用量 (ED_{50} 値) は、投与 0.5 時間後では 0.5 $\mu\text{mol/kg}$ (0.16 mg/kg)、投与 4 時間後では 1.5 $\mu\text{mol/kg}$ (0.47 mg/kg) であった^{報告書番号 019417}。

結論：血漿中 DPP-4 活性に対する阻害作用が明確にみられる用量と同じ用量範囲で、OGTT 時の活性型 GLP-1 濃度上昇を増強したことから、サキサグリブチンは DPP-4 阻害作用を介して血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇を増強する作用を示し、またこの作用はラットにおいて投与 0.5 時間後だけでなく、投与 4 時間後においても持続していることが示された。

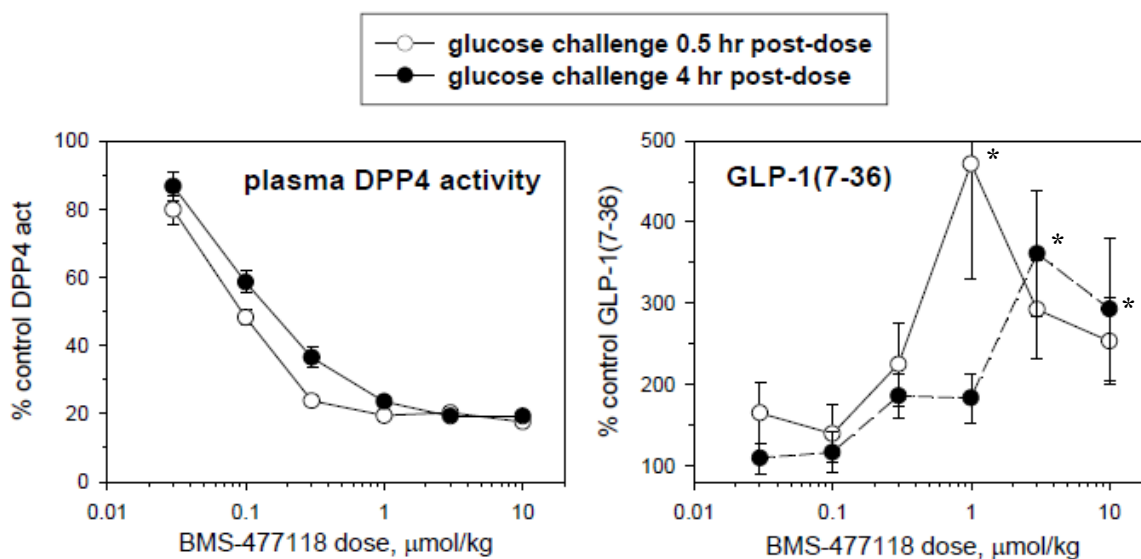


図 2.6.2-7 OGTT 時の血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇に対するサキサグリブチンの増強作用及び DPP-4 阻害活性との関連性 (SD 系ラット)

SD 系ラットを 18 時間絶食した後、各用量のサキサグリブチン (BMS-477118) 及び水 (コントロール群) を投与し (各群 6～8 例)、0.5 時間及び 4 時間経過後、グルコースを 1 g/kg の用量で経口投与して OGTT を行った。グルコース投与 10 分後に採血を行い、血漿中 DPP-4 活性の測定、及び血漿中活性型 GLP-1 (GLP-1(7-36)) 濃度の測定を行った。図左はコントロール群での数値を 100%とした場合の *ex vivo* における血漿中 DPP-4 活性を%で示し、また図右はコントロール群での数値を 100%とした場合の血漿中活性型 GLP-1 濃度を%で示した。横軸はどちらもサキサグリブチンの用量 ($\mu\text{mol/kg}$) を示す。値は平均値 \pm 標準誤差で示した。*: p<0.01 (p 値はコントロール群との比較で Dunnett 検定の結果を示した)

<資料番号 4.2.1.1-05：7 ページより抜粋。BMS 社より得られた情報に基づき修正>

2.6.2.2.4 病態モデルにおける血糖値低下作用

耐糖能異常を示す Zucker fa/fa ラットを用いてサキサグリプチンの単回投与による血糖低下作用及びインスリン分泌促進作用について評価した。また 2 型糖尿病モデル動物である ZDF ラットを用いて、サキサグリプチンの反復投与による血糖値低下作用について評価した。更には、正常マウスに高脂肪食を摂取させかつストレプトゾトシンを投与した病態モデルを用いて、サキサグリプチンの反復投与による血糖値、HbA1c 及び β 細胞量に対する効果を評価した。

2.6.2.2.4.1 Zucker fa/fa ラットにおける OGTT 時の血糖値上昇に対する抑制作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 019418)

目的：インスリン抵抗性及び耐糖能異常を呈する Zucker fa/fa ラットを用いて、サキサグリプチン単回投与後の OGTT による血糖値上昇及びインスリン分泌に対する作用を検討した。

方法：Zucker fa/fa ラット (雄 16~24 週齢；各群 8 例) を 18 時間絶食した後、サキサグリプチン ($0.3 \sim 3 \mu\text{mol/kg}$; $0.09 \sim 0.95 \text{ mg/kg}$) 及び水 (コントロール群) を単回経口投与し、4 時間後に OGTT を実施した。その後経時的に採血を行い、血糖値の測定を行った。血糖値に対する作用と血中インスリン濃度の関連性についての試験では、Zucker fa/fa ラット (雄 16~24 週齢；各群 5 例) にサキサグリプチンを $3 \mu\text{mol/kg}$ (0.95 mg/kg) の用量で単回経口投与し、0.5 時間及び 4 時間後に OGTT を実施した。経時的に採血を行い、血糖値と血中インスリン濃度の測定を行った^{報告書番号 019418}。

成績：サキサグリプチンは投与する用量に応じて OGTT 時の血糖値上昇に対して抑制作用を示した (図 2.6.2-8)。血糖値推移下面積で比較した場合には、 $0.3, 1, 3 \mu\text{mol/kg}$ ($0.09, 0.32, 0.95 \text{ mg/kg}$) のサキサグリプチンの投与でそれぞれコントロール群と比べて 23%, 43%, 47%抑制する作用が認められた。また、この用量範囲は正常ラットでの OGTT 時の血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇に対して増強作用がみられる用量と一致していた^{報告書番号 019421}。

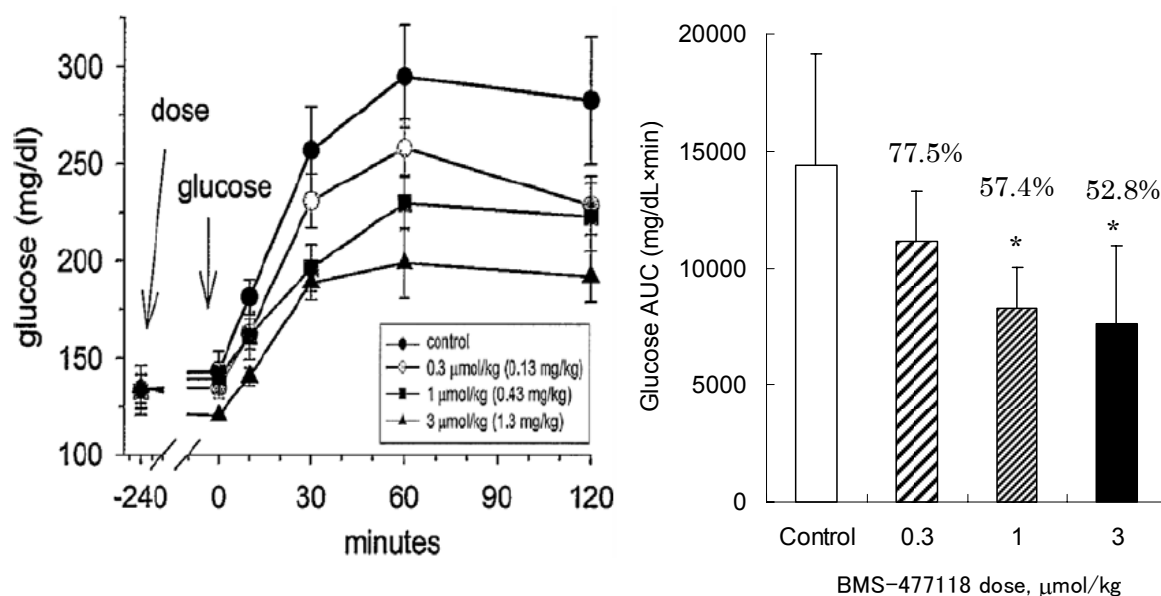


図 2.6.2-8 OGTT 時の血糖値上昇に対するサキサグリプチンの抑制作用 (Zucker fa/fa ラット)

Zucker fa/fa ラットは 18 時間絶食した後、各用量のサキサグリプチン (BMS-477118) 及び水 (コントロール群) を投与した (各群 8 例)。4 時間後にグルコースを 1 g/kg の用量で経口投与し、左図の横軸に示された時間で経時的に採血を行い、血糖値の測定を行った。左図には OGTT 後の時間経過に伴う血糖値の推移、右図には左図のサキサグリプチンの各投与用量での血糖値推移下面積 (AUC; mg/dL×min; 平均値±標準偏差) を示した。右図上の数値は、コントロール群を 100%とした場合の各用量での AUC を%で示した。*: p<0.01 (p 値はコントロール群との比較で Dunnett 検定の結果を示した)

<資料番号 4.2.1.1-06 : Figure 2 を BMS 社より得られた情報に基づき修正>

また、サキサグリプチン (3 µmol/kg ; 0.95 mg/kg) は OGTT 時の血中インスリン濃度上昇に対して増強作用を示し、同時に血糖値の上昇に対して抑制作用を示した (図 2.6.2-9)。この作用は投与 0.5 時間後だけでなく、投与 4 時間後においても認められた。

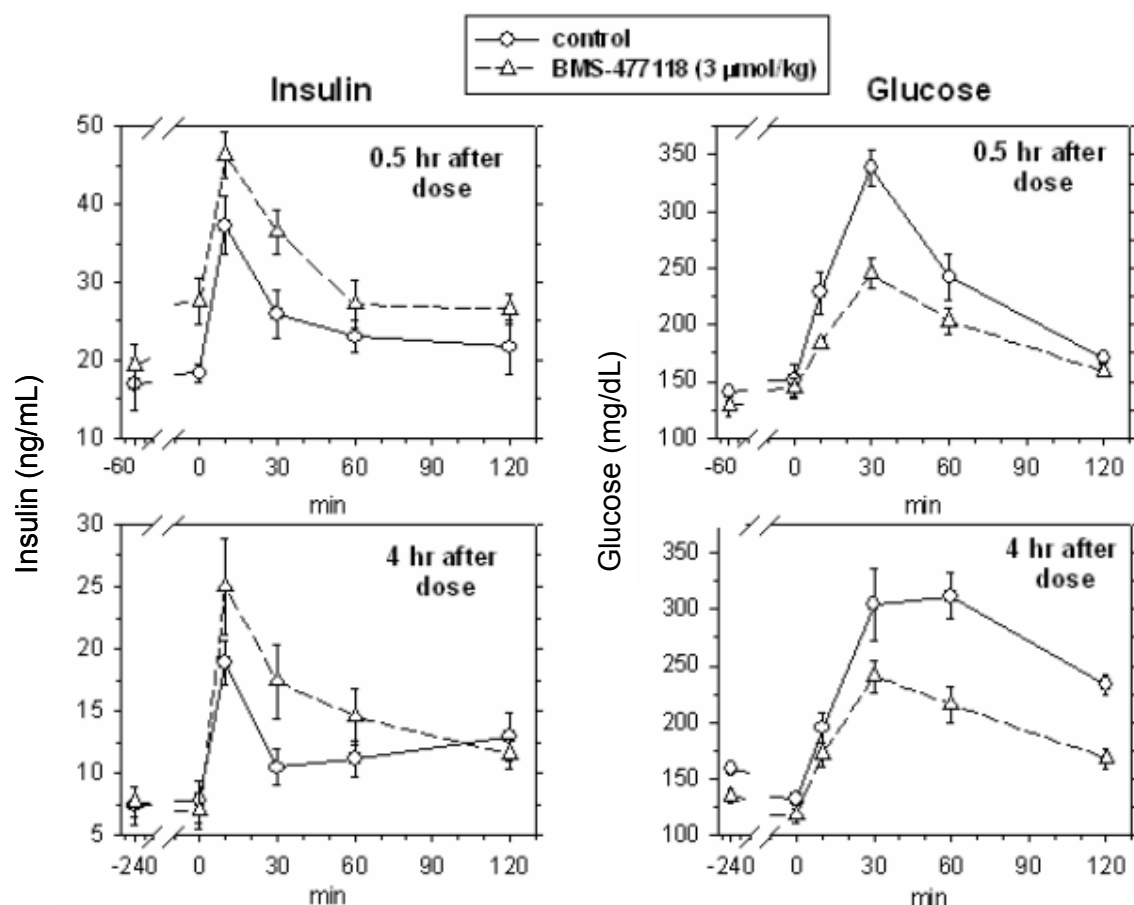


図 2.6.2-9 サキサグリプチンの血糖値上昇抑制作用及びインスリン分泌増強作用 (Zucker fa/fa ラット)

Zucker fa/fa ラットは 18 時間絶食した後、サキサグリプチン (BMS-477118) 3 µmol/kg (0.95 mg/kg) 及び水 (コントロール群) を投与した (各群 5 例)。0.5 及び 4 時間後にグルコースを 1 g/kg の用量で経口投与し OGTT を行った。図に示された時間で経時的に採血を行い、各時点での血糖値及び血漿中インスリン濃度の測定を行った。左側の図には血漿中インスリン濃度の測定結果、右側の図には血糖値の推移を示した。また、上段はサキサグリプチン投与 0.5 時間後、下段は投与 4 時間後の結果を示す。左図の縦軸は血漿中インスリン濃度 (ng/mL) 右図の縦軸は血糖値 (mg/dL) を示す (いずれも平均値±標準偏差)。○: コントロール群, △: サキサグリプチン投与群

<資料番号 4.2.1.1-06 : Figure 4>

2.6.2.2.4.2 Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットでの空腹時血糖値上昇抑制作用及び OGTT 時の血糖上昇に対する抑制作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 019418)

目的: 2 型糖尿病モデル動物におけるサキサグリブチンの反復投与による血糖低下作用を評価するため, 高血糖状態が進展する病態モデルである ZDF (Zucker diabetic fatty) ラットを用いて, 空腹時血糖値及び OGTT 時の血糖値上昇に対する作用を検討した。

方法: ZDF ラット (雄; 16 週齢) を用い, サキサグリブチン ($10 \mu\text{mol/kg}$; 3.15 mg/kg) 及び水 (コントロール群) を 1 日 1 回反復経口投与した (各群 8 例)。空腹時血糖値の検討では, サキサグリブチン投与 7 日前, 投与 1, 14, 28, 35 日目に空腹時血糖値の測定を行った。OGTT 時の血糖値上昇に対する作用の検討では, 投与 1 日目及び 35 日目にサキサグリブチン及び水を投与後 0.5 時間で OGTT (グルコースの用量: 1 g/kg) を行い, その後経時的に血糖値の測定を行った^{報告書番号 019418}。

成績: サキサグリブチンを 1 日 1 回 35 日間反復投与したところ, ZDF ラットの空腹時血糖値に対して投与 14 日目で約 17%の低下作用を示した (図 2.6.2-10)。

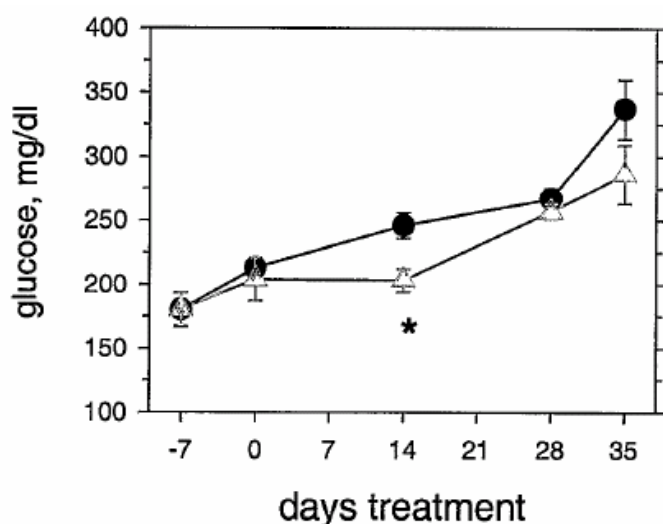


図 2.6.2-10 空腹時血糖値に対するサキサグリブチンの低下作用 (ZDF ラット)

ZDF ラット (16 週齢) を用い, サキサグリブチン ($10 \mu\text{mol/kg}$; 3.15 mg/kg) 及び水 (コントロール群) を 1 日 1 回反復経口投与した (各群 8 例)。サキサグリブチン投与 7 日前, 投与 1, 14, 28, 35 日目に空腹時血糖値の測定を行った (平均値 \pm 標準誤差)。●: コントロール群, △: サキサグリブチン投与群。*: $p < 0.01$ (p 値はコントロール群との比較で t 検定の結果を示した)

<資料番号 4.2.1.1-06 : Figure 5>

更に, サキサグリブチン投与 1 日目及び 35 日目において OGTT を実施し, 血糖値上昇に対するサキサグリブチンの作用を検討した。サキサグリブチンは投与 1 日目において OGTT 時の血糖値上昇に対して抑制作用を示した (図 2.6.2-11)。投与 35 日目では ZDF ラットの高血糖状態は進展していたが, この時点においてもサキサグリブチン投与で OGTT 時の血糖値上昇に対して抑制する作用が認められた。

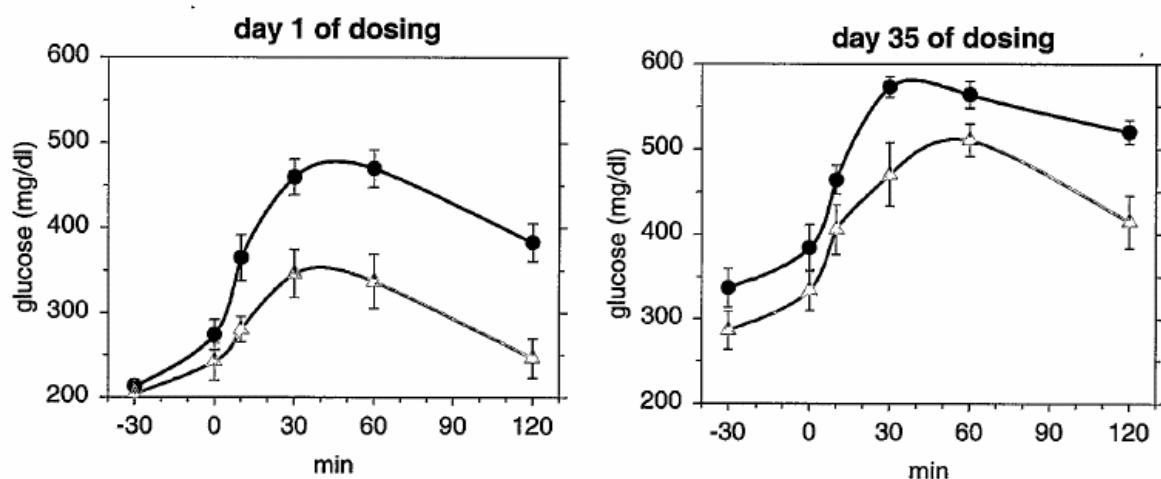


図 2.6.2-11 OGTT 時の血糖値上昇に対するサキサグリプチンの抑制作用(ZDF ラット)

ZDF ラット (16 週齢) を用い、サキサグリプチン (10 $\mu\text{mol/kg}$; 3.15 mg/kg) 及び水 (コントロール群) を 1 日 1 回経口投与した (各群 8 例)。投与 1 日目 (左図) 及び投与 35 日目 (右図) にサキサグリプチン及び水を経口投与して 0.5 時間後にグルコース経口投与 (1 g/kg) を行い、その後横軸に示した時間で経時的に血糖値の測定を行った (平均値 \pm 標準誤差)。●: コントロール群, △: サキサグリプチン投与群。

<資料番号 4.2.1.1-06 : Figure 6 より抜粋>

2.6.2.2.4.3 ストレプトゾトシン (STZ) 投与マウスでの血糖値, HbA1c, β 細胞量に対する作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 027474)

目的: 糖尿病モデル動物におけるサキサグリプチンの反復投与による血糖コントロールに対する効果及び β 細胞量に対する効果を評価するため、高脂肪食を摂取させた正常マウスにストレプトゾトシン (STZ) を投与した糖尿病モデル動物を用いて、血糖値, HbA1c, β 細胞量に対する作用を検討し、シタグリプチンとの比較を行った。

方法: C57BL/6J マウス (雄; 4~6 週齢) を 60%高脂肪食で 2 週間飼育後、体重、血糖値、インスリン値、HbA1c を指標として群分けを行い、その後 STZ (50 mg/kg) を連続 3 日間 (Day 8~10) 腹腔内投与した (各群例数 12)。STZ 投与 1 週間前 (Day 1), もしくは STZ 投与 1 日後 (Day 11) から Vehicle (水), サキサグリプチン (10 mg/kg/day), シタグリプチン (10 mg/kg/day) の経口投与を開始し、試験終了まで継続して 1 日 1 回の反復投与を行った。Day 22 に 4 時間絶食後採血し、血糖値の測定を行った。STZ 投与 3 週間後 (Day 31~32) に 16 時間絶食後 OGTT (2 g/kg グルコース経口投与) を行い、血糖値上昇に対する作用を検討した。OGTT 後は摂餌を再開させ、薬剤の投与も Day 45 まで継続した。STZ 投与 36 日後 (Day 46) に採血し、空腹時血糖値 (16 時間絶食後) の測定を行った。Day 46 に採取した膵臓は重量を測定した後 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋した組織切片 (4 μm 厚) を作成して抗インスリン抗体を用いた染色を行った。自動画像解析装置 () で β 細胞量に関する評価を行った^{報告書番号 027474}。試験方法の概略を図にまとめた (図 2.6.2-12)。

	Run-in period	Day1	Day6	Day8-10	Day11	Day22	Day31-32	Day45	Day46
Vehicle投与群	1), 2), 3), 4)		5)	クエン酸緩衝液 腹腔内投与		血糖値測定	OGTT	6)	7), 8)
	●-----		Vehicle投与					→	
STZ投与群	1), 2), 3), 4)		5)	STZ 50 mg/kg 腹腔内投与		血糖値測定	OGTT	6)	7), 8)
	●-----		Vehicle投与					→	
STZ+シタグリブチン 投与群 (Day11より開始)	1), 2), 3), 4)		5)	STZ 50 mg/kg 腹腔内投与	投与開始	血糖値測定	OGTT	6)	7), 8)
	●-----		Vehicle投与		●-----	シタグリブチン 10 mg/kg/day投与		→	
STZ+サキサグリブチン 投与群 (Day11より開始)	1), 2), 3), 4)		5)	STZ 50 mg/kg 腹腔内投与	投与開始	血糖値測定	OGTT	6)	7), 8)
	●-----		Vehicle投与		●-----	サキサグリブチン 10 mg/kg/day投与		→	
STZ+シタグリブチン 投与群 (Day 1より開始)	1), 2), 3), 4)	投与開始		STZ 50 mg/kg 腹腔内投与		血糖値測定	OGTT	6)	7), 8)
	●-----	●-----	Vehicle投与	シタグリブチン 10 mg/kg/day投与				→	
STZ+サキサグリブチン 投与群 (Day1より開始)	1), 2), 3), 4)	投与開始		STZ 50 mg/kg 腹腔内投与		血糖値測定	OGTT	6)	7), 8)
	●-----	●-----	Vehicle投与	サキサグリブチン 10 mg/kg/day投与				→	

図 2.6.2-12 STZ 投与マウスを用いた試験の概略

STZ 投与マウスを用いた試験の概略を示した。図中の 1) ～8) はそれぞれ下記に示した実験操作を行ったことを示す。

- 1) Run-in period は薬剤投与開始 1 週間前より薬剤投与開始前日までの期間を設定した。Run-in period の 1 週間前から 60%高脂肪食での飼育を行い、試験終了まで継続した。
- 2) 全ての個体に Vehicle (水) を投与した。
- 3) 採血を行い、血糖値、インスリン値、HbA1c を測定した。
- 4) 体重を測定し、12 個体ずつ 6 群に群分けを行った。
- 5) Vehicle 群, STZ 投与群, STZ+シタグリブチン投与群 (Day 11 より開始), STZ+サキサグリブチン投与群 (Day11 より開始) は Day6 で再度体重を測定し、12 個体ずつ 4 群に群分けを行った。
- 6) Day45 では薬剤の最終投与を行った。その後 Day 46 にかけて 16 時間の絶食を行った。
- 7) Day45 の最終投与から 24 時間経過した時点で採血を行い、血糖値、インスリン値、HbA1c を測定した。
- 8) 各個体より臓臓を摘出し、ホルマリン固定を行った。

<資料番号 4.2.1.1-07 : Section3 (MATERIALS AND METHODS) より作成>

成績: 各薬剤の血糖値、インスリン、HbA1c に対する作用を検討した結果を示した (表 2.6.2-9)。Vehicle 群と比較した場合には、STZ 投与により Day 22 の血糖値及び Day 46 の空腹時血糖値は有意に上昇し、Day 46 の HbA1c は Vehicle 群で $5.24 \pm 0.09\%$ (平均値 \pm 標準誤差; このセクション内は全て同じ) であったのに対し、STZ 投与群は $6.80 \pm 0.19\%$ であり、有意な上昇が認められた。また、Day 46 の血漿中インスリン濃度では有意な低下が認められた。シタグリブチンを投与した場合には、Day 22 の血糖値、Day 46 の空腹時血糖値及びインスリンレベルにはどの時点でも STZ 投与群と比較して変化は認められなかったが、STZ 投与前から投与を開始した場合には HbA1c の低下 ($6.16 \pm 0.17\%$) が認められた。サキサグリブチンを投与した場合には、STZ 投与前から投与を開始した場合にはいずれの指標においても有意な変化は認められなかったが、STZ 投与後から

投与を開始した場合には、Day 22 の血糖値、Day 46 の空腹時血糖値及び HbA1c ($6.10 \pm 0.15\%$) の有意な低下が認められた。

表 2.6.2-9 各薬剤の血糖値、血漿中インスリン濃度、HbA1c に対する作用

群	Day 22 の血糖値 (mmol/L)	Day 46 の空腹時 血糖値 (mmol/L)	Day 46 のイン スリン (ng/mL)	Day 46 の HbA1c (%)
Vehicle 群	$13.70 \pm 0.54^{***}$	$11.13 \pm 0.39^{***}$	$1.48 \pm 0.27^{***}$	$5.24 \pm 0.09^{***}$
STZ 投与群	25.37 ± 1.17	17.92 ± 1.28	0.57 ± 0.07	6.80 ± 0.19
STZ+シタグリブチン投 与群 (Day 1 より開始)	24.14 ± 1.24	16.12 ± 0.72	0.64 ± 0.11	$6.16 \pm 0.17^*$
STZ+サキサグリブチン 投与群 (Day 1 より開始)	23.69 ± 1.53	17.62 ± 1.16	0.69 ± 0.08	6.45 ± 0.17
STZ+シタグリブチン投 与群 (Day 11 より開始)	23.75 ± 1.40	15.59 ± 1.17	0.44 ± 0.06	6.33 ± 0.20
STZ+サキサグリブチン 投与群 (Day 11 より開始)	$19.36 \pm 1.05^{***}$	$14.39 \pm 1.02^*$	0.62 ± 0.11	$6.10 \pm 0.15^{**}$

Day 22 に 4 時間絶食を行った後採血し、血糖値の測定を行った。また、Day 45 から 16 時間の絶食を行い、Day 46 に採血を行って空腹時血糖値、血漿中インスリン、HbA1c の測定を行った（各群 12 例）。結果は平均値±標準誤差で示した。（* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs STZ 処置群；共変量として、Day 1 の体重、bleeding order, Day -4 (Run-in period) の血糖値、インスリン値、HbA1c を要因として、薬剤治療群を用いた一般線形モデルの下で群間比較は multiple t-test（両側）により行った。）

<資料番号 4.2.1.1-07 : 42 ページ Table 2 より抜粋>

OGTT 時に測定した血糖値及び血漿中インスリン濃度の推移下面積（グルコース AUC 及びインスリン AUC）を計算した結果を示した（表 2.6.2-10）。Vehicle 群と比較した場合には、STZ 投与に伴ってグルコース AUC の顕著な増大が認められ、またインスリン AUC は有意に低下した。シタグリブチンを投与した場合には、STZ 投与前から投与を開始した場合にのみグルコース AUC の有意な低下が認められたが、この時インスリン AUC の有意な改善は認められなかった。サキサグリブチンを投与した場合には、投与開始の時期に関わらず有意なグルコース AUC の低下が認められたが、いずれの場合でもインスリン AUC の有意な改善は認められなかった。

表 2.6.2-10 グルコース AUC 及びインスリン AUC に対する作用

群	グルコース AUC _{0-120 min} (mmol/L・min)	インスリン AUC _{0-120 min} (ng/mL・min)
Vehicle 群	$34.29 \pm 1.33^{***}$	$4.89 \pm 0.43^{***}$
STZ 投与群	73.35 ± 2.11	1.69 ± 0.12
STZ+シタグリブチン投与群 (Day 1 より開始)	$63.70 \pm 2.26^*$	1.67 ± 0.12
STZ+サキサグリブチン投与群 (Day 1 より開始)	$65.65 \pm 3.25^*$	1.58 ± 0.09
STZ+シタグリブチン投与群 (Day 11 より開始)	66.75 ± 1.71	1.96 ± 0.31
STZ+サキサグリブチン投与群	$58.01 \pm 2.38^{***}$	1.63 ± 0.11

群	グルコース AUC _{0-120 min} (mmol/L・min)	インスリン AUC _{0-120 min} (ng/mL・min)
(Day 11 より開始)		
Day 31～32 にかけて 16 時間絶食後 OGTT (2 g/kg グルコース経口投与) を行い、グルコース投与 5, 15, 30, 60, 120 分後に採血を行い、血糖値と血漿中インスリン濃度の測定を行った。それぞれの時点の値をもとにグルコース投与後 120 分までの血糖値推移下面積 (グルコース AUC _{0-120 min}) 及び血漿中インスリン濃度推移下面積 (インスリン AUC _{0-120 min}) を算出した。結果は平均値±標準誤差で示した。(*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs STZ 処置群; ロバスト回帰モデルの下で、群間比較は multiple t-test (両側) により行った。) <資料番号 4.2.1.1-07: 90 ページ Appendix DD 及び Appendix FF より抜粋>		

また、この病態モデルにおける β 細胞量の評価を行った結果を示した (表 2.6.2-11)。 β 細胞量に関しては、Vehicle 群で 0.91 ± 0.13 mg であったのに対し、STZ 投与群で 0.13 ± 0.03 mg へと有意な減少が認められた。シタグリブチン投与群では、STZ 投与前からの投与及び STZ 投与後からの投与でそれぞれ 0.16 ± 0.02 及び 0.42 ± 0.06 mg であり、STZ 投与後からシタグリブチン投与を開始した場合にのみ有意な β 細胞量の増加が認められた。これに対してサキサグリブチン投与群では、STZ 投与前からの投与及び STZ 投与後からの投与でそれぞれ 0.23 ± 0.03 及び 0.28 ± 0.05 mg となり、投与開始時期に依存せず、いずれの場合でも有意な β 細胞量の増加が認められた。

表 2.6.2-11 β 細胞量に対する作用

群	膵臓重量 (mg)	β 細胞量 (mg)	β 細胞面積 (膵臓組織の面積に対する%)
Vehicle 群	131 ± 11	$0.91 \pm 0.13^{***}$	$0.7 \pm 0.1^{***}$
STZ 投与群	111 ± 3	0.13 ± 0.03	0.1 ± 0.0
STZ+シタグリブチン投与群 (Day 1 より開始)	99 ± 7	0.16 ± 0.02	0.2 ± 0.0
STZ+サキサグリブチン投与群 (Day 1 より開始)	109 ± 5	$0.23 \pm 0.03^*$	$0.2 \pm 0.0^*$
STZ+シタグリブチン投与群 (Day 11 より開始)	111 ± 5	$0.42 \pm 0.06^{**}$	$0.4 \pm 0.1^{**}$
STZ+サキサグリブチン投与群 (Day 11 より開始)	114 ± 5	$0.28 \pm 0.05^*$	$0.3 \pm 0.1^*$
Day 46 で採取した膵臓は周囲組織を切除し、重量を測定した。膵臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液で 24 時間固定し、パラフィン包埋後組織切片 (4 μ m 厚) を作成した。抗インスリン抗体で染色を行い、自動画像解析装置で β 細胞量の測定を行った。抗インスリン抗体による染色強度 (insulin-staining intensity) 120 以上のエリアを β 細胞と見なし、膵臓組織の占める面積に対する β 細胞の面積の割合 (%) を算出した。この割合に膵臓の重量をかけることにより β 細胞量 (mg) を求めた。結果は平均値±標準誤差で示した。(*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs STZ 処置群; ロバスト回帰モデルの下で、群間比較は multiple t-test (両側) により行った。) <資料番号 4.2.1.1-07: 43 ページ Table 3 より抜粋>			

2.6.2.2.4.4 結論

サキサグリブチンはインスリン抵抗性及び耐糖能異常を呈する Zucker fa/fa ラットにおいて、単

回経口投与で OGTT 後の血糖値上昇に対して投与用量に応じた抑制作用を示し、同時に血糖値上昇を抑制する投与用量においてインスリン分泌を増強する作用を示した。また高血糖状態が進展する ZDF ラットにおいて、サキサグリブチンの反復投与により空腹時血糖値の上昇抑制作用及び OGTT 後の血糖値上昇に対する抑制作用が認められた。これらの結果から、サキサグリブチンは耐糖能異常あるいは高血糖が進展する糖尿病病態モデル動物において、OGTT 時のインスリン分泌上昇に対する増強を介して血糖値の上昇を抑制することが示唆された。また、正常マウスに高脂肪食を摂取させて STZ を投与した病態モデルにおいては、サキサグリブチンの反復投与によって血糖値の低下を伴った HbA1c の改善効果や STZ 投与によって低下した β 細胞量の部分的な回復が認められ、OGTT 時にはグルコース AUC を低下させて血糖コントロールを改善する作用が認められることが示された。

2.6.2.2.5 代謝物の薬理作用

BMS-510849 は動物やヒトにおけるサキサグリブチンの主要代謝物であり、サキサグリブチン投与時にはサキサグリブチンと同程度かそれ以上の濃度で血漿中に存在する。このことから、BMS-510849 はサキサグリブチンを投与した際の薬理作用に寄与する可能性が考えられる。そこで、BMS-510849 の DPP アイソザイムに対する *in vitro* での阻害作用を検討した。更に、*in vivo* での薬理作用を評価し、サキサグリブチンとの比較を行った。

2.6.2.2.5.1 BMS-510849 の DPP-4 阻害作用及び阻害選択性

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 021944)

目的：BMS-510849 の DPP アイソザイムに対する阻害作用及び阻害選択性を評価するため、ヒト DPP-4 (ヒト腎臓由来)、DPP-8、DPP-9 (COS-7 細胞での一過性発現によるヒト組換えタンパク) を用いて酵素阻害作用を検討し、サキサグリブチンの阻害作用と比較した。

方法：酵素基質としてジペプチド人工基質である gly-pro-pNA を用い、サキサグリブチン及び BMS-510849 を添加し、ヒト DPP-4、DPP-8、DPP-9 活性を測定した。37°C で酵素反応を行い、DPP 活性に伴って生成する pNA の量を 405 nm の吸光度で測定した。10 種類の異なる添加濃度で DPP 活性測定を行い、濃度阻害曲線から IC₅₀ 値を算出した。阻害定数 (K_i 値) は $K_i = IC_{50} / (1 + S/K_m)$ より求めた (S: 用いた基質濃度 K_m: 各酵素の人工基質に対する K_m 値) 報告書番号 021944。

成績：BMS-510849 のヒト DPP-4 に対する K_i 値は 2.6 ± 1.0 nmol/L であり、DPP-4 に対して強い阻害作用を示したが、K_i 値で比較した場合、サキサグリブチンの約 1/2 の阻害活性であった (表 2.6.2-12)。また、DPP-8 や DPP-9 に対しても阻害作用を示し、その K_i 値はそれぞれ 2495 ± 727 nmol/L 及び 423 ± 64 nmol/L であったが、いずれの作用も DPP-4 に対する阻害作用よりも弱く、またサキサグリブチンよりも弱い阻害作用を示した。BMS-510849 の DPP-4 に対する阻害選択性 (それぞれの酵素に対する K_i 値の比) は、DPP-8 に対して約 948 倍、DPP-9 に対して約 163 倍と算出され、BMS-510849 も DPP-4 に対して選択的な阻害作用を示すと考えられた。

表 2.6.2-12 各DPPアイソザイムに対するBMS-510849の阻害作用及び阻害特性（サキサグリプチンとの比較）

薬剤	DPP-4 K _i (nmol/L)	DPP-8 K _i (nmol/L)	DPP-9 K _i (nmol/L)
	平均値±標準偏差（例数）	平均値±標準偏差（例数）	平均値±標準偏差（例数）
サキサグリプチン	1.3±0.31 (12)	508±174 (13) 選択性：391	98±44 (11) 選択性：75
BMS-510849	2.6±1.0 (12)	2495±727 (14) 選択性：948	423±64 (12) 選択性：163

数値はいずれも平均値±標準偏差（nmol/L），数値右側の（ ）内の数値は例数。選択性は DPP-4 に対する K_i 値に対するそれぞれの酵素に対する K_i 値の比で示した。

<資料番号 4.2.1.1-01：Table 2 より抜粋>

2.6.2.2.5.2 BMS-510849 とサキサグリプチンの薬理作用の比較

（概要表 2.6.3.2，報告書番号 019422）

目的：BMS-510849 の *in vivo* での薬理作用を評価するため，正常ラット及び Zucker fa/fa ラットを用いて OGTT 後の血糖値上昇抑制作用と血漿中濃度との関連性を検討し，サキサグリプチンと比較した。

方法：正常（SD 系）ラット（雄）及び Zucker fa/fa ラット（雄；11～14 週齢）を 15～18 時間絶食し，馴化後サキサグリプチン及び BMS-510849 を 0.1，0.5，2.5 mg/kg の用量で動脈内投与した（この用量はそれぞれの安息香酸塩及び塩酸塩での重量であり，フリー体重量換算ではサキサグリプチン：0.07，0.36，1.80 mg/kg，BMS-510849：0.09，0.45，2.25 mg/kg）。なお，BMS-510849 は経口吸収性が低いことから，動脈内投与によりサキサグリプチンとの薬理作用の比較を行った。コントロール群には生理食塩水を投与した（各群 3～10 例）。SD 系ラットについては 4 時間後，Zucker fa/fa ラットについては 1 時間後に 2 g/kg の用量でグルコースを経口投与し，以降経時的にグルコース投与の 240 分後まで血糖値の測定を行った。また，グルコース投与時に採血を行い，薬剤血中濃度の測定を行った^{報告書番号 019422}。

成績：サキサグリプチン及び BMS-510849 の投与により，OGTT 時にみられる血糖値上昇に対する抑制作用が SD 系及び Zucker fa/fa ラットにおいて認められたが，血糖値上昇抑制作用はどちらのラットにおいてもサキサグリプチンの方が低用量から認められた（図 2.6.2-13 及び図 2.6.2-14）。同じ用量を動脈内投与した場合，各薬剤の血中濃度には顕著な差が認められなかったか，もしくは BMS-510849 の方が高い値を示した。BMS-510849 の薬理作用を薬剤血中濃度との関連性でサキサグリプチンと比較したところ，一定の薬理作用（グルコース AUC をコントロール群と比べて 25%低下させる作用）を示すために必要な BMS-510849 の血中濃度は，サキサグリプチンと比べて SD 系ラットで最低でも 20 倍，Zucker fa/fa ラットで最低でも 5 倍以上高いことが示された。

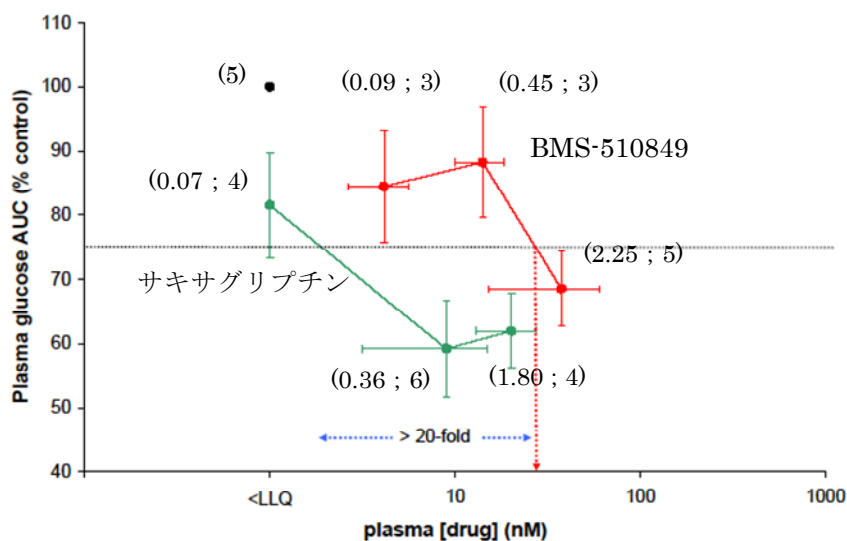


図 2.6.2-13 サキサグリブチンと BMS-510849 の薬理作用比較 (SD 系ラット)

SD 系ラットは 15～18 時間絶食し、馴化後サキサグリブチン及び BMS-510849 を 0.1, 0.5, 2.5 mg/kg の用量で動脈内投与した (それぞれの安息香酸塩及び塩酸塩での重量であり、フリー体重量換算ではサキサグリブチン : 0.07, 0.36, 1.80 mg/kg, BMS-510849 : 0.09, 0.45, 2.25 mg/kg)。コントロール群には生理食塩水を投与した (各投与群とも 3～6 例)。4 時間後グルコースを 2 g/kg の用量で経口投与し、以降経時的にグルコース投与の 240 分後まで採血を行い、血糖値の測定を行った。また、グルコース投与時に採血を行い、薬剤血中濃度の測定を行った。コントロール群に対する各用量投与群のグルコース AUC (血糖値推移下面積) を縦軸に、各用量投与群のグルコース投与時の薬剤血中濃度を横軸に取り、血中濃度－作用曲線を作成し、グルコース AUC をコントロール群から 25%低下させる薬理作用を示す血中濃度の比較を行った。

<LLQ: 血中濃度が検出限界 (lower limit of quantitation) 以下であることを示す (具体的な濃度は 1～2 nmol/L)。グラフ中の () 内は、各プロットでの薬剤投与用量 (フリー体重量換算値 ; mg/kg) を示す。また、グラフ中の () の「;」の後に記された数値及び●の近傍に記された () 内の数値は、それぞれ各用量の投与群及びコントロール群で実際に結果を取得した個体の例数を示す。図中の●はコントロール群の結果を示す。エラーバーは平均値±標準偏差を示す。

<資料番号 4.2.1.1-08 : Figure 3 より作成>

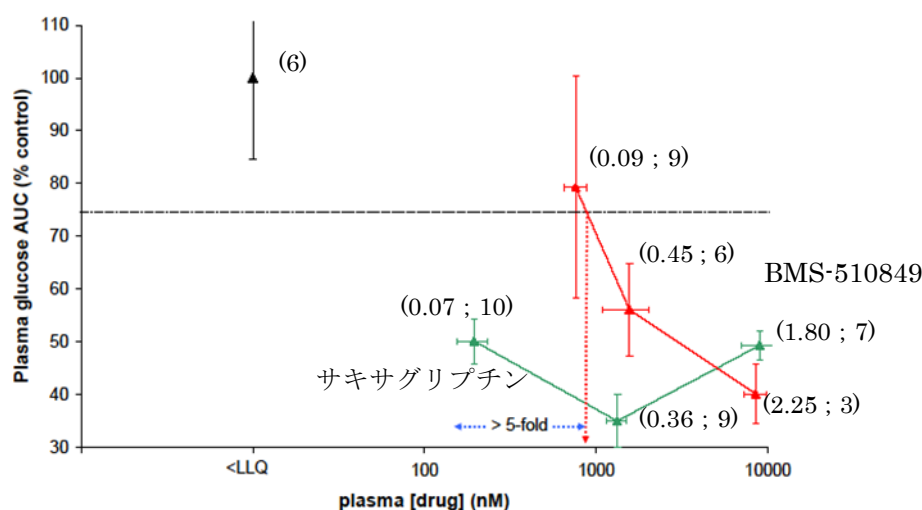


図 2.6.2-14 サキサグリプチンと BMS-510849 の薬理作用比較（Zucker fa/fa ラット）

Zucker fa/fa ラットは 15～18 時間絶食し、馴化後サキサグリプチン及び BMS-510849 を 0.1, 0.5, 2.5 mg/kg の用量で動脈内投与した（それぞれの安息香酸塩及び塩酸塩での重量であり、フリー体重量換算ではサキサグリプチン：0.07, 0.36, 1.80 mg/kg, BMS-510849：0.09, 0.45, 2.25 mg/kg）。コントロール群には生理食塩水を投与した（各投与群とも 3～10 例）。1 時間後グルコースを 2 g/kg の用量で経口投与し、以降経時的にグルコース投与の 240 分後まで採血を行い、血糖値の測定を行った。また、グルコース投与時に採血を行い、薬剤血中濃度の測定を行った。コントロール群に対する各用量投与群のグルコース AUC（血糖値推移下面積）を縦軸に、各用量投与群のグルコース投与時点での薬剤血中濃度を横軸に取り、血中濃度－作用曲線を作成し、グルコース AUC をコントロール群から 25%低下させる薬理作用を示す血中濃度の比較を行った。

<LLQ：血中濃度が検出限界（low limit of quantitation）以下であることを示す。グラフ中の（ ）内は、各プロットでの薬剤投与用量（フリー体重量換算値；mg/kg）を示す。また、グラフ中の（ ）の「；」の後に記された数値及び▲の近傍に記された（ ）内の数値は、それぞれ各用量の投与群及びコントロール群で実際に結果を取得した個体の例数を示す。図中の▲はコントロール群の結果を示す。エラーバーは平均値±標準偏差を示す。

<資料番号 4.2.1.1-08：Figure 7 より作成>

2.6.2.2.5.3 結論

BMS-510849 はサキサグリプチンと同様、*in vitro* において選択的な DPP-4 阻害作用を示したが、阻害作用をサキサグリプチンと K_i 値で比較すると約 1/2 であった。また、*in vivo* において BMS-510849 は SD 系ラット及び Zucker fa/fa ラットで OGTT 後の血糖値上昇を抑制する作用を示したが、同じ薬理作用を示すために必要な血中濃度をサキサグリプチンと比較した場合には、BMS-510849 は最低でも 5～20 倍高い血中濃度を必要とすることが示された。これらの結果から、BMS-510849 はサキサグリプチン投与によりラットにおいて認められる薬理作用全体に対してその一部に寄与すると考えられた。

2.6.2.3 副次的薬理試験

T リンパ球や造血前駆細胞においては、細胞表面の CD26 が DPP-4 活性を有することが知られており⁴、この分子は T リンパ球の活性化に対して促進的に機能することが知られている⁵。サキサグリプチンの副次的薬理試験として、ヒト T リンパ球における DPP-4 活性に対する阻害作用と T リンパ球活性化との関連性を検討した。

2.6.2.3.1 ヒト T リンパ球の DPP 活性と DNA 合成促進に対する作用

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 019419)

目的： T リンパ球が有する DPP-4 活性に対するサキサグリプチンの影響と、T リンパ球活性化に対する作用及びこれらの関連性を調べるため、ヒト末梢血から調製した T リンパ球を用いて、DPP-4 活性に対するサキサグリプチンの阻害作用を検討した。同時に、抗 CD3 抗体刺激による DNA 合成 ($[^3\text{H}]$ -チミジンの取り込み) の促進に対するサキサグリプチンの作用を検討した。

方法： ヒト末梢血から調製した T リンパ球懸濁液にサキサグリプチンを添加して 2 時間処理した後人工基質を添加し、蛍光強度の変化を指標として DPP-4 活性を測定した。同じ細胞集団を抗 CD3 抗体で刺激し、様々な濃度のサキサグリプチンを添加して 2 日間処理した後、 $[^3\text{H}]$ -チミジンの細胞への取り込み量を測定した^{報告書番号 019419}。

成績： T リンパ球の有する DPP-4 活性に対して、サキサグリプチンは添加濃度に応じて阻害作用を示し、その IC_{50} 値は約 30 nmol/L と推定された。この結果は前述のヒト T リンパ球を用いた細胞表面に局在する DPP 活性に対する阻害作用の結果とほぼ一致していた^{報告書番号 019417}。これに対して、抗 CD3 抗体刺激による DNA 合成の促進に対して、サキサグリプチンは 4000 nmol/L 以上の添加濃度でのみ阻害作用を示し、その IC_{50} 値は約 20 $\mu\text{mol/L}$ と推定された (図 2.6.2-15)。 IC_{50} 値で比較した場合には、サキサグリプチンの T リンパ球における CD3 を介した DNA 合成促進に対する阻害作用と DPP-4 活性に対する阻害作用は 600 倍以上乖離していた。この結果から、外来刺激による T リンパ球の DNA 合成促進に対して、1 $\mu\text{mol/L}$ 以下のサキサグリプチンで得られる DPP-4 活性阻害が与える影響は小さいものと考えられた。

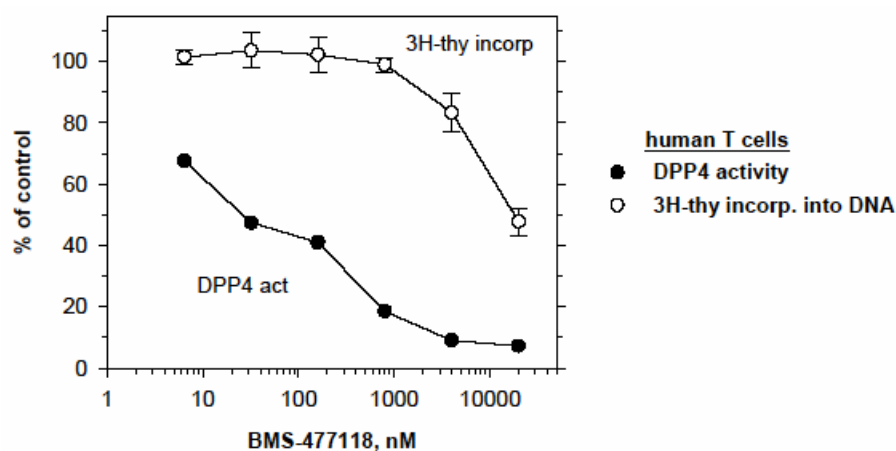


図 2.6.2-15 ヒト T リンパ球における DPP-4 活性と DNA 合成に対するサキサグリプチンの阻害作用

ヒト T リンパ球の DPP-4 活性と、同じ細胞を用いた抗 CD3 抗体刺激による DNA 合成促進に対するサキサグリブチン (BMS-477118) の阻害作用を並べて示した。横軸はサキサグリブチンの添加濃度 (nM ; nmol/L) を示す。縦軸はサキサグリブチンを添加しない場合を 100%とした場合の値を示す (平均値±標準誤差)。

<資料番号 4.2.1.2-01 : Figure より抜粋>

2.6.2.3.2 T リンパ球活性化に対する作用 (混合リンパ球反応による評価)

(概要表 2.6.3.2, 報告書番号 021942)

目的 : T リンパ球が有する DPP-4 活性に対する阻害作用と、T リンパ球の活性化との関連性を調べるため、ヒト T リンパ球を用い、混合リンパ球反応 (MLR ; mixed lymphocyte reaction) を用いて T リンパ球の活性化に対するサキサグリブチンを含む DPP-4 阻害薬の作用を検討した。

方法 : 健康人より T リンパ球を調製し、薬剤と 37°C, 30 分間インキュベーションを行った後酵素基質 (ala-pro-AFC) を添加して蛍光強度の変化を指標として DPP-4 活性の測定を行った。混合リンパ球反応は、ヒト T リンパ球と末梢血単核球を混合して薬剤を添加し、4 日間培養した後 6 時間 [³H]-チミジンのパルスラベルを行い、 [³H]-チミジンの取り込みを指標として T リンパ球の増殖に対する作用を検討した 報告書番号 021942。

成績 : T リンパ球の細胞表面に局在する DPP-4 活性に対してサキサグリブチンは阻害作用を示し、IC₅₀ 値は約 20 nmol/L と推定された (表 2.6.2-13)。また、他の DPP-4 阻害薬 (シタグリブチン、ビルダグリブチン) でも阻害作用が認められ、IC₅₀ 値はそれぞれ 32 nmol/L 及び 16 nmol/L であった。一方、混合リンパ球反応に対しては、陽性対照として用いた LFA-1 アンタゴニストは 300 nmol/L の添加濃度で 95% [³H]-チミジンの取り込みを抑制したが、サキサグリブチンや BMS-510849 を 10 µmol/L 添加した場合の抑制率はそれぞれ 8%及び 6%であった。また、シタグリブチンやビルダグリブチンを 10 µmol/L 添加した場合の抑制率はそれぞれ 5%及び 1%であった。

表 2.6.2-13 DPP-4 阻害薬による T リンパ球 DPP 活性阻害と T リンパ球活性化阻害作用

薬剤	T リンパ球細胞表面の DPP 活性に対する阻害作用 (IC ₅₀ ;nmol/L, 平均値 ± 標準偏差)	MLR で評価した T リンパ球活性化に対する阻害作用 (%)
サキサグリブチン	20 (1)	8 (4)
BMS-510849	NT	6 (4)
シタグリブチン	32 ± 6 (4)	5 (4)
ビルダグリブチン	16 ± 7 (4)	1 (4)
LFA-1 アンタゴニスト	NT	95 (4)

() 内の数値はいずれも例数を示す。NT : not tested。MLR で評価した T リンパ球活性化に対する阻害作用については、LFA-1 アンタゴニストは 300 nmol/L の濃度で、その他の薬剤は 10 µmol/L の添加濃度で検討した。

<資料番号 4.2.1.2-02 : Table 1 より作成>

2.6.2.3.3 *In vitro* 受容体/イオンチャネル結合及び酵素活性

(概要表 2.6.3.3, 報告書番号 019420)

放射標識した適切な基質の 42 種の受容体及びイオンチャネルへの結合に対するサキサグリブチンの拮抗能、11 種の酵素に対するサキサグリブチンの阻害能について *in vitro* で評価した。評価

した受容体、イオンチャネル、酵素に対して意味のある影響は見られなかった（10 $\mu\text{mol/L}$ で 25% 未満の抑制のみ）^{報告書番号 019420}。この試験において検討されたサキサグリブチンの添加濃度は 10 $\mu\text{mol/L}$ （フリー体重量換算で 3.15 $\mu\text{g/mL}$ ）であったが、この濃度は、臨床用量（5 mg）が日本人 2 型糖尿病患者に投与された場合のサキサグリブチンの C_{max} の最大平均値である 49 ng/mL の約 64 倍であった^{資料番号 5.3.4.2-01}。

2.6.2.3.4 結論

ヒト T リンパ球が有する DPP-4 活性に対してサキサグリブチンは阻害作用を示した。この作用は同じ条件下で検討した他の DPP-4 阻害薬でも同様に認められた。一方で、抗体刺激、あるいは混合リンパ球反応で見られる T リンパ球の活性化（増殖促進）に対してサキサグリブチンはほとんど抑制作用を示さないか、あるいは高濃度添加した場合にのみ抑制作用を示した。T リンパ球が有する DPP-4 活性を DPP-4 阻害薬で阻害した場合でも、これらの薬剤による T リンパ球の活性化に対する抑制濃度との間に乖離がみられることから、DPP-4 阻害薬による T リンパ球が有する DPP-4 活性の阻害が T リンパ球の活性化に対して与える影響は小さいものと考えられた。また、サキサグリブチンは 10 $\mu\text{mol/L}$ の添加濃度において、*in vitro* で検討した受容体、イオンチャネル、酵素に対して意味のある影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

サキサグリブチンの心循環系，中枢神経系，呼吸器系に対する *in vitro* 及び *in vivo* の安全性薬理評価を，主要な毒性試験の一項目としてあるいは特定の安全性薬理試験として実施した。主要代謝物の心循環系への作用について *in vitro* の系で評価した。

2.6.2.4.1 サキサグリブチンの安全性薬理試験

2.6.2.4.1.1 心循環系に及ぼす影響

(概要表 2.6.3.4, 報告書番号 019426, 019437, 019456, 019439, 019430, 019438, 019435, 019619, 021432, 027684)

サキサグリブチンの心循環系に及ぼす影響を，*in vitro* 及び *in vivo* の安全性薬理試験及び非臨床毒性試験において評価し，ヒトに対する懸念は無いことが示唆された。これらの試験には，*in vitro* human ether-a-go-go-related gene アッセイ (hERG, I_{Kr}) 及びウサギプルキンエ線維アッセイ，イヌにおける単回経口投与心循環テレメトリー試験，カニクイザルにおける単回経口投与毒性試験，ラットにおける6ヵ月経口投与毒性試験，イヌにおける2週間・3ヵ月・12ヵ月経口投与毒性試験，サルにおける1～3ヵ月経口投与探索毒性試験，サルにおける3ヵ月経口投与毒性試験が含まれる。更に，臨床における生物学的利用率確認試験で用いる静脈内投与に先立ち，カニクイザルにおける単回静脈内投与心循環テレメトリー試験も実施した。

hERG アッセイにおいて，10 及び 30 $\mu\text{mol/L}$ の濃度のサキサグリブチンを評価した。サキサグリブチンは I_{Kr} 電流を 10 及び 30 $\mu\text{mol/L}$ (フリー体として 9.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下) それぞれで，媒体のみを適用した条件での最大値に対する相対値として $5.1 \pm 2.8\%$ 及び $11.6 \pm 4.8\%$ 抑制し，QT 延長のわずかな傾向が示唆されただけであった。同様に，30 $\mu\text{mol/L}$ までの濃度で実施したウサギプルキンエ線維アッセイにおいて，活動電位パラメーター (静止膜電位，オーバーシュート，最大立ち上がり速度，50% 及び 90% 再分極時活動電位持続時間) に意味のある変化はみられなかった^{報告書番号 019426}。

総合的に，サキサグリブチンは 30 $\mu\text{mol/L}$ までの濃度 (フリー体として 9.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下) において hERG/ I_{Kr} 電流及びプルキンエ線維活動電位にほとんど作用を示さず，患者において予測される血漿中濃度 (ヒト 5 mg 投与時サキサグリブチンの C_{max} は 0.024 $\mu\text{g/mL}$; 試験番号 CV181037) において，hERG/ I_{Kr} を介した心電図変化をもたらすことはないであろうことが示唆された。

毒性評価の一部として，カニクイザルの単回経口投与毒性試験，ラット，イヌ，カニクイザルを用いた 1 年間までの反復投与毒性試験において，サキサグリブチンの心電図 (ECGs)，血圧，及び/あるいは心拍数を含む心循環系パラメーターへの影響を評価した。

ラットにおけるサキサグリブチン 6 ヶ月経口投与毒性試験において，投与第 1 週では 20 及び 100 mg/kg/day (安息香酸塩の用量 ; フリー体重量換算では 14.4 及び 72 mg/kg/day, 2.6.2.4 の () 内に表示される用量はフリー体重量換算値) の雄，投与第 13 週では 100 mg/kg/day (72 mg/kg/day) の雄で平均収縮期血圧が 17%～19% 低下した (心拍数に影響はなし)。投与第 25 週では，100 mg/kg/day (72 mg/kg/day) の雌雄いずれにも血圧，心拍数に影響はみられなかった^{報告書番号 019437}。雄の各測定時点において影響の認められなかった最大用量における暴露 AUC は，2 mg/kg/day (1.44

mg/kg/day) で 181 ng·h/mL (投与 1 日目) , 20 mg/kg/日 (14.4 mg/kg/日) で 2468 ng·h/mL (投与 92 日目) , 100 mg/kg/日 (72 mg/kg/日) で 21869 ng·h/mL (投与 181 日目) と、臨床推奨用量 5 mg でのヒト暴露 AUC (78 ng·h/mL ; 試験番号 CV181037) の 2.3, 31, 280 倍であった。また、いずれの測定時点においても影響の認められなかった雌 100 mg/kg/日 (72 mg/kg/日) における暴露 AUC は、32804 ng·h/mL (投与 1 日目) ~48261 ng·h/mL (投与 181 日目) と、ヒト暴露 AUC (78 ng·h/mL ; 試験番号 CV181037) の 420 倍~618 倍であった。なお、すべての用量において雌ラットと比べて雄ラットの血漿中サキサグリプチン及び BMS-510849 濃度 (C_{max} 及び AUC) は低値 (全般的に 25-75%) であったことは注目すべきことであった。

テレメトリー装置を埋め込まれた無麻酔イヌを用いたサキサグリプチン単回経口投与試験において、10 mg/kg/日投与では薬物に関連した心循環系パラメーター (P 波幅, RR 間隔, PR 間隔, QRS 幅, QT 間隔) に変化はみられなかった^{報告書番号 019456}。この用量における C_{max} 及び AUC (同じ用量を用いて実施した 12 ヶ月イヌ試験^{報告書番号 019439} の投与第 1 日目に得られた値) は、約 3 µg/mL 及び 8 µg·h/mL であり、この暴露は臨床推奨用量 5 mg でのヒト暴露 AUC (78 ng·h/mL ; 試験番号 CV181037) の約 100 倍であった。

イヌを用いたサキサグリプチン経口投与毒性試験において、2 週間投与は 25 mg/kg (18 mg/kg ; (暴露 AUC は雄 50803 ng·h/mL, 雌 45506 ng·h/mL) まで、12 ヶ月投与は 10 mg/kg/日 (7.2 mg/kg/日 ; 暴露 AUC は雄 4278 ng·h/mL, 雌 2782 ng·h/mL) までの用量を投与したが、ECG, 血圧, 心拍数に薬物に関連した作用はみられなかった^{報告書番号 019430, 019439}。これらの暴露量は、臨床推奨用量 5 mg でのヒト暴露 AUC (78 ng·h/mL ; 試験番号 CV181037) と比べて、35 倍~651 倍であった。

イヌと同様に、サルを用いたサキサグリプチン経口投与毒性試験において、単回投与は 25 mg/kg/日 (18 mg/kg/日 ; 暴露 AUC は 13770 ng·h/mL) まで、4 週間までの投与は 30/20 mg/kg/日 (雄は投与 4 日目から、雌は投与 3 日目から投与量を 30 mg/kg/日から 20 mg/kg/日に減量、暴露 AUC は雄 6013 ng·h/mL, 雌 4839 ng·h/mL) , 3 ヶ月投与は 3 mg/kg/日 (暴露 AUC は雄 1592 ng·h/mL, 雌 2196 ng·h/mL) までの用量を投与したが、ECG, 血圧, 心拍数に薬物に関連した作用はみられなかった^{報告書番号 019435, 019619, 021432}。作用のみられなかった用量における暴露量は、臨床推奨用量 5 mg でのヒト暴露 AUC (78 ng·h/mL ; 試験番号 CV181037) と比べて、20 倍~176 倍であった。

カニクイザルにおけるサキサグリプチン単回静脈内投与心循環テレメトリー試験において、225 µg/kg までの投与を受けたサルにおいても心拍数, 血圧, 左心室圧, 左心室駆出指標, 心電図, 身体活動, 体温に変化はみられなかった^{報告書番号 027684}。この用量における C_{max} は 162.5 ng/mL であり、臨床での静脈内投与生物学的利用率確認試験で予想される C_{max} (約 17 ng/mL) の約 10 倍までの安全域が確認された。また、AUC は 195 ng·h/mL であり、経口投与による臨床推奨用量 5 mg でのヒト暴露 AUC (78 ng·h/mL ; 試験番号 CV181037) の 2.5 倍であった。

以上のように、ラットの 6 ヶ月試験において投与 1 週間後及び 3 ヶ月後に血圧の低下がみられたが、試験終了時 (ヒト暴露 AUC の 280 倍~618 倍の AUC あり) にはみられなかった。更に、イヌ及びサルにおいて、ヒト暴露 AUC のそれぞれ 35 倍~651 倍及び 20 倍~176 倍の AUC においても、血圧を含めた心循環系パラメーターに影響はみられなかった。

これらの動物試験に加え、14 日間 400 mg（臨床推奨用量 5 mg の 80 倍）のサキサグリブチン投与を含む海外臨床試験、並びに 4 日間 40 mg（臨床推奨用量 5 mg の 8 倍）のサキサグリブチンを投与された被験者における詳細な QT 評価臨床試験（CV181032）のいずれにおいても、薬物に関連した心循環系の変化はみられなかった。

2.6.2.4.1.2 中枢神経系に及ぼす影響

（概要表 2.6.3.4, 報告書番号 027681, 019430）

ラットに 10, 30, 100 mg/kg の用量でサキサグリブチンを単回経口投与^{報告書番号 027681}し、一般状態観察、機能的観察総合評価法（姿勢、歩行、呼吸、体緊張、角膜反射、耳介反射、嗅覚反応、尾刺激反応、前後肢握力、等）による行動評価及び運動活性評価を実施した。更に体温も測定した。その結果、100 mg/kg においても影響はみられず、この用量での暴露量（AUC は雄 9860 ng・h/mL, 雌 36300 ng・h/mL）は臨床推奨用量 5 mg での AUC（78 ng・h/mL；試験番号 CV181037）の 126 倍～465 倍であった。

1, 5, 25 mg/kg/日（0.72, 3.6, 18 mg/kg/日）の用量でサキサグリブチンを投与したイヌの 2 週間毒性試験^{報告書番号 019430}において、行動、運動の協調、活動性の肉眼的変化を含む明らかな中枢神経系症状について、投与後毎日、注意深く観察した。神経学的評価として精神状態、歩行、姿勢、脳神経機能（威嚇反応、瞳孔光反射、眼瞼反射、眼収縮、開口反射、休息時眼位置、筋触診、舌検査）、末梢神経機能（筋緊張、脊髓反射、姿勢反応）を評価した。更に体温も測定した。その結果、25 mg/kg/日においても中枢及び末梢神経系機能への有害な作用を示す変化はみられず、この用量での暴露量（AUC は雄 50803 ng・h/mL, 雌 45506 ng・h/mL）は臨床推奨用量 5 mg での AUC（78 ng・h/mL；試験番号 CV181037）の 583 倍～651 倍であった。

2.6.2.4.1.3 呼吸器系に及ぼす影響

（概要表 2.6.3.4, 報告書番号 019430, 019438, 019439, 021432）

サキサグリブチンのイヌにおける 2 週間、3 ヶ月及び 12 ヶ月経口投与毒性試験、サルにおける 3 ヶ月経口投与毒性試験^{報告書番号 019430, 019438, 019439, 021432}において、呼吸数、肺音（胸部聴診）及び/あるいは動脈酸素飽和度を評価した。イヌでは 25 mg/kg/日（18 mg/kg/日；2 週間投与、暴露 AUC は雄 50803 ng・h/mL, 雌 45506 ng・h/mL）まで、及び 10 mg/kg/日（7.2 mg/kg/日；12 ヶ月投与、暴露 AUC は雄 4278 ng・h/mL, 雌 2782 ng・h/mL）まで、サルでは 3 mg/kg/日（暴露 AUC は雄 1592 ng・h/mL, 雌 2196 ng・h/mL）までの用量を投与したが、呼吸器系パラメーターに薬物に関連した作用はみられなかった。作用のみられなかった用量での暴露量は、臨床推奨用量 5 mg での AUC（78 ng・h/mL；試験番号 CV181037）の 20 倍～651 倍であった。

2.6.2.4.2 主要代謝物の安全性薬理試験

（概要表 2.6.3.4, 報告書番号 019620）

サキサグリブチンの主要代謝物である BMS-510849 の心循環系に及ぼす影響を独立した *in vitro* アッセイで評価した。

hERG アッセイにおいて、3, 10 及び 30 µmol/L の濃度（フリー体として 9.5 µg/mL 以下）においてそれぞれ、I_{Kr} 電流を媒体のみを適用した条件での最大値に対する相対値として、3.1±0.0%,

3.8±1.4%及び7.3±1.9%抑制したが、意味のある作用ではなかった。同様に、30 µmol/L までの濃度で実施したウサギプルキンエ線維アッセイにおいて、活動電位パラメーターに意味のある作用はみられなかった^{報告書番号 019620}。

総合的に、BMS-510849 は 30 µmol/L までの濃度（フリー体として 9.5 µg/mL 以下）において hERG/I_{Kr} 電流及びプルキンエ線維活動電位にほとんど作用を示さず、患者において予測される血漿中濃度（ヒト 5 mg 投与時 BMS-510849 の C_{max} は 0.047 µg/mL; 試験番号 CV181037) において、hERG/I_{Kr} を介した心電図変化をもたらすことはないであろうことが示唆された。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

2.6.2.6.1 効力を裏付ける試験の考察及び結論

2.6.2.6.1.1 効力を裏付ける試験結果の総括

サキサグリブチンは *in vitro* においてヒト及びカニクイザルの DPP-4 活性に対して強力な阻害作用を示し、かつ DPP-4 に対する阻害選択性を有していた。また、サキサグリブチンは同時に比較した他の DPP-4 阻害薬（ビルダグリブチン、シタグリブチン、アログリブチン）と比べ、酵素レベルでは DPP-4 に対して強い阻害作用を示した。サキサグリブチンは、DPP-4 の生理的な基質である GLP-1 の分解に対しても人工基質を用いた場合と同様の阻害作用を示すことが確認された。また、様々な細胞表面に発現している DPP 活性に対しても阻害作用を示すことが確認された。

動物を用いた検討においては、サキサグリブチンは検討した動物種（ヒト、ラット、カニクイザル、アカゲザル）の血漿中に含まれる DPP 活性に対して強い阻害作用を示した。また、サキサグリブチンの経口投与後に、血漿中 DPP-4 活性に対する阻害作用がラット及びイヌの *ex vivo* において確認された。酵素反応速度論的解析から、サキサグリブチンは他の DPP-4 阻害薬（ビルダグリブチン、シタグリブチン）と比べて DPP-4 に対する解離速度が遅いと推測されたことから、*in vitro* での阻害作用の強さと併せて長時間酵素に結合することで強い阻害作用が持続する可能性が考えられた。

正常ラットにおいて、サキサグリブチンは *ex vivo* で血漿中 DPP-4 阻害作用を示す投与用量と同じ用量範囲（0.09～3.15 mg/kg）の単回投与で、OGTT 時にみられる血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇に対して増強作用を示した。また、同様の用量範囲（0.09～0.95 mg/kg）の単回投与で耐糖能異常を示す Zucker fa/fa ラットにおいて OGTT 時の血糖値上昇に対する抑制作用を示し、抑制作用が観察される用量（0.95 mg/kg）を投与した場合には、OGTT 時の血漿中インスリン濃度上昇に対する増強作用も認められた。更に、高血糖を呈する病態モデルである ZDF ラットにおいて、反復投与（3.15 mg/kg）により OGTT 時の血糖値上昇に対する抑制作用及び空腹時血糖値の上昇に対する抑制作用を示した。また、正常マウスに高脂肪食を摂取させ、かつ STZ を投与した病態モデルにおいて、反復投与（10 mg/kg）により HbA1c を低下させ、 β 細胞量を部分的に回復させる作用を示した。

これらの結果から、サキサグリブチンは DPP-4 を阻害することにより、OGTT 時に見られる血漿中活性型 GLP-1 濃度上昇に対する増強作用を介してインスリン分泌を促進し、食後の血糖値上昇に対して抑制作用を示すと考えられた。これらのプロファイルを考慮すると、サキサグリブチンは 2 型糖尿病患者でみられる異常な食後高血糖に対して抑制的な効果を発揮するものと考えられた。また、ZDF ラットや STZ 投与マウスに対する反復投与試験では空腹時血糖値や HbA1c を抑制する作用が認められたことから、サキサグリブチンは 2 型糖尿病の臨床における血糖コントロールにおいて治療効果を発揮するものと考えられた。

サキサグリブチンの主要な代謝物として BMS-510849 が同定されているが、この代謝物も DPP-4 に対して強力かつ選択的な阻害作用を示した。しかし阻害定数（ K_i 値）を考慮した場合、この阻害作用はサキサグリブチンの約 1/2 であると考えられた。また、この代謝物は正常ラット及び Zucker fa/fa ラットにおいて OGTT 時の血糖値上昇に対して抑制作用を示したが、一定の抑制作用

(グルコース AUC の 25%低下) を示すために必要な血中濃度を比較した場合には、この代謝物はサキサグリブチンよりも 5 倍～20 倍高い血中濃度が必要であることが示された。これらの結果から、BMS-510849 の薬理作用はサキサグリブチンと比べると弱く、*in vivo* におけるサキサグリブチン投与時の薬理作用の一部に寄与するものと考えられた。

サキサグリブチンはヒト T リンパ球が有する DPP-4 活性に対しても阻害作用を示したが、抗 CD3 抗体刺激による [³H]-チミジンの取り込み促進に対しては、DPP-4 活性が 20%以下にまで阻害されるような添加濃度においても抑制が認められず、サキサグリブチンの DPP-4 阻害作用と抗体刺激による DNA 合成促進に対する阻害作用には、IC₅₀ 値の比較で 600 倍以上の乖離が認められた。この乖離は T リンパ球の刺激として混合リンパ球反応を用いた場合でも同様にみられた。サキサグリブチンによる T リンパ球の DPP-4 活性阻害が、外来刺激による T リンパ球の活性化に対して与える影響は小さいものと考えられた。

2.6.2.6.1.2 DPP に対する阻害選択性及びその影響に関する考察

DPP-8 及び DPP-9 はヒトの生体内で広汎な組織に発現しており^{6,7}、DPP-4 と同様 GLP-1、GLP-2、NPY、pYY などの生理活性ペプチドを分解することが知られている⁸。また動物モデルで喘息を惹起した際に発現が亢進すること⁹、また DPP-8 及び DPP-9 の選択的阻害剤により T リンパ球の増殖が抑制されることから¹⁰、生体内では免疫反応に関与していると考えられており、実際にリンパ球、単球などの細胞質に酵素活性が認められている¹¹。DPP-8 及び DPP-9 の生理的な役割についてはまだ不明な点が多いものの、動物レベルで化合物投与によってこれらの酵素活性を阻害した際の影響については、現在までにいくつかの知見が報告されている。

Lankas らは、DPP-8 及び DPP-9 を選択的に阻害する化合物の投与で、ラットでは脱毛、血小板減少、赤血球減少、脾臓腫大、多臓器における組織学的変化、死亡例、またイヌでは消化管毒性が認められたことを報告している¹²。一方で、Wu らは別の化学構造を有する DPP-8 及び DPP-9 に対する選択的な阻害剤をラットに投与して毒性試験を行ったところ、化合物に付随した重篤な毒性症状や血清生化学的な指標の変動は観察されなかったことを報告している¹³。また Burkey らは DPP-8 及び DPP-9 に対する K_i 値を上回る血中濃度を投与後 24 時間にわたって維持できるビルダグリブチンの用量を CD-1 ラット及び Wistar ラットに反復経口投与し、Lankas らが報告した毒性症状が見られるかどうか検討を行ったが、組織傷害や死亡例などは認められなかったことを報告している¹⁴。以上の知見から推察すると、選択的 DPP-8 及び DPP-9 阻害化合物がこの阻害作用に基づいて毒性症状を引き起こす可能性は否定できないものの、酵素阻害作用自体の毒性症状との関連性はまだ明らかになっていないと考えられる。

サキサグリブチンの DPP-4 に対する K_i 値を DPP-8 及び DPP-9 に対する K_i 値と比較すると、それぞれ約 391 倍、約 75 倍と算出され、DPP-4 に対して選択的に阻害作用を示した。サキサグリブチンの DPP-8 及び DPP-9 に対する阻害作用を踏まえた上で、臨床使用した場合のこれらの酵素に対する阻害作用の影響を考慮する際には、これらの酵素が細胞質内に局在する酵素であること、特異的な基質が知られていないこと、サキサグリブチンの細胞内分布や局在濃度が不明であることなどの様々な理由から、正確に評価することは困難と考えられる。このことから、下記の前提条件を基に計算を行い、サキサグリブチン 5 mg をヒトに投与した場合の投与 18 時間後までの DPP-4、DPP-8、DPP-9 の阻害率を理論的に計算した結果を示した (図 2.6.2-16) 報告書番号 021944。

(前提条件)

①37℃におけるサキサグリブチン及び主要代謝物（BMS-510849）のヒト DPP 酵素に対する K_i 値，また，ヒトにサキサグリブチン 5 mg を投与した際の血漿中濃度推移を使用

②サキサグリブチン及び主要代謝物については，血漿中濃度と細胞質内濃度は等しいと仮定

③酵素基質として gly-pro-pNA を用いた場合を想定

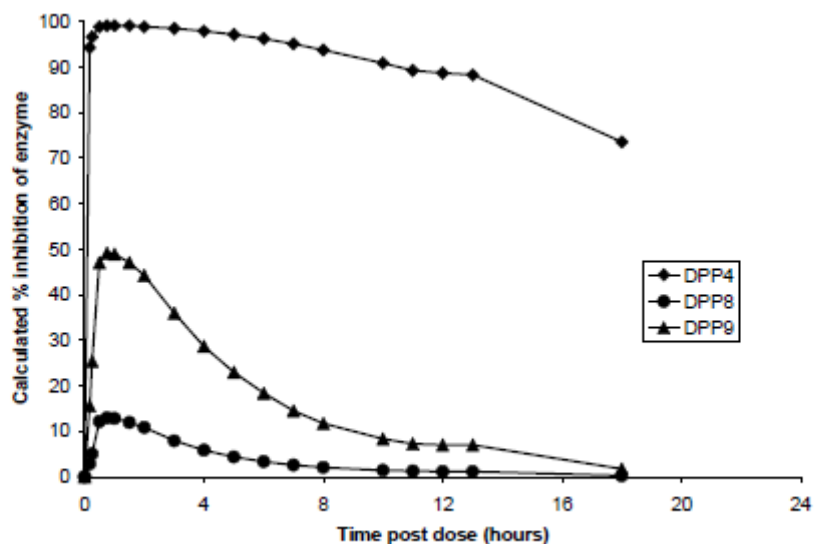


図 2.6.2-16 ヒトにサキサグリブチン 5 mg を投与した場合の投与 18 時間後までの DPP-4, DPP-8, DPP-9 に対する阻害率（理論的計算による推定）

ヒトにサキサグリブチン 5 mg を投与した場合のサキサグリブチン及び主要代謝物の血漿中濃度測定結果，及び DPP-4, DPP-8, DPP-9 に対するサキサグリブチン及び主要代謝物の K_i 値から，これらの酵素に対する阻害作用を横軸に示した各時点ごとに理論的に計算した。縦軸は各投与後時点における各酵素に対する阻害%を示す。
<資料番号 4.2.1.1-01：28 ページ Figure 2 より抜粋>

上記の前提条件下においては，最も保守的に計算した場合でも DPP-8 に対する阻害作用は，最大阻害率で 13%，投与後 3 時間以降では 10%以下の阻害率であった。DPP-9 に対する阻害作用は，最大阻害率で 49%，投与後 10 時間以降では 10%以下の阻害率であった。また，この時間範囲内での阻害 AUC（阻害率下面積）を 18 時間 100%の阻害作用が継続した場合を 100%とした比率で示すと，DPP-4 に対する阻害 AUC は 90%であったのに対し，DPP-8 に対する阻害 AUC は 3%，DPP-9 に対する阻害 AUC は 16%であった。

上記の結果で示されるように，投与後初期においては DPP-8 及び DPP-9 に対する阻害作用が認められるものの，最も保守的な計算を行った場合の最大値でも DPP-9 に対する阻害率は 50%以下であり，また DPP-8 及び DPP-9 に対する阻害作用を AUC で比較した場合には，DPP-4 阻害作用に比べて相対的に低いと考えられた。

サキサグリブチンの FAP（Fibroblast activation protein）に対する阻害作用については，本概要文中の 2.6.2.2.1.3 に記載されているとおり， K_i 値は 4300 nmol/L と推定されている（基質：gly-pro-pNA，室温（約 22℃）での結果）^{報告書番号 019423}。またこの試験ではビルダグリブチンの K_i 値は 15603 nmol/L

と推定されている。シタグリブチンやアログリブチンと同じ条件で直接比較した報告や試験は現在のところ見受けられない。アログリブチンとシタグリブチンの FAP に対する阻害作用を直接比較した文献報告によると、どちらの化合物の IC₅₀ 値も 100000 nmol/L 以上と推定されており、FAP に対する阻害作用を示さないと考えられた。またこの報告ではビルダグリブチンの IC₅₀ 値は 73000 nmol/L と推定されている。但し、この検討では基質として ala-pro-AFC が用いられている¹⁵。これらの結果は用いる基質や反応温度などの試験条件が異なること、検討に用いた基質濃度が不明であることから、単純に阻害強度や阻害選択性を比較することはできないと考えられる。

2.6.2.6.1.3 病態モデルでの薬理作用に関する考察

ZDF ラットは、通常は高血糖が見られない Zucker fa/fa ラットの中から糖尿病を発症する個体を発見し、これを選択的に交配することによって確立された高血糖を呈する 2 型糖尿病モデル動物として知られている¹⁶。ZDF ラットの特性や病態の進展については報告によって若干のばらつきは見られるものの、7 週齢までは高血糖がみられず、以降徐々に高血糖を呈するようになり、12 週齢以降で非絶食時の血糖値は 300 mg/dL を越えて高血糖状態が維持され、ヒトの 2 型糖尿病に類似した病態を示すと考えられている¹⁷。高血糖が観察されない 7 週齢以前においても末梢組織におけるインスリン抵抗性が認められ、血漿中インスリン濃度はコントロール動物である Zucker-Lean と比べて著しく高い値を示す。しかし、高血糖状態が維持されている時期では週齢の経過と共に血漿中インスリン濃度は逆に減少していくことから、ZDF ラットにおける高血糖の進展には、初期にはインスリン抵抗性の進展、後期にはこれに加えてインスリン分泌不全が影響を及ぼすと考えられている¹⁸。

ZDF ラット（10 週齢～14 週齢）由来の膵島に GLP-1 を作用させた場合にはグルコース刺激によるインスリン分泌を亢進させること¹⁹、また同様の現象が ZDF ラット（22 週齢）由来の膵臓を灌流した実験においても認められること²⁰、更には ZDF ラット（9 週齢～13 週齢）に exenatide を反復投与した場合には HbA1c が低下することが報告されていることから²¹、高血糖を呈する状態の ZDF ラットにおいても、GLP-1 に対する反応性（GLP-1 のインスリン分泌促進作用）はある程度維持されていると考えられる。

サキサグリブチンを ZDF ラットに反復投与した試験においては、開始時点ですでに 16 週齢を迎え、試験終了時点では 21 週齢となっており、一般的な ZDF ラットの病態進展経過を考慮すると試験開始時点ですでに高血糖を呈していると考えられた。実際に空腹時血糖値はコントロール群、サキサグリブチン投与群共にこの時点で 200 mg/dL を越えていた。報告書番号 019418。また、投与終了時点での空腹時血糖値もコントロール群で 300 mg/dL 以上、サキサグリブチン投与群で 250 mg/dL を越えており、この空腹時血糖値の上昇については、週齢の経過に伴う糖尿病病態の進展が影響していると考えられた。

ZDF ラットでの GLP-1 によるインスリン分泌促進作用については、肥満型 ZDF ラットよりもやせ型 ZDF ラット（高血糖を呈さない）で、また雄よりも雌（高血糖にならない）の方で強いことが報告されていることから²⁰、GLP-1 の作用は糖尿病や肥満の病態が進展するにつれて減弱する可能性が考えられ、ZDF ラットにおける糖尿病病態の進展がサキサグリブチン投与時の血糖値低下作用を上回ったものと考えられる。一方で、ZDF ラットでのサキサグリブチン反復投与時の薬物動態に関しては検討されていないものの、正常ラットに 6 ヶ月間反復経口投与を行った場合

には、投与初期と投与終了時点でのサキサグリブチンの薬物動態に大きな変動は見られないか、もしくは反復投与に伴い C_{max} 及び AUC は増大していたことから^{報告書番号 019437}、反復投与時の薬理作用が薬物動態の変動に影響される可能性は低いと考えられた。

高血糖を呈する ZDF ラットを用いて DPP-4 阻害薬の薬理作用（血糖値低下作用、HbA1c 低下作用）を検討した結果については、以下に示す知見が報告されているのみである。

①雄の ZDF ラット（9 週齢～15 週齢）に DPP-4 阻害剤である P32/98 を経口投与して OGTT（2 g/kg グルコース経口投与）時のグルコース AUC について評価を行った²²。9 週齢の ZDF ラットでは P32/98 の単回投与によるグルコース AUC の低下作用が有意に認められたが、12 及び 15 週齢の ZDF ラットでは単回投与による有意なグルコース AUC の低下作用は認められなかった。ZDF ラットの空腹時血糖値は 9 週齢時点で約 5 mmol/L（約 90 mg/dL）、12 週齢時点で約 8 mmol/L（約 144 mg/dL）、15 週時点で約 10 mmol/L（約 180 mg/dL）で、週齢の経過に伴い空腹時血糖値の悪化が認められた。

②雄の ZDF ラット（6 週齢）に DPP-4 阻害剤である BI-1356（リナグリブチン）を経口投与し、OGTT（1 g/kg グルコース経口投与）時のグルコース AUC 及び 35 日間反復投与後の HbA1c に対する作用をビルダグリブチンと比較した（用量はいずれの薬剤も 3 mg/kg）²³。初回投与時には約 50%のグルコース AUC の低下作用がどちらの薬剤でも認められたが、35 日間反復投与を行った場合にはコントロール群の HbA1c は 3.2%から 6.4%へ上昇した。ビルダグリブチン投与群では HbA1c の低下作用は認められず、BI-1356 投与群では 0.4 ポイント低下したが有意な変化ではなかった。

③雄の ZDF ラット（20 週齢）に DPP-4 阻害薬であるシタグリブチン（10 mg/kg）を 1 日 1 回 6 週間反復経口投与し、血糖値と HbA1c に対する長期投与の影響を評価した²⁴。投与終了時点（ZDF ラットは 26 週齢）では、コントロール群の血糖値は 523.3 ± 15.6 mg/dL であったのに対し、シタグリブチン投与群では 486.3 ± 19.1 mg/dL と低下していた。また HbA1c はコントロール群に対してシタグリブチン投与群では約 11%の低下作用が認められた。

以上の結果及びサキサグリブチンの試験結果を総合すると、ZDF ラットでの週齢の経過に伴う高血糖病態の進展が、DPP-4 阻害薬の薬理作用（血糖値低下作用あるいは HbA1c 低下作用）を上回る可能性が考えられた。但し、このような高血糖状態が進展した病態モデルにおいてもサキサグリブチンの反復投与により空腹時血糖値の低下作用が認められていること、また投与 1 日目及び 35 日目のいずれの時点でも OGTT 時の血糖値推移はコントロール群と比べてサキサグリブチン投与群で低値を示していることから、このような高血糖状態を呈する状態の ZDF ラットにおいても、サキサグリブチンは血糖値を低下させる作用を有すると考えられた。また、高脂肪食を摂取させ、かつ STZ を投与した病態モデルにおいても HbA1c やグルコース AUC の改善効果が認められていることから、サキサグリブチンは様々な糖尿病病態に対して血糖コントロール改善作用を示す可能性が期待された。

2.6.2.6.1.4 ヒトにおける用法に関する考察

ヒトとは異なる動物種において検討された試験結果からヒトでの用法の妥当性を示唆するためには、少なくともヒトで予定している同じ用法で検討した動物種において、薬力学的作用と共に薬理学的作用が確認されていることが望ましいと考えられる。

サキサグリブチンは ZDF ラットを用いて行った試験において、3.15 mg/kg の 1 日 1 回反復経口

投与により、空腹時の血糖値低下作用及び OGTT 時の血糖値上昇に対して抑制作用を示し、OGTT 時の血糖値上昇に対する抑制作用は投与 35 日目でも引き続き認められた^{報告書番号 019418}。また、STZ 投与マウスを用いた試験においては、10 mg/kg の 1 日 1 回反復経口投与により、投与開始タイミングによって差異は認められるものの、4 時間絶食後の血糖値、空腹時血糖値、HbA1c、OGTT 時のグルコース AUC に対して抑制効果を示した。また、このサキサグリブチンの効果は臨床において 1 日 1 回投与で治療効果が認められているシタグリブチンの効果とほぼ同等か、項目によってはそれ以上の効果を示すと考えられた^{報告書番号 027474}。サキサグリブチンは薬理作用を検討した動物種において、1 日 1 回の投与で血糖コントロールを改善する作用を示したことから、ヒトでの用法として 1 日 1 回の投与が妥当である可能性が考えられた。これらの薬理試験において、投与用量、未変化体及び主要代謝物の血漿中濃度、血漿中 DPP-4 阻害活性、薬理作用（血漿中活性型 GLP-1 濃度、血糖低下作用、HbA1c 低下作用など）の間の関連性が一貫して示されていることが望ましいと考えられるが、これらの関連性はヒトと齧歯類で必ずしも一致しない可能性もあるため、ヒトにおける用法の妥当性については、臨床試験成績と合わせて考慮する必要があると考えられる。

2.6.2.6.2 安全性薬理試験の考察及び結論

サキサグリブチンの心循環系、中枢神経系、呼吸器系に対する *in vitro* 及び *in vivo* の安全性薬理評価を、主要な毒性試験の一項目としてあるいは特定の安全性薬理試験として実施し、主要代謝物の心循環系への作用について *in vitro* の系で評価した。その結果は、ヒトに臨床推奨用量 5 mg を投与した際の血漿中未変化体及び代謝物 BMS-510849 濃度を数倍から数百倍上回る曝露においても明らかな影響を及ぼさず、ヒトにおいて懸念される潜在的なリスクを示唆するものではなかった。

2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

引用文献

- 1 Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. Regul Pept. 1999; 85: 9-24. (資料番号 4.3-18)
- 2 Lambier AM, Durinx C, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. Crit Rev Clin Lab Sci. 2003; 40: 209-94. (資料番号 4.3-19)
- 3 Deacon CF, Johnson AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields and N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. J Clin Endocrinol Metab. 1995; 80: 952-7. (資料番号 4.3-20)
- 4 Ulmer AJ, Mattern T, Feller AC, Heymann E, Flad HD. CD26 antigen is a surface dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) as characterized by monoclonal antibodies clone TII-19-4-7 and 4EL1C7. Scand J Immunol. 1990; 31: 429-35. (資料番号 4.3-21)
- 5 Morimoto C, Schlossman SF. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. Immunol Rev. 1998; 161: 55-70. (資料番号 4.3-22)
- 6 Abbott CA, Yu DM, Wollatt E, Sutherland GR, McCaughan GW. Cloning ,expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. Eur J Biochem. 2000; 267: 6140-50. (資料番号 4.3-23)
- 7 Ajami K, Abbott CA, McCaughan GW, Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase 9 has two forms, broad tissue distribution, cytoplasmic localization and DPIV-like peptidase activity. Biochim Biophys Acta. 2004; 1679: 18-28. (資料番号 4.3-24)
- 8 Bjelke JR, Christensen J, Neilsen PF, Branner S, Kanstrup AB, Wagtmann N, et al. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. Biochem J. 2006; 396: 391-9. (資料番号 4.3-25)
- 9 Schade J, Stephan M, Schmiedl A, Wagner L, Niestroj AJ, Demuth HU, et al. Regulation of expression and function of dipeptidyl peptidase 4 (DP4), DP8/9, and DP10 in allergic responses of the lung in rats. J Histochem cytochem. 2008; 56: 147-55. (資料番号 4.3-26)
- 10 Reinhold D, Goihl A, Wrenger S, Reinhold A, Kuhlmann UC, Faust J, et al. Role of dipeptidyl peptidase IV (DP IV)-like enzymes in T lymphocyte activation: investigations in DP IV/CD26-knockout mice. 2009; 47(3): 268-74. (資料番号 4.3-27)
- 11 Maes MB, Dubois V, Brandt I, Lambier AM, Van der Veken P, Augustyns K, et al. Dipeptidyl peptidase 8/9-like activity in human leukocytes. J Leukoc Biol. 2007; 81: 1252-7. (資料番号 4.3-28)
- 12 Lankas GR, Leiting B, Roy RS, Eiermann GJ, Beconi MG, Biftu T, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes: potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidase 8 and 9. 2005; 54: 2988-94. (資料番号 4.3-29)
- 13 Wu J, Tang H, Yeh T, Chen C, Shy H, Chu Y, et al. Biochemistry, pharmacokinetics, and toxicity of a potent and selective DPP8/9 inhibitor. Biochem Pharmacol. 2009; 78: 203-10. (資料番号 4.3-30)
- 14 Burkey BF, Hoffmann PK, Hassiepen U, Trappe J, Juedes M, Foley JE. Adverse effects of dipeptidyl peptidases 8 and 9 inhibition in rodents revisited. Diab Obes Metab. 2008; 10: 1057-61. (資料番号 4.3-31)
- 15 Lee B, Shi L, Kassel DB, Asakawa T, Takeuchi K, Christopher RJ. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy profiles of alogliptin, a novel inhibitor of dipeptidyl peptidase-4, in rats, dogs, and monkeys. Eur J Pharmacol. 2008; 589: 306-14. (資料番号 4.3-32)

- ¹⁶ Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN. The diabetic Zucker Fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1983; 173: 68-75. (資料番号 4.3-33)
- ¹⁷ Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: Impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 10878-82. (資料番号 4.3-34)
- ¹⁸ Etgen GJ, Oldham BA. Profiling of Zucker diabetic fatty rats in their progression to the overt diabetic state. *Metabolism*. 2000; 49: 684-8. (資料番号 4.3-35)
- ¹⁹ Sreenan SK, Mittal AA, Dralyuk F, Pugh WL, Polonsky KS, Roe MW. Glucagon-like peptide-1 stimulates insulin secretion by a Ca²⁺-independent mechanism in Zucker diabetic fatty rat islets of Langerhans. *Metabolism*. 2000; 49: 1579-87. (資料番号 4.3-36)
- ²⁰ Shen HQ, Roth SM, Peterson RG. The effect of glucose and glucagon-like peptide-1 stimulation on insulin release in the perfused pancreas in a non-insulin-dependent diabetes mellitus animal model. *Metabolism*. 1998; 47: 1042-7. (資料番号 4.3-37)
- ²¹ Gedulin BR, Smith P, Prickett KS, Tryon M, Barnhill S, Reynolds J, Nielson LL, Parkes DG, Young AA. Dose-response for glycaemic and metabolic changes 28 days after single injection of long-acting release exenatide in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetologia*. 2005; 48: 1380-5. (資料番号 4.3-38)
- ²² Wargent E, Stocker C, Augstein P, Heinke P, Meyer A, Hoffmann T, et al. Improvement of glucose tolerance in Zucker diabetic fatty rats by long-term treatment with the dipeptidyl peptidase inhibitor P32/98: comparison with and combination with rosiglitazone. *Diabetes Obesity and Metabolism*. 2005; 7: 170-81. (資料番号 4.3-39)
- ²³ Thomas L, Tadayyon M, Mark M. Chronic treatment with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor BI1356 [(R)-8-(3-amino-piperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl 3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydro-purine-2,6-dione] increases basal glucagon-like peptide-1 and improves glycemic control in diabetic rodent models. *The Journal of Pharmacol Exp Ther*. 2009; 328: 556-63. (資料番号 4.3-40)
- ²⁴ Ferreira L, Teixeira-de-Lemos E, Pinto F, Parada B, Mega C, Vala H, et al. Effects of sitagliptin treatment on dysmetabolism, inflammation, and oxidative stress in an animal model of type 2 diabetes (ZDF rat). *Mediators of Inflammation*. 2010; Article ID 592760. (資料番号 4.3-41)