

2.6.1 緒言

2.6.1.1 名称及び化学構造式

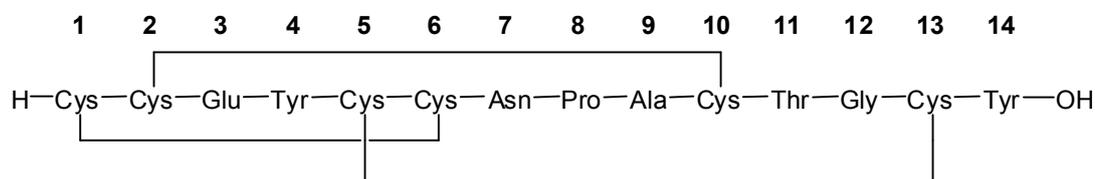
リナクロチド（以下、本薬）の名称及び化学構造式は以下のとおりである。

一般名：INN linaclotide

JAN（日本名）リナクロチド，（英名）Linaclotide

化学名：L-Cysteinyl-L-cysteinyl-L- α -glutamyl-L-tyrosyl-L-cysteinyl-L-cysteinyl-L-asparaginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-cysteinyl-L-threonylglycyl-L-cysteinyl-L-tyrosine cyclic (1→6),(2→10),(5→13)-tris(disulfide)

構造式：



分子式：C₅₉H₇₉N₁₅O₂₁S₆

分子量：1,526.74

2.6.1.2 リナクロチドの薬理作用

本薬は、14個のアミノ酸からなるグアニル酸シクラーゼC（GC-C）受容体作動薬である。本薬は、腸管の管腔表面に存在するGC-C受容体を活性化することにより、細胞内のサイクリックGMP濃度を増加させ、腸管分泌並びに腸管輸送能を促進させる。更に、本薬は、ストレスや大腸炎によって引き起こされる大腸痛覚過敏を抑制する。本薬によるこれらの大腸機能促進作用及び痛覚過敏改善作用が、便秘型過敏性腸症候群における排便異常並びに腹痛/腹部不快感の改善に寄与していると考えられる。

2.6.1.3 効能・効果

便秘型過敏性腸症候群

2.6.1.4 用法・用量

通常、成人にはリナクロチドとして0.5 mgを1日1回、食前に経口投与する。

なお、症状により0.25 mgに減量する。

目次

| | | |
|-----------|----------------------------------|----|
| 2.6.2 | 薬理試験の概要文 | 4 |
| 2.6.2.1 | まとめ | 5 |
| 2.6.2.2 | 効力を裏付ける試験 | 9 |
| 2.6.2.2.1 | GC-C 受容体親和性 | 9 |
| 2.6.2.2.2 | GC-C 受容体選択性 | 11 |
| 2.6.2.2.3 | <i>In vitro</i> における cGMP 濃度増加作用 | 11 |
| 2.6.2.2.4 | 腸管分泌促進作用 | 14 |
| 2.6.2.2.5 | 小腸輸送能促進作用 | 18 |
| 2.6.2.2.6 | 大腸痛覚過敏改善作用 | 25 |
| 2.6.2.2.7 | 便性状に対する作用 | 34 |
| 2.6.2.3 | 副次的薬理試験 | 35 |
| 2.6.2.3.1 | 代謝物の薬理作用 | 35 |
| 2.6.2.3.2 | 原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の薬理作用 | 39 |
| 2.6.2.3.3 | ラット術後小腸輸送能低下に対する作用 | 41 |
| 2.6.2.3.4 | ラットオピオイド誘発小腸輸送能低下に対する作用 | 42 |
| 2.6.2.3.5 | ラット結腸粘膜透過性に対する作用 | 42 |
| 2.6.2.4 | 安全性薬理試験 | 42 |
| 2.6.2.4.1 | コアバッテリー試験 | 42 |
| 2.6.2.5 | 薬力学的薬物相互作用試験 | 43 |
| 2.6.2.6 | 考察及び結論 | 43 |
| 2.6.2.7 | 図表 | 46 |
| 2.6.2.8 | 参考文献 | 46 |

表

| | | |
|-----------|---|----|
| 表 2.6.2-1 | 略号及び用語の定義一覧 | 4 |
| 表 2.6.2-2 | 酸性、中性及びアルカリ性条件下におけるヒト GC-C 受容体に対するリナクロチド、MM-419447、STa、STc、グアニリン及びウログアニリンの親和性 | 10 |
| 表 2.6.2-3 | リナクロチド及び各種代謝物のアミノ酸配列及び <i>in vitro</i> 薬理作用 | 39 |

図

| | | |
|------------|---|----|
| 図 2.6.2-1 | T84 細胞におけるリナクロチドの細胞内 cGMP 濃度増加作用 | 12 |
| 図 2.6.2-2 | T84 細胞における MM-419447 の細胞内 cGMP 濃度増加作用 | 12 |
| 図 2.6.2-3 | Caco-2 細胞の頂端膜側にリナクロチド及び STc を添加した際の (A) 細胞内並びに (B) 頂端膜側及び (C) 側底膜側細胞外液 cGMP 濃度の変化 | 13 |
| 図 2.6.2-4 | 幼若マウスにおけるリナクロチドの腸管分泌促進作用 | 14 |
| 図 2.6.2-5 | 幼若マウスにおけるリナクロチド及びテガセロッドの腸管分泌促進作用 | 15 |
| 図 2.6.2-6 | ラットの小腸及び大腸におけるリナクロチドの腸管分泌促進作用 | 16 |
| 図 2.6.2-7 | リナクロチドによるラット小腸及び大腸ループ内腸液中の cGMP 濃度増加作用 | 17 |
| 図 2.6.2-8 | 野生型及び GC-C 受容体ノックアウトマウスにおけるリナクロチドの腸管分泌促進作用及び cGMP 濃度増加作用 | 18 |
| 図 2.6.2-9 | 雌性マウスにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用 | 19 |
| 図 2.6.2-10 | 雄性マウスにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用 | 20 |
| 図 2.6.2-11 | 雌性マウスにおけるリナクロチド及びテガセロッドの小腸輸送能促進作用 | 21 |
| 図 2.6.2-12 | 雌性マウスにおけるリナクロチド及びテガセロッドの単回並びに反復経口投与時の小腸輸送能促進作用 | 22 |
| 図 2.6.2-13 | 雌性ラットにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用 | 23 |
| 図 2.6.2-14 | 雄性ラットにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用 | 23 |
| 図 2.6.2-15 | 雌性ラットにおけるリナクロチド及びテガセロッドの小腸輸送能促進作用 | 24 |
| 図 2.6.2-16 | (A) 雌性及び (B) 雄性的野生型及び GC-C 受容体ノックアウトマウスにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用 | 25 |
| 図 2.6.2-17 | WAS 負荷ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用 | 27 |
| 図 2.6.2-18 | WAS 負荷ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチド (10 µg/kg) の作用 | 28 |
| 図 2.6.2-19 | PRS 負荷ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用 | 29 |
| 図 2.6.2-20 | TNBS 誘発大腸炎ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用 | 30 |
| 図 2.6.2-21 | TNBS 誘発大腸炎ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用 | 31 |
| 図 2.6.2-22 | (A) 野生型及び (B) GC-C 受容体ノックアウトマウスにおける腹痛反応に対するリナクロチドの作用 | 33 |
| 図 2.6.2-23 | (A) 野生型及び (B) GC-C 受容体ノックアウトマウスにおける TNBS 大腸炎誘発大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用 | 34 |
| 図 2.6.2-24 | 幼若マウスにおける MM-419447 及びリナクロチドの腸管分泌促進作用 | 36 |

| | |
|--|----|
| 図 2.6.2-25 雌性ラットの小腸における MM-419447 及びリナクロチドの腸管分泌促進作用..... | 37 |
| 図 2.6.2-26 雌性ラットにおける MM-419447 及びリナクロチドの小腸輸送能促進作用..... | 38 |
| 図 2.6.2-27 リナクロチド及び原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の T84 細胞内 cGMP 濃度に対する作用 (1) | 40 |
| 図 2.6.2-28 リナクロチド及び原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の T84 細胞内 cGMP 濃度に対する作用 (2) | 41 |
| 図 2.6.2-29 想定されるリナクロチドの作用機序 | 45 |

2.6.2 薬理試験の概要文

本項で使用した略号及び用語の定義一覧を表 2.6.2-1 に示す。

表 2.6.2-1 略号及び用語の定義一覧

| 略号及び用語 | 定義 |
|-----------|--|
| Caco-2 | Human colon carcinoma cell line Caco-2：ヒト結腸がん細胞株 Caco-2 (ヒト結腸上皮細胞 Caco-2) |
| CFTR | Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator：嚢胞性線維症膜貫通調節因子 |
| cGMP | Cyclic guanosine monophosphate：サイクリック GMP |
| CRD | Colorectal distension：大腸伸展 |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid：エチレンジアミン四酢酸 |
| EMG | Electromyography：筋電図 |
| GC-C | Guanylate cyclase C：グアニル酸シクラーゼ C |
| GC-C KO | GC-C receptor knockout：GC-C 受容体ノックアウト |
| G/C ratio | Gut weight to carcass weight ratio：腸管重量と体重の比 |
| 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 |
| HB-PS | HEPES-buffered physiological saline：HEPES 緩衝生理食塩水 |
| HEK293 細胞 | Human embryonic kidney 293 細胞：ヒト胎児腎細胞由来株化細胞 |
| hERG | Human ether-a-go-go related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 |
| IBS-C | Irritable bowel syndrome with constipation：便秘型過敏性腸症候群 |
| Ki | Inhibition constant：阻害定数 |
| MM-419447 | Active metabolite of linaclotide (Des-Tyr ¹⁴)：リナクロチドの活性代謝物 |
| PBS | Phosphate buffered saline：リン酸緩衝生理食塩水 |
| PKG II | Protein kinase G II：蛋白質キナーゼ G II |
| PRS | Partial restraint stress：部分拘束ストレス |
| pSTa | Porcine-derived heat-stable enterotoxin：ブタ由来耐熱性エンテロトキシン |
| SEC | Size-exclusion chromatography：サイズ排除クロマトグラフィー |
| STa | Human-derived full-length (19-amino acid) E. coli heat-stable bacterial enterotoxin a：ヒト由来大腸菌耐熱性エンテロトキシン |
| STc | Synthetic peptide comprised of the core sequence (amino acids 6-19) of STa：STa のコア構造を有する合成ペプチド |
| T84 | Human colon carcinoma cell line T84：ヒト結腸がん細胞株 T84 (ヒト結腸上皮細胞 T84) |
| TK | Toxicokinetics：トキシコキネティクス |
| TNBS | Trinitrobenzenesulfonic acid：トリニトロベンゼンスルホン酸 |
| WAS | Water avoidance stress：水回避ストレス |
| W/L ratio | Weight of intestinal fluid to length of intestine：単位長あたりの腸液重量 |
| WT | Wild type：野生型 |

2.6.2.1 まとめ

リナクロチド（以下、本薬）は、グアニル酸シクラーゼ C (GC-C) 受容体作動薬であり、便秘型過敏性腸症候群 (IBS-C) に対して有効性を示すと考えられる経口投与可能なペプチド化合物である。今回の申請にあたり、本薬の薬理学的特性を明らかにする目的で、以下の各種試験を実施した。

効力を裏付ける試験として、本薬の GC-C 受容体に対する結合親和性、受容体活性化作用及び選択性を評価し、加えてラット、マウス及び GC-C 受容体ノックアウト (GC-C KO) マウスにおける腸管分泌促進作用、腸管輸送能促進作用並びに大腸痛覚に対する抑制作用を評価した。副次的薬理試験として、ヒトで検出された本薬の主要代謝物及び原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の GC-C 受容体活性化作用についても検討した。更に、安全性薬理試験として、コアバッテリー試験（心血管系及び呼吸系に及ぼす影響）を実施した。コアバッテリー試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) 適合試験として、安全性薬理試験ガイドライン (ICH S7A) に準拠して実施した。以下に、本薬の効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の成績をまとめた。

本資料中で表示されている本薬の濃度・用量は、本薬のペプチド含有量及び純度で補正されている。しかし、一部の試験において実際に投与された本薬の濃度・用量は、表示より 3%程度少ない。これは当初、本薬の定量試験に用いられたリナクロチド標準品の純度が、関連ペプチドを含めた状態で算出されていたためである。ただし、2.6.2.2.6.1 の試験で表示されている本薬の用量は、ペプチド含有量及び純度で補正されていない。

上記、原薬中リナクロチド含量の表示変更の詳細については、3.2.S.4.4 に記載されている。

効力を裏付ける試験

GC-C 受容体に対する結合親和性及び選択性

GC-C 受容体を発現している各種細胞や膜標品及び GC-C 受容体特異的な放射性リガンドを用いて、本薬及びその主要代謝物である MM-419447 (Des-Tyr¹⁴) の GC-C 受容体親和性を検討した。ヒト結腸上皮細胞 (T84 細胞)、ラット小腸粘膜細胞及びラット小腸刷子縁膜において、本薬は GC-C 受容体に対して親和性を示し、その阻害定数 (K_i) 値はそれぞれ 1.69, 4.3 及び 2.63 nmol/L であった。同様に、MM-419447 は T84 細胞及びラット小腸刷子縁膜において高い GC-C 受容体親和性を示し、その K_i 値はそれぞれ 2.82 及び 4.95 nmol/L であった。また、本薬及び MM-419447 の T84 細胞における GC-C 受容体親和性は、pH の影響を受けなかった。更に、GC-C KO マウスの小腸粘膜上皮細胞に対する ¹²⁵I-リナクロチドの結合量は、野生型マウスの 10%以下であった。このことから、GC-C 受容体が本薬の主たる標的分子であることが示された。

本薬は、検討した 50 種類の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対して、10 µmol/L の濃度で明らかな親和性を示さなかった。

cGMP 濃度増加作用 (*in vitro*)

T84 細胞を用いて、本薬及び MM-419447 の細胞内サイクリック GMP (cGMP) 濃度増加作用を検討した。本薬及び MM-419447 は、それぞれ 100 及び 10 nmol/L 以上の濃度で、細胞内 cGMP 濃度を有意に増加させた。また、本薬 (0.01~1 µmol/L) はヒト結腸上皮細胞 (Caco-2 細胞) において、細胞内並びに頂端膜側及び側底膜側細胞外液の cGMP 濃度を増加させた。

腸管分泌促進作用

幼若マウスに本薬を単回経口投与し、1 時間後に摘出した腸管の重量と体重の比を腸管分泌の指標として、本薬の腸管分泌促進作用を検討した。本薬は 2.5 µg/kg 以上の用量群で、溶媒投与群と比較して腸管分泌を有意に促進した。

ラットの小腸 (近位, 中位, 遠位) 及び大腸にループを作製し、ループ中に貯留した腸液量及び cGMP 量を測定することにより、本薬の腸管分泌促進作用及び cGMP 濃度増加作用を検討した。すべての部位において、本薬 (ループ内に 5 µg を直接投与) は腸管分泌を増加させ、その変化は溶媒投与群と比較して近位及び中位小腸並びに大腸において有意であった。同様に、本薬は腸管ループ内に貯留した腸液中の cGMP 濃度を増加させ、その変化は溶媒投与群と比較してすべての部位において有意であった。また、野生型マウスにおいて、本薬 (ループ内に 5 µg を直接投与) は腸管分泌促進作用及び cGMP 濃度増加作用を示したが、GC-C KO マウスにおいては、いずれに対しても有意な作用を示さなかった。このことから、本薬の腸管分泌促進作用及び cGMP 濃度増加作用は、GC-C 受容体を介するものであることが示唆された。

小腸輸送能促進作用

マウス及びラットにおける本薬の小腸輸送能促進作用を、経口投与した活性炭末の小腸内移動距離を指標に検討した。

雌性及び雄性マウスにおける本薬 (6~100 µg/kg po) の単回投与による作用を検討したところ、それぞれ 25 µg/kg 以上の用量群及び 100 µg/kg の用量群で、溶媒投与群と比較して有意な小腸輸送能促進作用を示した。同様の方法を用いて、雌性マウスにおける本薬 (60 及び 250 µg/kg po) の 1 日 1 回 5 日間反復投与による小腸輸送能促進作用を検討したところ、単回投与時と同程度の促進作用が認められた。

雌性及び雄性ラットにおいて、本薬は 10 µg/kg po 以上の用量群において、溶媒投与群と比較して有意な小腸輸送能促進作用を示した。

本薬 (100 µg/kg po) は雌性及び雄性いずれの野生型マウスにおいても有意な小腸輸送能促進作用を示したが、GC-C KO マウスでは有意な作用を示さなかった。このことから、本薬の小腸輸送能促進作用は、GC-C 受容体を介するものであることが示唆された。

ストレス誘発大腸痛覚過敏に対する改善作用

あらかじめ腹筋に筋電図電極を装着させたラットを用い、大腸内に挿入したバルーンの伸展時に認められる筋電図活動の変化を腹痛反応の指標として、正常時の大腸痛覚若しくはストレスによって引き起こされる大腸痛覚過敏に対する本薬の作用を検討した。

正常ラットの腹痛反応に対して、本薬（10, 30 及び 100 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ ）は有意な作用を示さなかった。

ラットにおける水回避ストレス（WAS）誘発大腸痛覚過敏モデルにおいて、本薬の大腸痛覚過敏改善作用を検討した。本薬は 3 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ で、WAS 負荷後 24 時間に認められる腹痛反応の増強を抑制し、非ストレス負荷時と同程度のレベルにまで腹痛反応を低下させた。一方、本薬の 10 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ 投与群では、WAS 誘発大腸痛覚過敏に対する有意な抑制効果が認められなかった。なお、本検討と並行して実施した非ストレス負荷時の腹痛反応評価において、本薬 3 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ は有意な作用を示さなかったが、30 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ では有意に腹痛反応を増加させた。

ラット部分拘束ストレス（PRS）負荷モデルにおいては、15 mmHg 負荷時に認められる腹痛反応を、本薬は 3 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ で有意に抑制した。なお、本薬の 0.3 及び 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、有意な抑制作用は認められなかった。

大腸炎誘発大腸痛覚過敏に対する改善作用

あらかじめ腹筋に筋電図電極を装着させたラット及びマウスを用い、大腸内に挿入したバルーンの伸展時に認められる筋電図活動の変化を腹痛反応の指標として、正常時の大腸痛覚若しくは大腸炎によって引き起こされる大腸痛覚過敏に対する本薬の作用を検討した。

トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）誘発大腸炎モデルラットにおける腹痛反応（大腸痛覚過敏）に対する、本薬（0.01, 0.03, 0.3, 3 及び 30 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ ）の作用を検討した。その結果、本薬は 0.01, 0.03 及び 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で有意な抑制作用を示したが、3 及び 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では有意な作用を示さなかった。なお、本薬はいずれの用量においても、大腸伸展時の腸管コンプライアンスに対して有意な影響を及ぼさなかった。

野生型及び GC-C KO マウスを用いて、TNBS 非処置時の大腸痛覚若しくは TNBS 大腸炎誘発大腸痛覚過敏に対する本薬の作用を検討した。TNBS 非処置野生型マウスにおいて、本薬の 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ 投与群で腹痛反応が小さくなる傾向が認められたが、いずれの大腸伸展容量においても溶媒投与群に対する有意差は認められなかった。TNBS 非処置 GC-C KO マウスにおいては、本薬は 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ で 0.12 mL 大腸伸展時の腹痛反応を有意に抑制した。一方、野生型及び GC-C KO マウスのいずれにおいても、TNBS 大腸炎に伴う大腸痛覚過敏が認められ、本薬（0.01 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ ）は野生型マウスにおける大腸痛覚過敏に対してのみ有意な改善効果を示した。このことから、本薬の大腸痛覚過敏抑制作用は GC-C 受容体を介して発現することが示唆された。

便性状に対する作用

マウス及びラットの便性状を指標に、本薬（50～200 mg/kg po）の下痢誘発作用を検討した。本薬は単回投与により、雌性マウス及び雌性ラットにおける軟便、無形状便若しくは水様便の発生頻度を 50 mg/kg 以上の用量で増加させた。また、雄性マウス及び雄性ラットにおいて、本薬は 200 mg/kg で軟便、無形状便若しくは水様便の発生頻度を増加させた。本薬の 5 日間反復投与は、雌性及び雄性マウスの軟便、無形状便若しくは水様便の発生頻度を 100 mg/kg（1 日 2 回）及び 200 mg/kg（1 日 1 回）の用量において増加させたが、体重に対して影響を及ぼさなかった。

副次的薬理試験

代謝物の薬理作用

本薬の主要代謝物である MM-419447（13 個のアミノ酸から成るペプチド）は、ヒト、マウス及びラットの腸液を用いた *in vitro* 試験において検出されており、本薬が腸管腔内でカルボキシペプチダーゼ A により加水分解されることにより生成される。MM-419447 は、*in vitro* 試験（GC-C 受容体親和性及び細胞内 cGMP 濃度増加）において、本薬と同程度の活性を示した。

In vivo 試験として、MM-419447 の幼若マウス及びラット小腸における腸管分泌促進作用、並びにラットにおける小腸輸送能促進作用（活性炭末法）を検討した。MM-419447（2.5～10 µg/kg po）は幼若マウスにおける腸管分泌を有意に促進し、その作用は本薬による促進作用と同程度であった。次に、ラットの小腸（近位、中位、遠位）にループを作製し、ループ中に貯留した腸液量を測定することにより、MM-419447 の腸管分泌促進作用を検討したところ、MM-419447 及び本薬（それぞれループ内に 5 µg を直接投与）はすべての部位において有意に腸管分泌を上昇させた。

ラットにおいて、MM-419447 は 12.5 µg/kg po 以上の用量で有意な小腸輸送能促進作用を示し、その作用は同用量の本薬による作用と同程度であった。

一方、本薬をラット腸液と反応させることにより生成される還元型リナクロチド及び 4 つの短鎖ペプチド断片は、いずれも T84 細胞における細胞内 cGMP 濃度に対して作用を示さなかった。

原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の薬理作用

原薬中若しくは製剤中に含まれる主な不純物として、本薬の類縁物質 1 *、類縁物質 2 *、類縁物質 3 *、類縁物質 4 * 及び 類縁物質 5 * の薬理作用を、T84 細胞における細胞内 cGMP 濃度の増加を指標として検討した。その結果、本薬の類縁物質 1 * は、明らかな cGMP 濃度増加作用を示さなかった。類縁物質 2 * 及び 類縁物質 3 * は GC-C 受容体活性化作用を示したが、10 µmol/L における細胞内 cGMP 濃度はそれぞれ本薬の 69.8% 及び 26.0% であった。類縁物質 4 * は本薬と同程度の GC-C 受容体活性化作用を示した。類縁物質 5 * も GC-C 受容体活性化作用を示したが、10 µmol/L で認められた細胞内 cGMP 濃度の増加は、本薬による増加に比べて小さかった。

ラット術後小腸輸送能低下に対する作用

ラットにおける術後小腸輸送能低下モデルを用いて、経口投与した活性炭末の小腸内移動距離を指標に、本薬の小腸輸送能改善作用を検討した。開腹及び腸管の物理的な刺激により引き起こされる小腸輸送能低下に対して、本薬は 10 µg/kg po で有意な改善効果を示した。

ラットオピオイド誘発小腸輸送能低下に対する作用

ラットにおけるモルヒネ誘発小腸輸送能低下モデルを用いて、経口投与した活性炭末の小腸内移動距離を指標に、本薬の小腸輸送能改善作用を検討した。モルヒネ (2.5 mg/kg ip) を投与することにより引き起こされる小腸輸送能低下に対して、本薬は 25 µg/kg po 以上の用量群で有意な改善効果を示した。

ラット結腸粘膜透過性に対する作用

正常及び PRS 誘発結腸粘膜透過性亢進モデルラットを用いて、本薬の粘膜透過性に対する作用を検討した。本薬 (0.3, 1, 3 及び 10 µg/kg po) は非ストレス負荷時の結腸粘膜透過性及び PRS 負荷により増大した結腸粘膜透過性のいずれに対しても有意な影響を及ぼさなかった。

安全性薬理試験

コアバッテリー試験として、心血管系及び呼吸系に対する作用を検討した。*In vitro* 電気生理学的試験において、本薬 (10, 100 µmol/L) は HEK293 細胞における hERG チャネルを介するカリウム電流に明らかな作用を示さなかった。麻酔イヌに本薬 (0.2~5 mg/kg) を単回静脈内持続投与した際の心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討したが、血圧、心拍数、心電図及び呼吸系パラメータに薬物投与の影響は認められなかった。

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 GC-C 受容体親和性

2.6.2.2.1.1 T84 細胞

添付資料 4.2.1.1-1

GC-C 受容体を恒常的に発現しているヒト結腸上皮細胞 (T84 細胞) 及び GC-C 受容体特異的な放射性リガンド (^{125}I -ブタ由来耐熱性エンテロトキシン [pSTa]) を用いて、本薬及びその主要代謝物である MM-419447 (Des-Tyr¹⁴) の GC-C 受容体親和性を検討した。

本薬及び MM-419447 (各 0.01~1000 nmol/L) は ^{125}I -pSTa の GC-C 受容体に対する結合を阻害し、 K_i 値はそれぞれ 1.69 及び 2.82 nmol/L であった。

2.6.2.2.1.2 T84 細胞 (pH の影響)

添付資料 4.2.1.1-2

本薬の標的分子 (GC-C 受容体) が発現する腸管の管腔内 pH は中性付近で変動することから、異なる pH 条件下における本薬, MM-419447, ヒト由来大腸菌耐熱性エンテロトキシン (STa), STa のコア構造を有する合成ペプチド (STc), グアニリン及びウログアニリンの GC-C 受容体に対する親和性を T84 細胞及び ^{125}I -pSTa を用いて検討した。

酸性, 中性及びアルカリ性条件下における本薬 (0.003~3000 nmol/L) の GC-C 受容体に対する K_i 値は, それぞれ 1.7, 3.1 及び 1.5 nmol/L であり, 同程度の親和性を示した (表 2.6.2-2)。同様に, MM-419447, STa 及び STc の GC-C 受容体親和性も, 異なる pH 条件下で同程度であった (表 2.6.2-2)。一方, グアニリン及びウログアニリンの GC-C 受容体親和性は pH により影響を受けた。グアニリンの GC-C 受容体親和性は酸性条件下よりも中性及びアルカリ性条件下において高かった (表 2.6.2-2)。また, ウログアニリンの GC-C 受容体親和性は, 中性及びアルカリ性条件下よりも酸性条件下において高かった (表 2.6.2-2)。

表 2.6.2-2 酸性, 中性及びアルカリ性条件下におけるヒト GC-C 受容体に対するリナクロチド, MM-419447, STa, STc, グアニリン及びウログアニリンの親和性

| pH | K _i 値 (nmol/L) | | | | | |
|----|---------------------------|-----------|-----|------|-------|---------|
| | リナクロチド | MM-419447 | STa | STc | グアニリン | ウログアニリン |
| 5 | 1.7 | 0.95 | 4.9 | 0.89 | 36 | 1.4 |
| 7 | 3.1 | 1.8 | 5.4 | 1.5 | 2.8 | 11 |
| 8 | 1.5 | 1.6 | 2.8 | 1.7 | 2.8 | 7.3 |

表中の K_i 値は 2 例の平均値を示す。

K_i : 阻害定数, STa: ヒト由来大腸菌耐熱性エンテロトキシン, STc: STa のコア構造を有する合成ペプチド
(添付資料 4.2.1.1-2: MDP-103-067-PHR-01)

2.6.2.2.1.3 ラット小腸粘膜

添付資料 4.2.1.1-3

ラットの小腸粘膜細胞及び ^{125}I -pSTa を用いた受容体結合試験において, 本薬 (0.01~1000 nmol/L) は ^{125}I -pSTa の結合を阻害し, その K_i 値は 4.3 nmol/L であった。

2.6.2.2.1.4 ラット小腸刷子縁膜

添付資料 4.2.1.1-4

ラット小腸の刷子縁膜より調製した細胞膜標品及び¹²⁵I-pSTaを用いた受容体結合試験において、本薬及びMM-419447（各0.01～1000 nmol/L）は¹²⁵I-pSTaの結合を阻害し、Ki値はそれぞれ2.63及び4.95 nmol/Lであった。

2.6.2.2.1.5 野生型及びGC-C受容体ノックアウトマウス小腸粘膜及び刷子縁膜

添付資料 4.2.1.1-5

野生型マウス及びGC-C KOマウスの小腸粘膜細胞及び¹²⁵I-リナクロチドを用いた受容体結合試験を実施した。

¹²⁵I-リナクロチドは、野生型及びGC-C KOマウスの小腸粘膜細胞に結合した。しかし、GC-C KOマウスの小腸粘膜細胞に対する¹²⁵I-リナクロチドの結合量は、野生型マウスの10%以下であった。本薬（15 μmol/L）は、いずれの¹²⁵I-リナクロチドの結合に対しても阻害作用を示した。

次に、野生型マウス及びGC-C KOマウスの小腸刷子縁膜より調製した細胞膜標品及び¹²⁵I-pSTaを用いた受容体結合試験を実施した。

本薬（0.3～1000 nmol/L）は、野生型マウスの小腸刷子縁膜より調製した細胞膜標品に対する¹²⁵I-pSTaの結合を阻害し、そのKi値は16.2 nmol/Lであった。GC-C KOマウスより採取した刷子縁膜の細胞膜標品に対する¹²⁵I-pSTaの結合量は、野生型マウスに比して低下していたが、本薬（0.3～1000 nmol/L）は残存した¹²⁵I-pSTaの結合を阻害し、そのKi値は11.9 nmol/Lであった。

2.6.2.2.2 GC-C受容体選択性

添付資料 4.2.1.1-6

50種類の各種受容体、イオンチャネル及びトランスポーターに対する本薬の親和性を検討した。今回検討した受容体、イオンチャネル及びトランスポーターへの特異的リガンドの結合に対する本薬10 μmol/Lの阻害率は、いずれも50%未満であった（阻害率：-26%～13%）。

2.6.2.2.3 *In vitro*におけるcGMP濃度増加作用

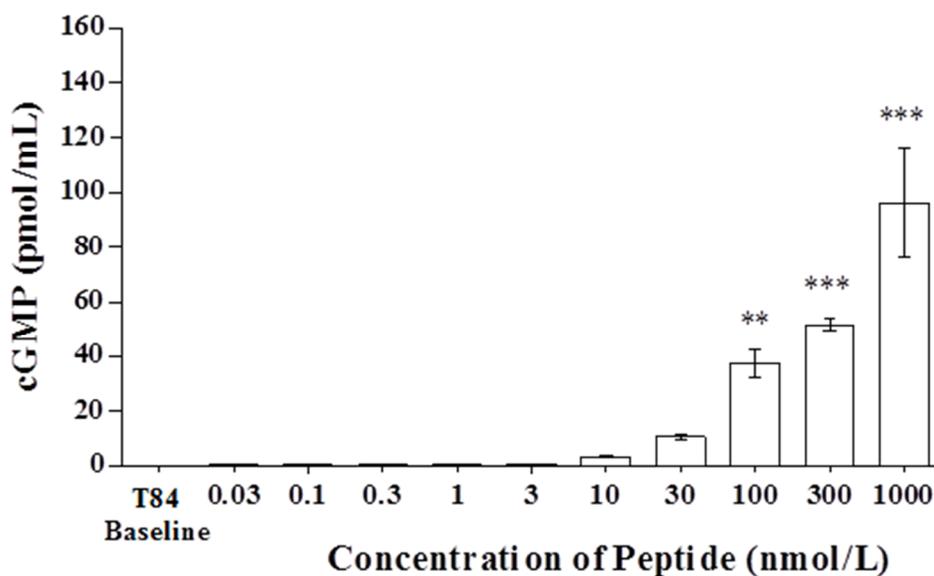
2.6.2.2.3.1 T84細胞

添付資料 4.2.1.1-7, 4.2.1.1-8

T84細胞を用いて、本薬及びMM-419447の細胞内cGMP濃度増加作用を検討した。

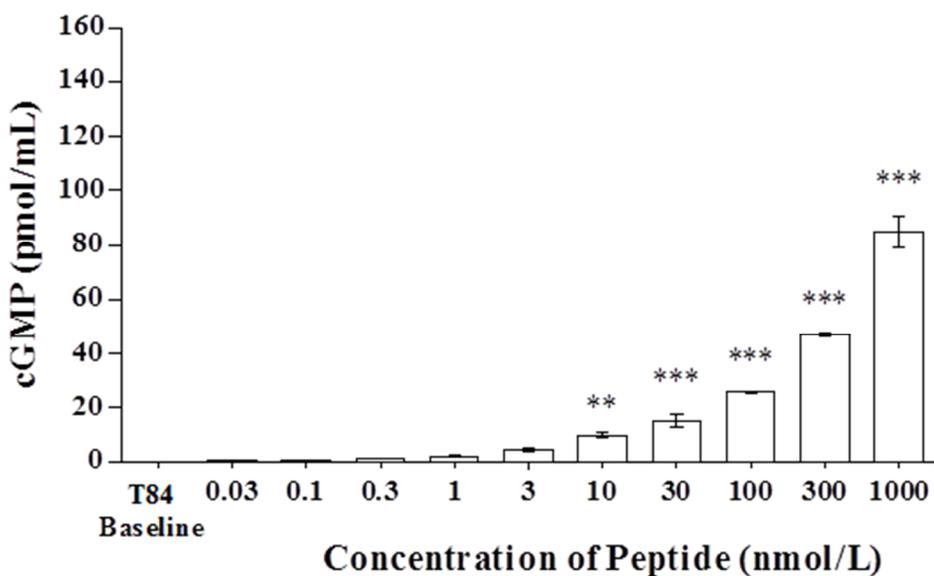
本薬（0.03～1000 nmol/L）はT84細胞における細胞内cGMP濃度を増加させ、100 nmol/L以上の濃度で有意な増加が認められた（図2.6.2-1）。同様に、MM-419447（0.03～1000 nmol/L）もT84細胞における細胞内cGMP濃度を増加させ、10 nmol/L以上の濃度で有意な増加が認められた（図2.6.2-2）。

図 2.6.2-1 T84 細胞におけるリナクロチドの細胞内 cGMP 濃度増加作用



図中の 0.3, 3 及び 300 nmol/L 群のカラムは 3 例, それ以外のカラムは 4 例の平均値±標準誤差を示す。
及び*は T84 Baseline 群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: **P<0.01, ***P<0.001)。
(添付資料 4.2.1.1-8 : 0456-PH-0002)

図 2.6.2-2 T84 細胞における MM-419447 の細胞内 cGMP 濃度増加作用



図中の 100 及び 300 nmol/L 群のカラムは 2 例, 0.1 及び 1000 nmol/L 群のカラムは 3 例, それ以外のカラムは 4 例の平均値±標準誤差を示す。
及び*は T84 Baseline 群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: **P<0.01, ***P<0.001)。
(添付資料 4.2.1.1-8 : 0456-PH-0002)

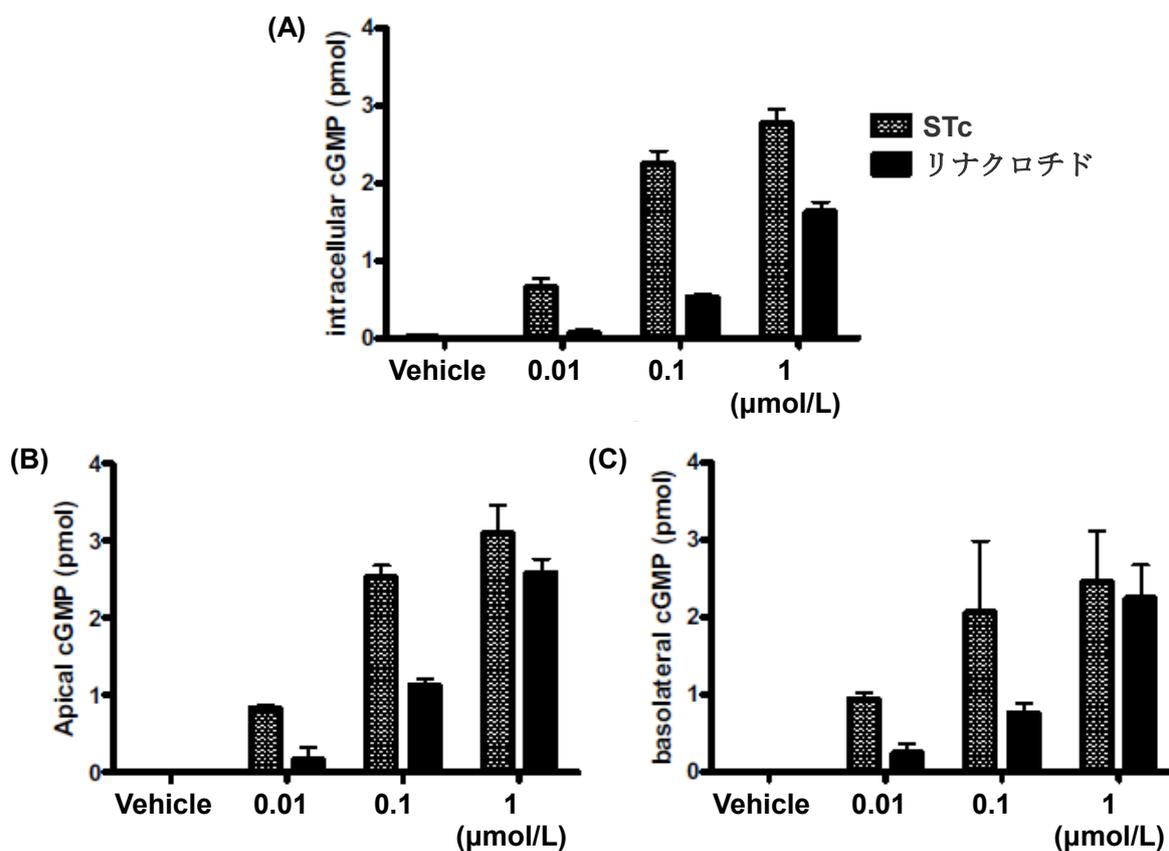
2.6.2.2.3.2 Caco-2 細胞

添付資料 4.2.1.1-9

GC-C 受容体を恒常的に発現している Caco-2 細胞単層培養系を用いて、本薬及び STc を細胞外（頂端膜側）に添加した際に認められる細胞内並びに細胞外（頂端膜側及び側底膜側）の cGMP 濃度の変化を検討した。

Caco-2 細胞において、本薬及び STc（各 0.01~1 $\mu\text{mol/L}$ ）は、細胞内並びに頂端膜側及び側底膜側細胞外液の cGMP 濃度を増加させた（図 2.6.2-3）。

図 2.6.2-3 Caco-2 細胞の頂端膜側にリナクロチド及び STc を添加した際の (A) 細胞内並びに (B) 頂端膜側及び (C) 側底膜側細胞外液 cGMP 濃度の変化



図中の溶媒 (Vehicle) 群のカラムは 2 例, それ以外のカラムは 3 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。
(添付資料 4.2.1.1-9 : MDP-103-053-PHR-01)

2.6.2.2.4 腸管分泌促進作用

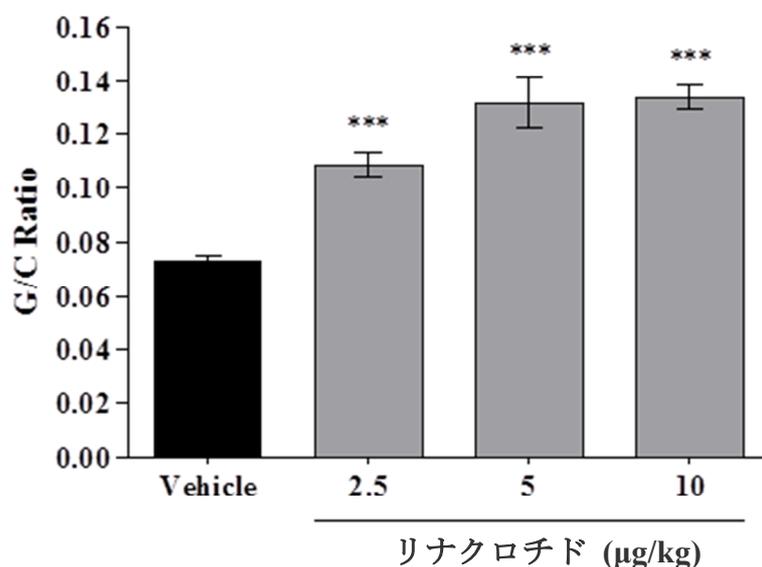
2.6.2.2.4.1 幼若マウスにおける腸管分泌促進作用

添付資料 4.2.1.1-10, 4.2.1.1-11

幼若マウス（7～9日齢）に本薬を経口投与し、その1時間後に摘出した腸管の重量と体重の比を腸管分泌の指標として、本薬の腸管分泌促進作用を検討した。

本薬（2.5～10 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ ）は、2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量群で、溶媒投与群と比較して有意な腸管分泌促進作用を示した。（図 2.6.2-4）。

図 2.6.2-4 幼若マウスにおけるリナクロチドの腸管分泌促進作用



図中の溶媒 (Vehicle), リナクロチド 2.5, 5 及び 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群のカラムは、それぞれ 10, 13, 6 及び 13 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。***は溶媒投与群に対する有意差を示す (Dunnett 検定 : *** $P < 0.001$)。

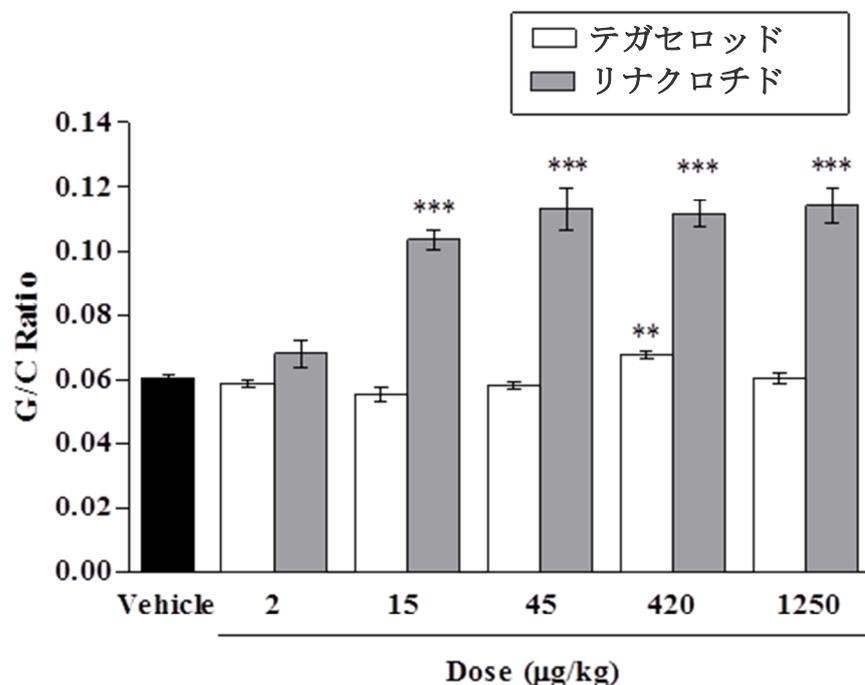
G/C ratio : 腸管重量と体重の比 (Gut weight to carcass weight ratio)

(添付資料 4.2.1.1-11 : 0456-PH-0005)

また、同様の方法により、本薬及びセロトニン 5-HT₄ 受容体作動薬であるマレイン酸テガセロッド (以下、テガセロッド) の作用を 2～1250 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ の投与用量において検討した。

その結果、本薬は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量群で、溶媒投与群と比較して有意な腸管分泌促進作用を示したが、テガセロッドは 420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量群でのみ有意な促進作用を示した (図 2.6.2-5)。

図 2.6.2-5 幼若マウスにおけるリナクロチド及びテガセロッドの腸管分泌促進作用



図中の各カラムは6例の平均値±標準誤差を示す。**及び***は溶媒 (Vehicle) 投与群に対する有意差を示す (薬物ごとに Dunnett 検定: **P<0.01, ***P<0.001)。

G/C ratio: 腸管重量と体重の比 (Gut weight to carcass weight ratio)

(添付資料 4.2.1.1-11: 0456-PH-0005)

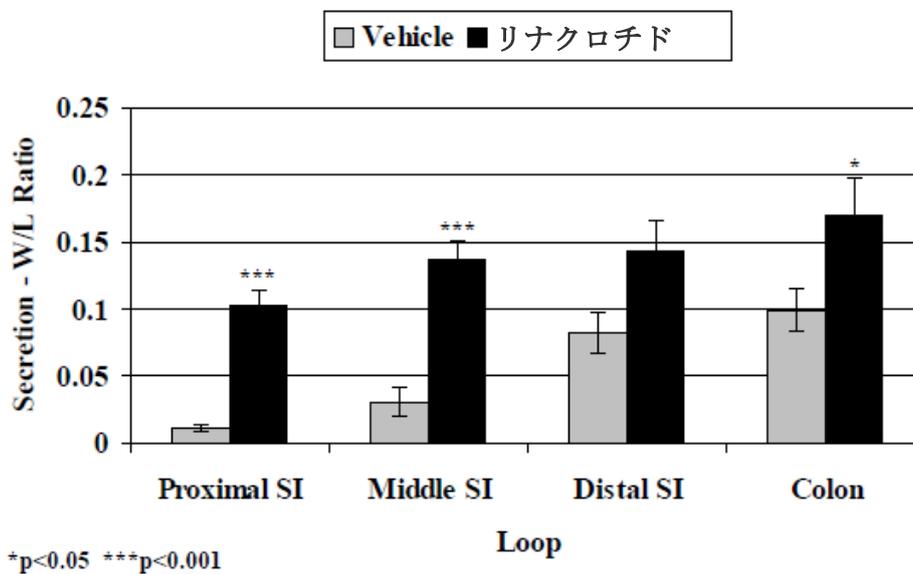
2.6.2.2.4.2 ラットにおける腸管分泌促進作用

添付資料 4.2.1.1-12

雌性ラットの小腸 (近位, 中位, 遠位) 及び大腸にループを作製し, ループ内に本薬を直接投与した 90 分後に, ループ内に貯留した腸液量及び cGMP 量を測定した。

すべての部位において, 本薬 (ループ内に 5 µg/200 µL を直接投与) は腸管分泌を増加させ, 近位及び中位小腸並びに大腸において, 溶媒投与群との間に有意な差が認められた (図 2.6.2-6)。同様に, 本薬は腸管ループ内に貯留した腸液中の cGMP 濃度を増加させ, すべての部位において, 溶媒投与群との間に有意な差が認められた (図 2.6.2-7)。

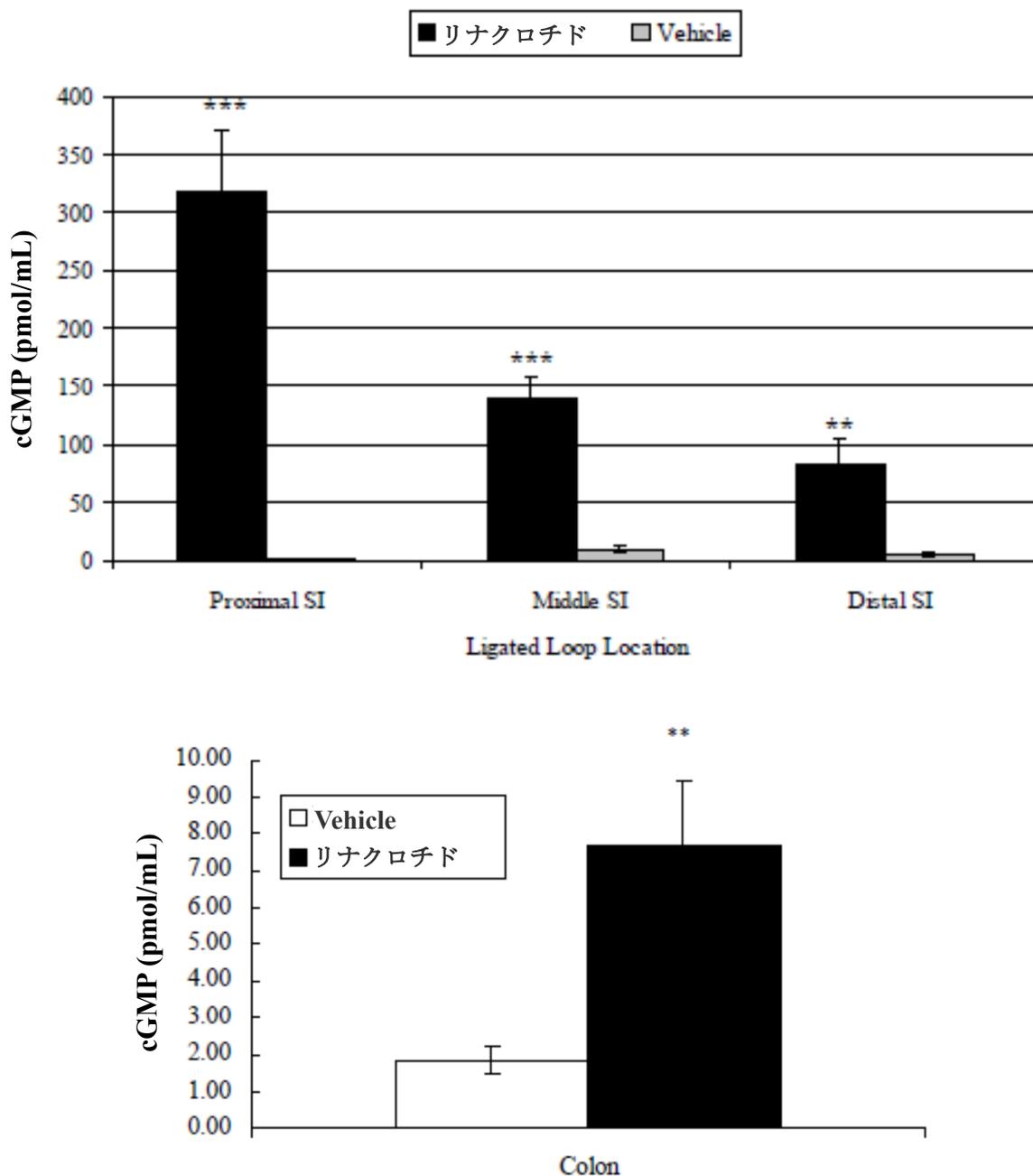
図 2.6.2-6 ラットの小腸及び大腸におけるリナクロチドの腸管分泌促進作用



リナクロチド (5 µg/200 µL) はループ内に直接投与した。図中の溶媒 (Vehicle) 群のカラムは 10 例, リナクロチド群のカラムは 11 例の平均値±標準誤差を示す。*及び***は対応する溶媒投与群に対する有意差を示す (Student t 検定)。

W/L ratio: 単位長あたりの腸液重量 (Weight of intestinal fluid to length of intestine), SI: 小腸 (Small intestine)
(添付資料 4.2.1.1-12 : MDP-103-024-PHR-01)

図 2.6.2-7 リナクロチドによるラット小腸及び大腸ループ内腸液中の cGMP 濃度増加作用



リナクロチド (5 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$) はループ内に直接投与した。図中の溶媒 (Vehicle) 群のカラムは 10 例, リナクロチド群のカラムは 11 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。**及び***は対応する溶媒投与群に対する有意差を示す (Student t 検定: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

SI : 小腸 (Small intestine)

(添付資料 4.2.1.1-12 : MDP-103-024-PHR-01)

2.6.2.2.4.3 GC-C 受容体ノックアウトマウスにおける腸管分泌促進作用

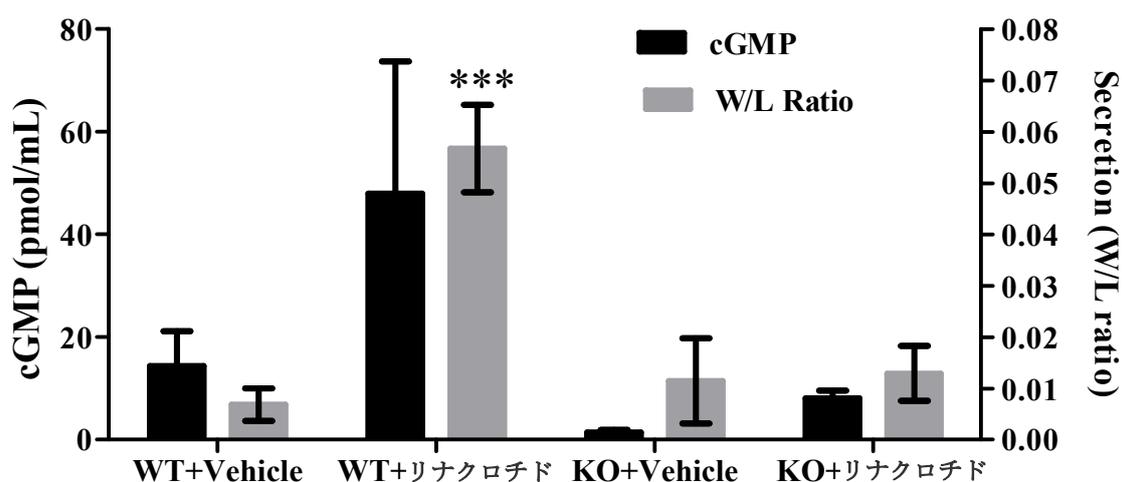
添付資料 4.2.1.1-13

雄性の野生型及び GC-C KO マウスの小腸にループを作製し、ループ内に本薬 (5 µg/100 µL) を直接投与した 90 分後に、ループ内に貯留した腸液量及び cGMP 量を測定することにより、本薬の腸管分泌促進作用及び cGMP 濃度増加作用を検討した。

野生型マウスにおいて、本薬は溶媒投与群と比較して、有意な腸管分泌促進作用を示した (図 2.6.2-8)。一方、GC-C KO マウスにおいては、本薬は有意な腸管分泌促進作用を示さなかった (図 2.6.2-8)。

本薬は、野生型及び GC-C KO マウスにおいて、ループ内に貯留した腸液中の cGMP 濃度を増加させる傾向を示した (図 2.6.2-8)。しかし、GC-C KO マウスにおける本薬投与後の cGMP 濃度の増加は、野生型マウスに比べて小さかった (図 2.6.2-8)。

図 2.6.2-8 野生型及び GC-C 受容体ノックアウトマウスにおけるリナクロチドの腸管分泌促進作用及び cGMP 濃度増加作用



リナクロチド (5 µg/100 µL) はループ内に直接投与した。図中の WT+Vehicle, WT+リナクロチド, KO+Vehicle 及び KO+リナクロチドのカラムは、それぞれ 6, 6, 5 及び 4 例の平均値±標準誤差を示す。

***は WT+Vehicle に対する有意差を示す (Student t 検定: ***P<0.001)。

WT: 野生型マウス, KO: GC-C 受容体ノックアウトマウス, Vehicle: 溶媒, W/L ratio: 単位長あたりの腸液重量 (Weight of intestinal fluid to length of intestine)

(添付資料 4.2.1.1-13: MDP-103-026-PHR-01)

2.6.2.2.5 小腸輸送能促進作用

経口投与した活性炭末の小腸内移動距離を指標に、マウス及びラットにおける本薬の小腸輸送能促進作用を評価した。

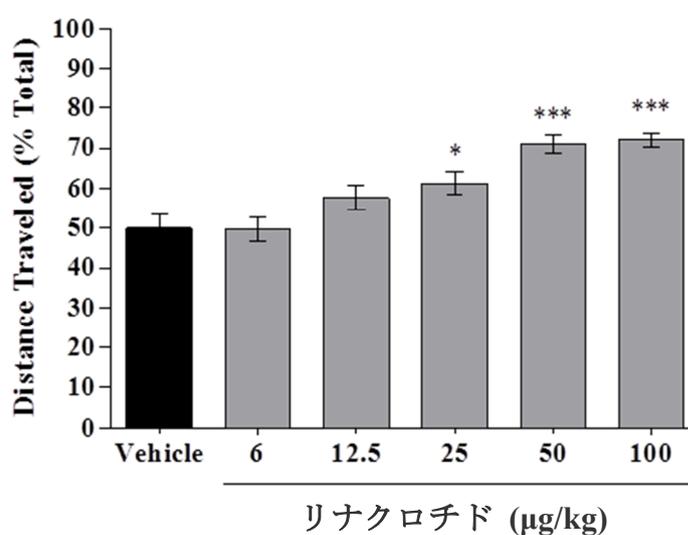
2.6.2.2.5.1 マウスにおける小腸輸送能促進作用

添付資料 4.2.1.1-14, 4.2.1.1-15, 4.2.1.1-16, 4.2.1.1-17

絶食下のマウスに本薬（6～100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ po）を経口投与した7分後に、活性炭末を経口投与し、その15分後に活性炭末の小腸内移動距離を測定した。

雌性及び雄性マウスにおいて、本薬はそれぞれ25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量群及び100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量群で、溶媒投与群と比較して有意な小腸輸送能促進作用を示した（図2.6.2-9及び図2.6.2-10）。

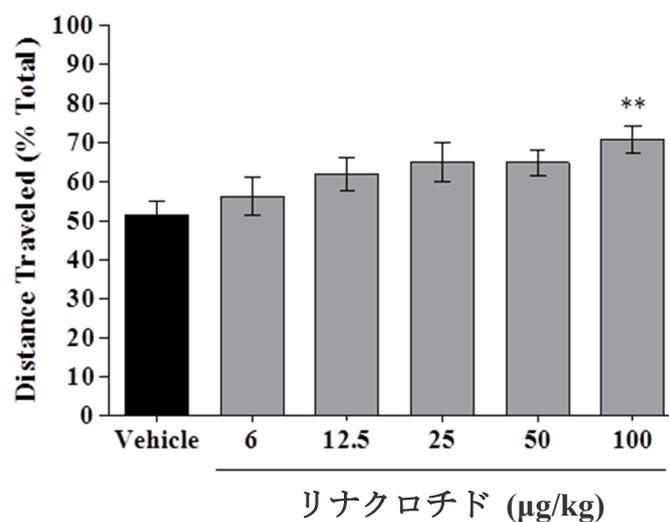
図2.6.2-9 雌性マウスにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用



図中の溶媒（Vehicle）、リナクロチド 6、12.5、25、50 及び 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群のカラムは、それぞれ 20、21、21、19 及び 20 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。*及び***は溶媒投与群に対する有意差を示す（Dunnett 検定：* $P<0.05$ ，*** $P<0.001$ ）。

（添付資料 4.2.1.1-15：0456-PH-0006）

図 2.6.2-10 雄性マウスにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用

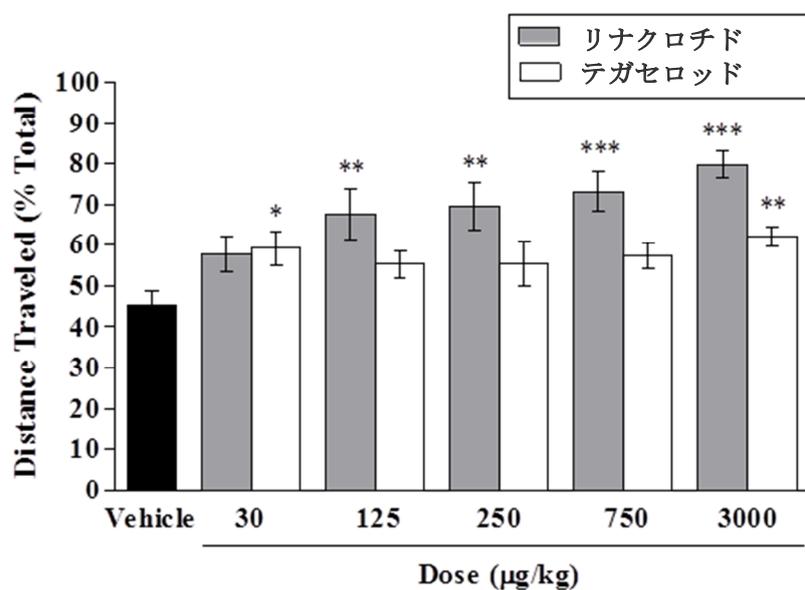


図中の溶媒 (Vehicle), リナクロチド 6, 12.5, 25, 50 及び 100 µg/kg 群のカラムは, それぞれ 20, 10, 10, 11, 11 及び 11 例の平均値±標準誤差を示す。**は溶媒投与群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: **P<0.01)。

(添付資料 4.2.1.1-15 : 0456-PH-0006)

また, 同様の方法で, 本薬及びテガセロッド (30~3000 µg/kg) の雌性マウスにおける小腸輸送能促進作用を検討したところ, 本薬は 125 µg/kg 以上の用量群で有意な小腸輸送能促進作用を示したが, テガセロッドは 30 及び 3000 µg/kg の用量群でのみ有意な小腸輸送能促進作用を示した (図 2.6.2-11)。

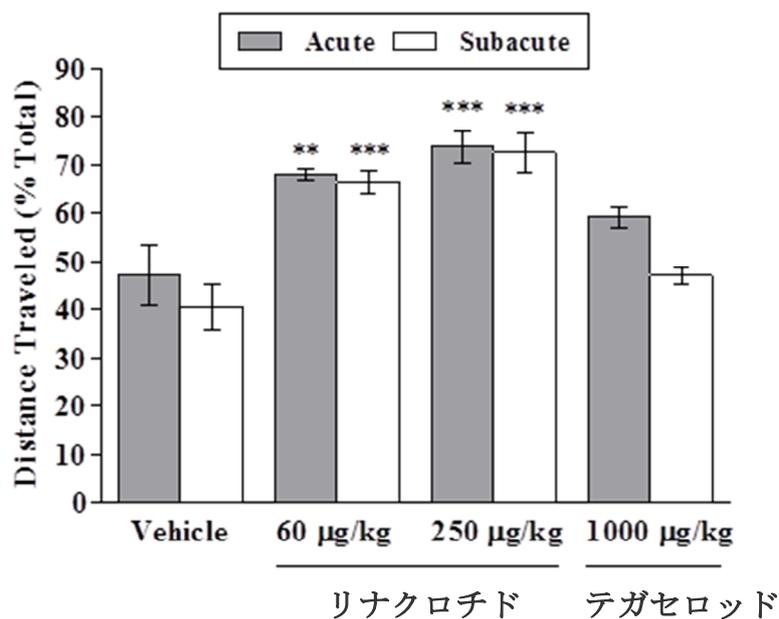
図 2.6.2-11 雌性マウスにおけるリナクロチド及びテガセロッドの小腸輸送能促進作用



図中の溶媒 (Vehicle) 群のカラムは 19 例, それ以外のカラムは 10 例の平均値±標準誤差を示す。*, ** 及び***は溶媒投与群に対する有意差を示す (薬物ごとに Dunnett 検定: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)。
(添付資料 4.2.1.1-15 : 0456-PH-0006)

次に, 同様の方法を用いて, 本薬 (60 及び 250 µg/kg po) の単回並びに 1 日 1 回 5 日間反復投与による小腸輸送能促進作用を雌性マウスにおいて検討したところ, 単回投与時と反復投与時で同程度の促進作用が認められた (図 2.6.2-12)。一方, テガセロッド (1000 µg/kg po) は, 単回投与及び 1 日 1 回 5 日間の反復投与のいずれにおいても有意な小腸輸送能促進作用を示さなかった (図 2.6.2-12)。

図 2.6.2-12 雌性マウスにおけるリナクロチド及びテガセロッドの単回並びに反復経口投与時の小腸輸送能促進作用



図中の各カラムは 10 例の平均値±標準誤差を示す。**及び***は対応するそれぞれの溶媒 (Vehicle) 投与群に対する有意差を示す (リナクロチド投与群との比較は Dunnett 検定: **P<0.01, ***P<0.001)。溶媒投与群とテガセロッド投与群との比較は, Student t 検定を実施。

Acute: 単回経口投与, Subacute: 1 日 1 回 5 日間の反復経口投与

(添付資料 4.2.1.1-17: 0456-PH-0007)

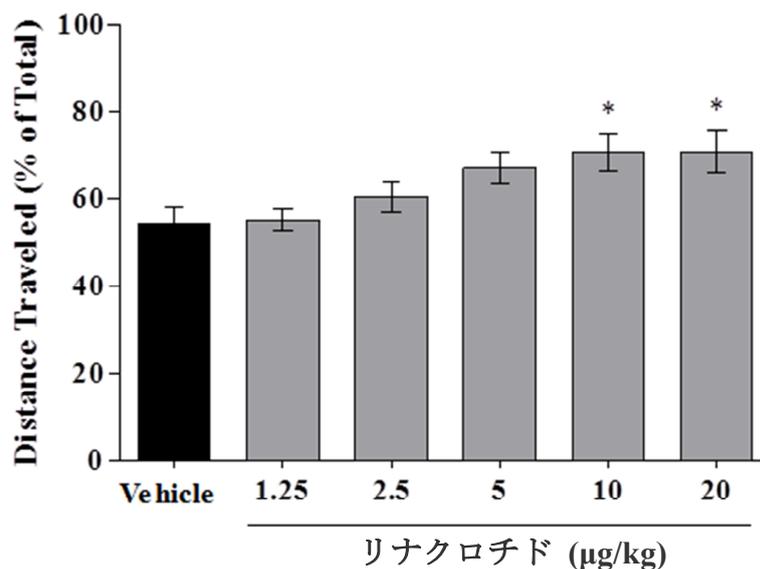
2.6.2.2.5.2 ラットにおける小腸輸送能促進作用

添付資料 4.2.1.1-18, 4.2.1.1-19

絶食下のラットに本薬を経口投与した直後に, 活性炭末を経口投与し, その 10 分後に活性炭末の小腸内移動距離を測定した。

雌性及び雄性ラットにおいて, 本薬 (1.25~20 µg/kg po) の小腸輸送能に対する作用を検討したところ, 10 µg/kg 以上の用量群において, 溶媒投与群と比較して有意な促進が認められた (図 2.6.2-13 及び図 2.6.2-14)。

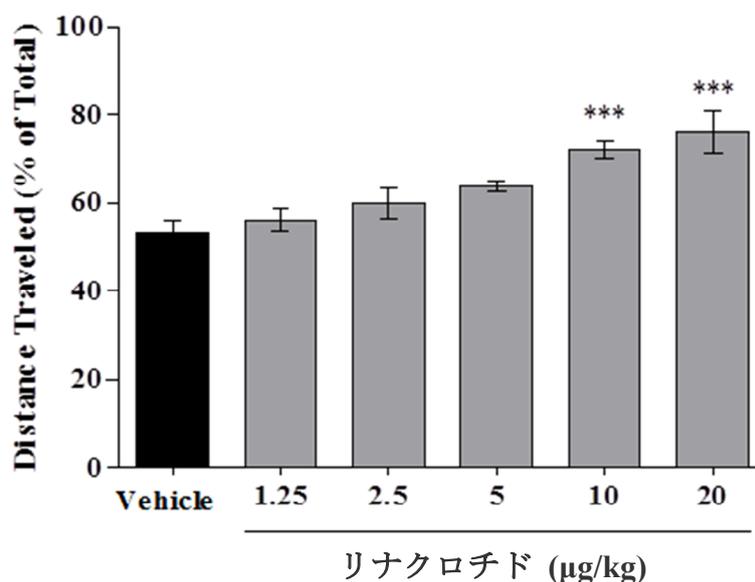
図 2.6.2-13 雌性ラットにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用



図中のリナクロチド 5 及び 10 µg/kg 群のカラムは 6 例, それ以外のカラムは 5 例の平均値±標準誤差を示す。*は溶媒 (Vehicle) 投与群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: *P<0.05)。

(添付資料 4.2.1.1-19 : 0456-PH-0003)

図 2.6.2-14 雄性ラットにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用



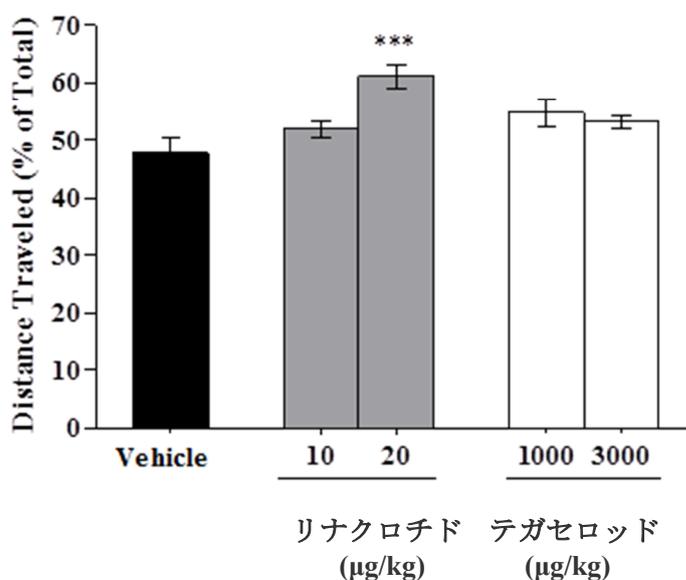
図中のリナクロチド 20 µg/kg 群のカラムは 5 例, それ以外のカラムは 6 例の平均値±標準誤差を示す。

***は溶媒 (Vehicle) 投与群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: ***P<0.001)。

(添付資料 4.2.1.1-19 : 0456-PH-0003)

また、同様の方法で、雌性ラットにおける本薬（10 及び 20 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ ）及びテガセロッド（1000 及び 3000 $\mu\text{g}/\text{kg po}$ ）の小腸輸送能促進作用を検討したところ、本薬は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量群で溶媒投与群と比較して有意な促進作用を示したが、テガセロッドはいずれの用量においても有意な作用を示さなかった（図 2.6.2-15）

図 2.6.2-15 雌性ラットにおけるリナクロチド及びテガセロッドの小腸輸送能促進作用



図中の各カラムは 8 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。***は溶媒 (Vehicle) 投与群に対する有意差を示す (薬物ごとに Dunnett 検定: *** $P < 0.001$)。

(添付資料 4.2.1.1-19 : 0456-PH-0003)

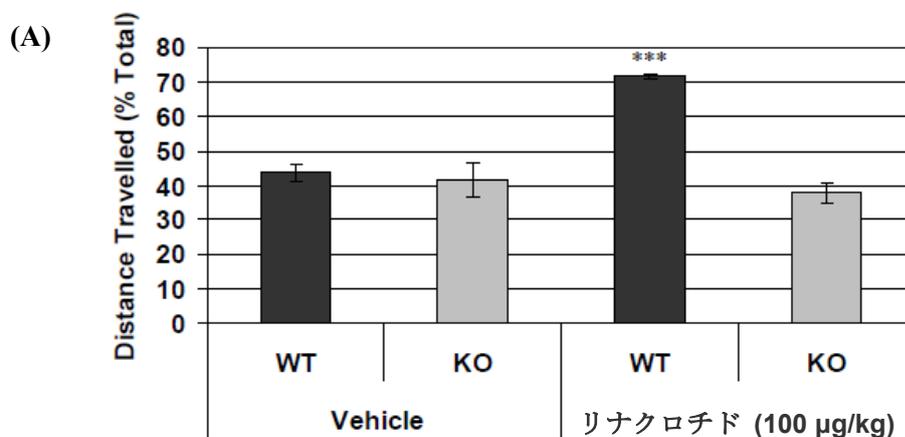
2.6.2.2.5.3 GC-C 受容体ノックアウトマウスにおける小腸輸送能促進作用

添付資料 4.2.1.1-20

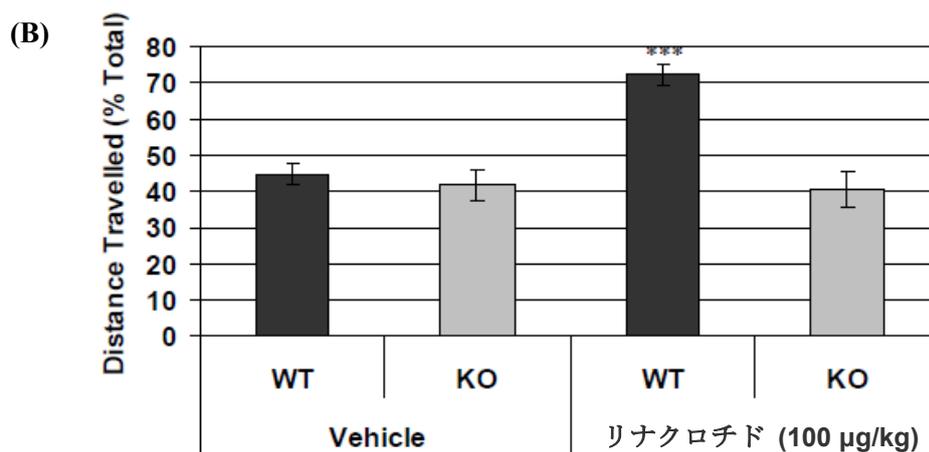
絶食下のマウスに本薬を経口投与した 10 分後に、活性炭末を経口投与し、その 5 分後に活性炭末の小腸内移動距離を測定した。

本薬 (100 $\mu\text{g}/\text{kg po}$) は雌性及び雄性いずれの野生型マウスにおいても有意な小腸輸送能促進作用を示したが、GC-C KO マウスでは有意な作用を示さなかった (図 2.6.2-16)。

図 2.6.2-16 (A) 雌性及び (B) 雄性の野生型及び GC-C 受容体ノックアウトマウスにおけるリナクロチドの小腸輸送能促進作用



*** $p < 0.001$



*** $p < 0.001$

(A) 図中のリナクロチド投与 KO 群のカラムは 11 例、それ以外のカラムは 10 例の平均値±標準誤差を示す。(B) 図中の各カラムは 9 例の平均値±標準誤差を示す。***は溶媒 (Vehicle) 投与 WT 群に対する有意差を示す (Student t 検定)。

WT : 野生型マウス, KO : GC-C 受容体ノックアウトマウス

(添付資料 4.2.1.1-20 : MDP-103-025-PHR-01)

2.6.2.2.6 大腸痛覚過敏改善作用

あらかじめ腹筋に筋電図電極を装着させたラット及びマウスを用い、大腸内に挿入したバルーンの伸展時に認められる筋電図活動の増加を腹痛反応の指標として、正常時若しくは痛覚過敏時の大腸痛覚に対する本薬の作用を検討した。

2.6.2.2.6.1 正常ラットにおける大腸痛覚に対する作用

添付資料 4.2.1.1-21

正常雄性ラットを用いて、大腸伸展時（10, 20, 40, 60 mmHg）に認められる腹筋筋電図活動のスパイク強度を指標に、大腸痛覚に対する本薬の作用を検討した。本薬の経口投与前と投与1時間後に、一連の大腸伸展刺激として各伸展圧を20秒間4分間隔で負荷し、投与前後における各伸展圧の最大スパイク強度を比較した。

正常ラットの腹痛反応に対して、本薬（10, 30 及び 100 µg/kg po）は有意な作用を示さなかった。

2.6.2.2.6.2 ラット水回避ストレス負荷モデルにおける大腸痛覚過敏改善作用

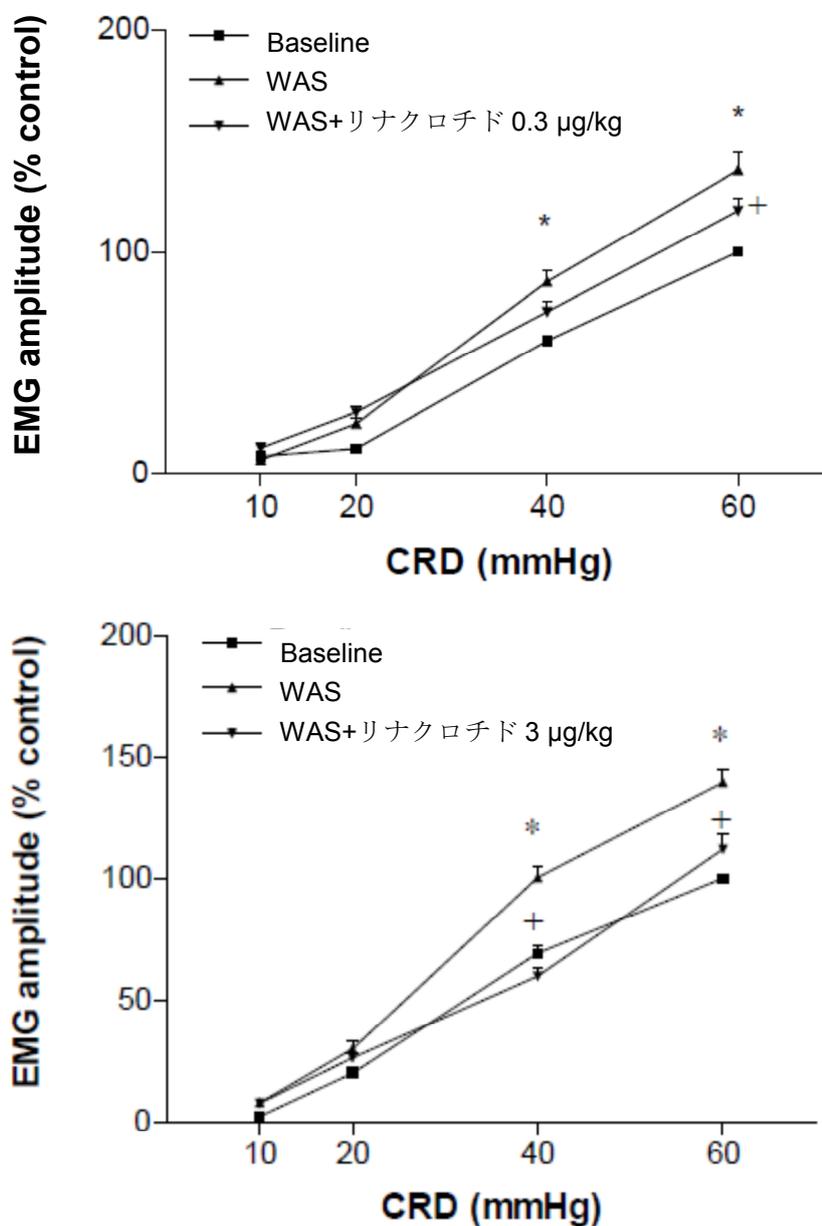
添付資料 4.2.1.1-22

大腸伸展時（10, 20, 40 及び 60 mmHg）に認められる腹筋筋電図活動のスパイク強度を指標に、雄性ラットの大腸痛覚に対する本薬（3 及び 30 µg/kg po）の作用を検討した。また、ラットにおける水回避ストレス（WAS）誘発大腸痛覚過敏モデルを使用し、本薬（0.3, 3 及び 10 µg/kg po）の大腸痛覚過敏改善作用を検討した。本薬の経口投与前と投与1時間後に、一連の大腸伸展刺激として各伸展圧を20秒間4分間隔で負荷し、投与前後における各伸展圧の最大スパイク強度を比較した。

非ストレス負荷時の腹痛反応に対して、30 µg/kg で有意に腹痛反応を増加させた。

ラットに WAS を1時間負荷することにより、その24時間後に腹痛反応の増強（大腸痛覚過敏）が認められた。本薬は0.3 及び 3 µg/kg で、WAS 負荷後に認められる大腸痛覚過敏を抑制した。本薬の0.3 µg/kg 投与群では、60 mmHg 負荷時の大腸痛覚過敏に対してのみ有意な抑制が認められたが、3 µg/kg 投与群では40 及び 60 mmHg のいずれの負荷圧においても非ストレス負荷時と同程度のレベルにまで腹痛反応が低下した（図 2.6.2-17）。一方、本薬の10 µg/kg 投与群は、WAS 誘発大腸痛覚過敏に対して有意な抑制作用を示さなかった（図 2.6.2-18）。

図 2.6.2-17 WAS 負荷ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用



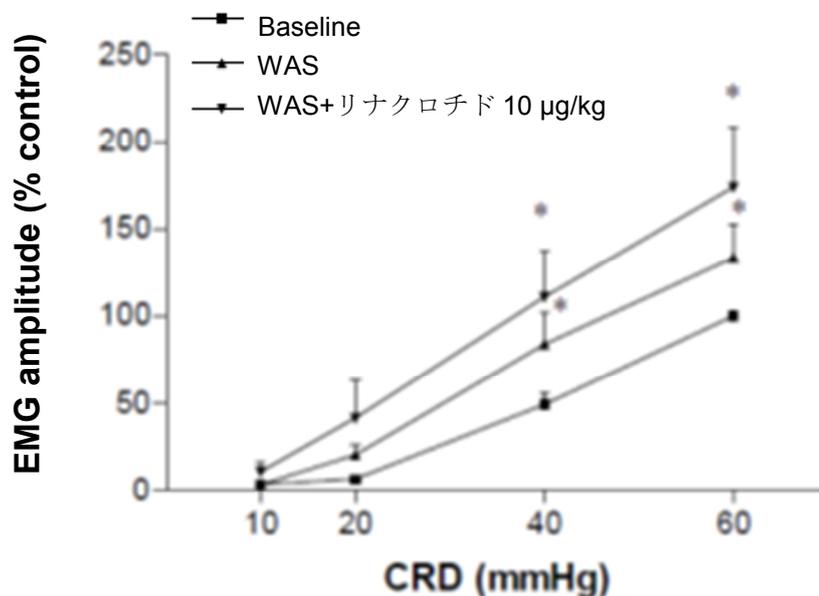
図中の各点は8例の平均値+標準誤差を示す。

*は Baseline (非ストレス負荷) 群に, +は WAS 群に対する有意差を示す (二元配置分散分析後の Bonferroni 検定: * $P < 0.05$, + $P < 0.05$)。

Baseline: 非ストレス負荷, CRD: 大腸伸展 (Colorectal distension), EMG: 筋電図 (Electromyography), WAS: 水回避ストレス (Water avoidance stress)

(添付資料 4.2.1.1-22: MDP-103-022-PHR-02)

図 2.6.2-18 WAS 負荷ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチド (10 µg/kg) の作用



図中の各点は7例の平均値+標準誤差を示す。

*はBaseline(非ストレス負荷)群に対する有意差を示す(二元配置分散分析後のBonferroni検定: *P<0.05)。

Baseline: 非ストレス負荷, CRD: 大腸伸展 (Colorectal distension), EMG: 筋電図 (Electromyography), WAS: 水回避ストレス (Water avoidance stress)

(添付資料 4.2.1.1-22: MDP-103-022-PHR-02)

2.6.2.2.6.3 ラット部分拘束ストレス負荷モデル及びTNBS誘発大腸炎モデルにおける大腸痛覚過敏改善作用

添付資料 4.2.1.1-23, 4.2.1.1-24

雌性ラットにおける部分拘束ストレス (PRS) 負荷モデル及び雄性ラットにおけるトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 誘発大腸炎モデルを使用し、本薬 (0.3, 3 及び 30 µg/kg po) の大腸痛覚過敏改善作用を検討した。大腸伸展時 (15, 30, 45, 60 mmHg) に認められる腹筋筋電図活動のバースト回数を腹筋収縮回数とし、腹痛反応の指標とした。本薬の経口投与前と投与1時間後に、一連の大腸伸展刺激として各伸展圧を5分間ずつ負荷し、投与前後における各伸展圧でのバースト回数を比較した。また、本薬の腸管コンプライアンスに対する影響を確認するために、大腸伸展時のバルーン容量も同時に測定した。

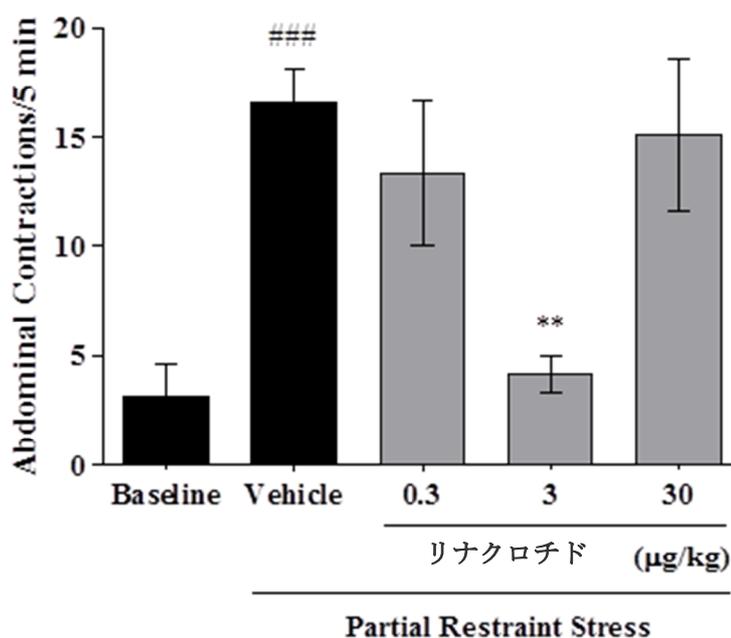
正常ラットの腹痛反応に対して、本薬 (0.3, 3 及び 30 µg/kg po) は有意な作用を示さなかった。

ラットにPRSを2時間負荷することにより、15 mmHgの伸展圧においてのみ有意な腹痛反応の増強が認められた。15 mmHg負荷時に認められた腹痛反応の増強に対し、本薬は3 µg/kgで有意な抑制作用を示した (図 2.6.2-19)。

ラット TNBS 誘発大腸炎モデルにおいて、TNBS (80 mg/kg 大腸内直接投与) を処置した 3 日後に腹痛反応を測定したところ、15 mmHg の伸展圧においてのみ有意な腹痛反応の増強が認められた。本薬は 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、15 mmHg 負荷時に認められた腹痛反応の増強を有意に抑制した (図 2.6.2-20)。

なお、本薬 (0.3, 3 及び 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ po) はいずれのモデルにおいても大腸伸展時のバルーン容量に対して有意な作用を示さず、腸管コンプライアンスに影響を及ぼさなかった。

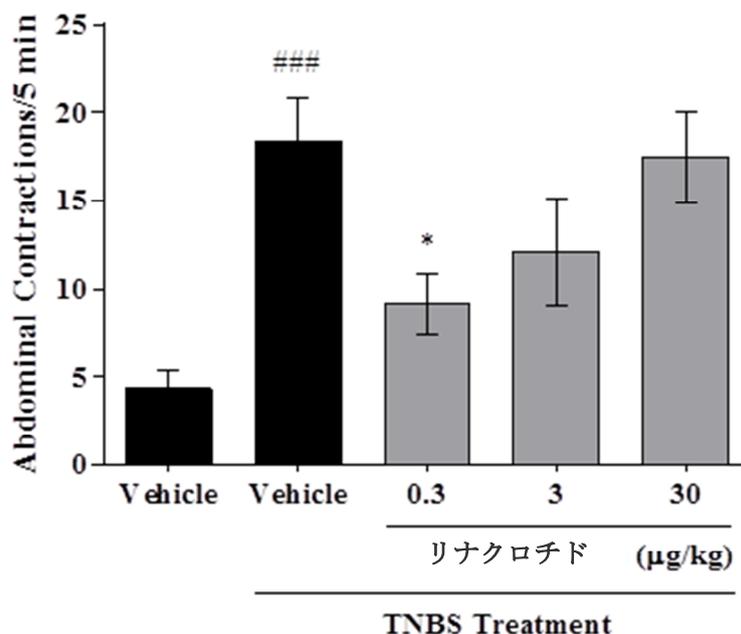
図 2.6.2-19 PRS 負荷ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用



図の縦軸は、ラットに 15 mmHg の大腸伸展刺激を負荷した時の腹筋筋電図活動のバースト回数を腹筋収縮回数として示す。図中のリナクロチド 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群のカラムは 9 例、それ以外のカラムは 8 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。###は Baseline 群に対する有意差を示す (Student t 検定: ###P<0.001)。**は PRS+Vehicle 群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: **P<0.01)。

PRS: 部分拘束ストレス (Partial restraint stress), Vehicle: 溶媒
(添付資料 4.2.1.1-24: 0456-PH-0004)

図 2.6.2-20 TNBS 誘発大腸炎ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用



図の縦軸は、ラットに 15 mmHg の大腸伸展刺激を負荷した時の腹筋筋電図活動のバースト回数を腹筋収縮回数として示す。図中のリナクロチド 3 μg/kg 群のカラムは 10 例、それ以外のカラムは 9 例の平均値±標準誤差を示す。###は溶媒 (Vehicle) 投与群に対する有意差を示す (Student t 検定: ###P<0.001)。*は TNBS+Vehicle 群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: *P<0.05)。

TNBS: トリニトロベンゼンスルホン酸 (Trinitrobenzenesulfonic acid)

(添付資料 4.2.1.1-24: 0456-PH-0004)

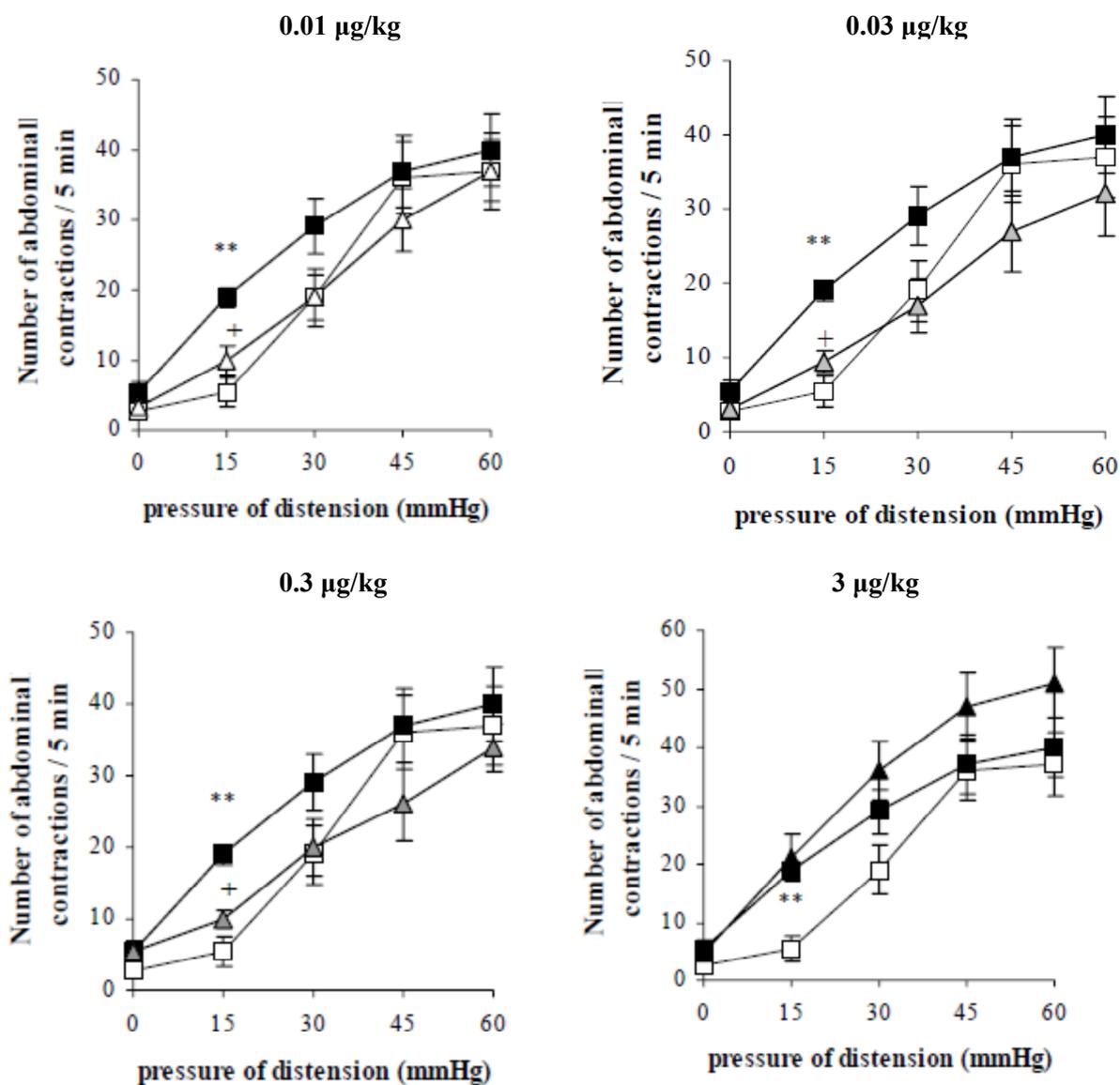
2.6.2.2.6.4 ラット TNBS 誘発大腸炎モデルにおける大腸痛覚過敏改善作用

添付資料 4.2.1.1-25

雄性ラット TNBS 大腸炎誘発大腸痛覚過敏モデルにおける、より低用量の本薬 (0.01, 0.03, 0.3 及び 3 μg/kg po) による大腸痛覚過敏改善作用を検討した。上記 2.6.2.2.6.3 と同様の試験方法を用いて、大腸伸展時 (15, 30, 45, 60 mmHg) の腹痛反応を測定した。また、本薬の腸管コンプライアンスに対する影響を確認するために、大腸伸展時のバルーン容量も同時に測定した。

ラット TNBS 誘発大腸炎モデルにおいて認められる腹痛反応の増強を、本薬は 0.01, 0.03 及び 0.3 μg/kg の用量で有意に抑制したが (伸展圧: 15 mmHg), 3 μg/kg では有意な作用を示さなかった (図 2.6.2-21)。なお、本薬はいずれの用量においても大腸伸展時のバルーン容量に対して有意な作用を示さず、腸管コンプライアンスに影響を及ぼさなかった。

図 2.6.2-21 TNBS 誘発大腸炎ラットにおける大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用



図中のリナクロチド 0.01 及び 0.3 µg/kg 投与群の各ポイントは 9 例、それ以外の投与群の各ポイントは 8 例の平均値±標準誤差を示す。□：正常ラット+溶媒投与群，■：TNBS ラット+溶媒投与群，△，▲又は▲：TNBS ラット+リナクロチド投与群。**は正常ラット+溶媒投与群に，+は TNBS ラット+溶媒投与群に対する有意差を示す（対応のある t 検定：**P<0.01，Dunnett 検定：+P<0.05）。

TNBS：トリニトロベンゼンスルホン酸（Trinitrobenzenesulfonic acid）

（添付資料 4.2.1.1-25：MDP-103-030-PHR-01）

2.6.2.2.6.5 GC-C 受容体ノックアウトマウスにおける大腸痛覚過敏改善作用

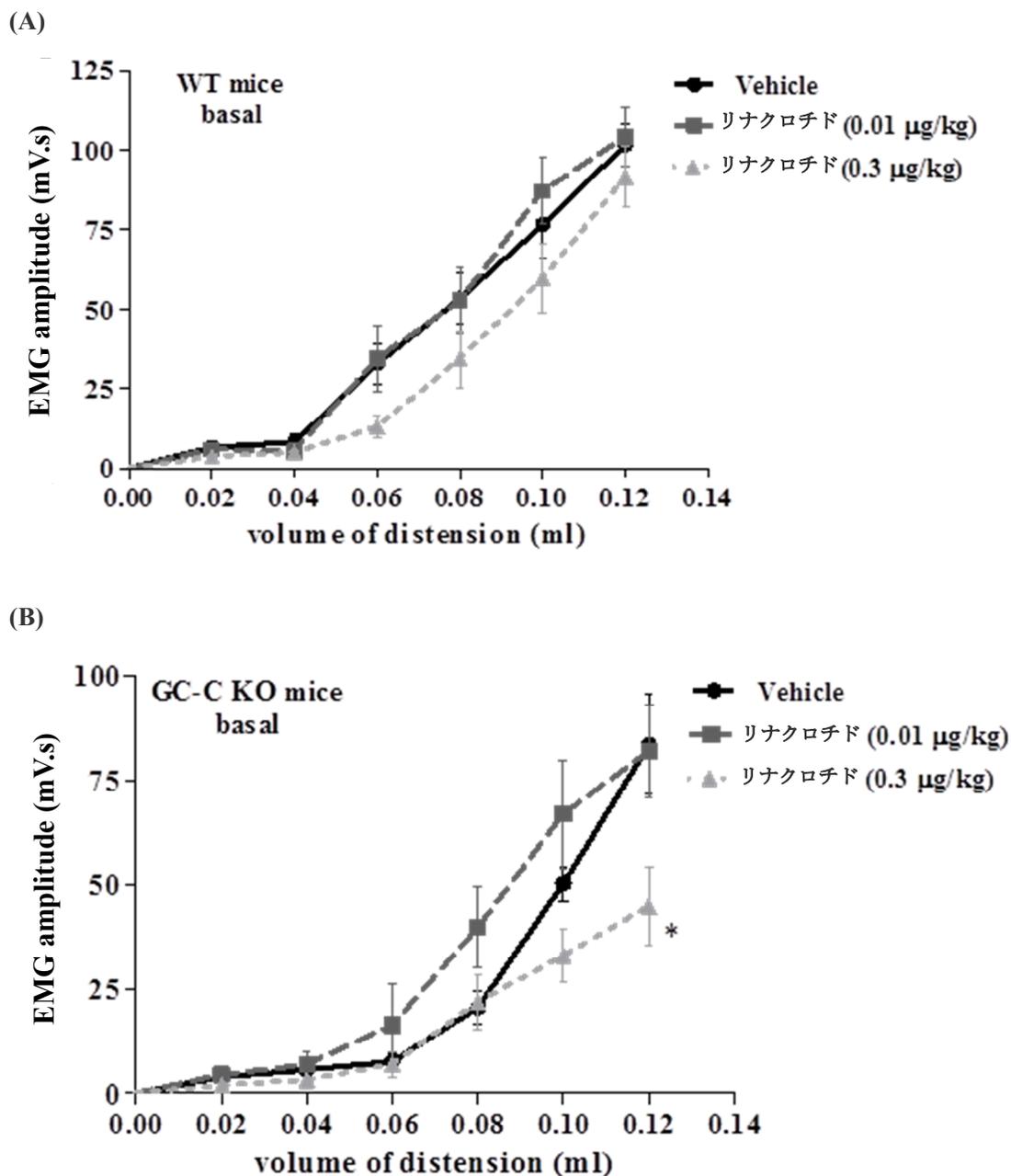
添付資料 4.2.1.1-26, 4.2.1.1-27

雄性の野生型及び GC-C KO マウスを用い、大腸伸展時 (0.02~0.12 mL) に認められる腹筋筋電図活動のスパイク強度を指標に、本薬 (0.01 及び 0.3 µg/kg po) の大腸痛覚に対する作用を検討した。また、雄性野生型及び GC-C KO マウスにおける TNBS 大腸炎誘発大腸痛覚過敏モデルを使用し、本薬 (0.01 µg/kg po) の大腸痛覚過敏改善作用についても検討した。本薬の投与 1 時間後に、一連の大腸伸展刺激として、0.02~0.12 mL の伸展容量を 0.02 mL おきに 10 秒間 5 分間隔で負荷し、各伸展容量における最大スパイク強度を溶媒投与群と比較した。

TNBS 非処置野生型マウスにおいて、本薬 0.01 µg/kg 投与群の腹痛反応は溶媒投与群と同程度であった。また、本薬を 0.3 µg/kg 投与した群で腹痛反応が小さくなる傾向が認められたが、いずれの大腸伸展容量においても溶媒投与群に対する有意差は認められなかった (図 2.6.2-22)。TNBS 非処置 GC-C KO マウスにおいては、本薬は 0.3 µg/kg の用量で、0.12 mL で大腸を伸展した際の腹痛反応を有意に抑制した (図 2.6.2-22)。

野生型及び GC-C KO マウスの大腸内に、TNBS (20 mg/kg) を直接投与した 3 日後に腹痛反応を測定したところ、いずれにおいても、TNBS 大腸炎に伴う大腸痛覚過敏が認められた。本薬 (0.01 µg/kg po) は野生型マウスにおける大腸痛覚過敏に対してのみ有意な改善効果を示し、GC-C KO マウスにおいては改善効果を示さなかった (図 2.6.2-23)。

図 2.6.2-22 (A) 野生型及び (B) GC-C 受容体ノックアウトマウスにおける腹痛反応に対するリナクロチドの作用



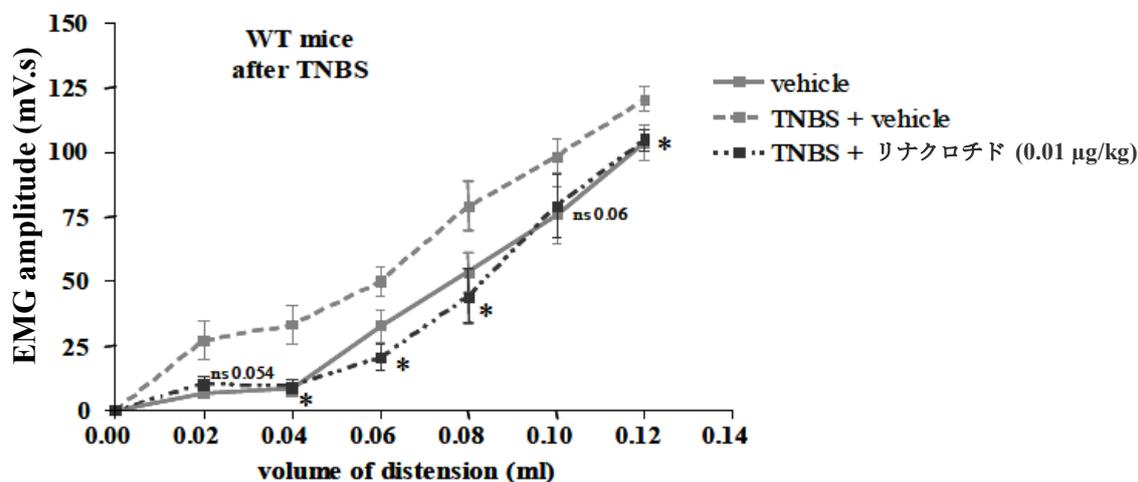
(A) 図中のリナクロチド 0.01 µg/kg 群の各ポイントは 12 例，それ以外の群の各ポイントは 14 例の平均値±標準誤差を示す。(B) 図中の溶媒 (Vehicle)，リナクロチド 0.01 及び 0.3 µg/kg 群の各ポイントは，それぞれ 14，11 及び 12 例の平均値±標準誤差を示す。*は溶媒投与群に対する有意差を示す (Dunnett 検定: *P<0.05)。

EMG: 筋電図 (Electromyography), GC-C KO mice: GC-C 受容体ノックアウトマウス, WT mice: 野生型マウス

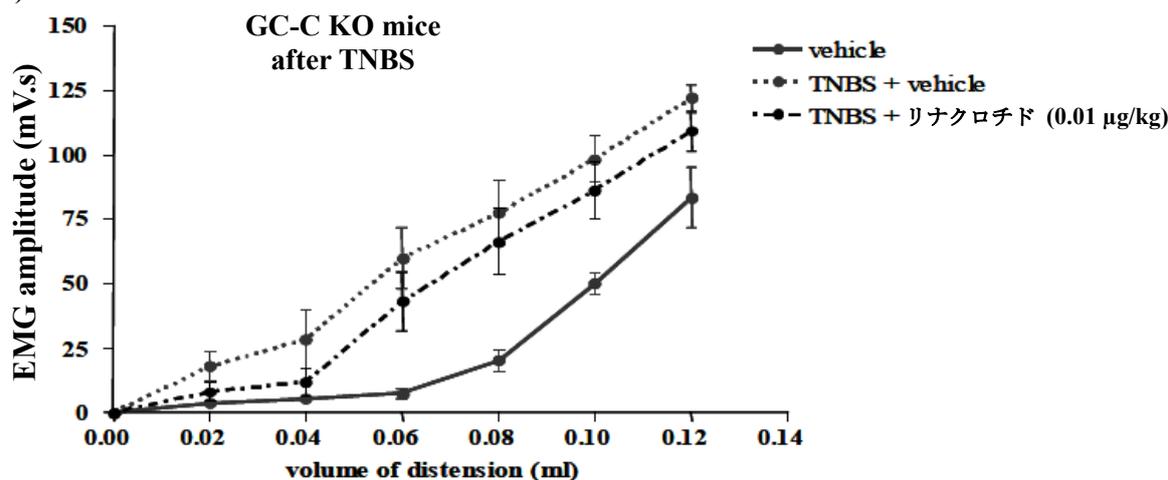
(添付資料 4.2.1.1-27: 0456-PH-0009)

図 2.6.2-23 (A) 野生型及び (B) GC-C 受容体ノックアウトマウスにおける TNBS 大腸炎誘発大腸痛覚過敏に対するリナクロチドの改善作用

(A)



(B)



(A) 図中の Vehicle 群の各ポイントは 14 例、それ以外の群の各ポイントは 12 例の平均値±標準誤差を示す。*は TNBS+Vehicle 群に対する有意差を示す (Student t 検定: *P<0.05)。(B) 図中の各ポイントは 14 例の平均値±標準誤差を示す。

EMG: 筋電図 (Electromyography), GC-C KO mice: GC-C 受容体ノックアウトマウス, TNBS: トリニトロベンゼンスルホン酸 (Trinitrobenzenesulfonic acid), WT mice: 野生型マウス

(添付資料 4.2.1.1-26: MDP-103-023-PHR-01)

2.6.2.2.7 便性状に対する作用

添付資料 4.2.1.1-28

マウス及びラットの便性状を指標に、本薬の下痢誘発作用を検討した。

本薬 (50~200 mg/kg po) は単回投与により、雌性マウス及び雌性ラットにおける軟便、無形状便若しくは水様便の発生頻度を 50 mg/kg 以上の用量で増加させた。また、雄性マウス及び雄性ラッ

トにおいて、本薬は 200 mg/kg で軟便、無形状便若しくは水様便の発生頻度を増加させた。本薬の5日間反復投与は、雌性及び雄性マウスの軟便、無形状便若しくは水様便の発生頻度を 100 mg/kg (1日2回) 及び 200 mg/kg (1日1回) の用量において増加させたが、体重に対して影響を及ぼさなかった。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 代謝物の薬理作用

添付資料 4.2.1.2-1, 4.2.1.2-2, 4.2.1.2-3, 4.2.2.4-7

本薬は腸管腔内でカルボキシペプチダーゼ A により加水分解され、13 個のアミノ酸から成るペプチドである MM-419447 が主要代謝物として生成される。なお、MM-419447 は、ヒト、マウス及びラットの腸液を用いた *in vitro* 試験において検出されている (2.6.4.5.1.4, 2.6.4.5.1.5 及び 2.7.2.2.1.2)。

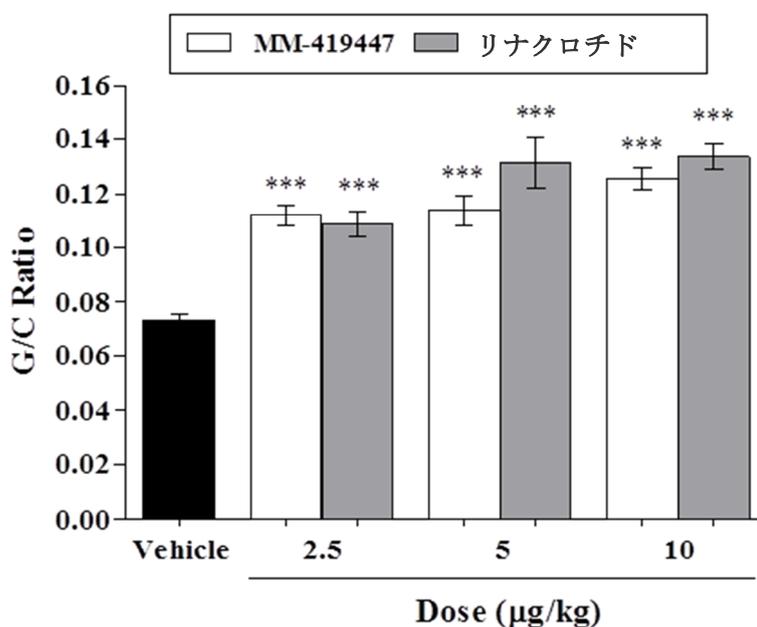
T84 細胞及び ^{125}I -pSTa を用いた GC-C 受容体結合試験において、MM-419447 は本薬とほぼ同等の GC-C 受容体親和性を示した (2.6.2.2.1.1)。また、酸性、中性及びアルカリ性条件下における MM-419447 の GC-C 受容体に対する親和性に、差は認められなかった (2.6.2.2.1.2)。

同様に、ラット小腸刷子縁膜より調製した膜標品及び ^{125}I -pSTa を用いた GC-C 受容体結合試験において、MM-419447 は本薬とほぼ同等の GC-C 受容体親和性を示した (2.6.2.2.1.4)。

MM-419447 及び本薬はいずれも T84 細胞において細胞内 cGMP 濃度を増加させ、MM-419447 と本薬の同濃度における細胞内 cGMP 濃度は同程度であった (2.6.2.2.3.1)。

MM-419447 及び本薬の幼若マウス及び雌性ラット小腸における腸管分泌促進作用を検討した。幼若マウス (7~9 日齢) に MM-419447 及び本薬 (2.5~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を経口投与し、その 1 時間後に摘出した腸管の重量と体重の比を腸管分泌の指標として、腸管分泌促進作用を検討した。MM-419447 は検討したすべての用量において、幼若マウスにおける腸管分泌を有意に促進し、その作用は同用量の本薬による作用と同程度であった (図 2.6.2-24)。

図 2.6.2-24 幼若マウスにおける MM-419447 及びリナクロチドの腸管分泌促進作用



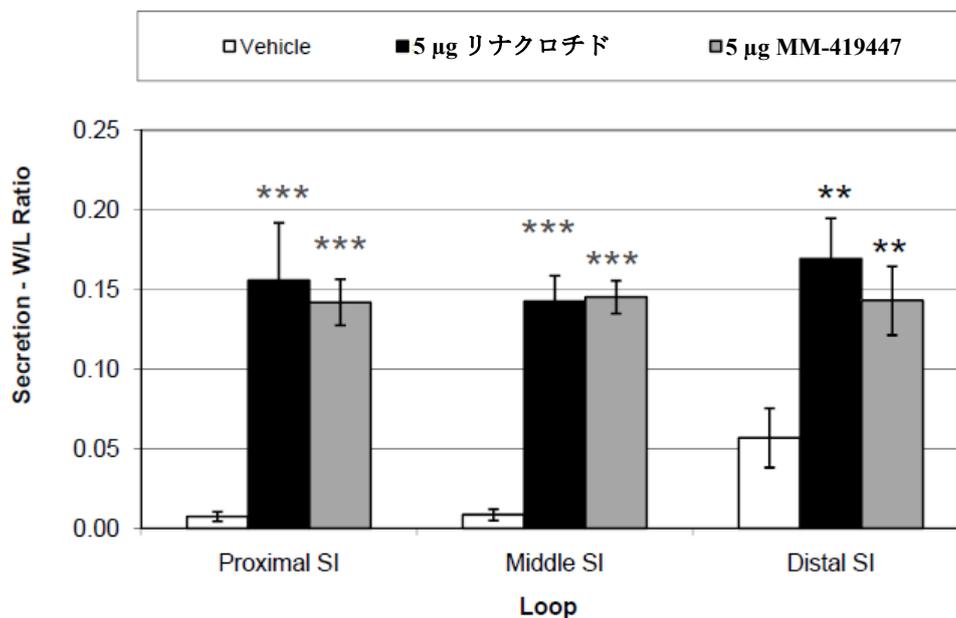
図中の溶媒 (Vehicle), MM-419447 2.5, 5 及び 10 µg/kg 群のカラムは, それぞれ 10, 13, 9 及び 13 例の平均値±標準誤差を示す。図中のリナクロチド 2.5, 5 及び 10 µg/kg 群のカラムは, それぞれ 13, 6 及び 13 例の平均値±標準誤差を示す。***は溶媒投与群に対する有意差を示す (薬物ごとに Dunnett 検定: ***P<0.001)。

G/C ratio : 腸管重量と体重の比 (Gut weight to carcass weight ratio)
(添付資料 4.2.1.2-2 : 0456-PH-0008)

次に, 雌性ラットの小腸 (近位, 中位, 遠位) にループを作製し, ループ内に薬物を直接投与した 90 分後に, ループ中に貯留した腸液量を測定することにより, MM-419447 及び本薬の腸管分泌促進作用を検討した。

MM-419447 及び本薬 (それぞれループ内に 5 µg/200 µL を直接投与) は, すべての部位において有意に腸管分泌を上昇させた (図 2.6.2-25)。

図 2.6.2-25 雌性ラットの小腸における MM-419447 及びリナクロチドの腸管分泌促進作用



** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ as compared to vehicle

図中の各カラムは 10 例の平均値 \pm 標準誤差を示す。**及び***は溶媒 (Vehicle) 投与群に対する有意差を示す (Student t 検定)。

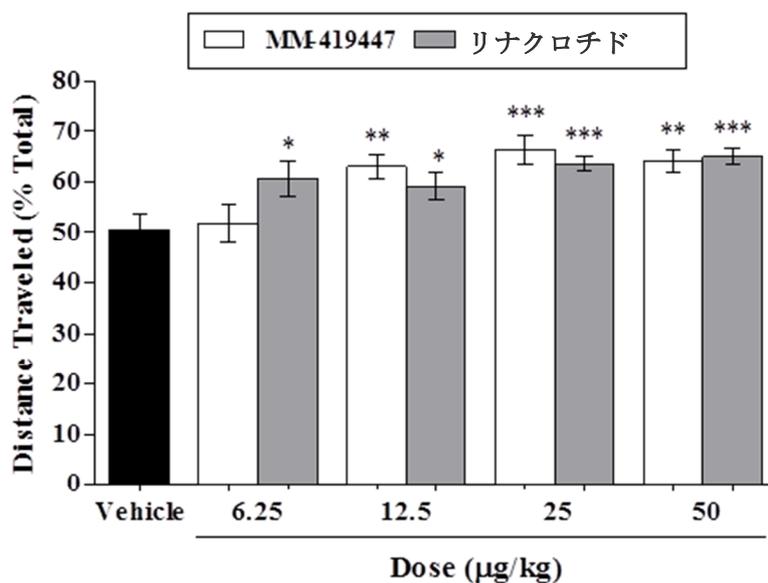
W/L ratio : 単位長あたりの腸液重量 (Weight of intestinal fluid to length of intestine), SI : 小腸 (Small intestine)

(添付資料 4.2.1.2-3 : MDP-103-085-PHR-01)

MM-419447 及び本薬の雌性ラットにおける小腸輸送能促進作用 (活性炭末法) を検討した。

絶食下のラットに MM-419447 及び本薬 (6.25~50 µg/kg) を経口投与した直後に、活性炭末を経口投与し、その 10 分後に活性炭末の小腸内移動距離を測定した。MM-419447 及び本薬は、それぞれ 12.5 及び 6.25 µg/kg 以上の用量群において有意な小腸輸送能促進作用を示した (図 2.6.2-26)。なお、MM-419447 の 12.5 µg/kg 以上の用量群の作用は、同用量の本薬による作用と同程度であった。

図 2.6.2-26 雌性ラットにおける MM-419447 及びリナクロチドの小腸輸送能促進作用



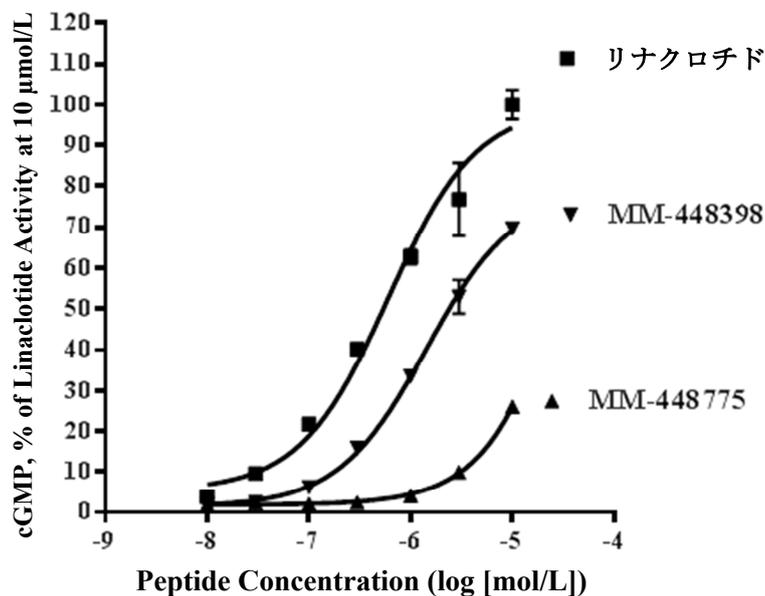
図中の両化合物の6.25 µg/kg群のカラムは5例, それ以外のカラムは10例の平均値±標準誤差を示す。
*, **及び***は溶媒(Vehicle)投与群に対する有意差を示す(薬物ごとにDunnett検定: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)。

(添付資料 4.2.1.2-2 : 0456-PH-0008)

次に, 本薬をラット腸液とともにインキュベーションすることにより生成される MM-419447 以外の代謝物についても, T84 細胞における細胞内 cGMP 濃度の増加を指標として, その GC-C 受容体活性化作用を検討した。

還元型リナクロチド (3 及び 100 nmol/L), MM-421202 (1, 100 及び 1000 nmol/L), MM-421519 (1 nmol/L), MM-421524 (1 nmol/L) 及び MM-421522 (1, 100 及び 1000 nmol/L) は, いずれも T84 細胞における細胞内 cGMP 濃度に有意な影響を及ぼさなかった (表 2.6.2-3)。なお, 還元型リナクロチド, MM-421202 及び MM-421519 は, 本薬をヒト腸液とともにインキュベーションした試験においても検出されている (2.7.2.2.1.2)。

図 2.6.2-27 リナクロチド及び原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の T84 細胞内 cGMP 濃度に対する作用 (1)

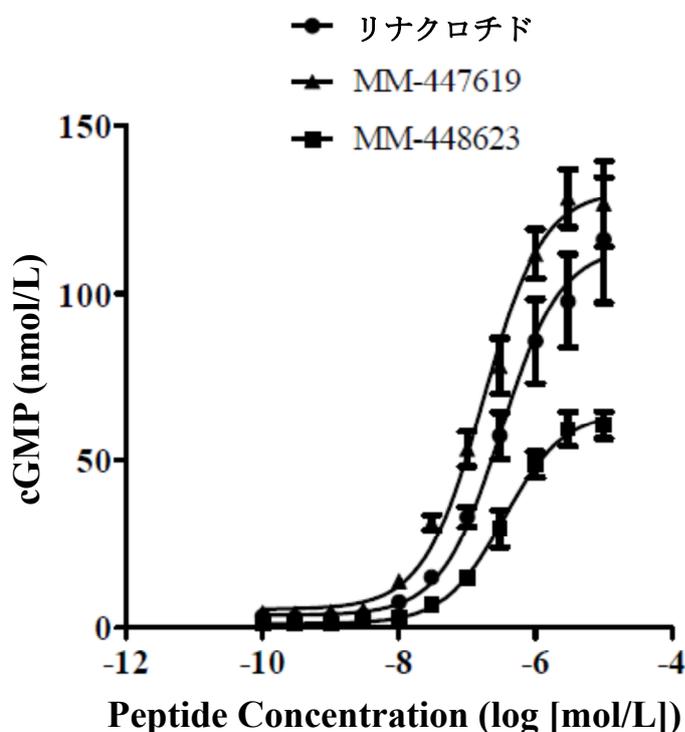


リナクロチド 10000 nmol/L における細胞内 cGMP 濃度を 100% に設定した。図中の各ポイントは 2 例の平均値±標準誤差を示す。

MM-448398 : 類縁物質 2 * , MM-448775 : 類縁物質 3 *
(添付資料 4.2.1.2-5 : MDP-103-136-PHR-01)

更に、類縁物質 4 * 及び 類縁物質 5 * (0.1~10000 nmol/L) の GC-C 受容体活性化作用を検討した。類縁物質 4 * は本薬と同程度の GC-C 受容体活性化作用を示した(図 2.6.2-28)。類縁物質 5 * も GC-C 受容体活性化作用を示したが、10000 nmol/L で認められた細胞内 cGMP 濃度の増加は、本薬による増加に比べて小さかった (図 2.6.2-28)。

図 2.6.2-28 リナクロチド及び原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の T84 細胞内 cGMP 濃度に対する作用 (2)



図中のリナクロチド、MM-447619 及び MM-448623 の各ポイントは、それぞれ 6 例、4 例及び 2 例の平均値±標準誤差を示す。

MM-447619 : 類縁物質 4* , MM-448623 : 類縁物質 5 *

(添付資料 4.2.1.2-6 : MDP-103-069-PHR-01)

2.6.2.3.3 ラット術後小腸輸送能低下に対する作用

添付資料 4.2.1.2-7

雌性ラットにおける術後小腸輸送能低下（腸閉塞）モデルを用いて、本薬の小腸輸送能改善作用を検討した。絶食下のラットに麻酔下で開腹術を施行し、腸管を 5 分間マッサージすることにより物理的な刺激を与えた。覚醒直後に本薬（10 µg/kg）を経口投与し、その 1 時間後に同用量の本薬を再度経口投与した。更なる直後に活性炭末を経口投与し、20 分後の小腸内の活性炭末移動距離を指標に小腸輸送能を測定した。

ラットにおける、開腹及び腸管の物理的な刺激により惹起される小腸輸送能低下に対して、本薬は 10 µg/kg の用量で有意な改善効果を示した。

2.6.2.3.4 ラットオピオイド誘発小腸輸送能低下に対する作用

添付資料 4.2.1.2-8

雌性ラットにおけるモルヒネ誘発小腸輸送能低下モデルを用いて、本薬の小腸輸送能改善作用を検討した。絶食下のラットにモルヒネ (2.5 mg/kg ip) を投与し、その 30 分後に本薬 (12.5, 25 及び 50 µg/kg) を経口投与した。更にその 10 分後に活性炭末を経口投与し、10 分後の小腸内の活性炭末移動距離を指標に小腸輸送能を測定した。

ラットにモルヒネを投与することにより惹起される小腸輸送能低下に対して、本薬は改善作用を示し、25 µg/kg 以上の用量群で溶媒投与群との間に有意な差が認められた。

2.6.2.3.5 ラット結腸粘膜透過性に対する作用

添付資料 4.2.1.2-9

雌性ラットを用い、正常及び PRS 誘発結腸粘膜透過性亢進モデルにおける、本薬の粘膜透過性に対する作用を検討した。ラットに本薬 (0.3, 1, 3 及び 10 µg/kg) を経口投与した直後に PRS を 2 時間負荷し、その後 ⁵¹Cr でラベルされたエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を結腸内に注入した。結腸粘膜透過性は、尿中に排泄された ⁵¹Cr-EDTA 量を指標に測定した。

本薬は検討したいずれの用量においても、非ストレス負荷時の結腸粘膜透過性及び PRS 負荷により増大した結腸粘膜透過性に対して有意な影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

コアバッテリー試験 (心血管系及び呼吸系に及ぼす影響) を GLP 適合試験として実施した。

2.6.2.4.1 コアバッテリー試験

2.6.2.4.1.1 中枢神経系に及ぼす影響

該当試験なし。

本薬は消化管からの吸収性が極めて低く (2.6.4.3)、消化管内で短鎖ペプチドやアミノ酸レベルにまで分解されるペプチド (2.6.4.5) で、中枢神経系を含めた全身への曝露が想定されないこと、これまでに実施したリナクロチドのマウス、ラット又はカニクイザルにおける経口又は静脈内投与毒性試験 (2.6.6) のいずれにおいても、中枢神経系への影響を示唆する変化は認められなかったことから、中枢神経系に関する安全性薬理試験は不要と判断し、実施しなかった。

2.6.2.4.1.2 心血管系及び呼吸系に及ぼす影響

2.6.2.4.1.2.1 hERG チャンネルに対する作用

添付資料 4.2.1.3-1

本薬の hERG チャンネルを介するカリウム電流 (hERG 電流) に及ぼす影響を hERG チャンネルを発現させた HEK293 細胞を用いて検討した。本薬は PBS に溶解した後、灌流液中でそれぞれ 10 及び 100 $\mu\text{mol/L}$ の濃度に希釈した。HEK293 細胞に灌流液を 12 分間まで曝露させたときの hERG 電流の変化をパッチクランプ法にて測定した。媒体対照として HB-PS を同様に処置した。

その結果、本薬の 10 及び 100 $\mu\text{mol/L}$ における hERG 電流の抑制率はそれぞれ 3.7% 及び 0.9% で、媒体対照群の抑制率 (0.7%) との間には統計学的な有意差は認められなかった ($P>0.05$)。

したがって、本薬は 100 $\mu\text{mol/L}$ まで hERG 電流の抑制作用はないと判断された。

2.6.2.4.1.2.2 麻酔イヌにおける心血管系及び呼吸系に対する作用

添付資料 4.2.1.3-2

本薬を PBS に溶解し、0.2, 1 及び 5 mg/kg の投与量で雌雄各 2 例の麻酔処置したビーグル犬に漸増方式で単回静脈内持続投与 (15 分間) し、心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討した。また、投与前と 5 mg/kg の投与終了直後、投与終了後 15, 30, 60 及び 90 分に採血を行い、非 GLP 下において血中薬物濃度を測定した。

その結果、いずれの用量においても、血圧、心拍数、左心室内圧の最大立ち上がり速度及び心電図パラメータ (PR, RR, QRS, QT 及び QTc 間隔) に投与に起因すると思われる変化は認められなかった。また、いずれの用量においても、呼吸系パラメータ (ピーク吸気流量、ピーク呼気流量、一回換気量、分時換気量及び呼吸数) に変化は認められなかった。なお、5 mg/kg の投与終了直後における血漿中リナクロチド濃度は雄 30.8 $\mu\text{g/mL}$ 、雌 24.3 $\mu\text{g/mL}$ であった。

したがって、本薬は 5 mg/kg まで心血管系及び呼吸系に対する作用はないと判断された。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬理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

効力を裏付ける試験において、本薬は GC-C 受容体に対して結合親和性を示し、細胞内 cGMP 濃度を増加させた。また、GC-C 受容体以外の受容体、イオンチャンネル及びトランスポーターに対しては明らかな親和性を示さなかった。

ラット及びマウスを用いた *in vivo* 試験において、本薬は腸管腔内に分泌された腸液中の cGMP 濃度を増加させ、腸管分泌を促進するとともに、小腸輸送能を促進させた。一方、GC-C KO マウ

スにおいて、本薬は cGMP 濃度増加作用、腸管分泌促進作用及び小腸輸送能促進作用を示さなかったことから、本薬のこれらの作用は GC-C 受容体を介していると考えられる。

本薬の大腸痛覚に対する作用を検討する目的で、正常ラット及びマウスにおける大腸伸展刺激負荷時の腹痛反応を測定した結果、本薬による明らかな変化は認められなかった。このことから、本薬は正常時の大腸痛覚に影響を及ぼさないことが示唆された。一方、WAS 及び PRS といった心理的若しくは身体的ストレスをラットに負荷した時に認められる大腸痛覚過敏に対して、本薬は改善作用を示した。更に、本薬は、ラット及びマウス TNBS 大腸炎モデルにおける大腸痛覚過敏を改善した。大腸炎モデルで認められた大腸痛覚過敏に対する本薬の改善作用は、GC-C KO マウスでは認められなかったことから、本薬の大腸痛覚過敏改善作用も GC-C 受容体を介して発現すると考えられる。

以上の効力を裏付ける試験から、本薬は GC-C 受容体活性化作用に基づく腸管分泌促進作用、小腸輸送能促進作用及び大腸痛覚過敏改善作用を有することが明らかとなり、IBS-C 患者において便秘を改善するとともに、腹痛を緩和し、その症状を寛解することが期待される。

経口投与された本薬は、腸管腔内で MM-419447 に速やかに代謝される。MM-419447 は、本薬のカルボキシ末端のチロシンを欠損する 13 アミノ酸から成るペプチドで、ヒト、マウス及びラットの腸液を用いた *in vitro* 試験において検出されている主要代謝物である。

MM-419447 の薬理活性を検討した結果、本薬と同程度の GC-C 受容体活性化作用を示し、*in vivo* 試験においても本薬と同程度の腸管分泌促進作用及び小腸輸送能促進作用を示した。このことから、MM-419447 は、本薬を経口投与した際の薬理作用発現に寄与していると考えられる。また、本薬のバイオアベイラビリティは検討したすべての非臨床動物種（マウス、ラット及びカニクイザル）において低く（0.2%未満）、ヒトにおいても経口投与後の血漿中濃度はほとんどの試料で定量下限（0.2~3 ng/mL）未満であった（表 2.6.4-22）。更に、MM-419447 のラットにおけるバイオアベイラビリティも本薬と同程度であり、ヒトに本薬を経口投与した際の血漿中 MM-419447 濃度はすべての試料で定量下限（2~3 ng/mL）未満であった（表 2.6.4-22）。このことに加えて、GC-C 受容体が腸管上皮の管腔側に発現していることから、本薬及び MM-419447 は、循環血中からではなく腸管局所において GC-C 受容体に作用することにより、薬理作用を発揮していると考えられる。

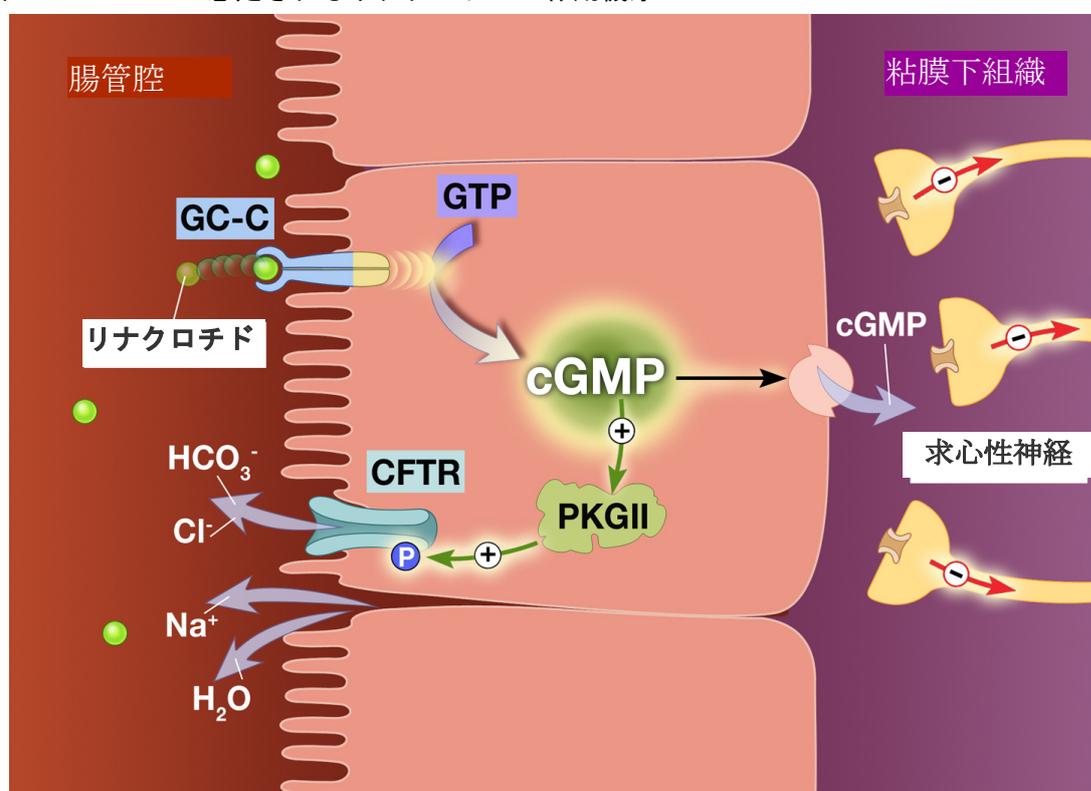
GC-C 受容体の活性化により細胞内 cGMP 濃度は上昇するが、細胞内 cGMP は主に蛋白質キナーゼ G II (PKG II) による cGMP 依存性リン酸化を介して、腸上皮細胞頂端膜に存在する囊胞性線維膜貫通調節因子 (CFTR) を活性化することにより、腸管腔内への塩化物イオンや重炭酸イオン分泌を増大させる [Pfeifer, 1996; Selvaraj, 2000; Vaandrager, 1998; Vaandrager, 2002]。その結果、腸管分泌が増加し腸管輸送能が亢進することが知られている。

大腸痛覚における cGMP の関与について、いくつかの報告がある。摘出したマウス大腸とそれに付随する求心性神経線維を用いた *in vitro* 試験において、本薬及び cGMP は求心性神経の発火を抑制した [Castro, 2011; Castro, 2013]。また、ラット TNBS 大腸炎誘発大腸痛覚過敏モデルにおいて、経口投与された cGMP は痛覚過敏を改善し、併せて大腸を起始部とする求心性神経の発火を抑制

した[Silos-Santiago, 2013]。大腸痛覚を伝達する求心性神経の起始部は、腸管粘膜下組織に存在することが知られている。また、Caco-2 細胞を用いた試験において、本薬は細胞内 cGMP 濃度に加えて、細胞頂端膜側及び側底膜側の細胞外液の cGMP 濃度も上昇させた。このことから、本薬の作用によって腸上皮細胞内で産生された cGMP は、腸管腔及び粘膜下組織の両方向に輸送されることが示された。以上のことから、本薬は求心性神経を介した大腸痛覚伝達を抑制することにより腹痛を改善し、その作用は粘膜下組織における細胞外 cGMP の増加によって介在される可能性が示唆された。

想定される本薬の作用機序を図 2.6.2-29 にまとめた。

図 2.6.2-29 想定されるリナクロチドの作用機序



CFTR：嚢胞性線維症膜貫通調節因子，cGMP：サイクリック GMP，Cl⁻：塩化物イオン，GC-C：グアニル酸シクラーゼ C（受容体），HCO₃⁻：重炭酸イオン，H₂O：水，Na⁺：ナトリウムイオン，PKG II：蛋白質キナーゼ GII，+：活性化，-：求心性神経の抑制

次に、副次的薬理試験において、本薬は術後腸閉塞モデル及びオピオイド投与ラットにおける腸管輸送能低下を改善し、これらの病態に対しても有効である可能性が示唆された。なお、本薬はラット結腸粘膜透過性には影響を及ぼさなかった。

安全性薬理試験において、コアバッテリー試験として、心血管系及び呼吸系に対する本薬の作用を検討した。

In vitro 電気生理学的試験において、本薬（10, 100 $\mu\text{mol/L}$ ）は HEK293 細胞におけるヒト hERG チャンネルを介するカリウム電流に明らかな作用を示さなかった。麻酔イヌに本薬（0.2~5 mg/kg）を単回静脈内持続投与した際の心血管系及び呼吸系に及ぼす影響を検討したが、血圧、心拍数、心電図及び呼吸系パラメータに薬物投与の影響は認められなかった。したがって、本薬には心血管系及び呼吸系に対する作用はないと判断された。中枢神経系に関する安全性薬理試験は実施しなかったが、これまでに実施した本薬のマウス、ラット又はカンクイザルにおける経口又は静脈内投与毒性試験（2.6.6）のいずれにおいても、中枢神経系への影響を示唆する変化は認められなかった。

2.6.2.7 図表

図表は各項の本文中の適切な場所に挿入した。

2.6.2.8 参考文献

- Castro J, Harrington AM, Hughes PA, Martin CM, Ge P, Shea CM, et al. Linaclotide inhibits colonic nociceptors and relieves abdominal pain via guanylate cyclase-C and extracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Gastroenterol.* 2013;145:1334-46.
- Castro J, Martin C, Hughes PA, Silos-Santiago A, Kurtz CB, Blackshaw LA, et al. A novel role of cyclic GMP in colonic sensory neurotransmission in healthy and TNBS-treated mice. *Gastroenterol.* 2011;140:S-538.
- Pfeifer A, Aszódi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fässler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science.* 1996;274:2082-6.
- Selvaraj NG, Prasad R, Goldstein JL, Rao MC. Evidence for the presence of cGMP-dependent protein kinase-II in human distal colon and in T84, the colonic cell line. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1498:32-43.
- Silos-Santiago I, Hannig G, Eutamene H, Ustinova EE, Bernier SG, Ge P, et al. Gastrointestinal pain: Unraveling a novel endogenous pathway through uroguanylin/guanylate cyclase-C/cGMP activation. *Pain.* 2013;154:1820-30.
- Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EME, Bot AGM, et al. Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:1466-71.
- Vaandrager AB. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. *Mol Cell Biochem.* 2002;230:73-83.

目次

| | | |
|---------|-------------------|----|
| 2.6.3 | 薬理試験概要表..... | 2 |
| 2.6.3.1 | 薬理試験：一覧表..... | 2 |
| 2.6.3.2 | 効力を裏付ける試験..... | 9 |
| 2.6.3.3 | 副次的薬理試験..... | 16 |
| 2.6.3.4 | 安全性薬理試験..... | 19 |
| 2.6.3.5 | 薬力学的薬物相互作用試験..... | 20 |

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その1）

被験物質：リナクロチド

| Type of Study | Test System | Methods of Administration | Testing Facility | Study Report Number | CTD Number |
|---|---|---------------------------|--------------------------|---------------------|------------|
| Primary Pharmacodynamics | | | | | |
| Relative binding affinities of linaclotide and MM-419447 to human GC-C receptor | Human T84 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-060-PHR-01 | 4.2.1.1-1 |
| Effect of pH on the relative binding affinities of linaclotide, MM-419447, STa, STc, guanylin, and uroguanylin to human GC-C receptor | Human T84 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-067-PHR-01 | 4.2.1.1-2 |
| Relative binding affinity of linaclotide to rat GC-C receptor | Sprague-Dawley rat intestinal mucosal cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-059-PHR-01 | 4.2.1.1-3 |
| Relative binding affinity of linaclotide and MM-419447 to rat GC-C receptor | Sprague-Dawley rat intestinal mucosa (brush-border membrane) | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-071-PHR-01 | 4.2.1.1-4 |
| Binding of linaclotide to intestinal mucosa from GC-C KO and WT mice | GC-C KO or WT (C57BL/6) mouse intestinal mucosal cell and brush-border membrane | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-058-PHR-01 | 4.2.1.1-5 |
| Selectivity of linaclotide binding to receptors, ion channels and transporters | 50 different mammalian receptors, ion channels and transporters | <i>In vitro</i> | ■ | MDP-103-019-PHR-01 | 4.2.1.1-6 |
| <i>Table continued on next page</i> | | | | | |

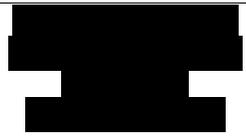
2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その2）

被験物質：リナクロチド

| Type of Study | Test System | Methods of Administration | Testing Facility | Study Report Number | CTD Number |
|--|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------|------------|
| Primary Pharmacodynamics (continued) | | | | | |
| <i>In vitro</i> stimulation of cGMP production by linaclotide and MM-419447 | Human T84 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-001-PHR-01 | 4.2.1.1-7 |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-001-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0002 | 4.2.1.1-8 |
| Effect of linaclotide and STc on cGMP efflux | Caco-2 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-053-PHR-01 | 4.2.1.1-9 |
| Effect of linaclotide and tegaserod maleate on mouse intestinal secretion | 7-9 day old CD-1 suckling mice | Single oral administration | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-015-PHR-01 | 4.2.1.1-10 |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-015-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0005 | 4.2.1.1-11 |
| Effect of linaclotide on intestinal secretion and cGMP production in rats | Sprague-Dawley rats (female) | Intra-intestinal injection | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-024-PHR-01 | 4.2.1.1-12 |
| Effect of linaclotide on intestinal secretion and cGMP production in GC-C KO and WT mice | GC-C KO and WT (C57BL/6) mice (male) | Intra-intestinal injection | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-026-PHR-01 | 4.2.1.1-13 |
| Effect of linaclotide and tegaserod maleate on mouse GI transit | CD-1 mice (male and female) | Single oral administration | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-016-PHR-01 | 4.2.1.1-14 |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-016-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0006 | 4.2.1.1-15 |
| <i>Table continued on next page</i> | | | | | |

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その3）

被験物質：リナクロチド

| Type of Study | Test System | Methods of Administration | Testing Facility | Study Report Number | CTD Number |
|---|---|---|---|---------------------|------------|
| Primary Pharmacodynamics (continued) | | | | | |
| Effect of acute or subacute administration of linaclotide and tegaserod maleate on mouse GI transit | CD-1 mice (female) | Single or 5-days repeated oral administration | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-017-PHR-01 | 4.2.1.1-16 |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-017-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0007 | 4.2.1.1-17 |
| Effect of linaclotide and tegaserod maleate on rat GI transit | Sprague-Dawley rats (male and female) | Single oral administration | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-013-PHR-01 | 4.2.1.1-18 |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-013-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0003 | 4.2.1.1-19 |
| Effect of linaclotide on GI transit in GC-C KO and WT mice | GC-C KO and WT (C57BL/6) mice (male and female) | Single oral administration | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-025-PHR-01 | 4.2.1.1-20 |
| Effect of linaclotide on abdominal pain responses induced by colorectal distension in rats | Wistar rats (male) | Single oral administration | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0001 | 4.2.1.1-21 |
| Effect of linaclotide on water avoidance stress-induced visceral hypersensitivity in rats | Wistar rats (male) | Single oral administration |  | MDP-103-022-PHR-02 | 4.2.1.1-22 |
| Effect of linaclotide on visceral hypersensitivity induced by TNBS-caused inflammation and partial restraint stress in rats | Wistar rats (male and female) | Single oral administration |  | MDP-103-014-PHR-01 | 4.2.1.1-23 |
| <i>Table continued on next page</i> | | | | | |

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その4）

被験物質：リナクロチド

| Type of Study | Test System | Methods of Administration | Testing Facility | Study Report Number | CTD Number |
|--|---|---|--------------------------|---------------------|------------|
| Primary Pharmacodynamics (continued) | | | | | |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-014-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0004 | 4.2.1.1-24 |
| Effect of linaclotide on inflammation-induced visceral hypersensitivity in TNBS-treated rats | Wistar rats (male) | Single oral administration | ██████████ | MDP-103-030-PHR-01 | 4.2.1.1-25 |
| Effect of linaclotide on inflammation-induced visceral hypersensitivity in TNBS-treated mice | GC-C KO and WT (C57BL/6) mice (male) | Oral administration at two time points (baseline and post-TNBS-induction) | ██████████ | MDP-103-023-PHR-01 | 4.2.1.1-26 |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-023-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0009 | 4.2.1.1-27 |
| Effect of linaclotide on stool consistency in rodents | Sprague-Dawley rats and CD-1 mice (male and female) | Single oral administration Once- or twice-daily oral administration for 5 days | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-032-PHR-01 | 4.2.1.1-28 |
| <i>Table continued on next page</i> | | | | | |

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その5）

被験物質：リナクロチド

| Type of Study | Test System | Methods of Administration | Testing Facility | Study Report Number | CTD Number |
|--|---|----------------------------|--------------------------|---------------------|------------|
| Secondary Pharmacodynamics | | | | | |
| Effect of linaclotide and MM-419447 on mouse intestinal secretion and rat GI transit | 7-9 day old CD-1 suckling mice and Sprague-Dawley rats (female) | Single oral administration | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-018-PHR-01 | 4.2.1.2-1 |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-018-PHR-01 | N/A | N/A | Astellas Pharma Inc. | 0456-PH-0008 | 4.2.1.2-2 |
| Effects of linaclotide and MM-419447 on intestinal secretion in rats | Sprague-Dawley rats (female) | Intra-intestinal injection | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-085-PHR-01 | 4.2.1.2-3 |
| <i>In vitro</i> cGMP production by linaclotide degradation products formed during the digestion pathway in the intestine | Human T84 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-039-IAR-01 | 4.2.2.4-7 |
| <i>In vitro</i> cGMP production by linaclotide 類縁物質1* formed during the manufacture of linaclotide | Human T84 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-061-PHR-01 | 4.2.1.2-4 |
| <i>Table continued on next page</i> | | | | | |

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その6）

被験物質：リナクロチド

| Type of Study | Test System | Methods of Administration | Testing Facility | Study Report Number | CTD Number |
|--|------------------------------|---|---|---------------------|------------|
| Secondary Pharmacodynamics (continued) | | | | | |
| <i>In vitro</i> cellular pharmacological activity of linaclotide drug substance impurities MM-448398 and MM-448775 | Human T84 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-136-PHR-01 | 4.2.1.2-5 |
| <i>In vitro</i> cellular pharmacological activity of linaclotide drug product degradants MM-447619 and MM-448623 | Human T84 cells | <i>In vitro</i> | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-069-PHR-01 | 4.2.1.2-6 |
| Effect of linaclotide on rat GI transit in postoperative ileus model | Sprague-Dawley rats (female) | Oral administration at two time points (immediately following surgery and after 1 h recovery) | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-027-PHR-01 | 4.2.1.2-7 |
| Effect of linaclotide on rat GI transit in opiate-induced constipation model | Sprague-Dawley rats (female) | Single oral administration | Ironwood Pharmaceuticals | MDP-103-043-PHR-01 | 4.2.1.2-8 |
| Effect of linaclotide on stress-increased colonic paracellular permeability in rats | Wistar rats (female) | Single oral administration |  | MDP-103-031-PHR-01 | 4.2.1.2-9 |
| <i>Table continued on next page</i> | | | | | |

2.6.3.1.1 薬理試験：一覧表（その7）

被験物質：リナクロチド

| Type of Study | GLP Study | Test System | Methods of Administration | Testing Facility | Study Report Number | CTD Number |
|--|-----------|-------------------------------|---------------------------|------------------|---------------------|------------|
| Safety Pharmacology | | | | | | |
| Effects of linaclotide on cloned hERG channels expressed in mammalian cells | Yes | hERG-transfected HEK293 cells | <i>In vitro</i> | ██████████ | MNP-103-024-SPR-01 | 4.2.1.3-1 |
| Cardiovascular and respiratory effects in the anaesthetised dog following intravenous administration | Yes | Beagle dogs (male and female) | Single intravenous dose | ██████████ | MNP-103-025-SPR-01 | 4.2.1.3-2 |

GC-C: guanylate cyclase C, GI: gastrointestinal, HEK: human embryonic kidney, hERG: human ether-a-go-go related gene, KO: knock out, MM-419447: active metabolite of linaclotide, N/A: not applicable, pSTa: porcine-derived heat-stable enterotoxin, STa: human-derived full-length (19-amino acid) E. coli heat-stable bacterial enterotoxin a, STc: synthetic peptide comprised of the core sequence (amino acids 6-19) of STa, TNBS: Trinitrobenzenesulfonic acid, WT: wild type

Astellas Pharma Inc.: 21, Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8585, Japan, ██████████, France, ██████████, ██████████, USA, ██████████, UK, Ironwood Pharmaceuticals (former Microbia, Inc.): 301 Binney Street Cambridge, MA, USA, ██████████, France, ██████████, USA

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (*In vitro*, その1)

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--|---|--|-----------------------------------|------|------|------|-------------|-----|-----|-----|-----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|----------|----|-----|-----|-------------|-----|----|-----|-----------------------------------|
| Relative binding affinities of linaclotide and MM-419447 to human GC-C receptor | <i>In vitro</i> competitive binding with ¹²⁵ I-pSTa in human T84 cells | Duplicate | 0.01, 0.03, 0.1, 0.32, 1, 3.16, 10, 31.6, 100 and 1000 nmol/L | Linaclotide Ki = 1.69 nmol/L MM-419447 Ki = 2.82 nmol/L | 4.2.1.1-1 (MDP-103-060-PHR-01) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Effect of pH on the binding affinities of linaclotide, MM-419447, STa, STc, guanylin and uroguanylin to human GC-C receptor | <i>In vitro</i> competitive binding with ¹²⁵ I-pSTa in human T84 cells | Duplicate | 0.003, 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 and 3000 nmol/L | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Ki (nmol/L)</th> <th>pH 5</th> <th>pH 7</th> <th>pH 8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Linaclotide</td> <td>1.7</td> <td>3.1</td> <td>1.5</td> </tr> <tr> <td>MM-419447</td> <td>0.95</td> <td>1.8</td> <td>1.6</td> </tr> <tr> <td>STa</td> <td>4.9</td> <td>5.4</td> <td>2.8</td> </tr> <tr> <td>STc</td> <td>0.89</td> <td>1.5</td> <td>1.7</td> </tr> <tr> <td>Guanylin</td> <td>36</td> <td>2.8</td> <td>2.8</td> </tr> <tr> <td>Uroguanylin</td> <td>1.4</td> <td>11</td> <td>7.3</td> </tr> </tbody> </table> | Ki (nmol/L) | pH 5 | pH 7 | pH 8 | Linaclotide | 1.7 | 3.1 | 1.5 | MM-419447 | 0.95 | 1.8 | 1.6 | STa | 4.9 | 5.4 | 2.8 | STc | 0.89 | 1.5 | 1.7 | Guanylin | 36 | 2.8 | 2.8 | Uroguanylin | 1.4 | 11 | 7.3 | 4.2.1.1-2 (MDP-103-067-PHR-01) |
| Ki (nmol/L) | pH 5 | pH 7 | pH 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Linaclotide | 1.7 | 3.1 | 1.5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MM-419447 | 0.95 | 1.8 | 1.6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STa | 4.9 | 5.4 | 2.8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| STc | 0.89 | 1.5 | 1.7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Guanylin | 36 | 2.8 | 2.8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Uroguanylin | 1.4 | 11 | 7.3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Relative binding affinity of linaclotide to rat GC-C receptor | <i>In vitro</i> competitive binding with ¹²⁵ I-pSTa in Sprague-Dawley rat intestinal mucosal cells | Duplicate | 0.01, 0.1, 1, 2, 6, 33, 100 and 1000 nmol/L | Linaclotide Ki = 4.3 nmol/L | 4.2.1.1-3 (MDP-103-059-PHR-01) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Relative binding affinity of linaclotide and MM-419447 to rat GC-C receptor | <i>In vitro</i> competitive binding with ¹²⁵ I-pSTa in Sprague-Dawley rat intestinal mucosa (brush-border membrane) | Singlet or duplicate | 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 nmol/L | Linaclotide Ki = 2.63 nmol/L MM-419447 Ki = 4.95 nmol/L | 4.2.1.1-4 (MDP-103-071-PHR-01) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (*In vitro*, その2)

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|--|---|---|--|--|----------------------------------|
| Binding of linaclotide to intestinal mucosa from GC-C KO and WT mice | <i>In vitro</i> competitive binding with ¹²⁵ I-labeled ligand in GC-C KO or WT C57/BL6 mouse intestinal mucosal cell and brush-border membrane | Duplicate | 15 µmol/L | ¹²⁵ I-linaclotide binding to intestinal mucosal cells from GC-C KO mice was less than 10% of that observed in cells from WT mice. The binding to mucosal cells from WT and GC-C KO mice was inhibited by excess linaclotide. | 4.2.1.1-5 (MDP-103-058-PHR-01) |
| | | | 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 and 1000 nmol/L | Ki values of linaclotide for inhibition on ¹²⁵ I-pSTa binding to intestinal brush-border membrane from WT and GC-C KO mice were 16.2 and 11.9 nmol/L, respectively. | |
| Selectivity of linaclotide binding to receptors, ion channels and transporters | <i>In vitro</i> competitive binding with each radioligand to 50 different mammalian receptors, ion channels and transporters | Duplicate | 10 µmol/L | Linaclotide at 10 µmol/L did not inhibit binding of each radioligand to 50 types of receptors, ion channels and transporters more than 50%. | 4.2.1.1-6 (MDP-103-019-PHR-01) |
| <i>In vitro</i> stimulation of cGMP production by linaclotide and MM-419447 | <i>In vitro</i> cGMP measurement in human T84 cells | Quadruplicate Except for MM-419447 at 100 and 300 nmol/L were duplicate. Linaclotide at 0.3, 3 and 300 nmol/L, and MM-419447 at 0.1 and 1000 nmol/L were triplicate | 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 and 1000 nmol/L | Linaclotide significantly increased intracellular cGMP concentration in human colonic T84 cells at concentrations of 100 nmol/L and higher, compared with T84 baseline control group. MM-419447 significantly increased intracellular cGMP concentration at concentrations of 10 nmol/L and higher. | 4.2.1.1-7 (MDP-103-001-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-001-PHR-01 | | | | | 4.2.1.1-8 (0456-PH-0002) |
| Effect of linaclotide and STc on cGMP efflux | <i>In vitro</i> cGMP measurement in Caco-2 cell monolayer | Vehicle; duplicate, drugs; triplicate | 0.01, 0.1 and 1 µmol/L | Application of linaclotide and STc to the apical side of Caco-2 cell monolayer increased the intracellular level of cGMP as well as the levels of cGMP in both the apical and basolateral compartments. | 4.2.1.1-9 (MDP-103-053-PHR-01) |

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (*In vivo*, その1)

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|--|---|--|--|--|----------------------------------|
| Effect of linaclotide and tegaserod maleate on mouse intestinal secretion | <i>In vivo</i> intestinal secretion in 7-9 day old CD-1 suckling mice | Vehicle and linaclotide at 2.5, 5 and 10 µg/kg used 10, 13, 6 and 13 mice, respectively. | Linaclotide; 2.5, 5 and 10 µg/kg po | Linaclotide significantly increased the intestinal secretion in suckling mice at 2.5, 5 and 10 µg/kg. In the experiment using the higher dose range, linaclotide significantly increased the intestinal secretion at doses of 15 µg/kg and greater. On the other hand, tegaserod maleate significantly increased the intestinal secretion only at a dose of 420 µg/kg. | 4.2.1.1-10 (MDP-103-015-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-015-PHR-01 | | N=6 for experiment using higher dose range of linaclotide and tegaserod. | Linaclotide, tegaserod; 2, 15, 45, 420 and 1250 µg/kg po | | 4.2.1.1-11 (0456-PH-0005) |
| Effect of linaclotide on intestinal secretion and cGMP production in rats | <i>In vivo</i> intestinal secretion and cGMP level in Sprague-Dawley rats (female) | N=10 for vehicle N=11 for linaclotide | Application of 5 µg in the intestinal loop | Linaclotide increased intestinal secretion in proximal, middle and distal small intestines, and colon. Except for distal small intestine, these increases were statistically significant. Linaclotide significantly increased cGMP levels in proximal, middle and distal small intestines, and colon. | 4.2.1.1-12 (MDP-103-024-PHR-01) |
| Effect of linaclotide on intestinal secretion and cGMP production in GC-C KO and WT mice | <i>In vivo</i> intestinal secretion and cGMP level in GC-C KO or WT C57BL/6 mice (male) | WT groups; N=6 GC-C KO + vehicle; N=5 GC-C KO + linaclotide; N=4 | Application of 5 µg in the intestinal loop | Linaclotide significantly increased intestinal secretion in WT mice, but not in GC-C KO mice. Linaclotide showed tendency to increase cGMP level in the intestinal loop of WT and GC-C KO mice. The increase in the cGMP level in GC-C KO mice was smaller than that in WT mice. | 4.2.1.1-13 (MDP-103-026-PHR-01) |

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (*In vivo*, その2)

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|---|--|--|---|---|----------------------------------|
| Effect of linaclotide and tegaserod maleate on mouse GI transit | <i>In vivo</i> GI transit in CD-1 mice (male and female) | Study using lower dose range of linaclotide. Respective numbers in female and male: Vehicle; 20 and 20 6 µg/kg; 21 and 10 12.5 µg/kg; 21 and 10 25 µg/kg; 21 and 11 50 µg/kg; 19 and 11 100 µg/kg; 20 and 11 | Linaclotide; 6, 12.5, 25, 50 and 100 µg/kg po | Linaclotide significantly increased the GI transit in female mice at 25, 50 and 100 µg/kg. Linaclotide significantly increased the GI transit in male mice at 100 µg/kg. In the experiment using the higher dose range, linaclotide significantly increased the GI transit in female mice at doses of 125 µg/kg and greater. On the other hand, tegaserod maleate significantly increased the transit at doses of 30 and 3000 µg/kg in female mice, while the intermediate doses at 125, 250 and 750 µg/kg did not significantly increase it. | 4.2.1.1-14 (MDP-103-016-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-016-PHR-01 | | Study using higher dose range of linaclotide and tegaserod; N=10 except for vehicle was N=19 | Study using higher dose range of linaclotide and tegaserod; 30, 125, 250, 750 and 3000 µg/kg po | | 4.2.1.1-15 (0456-PH-0006) |
| Effect of acute or subacute administration of linaclotide and tegaserod maleate on mouse GI transit | <i>In vivo</i> GI transit in CD-1 mice (female) | N=10 | Linaclotide; 60 and 250 µg/kg po Tegaserod; 1000 µg/kg po | Linaclotide at 60 and 250 µg/kg significantly increased the GI transit after acute or 5-days subacute administration in mice. Neither acute nor subacute administration of tegaserod maleate at 1000 µg/kg increased the transit in mice. | 4.2.1.1-16 (MDP-103-017-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-017-PHR-01 | | | | | 4.2.1.1-17 (0456-PH-0007) |

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (*In vivo*, その3)

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|--|--|---|---|---|------------------------------------|
| Effect of linaclotide and tegaserod maleate on rat GI transit | <i>In vivo</i> GI transit in Sprague-Dawley rats (male and female) | Respective numbers in female and male: Vehicle; 5 and 6 1.25 µg/kg; 5 and 6 2.5 µg/kg; 5 and 6 5 µg/kg; 6 and 6 10 µg/kg; 6 and 6 20 µg/kg; 5 and 5 | Linaclotide; 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 µg/kg po Study using both linaclotide and tegaserod. Linaclotide; 10 and 20 µg/kg po Tegaserod; 1000 and 3000 µg/kg po | Linaclotide significantly increased GI transit in both female and male rats at doses of 10 µg/kg and greater. Tegaserod maleate at 1000 and 3000 µg/kg did not significantly increase the GI transit over the vehicle in female rats, while linaclotide at 20 µg/kg significantly increased the transit in the same assay | 4.2.1.1-18 (MDP-103-013-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-013-PHR-01 | | Study using both linaclotide and tegaserod; N=8 | | | 4.2.1.1-19 (0456-PH-0003) |
| Effect of linaclotide on GI transit in GC-C KO and WT mice | <i>In vivo</i> GI transit in GC-C KO and WT C57BL/6 mice (male and female) | Female; N=10 except for GC-C KO +linaclotide was N=11 Male; N=9 | 100 µg/kg po | Linaclotide significantly increased the GI transit in both female and male WT mice. Linaclotide did not significantly increase the GI transit in both female and male GC-C KO mice. | 4.2.1.1-20 (MDP-103-025-PHR-01) |
| Effect of linaclotide on abdominal pain responses induced by colorectal distension in rats | <i>In vivo</i> colorectal distension in Wistar rats (male) | N=7 | 10, 30 and 100 µg/kg po | Linaclotide did not affect visceral nociceptive response to colorectal distension in rats. | 4.2.1.1-21 (0456-PH-0001) |

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (*In vivo*, その4)

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|---|---|---|---|---|----------------------------------|
| Effect of linaclotide on water avoidance stress-induced visceral hypersensitivity in rats | <i>In vivo</i> colorectal distension in Wistar rats with water avoidance stress (male) | Unstressed; N=7 except for vehicle group correspond to 3 µg/kg group; N=8 Stressed; N=8 except for 10 µg/kg; N=7 | Unstressed; 3 and 30 µg/kg po Stressed; 0.3, 3 and 10 µg/kg po | Linaclotide at 3 µg/kg did not affect visceral nociceptive response to colorectal distension in rats, but significantly increased the response at 30 µg/kg. Linaclotide significantly inhibited water avoidance stress-induced visceral hypersensitivity at distension pressures of 40 and 60 mmHg in rats at 3 µg/kg, and significantly inhibited the hypersensitivity only at a distension pressure of 60 mmHg at 0.3 µg/kg. | 4.2.1.1-22 (MDP-103-022-PHR-02) |
| Effect of linaclotide on visceral hypersensitivity induced by TNBS-caused inflammation and partial restraint stress in rats | <i>In vivo</i> colorectal distension in TNBS-treated (male) and partial restraint stress-applied (female) Wistar rats | TNBS; N=9 except for 3 µg/kg; N=10 Stress; N=8 except for 30 µg/kg; N=9 | 0.3, 3 and 30 µg/kg po | Linaclotide at 0.3 µg/kg significantly inhibited visceral hypersensitivity induced by TNBS in rats. Linaclotide at 3 µg/kg significantly inhibited partial restraint stress-induced visceral hypersensitivity in rats. Linaclotide did not affect colorectal volume at any tested doses in both models. | 4.2.1.1-23 (MDP-103-014-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-014-PHR-01 | | | | | 4.2.1.1-24 (0456-PH-0004) |
| Effect of linaclotide on inflammation-induced visceral hypersensitivity in TNBS-treated rats | <i>In vivo</i> colorectal distension in TNBS-treated Wistar rats (male) | 0.01 and 0.3 µg/kg groups; N=9 0.03 and 3 µg/kg groups; N=8 | 0.01, 0.03, 0.3 and 3 µg/kg po | Linaclotide significantly inhibited TNBS-induced visceral hypersensitivity in rats at doses of 0.01, 0.03 and 0.3 µg/kg. Linaclotide at 3 µg/kg did not significantly inhibit the hypersensitivity. Linaclotide did not affect colorectal volume at any tested doses. | 4.2.1.1-25 (MDP-103-030-PHR-01) |

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験 (*In vivo*, その5)

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|--|---|---|--|---|----------------------------------|
| Effect of linaclotide on inflammation-induced visceral hypersensitivity in TNBS-treated mice | <i>In vivo</i> colorectal distension in TNBS-treated GC-C KO and WT C57BL/6 mice (male) | Respective numbers in WT and GC-C KO mice under basal condition: Vehicle; 14 and 14 0.01 µg/kg; 12 and 11 0.3 µg/kg; 14 and 12 | Basal condition; 0.01 and 0.3 µg/kg po TNBS-treated; 0.01 µg/kg po | Linaclotide at 0.01 µg/kg did not affect visceral nociceptive response to colorectal distension at any distension volume in WT and GC-C KO mice under basal condition. The visceral nociceptive response in WT mice treated with linaclotide at 0.3 µg/kg tended to be smaller than that in vehicle-treated mice, but there was no statistical difference between groups at any distension volume. In GC-C KO mice, linaclotide at 0.3 µg/kg significantly reduced the visceral nociceptive response at a highest distension volume. Linaclotide at 0.01 µg/kg significantly inhibited TNBS-induced visceral hypersensitivity in WT mice, but not in GC-C KO mice. | 4.2.1.1-26 (MDP-103-023-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-023-PHR-01 | | TNBS-treated WT mice: Vehicle; N=14 TNBS+vehicle; N=12 TNBS+0.01 µg/kg; N=12 TNBS-treated GC-C KO mice; N=14 | | | 4.2.1.1-27 (0456-PH-0009) |
| Effect of linaclotide on stool consistency in rodents | <i>In vivo</i> stool consistency in Sprague-Dawley rats and CD-1 mice (male and female) | Single dosing; N=3 5-day dosing; N=10 | Single dosing of 50, 100 and 200 mg po 200 mg/kg po once a day or 100 mg/kg po twice a day for 5 days | Single dosing of linaclotide increased incidence of soft stool and non-formed or liquid feces in both female mice and rats at doses of 50 mg/kg and greater. Single dosing of linaclotide increased incidence of soft stool and non-formed or liquid feces in both male mice and rats at 200 mg/kg. Five-days repeated administration of linaclotide with both dosing regimens increased incidence of soft stool and non-formed or liquid feces in both female and male mice without affecting body weight. | 4.2.1.1-28 (MDP-103-032-PHR-01) |

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 副次的薬理試験（代謝物及び原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の薬理作用，その1）

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|--|---|---|---|--|----------------------------------|
| Effect of linaclotide and MM-419447 on mouse intestinal secretion and rat GI transit | <i>In vivo</i> intestinal secretion in 7-9 day old CD-1 suckling mice | Intestinal secretion: N=13 exception was as follows, vehicle; N=10 MM-419447 at 5 µg/kg; N=9 linaclotide at 5 µg/kg; N=6 | Intestinal secretion: 2.5, 5 and 10 µg/kg po Transit: 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/kg po | Linaclotide and MM-419447 (2.5, 5 and 10 µg/kg) significantly increased intestinal secretion in suckling mice. In the GI transit study, linaclotide (6.25, 12.5, 25 and 50 µg/kg) significantly increased the transit in rats. MM-419447 (12.5, 25 and 50 µg/kg) significantly increased the transit. | 4.2.1.2-1 (MDP-103-018-PHR-01) |
| Reanalysis of results in Study report MDP-103-018-PHR-01 | <i>In vivo</i> GI transit in Sprague-Dawley rats (female) | Transit: N=10 except for 6.25 µg/kg was N=5 | | | 4.2.1.2-2 (0456-PH-0008) |
| Effects of linaclotide and MM-419447 on intestinal secretion in rats | <i>In vivo</i> intestinal secretion in Sprague-Dawley rats (female) | N=10 | Application of 5 µg in the intestinal loop | Linaclotide and MM-419447 increased intestinal secretion in proximal, middle and distal small intestines. | 4.2.1.2-3 (MDP-103-085-PHR-01) |
| <i>In vitro</i> cGMP production by linaclotide degradation products formed during the digestion pathway in the intestine | <i>In vitro</i> cGMP measurement in human T84 cells | Triplicate | Reduced linaclotide; 3 and 100 nmol/L MM-421202 and MM-421522; 1, 100 and 1000 nmol/L MM-421519 and MM-421524; 1 nmol/L | Reduced linaclotide and linaclotide degradation products formed during the digestion pathway in the intestine (MM-421202, MM-421519, MM-421524 and MM-421522) did not increase intracellular cGMP concentration in human T84 cells. | 4.2.2.4-7 (MDP-103-039-IAR-01) |

2.6.3.3.1 副次的薬理試験（代謝物及び原薬中若しくは製剤中に含まれる不純物の薬理作用，その2）

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|----------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------|---|-----|-----------|----------|------|-----------|----------|------|--------------------------------|
| <i>In vitro</i> cGMP production by linaclotide 類縁物質 1 * formed during the manufacture of linaclotide | <i>In vitro</i> cGMP measurement in human T84 cells | Duplicate | 類縁物質 1 * were formed by [redacted] linaclotide [redacted] | Fraction of linaclotide 類縁物質 1 * increased intracellular cGMP concentration to 1.01 nmol/L in human T84 cells (baseline; 0.38 nmol/L). In the same assay, eluted linaclotide increased cGMP concentration to 16.32 nmol/L. | 4.2.1.2-4 (MDP-103-061-PHR-01) | | | | | | | | | | | | |
| <i>In vitro</i> cellular pharmacological activity of linaclotide drug substance impurities MM-448398 and MM-448775 | <i>In vitro</i> cGMP measurement in human T84 cells | Duplicate | 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 and 10000 nmol/L | <p>Mean % response with intracellular cGMP concentration of each article at 10000 nmol/L was calculated. Intracellular cGMP concentration of linaclotide at 10000 nmol/L was set as 100%.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Description</th> <th>Mean % of response at 10000 nmol/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Linaclotide</td> <td>-</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>MM-448398</td> <td>類縁物質 2 *</td> <td>69.8</td> </tr> <tr> <td>MM-448775</td> <td>類縁物質 3 *</td> <td>26.0</td> </tr> </tbody> </table> | | Description | Mean % of response at 10000 nmol/L | Linaclotide | - | 100 | MM-448398 | 類縁物質 2 * | 69.8 | MM-448775 | 類縁物質 3 * | 26.0 | 4.2.1.2-5 (MDP-103-136-PHR-01) |
| | Description | Mean % of response at 10000 nmol/L | | | | | | | | | | | | | | | |
| Linaclotide | - | 100 | | | | | | | | | | | | | | | |
| MM-448398 | 類縁物質 2 * | 69.8 | | | | | | | | | | | | | | | |
| MM-448775 | 類縁物質 3 * | 26.0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>In vitro</i> cellular pharmacological activity of linaclotide drug product degradants MM-447619 and MM-448623 | <i>In vitro</i> cGMP measurement in human T84 cells | Linaclotide; sextuplicate MM-447619; quadruplicate MM-448623; duplicate | 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 and 10000 nmol/L | GC-C receptor agonistic effect of MM-447619 類縁物質 4 * was equipotent to that of linaclotide. MM-448623 類縁物質 5 * showed GC-C receptor agonistic effect, but the increase in intracellular cGMP concentration was smaller than that induced by linaclotide. | 4.2.1.2-6 (MDP-103-069-PHR-01) | | | | | | | | | | | | |

2.6.3.3.1 副次的薬理試験（その他）

| Study Description | Species/Test System | Number of Replicate /Number of Animals | Regimen/ Methodology | Key Results | CTD Number (Study Report Number) |
|---|---|---|---|--|--|
| Effect of linaclotide on rat GI transit in postoperative ileus model | <i>In vivo</i> GI transit in Sprague-Dawley rats (female) | N=10 | 10 µg/kg po at two time points (immediately following surgery and after 1 h recovery) | Linaclotide at 10 µg/kg significantly increased GI transit following abdominal surgery in rats. | 4.2.1.2-7 (MDP-103-027-PHR-01) |
| Effect of linaclotide on rat GI transit in opiate-induced constipation model | <i>In vivo</i> GI transit in Sprague-Dawley rats (female) | N=8 | 12.5, 25 and 50 µg/kg po | Administration of morphine (2.5 mg/kg ip) significantly decreased GI transit in rats. Linaclotide significantly reversed the morphine-induced decrease in GI transit at doses of 25 and 50 µg/kg. | 4.2.1.2-8 (MDP-103-043-PHR-01) |
| Effect of linaclotide on stress-increased colonic paracellular permeability in rats | <i>In vivo</i> colonic permeability in Wistar rats (female) | Control and all vehicle-treated groups; N=9 Linaclotide-treated groups; N=8 except for stress+linaclotide 1 µg/kg group; N=9 | 0.3, 1, 3 and 10 µg/kg po | Linaclotide did not affect the colonic permeability in unstressed rats. Partial restraint stress significantly increased the colonic permeability in rats, but linaclotide did not affect stress-induced increase in the colonic permeability at any doses tested. | 4.2.1.2-9 (MDP-103-031-PHR-01) |

2.6.3.4 安全性薬理試験

| Test Article: Linaclotide | | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------|---|-----|----------------------------------|
| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Administration | Concentration/Dose | Gender and n per Group | Noteworthy Findings | GLP | CTD Number (Study Report Number) |
| hERG potassium channel | hERG-transfected HEK293 cells | <i>In vitro</i> | 10 and 100 µmol/L (0.02 and 0.2 mg/mL) | N=3 | No significant inhibition of hERG channel current. | Yes | 4.2.1.3-1 (MNP-103-024-SPR-01) |
| Cardiovascular/ Respiratory | Beagle Dogs | Single intravenous ascending dose | 0.2, 1 and 5 mg/kg | 2 M, 2 F (2 groups) | No adverse effects on cardiovascular or respiratory function. | Yes | 4.2.1.3-2 (MNP-103-025-SPR-01) |

2.6.3.5 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。