

**デベルザ錠20mg/アプルウェイ錠20mg  
(トホグリフロジン水和物)  
[2型糖尿病]**

第2部 (モジュール 2)

CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

興和株式会社/サノフィ株式会社

## 目次

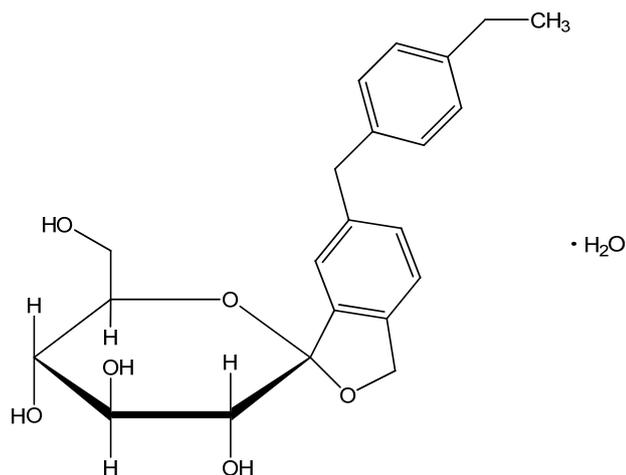
	<u>頁</u>
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表.....	3
2.6.1 緒言.....	3
2.6.1.1 承認申請の概要.....	5
2.6.1.1.1 効能・効果.....	5
2.6.1.1.2 用法・用量.....	5
2.6.1.2 参考文献一覧.....	6

## 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

### 2.6.1 緒言

トホグリフロジン水和物（以下、本薬）は中外製薬株式会社で創製されたナトリウム・グルコース共輸送体（SGLT）2の選択的阻害薬である。本薬は、腎糸球体で濾過されたグルコースの再吸収を担うトランスポーターである SGLT2を選択的に阻害し、尿中へグルコースを排泄させることにより血糖を低下させる2型糖尿病治療薬である。本薬の構造式を図 2.6.1-1に示す。

図 2.6.1-1 トホグリフロジン水和物の化学構造



SGLT はナトリウムイオンと共役してグルコースを輸送するトランスポーターであり、腎尿細管でのグルコース再吸収においては、SGLT1と SGLT2の両アイソフォームが主に関与している<sup>1)</sup>。SGLT2の発現は腎臓に特異的であり<sup>2)</sup>、腎尿細管からのグルコース再吸収の大部分はSGLT2が担っていると考えられている<sup>3)</sup>。

遺伝的に SGLT2に障害を有し機能不全である家系は家族性腎性糖尿と呼ばれ、変異や接合型にもよるが1日数 g から100 g 以上のグルコースが尿へ排泄される。しかし、ごく限られた例を除いては、尿糖は検出されるが通常的生活を送る<sup>4)-6)</sup>。一方、SGLT1は腎臓のみならず消化管においてもグルコースとガラクトースの吸収を担う輸送体として機能し、遺伝的に SGLT1に障害を有して機能不全である場合、新生児が母乳を飲んだ時に激しい下痢を発症することがあり、グルコース・ガラクトース吸収不全症として報告されている<sup>7)</sup>。

SGLT2を欠損させたマウスモデルは複数報告されており、肥満2型糖尿病モデルマウス（SGLT2欠損 db/db マウス）においては、血糖コントロールの改善が膵β細胞の保護とあわせて報告されている<sup>8)</sup>。

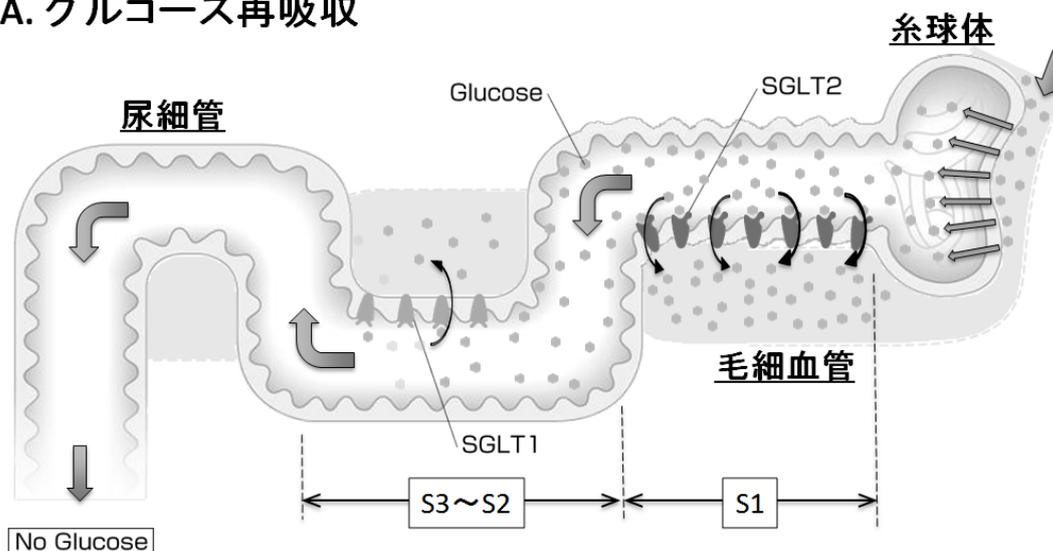
これらの知見から、中外製薬株式会社では、SGLT2を選択的に阻害し、尿へのグルコース排泄を亢進させることにより、2型糖尿病患者の高血糖を治療することができると考え、1日1回の経口投与により良好な血糖コントロールを可能とする薬剤の開発を目指し、SGLT1に比較してSGLT2への選択性の高いSGLT2阻害剤である本薬を見出した。

本薬の腎臓での作用を図 2.6.1-2に示す。本薬が体内に無い場合は図 2.6.1-2A)、原尿に含まれる大部分のグルコースは、尿細管の上流の管腔側に発現している高輸送能・低親和性のSGLT2により再吸収され、残ったグルコースもその下流の管腔側に発現している高親和性・低輸送能の SGLT1で再吸収されるため、健康な人では食後に血糖が上昇してもグルコースは尿中に排泄されない。一方、本薬が作用している場合は図 2.6.1-2B)、原尿のグルコースは尿細管の SGLT1を発現している部位まで運ばれて再吸収されるが、低輸送能の SGLT1のみではす

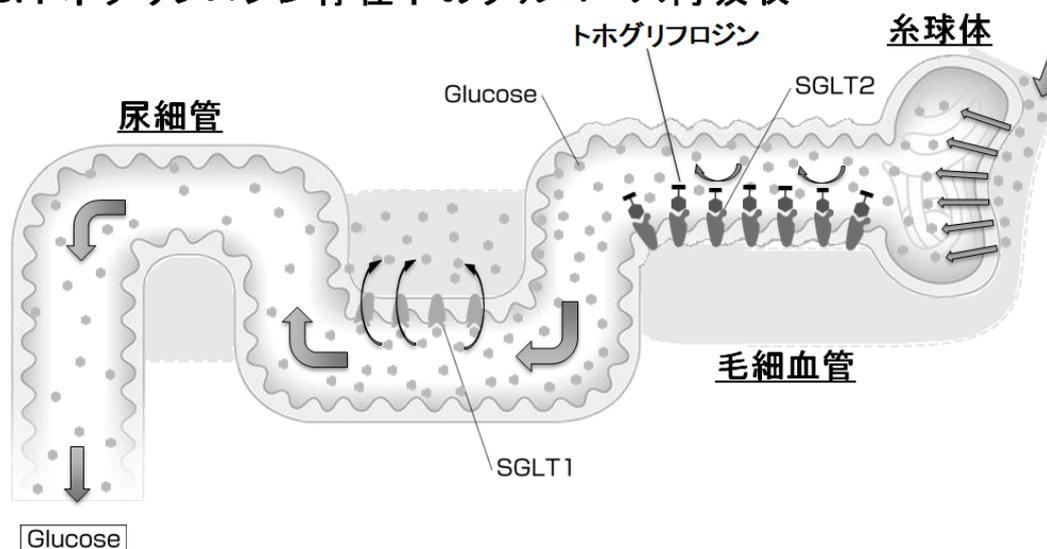
すべてのグルコースを再吸収することはできず、グルコースを尿中に排泄することになる。

図 2.6.1-2 腎臓におけるグルコースの再吸収と本剤の作用

### A. グルコース再吸収



### B. トホグリフロジン存在下のグルコース再吸収



本薬の作用の特徴は SGLT1によるグルコースの再吸収を阻害しない点にある。すなわち食後過血糖の状態を含めた高血糖状態では、本剤は SGLT2を阻害することにより糸球体で濾過された過剰な血中グルコースを尿中に排泄させ、血糖値を低下させる。一方、正常血糖状態では本剤が SGLT2を阻害しても、一定量のグルコースは SGLT1により再吸収され、尿糖排泄は低下するようになる。このように本薬の特徴は、腎でのグルコース再吸収阻害率が血糖値に依存して増減することであり、血糖値が高くなるほど尿へのグルコース排泄をより亢進するという長所を有している。

本薬は、現在承認されている2型糖尿病治療薬と薬理作用の異なる新規血糖降下薬である。その血糖降下作用は、インスリン作用に基づかないことから、インスリン抵抗性やインスリン分泌不全といった2型糖尿病の発症要因に関わらず、幅広い患者に対してその作用を発揮する

ことが期待される。また、SGLT2を選択的に阻害するという特長から、本薬は血糖が高値の場合にはグルコース再吸収を強く抑制し、血糖が低値の場合にはグルコース再吸収が保持されると考えられることから、低血糖を生じにくい血糖降下薬であることが期待される。

### 2.6.1.1 承認申請の概要

#### 2.6.1.1.1 効能・効果

今回申請する効能・効果は以下のとおりである。

2型糖尿病

#### 2.6.1.1.2 用法・用量

今回申請する用法・用量は以下のとおりである。

通常、成人にはトホグリフロジンとして20 mg を1日1回経口投与する。

### 2.6.1.2 参考文献一覧

- 1) Wright EM. Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F10-8.
- 2) Chen J, Williams S, Ho S, Loraine H, Hagan D, Whaley JM, et al. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther* 2010;1:57-92.
- 3) Mather A, Pollock C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int* 2011;79:S1-6.
- 4) Magen D, Sprecher E, Zelikovic I, Skorecki K. A novel missense mutation in *SLC5A2* encoding SGLT2 underlies autosomal-recessive renal glucosuria and aminoaciduria. *Kidney Int* 2005;67:34-41.
- 5) Kleta R, Stuart C, Gill FA, Gahl WA. Renal glucosuria due to *SGLT2* mutations. *Mol Genet Metab* 2004;82:56-8.
- 6) Santer R, Kinner M, Lassen CL, Schneppenheim R, Eggert P, Bald M, et al. Molecular analysis of the *SGLT2* gene in patients with renal glucosuria. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2873-82.
- 7) Wright EM, Turk E, Martin MG. Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem Biophys* 2002;36:115-21.
- 8) Jurczak MJ, Lee HY, Birkenfeld AL, Jornayvaz FR, Frederick DW, Pongratz RL, et al. SGLT2 deletion improves glucose homeostasis and preserves pancreatic  $\beta$ -cell function. *Diabetes* 2011;60:890-8.

**デベルザ錠20mg/アプルウェイ錠20mg  
(トホグリフロジン水和物)  
[2型糖尿病]**

第2部 (モジュール 2)

CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

興和株式会社/サノフィ株式会社

## 略語一覧

略号	英名	和名
AUC <sub>0-t</sub>	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to t	投与後0時間から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC <sub>inf</sub>	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to extrapolated infinity	投与後0時間から無限時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積
BW	Body weight	体重
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズ・ハムスター卵巣由来
C <sub>max</sub>	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
GK rat	Goto-Kakizaki rat	後藤－柿崎ラット
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
Glu	Glucose	グルコース
Glu AUC <sub>0-4h</sub>	Area under the blood glucose curve from time zero to 4-hour	0から4時間までの血糖値の曲線下面積
Glu AUC <sub>0-12h</sub>	Area under the blood glucose curve from time zero to 12-hour	0から12時間までの血糖値の曲線下面積
Hb	Hemoglobin	ヘモグロビン
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓由来
hERG	Human ether-a-go-go related gene	－
hSGLT	Human sodium-glucose cotransporter	ヒトナトリウム・グルコース共輸送体
IC <sub>20</sub>	Concentration producing 20% inhibition	20%阻害濃度
IC <sub>50</sub>	Concentration producing 50% inhibition	50%阻害濃度
IRI	Immunoreactive insulin	免疫反応性インスリン
K <sub>i</sub>	Inhibition constant	阻害定数
SD rat; CD(SD) rat	Caesarean derived (Sprague-Dawley) rat strain	SD ラット, CD(SD)ラット
SGLT	Sodium-glucose cotransporter	ナトリウム・グルコース共輸送体
SMIT	Sodium-myo-inositol cotransporter	ナトリウム・ミオイノシトール共輸送体
T2DM	Type 2 diabetes mellitus	2型糖尿病
ZDF rat	Zucker diabetic fatty rat	Zucker 糖尿病性肥満ラット

トホグリフロジン及び代謝物の略称は 2.6.4 「トホグリフロジン水和物及び代謝物の略称一覧」を参照

## 目次

	頁
2.6.2 薬理試験の概要文.....	4
2.6.2.1 まとめ.....	4
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験.....	4
2.6.2.1.2 副次的薬理試験.....	5
2.6.2.1.3 安全性薬理試験.....	6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験.....	7
2.6.2.2.1 SGLT1 及び SGLT2 阻害活性.....	7
2.6.2.2.2 db/db マウスにおける血糖降下作用（単回投与）.....	9
2.6.2.2.3 ZDF ラットにおける血糖降下作用及び尿糖排泄亢進作用.....	10
2.6.2.2.4 正常動物における血糖値への影響.....	12
2.6.2.2.5 2型糖尿病モデル動物における食後過血糖改善作用.....	13
2.6.2.2.6 2型糖尿病モデル動物における血糖降下作用（反復投与）.....	14
2.6.2.3 副次的薬理試験.....	18
2.6.2.3.1 本薬の代謝物の SGLT1 及び SGLT2 に対する阻害活性.....	18
2.6.2.3.2 本薬及び代謝物の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーター結合活性.....	19
2.6.2.3.3 本薬のグルコーストランスポーター（GLUT）阻害活性.....	19
2.6.2.4 安全性薬理試験.....	20
2.6.2.4.1 中枢神経系.....	20
2.6.2.4.1.1 ラットの中枢神経系に及ぼす影響（Irwin 変法）.....	20
2.6.2.4.2 呼吸系.....	21
2.6.2.4.2.1 ラットの呼吸系に及ぼす影響.....	21
2.6.2.4.3 心血管系.....	21
2.6.2.4.3.1 hERG チャネルに及ぼす影響.....	21
2.6.2.4.3.2 カニクイザルの心血管系に及ぼす影響（テレメトリー法）.....	22
2.6.2.4.3.3 代謝物の hERG チャネルに及ぼす影響.....	22
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....	22
2.6.2.6 考察及び結論.....	22
2.6.2.7 図表.....	24
2.6.2.8 参考文献一覧.....	25

## 2.6.2 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1 まとめ

トホグリフロジン水和物（以下、本薬）は、SGLT2を選択的に阻害することにより、尿糖の排泄を直接誘導し、2型糖尿病患者における高血糖を是正する糖尿病治療薬である。

トホグリフロジンの薬理作用を、以下に示す *in vitro* 及び *in vivo* 試験により評価した。

*In vitro* において、本薬はヒト、マウス及びラットの SGLT2を阻害し、ヒト SGLT2阻害活性はヒト SGLT1阻害活性に比較して2100倍強いほか、いずれのヒト SGLT サブタイプに対しても高いヒト SGLT2選択性を有していた。

*In vivo* において、本薬は肥満2型糖尿病モデルマウスあるいはラットへの単回経口投与により、随時血糖を用量依存的に低下させた。また、本薬は肥満2型糖尿病ラットで尿糖排泄を用量依存的に亢進させたことから、その血糖降下作用は、グルコース再吸収阻害に起因する尿糖排泄亢進によると考えられた。一方、本薬は正常ラットの随時血糖を低下させず、正常血糖への影響は少ないと考えられた。非肥満2型糖尿病モデルラットにおける液体飼料負荷試験において、本薬は液体飼料負荷後の血糖上昇を抑制し、食後過血糖を改善する可能性が示唆された。肥満2型糖尿病モデルマウスへの4週間反復経口投与により、本薬は糖化ヘモグロビン値を溶媒投与群に比較して有意に低下させた。糖化ヘモグロビンは長期の血糖コントロールを反映するパラメータであり、本薬投与による長期的な血糖コントロールが可能であることが示唆された。

安全性薬理試験からは、本薬が中枢神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響はないと考えられた。

なお、薬理試験における投与量はトホグリフロジンとしての投与量とした。

#### 2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

##### (1) SGLT1及びSGLT2阻害活性

(資料番号4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2)

ヒト及びマウスの SGLT1及び SGLT2をそれぞれ発現した CHO 細胞を用いて、基質である methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside の取り込みを指標に、本薬の SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。本薬の SGLT2に対する阻害定数 ( $K_i$  値) は、ヒト及びマウスでそれぞれ0.0029  $\mu\text{mol/L}$  及び0.0064  $\mu\text{mol/L}$  であった。 $K_i$  値で比較した本薬の SGLT2阻害活性は、ヒトにおいて SGLT1の2100倍、マウスにおいては SGLT1の190倍強かった。また、ラットの SGLT1及び SGLT2をそれぞれ発現した COS-7細胞を用い、methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside の取り込みを指標に、本薬のラット SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。本薬のラット SGLT1及び SGLT2に対する  $\text{IC}_{50}$ 値は、それぞれ8.2  $\mu\text{mol/L}$  及び0.0145  $\mu\text{mol/L}$  であり、 $\text{IC}_{50}$ 値で比較したラット SGLT2阻害活性は、ラット SGLT1阻害活性に比較して560倍強かった。なお、 $\text{IC}_{50}$ 値で比較した本薬のヒト SGLT3, SGLT4, SGLT5, SGLT6及び SMIT1に対する SGLT2選択性は、それぞれ19000倍、1500倍、540倍、6200倍及び28000倍であり、SGLT1を含めたいずれの SGLT サブタイプに対して500倍以上の高い SGLT2選択性が認められた。

##### (2) 2型糖尿病モデル動物における血糖降下作用（単回投与）

(資料番号4.2.1.1-3, 4.2.1.1-4)

本薬 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) 単回経口投与時の随時血糖に対する作用を肥満2型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) あるいは肥満2型糖尿病モデルラット (ZDF ラット) を用いて評価した。いずれのモデル動物においても、本薬は投与12時間後まで血糖値を用量依存的に低下させた。

ZDF ラットにおいては、本薬の尿糖排泄への影響 (グルコース腎排泄クリアランス値) について評価し、本薬の作用機序である腎臓におけるグルコース再吸収阻害に起因する尿糖排泄の

亢進が確認された。

(3) 正常動物における血糖値への影響

(資料番号4.2.1.1-5, 4.2.1.1-2)

正常 Wistar ラットにおける本薬 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) 単回経口投与時の随時血糖に対する作用を評価した。投与1, 2, 4, 6, 8, 12, 24時間後のいずれの時間においても、溶媒投与群と比較して、本薬投与群における有意な血糖値の低下は認められなかった。

正常 SD ラットへの本薬 (1, 3, 10 mg/kg) 投与により、投与後6時間まではすべての用量で、6~12時間では3及び10 mg/kg で、12~24時間では10 mg/kg の用量で、有意な尿糖排泄亢進作用が認められたが、投与6, 12, 24時間後のいずれの時間においても有意な血糖値の低下は認められなかった。

(4) 2型糖尿病モデル動物における食後過血糖改善作用

(資料番号4.2.1.1-6)

非肥満2型糖尿病のモデルである後藤 - 柿崎 (GK) ラットを用いて、本薬の食後過血糖改善作用を評価した。一晚絶食したラットに本薬 (1, 3, 10 mg/kg) あるいは  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤であるボグリボース (0.1, 0.3, 1 mg/kg) を単回経口投与し、薬剤投与5分後に液体飼料を負荷して血糖値推移を評価した。本薬及びボグリボースはともに、溶媒投与群と比較して液体飼料負荷後の血糖上昇を有意に抑制した。

(5) 2型糖尿病モデル動物における血糖降下作用 (反復投与)

(資料番号4.2.1.1-7)

db/db マウスに、本薬 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg/日) を1日1回、4週間反復経口投与し、糖化ヘモグロビン値への影響及び db/db マウスの病態への影響を評価した。本薬は0.3 mg/kg/日以上用量で、投与4週後の糖化ヘモグロビン値を溶媒投与群と比較して有意に低下させ、また、3 mg/kg/日以上投与群においては、非絶食条件下の血漿中インスリン値が溶媒投与群と比較して有意に高値であった。更に、経口グルコース負荷試験において、3 mg/kg/日以上用量で、血糖曲線下面積 (Glu AUC<sub>0-4h</sub>) を溶媒投与群と比較して有意に低下させた。糖化ヘモグロビンは長期の血糖コントロールを反映するパラメータであり、本薬は反復投与により db/db マウスの血糖値を長期間低下させ、また耐糖能を改善することが示された。

### 2.6.2.1.2 副次的薬理試験

(1) 本薬の代謝物の SGLT1及び SGLT2阻害活性

(資料番号4.2.1.2-1)

ヒト SGLT1及び SGLT2をそれぞれ発現した CHO 細胞を用いて、基質である methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside の取り込みを指標に、本薬の主要代謝物の SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。

本薬のヒト SGLT1及び SGLT2に対する IC<sub>50</sub>値は、それぞれ13 及び0.0039  $\mu$ mol/L であった。本薬の代謝物のヒト SGLT2阻害活性は、脱水素体、一級水酸化体が本薬とほぼ同等であり、ケトン体、二級水酸化体エピマー1、二級水酸化体エピマー2は本薬に対して3-4倍程度弱く、カルボン酸体は本薬の700倍弱かった。

本薬の代謝物のヒト SGLT1阻害活性は、脱水素体の IC<sub>50</sub>値が本薬の0.51倍で本薬よりもやや強く、一級水酸化体では本薬とほぼ同等、ケトン体、二級水酸化体エピマー1、二級水酸化体エピマー2では本薬に対して3-4倍程度弱く、カルボン酸体では本薬よりも15倍を超えて弱かった。

## (2) 本薬及び代謝物の各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーター結合活性

(資料番号4.2.1.2-2)

本薬及び代謝物（カルボン酸体，一級水酸化体，二級水酸化体エピマー1及び二級水酸化体エピマー2）の各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーターに対する *in vitro* での結合能を評価した。その結果，本薬及び代謝物は，本薬のヒト SGLT2に対する  $K_i$  値に比較して3000倍以上高い濃度である10  $\mu\text{mol/L}$  では，各種受容体，イオンチャネル及びトランスポーターに対してほとんど結合しないか，又は弱い結合能しか有さなかった。ただし，二級水酸化エピマー2のみが，10  $\mu\text{mol/L}$  の濃度で  $\sigma$  受容体に結合する可能性（結合阻害率64%）が示唆された。

## (3) 本薬のグルコーストランスポーター（GLUT）阻害活性

(資料番号4.2.1.1-2)

ヒト骨格筋由来細胞株（XM13A1）とラット骨格筋由来細胞株（L6），マウス脂肪由来細胞株（3T3-L1）のインスリン刺激時のグルコース取り込みに対する本薬の阻害活性を評価した結果，本薬のグルコース取り込み阻害活性（ $\text{IC}_{50}$ 値）は100  $\mu\text{mol/L}$  以上であった。本薬はヒト SGLT2に対する  $K_i$  値（0.0029  $\mu\text{mol/L}$ ）の30000倍以上の高濃度においても GLUT1あるいは GLUT4によると考えられるグルコース取り込み作用を強く抑制することはなかった。

## 2.6.2.1.3 安全性薬理試験

## (1) 中枢神経系

(資料番号4.2.1.3-1)

SD ラットを用いた Irwin 変法試験において，10 mg/kg 以上の投与量で排尿増加がみられた。更に体温低下及び眼瞼閉塞が640 mg/kg（絶食条件下）においてのみ認められた。体温及び眼瞼閉塞は，給餌を実施した投与後8時間に正常に回復したが，排尿の増加は投与後8時間の観察でも認められた。排尿の増加は，本薬の薬理作用である尿糖排泄亢進に基づく浸透圧利尿の結果と考えられた。

## (2) 呼吸系

(資料番号4.2.1.3-2)

SD ラットを用いた試験において，本薬は10，80及び640 mg/kg の投与量で呼吸数，1回換気量及び毎分換気量に影響を及ぼさなかった。

## (3) 心血管系

(資料番号4.2.1.3-3, 4.2.1.3-4, 4.2.1.3-5)

*In vitro* の心血管系安全性薬理評価は10～1000  $\mu\text{mol/L}$  の濃度においてパッチクランプによる hERG 電流測定により行った。hERG 電流の抑制は，300  $\mu\text{mol/L}$  以上の濃度でみられ，その  $\text{IC}_{20}$ 値は554  $\mu\text{mol/L}$ （214  $\mu\text{g/mL}$ ）であった。

更に，本薬（10，30及び100 mg/kg）が血圧，心拍数，心電図及び体温に及ぼす影響について，覚醒下のカニクイザルを用いてテレメトリー法にて評価した。その結果，異常所見は認められなかった。

また，ヒト代謝物であるカルボン酸体及び二級水酸化体の hERG 電流に及ぼす影響をパッチクランプにより評価した。カルボン酸体については hERG 電流の抑制は1000  $\mu\text{mol/L}$  までみられず，二級水酸化体は，最高濃度である1000  $\mu\text{mol/L}$  においてのみ，わずかな hERG 電流の抑制（8.7%）が認められた。

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

## 2.6.2.2.1 SGLT1及びSGLT2阻害活性

(資料番号4.2.1.1-1, 4.2.1.1-2)

ヒト及びマウスの SGLT1及び SGLT2をそれぞれ発現させた CHO 細胞を用いて、基質である methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside の Na<sup>+</sup>依存的な取り込みを指標に、本薬の SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。陽性対照物質としては、天然物由来の SGLT 阻害剤であるフロリジンを用いた。SGLT 阻害活性は、Lineweaver-Burk プロットによりそれぞれの SGLT に対する阻害定数 ( $K_i$  値) を算出して評価した。

本薬のヒト SGLT1及び SGLT2に対する  $K_i$  値は、それぞれ  $6.0 \pm 0.7 \mu\text{mol/L}$  (平均値  $\pm$  標準偏差, 以下同様) 及び  $0.0029 \pm 0.0002 \mu\text{mol/L}$  であり、ヒト SGLT2阻害活性は、ヒト SGLT1阻害活性に比較して2100倍強かった (表 2.6.2.2.1-1)。本薬のマウス SGLT1及び SGLT2に対する  $K_i$  値は、それぞれ  $1.2 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$  及び  $0.0064 \pm 0.0008 \mu\text{mol/L}$  であり、マウス SGLT2阻害活性は、マウス SGLT1阻害活性に比較して190倍強かった (表 2.6.2.2.1-2)。

更に、ラットの SGLT1及び SGLT2をそれぞれ発現させた COS-7細胞を用いて、methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside の Na<sup>+</sup>依存的な取り込みを指標に、本薬のラット SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性を評価した。本薬のラット SGLT1及び SGLT2に対する  $IC_{50}$ 値は、それぞれ  $8.2 \pm 1.9 \mu\text{mol/L}$  及び  $0.0145 \pm 0.0019 \mu\text{mol/L}$  であり、ラット SGLT2阻害活性は、ラット SGLT1阻害活性に比較して560倍強かった (表 2.6.2.2.1-3)。

以上のことより、本薬はヒト、マウス及びラットのいずれの動物種においても、SGLT2を選択的に阻害することが示された。

なお、培養細胞に発現したヒト SGLT3, SGLT4, SGLT5, SGLT6及び SMIT1に対する本薬の阻害活性を検討したところ、 $IC_{50}$ 値で比較した本薬のヒト SGLT3, SGLT4, SGLT5, SGLT6及び SMIT1に対する SGLT2選択性は、それぞれ19000倍, 1500倍, 540倍, 6200倍及び28000倍であり、SGLT1を含めたいずれの SGLT サブタイプに対しても500倍以上の高い SGLT2選択性が認められた。

表 2.6.2.2.1-1 トホグリフロジン及びフロリジンのヒト SGLT1及びヒト SGLT2阻害活性

Compound	$K_i$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	
	ヒト SGLT1	ヒト SGLT2
トホグリフロジン	$6.0 \pm 0.7$	$0.0029 \pm 0.0002$
フロリジン	$0.15 \pm 0.01$	$0.014 \pm 0.001$

平均値  $\pm$  標準偏差 (n=3)

表 2.6.2.2.1-2 トホグリフロジン及びフロリジンのマウス SGLT1及びマウス SGLT2阻害活性

Compound	$K_i$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	
	マウス SGLT1	マウス SGLT2
トホグリフロジン	$1.2 \pm 0.1$	$0.0064 \pm 0.0008$
フロリジン	$0.27 \pm 0.03$	$0.014 \pm 0.001$

平均値  $\pm$  標準偏差 (n=3)

表 2.6.2.2.1-3 トホグリフロジン及びフロリジンのラット SGLT1及びラット SGLT2阻害活性

Compound	IC <sub>50</sub> (μmol/L)	
	ラット SGLT1	ラット SGLT2
トホグリフロジン	8.2 ± 1.9	0.0145 ± 0.0019
フロリジン	0.97 ± 0.18	0.0482 ± 0.0114

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

## 2.6.2.2.2 db/db マウスにおける血糖降下作用（単回投与）

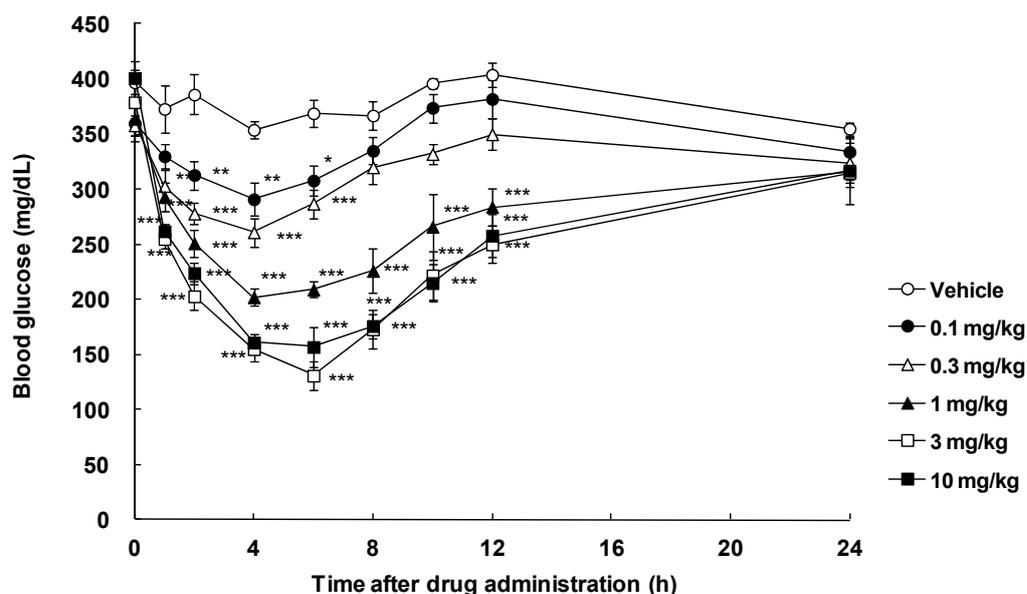
(資料番号4.2.1.1-3)

肥満2型糖尿病モデル動物であるdb/db マウス（9週齢，雄）を用いて，本薬単回経口投与時の随時血糖に対する作用を評価した。非絶食下でdb/dbマウスに本薬（0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg）を経口投与し，投与24時間後までの血糖値を経時的に測定した。同時に薬物濃度測定用db/dbマウスに本薬（0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg）を経口投与し，経時的に血漿中薬物濃度を測定し，薬物動態パラメータを求めた（2.6.4.8.1）。なお，本モデルでの1～3 mg/kg は，健康成人に臨床推奨用量（20 mg）を投与した場合の $C_{max}$  及び $AUC_{0-inf}$  値とほぼ同等となる用量であると考えられる（表 2.6.4.8.1-1, 表 2.7.2.2.2.3-1）。

本薬は，すべての用量で投与1又は2時間後から溶媒投与群に比較して用量に依存した有意な血糖降下作用を示し，0.1及び0.3 mg/kg では投与6時間後，1, 3及び10 mg/kg では投与12時間後においても有意な血糖降下作用が認められた。投与24時間後ではいずれの用量においても溶媒投与群との間に血糖値の有意な差は認められなかった（図 2.6.2.2.2-1）。

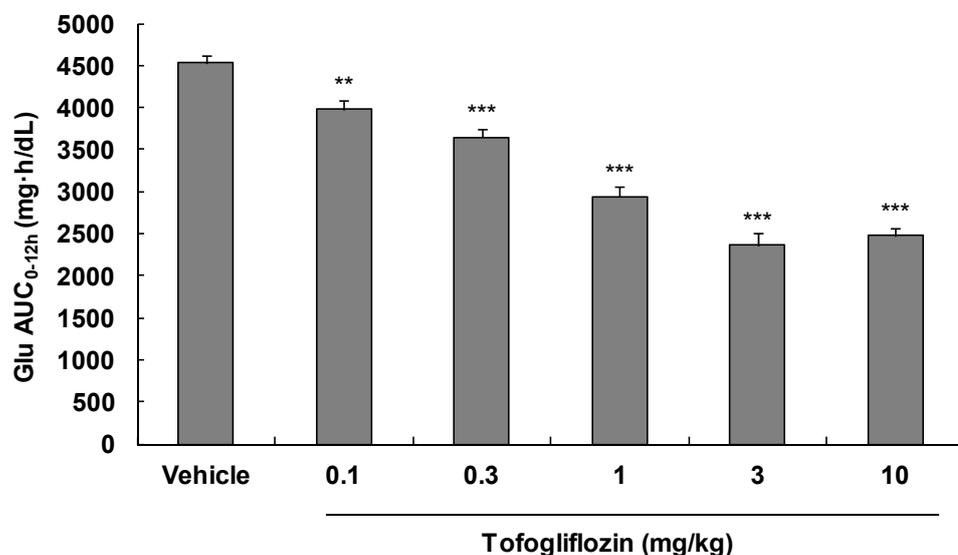
また，投与12時間後までの血糖値の曲線下面積（Glu  $AUC_{0-12h}$ ）を算出すると，本薬のすべての用量において溶媒投与群に比較して有意な Glu  $AUC_{0-12h}$  の低下が認められ，その効果は用量依存的であった（ $P<0.0001$ , Jonckheere-Terpstra 法）（図 2.6.2.2.2-2）。

図 2.6.2.2.2-1 db/db マウスにおけるトログリフロジンの血糖降下作用（血糖値の経時変化）



平均値 ± 標準誤差 (n=6)

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  : 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

図 2.6.2.2.2-2 db/db マウスにおけるトログリフロジンの血糖降下作用 (Glu AUC<sub>0-12h</sub>)

平均値 + 標準誤差 (n=6)

\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

### 2.6.2.2.3 ZDF ラットにおける血糖降下作用及び尿糖排泄亢進作用

(資料番号4.2.1.1-4)

肥満2型糖尿病モデル動物である ZDF ラット (10週齢, 雄) を用いて, 本薬単回経口投与時の随時血糖に対する作用及び尿糖排泄に対する作用を評価した。非絶食下にてラットに本薬 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) を経口投与し, 投与24時間後までの血糖値を経時的に測定した。また, 投与直後より12時間後まで4時間ごとに代謝ケージによる蓄尿を行い, 尿糖排泄量を測定した。同時に, 投与後経時的に血漿中薬物濃度を測定し, 薬物動態パラメータを求めた (2.6.4.8.1)。なお, 本モデルでの1 mg/kg は, 健康成人に臨床推奨用量 (20 mg) を投与した場合の C<sub>max</sub> 及び AUC<sub>0-inf</sub> 値とほぼ同等となる用量であると考えられる (表 2.6.4.8.1-2, 表 2.7.2.2.2.3-1)。

本薬は, すべての用量で投与1又は2時間後から溶媒投与群に比較して有意な血糖降下作用を示し, 0.1及び0.3 mg/kg では投与8時間後まで, 1, 3及び10 mg/kg では投与12時間後まで有意な血糖降下作用が認められた。投与24時間後ではいずれの用量においても溶媒投与群との有意な血糖値の差は認められなかった (図 2.6.2.2.3-1)。

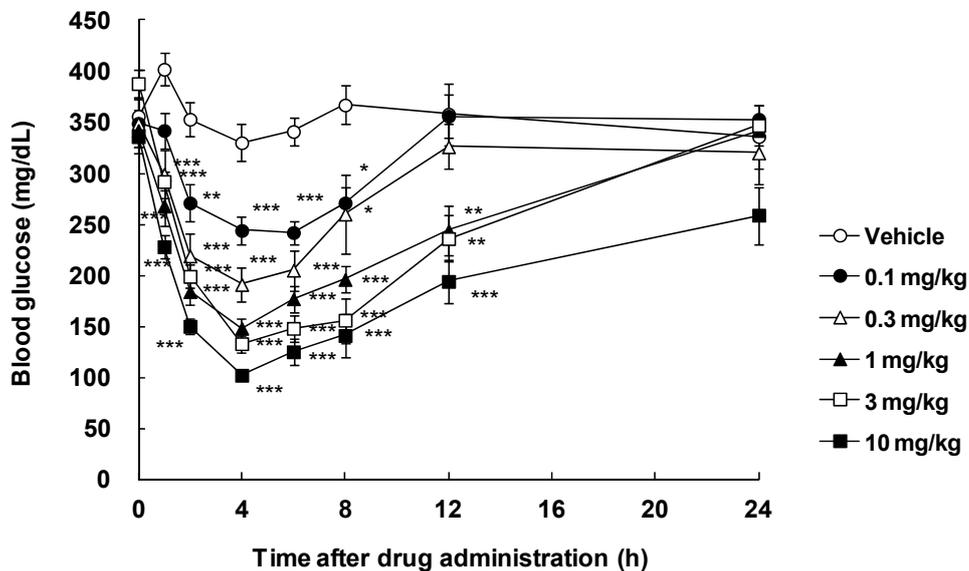
投与0から12時間後までの血糖値の曲線下面積 (Glu AUC<sub>0-12h</sub>) を算出すると, 本薬のすべての用量において溶媒投与群に比較して有意な Glu AUC<sub>0-12h</sub> の低下が認められ, その効果は用量依存的であった (P<0.0001, Jonckheere-Terpstra 法) (図 2.6.2.2.3-2)。

尿糖排泄に対する作用は, 血糖値の低下による尿糖排泄の低下を補正するために, 血糖当りの尿糖排泄を表すグルコース腎排泄クリアランス値 (4時間にわたって尿中に排出されたグルコース量をこれに対応する血糖曲線下面積で除した値) を算出して評価した (図 2.6.2.2.3-3)。

投与後0~4時間, 4~8時間, 8~12時間の3つの採尿期間において, 本薬は用量依存的にグルコース腎排泄クリアランス値を増加させた (P<0.001, Jonckheere-Terpstra 法)。3つの採尿期間のいずれにおいても, 3及び10 mg/kg の用量におけるグルコース腎排泄クリアラン

ス値は溶媒投与群と比較して有意に高値であった。これらの結果により、本薬の作用機序である腎臓におけるグルコース再吸収阻害に起因する尿糖排泄の亢進が確認された。

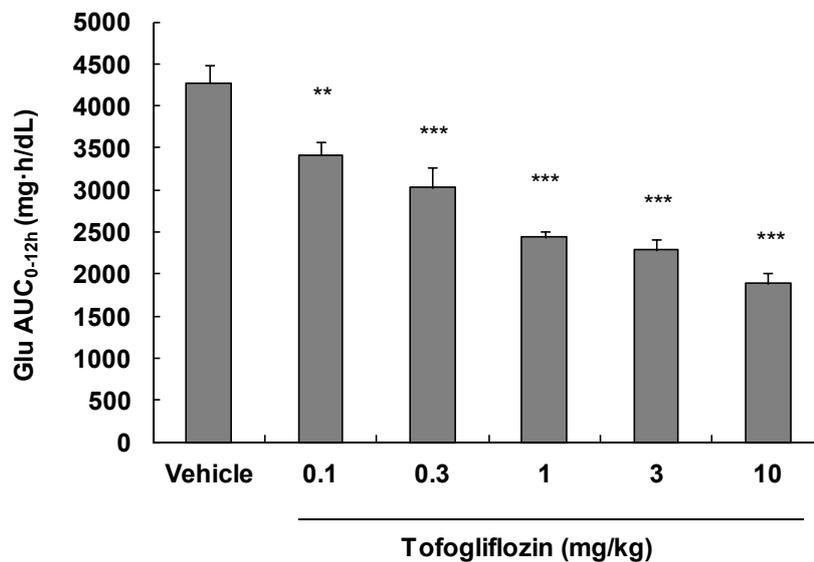
図 2.6.2.2.3-1 ZDF ラットにおけるトホグリフロジンの血糖降下作用（血糖値の経時変化）



平均値 ± 標準誤差 (n=6)

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

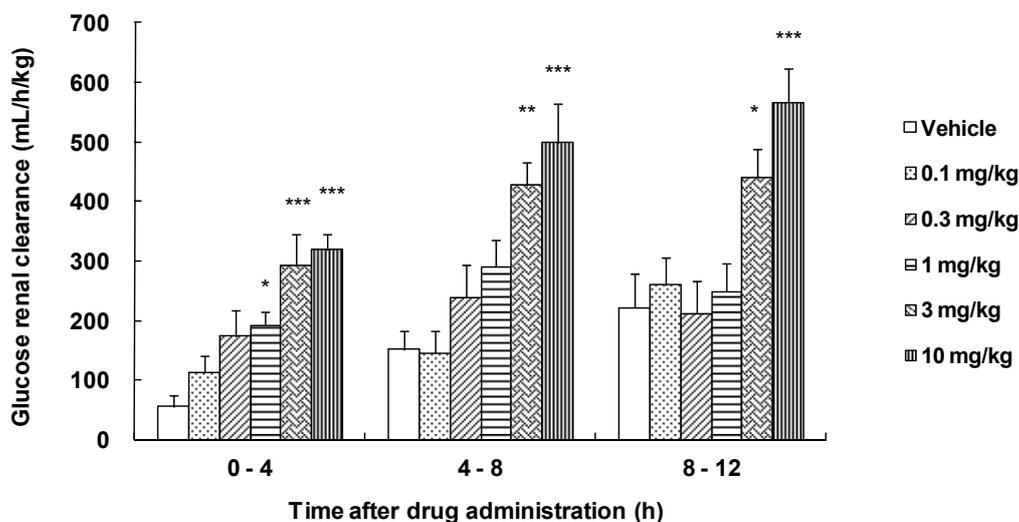
図 2.6.2.2.3-2 ZDF ラットにおけるトホグリフロジンの血糖降下作用 (Glu AUC<sub>0-12h</sub>)



平均値 + 標準誤差 (n=6)

\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

図 2.6.2.2.3-3 ZDF ラットにおけるトホグリフロジンのグルコース腎排泄クリアランス値に対する影響



平均値 + 標準誤差 (n=6)

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

#### 2.6.2.2.4 正常動物における血糖値への影響

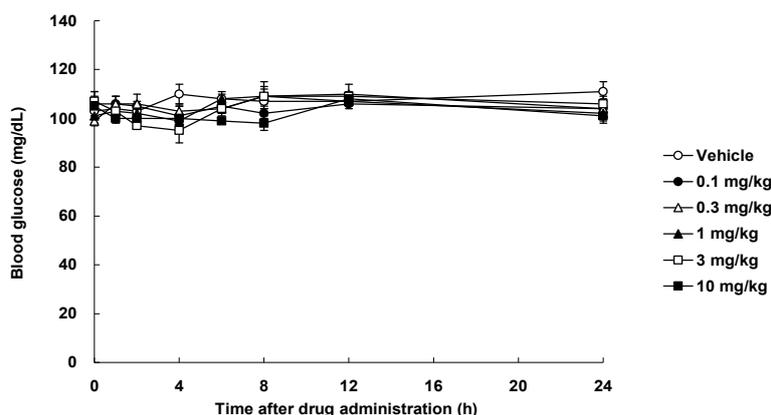
(資料番号4.2.1.1-5, 4.2.1.1-2)

Wistar ラット (8週齢, 雄) を用いて, 正常動物における本薬単回経口投与時の随時血糖に対する作用を評価した。非絶食下にてラットに本薬 (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) を経口投与し, 投与24時間後までの血糖値を経時的に測定した。

投与1, 2, 4, 6, 8, 12及び24時間後のいずれの時間においても, 各本薬投与群と溶媒投与群の随時血糖との間に有意な差は認められず, 正常ラットにおいて本薬は10 mg/kgまでの用量で随時血糖降下作用を示さなかった (図 2.6.2.2.4-1)。

SD ラット (8週齢, 雄) に本薬 (1, 3, 10 mg/kg) を投与し, 投与0~6時間, 6~12時間及び12~24時間後までの尿糖排泄量と血糖値に及ぼす影響を検討した。投与後6時間まではすべての用量で, 6~12時間では3及び10 mg/kgで, 12~24時間では10 mg/kgの用量で, 有意な尿糖排泄亢進作用が認められたが, 投与6, 12及び24時間後のいずれの時間においても有意な血糖値の低下は認められなかった。

図 2.6.2.2.4-1 Wistar ラットにおけるトホグリフロジンの血糖降下作用（血糖値の経時変化）



平均値 ± 標準誤差 (n=6)

各血糖値測定ポイントにおいて、溶媒投与群と各トホグリフロジン投与群の間に統計的有意差なし（パラメトリック Dunnett 型検定）

### 2.6.2.2.5 2型糖尿病モデル動物における食後過血糖改善作用

（資料番号4.2.1.1-6）

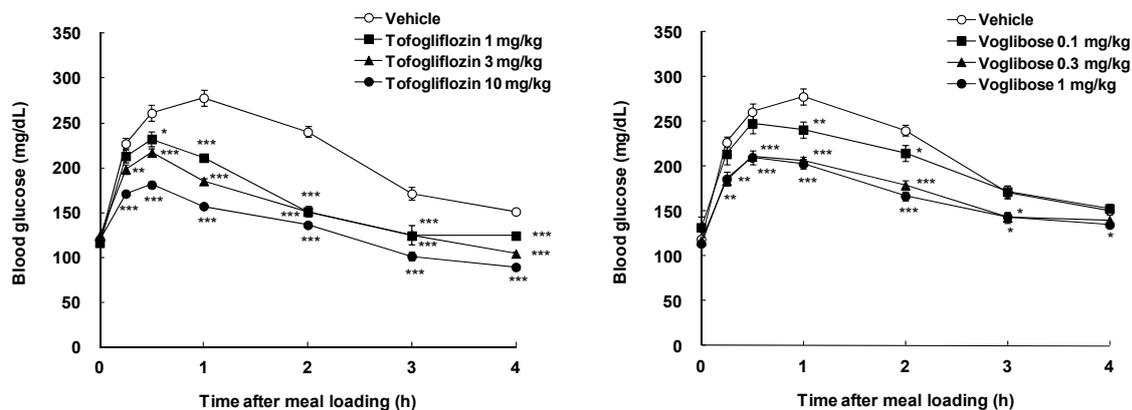
非肥満2型糖尿病モデル動物である GK ラット（9週齢，雄）を用いて、本薬の単回経口投与での食後過血糖改善作用を液体飼料負荷試験における血糖上昇抑制作用を指標に評価した。一晚絶食した GK ラットに本薬（1, 3, 10 mg/kg）を液体飼料負荷の5分前に経口投与した。また、陽性対照として食後過血糖改善薬である  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤のボグリボース（0.1, 0.3, 1 mg/kg）を本薬と同様に液体飼料負荷の5分前に経口投与した。液体飼料負荷の10分前（投与0時間）、15分、30分、1, 2, 3, 4時間後の血糖値を経時的に測定した。

本薬、ボグリボースともに、GK ラットの液体飼料負荷後の血糖上昇を溶媒投与群に比較して有意に抑制した（図 2.6.2.2.5-1）。

陽性対照のボグリボースは、0.3及び1 mg/kg の用量において血糖値曲線下面積（Glu AUC<sub>0-4h</sub>）を溶媒投与群に比較して有意に抑制し、その Glu AUC<sub>0-4h</sub> はそれぞれ686 ± 16（平均値 ± 標準誤差）及び670 ± 12 mg•h/dL であった。本薬は、1 mg/kg 以上の用量で液体飼料負荷後の Glu AUC<sub>0-4h</sub> を溶媒投与群に比較して有意に低下させ、1, 3, 10 mg/kg の各用量における Glu AUC<sub>0-4h</sub> はそれぞれ649 ± 11, 614 ± 15及び526 ± 8 mg•h/dL であった。なお、溶媒投与群の Glu AUC<sub>0-4h</sub> は864 ± 18 mg•h/dL であった（図 2.6.2.2.5-2）。

これらの結果から、本薬は GK ラットにおいてボグリボースと同様に食後過血糖改善作用を有することが示された。

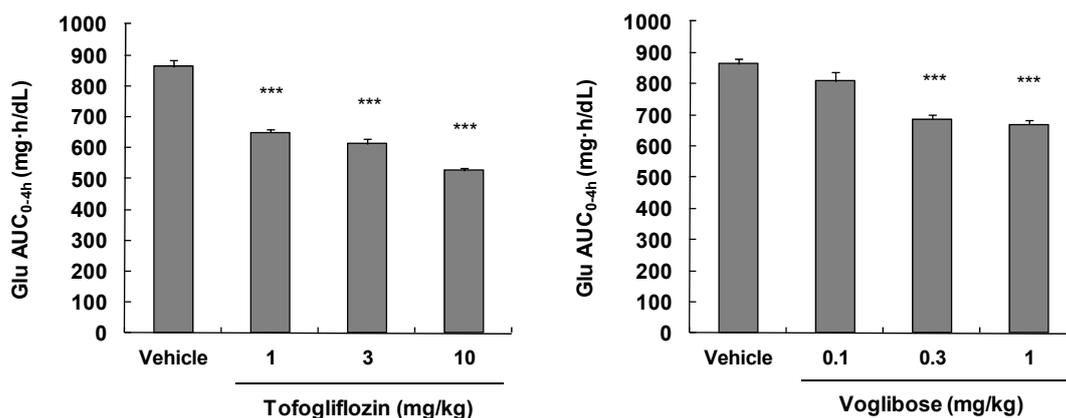
図 2.6.2.2.5-1 GK ラット液体飼料負荷試験におけるトグリフロジンあるいはボグリボースの血糖降下作用（液体飼料負荷後の血糖値推移）



平均値 ± 標準誤差 (n=6)

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

図 2.6.2.2.5-2 GK ラット液体飼料負荷試験におけるトグリフロジンあるいはボグリボースの血糖降下作用 (Glu AUC<sub>0-4h</sub>)



平均値 + 標準誤差 (n=6)

\*\*\*P<0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

## 2.6.2.2.6 2型糖尿病モデル動物における血糖降下作用（反復投与）

(資料番号4.2.1.1-7)

肥満2型糖尿病モデルである db/db マウス（投与開始時8週齢，雄）を用いて，本薬を4週間反復経口投与し，糖化ヘモグロビン値への影響，db/db マウスの病態への影響を評価した。本薬（0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg）を1日1回，28日間，反復経口投与した。初回投与日（Day 0）の1日前（Day - 1）及び28日後（Day 28, 最終投与の翌日）の糖化ヘモグロビン値，随時血糖及び血漿中インスリン値を測定した。また，Day 28以降は休薬し，Day 30から Day 31にかけて絶食し，経口グルコース負荷試験を実施した。体重及び1日平均摂餌量を，試験期間を通じて経時的に測定した。

本薬は0.3 mg/kg/日以上用量で，投与4週間後の糖化ヘモグロビン値を溶媒投与群に比較して有意に低下させた（図 2.6.2.2.6-1）。また，3 mg/kg/日以上用量で，投与4週間後の随時血糖が溶媒投与群に比較して有意に低下していた（図 2.6.2.2.6-2）。糖化ヘモグロビンは長期の

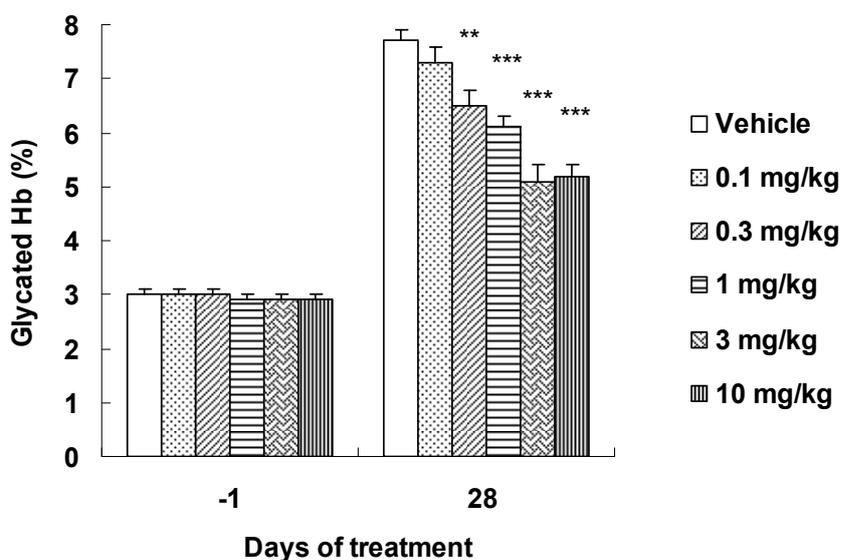
血糖コントロールを反映するパラメータであり、本薬の反復投与により、db/db マウスの血糖値は長期間に亘り低下していたと考えられた。

本薬の3 mg/kg/日以上用量において、投与4週間後の血漿中インスリン値が溶媒投与群に比較して有意に高値であった（図 2.6.2.2.6-3）。また、4週間反復投与の最終投与から4日後に実施した経口グルコース負荷試験において、0.3, 1, 10 mg/kg/日投与群ではグルコース負荷4時間後、3 mg/kg/日投与群ではグルコース負荷0.5, 2, 4時間後に、溶媒投与群に比較して有意な血糖上昇の抑制がみられた。更に3 mg/kg/日以上投与群で血糖値曲線下面積（Glu AUC<sub>0-4h</sub>）が溶媒投与群に比較して有意に低下した（図 2.6.2.2.6-4）。

なお、体重は、3 mg/kg/日投与群で、Day 28及びDay 30において、溶媒投与群に比較して有意に高値であったが、その他の用量では溶媒投与群との有意な体重の差は認められなかった。1日平均摂餌量は、10 mg/kg/日投与群で、Day 10からDay 14の期間でのみ、溶媒投与群に比較して有意に増加していた（図 2.6.2.2.6-5）。

以上、本薬は反復投与により db/db マウスの血糖値を長期間低下させることが示され、更に休薬後においても耐糖能の改善がみられたことから、本薬は db/db マウスの糖尿病病態を改善したものと考えられた。

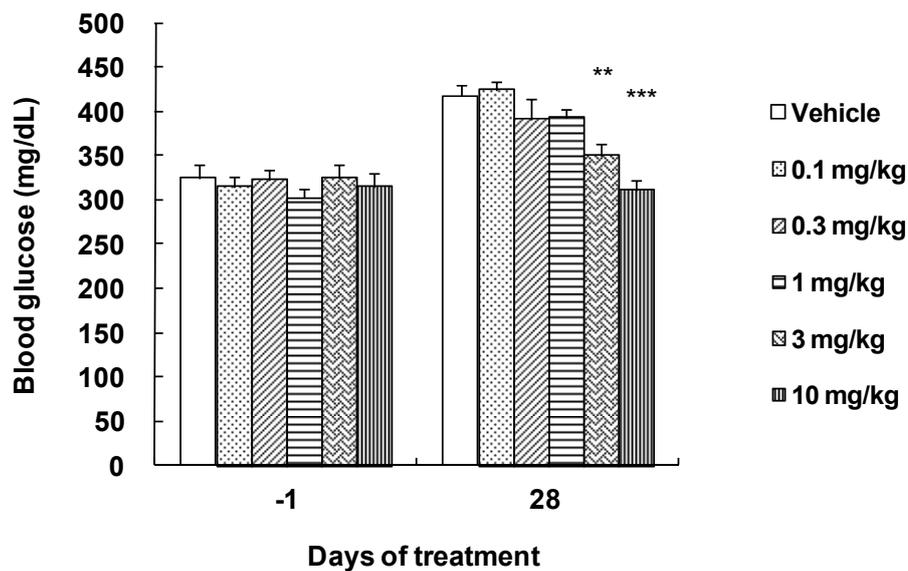
図 2.6.2.2.6-1 db/db マウスにおけるトホグリフロジン4週間反復経口投与による糖化ヘモグロビン値への影響



平均値 + 標準誤差 (n=10)

\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

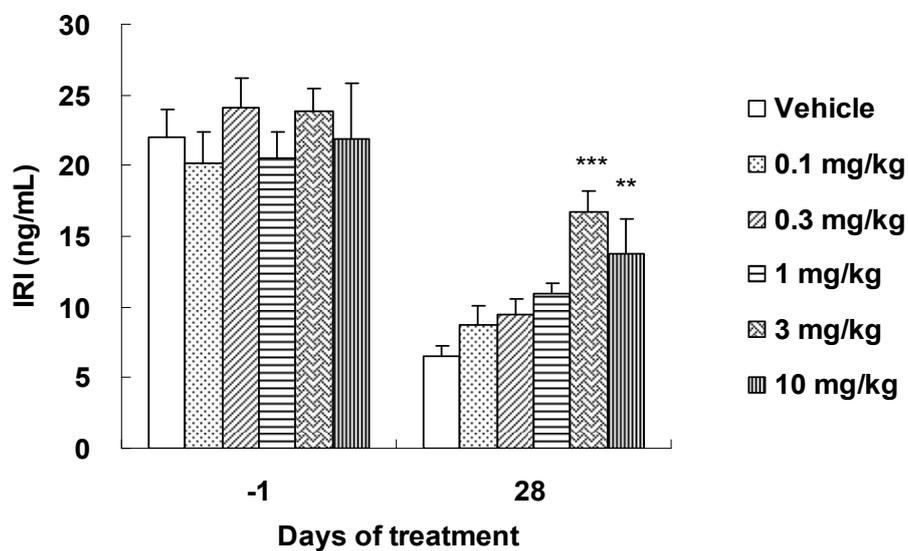
図 2.6.2.2.6-2 db/db マウスにおけるトホグリフロジン4週間反復経口投与による随時血糖への影響



平均値 + 標準誤差 (n=10)

\*\*P&lt;0.01, \*\*\*P&lt;0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

図 2.6.2.2.6-3 db/db マウスにおけるトホグリフロジン4週間反復経口投与による血漿中インスリン値への影響

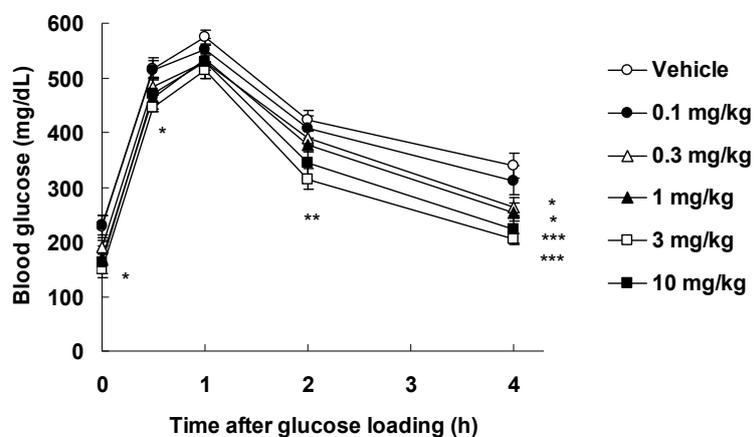


平均値 + 標準誤差 (n=10)

\*\*P&lt;0.01, \*\*\*P&lt;0.001: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

図 2.6.2.2.6-4 db/db マウスにおけるトホグリフロジン4週間反復経口投与による耐糖能への影響

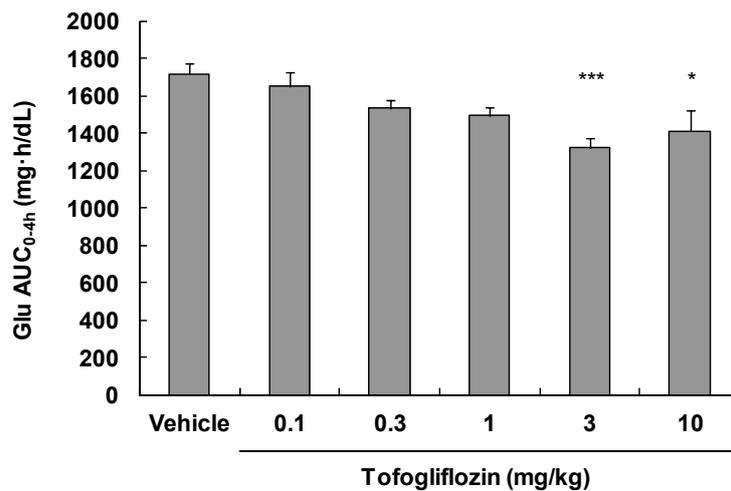
<グルコース負荷試験における血糖値推移>



平均値 ± 標準誤差 (n=10)

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 : 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)

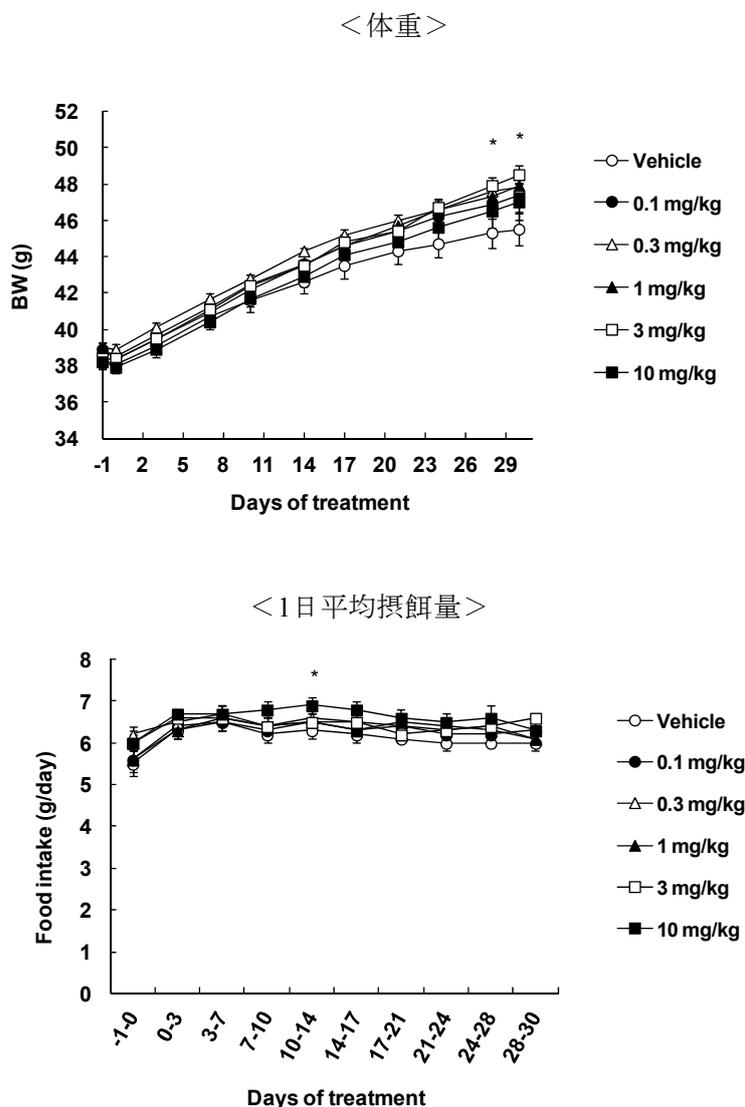
<グルコース負荷試験における血糖値曲線下面積 (Glu AUC<sub>0-4h</sub>) >



平均値 + 標準誤差 (n=10)

\*P<0.05, \*\*\*P<0.001 : 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

図 2.6.2.2.6-5 db/db マウスにおけるトホグリフロジン4週間反復経口投与試験における体重及び1日平均摂餌量への影響



平均値 ± 標準誤差 (n=10)

\*P<0.05: 溶媒投与群に対する有意差 (パラメトリック Dunnett 型検定)。

## 2.6.2.3 副次的薬理試験

### 2.6.2.3.1 本薬の代謝物の SGLT1及び SGLT2に対する阻害活性

(資料番号4.2.1.2-1)

本薬の代謝物である脱水素体 (CH5086516), ケトン体 (CH5098291), 二級水酸化体エピマー1 (CH5106786), 二級水酸化体エピマー2 (CH5106787), 一級水酸化体 (CH5108987), カルボン酸体 (CH5234447) のヒト SGLT1及びヒト SGLT2に対する阻害活性を評価した。ヒト SGLT1及びヒト SGLT2をそれぞれ発現した CHO 細胞を用いて, 基質である methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside の Na<sup>+</sup>依存的な取り込みを50%阻害する濃度 (IC<sub>50</sub>値) を求めた。また, 本薬の代謝物のヒト SGLT1及びヒト SGLT2に対する阻害活性を本薬の IC<sub>50</sub> 値を1として効力比 (IC<sub>50</sub> ratio; 各代謝物の IC<sub>50</sub> 値を本薬の IC<sub>50</sub> 値で除した数値) を算出, 比較して評価した。なお, 陽性対照薬としてはフロリジンを用いた。

本薬のヒトSGLT1及びSGLT2に対するIC<sub>50</sub>値は、それぞれ13 µmol/L, 0.0039 µmol/Lであった(表 2.6.2.3.1-1)。

本薬の代謝物のヒトSGLT2に対する阻害活性は、脱水素体、一級水酸化体が本薬とほぼ同等であり、ケトン体、二級水酸化体エピマー1、二級水酸化体エピマー2では本薬に対して3-4倍程度弱く、カルボン酸体では本薬の700倍弱かった。

本薬の代謝物のヒト SGLT1阻害活性は、ヒト SGLT2阻害活性に比べて弱かった。本薬と比較したヒト SGLT1阻害活性は、脱水素体が本薬の0.51倍とやや強く、一級水酸化体ではほぼ同等、ケトン体、二級水酸化体エピマー1、二級水酸化体エピマー2では3-4倍程度弱く、カルボン酸体では本薬よりも15倍を超えて弱かった(表 2.6.2.3.1-1)。

表 2.6.2.3.1-1 トホグリフロジン, トホグリフロジン代謝物及びフロリジンのヒト SGLT1 及びヒト SGLT2阻害活性

Compound	IC <sub>50</sub> (µmol/L)		IC <sub>50</sub> Ratio to Tofogliflozin	
	hSGLT2	hSGLT1	hSGLT2	hSGLT1
Phlorizin	0.015	0.20	3.7	0.016
Tofogliflozin	0.0039	13	1.0	1.0
CH5086516 (脱水素体)	0.0046	6.6	1.2	0.51
CH5098291 (ケトン体)	0.016	44	4.1	3.4
CH5106786 (二級水酸化体エピマー1)	0.015	42	3.8	3.3
CH5106787 (二級水酸化体エピマー2)	0.014	45	3.5	3.5
CH5108987 (一級水酸化体)	0.0049	17	1.3	1.3
CH5234447 (カルボン酸体)	2.7	>200	700	>15

IC<sub>50</sub>値は2回のアッセイの平均値を示す。

### 2.6.2.3.2 本薬及び代謝物の各種受容体, イオンチャネル及びトランスポーター結合活性

(資料番号4.2.1.2-2)

本薬及び代謝物(カルボン酸体, 一級水酸化体, 二級水酸化体エピマー1及び二級水酸化体エピマー2)の各種受容体, イオンチャネル及びトランスポーターに対する *in vitro* での結合能を評価した。その結果, 本薬及び代謝物は, 本薬のヒト SGLT2に対する *K<sub>i</sub>* 値に比較して3000倍以上高い濃度である10 µmol/L では, 各種受容体, イオンチャネル及びトランスポーターに対してほとんど結合しないか, 又は弱い結合能しか有さなかった。ただし, 二級水酸化体エピマー2のみが, 10 µmol/L の濃度でσ受容体に結合する可能性(結合阻害率64%)が示唆された。

### 2.6.2.3.3 本薬のグルコーストランスポーター (GLUT) 阻害活性

(資料番号4.2.1.1-2)

ヒト骨格筋由来細胞株(XM13A1)とラット骨格筋由来細胞株(L6), マウス脂肪由来細胞株(3T3-L1)のインスリン刺激時のグルコース取り込みに対する本薬の阻害活性を評価した。その結果, 本薬のグルコース取り込み阻害活性(IC<sub>50</sub>値)は100 µmol/L以上であった。骨格筋や脂肪由来細胞株のインスリン刺激時のグルコース取り込みは主に GLUT4や GLUT1が担っており<sup>11),12)</sup>, 本実験において本薬の GLUT4及び GLUT1 に対する阻害活性を評価していると考えられる。本薬はヒト SGLT2に対する *K<sub>i</sub>* 値(0.0029 µmol/L)の30000倍以上の高濃度においても GLUT1あるいは GLUT4によると考えられるグルコース取り込み作用を強く抑制することはなかった。

## 2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験は、ICH ガイドライン S7A（安全性薬理試験ガイドライン）及び S7B（ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価）に基づき実施し、本薬の中樞神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響を評価した。また、本薬の代謝物であるカルボン酸体及び二級水酸化体に関しては hERG 試験を実施した。これらの試験はすべて GLP を遵守して実施した。なお、ラット及びカニクイザルを用いた試験の溶媒は、いずれの試験についても 0.5 w/v% sodium carboxymethyl cellulose containing 0.2 w/v% polyethylene glycol (PEG)-60 hydrogenated castor oil を用いた。

### 2.6.2.4.1 中樞神経系

#### 2.6.2.4.1.1 ラットの中樞神経系に及ぼす影響（Irwin 変法）

（資料番号4.2.1.3-1）

SD ラット（雄6例/群）に本薬を0（対照）、10、80及び640 mg/kg の用量で単回経口投与し、Irwin 変法に準じて一般状態及び行動の観察を行った。測定は投与前及び投与後0.5、2、4及び8時間に実施した。

本薬の薬理作用に伴う排尿増加が10 mg/kg 以上の群でみられ、更に体温低下が640 mg/kg 群で投与後4時間の観察で、眼瞼閉塞が640 mg/kg 群で投与後2時間及び4時間の観察で認められた。なお、640 mg/kg 群の体温の低下及び眼瞼閉塞は、給餌後の投与後8時間には回復した。その他に異常はみられなかった。低体温及び眼瞼閉塞は、本薬の高用量投与により急激な血糖低下を来したことに起因する一般状態の悪化を反映したものであり、中樞神経系への直接的な作用ではないと考えられる。なお、一般毒性試験においても、一般状態観察において中樞神経系への作用を疑うような所見は認められていない。

本試験では他の試験の血漿中薬物濃度データにより本試験における本薬の曝露量の評価は可能であると判断したことから、血漿中薬物濃度測定を実施しなかった。ラット1カ月間反復経口投与毒性試験（投与量：0、10、40、160、640 mg/kg/日）では、 $C_{max}$  は、10及び40 mg/kg/日では用量に概ね比例して増加したが、160及び640 mg/kg/日では用量比を下回る増加であった。 $AUC_{0-24h}$  は、10～640 mg/kg/日の投与量範囲で用量に概ね比例して増加した。雄の初回投与日において、 $C_{max}$  は40 mg/kg/日群で10.9  $\mu\text{g/mL}$ 、160 mg/kg/日群で26.0  $\mu\text{g/mL}$ 、640 mg/kg/日群で50.2  $\mu\text{g/mL}$  であり、 $AUC_{0-24h}$  は40 mg/kg/日群で50.1  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、160 mg/kg/日群で210  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、640 mg/kg/日群で841  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$  であり、CSG010JP 試験で臨床推奨用量20 mg/日を1日1回経口投与した被験者の  $C_{max}$  (0.509  $\mu\text{g/mL}$ )、 $AUC_{inf}$  (2.14  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ) と比較した場合、40 mg/kg/日群で  $C_{max}$  及び  $AUC$  とともに約20倍、160 mg/kg/日群では  $C_{max}$  比較で約50倍、 $AUC$  比較で約100倍、640 mg/kg/日群では  $C_{max}$  比較で約100倍、 $AUC$  比較で約390倍であった。よって、臨床推奨用量の曝露量と本試験における80 mg/kg/日群では少なくとも約20倍以上、640 mg/kg/日群では約100倍以上の曝露を確保しており、十分な安全域があると考えられる。

また、ヒト主要代謝物であるカルボン酸体については、ラット6カ月間反復経口投与毒性試験（投与量：0、5、40、320 mg/kg/日）で血漿中カルボン酸体濃度測定を実施している。同試験（投与181日、雄）では、 $C_{max}$  が40 mg/kg/日群で0.0470  $\mu\text{g/mL}$ 、320 mg/kg/日群で0.323  $\mu\text{g/mL}$ 、 $AUC_{0-24h}$  が40 mg/kg/日群で0.299  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 、320 mg/kg/日群で3.31  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$  であり、CSG010JP 試験で本薬20 mg/日を1日1回経口投与した被験者のカルボン酸体の  $C_{max}$  (0.162  $\mu\text{g/mL}$ )、 $AUC_{inf}$  (1.840  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ) と比較した場合、40 mg/kg/日群で  $C_{max}$ 、 $AUC$  とともに約0.2倍、320 mg/kg/日群では  $C_{max}$  及び  $AUC$  とともに約2倍であった。なお、最高用量である320 mg/kg/日群においても中樞神経系への影響を示唆する変化はみられなかった。更に、カルボン酸体を投与したラット3カ月間反復経口投与毒性試験（投与量：0、125、500、2000 mg/kg/日）では、2000 mg/kg/日群においても軟便以外に一般状態に変化はみられなかった。2000 mg/kg/日群（投与13週、雄/雌）では  $C_{max}$  が2.45/2.61  $\mu\text{g/mL}$ 、 $AUC_{0-24h}$  が24.0/25.4  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$  であり、臨床

推奨用量の曝露と比較して  $C_{max}$  で15/16倍、AUC で13/14倍であった。このことから、本試験における640 mg/kg/日群ではカルボン酸体は十分に曝露されていると考えられ、直接的な中枢神経系への作用を疑う所見はみられず、更にカルボン酸体を直接ラットに投与した高曝露条件下の3カ月間反復経口投与毒性試験においても中枢作用を疑う変化がみられなかったことから、カルボン酸体が中枢神経系に影響を及ぼす可能性は少ないと考えられた。

## 2.6.2.4.2 呼吸系

### 2.6.2.4.2.1 ラットの呼吸系に及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-2)

SD ラット (雄8例/群) に本薬を0 (対照) , 10, 80及び640 mg/kg の用量で単回経口投与し、全身プレチスモグラフィ法により呼吸機能 (呼吸数, 1回換気量及び毎分換気量) を評価した。測定は投与前及び投与後0.5, 2, 4時間に実施した。

いずれの投与量においても呼吸機能に影響を及ぼさなかった。

本試験では血漿中薬物濃度測定を実施していないが、ラット1カ月間反復経口投与毒性試験 (0, 10, 40, 160, 640 mg/kg/day 投与, 初回投与日, 雄) では、640 mg/kg/日群で  $C_{max}$  が50.2  $\mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{0-24h}$  が841  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$  であり、CSG010JP 試験で本薬20 mg/日を1日1回経口投与した被験者の  $C_{max}$  (0.509  $\mu\text{g/mL}$ ),  $AUC_{inf}$  (2.14  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ) と比較した場合、 $C_{max}$  比較で約100倍、AUC 比較で約390倍であった。よって、本試験における NOEL である640 mg/kg/日投与では臨床推奨用量の曝露量の100倍以上の曝露を確保しており、十分な安全域があると考えられた。また、カルボン酸体についても、ラット6カ月間反復経口投与毒性試験 (投与量: 0, 5, 40, 320 mg/kg/日) で血漿中カルボン酸体濃度測定を実施している。同試験 (投与181日, 雄) では、 $C_{max}$  が320 mg/kg/日群で0.323  $\mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{0-24h}$  が320 mg/kg/日群で3.31  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$  であり、CSG010JP 試験で本薬20 mg/日を1日1回経口投与した被験者のカルボン酸体の  $C_{max}$  (0.162  $\mu\text{g/mL}$ ),  $AUC_{inf}$  (1.840  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ ) と比較した場合、320 mg/kg/日群では  $C_{max}$  及び AUC とともに約2倍であった。なお、最高用量である320 mg/kg/日群においても呼吸系への影響を示唆する変化はみられなかった。更に、カルボン酸体を投与したラット3カ月間反復経口投与毒性試験 (投与量: 0, 125, 500, 2000 mg/kg/日) では、2000 mg/kg/日群においても軟便以外に一般状態に変化はみられなかった。2000 mg/kg/日群 (投与13週, 雄/雌) では  $C_{max}$  が2.45/2.61  $\mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{0-24h}$  が24.0/25.4  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$  であり、臨床推奨用量の曝露と比較して  $C_{max}$  で15/16倍、AUC で13/14倍であった。このことから、本試験における640 mg/kg/日群ではカルボン酸体は十分に曝露されていると考えられ、直接的な呼吸系への作用を疑う所見はみられず、更にカルボン酸体を直接ラットに投与した高曝露条件下の3カ月間反復経口投与毒性試験においても呼吸系への影響を疑う変化がみられなかったことから、カルボン酸体が呼吸系に影響を及ぼす可能性は少ないと考えられた。

## 2.6.2.4.3 心血管系

### 2.6.2.4.3.1 hERG チャネルに及ぼす影響

(資料番号4.2.1.3-4)

hERG チャネルを発現させた HEK293細胞を用いて、本薬の hERG 電流に及ぼす影響をホールセルパッチクランプ法にて評価した。本薬の濃度は10, 30, 100, 300及び1000  $\mu\text{mol/L}$  とし、陽性対照薬物として E-4031 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) を用いた。陽性対照薬物である E-4031は hERG 電流に対して有意な抑制作用を示し (抑制率: 92.0%) , 本試験の妥当性が確認された。

hERG 電流の抑制は300  $\mu\text{mol/L}$  以上の濃度で認められ、その  $IC_{20}$ 値は554  $\mu\text{mol/L}$  であった。この値は、CSG010JP 試験で臨床推奨用量20 mg/日を投与した被験者の遊離薬物最高血漿中濃度 (0.224  $\mu\text{mol/L}$ ) の約2470倍であった (ヒトでの非結合画分17%からフリー体濃度を算出)。また、無作用濃度である100  $\mu\text{mol/L}$  は臨床推奨用量20 mg/日を投与した被験者の遊離薬物最高

血漿中濃度の約450倍であった。

#### 2.6.2.4.3.2 カニクイザルの心血管系に及ぼす影響（テレメトリー法）

（資料番号4.2.1.3-3）

覚醒下カニクイザル（雄4例）に本薬を0（対照，0.5 w/v% sodium carboxymethyl cellulose containing 0.2 w/v% polyethylene glycol (PEG)-60 hydrogenated castor oil），10，30及び100 mg/kgの用量で単回経口投与し，テレメトリー法により心血管系（血圧，心拍数及び心電図）及び体温に及ぼす影響を評価した。血圧，心拍数，心電図及び体温の解析は，投与前1時間，投与後1，2，4，8及び24時間に実施した。

いずれの投与量においても，血圧，心拍数，心電図及び体温に影響は認められなかったが，嘔吐が100 mg/kg 投与で1例認められた。この例では投与直後に嘔吐は観察されなかったが，投与後4時間の採血時の観察で嘔吐が発見された。100 mg/kg 投与後4時間における本薬の血漿中濃度（22.8 µg/mL）は，CSG010JP 試験でのヒト臨床推奨用量20 mg/日における  $C_{max}$ （509 ng/mL）の約45倍の値であった。カルボン酸体については本試験では測定していないものの，カニクイザル12カ月間反復経口投与毒性試験（投与量：0，10，30，100 mg/kg/日）では血漿中カルボン酸体濃度測定を実施している。同試験（投与初日，雄）では， $C_{max}$  が100 mg/kg/日群で0.445 µg/mL， $AUC_{0-24h}$  が100 mg/kg/日群で3.24 µg・h/mL であり，CSG010JP 試験で本薬20 mg/日を1日1回経口投与した被験者のカルボン酸体の  $C_{max}$ （0.162 µg/mL）， $AUC_{inf}$ （1.840 µg・h/mL）と比較した場合，100 mg/kg/日群では  $C_{max}$  で約3倍， $AUC$  で約2倍であった。

#### 2.6.2.4.3.3 代謝物の hERG チャンネルに及ぼす影響

（資料番号4.2.1.3-5）

hERG チャンネルを発現させた HEK293細胞を用いて，本薬のヒト代謝物であるカルボン酸体及び二級水酸化体の hERG 電流に及ぼす影響をホールセルパッチクランプ法にて評価した。濃度は100，300，1000 µmol/L（カルボン酸体）あるいは30，100，300，1000 µmol/L（二級水酸化体）とし，陽性対照薬物として E-4031（0.1 µmol/L）を用いた。陽性対照薬物である E-4031 は hERG 電流に対して有意な抑制作用を示し（抑制率：91.0%），本試験の妥当性が確認された。

カルボン酸体について，hERG 電流の抑制は1000 µmol/L までみられず，CSG010JP 試験での臨床推奨用量（20 mg/日）の遊離薬物最高血漿中濃度（フリー体，0.175 µmol/L）の約5700倍であった。二級水酸化体 では，最高濃度である1000 µmol/L においてのみ，わずかな hERG 電流の抑制（8.7%）が認められたが，無作用濃度である300 µmol/L は BP22320試験で臨床推奨用量20 mg/日投与時の遊離薬物最高血漿中濃度（フリー体，0.026 µmol/L）の約11500倍であった。よって，安全域は十分に確保されており，ヒトでのリスクは少ないと判断した。

#### 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当無し。

#### 2.6.2.6 考察及び結論

本薬の SGLT に対する阻害活性を SGLT1あるいは SGLT2発現細胞を用いて評価した。また，本薬の血糖降下作用を2型糖尿病モデルマウスあるいはラットを用いた *in vivo* 試験により評価し，単回経口投与時の随時血糖，尿糖排泄，食後過血糖への影響及び反復投与時の糖化ヘモグロビン値，血漿中インスリン値，耐糖能などへの影響について評価した。また，正常ラットにおける単回経口投与時の随時血糖への影響についても評価した。更に安全性薬理試験を実施し，本薬が中枢神経系，呼吸系及び心血管系に及ぼす影響について評価した。

本薬の SGLT2阻害活性は、ヒトにおいて SGLT1の2100倍、マウスにおいては SGLT1の190倍、ラットにおいては SGLT1の560倍強く、本薬は SGLT2選択的阻害剤であることが確認された。

SGLT1は腎尿細管だけでなく小腸においてもグルコース及びガラクトースの輸送に関与し、SGLT1に変異を有する人は重篤な下痢を症状とするグルコース・ガラクトース吸収不全症を引き起こすことが知られている<sup>1)3)</sup>。一方、SGLT2の発現は腎臓に特異的であり、遺伝的な SGLT2の機能不全により引き起こされる家族性腎性糖尿病においては、尿糖が検出される以外には健康上の問題はなく、血糖も正常であることが報告されていることから<sup>4)6)</sup>、SGLT2阻害に基く副作用のリスクは低いと考えられる。

本薬の単回経口投与における随時血糖に対する作用を肥満2型糖尿病モデルマウス (db/db マウス)あるいはラット (ZDF ラット)を用いて評価した結果、いずれのモデル動物においても、本薬は投与12時間後までの血糖値を用量依存的に低下させた。本薬の尿糖排泄への影響 (グルコース腎排泄クリアランス値)について、ZDF ラットを用いて評価した結果、本薬はグルコース腎排泄クリアランス値を用量依存的に増加させることが示された。グルコース腎排泄クリアランス値は、血糖値で補正した尿糖排泄の大きさを示しており、この値の増加は、腎臓におけるグルコース再吸収阻害による尿糖排泄亢進を示していると考えられる<sup>7)</sup>。以上の試験成績から、本薬は、その作用機序である SGLT2阻害によると考えられる尿糖排泄の亢進を伴い、2型糖尿病動物の血糖値を低下させることが確認された。db/db マウス及び ZDF ラットは、いずれも強いインスリン抵抗性を有する2型糖尿病モデル動物であり<sup>8), 9)</sup>、これらの動物において本薬が血糖降下作用を示したことは、本薬がインスリン抵抗性の強い2型糖尿病の治療に有効であることを示唆するものである。

一方で、本薬は、正常ラットへの単回経口投与において、随時血糖を低下させず、正常血糖への影響は少ないと考えられた。

非肥満2型糖尿病ラットである GK ラットを用いた液体飼料負荷試験においては、本薬は液体飼料負荷後の血糖上昇を抑制した。本試験において、陽性対照薬として用いた食後過血糖改善薬であるボグリボースも液体飼料負荷後の血糖上昇を抑制し、本薬の血糖上昇抑制はボグリボースと同様であったことから、本薬は臨床においても食後過血糖を抑制する可能性が示唆された。また、GK ラットはグルコース応答性のインスリン分泌に障害のある2型糖尿病モデル動物であり<sup>10)</sup>、このモデル動物において本薬が血糖降下作用を示したことは、本薬がインスリン分泌に障害のある2型糖尿病の治療に有効であることを示唆するものである。

db/db マウスへの4週間反復経口投与により、本薬は糖化ヘモグロビン値を溶媒投与群に比較して有意に低下させた。本薬の単回経口投与により db/db マウスの随時血糖が低下すること、並びに本試験において4週間反復投与後にも随時血糖の低下がみられたことから、本薬の反復投与により db/db マウスの血糖値を長期間低下させていたと考えられ、本薬による長期的な血糖コントロールの改善が可能であることが示唆された。また、本試験において、本薬の4週間反復投与後の血漿中インスリン値が溶媒投与群に比較して有意に高値であった。db/db マウスは加齢に伴いその糖尿病病態が進展し、血糖値の上昇や血漿中インスリン値の低下がみられることが知られていることから<sup>8)</sup>、本薬は血糖値を降下するのみならず糖尿病の病態進展を抑制する可能性が示唆された。最終投与後に休薬期間を置いて実施した経口グルコース負荷試験においても、本薬投与群で、溶媒投与群に比較して有意な血糖上昇の抑制がみられ、本薬の反復投与により、溶媒投与群に比較して耐糖能が改善していることが示された。これらの結果は、本薬が臨床においても長期に血糖を良好にコントロールし、2型糖尿病の病態を改善させる可能性を示唆するものである。

安全性薬理試験からは、本薬が中枢神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響はないと考えられた。また、血漿中代謝物プロファイルは種間で異なるものの、ヒトにおける主要代謝物 (カルボン酸体)についてはラット、カニクイザルでヒト推定臨床推奨用量での曝露 ( $C_{max}$  : 0.162  $\mu\text{g/mL}$ ,  $AUC_{inf}$  : 1.840  $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ , CSG010JP)と同等若しくはそれ以上の曝露条件下で評価している (表2.6.4.5.3-1)。ラットについては、カルボン酸体を投与した3カ月間反復経口

投与毒性試験を実施しており、その中では一般状態観察において行動の変化など安全性薬理に関する異常は認められていない。また、カニクイザルテレメトリー試験の NOAEL である100 mg/kg/日投与時の血漿中カルボン酸体濃度は、カニクイザル12カ月間反復経口投与毒性試験の初回投与時のデータ ( $C_{\max}$ : 0.455  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ : 3.24  $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$ ) より、臨床推奨用量での曝露とほぼ同程度曝露できていると考えられる。hERG 試験においても実際にカルボン酸体を用いた試験を実施しており、十分な安全域が確保されていることから、非臨床試験の成績からは、主要代謝物（カルボン酸体）がヒトにおいて、心血管系、中枢神経系、呼吸系に与えるリスクは低いと考えられる。

以上、非臨床薬理試験成績から、本薬が種々の2型糖尿病モデルに対して血糖降下作用、食後過血糖改善作用を有し、また長期に良好な血糖コントロールが可能であることが示された。また、本薬は高い SGLT2選択性を有し、安全性薬理試験からも中枢神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響はないと考えられることから、臨床においても忍容性が高く、種々の病態の2型糖尿病に有効であることが期待される。

### 2.6.2.7 図表

本文中に記載した。

### 2.6.2.8 参考文献一覧

- 1) Wright EM. Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F10-8.
- 2) Wright EM, Hirsch JR, Loo DD, Zampighi GA. Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters. *J Exp Biol* 1997;200:287-93.
- 3) Wright EM, Turk E, Martin MG. Molecular basis for glucose-galactose malabsorption. *Cell Biochem Biophys* 2002;36:115-21.
- 4) Magen D, Sprecher E, Zelikovic I, Skorecki K. A novel missense mutation in *SLC5A2* encoding SGLT2 underlies autosomal-recessive renal glucosuria and aminoaciduria. *Kidney Int* 2005;67:34-41.
- 5) Kleta R, Stuart C, Gill FA, Gahl WA. Renal glucosuria due to *SGLT2* mutations. *Mol Genet Metab* 2004;82:56-8.
- 6) Santer R, Kinner M, Lassen CL, Schneppenheim R, Eggert P, Bald M, et al. Molecular analysis of the *SGLT2* gene in patients with renal glucosuria. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2873-82.
- 7) Yamaguchi K, Kato M, Suzuki M, Asanuma K, Aso Y, Ikeda S, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of the effect of an sodium-glucose cotransporter inhibitor, phlorizin, on renal glucose transport in rats. *Drug Metab Dispos* 2011;39:1801-7.
- 8) Kodama H, Fujita M, Yamaguchi I. Development of hyperglycaemia and insulin resistance in conscious genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice. *Diabetologia* 1994; 37:739-44.
- 9) Leonard BL, Watson RN, Loomes KM, Phillips ARJ, Cooper GJ. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol* 2005; 42:162-70.
- 10) Picarel-Blanchot F, Berthelie C, Bailbé D, Portha B. Impaired insulin secretion and excessive hepatic glucose production are both early events in the diabetic GK rat. *Am J Physiol* 1996; 271:E755-62.
- 11) Liao W, Nguyen MT, Imamura T, Singer O, Verma IM, Olefsky JM. Lentiviral short hairpin ribonucleic acid-mediated knockdown of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 2006;147: 2245-52.
- 12) Estrada DE, Ewart HS, Tsakiridis T, Volchuk A, Ramlal T, Tritschler H, et al. Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes* 1996; 45: 1798-804.

**デベルザ錠20mg/アプルウェイ錠20mg  
(トホグリフロジン水和物)  
[2型糖尿病]**

第2部 (モジュール 2)

CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

興和株式会社/サノフィ株式会社

## 略語一覧

略号	英名	和名
AUC <sub>0-t</sub>	Area under the plasma concentration-time curve from time zero to t	投与後0時間から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BW	Body weight	体重
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズ・ハムスター卵巣由来
C <sub>max</sub>	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
GK rat	Goto-Kakizaki rat	後藤－柿崎ラット
GLP	Good laboratory practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
Glu	Glucose	グルコース
Glu AUC <sub>0-4h</sub>	Area under the blood glucose curve from time zero to 4-hour	0から4時間までの血糖値の曲線下面積
Glu AUC <sub>0-12h</sub>	Area under the blood glucose curve from time zero to 12-hour	0から12時間までの血糖値の曲線下面積
Hb	Hemoglobin	ヘモグロビン
hERG	Human ether-a-go-go related gene	—
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎臓由来
IC <sub>20</sub>	Concentration producing 20% inhibition	20%阻害濃度
IC <sub>50</sub>	Concentration producing 50% inhibition	50%阻害濃度
IRI	Immunoreactive insulin	免疫反応性インスリン
K <sub>i</sub>	Inhibition constant	阻害定数
NC	Not calculated	未計算
NE	Not examined	未試験
SD rat; CD(SD) rat	Caesarean derived (Sprague-Dawley) rat strain	SD ラット, CD (SD)ラット
SGLT	Sodium-glucose cotransporter	ナトリウム・グルコース共輸送体
SMIT	Sodium-myo-inositol cotransporter	ナトリウム・ミオイノシトール共輸送体
T2DM	Type 2 diabetes mellitus	2型糖尿病
ZDF rat	Zucker diabetic fatty rat	Zucker 糖尿病性肥満ラット

## 目次

	頁
2.6.3 薬理試験概要表.....	4
2.6.3.1 効力を裏付ける試験一覧表.....	4
2.6.3.2 副次的薬理試験一覧表.....	5
2.6.3.3 安全性薬理試験一覧表.....	6
2.6.3.4 薬力学的相互作用試験一覧表.....	7
2.6.3.5 効力を裏付ける試験.....	7
2.6.3.6 副次的薬理試験.....	10
2.6.3.7 安全性薬理試験.....	13
2.6.3.7.1 中枢神経系に及ぼす影響.....	13
2.6.3.7.2 呼吸系に及ぼす影響.....	13
2.6.3.7.3 心血管系に及ぼす影響.....	14
2.6.3.7.4 心血管系に及ぼす影響（代謝物：カルボン酸体及び二級水酸化体）.....	14
2.6.3.8 薬力学的薬物相互作用試験.....	14

## 2.6.3 薬理試験概要表

## 2.6.3.1 効力を裏付ける試験一覧表

試験項目	動物種又は試験試料	試験方法	実施施設	試験番号	資料番号
SGLT 阻害作用 (ヒト, マウス)	SGLT1発現 CHO 細胞 SGLT2発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	中外製薬(株)	PHM■■-0258	4.2.1.1-1
SGLT 阻害作用 (ラット)	SGLT1発現 COS-7細胞 SGLT2発現 COS-7細胞	<i>in vitro</i>	中外製薬(株)	Suzuki et al. (2012)	4.2.1.1-2 (参考資料)
SGLT3, SGLT 4, SGLT5, SGLT6, SMIT1阻害作用 (ヒト)	SGLT3発現 HEK293細胞 SGLT4発現 CHO 細胞 SGLT5発現 COS-7細胞 SGLT6発現 CHO 細胞 SMIT1発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	中外製薬(株)	Suzuki et al. (2012)	4.2.1.1-2 (参考資料)
血糖降下作用	db/db マウス (肥満2型糖尿病モデル)	<i>in vivo</i>	中外製薬(株)	PHM■■-0220	4.2.1.1-3
血糖降下作用・尿糖排泄亢進作用	ZDF ラット (肥満2型糖尿病モデル)	<i>in vivo</i>	中外製薬(株)	PHM■■-0238	4.2.1.1-4
血糖降下作用	Wistar ラット (正常動物)	<i>in vivo</i>	中外製薬(株)	PHM■■-0269	4.2.1.1-5
血糖降下作用・尿糖排泄亢進作用	SD ラット (正常動物)	<i>in vivo</i>	中外製薬(株)	Suzuki et al. (2012)	4.2.1.1-2 (参考資料)
食後過血糖抑制作用	GK ラット (非肥満2型糖尿病モ デル・液体飼料負荷試験)	<i>in vivo</i>	中外製薬(株)	PHM■■-0251	4.2.1.1-6
糖化ヘモグロビン低下作用	db/db マウス (肥満2型糖尿病モデル)	<i>in vivo</i>	中外製薬(株)	PHM■■-0216	4.2.1.1-7

## 2.6.3.2 副次的薬理試験一覧表

試験項目	動物種又は試験試料	試験方法	実施施設	試験番号	資料番号
代謝物のヒト SGLT 阻害作用	SGLT1発現 CHO 細胞 SGLT2発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	中外製薬(株)	PHM-0077	4.2.1.2-1
トホグリフロジン及び代謝物の各種受容体, イオンチャネル及びトランスporter結合活性	ヒト, ラット及びマウスの各種受容体, イオンチャネル及びトランスporter	<i>in vitro</i>		PHM-0147S	4.2.1.2-2 (参考資料)
トホグリフロジンのグルコーストランスporter (GLUT) 阻害活性	ヒト骨格筋由来細胞 (XM13A1), ラット骨格筋由来細胞 (L6), マウス脂肪由来細胞 (3T3-L1)	<i>in vitro</i>	中外製薬(株)	Suzuki et al. (2012)	4.2.1.1-2 (参考資料)



## 2.6.3.4 薬力学的相互作用試験一覧表

該当なし。

## 2.6.3.5 効力を裏付ける試験

試験項目	動物種又は試験系	試験方法/投与方法	結果	資料番号
<b><i>In vitro</i></b>				
SGLT 阻害作用 (ヒト, マウス)	ヒト, マウスの SGLT1 あるいは SGLT2 を発現してい る CHO 細胞	Methyl- $\alpha$ -D- glucopyranoside 取り込み阻害活性	<ul style="list-style-type: none"> <li>トホグリフロジンのヒト SGLT2 に対する <math>K_i</math> 値は 0.0029 <math>\mu\text{mol/L}</math>, ヒト SGLT1 に対する <math>K_i</math> 値は 6.0 <math>\mu\text{mol/L}</math> であり, ヒト SGLT1 に対するヒト SGLT2 への選択性 (<math>K_i</math> 値比) は 2100 倍であった。</li> <li>トホグリフロジンのマウス SGLT2 に対する <math>K_i</math> 値は 0.0064 <math>\mu\text{mol/L}</math>, マウス SGLT1 に対する <math>K_i</math> 値は 1.2 <math>\mu\text{mol/L}</math> であり, マウス SGLT1 に対するマウス SGLT2 への選択性 (<math>K_i</math> 値比) は 190 倍であった。</li> </ul>	4.2.1.1-1
SGLT 阻害作用 (ラット)	ラットの SGLT1 ある いは SGLT2 を発現し ている COS-7 細胞	Methyl- $\alpha$ -D- glucopyranoside 取り込み阻害活性	<ul style="list-style-type: none"> <li>トホグリフロジンのラット SGLT2 に対する <math>\text{IC}_{50}</math> 値は 0.0145 <math>\mu\text{mol/L}</math>, ラット SGLT1 に対する <math>\text{IC}_{50}</math> 値は 8.2 <math>\mu\text{mol/L}</math> であり, ラット SGLT1 に対するラット SGLT2 への選択性 (<math>\text{IC}_{50}</math> 値比) は 560 倍であった。</li> </ul>	4.2.1.1-2 (Suzuki et al. 2012)
SGLT3, SGLT4, SGLT5, SGLT6, SMIT1 阻害作用 (ヒト)	ヒトの SGLT3, SGLT4, SGLT5, SGLT6 あるいは SMIT1 を発現してい る各細胞 (HEK293 細胞, CHO 細胞ある いは COS-7 細胞)	基質 (Methyl- $\alpha$ -D- glucopyranoside, Fructose あるいは Myo- inositol) の取り込み阻 害作用	<ul style="list-style-type: none"> <li>トホグリフロジンのヒト SGLT3, SGLT4, SGLT5, SGLT6 及び SMIT1 に対する SGLT2 選択性 (<math>\text{IC}_{50}</math> 値比) は, それぞれ 19000 倍, 1500 倍, 540 倍, 6200 倍及び 28000 倍であった。</li> </ul>	4.2.1.1-2 (Suzuki et al. 2012)

効力を裏付ける試験（続）

試験項目	動物種又は試験系	試験方法/投与方法	結果	資料番号
<b>In vivo</b>				
血糖降下作用（随 時血糖）	db/db マウス（肥 満 2 型糖尿病モデ ル） 9 週齢，雄	トホグリフロジン（0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg）を単 回経口投与	0.1 mg/kg 以上の用量で投与直前（0時間）から投与12時間後まで の血糖値の曲線下面積（Glu AUC <sub>0-12h</sub> ）を用量依存的に低下させ た。	4.2.1.1-3
血糖降下作用（随 時血糖）・尿糖排 泄亢進作用	ZDF ラット （肥満 2 型糖尿病 モデル） 10 週齢，雄	トホグリフロジン（0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg）を単 回経口投与	<ul style="list-style-type: none"> <li>0.1 mg/kg 以上の用量で投与直前（0時間）から投与12時間後まで の血糖値の曲線下面積（Glu AUC<sub>0-12h</sub>）を用量依存的に低下させ た。</li> <li>投与後0-4時間，4-8時間及び8-12時間のグルコース腎排泄クリア ランス値を用量依存的に増加させ，1 mg/kg では投与後0-4時間 において，3及び10 mg/kg では投与後12時間までのいずれの採血 時間においても，溶媒投与群に比較してグルコース腎排泄クリ アランス値の有意な増加を認めた。</li> </ul>	4.2.1.1-4
正常動物における 随時血糖への作用	Wistar ラット 8 週齢，雄	トホグリフロジン（0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg）を単 回経口投与	0.1 mg/kg から 10 mg/kg の用量において，投与 24 時間後までの随 時血糖に溶媒投与群との有意な差はなく，随時血糖降下作用は認 められなかった。	4.2.1.1-5
正常動物における 随時血糖及び尿糖 排泄への作用	SD ラット 8 週齢，雄	トホグリフロジン（1, 3, 10 mg/kg）を単回経口投 与	投与後 6 時間まではすべての用量で，6～12 時間では 3 及び 10 mg/kg で，12～24 時間では 10 mg/kg の用量で，有意な尿糖排泄亢 進作用が認められたが，投与 6, 12, 24 時間後のいずれの時間に おいても有意な随時血糖降下作用は認められなかった。	4.2.1.1-2 (Suzuki et al. 2012)

## 効力を裏付ける試験（続）

試験項目	動物種又は試験系	試験方法/投与方法	結果	資料番号
<b>In vivo</b>				
食後過血糖抑制作用	GK ラット (非肥満 2 型糖尿病モデル) 9 週齢, 雄	トホグリフロジン (1, 3, 10 mg/kg) 又はボグリボース (0.1, 0.3, 1 mg/kg) を単回経口投与し, 直後に経口液体飼料負荷試験を実施	<ul style="list-style-type: none"> <li>トホグリフロジンは, 1 mg/kg 以上の用量で, 液体飼料負荷4時間後までの血糖値の曲線下面積 (Glu AUC<sub>0-4h</sub>) を溶媒投与群に比較して有意に抑制した。</li> <li>ボグリボースは, 0.3 mg/kg 及び1 mg/kg の用量において, 液体飼料負荷4時間後までの血糖値の曲線下面積 (Glu AUC<sub>0-4h</sub>) を溶媒投与群に比較して有意に抑制した。</li> </ul>	4.2.1.1-6
糖化ヘモグロビン低下作用	db/db マウス (肥満 2 型糖尿病モデル) 8-12 週齢, 雄	トホグリフロジン (0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg) を1日1回, 4週間経口投与	<ul style="list-style-type: none"> <li>0.3 mg/kg/日以上以上の用量で, 投与4週間後の糖化ヘモグロビン値が溶媒投与群に比較して有意に低下した。</li> <li>3 mg/kg/日以上以上の用量で, 投与4週間後の随時血糖が溶媒投与群に比較して有意に低下した。</li> <li>3 mg/kg/日以上以上の用量で, 投与4週間後の血漿中インスリン値が溶媒投与群に比較して有意に高値であった。</li> <li>最終投与の4日後 (休薬後) に実施した経口グルコース負荷試験において, 0.3 mg/kg 以上の用量でグルコース負荷4時間後の血糖上昇が, 3 mg/kg 以上の用量で血糖値の曲線下面積 (Glu AUC<sub>0-4h</sub>) が, それぞれ溶媒投与群に比較して有意に低下した。</li> </ul>	4.2.1.1-7

### 2.6.3.6 副次的薬理試験

試験項目	動物種又は試験系	試験方法/投与方法	結果	資料番号
<i>In vitro</i>				
代謝物の SGLT 阻害作用	ヒト SGLT1 あるいは SGLT2 を発現している CHO 細胞	<p>Methyl-<math>\alpha</math>-D-glucopyranoside 取り込み阻害活性</p> <p>被験物質：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● トホグリフロジン</li> <li>● トホグリフロジン代謝物（脱水素体，ケトン体，二級水酸化体エピマー1，二級水酸化体エピマー2，一級水酸化体，カルボン酸体）</li> <li>● フロリジン（陽性対照薬）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ヒト SGLT2に対する IC<sub>50</sub>値 <ul style="list-style-type: none"> <li>● トホグリフロジン：0.0039 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 脱水素体：0.0046 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● ケトン体：0.016 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 二級水酸化体エピマー1：0.015 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 二級水酸化体エピマー2：0.014 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 一級水酸化体：0.0049 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● カルボン酸体：2.7 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● フロリジン：0.015 <math>\mu</math>mol/L</li> </ul> </li> <li>● ヒト SGLT1に対する IC<sub>50</sub>値 <ul style="list-style-type: none"> <li>● トホグリフロジン：13 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 脱水素体：6.6 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● ケトン体：44 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 二級水酸化体エピマー1：42 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 二級水酸化体エピマー2：45 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● 一級水酸化体：17 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● カルボン酸体：&gt;200 <math>\mu</math>mol/L</li> <li>● フロリジン：0.20 <math>\mu</math>mol/L</li> </ul> </li> <li>● トホグリフロジンに対するトホグリフロジン代謝物の SGLT2 阻害活性効力比（各代謝物の IC<sub>50</sub> 値をトホグリフロジンの IC<sub>50</sub>値で除した数値）</li> </ul>	4.2.1.2-1

			<ul style="list-style-type: none"> <li>• 脱水素体：1.2</li> <li>• ケトン体：4.1</li> <li>• 二級水酸化体エピマー1：3.8</li> <li>• 二級水酸化体エピマー2：3.5</li> <li>• 一級水酸化体：1.3</li> <li>• カルボン酸体：700</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• トホグリフロジンに対するトホグリフロジン代謝物の SGLT1 阻害活性効力比（各代謝物の IC<sub>50</sub> 値をトホグリフロジンの IC<sub>50</sub>値で除した数値） <ul style="list-style-type: none"> <li>• 脱水素体：0.51</li> <li>• ケトン体：3.4</li> <li>• 二級水酸化体エピマー1：3.3</li> <li>• 二級水酸化体エピマー2：3.5</li> <li>• 一級水酸化体：1.3</li> <li>• カルボン酸体：&gt;15</li> </ul> </li> </ul>	
--	--	--	---	--

## 副次的薬理試験（続）

試験項目	動物種又は試験系	試験方法/投与方法	結果	資料番号
<b><i>In vitro</i></b>				
トホグリフロジン及び代謝物の各種受容体、イオンチャンネル及びトランスポーター結合活性	ヒト、ラット及びマウスの各種受容体、イオンチャンネル及びトランスポーター	リガンド、イオン及び基質の結合阻害活性	<ul style="list-style-type: none"> <li>トホグリフロジン及び代謝物（カルボン酸体、一級水酸化体、二級水酸化体エピマー1及び二級水酸化体エピマー2）は、10 <math>\mu\text{mol/L}</math> で、各種受容体、イオンチャンネル及びトランスポーターに対してほとんど結合しないか、又は弱い結合能しか示さなかった。</li> <li>二級水酸化エピマー2のみが、10 <math>\mu\text{mol/L}</math> の濃度で <math>\sigma</math> 受容体に結合する可能性（結合阻害率64%）が示唆された。</li> </ul>	4.2.1.2-2
トホグリフロジンのグルコーストランスポーター（GLUT）阻害活性	ヒト骨格筋由来細胞（XM13A1）、ラット骨格筋由来細胞（L6）、マウス脂肪由来細胞（3T3-L1）	インスリン刺激時の2-deoxy-glucose 取り込み阻害活性	<ul style="list-style-type: none"> <li>インスリン刺激時の2-deoxy-glucose 取り込みに対するトホグリフロジンの阻害活性（<math>\text{IC}_{50}</math>値）はいずれの細胞でも100 <math>\mu\text{mol/L}</math> 以上であった。</li> </ul>	4.2.1.1-2

## 2.6.3.7 安全性薬理試験

## 2.6.3.7.1 中枢神経系に及ぼす影響

試験の種類	投薬期間	動物種／試験系	動物数／群	投与量 (mg/kg/日)	平均 C <sub>max</sub> (µg/mL)	平均 AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL)	主な作用	GLP 適用	資料番号
中枢神経系 (Irwin 変法) 経口投与	単回投与	ラット/SD	雄6例	10 80 640	2.96* NE 50.2*	14.9* NE 841*	10 mg/kg 及び80 mg/kg : 排尿増加 640 mg/kg : 排尿増加, 体温低下, 眼瞼閉塞  *ラット1カ月間反復投与毒性試験のデータ (雄, 初回投与日)	適	4.2.1.3-1

## 2.6.3.7.2 呼吸系に及ぼす影響

試験の種類	投薬期間	動物種／試験系	動物数／群	投与量 (mg/kg/日)	平均 C <sub>max</sub> (µg/mL)	平均 AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL)	主な作用	GLP 適用	資料番号
呼吸系 経口投与	単回投与	ラット/SD	雄8例	10 80 640	2.96* NE 50.2*	14.9* NE 841*	呼吸機能への作用なし  * ラット1カ月間反復投与毒性試験のデータ (雄, 初回投与日)	適	4.2.1.3-2

## 2.6.3.7.3 心血管系に及ぼす影響

試験の種類	投薬期間	動物種／試験系	動物数／群	投与量 (mg/kg/日)	平均 C <sub>max</sub> (µg/mL)	平均 AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL)	主な作用	GLP 適用	資料番号
心血管系経口投与	単回投与	サル/カニクイザル	雄4例 <sup>§</sup>	10 30 100	2.81** 11.0** 22.8**	NC NC NC	血圧, 心拍数, ECG, 体温への影響なし  **投与後4時間の血漿中濃度 <sup>§</sup> ラテン方格法に準じ, 同一個体に投与	適	4.2.1.3-3
hERG	<i>In vitro</i>	hERG 発現 HEK293細胞	各濃度 5例	10, 30, 100, 300, 1000 µmol/L	—	—	IC <sub>20</sub> : 554 µmol/L	適	4.2.1.3-4

—: 該当せず

## 2.6.3.7.4 心血管系に及ぼす影響 (代謝物: カルボン酸体及び二級水酸化体)

試験の種類	投薬期間	動物種／試験系	動物数／群	投与量	平均 C <sub>max</sub> (µg/mL)	平均 AUC <sub>0-24h</sub> (µg·h/mL)	主な作用	GLP 適用	資料番号
hERG 代謝物: カルボン酸体及び二級水酸化体 (CH5234447 及び CH5098293)	<i>In vitro</i>	hERG 発現 HEK293細胞	各濃度 5例	カルボン酸体: 100, 300, 1000 µmol/L 二級水酸化体: 30, 100, 300, 1000 µmol/L	—	—	カルボン酸体: 1000 µmol/L まで影響なし 二級水酸化体: 8.7%抑制 (1000 µmol/L)	適	4.2.1.3-5

—: 該当せず

## 2.6.3.8 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。