目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文.....5
2.6.4.1 まとめ.....8
2.6.4.2 分析法.....10
2.6.4.2.1 マウス試料の分析法.....13
2.6.4.2.2 ラット試料の分析法.....17
2.6.4.2.3 ウサギ試料の分析法.....25
2.6.4.2.4 カニクイザル試料の分析法.....26
2.6.4.3 吸収.....30
2.6.4.3.1 単回投与試験.....30
2.6.4.3.2 反復投与試験.....34
2.6.4.4 分布.....35
2.6.4.4.1 マウスにおける脳，肝臓及び脂肪組織中のリナクロチド及び MM-419447 濃度.....35
2.6.4.4.2 蛋白結合及び血球移行性.....35
2.6.4.4.3 胎盤通過性.....35
2.6.4.5 代謝.....36
2.6.4.5.1 *In vitro* での代謝.....36
2.6.4.5.2 CYP に対する誘導及び阻害作用.....41
2.6.4.6 排泄.....41
2.6.4.6.1 尿，糞及び胆汁中排泄.....42
2.6.4.6.2 乳汁への移行.....42
2.6.4.7 その他の薬物動態試験.....42
2.6.4.7.1 製剤中の分解生成物の薬物動態試験.....42
2.6.4.7.2 原薬中不純物の薬物動態.....46
2.6.4.8 考察及び結論.....47
2.6.4.9 参考文献.....51

表

表 2.6.4- 1 略号及び用語の定義一覧 5
表 2.6.4- 2 アミノ酸の略号一覧 7
表 2.6.4- 3 生物学的分析法の概要 11
表 2.6.4- 4 分析法 MNP-103-013 におけるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 14
表 2.6.4- 5 分析法 MNP-103-038 におけるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 15
表 2.6.4- 6 分析法 MNP-103-058 におけるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 17
表 2.6.4- 7 分析法 MNP-103-012 におけるラット血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 20
表 2.6.4- 8 分析法 MNP-103-034 におけるラット血漿中のリナクロチドの安定性 22
表 2.6.4- 9 分析法 MNP-103-040 におけるラット血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 23
表 2.6.4- 10 分析法 MNP-103-044 におけるラット尿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 24
表 2.6.4- 11 分析法 MNP-103-036 におけるウサギ血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 26
表 2.6.4- 12 分析法 MNP-103-035 におけるカニクイザル血漿中のリナクロチドの安定性 27
表 2.6.4- 13 分析法 MNP-103-037 におけるカニクイザル血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 28
表 2.6.4- 14 分析法 MNP-103-039 におけるカニクイザル血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性 30
表 2.6.4- 15 雌雄ラットにリナクロチドを単回静脈内投与したときのトキシコキネティックパラメータ（3 例の平均値） 31
表 2.6.4- 16 雌性ラットにリナクロチドを 10 mg/kg 単回静脈内及び経口投与したときの PK パラメータ（3 例の平均値） 31
表 2.6.4- 17 雌雄カニクイザルにリナクロチドを 15 mg/kg 単回静脈内投与したときのトキシコキネティックパラメータ（2 例の平均値） 33
表 2.6.4- 18 雌雄カニクイザルにリナクロチドを 2.5 及び 5 mg/kg 単回経口投与したときのトキシコキネティックパラメータ（1 例の値若しくは複数例の平均値） 34
表 2.6.4- 19 リナクロチド及び還元型リナクロチドの蛋白分解酵素による代謝物 37
表 2.6.4- 20 リナクロチドと代謝物の薬理活性 40
表 2.6.4- 21 リナクロチド及びリナクロチド製剤中の分解生成物の[redacted]及び[redacted] 45

表 2.6.4- 22 マウス，ラット，カニクイザル及びヒトにリナクロチドを経口投与したときのリナクロチド及び MM-419447 の薬物動態データ及び全身曝露量の比較.....49

図

図 2.6.4- 1　ラジオイムノアッセイ（RIA）法の概略図 18
図 2.6.4- 2　ラット腸液中で検出されたリナクロチドの代謝物 39
図 2.6.4- 3　ラット腸液中で検出された代謝物の生成プロファイル.....39
図 2.6.4- 4　ラット小腸における結紮ループの概略図.....40

2.6.4 薬物動態試験の概要文

本項で使用した略号及び用語の定義一覧を表 2.6.4- 1 に，アミノ酸の略語一覧を表 2.6.4- 2 に示す。

表 2.6.4- 1　　略号及び用語の定義一覧

略号及び用語	定義
AUC	Area under the concentration-time curve：濃度－時間曲線下面積
AUC_{all}	Area under the concentration-time curve covering the entire collection time period：全採取時間の濃度－時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the concentration-time curve, extrapolated to infinity：時間を無限大に外挿した濃度－時間曲線下面積
AUC_t	Area under the concentration‐time curve before time t：時間 t までの濃度‐時間曲線下面積
B_0	maximum binding：最大結合量
BA	Oral bioavailability：経口バイオアベイラビリティ
°C	Degrees Celsius：摂氏°C
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）
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate：サイクリック GMP
CL_{tot}	Systemic clearance：全身クリアランス
C_{max}	Maximum concentration：最高濃度
cpm	Counts per minute：カウント毎分
CV	Coefficient of variation：変動係数（精度）
CYP	Cytochrome P450：チトクローム P450
Des-Tyr^{14}	Active primary metabolite of linaclotide; MM-419447：リナクロチドの活性一次代謝物 MM-419447
DTT	Dithiolthreitol：ジチオトレイトール
GC-C	Guanylate cyclase C：グアニル酸シクラーゼ C
HCl	Hydrochloric acid：塩酸
IBS-C	Irritable bowel syndrome with constipation：便秘型過敏性腸症候群
IgG	Immunoglobulin G：免疫グロブリン G
IS	Internal standard：内標準物質
K_2EDTA	Dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid：エチレンジアミン四酢酸二カリウム
K_3EDTA	Tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid：エチレンジアミン四酢酸三カリウム

表 2.6.4- 1　　略号及び用語の定義一覧（続き）

略号及び用語	定義
LC	Liquid chromatography：液体クロマトグラフィー
LLOQ	Lower limit of quantitation：定量下限
L/N	Lot number：ロット番号
MM-419447	Active primary metabolite of linaclotide; Des-Tyr^{14}：リナクロチドの活性一次代謝物 Des-Tyr^{14}
MM-420026	Stable isotope-labeled internal standard of linaclotide ; $^{15}N^{13}C_9$-linaclotide：リナクロチドの安定同位体標識内標準物質（$^{15}N^{13}C_9$-リナクロチド）
MM-447619	Degradant found in linaclotide drug product; 類縁物質4＊: リナクロチド製剤中の分解生成物（類縁物質4＊）
MM-448623	Degradant found in linaclotide drug product; 類縁物質5＊：リナクロチド製剤中の分解生成物（ 類縁物質5＊ ）
MS/MS	Tandem mass spectrometry：タンデム質量分析
n	Number：例数
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate : 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NSB	Non-specific binding：非特異的結合
PBS	Phosphate-buffered saline：リン酸緩衝生理食塩水
PK	Pharmacokinetics：薬物動態
pSTa	*E. coli* heat-stable enterotoxin derived from a porcine source : ブタ由来大腸菌耐熱性エンテロトキシン
QC	Quality control：品質管理
RE	Relative error：相対誤差
RIA	Radioimmunoassay：ラジオイムノアッセイ
$t_{½}$	Half-life：半減期
t_{max}	Time of first maximum concentration：最高濃度到達時間
TOF/MS	Time-of-flight mass spectrometry：飛行時間型質量分析
Tris-HCl	Tris（hydroxymethyl）aminomethane hydrochloride : トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩
ULOQ	Upper limit of quantitation：定量上限
V_d	Volume of distribution associated with the terminal phase of the concentration-time curve：濃度‐時間曲線終末相での分布容積

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。

表 2.6.4- 2　　アミノ酸の略号一覧

アミノ酸	3 文字コード	1 文字コード
アラニン	Ala	A
アスパラギン	Asn	N
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
プロリン	Pro	P
トレオニン	Thr	T
チロシン	Tyr	Y

2.6.4.1 まとめ

リナクロチドは，グアニル酸シクラーゼ C（GC-C）受容体の内因性リガンドであるグアニリン及びウログアニリンと類似した 14 個の天然型アミノ酸から成る合成ペプチドである[Currie, 1992; Hamra, 1993]。GC-C 受容体は腸管上皮の管腔側に発現しており[Krause, 1994]，リナクロチドは本受容体に対して結合親和性を示す（2.6.2.2.1.1）ことから，循環血中からではなく腸管局所において本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。リナクロチドは主として腸管腔内で代謝され，経口吸収性は極めて低い。そこで，薬物動態学的な評価は消化管における代謝評価を中心に実施した。

なお，本資料中で表示されているリナクロチドの濃度・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リナクロチドの濃度・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。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。

分析法

マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルの血清，血漿及び尿中のリナクロチド及び薬理活性を有する代謝物 MM-419447 の濃度は，ラジオイムノアッセイ（RIA）法又は液体クロマトグラフィーータンデム質量分析（LC-MS/MS）法により測定した。*In vitro* における代謝物プロファイルは，液体クロマトグラフィーー飛行時間型質量分析（LC-TOF/MS）法を用いて測定した。

吸収及び血中濃度

リナクロチドは水への溶解性が高く，ヒト結腸上皮細胞（Caco-2 細胞）単層膜における透過係数は 0.32×10^{-7}cm/秒と低い（2.7.2.2.1.1）。リナクロチドは検討したすべての動物種（マウス，ラット及びカニクイザル）において極めて低い経口バイオアベイラビリティ（BA）を示した。また，ラットに経口投与したときの門脈内血中濃度も低く，消化管における低い吸収率が低 BA の原因の一つと考えられた。静脈内投与したときの $t_{1/2}$ は，マウス，ラット及びカニクイザルでそれぞれ 0.605 時間，0.328～0.565 時間及び 1.50～1.69 時間と循環血からの消失は速やかであった。

リナクロチドの一次代謝物で活性を有する MM-419447 のラットにおける体内動態はリナクロチドに類似しており，経口吸収性は低く，循環血からの消失も速やかであった。

分布

リナクロチド及び MM-419447 は, いずれも消化管で低分子ペプチド及び天然型アミノ酸に分解される。それらの分解物は再利用されて内因性ペプチドに取り込まれるため，放射能標識体を用いたマスバランス試験等の解釈は困難であると考えられる。したがって，放射能標識体を用いた組織分布及び排泄試験は実施しなかった。リナクロチドをマウスに 1 日 1 回 26 週間経口投与した

毒性試験で採取した脳，肝臓及び脂肪組織試料の測定結果から，リナクロチド及び MM-419447 の組織分布は低く，蓄積性もないと考えられた。

代謝

マウス及びラットから採取した腸液並びに人工胃液を用いて *in vitro* での代謝安定性を評価した。リナクロチドは人工胃液中で安定であったが，マウス及びラット腸液中では MM-419447 が生成し，その後速やかに低分子ペプチド等に代謝された。したがって，リナクロチドを経口投与したときの主消失経路は消化管内における代謝と考えられた。同様に，リナクロチドはヒト腸液においても速やかに代謝された（2.7.2.2.1.2）。哺乳類の消化管に存在するカルボキシペプチダーゼ A 等の酵素を用いた *in vitro* 代謝安定性評価から，リナクロチドはカルボキシペプチダーゼ A によって MM-419447 に代謝されることが示された。また，消化管内に存在するグルタチオン及びグルタレドキシン系の酵素群によりリナクロチドの分子内に存在するジスルフィド結合が開裂し，蛋白分解酵素等によって低分子ペプチドに代謝され，更に天然型アミノ酸まで分解された。

なお，動物のミクロソームを用いたチトクローム P450（CYP）分子種による代謝評価は実施しなかったが，ヒト腸ミクロソーム中においてリナクロチドは CYP 分子種によって代謝されなかった（2.7.2.2.1.3）。また，リナクロチド及び MM-419447 はヒト肝ミクロソーム，腸ミクロソーム又は肝細胞を用いた *in vitro* 試験で CYP 分子種に対して阻害及び誘導作用をほとんど示さなかった。

排泄

ラットにリナクロチドを経口投与したときのリナクロチド及び MM-419447 の糞中排泄率は，それぞれ投与量の 0.04%及び 0.95%と低かった。リナクロチドを正常及び腎結紮ラットの静脈内に投与したときの全身クリアランスは，それぞれ 627 mL/h/kg 及び 28 mL/h/kg であった。腎結紮ラットにおいて全身クリアランスが大きく低下したことから，リナクロチドの循環血からの消失は主に腎臓からの排泄によると考えられた。また，胆汁中にも活性ペプチド（リナクロチド及び MM-419447）が検出されたことから胆汁排泄も一部関与すると考えられた。

2.6.4.2　分析法

リナクロチドは経口吸収性が極めて低いペプチドであるため，すべての *in vivo* 試験で感度の高い分析法が必要となる。そこで，RIA 法及び LC-MS/MS 法を開発した。LC-MS/MS 法は感度が高く，活性代謝物 MM-419447 を検出できる唯一の方法であった。多くの試験では LC-MS/MS 法を用いたが，初期の試験では RIA 法を用いた。両分析法を同様の試験に適用して得られた試験結果に大きな違いが認められなかったことから，分析法の選択が試験結果の解釈に影響を与えることはないと考えられた。

LC-MS/MS 法では，リナクロチドに対する検出感度の方が MM-419447 より高かった。リナクロチドの C 末端チロシンは，イオン化及びフラグメントの過程で電荷を帯びるため MS/MS 分析で検出され易いと考えられた。一方，MM-419447 は C 末端チロシンがないため，検出感度が低いと考えられた。

各分析法におけるリナクロチド及び MM-419447 の定量下限（LLOQ），並びにそれら分析法を用いて濃度測定を実施した薬物動態及び毒性試験を表 2.6.4- 3 に示す。

表 2.6.4- 3　　生物学的分析法の概要

分析法	Ironwood 社 分析法番号	試験実施施設	マトリックス	分析対象物質	LLOQ （ng/mL）	対象の試験一覧
薬物動態試験						
RIA	MDP-103-004	Ironwood Pharmaceuticals（米国）	ラット血漿	リナクロチド	1.53[a]	[MDP-103-006-PKR-02]
LC-MS/MS	MDP-103-002	Ironwood Pharmaceuticals（米国）	マウス血清	リナクロチド	1.83	[MDP-103-003-PKR-02]
LC-MS/MS	MDP-103-009	Ironwood Pharmaceuticals（米国）	ラット血漿	リナクロチド	0.763	[MDP-103-010-PKR-02] [MDP-103-011-PKR-02]
				MM-419447	1.36	
LC-MS/MS	MNP-103-040	[redacted]（米国）	ラット血漿	リナクロチド	1.00	[MNP-103-042-PKR-02] [MDP-103-087-PKR-01]
				MM-419447	2.00	
LC-MS/MS	MNP-103-044	[redacted]（米国）	ラット尿	リナクロチド	1.00	[MNP-103-042-PKR-02]
				MM-419447	2.00	
毒性試験						
LC-MS/MS	MNP-103-013	[redacted]（米国）	マウス血漿	リナクロチド	15.0	[MNP-103-007-TXR-01]
				MM-419447	30.0	
LC-MS/MS	MNP-103-038	[redacted]（米国）	マウス血漿	リナクロチド	0.500	[MNP-103-027-TXR-01] [MNP-103-033-RTR-01]
				MM-419447	5.00	
LC-MS/MS	MNP-103-058	[redacted]（米国）	マウス血漿	リナクロチド	2.00	[MNP-103-054-TXR-01]
				MM-419447	5.00	
LC-MS/MS	MNP-103-012	[redacted]（米国）	ラット血漿	リナクロチド	3.00	[MNP-103-005-TXR-01] [MNP-103-014-RTR-01]
				MM-419447	3.00	

表 2.6.4- 3 生物学的分析法の概要（続き）

分析法	Ironwood 社 分析法番号	試験実施施設	マトリックス	分析対象物質	LLOQ （ng/mL）	対象の試験一覧
LC-MS/MS	MNP-103-034	[redacted]（米国）	ラット血漿	リナクロチド	3.05	[MNP-103-016-TXR-01] [MNP-103-018-TXR-01] [MNP-103-020-TXR-01] [MNP-103-052-RTR-01]
LC-MS/MS	MNP-103-036	[redacted]（米国）	ウサギ血漿	リナクロチド	3.00	[MNP-103-015-RTR-01] [MNP-103-053-RTR-01]
				MM-419447	3.00	
LC-MS/MS	MNP-103-035	[redacted]（米国）	カニクイザル血漿	リナクロチド	3.05	[MNP-103-019-TXR-01]
LC-MS/MS	MNP-103-037	[redacted]（米国）	カニクイザル血漿	リナクロチド	3.00	[MNP-103-006-TXR-01] [MNP-103-021-TXR-01]
				MM-419447	3.00	
LC-MS/MS	MNP-103-039	[redacted]（米国）	カニクイザル血漿	リナクロチド	0.500	[MNP-103-028-TXR-01]
				MM-419447	5.00 3.00[b]	

a. 検出下限を記載

b. パーシャルバリデーションを実施して LLOQ を再設定した。

2.6.4.2.1 マウス試料の分析法

2.6.4.2.1.1 LC-MS/MS によるマウス血清中のリナクロチドの定量法の検討

添付資料 4.2.2.1-1

LC-MS/MS によるマウス血清中リナクロチド濃度測定法の適合性を検討した。本試験では，リナクロチド（L/N [redacted]00000057313）の検量線用標準試料（0.0611～15300 ng/mL）1 バッチを用いた。リナクロチドは試料 10 µL からインライン固相抽出法によって抽出し，LC-MS/MS で分析した。ピーク面積に基づき，1.83～59.5 ng/mL 及び 13.7～15300 ng/mL の 2 本の検量線を作成した。低濃度範囲の検量線には重みなしの線形回帰を，高濃度範囲の検量線には重み付き（1/x）線形回帰を用いた。LLOQ は 1.83 ng/mL で，真度（RE）は−4.3%であった。

本分析法を用いて MDP-103-003 試験におけるマウス血清試料中のリナクロチド濃度を定量した（2.6.4.3.1.1）。

2.6.4.2.1.2 LC-MS/MS によるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法の簡易バリデーション

添付資料 4.2.2.1-2

LC-MS/MS によるエチレンジアミン四酢酸三カリウム（K_3EDTA）処理マウス血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD11000401），MM-419447（L/N [redacted]00000068994）及び安定同位体標識内標準物質（IS）MM-420026（L/N [redacted]1268）をマウス血漿 50 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，メタノールと水の混合液に再溶解した。本バリデーションは，以下の 1 バッチ以上の試料を用いて実施した。

- マウス血漿中リナクロチド（15.0～750 ng/mL）及び MM-419447（30.0～750 ng/mL）を混合した検量線用標準試料各 1 本
- 定量上限（ULOQ）標準試料及び高濃度 QC 試料の後，ブランクマトリックス試料 2 本
- LLOQ（リナクロチド：15.0 ng/mL，MM-419447：30.0 ng/mL），低濃度 QC（リナクロチド：35.0 ng/mL，MM-419447：45.0 ng/mL），中濃度 QC（125 ng/mL），高濃度 QC（525 ng/mL）及び希釈 QC（10 倍希釈，2650 ng/mL）試料各 6 本

IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によって検量線を作成した。検量線から逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度を算出した。

本試験では，分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内精度・真度及び抽出回収率を検討した。一方，検量線用標準試料を用いた精度の評価は試料数が n = 2 と少なかったため実施しなかった。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 15.8 ng/mL，CV は 5.5%, 真度は 105.3%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 32.2 ng/mL，CV は 7.6%，真度は 107.3%であった。QC 試料は精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他

すべての QC 試料:15%以下)を満たした。検量線用標準試料及び QC 試料は真度の許容基準(LLOQ 試料：100 ± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：100 ± 15%以内）を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 4)。なお，標準原液中の分析対象物質の安定性は，別の試験で確認されている（表 2.6.4- 8 表 2.6.4- 13 及び表 2.7.1- 8)。

本分析法を用いて毒性試験 MNP-103-007 で得られたマウス血漿試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した(2.6.6.3.1)。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 4　　分析法 MNP-103-013 におけるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
冷蔵保存（2～8 ºC）	165 時間	165 時間
マウス血漿中の安定性		
室温	24 時間	24 時間
凍結／融解（−80～−60 ºC）	4 サイクル	4 サイクル

2.6.4.2.1.3　LC-MS/MS によるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法バリデーション

添付資料 4.2.2.1-3

LC-MS/MS によるエチレンジアミン四酢酸二カリウム（K_2EDTA）処理マウス血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD1100601B1）及び MM-419447（L/N [redacted]1285)，並びにリナクロチドの安定同位体標識 IS の MM-420026（L/N [redacted]00000068545）をマウス血漿 100 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，メタノールと水の混合液に再溶解した。本バリデーションは，以下の試料を 3 バッチ用いて実施した。

- マウス血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 5.00～500 ng/mL を混合した検量線用標準試料（8 濃度）並びにリナクロチド濃度 0.500 ng/mL 及び 1.00 ng/mL の検量線用標準試料（2 濃度）各 2 本
- ULOQ 標準試料及び高濃度 QC 試料の後，ゼロブランク試料（IS のみを添加したブランクマトリックス）2 本
- LLOQ（リナクロチド : 0.500 ng/mL，MM-419447 : 5.00 ng/mL)，低濃度 QC（リナクロチド : 1.50 ng/mL，MM-419447 : 15.0 ng/mL)，中濃度 QC（200 ng/mL)，高濃度 QC（425 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，2000 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後,各試料を LC-MS/MS に注入し,それぞれの IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によって検量線を作成した。検量線から逆回帰に

よって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。

分析の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定間及び測定内精度・真度並びに抽出回収率を検討した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 0.543 ng/mL，CV は 8.2%，RE は 8.7%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 5.34 ng/mL，CV は 5.6%, RE は 6.8%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料：15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料：± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：± 15%以内）を満たした。更に，MM-419447 の安定同位体標識 IS の MM-437150（L/N [redacted]00000129590）を用いてパーシャルバリデーションを実施した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 0.472 ng/mL，CV は 7.4%，RE は−5.6%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 4.85 ng/mL，CV は 3.3%，RE は−3.0%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は許容基準を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 5）。

これらの分析法を用いて, 毒性試験 MNP-103-027 及び MNP-103-033 で得られたマウス血漿試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.6.3.2 及び 2.6.6.6.2）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 5　　分析法 MNP-103-038 におけるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
室温	45 時間	45 時間
試料再注入時の再現性（室温）	151 時間	151 時間
マウス血漿中での安定性		
室温	24 時間	24 時間
凍結保存（−70 ºC）	269 日間	269 日間
凍結／融解（−70 ºC）	3 サイクル	3 サイクル
溶液中での安定性（標準原液及び標準溶液）		
標準原液（室温）	22 時間	22 時間
標準原液（−20 ºC）	70 日間	70 日間
標準溶液（−20 ºC）	70 日間	70 日間

2.6.4.2.1.4 LC-MS/MS によるマウス血漿試料中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法バリデーション

添付資料 4.2.2.1-4

本試験では，LC-MS/MS による K_2EDTA 処理マウス血漿試料中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD11000804）及び MM-419447（L/N [redacted]A1），並びにそれぞれの安定同位体標識 IS MM-420026（L/N [redacted]A1）及び MM-437150（L/N [redacted]A1）をマウス血漿 20 μL から固相抽出した後，蒸発乾固し，メタノールと水の混合液に再溶解した。分析法バリデーションは，以下の検量線標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 3 バッチで実施した。

- マウス血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 5.00～500 ng/mL の検量線用標準試料（8 濃度）並びにリナクロチド濃度 2.00 ng/mL の検量線用標準試料各 2 本
- ULOQ 標準試料の後，ゼロブランク試料（IS のみを添加したブランクマトリックス）1 本以上
- LLOQ（リナクロチド：2.00 ng/mL，MM-419447：5.00 ng/mL），低濃度 QC（リナクロチド：6.00 ng/mL，MM-419447：15.0 ng/mL），中濃度 QC（200 ng/mL），高濃度 QC（425 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，2000 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，それぞれの IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，リナクロチドについては重み付き（$1/x^2$）二次回帰による検量線を作成し，MM-419447 については重み付き（$1/x^2$）線形回帰による検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性及び測定内並びに測定間精度・真度を検討した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 1.95 ng/mL，CV は 7.9%，RE は −2.5%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 4.77 ng/mL, CV は 11.3%, RE は−4.6%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は精度の許容基準（LLOQ 試料 : 20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料 : 15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料 : ± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料 : ± 15%以内）を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 6）。なお，マウス血漿及び標準原液中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性は別の試験で確認されている（表 2.6.4- 5 及び表 2.6.4- 10）。

本分析法を用いて，毒性試験 MNP-103-054 で得られたマウス血漿試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.6.6.6.2）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 6　　分析法 MNP-103-058 におけるマウス血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
室温	113 時間	113 時間
試料再注入時の再現性（室温）	115 時間	115 時間

2.6.4.2.2　ラット試料の分析法

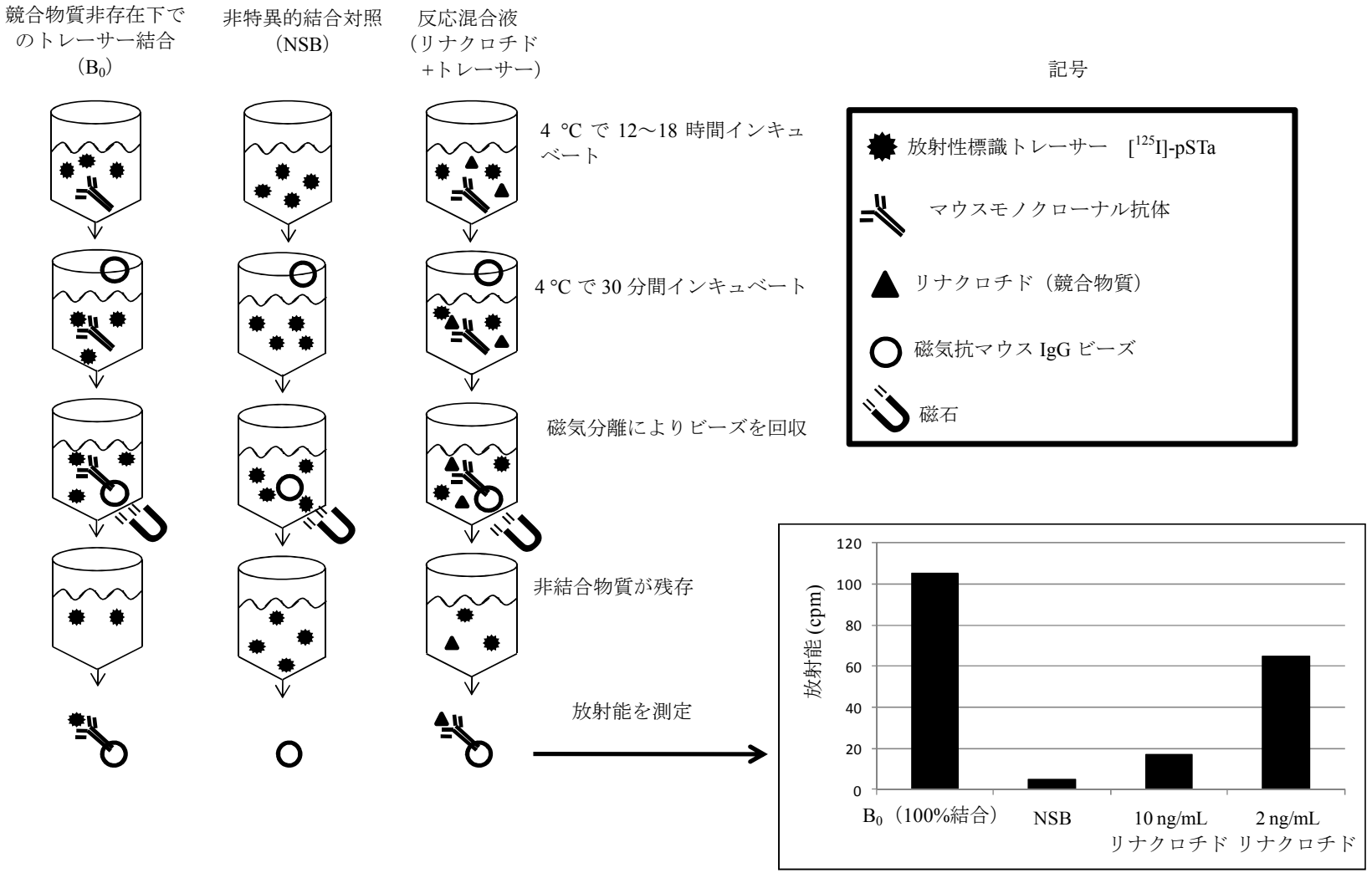
2.6.4.2.2.1　ラジオイムノアッセイによるマウス血清及びラット血漿中のリナクロチド濃度定量法の検討

添付資料 4.2.2.1-5

マウス血清及びラット血漿中リナクロチド濃度測定法の適合性を検討した。本分析法はラット試料の分析にのみ用いたため，ラットの結果のみを以下に記載する。各血漿試料 80 µL からリナクロチドを固相抽出した後，濃縮乾固し，10%ウシ胎児血清含有 PBS に再溶解した。抽出した血漿試料を希釈したマウスモノクローナル抗体とともにインキュベートした後，放射性標識トレーサーとして，一定濃度のブタ由来大腸菌耐熱性エンテロトキシン[^{125}I]-pSTa を添加した。インキュベーション後, 磁気抗マウス免疫グロブリン G（IgG）ビーズを用いて, リナクロチド又は[^{125}I]-pSTa と結合する抗体を採取した。各試料中の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定し，1 分あたりのカウント（cpm）で表した。インキュベーション中，[^{125}I]-pSTa は抗体に対してリナクロチドと競合し，試料中の放射能量は，放射性標識トレーサー濃度に比例し，リナクロチド濃度に反比例する。RIA 定量法の概略を図 2.6.4- 1 に示す。分析法の適合性の検討には，ラット血漿中リナクロチド（L/N [redacted]00000057313）濃度 0.763～391 ng/mL の検量線用標準試料（10 濃度）を 1 バッチ以上用いた。また，1 本の抗体ゼロ標準試料（放射性標識トレーサーを含み，リナクロチド及び抗体を含まない）及び 1 本以上のリナクロチドのゼロ標準試料（放射性標識トレーサー及び抗体を含み，リナクロチドを含まない）を分析し，それぞれ非特異的結合（NSB）及びリナクロチド非存在下での[^{125}I]-pSTa の最大結合量（B_0）を求めた。

リナクロチド非存在下で, 放射性標識トレーサーの 25%は抗体と結合し, 非特異的結合は 0.25%であった。B_0 に対する各標準試料中の放射能の割合（NSB 調整後）をリナクロチドの濃度の対数に対してプロットすることにより，リナクロチドのシグモイド標準曲線を作成した。リナクロチドの検出限界は 1.53 ng/mL で，本分析法の LLOQ は設定されなかった。本分析法は，ラット血漿中濃度 1.53～391 ng/mL のリナクロチドの定量が可能と判断されたため, 本分析法を用いて薬物動態試験 MDP-103-006 における試料を分析した（2.6.4.3.1.2.1）。

図 2.6.4- 1　　ラジオイムノアッセイ（RIA）法の概略図



2.6.4.2.2.2 LC-MS/MS によるラット血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法の検討

添付資料 4.2.2.1-6

LC-MS/MS によるラット血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]00000068455），MM-419447（L/N [redacted]00000068994）及び安定同位体標識 IS MM-420026（L/N [redacted]00000068545）をラット血漿 250 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，メタノールと水の混合液に再溶解した。分析法の適合性の検討には，ラット血漿中濃度 0.153～763 ng/mL（リナクロチド）及び 0.136～682 ng/mL（MM-419447）の検量線用標準試料（8 濃度）を用いた。分析対象物質のキャリーオーバーを評価するため，ULOQ 標準試料の後に少なくとも 1 つのゼロブランク試料（IS のみを添加したブランクマトリックス）を分析した。また，リナクロチド及び MM-419447 の濃度が低濃度（それぞれ 3.05 及び 2.73 ng/mL），中濃度（30.5 及び 27.3 ng/mL）及び高濃度（305 及び 273 ng/mL）の QC 試料も分析した。

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（1/x）線形回帰でリナクロチド及び MM-419447 の検量線を作成した。各分析対象物質の濃度は検量線から逆回帰によって算出した。

分析法のキャリーオーバー，感度及び直線性を検討した。ラット血漿中濃度は，リナクロチドについては 0.763～153 ng/mL，MM-419447 については 1.36～682 ng/mL の範囲で定量可能であった。

本分析法を用いて，薬物動態試験 MDP-103-010 及び MDP-103-011 で得られた試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.4.3.1.2.1 及び 2.6.4.3.1.2.3）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

2.6.4.2.2.3 LC-MS/MS 検出によるラット血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法の簡易バリデーション

添付資料 4.2.2.1-7

LC-MS/MS による K_3EDTA 処理ラット血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD11000401），MM-419447（L/N [redacted]00000068994）及び安定同位体標識 IS MM-420026（L/N [redacted]1268）をラット血漿 250 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，メタノールと水の混合液に再溶解した。分析法バリデーションは，以下の標準試料及び QC 試料のセットを含む 2 バッチで実施した。なお，LLOQ 試料及び希釈 QC 試料については 1 バッチで実施した。

- ラット血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 3.00～750 ng/mL の検量線用標準試料（8 濃度）各 1 本
- ULOQ 検量線用標準試料及び高濃度 QC 試料の後，ブランクマトリックス試料 2 本以上

- LLOQ（3.00 ng/mL），低濃度 QC（10.0 ng/mL），中濃度 QC（50.0 ng/mL），高濃度 QC（525 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，2650 ng/mL）の QC 試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰でリナクロチド及び MM-419447 の検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度を算出した。なお，検量線用標準試料を用いた精度の評価は試料数が少なかったため（n = 2）実施しなかった。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内精度・真度及び回収率を検討した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 3.13 ng/mL，CV は 4.8%，真度は 104.3%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 2.90 ng/mL，CV は 8.0%，真度は 96.7%であった。QC 試料は精度の許容基準（LLOQ 試料 : 20%以下，その他すべての QC 試料 : 15%以下）を満たした。検量線用標準試料及び QC 試料は，真度の許容基準（LLOQ 試料 : 100 ± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料 : 100 ± 15%以内）を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 7）。なお，標準原液中の分析対象物質の安定性は，別の試験で確認されている（表 2.6.4- 8 表 2.6.4- 13 及び表 2.7.1- 8）。

本分析法を用いて，毒性試験 MNP-103-005 及び MNP-103-014 で得られたラット血漿試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.6.3.4 及び 2.6.6.6.3）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 7　分析法 MNP-103-012 におけるラット血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
冷蔵保存（2～8 ℃）	64 時間	64 時間
ラット血漿中の安定性		
室温	24 時間	24 時間
凍結保存（−80～−60 ℃）	222 日間	222 日間
凍結／融解（−70 ℃）	3 サイクル	3 サイクル

2.6.4.2.2.4　LC-MS/MS によるラット血漿中のリナクロチドの定量法のバリデーション

添付資料 4.2.2.1-8

LC-MS/MS による K_3EDTA 処理ラット血漿中リナクロチド濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD11000401）及び安定同位体標識 IS の MM-420026（L/N [redacted]1222）をラット血漿 75 μL からメタノールによる除蛋白法によって抽出した後，濃縮乾固し，酢酸アンモニウム及びギ酸の水溶液に再溶解した。分析法のバリデーションは，以下の標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 3 バッチで実施した。なお，LLOQ 試料及び希釈 QC 試料については 1 バッチで実施した。

- ラット血漿中リナクロチド濃度 3.05～763 ng/mL の検量線用標準試料（8 濃度）各 1 本
- ULOQ 標準試料及び高濃度 QC 試料の後，ブランクマトリックス試料 1 本以上
- LLOQ（3.05 ng/mL），低濃度 QC（9.16 ng/mL），中濃度 QC（53.4 ng/mL），高濃度 QC（534 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，2670 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，IS に対するリナクロチドのピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によってリナクロチドの検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内及び測定間精度・真度並びに抽出回収率を検討した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 3.21 ng/mL，CV は 16.6%，RE は 5.0%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は，精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料：15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料：± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：± 15%以内）を満たした。

リナクロチドは，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 8）。

本分析法を用いて，毒性試験 MNP-103-016，MNP-103-018，MNP-103-020 及び MNP-103-052 で得られた試料中のリナクロチド濃度を定量した（2.6.6.2.1.1，2.6.6.2.1.2，2.6.6.3.3 及び 2.6.6.6.3）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 8　　分析法 MNP-103-034 におけるラット血漿中のリナクロチドの安定性

条件	リナクロチド
前処理後試料の安定性	
冷蔵保存（10 ℃）	72 時間
ラット血漿中の安定性	
室温	24 時間
凍結保存（−80～−60 ℃）	409 日間
凍結／融解	3 サイクル
溶液中での安定性（標準原液）	
室温	6 時間

2.6.4.2.2.5　LC-MS/MS によるラット血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法のバリデーション

添付資料 4.2.2.1-9

LC-MS/MS による K_2EDTA 処理ラット血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD1100601B1）及び MM-419447（L/N [redacted]1285），並びにそれぞれの安定同位体標識 IS の MM-420026（L/N [redacted]00000068545）及び MM-437150（L/N [redacted]00000129590）をラット血漿 40 µL から固相抽出した後，蒸発乾固し，ギ酸，メタノール及び水の混合液に再溶解した。バリデーションは，以下の標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 4 バッチで実施した。なお，バリデーションは本分析法を用いて実施した排泄に関する試験（2.6.4.6.1.2）の前に 1 バッチ，後に 3 バッチ実施した。

- ラット血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 2.00～500 ng/mL の検量線用標準試料（9 濃度）及びリナクロチド濃度 1.00 ng/mL の検量線用標準試料各 2 本
- 定量上限（ULOQ）標準試料及び高濃度 QC 試料の後，ゼロブランク試料（IS のみを添加したブランクマトリックス）2 本
- リナクロチドの LLOQ（1.00 ng/mL），MM-419447 の LLOQ（2.00 ng/mL），低濃度 QC（リナクロチド : 3.00 ng/mL，MM-419447 : 6.00 ng/mL），中濃度 QC（リナクロチド及び MM-419447 : 200 ng/mL），高濃度 QC（リナクロチド及び MM-419447：425 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，リナクロチド及び MM-419447：2000 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，それぞれの IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によって検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内及び測定間精度・真度並びに抽出回収率を検討した。排泄に関する試験の前に実施した 1 バッチ及び後の 3 バッチのリナクロチドの LLOQ 試料（n = 6 及び 18）における平均濃度はそれぞれ 0.948 及び 0.905 ng/mL，CV はそれぞ

れ 4.8%及び 5.1%，RE はそれぞれ−5.2%及び−9.5%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 6 及び 17）における平均濃度はそれぞれ 1.94 及び 1.78 ng/mL，CV はそれぞれ 3.6%及び 8.0%，RE はそれぞれ−3.2%及び−11.0%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は，精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料：15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料：± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：± 15%以内）を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 9）。標準原液及び標準溶液中の分析対象物質の安定性は別の試験で確認されている（表 2.6.4-10）。

本分析法を用いて，薬物動態試験 MNP-103-042 で得られた試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.4.6.1.2）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 9　　分析法 MNP-103-040 におけるラット血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
室温	確認されていない	108 時間
試料再注入時の再現性（室温）	108 時間	108 時間
ラット血漿中の安定性		
室温	24 時間	4 時間
凍結保存（−70 ºC）	88 日間	88 日間
凍結／融解（−70 ºC）	4 サイクル	4 サイクル

2.6.4.2.2.6　LC-MS/MS によるラット尿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法のバリデーション

添付資料 4.2.2.1-10

LC-MS/MS によるラット尿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD1100601B1）及び MM-419447（L/N [redacted]1285），並びにそれぞれの安定同位体標識 IS MM-420026（L/N [redacted]00000068545）及び MM-437150（L/N [redacted]00000129590）をラット尿 50 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，ギ酸，メタノール及び水の混合液に再溶解した。バリデーションは，以下の標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 3 バッチで実施した。

- ラット尿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 2.00～500 ng/mL の検量線用標準試料（9 濃度）及びリナクロチド濃度 1.00 ng/mL の検量線用標準試料各 2 本
- ULOQ 試料及び高濃度 QC 試料の後，ゼロブランク試料（IS のみを添加したブランクマトリックス）2 本

- LLOQ（リナクロチド：1.00 ng/mL，MM-419447：2.00 ng/mL），低濃度 QC（リナクロチド：3.00 ng/mL, MM-419447:6.00 ng/mL), 中濃度QC(リナクロチド及びMM-419447:200 ng/mL)，高濃度 QC（リナクロチド及び MM-419447：425 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，リナクロチド及び MM-419447：2000 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後, 各試料をLC-MS/MSに注入し, それぞれのISに対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によって検量線を作成した。検量線から，逆回帰によってQC試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字3桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内及び測定間精度・真度及び抽出回収率を検討した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 0.958 ng/mL，CV は 5.0%，RE は−4.2%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 2.08 ng/mL，CV は 8.7%, RE は 4.1%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料：15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料：± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：± 15%以内）を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 10）。

本分析法を用いて，薬物動態試験 MNP-103-042 で得られた試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.4.6.1.2）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 10　分析法 MNP-103-044 におけるラット尿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
室温	120 時間	120 時間
試料再注入時の再現性（室温）	120 時間	120 時間
ラット尿中の安定性		
室温	24 時間	24 時間
凍結保存（−70 ºC）	71 日間	71 日間
凍結／融解（−70 ºC）	3 サイクル	3 サイクル
PBS 中の安定性（標準原液及び標準溶液）		
標準原液（室温）	18 時間	18 時間
標準原液（−20 ºC）	129 日間	129 日間
標準溶液（室温）	18 時間	18 時間
標準溶液（−20 ºC）	129 日間	129 日間

2.6.4.2.3 ウサギ試料の分析法

2.6.4.2.3.1 LC-MS/MS によるウサギ血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法のバリデーション

添付資料 4.2.2.1-11

LC-MS/MS による K_3EDTA 処理ウサギ血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD11000401），MM-419447（L/N [redacted]00000068994）及び安定同位体標識 IS の MM-420026（L/N [redacted]1222）をウサギ血漿 250 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，メタノールと水の混合液に再溶解した。バリデーションは，以下の標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 3 バッチで実施した。なお，LLOQ 試料及び希釈 QC 試料については 1 バッチで実施した。

- ウサギ血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 3.00～750 ng/mL の検量線用標準試料 8 濃度各 1 本
- ULOQ 検量線用標準試料又は高濃度 QC 試料の後，ブランクマトリックス試料 1 本以上
- LLOQ（3.00 ng/mL），低濃度 QC（10.0 ng/mL），中濃度 QC（50.0 ng/mL），高濃度 QC（525 ng/mL）及び希釈 QC（10 倍希釈，2650 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によってリナクロチド及び MM-419447 の検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度を算出した。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内及び測定間精度・真度及び抽出回収率を検討した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 3.45 ng/mL, CV は 7.8%, 真度は 115.0%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 3.05 ng/mL，CV は 11.8%，真度は 101.7%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は，精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料：15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料：100 ± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：100 ± 15%以内）を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 11）。なお，標準原液中の分析対象物質の安定性は，別の試験で確認されている（表 2.6.4- 8 表 2.6.4- 13 及び表 2.7.1- 8）。

本分析法を用いて，毒性試験 MNP-103-015 及び MNP-103-053 で得られた試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.6.6.4）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 11　分析法 MNP-103-036 におけるウサギ血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
冷蔵保存（2～8 ℃）	67 時間	67 時間
ウサギ血漿中の安定性		
室温	24 時間	24 時間
凍結保存（−80～−60 ℃）	798 日間	798 日間
凍結／融解（−70 ℃）	3 サイクル	3 サイクル

2.6.4.2.4　カニクイザル試料の分析法

2.6.4.2.4.1　LC-MS/MS によるカニクイザル血漿中のリナクロチドの定量法の簡易バリデーション

添付資料 4.2.2.1-12

LC-MS/MS による K_3EDTA 処理カニクイザル血漿中リナクロチド濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD11000401）及び安定同位体標識 IS の MM-420026（L/N [redacted]1222）をカニクイザル血漿 75 μL からメタノールによる除蛋白法によって抽出した後，濃縮乾固し，ギ酸及び酢酸アンモニウムを含む水溶液に再溶解した。分析法バリデーションは，以下の標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 1 バッチで実施した。

- カニクイザル血漿中リナクロチド濃度 3.05～763 ng/mL の検量線用標準試料（8 濃度）各 1 本
- ULOQ 標準試料又は高濃度 QC 試料の後，ブランクマトリックス試料 1 本以上
- LLOQ（3.05 ng/mL），低濃度 QC（9.16 ng/mL），中濃度 QC（53.4 ng/mL），高濃度 QC（534 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，2670 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，IS に対するリナクロチドのピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によってリナクロチドの検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中のリナクロチドの濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。なお，検量線用標準試料を用いた精度の評価は試料数が少なかったため（n = 1）実施しなかった。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内精度・真度及び抽出回収率を検討した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 5）における平均濃度は 2.96 ng/mL，CV は 3.3%，RE は −3.0%であった。QC 試料は，精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料：15%以下）を満たした。また，検量線用標準試料及び QC 試料は，真度の許容基準（LLOQ 試料：± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：± 15%以内）を満たした。

リナクロチドは，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 12）。なお，標準原液中の分析対象物質の安定性は，別の試験で確認されている（表 2.6.4- 8，表 2.6.4- 13 及び表 2.7.1- 8）。

本分析法を用いて，毒性試験 MNP-103-019 で得られた試料中のリナクロチド濃度を定量した（2.6.6.2.2.2）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 12　　分析法 MNP-103-035 におけるカニクイザル血漿中のリナクロチドの安定性

条件	リナクロチド
前処理後試料の安定性	
冷蔵保存（10 ℃）	48 時間
カニクイザル血漿中の安定性	
凍結保存（−80～−60 ℃）	42 日間
室温	24 時間
凍結／融解	3 サイクル

2.6.4.2.4.2　LC-MS/MS によるカニクイザル血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法のバリデーション

添付資料 4.2.2.1-13

LC-MS/MS による K_3EDTA 処理カニクイザル血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD11000401），MM-419447（L/N [redacted]00000068994）及び安定同位体標識 IS の MM-420026（L/N [redacted]1222）をカニクイザル血漿 250 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，メタノールと水の混合液に再溶解した。バリデーションは，以下の標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 3 バッチで実施した。なお，LLOQ 試料及び希釈 QC 試料については 1 バッチで実施した。

- カニクイザル血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 3.00～750 ng/mL の検量線用標準試料（8 濃度）各 1 本
- ULOQ 標準試料又は高濃度 QC 試料の後，ブランクマトリックス試料又は試薬ブランク 1 本以上
- LLOQ（3.00 ng/mL），低濃度 QC（10.0 ng/mL），中濃度 QC（50.0 ng/mL），高濃度 QC（525 ng/mL）及び希釈 QC（10 倍希釈，2650 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によってリナクロチド及び MM-419447 の検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内及び測定間精度・真度並びに抽出回収率を検討した。本試験では，一部のバッチで LLOQ の 20%を超えるキャリーオーバーが認められた。そこで，本分析法では高濃度 QC 又は ULOQ 試料の直後にブランク試料を挿入し，キャリーオーバーの影響を回避することにした。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 6）における平均濃

度は 2.87 ng/mL，CV は 6.3%，RE は−4.3%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 3.29 ng/mL，CV は 14.3%，RE は 9.7%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は，精度の許容基準（LLOQ 試料：20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料：15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料：± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料：± 15%以内）を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 13）。なお，標準原液中の分析対象物質の安定性は，本試験及び別の試験で確認されている（表 2.6.4- 8 及び表 2.7.1- 8）。

本分析法を用いて，毒性試験 MNP-103-021 及び MNP-103-006 で得られたカニクイザル血漿試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.6.3.5 及び 2.6.6.3.6）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 13　　分析法 MNP-103-037 におけるカニクイザル血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
前処理後試料の安定性		
冷蔵保存（2～8 ℃）	66 時間	66 時間
カニクイザル血漿中の安定性		
室温	24 時間	24 時間
凍結保存（−60～−80 ℃）	243 日間	243 日間
凍結／融解	3 サイクル	3 サイクル
溶液中での安定性（標準原液）		
室温	6 時間 [a]	6 時間

a　分析法 MNP-103-034 において確認した。

2.6.4.2.4.3　LC-MS/MS によるカニクイザル血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の定量法のバリデーション

添付資料 4.2.2.1-14

LC-MS/MS による K_2EDTA 処理カニクイザル血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度測定法の適合性を検討した。リナクロチド（L/N [redacted]MD1100601B1）及び MM-419447（L/N [redacted]1285），並びにリナクロチドの安定同位体標識 IS MM-420026（L/N [redacted]00000068545）をカニクイザル血漿 100 µL から固相抽出した後，濃縮乾固し，ギ酸，アセトニトリル及び水の混合液に再溶解した。バリデーションは，以下の標準試料，ブランク試料及び QC 試料のセットを含む 3 バッチで実施した。

- カニクイザル血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度 5.00～500 ng/mL の検量線用標準試料（8 濃度）及びリナクロチド濃度 0.500～1.00 ng/mL の検量線用標準試料（2 濃度）各 2 本

- ULOQ 標準試料及び高濃度 QC 試料の後，ゼロブランク試料（IS のみを添加したブランクマトリックス）1 本以上
- LLOQ（リナクロチド : 0.500 ng/mL，MM-419447 : 5.00 ng/mL），低濃度 QC（リナクロチド : 1.50 ng/mL，MM-419447 : 15.0 ng/mL），中濃度 QC（200 ng/mL），高濃度 QC（425 ng/mL）及び希釈 QC（5 倍希釈，2000 ng/mL）試料各 6 本

抽出及び再溶解後，各試料を LC-MS/MS に注入し，それぞれの IS に対する各分析対象物質のピーク面積比に基づいて，重み付き（$1/x^2$）線形回帰によってリナクロチド及び MM-419447 の検量線を作成した。検量線から，逆回帰によって QC 試料中の各分析対象物質の濃度を求めた。各試料中の濃度は有効数字 3 桁で算出し，平均値，精度（CV）及び真度（RE）を算出した。

分析法の選択性，キャリーオーバー，感度，直線性，測定内及び測定間精度・真度並びに抽出回収率を検討した。初期のバリデーションバッチの一部ではキャリーオーバーが LLOQ の 20%を超えると評価されたが，ニードル洗浄液を変更し，洗浄過程を延長し，高濃度 QC 試料及び高濃度の標準試料の後にブランク試料を追加挿入することで，キャリーオーバーは許容範囲内となった。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 0.462 ng/mL，CV は 12.8%，RE は −7.6%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 18）における平均濃度は 5.05 ng/mL，CV は 5.8%，RE は 1.0%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は，精度の許容基準（LLOQ 試料 : 20%以下，その他すべての QC 試料及び標準試料 : 15%以下）及び真度の許容基準（LLOQ 試料 : ± 20%以内，その他すべての QC 試料及び標準試料 : ± 15%以内）を満たした。

更に，MM-419447 の安定同位体標識 IS の MM-437150（L/N [redacted]00000129590）を用いてパーシャルバリデーションを実施した。リナクロチドの LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 0.485 ng/mL，CV は 10.1%，RE は−3.1%であった。MM-419447 の LLOQ 試料（n = 6）における平均濃度は 2.80 ng/mL，CV は 6.2%，RE は−6.6%であった。検量線用標準試料及び QC 試料は許容基準を満たした。

リナクロチド及び MM-419447 は，試料調製及び分析中に想定される条件下で安定であった（表 2.6.4- 14）。

これらの分析法を用いて，毒性試験 MNP-103-028 で得られたカニクイザル血漿試料中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を定量した（2.6.6.3.7）。実試料分析中の検量線用標準試料及び QC 試料の精度及び真度は，許容基準を満たしていた。

表 2.6.4- 14　分析法 MNP-103-039 におけるカニクイザル血漿中のリナクロチド及び MM-419447 の安定性

条件	リナクロチド	MM-419447
カニクイザル血漿中の安定性		
室温	24 時間	24 時間
凍結保存（−70 ºC）	269 日間	269 日間
凍結／融解（−70 ºC）	6 サイクル	6 サイクル
溶液中での安定性（標準原液及び標準溶液）		
標準原液（室温）	22 時間	22 時間
標準原液（−20 ºC）	70 日間	70 日間
標準溶液（−20 ºC）	70 日間	70 日間

2.6.4.3　吸収

2.6.4.3.1　単回投与試験

2.6.4.3.1.1　マウスにおける単回静脈内及び経口投与後の血清中濃度

添付資料 4.2.2.2-1

雌マウスにおけるリナクロチドの薬物動態特性を明らかにするために，リナクロチドを単回静脈内及び経口投与したときの血清中リナクロチド濃度を LC-MS/MS で測定し，薬物動態パラメータを算出した。

リナクロチドを 8 mg/kg 静脈内投与したときの血清中リナクロチド濃度は二相性の消失を示し，時間を無限大に外挿した濃度－時間曲線下面積（AUC_{inf}），濃度－時間曲線終末相での分布容積（V_d），全身クリアランス（CL_{tot}）及び半減期（$t_{1/2}$）は，それぞれ 8170 ng·h/mL, 854 mL/kg, 979 mL/h/kg 及び 0.605 時間であった。一方，リナクロチドを 8 mg/kg 経口投与したとき，リナクロチド濃度が定量可能（1.83 ng/mL 以上）であったのは 3 試料のみであった。最高血清中濃度（C_{max}），最高血清中濃度到達時間（t_{max}）及び全採取時間の濃度－時間曲線下面積（AUC_{all}）は，それぞれ 8.80 ng/mL, 0.33 時間及び 5.85 ng·h/mL であった。静脈内投与時の AUC_{inf} 及び経口投与時の AUC_{all} 値を用いて算出した経口バイオアベイラビリティ（BA）は 0.07%であり，経口投与時の全身曝露は極めて低いことが示された。

2.6.4.3.1.2　ラットにおける単回静脈内及び経口投与後の血漿中濃度

2.6.4.3.1.2.1　ラットに静脈内及び経口投与したときのトキシコキネティクス試験

添付資料　4.2.2.2-2, -3, 4.2.3.1-1, -2

リナクロチドのラットにおける薬物動態評価は，毒性試験の一環として実施したトキシコキネティクス試験の結果を基に行った。

雌雄ラットにリナクロチドを 0.5，2.5 及び 5 mg/kg 単回静脈内投与したときの血漿中リナクロチド濃度は一相性の消失を示した（表 2.6.4- 15）。$t_{1/2}$ は 0.328～0.565 時間であり，消失は速かった。また，各パラメータにおいて，明らかな非線形性及び性差は認められなかった。リナクロチドを雌雄ラットに 0.5，2.5 及び 5 mg/kg 単回経口投与したときの血漿中リナクロチド濃度は，すべてのサンプルで定量下限（LLOQ：2 nmol/L）未満であった。

上記のトキシコキネティクス試験のほかに，雌性ラットにリナクロチドを 10 mg/kg 単回静脈内及び経口投与したときの血漿中濃度を RIA 又は LC-MS/MS で測定した 2 つの試験が実施されている。いずれの試験においても静脈内投与後の消失は速く，経口投与時の吸収性は極めて低い結果が得られている。LC-MS/MS 法で測定した試験では，リナクロチドを静脈内及び経口投与したときの MM-419447 の血漿中濃度も測定した（表 2.6.4- 16）。いずれの投与経路においても MM-419447 の血漿中濃度はリナクロチドと比較して低かった。

表 2.6.4- 15 雌雄ラットにリナクロチドを単回静脈内投与したときのトキシコキネティックパラメータ

投与量 (mg/kg)	性別	t_{max} (h)	C_{max} (nmol/L)	AUC_t (nmol·h/L)	AUC_{inf} (nmol·h/L)	$t_{1/2}$ (h)
0.5	雄	0.167	449	380	380	0.409
	雌	0.167	548	376	382	0.328
2.5	雄	0.167	3293	2321	2324	0.439
	雌	0.167	2773	2190	2198	0.565
5	雄	0.167	5760	4554	4561	0.441
	雌	0.167	4860	4132	4145	0.489

トキシコキネティックパラメータは，各時点における 3 例の平均血漿中濃度より算出した。

表 2.6.4- 16 雌性ラットにリナクロチドを 10 mg/kg 単回静脈内及び経口投与したときの PK パラメータ

測定化合物	静脈内投与	経口投与		
	AUC_{all}[a] (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	AUC_{all}[a] (ng·h/mL)
リナクロチド	18800	19.0	0.08	19.8
MM-419447	81.4	1.66	1	4.91

PK パラメータは，各時点 6 例より採取した試料を 2 例ずつプールした 3 検体を測定し，それらの平均血漿中濃度より算出した。

a. 定量下限未満の血漿中濃度は検出下限値（リナクロチド：0.153 ng/mL，MM-419447：0.682 ng/mL）を代用して算出した。

2.6.4.3.1.2.2　ラットに経口投与したときの全身及び門脈内における血漿中濃度

添付資料 4.2.2.2-4

雌性ラットにリナクロチドを 10 mg/kg 単回経口投与したときの全身循環（頸静脈）及び門脈における血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度を LC-MS/MS 法で測定した。その結果，頸静脈及び門脈における血漿中リナクロチド及び MM-419447 濃度は多くのサンプルで定量下限（リナクロチド：1 ng/mL，MM-419447：2 ng/mL）未満であった。門脈より採取した試料の一部にリナクロチド及び MM-419447 が検出されたが，最も高濃度の試料においても 6 ng/mL 未満であり，門脈内に吸収されるリナクロチド及び MM-419447 は少なかった。なお，頸静脈より採取した試料の一部からもリナクロチド及び MM-419447 が検出されたが，両化合物ともに 3 ng/mL 未満であった。

2.6.4.3.1.2.3　ラットに MM-419447 を静脈内及び経口投与したときの血漿中濃度

添付資料 4.2.2.2-5

リナクロチドの活性代謝物である MM-419447 のラットにおける薬物動態特性を明らかにする目的で，雌性ラットに単回静脈内及び経口投与したときの血漿中濃度を LC-MS/MS 法で測定した。

MM-419447 を 10 mg/kg 静脈内投与したときの AUC_{all} は 36100 ng･h/mL であった。一方，MM-419447 を 10 mg/kg 経口投与したときの血漿中濃度は定量可能なサンプルが限られていたため，定量限界未満のサンプルの濃度として検出下限値（1.06 ng/mL）を代用して AUC_{all} を算出したところ 29.7 ng･h/mL であった。静脈内及び経口投与時の AUC_{all} より算出された BA は 0.08%であり，MM-419447 を経口投与したときの曝露は極めて低かった。

2.6.4.3.1.3　カニクイザルにおける単回静脈内及び経口投与後の血漿中濃度

添付資料 4.2.3.1-4, 4.2.3.2-5

リナクロチドのカニクイザルおける薬物動態評価は毒性試験の一環として実施したトキシコキネティクス試験の結果を基に行った。

雄性カニクイザルにリナクロチドを 15 mg/kg 単回静脈内投与したときの血漿中リナクロチド濃度は二相性の消失を示した。$t_{1/2}$ は 1.69 時間であり，消失は速かった（表 2.6.4- 17）。同時に測定した MM-419447 の t_{max}, C_{max} 及び $t_{1/2}$ は，それぞれ 1.50 時間, 49.7 nmol/L 及び 1.77 時間であった。リナクロチドの AUC_t に対する MM-419447 の AUC_t 比は 0.00348 であり，代謝物の生成量は少なかった。なお，リナクロチドの各パラメータに性差は無かったが，MM-419447 の雌における C_{max}，AUC_t 及び AUC_{inf} は雄に比べてやや大きかった。

雄性カニクイザルにリナクロチドを 2.5 及び 5 mg/kg 単回経口投与したときの血漿中リナクロチドの C_{max} は，それぞれ 5.17 及び 7.00 nmol/L であった。静脈内投与時の AUC_t と経口投与時の AUC_t から算出した BA は 0.2%未満であり，経口投与時の曝露は極めて低かった（表 2.6.4- 18）。また，各パラメータに明確な性差は認められなかった。MM-419447 の濃度は限られた個体及び時点でのみ定量可能であったが，MM-419447 の曝露量は用量の増加に伴って増加する傾向が認められた。

表 2.6.4- 17 雌雄カニクイザルにリナクロチドを 15 mg/kg 単回静脈内投与したときのトキシコキネティックパラメータ

測定化合物	性別	t_{max} (h)	C_{max} (nmol/L)	AUC_t (nmol·h/L)	AUC_{inf} (nmol·h/L)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_t 比 [a]
リナクロチド	雄	0.167 (0.167, 0.167)	37000 (39500, 34500)	52036 (55066, 49007)	53595 (57029, 50161)	1.69 (1.84, 1.53)	-
	雌	0.167 (0.167, 0.167)	32750 (31900, 33600)	53794 (56116, 51471)	55040 (57493, 52586)	1.50 (1.53, 1.48)	-
MM-419447	雄	1.50 (1.50, 1.50)	49.7 (41.2, 58.2)	181 (185, 176)	191 (202, 181)	1.77 (2.09, 1.44)	0.00348 (0.00336, 0.00359)
	雌	1.75 (1.50, 2.00)	99.7 (107, 92.4)	419 (455, 383)	487[b] (487, NC)	1.90[b] (1.90, NC)	0.00779 (0.00811, 0.00744)

2 例の平均値。括弧内の数値は個別値。

NC : 算出できなかった。

a MM-419447 の AUC_t をリナクロチドの AUC_t で除して算出した。

b トキシコキネティックパラメータが算出できた 1 例の値

表 2.6.4- 18 雌雄カニクイザルにリナクロチドを 2.5 及び 5 mg/kg 単回経口投与したときのトキシコキネティックパラメータ

投与量 (mg/kg)	測定化合物	性別	t_{max} (h)	C_{max} (nmol/L)	AUC_t (nmol·h/L)	AUC_{24h} (nmol·h/L)	AUC_t 比 [a]	BA (%)[b]
2.5	リナクロチド	雄 [c]	1.33 ±0.58	5.17 ±1.21	12.9 ±6.6	17.1 ±7.8	-	0.15
		雌 [d]	1.00 (1.00, 1.00)	3.75 (4.73, 2.76)	7.45 (13.1, 1.78)	10.6 (18.1, 3.16)	-	0.08
	MM-419447	雄 [c]	2.00 ±0	5.50 ±0.90	14.2 ±3.6	22.4 ±5.7	1.10	-
		雌 [e]	0.500	3.76	6.16	9.86	0.83	-
5	リナクロチド	雄 [c]	0.833 ±0.289	7.00 ±4.09	15.7 ±15.6	19.9 ±18.1	-	0.09
		雌	0.900 ±0.652[f]	7.82 ±4.01[f]	18.7 ±12.1[g]	24.3 ±14.6[g]	-	0.10
	MM-419447	雄 [f]	2.20 ±1.10	21.8 ±39.9	72.8 ±143.6	77.1 ±141.2	4.64	-
		雌 [f]	1.80 ±1.30	9.19 ±7.30	56.2 ±74.8	68.6 ±68.9	3.01	-

a 同一個体から算出できない個体があるため，MM-419447 の AUC_t の平均値をリナクロチドの AUC_t の平均値で除して算出した。

b 静脈内投与と経口投与は別個体で実施したため，BA は静脈内及び経口投与の AUC_t の平均値を用いて算出した。

c 測定を実施した 5 例中のトキシコキネティックパラメータが算出可能であった 3 例の平均値±標準偏差。

d 測定を実施した 5 例中のトキシコキネティックパラメータが算出可能であった 2 例の平均値。括弧内の数値は個別値。

e 測定を実施した 5 例中のトキシコキネティックパラメータが算出可能であった 1 例の値。

f 5 例の平均値±標準偏差。

g 測定を実施した 5 例中のトキシコキネティックパラメータが算出可能であった 4 例の平均値±標準偏差。

2.6.4.3.2 反復投与試験

添付資料 4.2.3.2-2, -4, -7

反復投与後のリナクロチドの薬物動態評価は，毒性試験の一環として実施されたトキシコキネティクス試験の結果を基に行った。各動物種（マウス，ラット及びカニクイザル）における最長期間の反復投与試験で得られた薬物動態パラメータを 2.6.5.4 に示す。

経口投与と静脈内投与を両方実施した反復投与毒性試験はなかったため，別試験として実施した静脈内投与データ（2.6.4.3.1.1　2.6.4.3.1.2.1　2.6.4.3.1.3 及び 2.6.5.4）を用いて，反復投与後のリナクロチドの BA を推定した。反復投与したときの BA は検討したすべての動物種で 0.4%以下であり，循環血中の曝露量は低かった。また，循環血の曝露には反復投与による顕著な変化は認められなかった。

2.6.4.4　分布

リナクロチドはヒト及び検討したすべての動物種で全身への曝露が極めて低いため，以下の試験を除いて分布試験は実施しなかった。リナクロチドは天然型アミノ酸より構成されるペプチドで消化管において速やかに低分子ペプチド及びアミノ酸に分解されて生体内で再利用されるため，放射性同位元素で標識したリナクロチドを用いた分布評価を行っても解釈が困難であり，ラベル体を用いた分布試験も実施しなかった。

2.6.4.4.1　マウスにおける脳，肝臓及び脂肪組織中のリナクロチド及び MM-419447 濃度

添付資料 4.2.2.3-1

雌雄マウスを用いた 26 週間毒性試験［MNP-103-027-TXR-01］で採取した脳，肝臓及び腎周囲脂肪組織中のリナクロチド及び MM-419447 濃度を LC-MS/MS で測定した。なお，MM-419447 の肝臓中濃度はブランク試料に検出された妨害ピークのため測定できなかった。

リナクロチドを 5，20 及び 100/80 mg/kg で 1 日 1 回 1，90 及び 180 日間経口投与したとき，リナクロチド及び MM-419447 は検討したすべての組織において検出されなかった。

2.6.4.4.2　蛋白結合及び血球移行性

リナクロチドを経口投与したときの全身曝露はヒトを含むすべての動物種で極めて低いため，血漿蛋白結合及び血球への分布に関する試験は実施しなかった。

2.6.4.4.3　胎盤通過性

リナクロチドを経口投与したときの全身曝露はヒトを含むすべての動物種で極めて低いため，胎盤移行試験は実施しなかった。

2.6.4.5　代謝

2.6.4.5.1　*In vitro* での代謝

2.6.4.5.1.1　リナクロチド及び MM-419447 の蛋白分解酵素に対する安定性試験

添付資料 4.2.2.4-1

リナクロチド及び MM-419447 の代謝特性を評価する目的で, 人工胃液又は哺乳類の消化管内に存在する主要な蛋白分解酵素（カルボキシペプチダーゼ A，ペプシン，アミノペプチダーゼ，トリプシン及びキモトリプシン）による代謝を *in vitro* で評価した。リナクロチドは人工胃液中では分解されず，検討した 5 つの蛋白分解酵素のうち，カルボキシペプチダーゼ A でのみ，リナクロチドの C 末端のチロシン残基が脱離した MM-419447 が生成した。一方，MM-419447 は人工胃液及び上述の 5 つの蛋白分解酵素に対して安定であった。

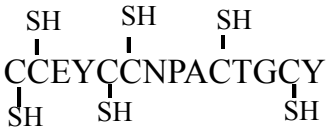
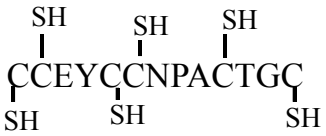
2.6.4.5.1.2　リナクロチド及び還元型リナクロチドの蛋白分解酵素に対する安定性試験

添付資料 4.2.2.4-2

リナクロチド及び還元型リナクロチドの蛋白分解酵素（キモトリプシン, カルボキシペプチダーゼ A 及びパンクレアチン）に対する安定性を評価した。還元型リナクロチドはリナクロチドを十分量のジチオトレイトール（DTT）存在下で蛋白分解酵素と反応させることで評価した。本試験で生成した代謝物の一覧を表 2.6.4- 19 に示す。リナクロチドはカルボキシペプチダーゼ A 及びパンクレアチンによって代謝されて MM-419447 を生成したが，キモトリプシンに対しては安定であった。

一方，DTT が存在する還元条件下では，酵素非存在下ですべてのジスルフィド結合が開裂（還元）した。還元されたリナクロチドはキモトリプシン及びカルボキシペプチダーゼ A によってペプチド結合が 1 か所代謝され，パンクレアチンによって低分子ペプチドに代謝された。

表 2.6.4- 19 リナクロチド及び還元型リナクロチドの蛋白分解酵素による代謝物

	検出された代謝物	
酵素	－DTT	＋DTT
なし	検出されなかった	
キモトリプシン	検出されなかった	CCEY + CCNPACTGCY
カルボキシペプチダーゼ A		
パンクレアチン		低分子ペプチド断片

2.6.4.5.1.3　リナクロチドのチオールに対する安定性試験

添付資料 4.2.2.4-3

チオールに対する安定性を評価する目的で，0.5 mmol/L DTT，グルタチオン及びラット腸液存在下におけるリナクロチドの安定性を評価した。リナクロチドは 0.5 mmol/L の DTT 処理により，リナクロチド分子内に存在する 3 つのジスルフィド結合がすべて還元された。グルタチオンは，リナクロチドの一部のジスルフィド結合を還元した。除蛋白処理したラット腸液ではリナクロチドは還元されなかったことから，リナクロチドの腸内での代謝には酵素が関与していると考えられた。

グルタチオン（2 mmol/L），グルタチオン還元酵素，グルタレドキシン及び NADPH を含むグルタレドキシン系の存在下ではリナクロチドは還元された。ラット腸液においてもグルタチオン還元酵素及びグルタレドキシン活性が検出されたことから，ラット腸液中のリナクロチド代謝に関与する酵素としてグルタレドキシン系酵素群が考えられた。

2.6.4.5.1.4　マウス腸液におけるリナクロチド及び MM-419447 の代謝安定性

添付資料 4.2.2.4-4

リナクロチド及び MM-419447 のマウス腸液中での安定性を評価した。リナクロチドを 37 °C のマウス腸液中でインキュベートしたとき，リナクロチドの $t_{1/2}$ は 3 分であり，30 分以内に完全に

消失した。本反応で生成した MM-419447 は 15 分で最高濃度に達し，その後，リナクロチドと同様に経時的に減少した。

2.6.4.5.1.5　ラット腸液におけるリナクロチド及び MM-419447 の代謝安定性

添付資料 4.2.2.4-5

リナクロチド及び MM-419447 のラット腸液中での安定性を評価した。リナクロチドを 37 ℃のラット腸液中でインキュベートしたとき，リナクロチドの $t_{1/2}$ は 3.3 分であり，30 分以内に完全に消失した。本反応で生成した MM-419447 は 10 分で最高濃度に達し，その後，リナクロチドと同様に経時的に代謝され，60 分以内に完全に消失した。

2.6.4.5.1.6　ラット腸液中チオール濃度及びリナクロチドの代謝

添付資料 4.2.2.4-6

ラット腸液におけるリナクロチドのジスルフィド還元活性を評価するため，ラット腸液中の総チオール及び遊離チオール量を測定した。その結果，測定されたチオールの大部分は遊離体として検出され，十二指腸で 5 mmol/L，空腸中間部で 2 mmol/L，回腸及び結腸で 0.2～0.3 mmol/L であった。各部位で検出された遊離チオール濃度は，別の試験（2.6.4.5.1.3）で検討したリナクロチドのジスルフィド結合を還元する濃度に達していた。

ラット腸液におけるリナクロチドの代謝安定性を，ラット腸液を希釈したのち，あるいは，低温下で評価したところ，リナクロチドの代謝速度が低下した。したがって，リナクロチドの消化管における代謝には酵素反応が関与していると考えられた。

2.6.4.5.1.7　ラット腸液におけるリナクロチド代謝物の同定

添付資料 4.2.2.4-7, -8

LC-TOF/MS を用いた精密質量測定結果を基に，ラット腸液中で生成したリナクロチド代謝物の構造を同定した。リナクロチドをラット腸液中でインキュベートしたとき，1 つのジスルフィド結合の還元，C 末端チロシンの切断による MM-419447 の生成，あるいはその両方を受けた代謝物が同定された。このことからリナクロチドの最初の代謝はジスルフィド結合の還元又はチロシン残基の切断と推定された。更に 3～13 個のアミノ酸から構成されるリナクロチドのペプチド断片が検出された（図 2.6.4- 2）。主として検出された 6 つの代謝物（CCEY，PACTGC，CCEYCCNPA，CNP，CTGC 及び CCEYC）は，反応開始後経時的に増加したが，19 時間後にはすべて消失した（図 2.6.4- 3）。また，別試験において，リナクロチド，MM-419447，MM-421202（CCEY）及び MM-421522（CCNPACTGCY）をグルタチオン及び NADPH が共存したラット腸液中でインキュベーションしたところ，いずれの化合物もアミノ酸に分解されることが確認された。同定された代謝物のうち 5 つの代謝物［MM-419447，CCEY（MM-421202），CCEYCCNPA（MM-421519），CCEYCCN（MM-421524）及び CCNPACTGCY（MM-421522）］，リナクロチド及び 3 つのジスル

フィド結合が開裂した還元型リナクロチドの薬理活性を評価したところ，リナクロチド及び MM-419447 は強い薬理活性を示した（表 2.6.4- 20 及び 2.6.2.2.8）。

図 2.6.4- 2　　ラット腸液中で検出されたリナクロチドの代謝物

CCEYCCNPACTGCY	**CCEYCCNPACTGCY**	**CCEYCCNPACTGCY**
CCEYCCNPACTGC	**CEYCCNPA**	**CCNPACTGCY**
CCEYCCNPA	**CEYCCNP**	**CCNPACT**
CCEYCCNP	**CEYCC**	**CCNPA**
CCEYCCN	**EYCCNPACT**	**CCNP**
CCEYC	**YCCNPACTGC**	
CCEY	**YCCNPACTG**	

CCEYCCNPACTGCY	**CCEYCCNPACTGCY**
CNPACTGCY	**PACTGC**
CNPACT	**ACTGCY**
CNPA	**CTGCY**
CNP	**CTGC**

図 2.6.4- 3　　ラット腸液中で検出された代謝物の生成プロファイル

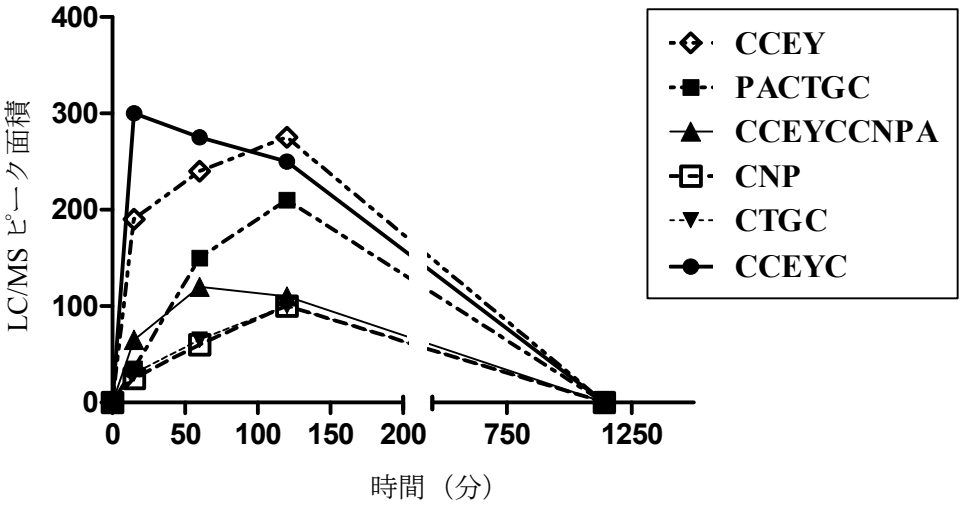


表 2.6.4- 20 リナクロチドと代謝物の薬理活性

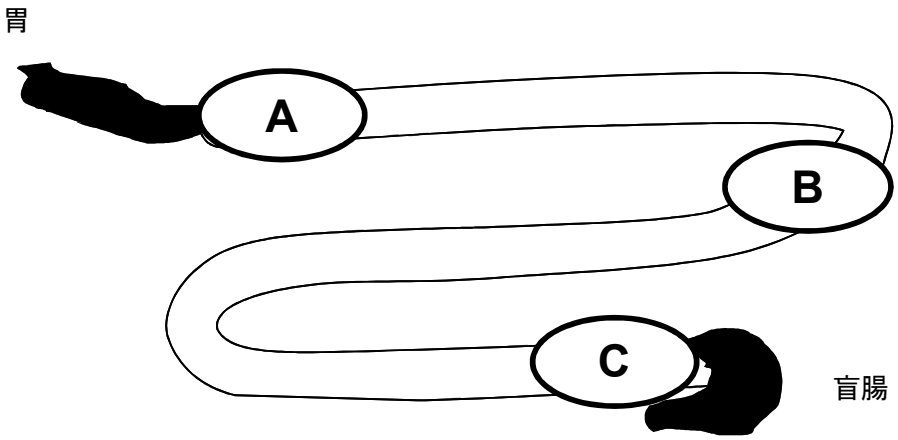
化合物名	アミノ酸配列	薬理活性（cGMP 蓄積）
リナクロチド	CCEYCCNPACTGCY	有
MM-419447	CCEYCCNPACTGC	有
還元型リナクロチド	CCEYCCNPACTGCY	無
MM-421202	CCEY	無
MM-421519	CCEYCCNPA	無
MM-421524	CCEYCCN	無
MM-421522	CCNPACTGCY	無

2.6.4.5.1.8　ラット小腸結紮ループにおけるリナクロチドの代謝安定性試験

添付資料 4.2.2.4-9

リナクロチドの小腸内での代謝安定性を検討するため，ラット小腸結紮ループにリナクロチドを投与して安定性を評価した。十二指腸ループ（ループ A, 図 2.6.4- 4）及び空腸中間部ループ（ループ B，図 2.6.4- 4）に投与したリナクロチドは速やかに代謝され，5 分以内に消失した。ループ A 及び B における $t_{1/2}$ は 1 分未満と推定された。回腸ループ（ループ C，図 2.6.4- 4）に投与したリナクロチドの代謝速度は十二指腸及び空腸中間部ループに比べて遅く，$t_{1/2}$ は 36 分であった。

図 2.6.4- 4　　ラット小腸における結紮ループの概略図



2.6.4.5.2 CYP に対する誘導及び阻害作用

2.6.4.5.2.1 ヒト肝細胞を用いたリナクロチド及び MM-419447 の CYP 分子種に対する誘導評価

添付資料 4.2.2.4-10

ヒト肝細胞を用いてリナクロチド及び MM-419447 のヒト CYP 分子種に対する誘導作用を検討した。リナクロチドは 50 ng/mL まで CYP1A2 及び CYP2B6 を誘導しなかった。CYP3A4/5 に対しては 5000 ng/mL まで誘導作用を示さなかった。MM-419447 についてもリナクロチドと同様に CYP1A2 及び CYP2B6 に対しては 50 ng/mL まで, CYP3A4/5 に対しては 5000 ng/mL まで誘導作用を示さなかった。

2.6.4.5.2.2 ヒト腸ミクロソームを用いたリナクロチドの CYP 分子種に対する阻害評価

添付資料 4.2.2.4-11

ヒト腸ミクロソームを用いてリナクロチドの腸における CYP 分子種に対する阻害作用を検討した。リナクロチドは評価した最大濃度（5.2 μg/mL）まで CYP2C9 及び CYP3A4/5 を阻害しなかった。また，リナクロチドはヒト腸ミクロソームと 30 分間プレインキュベーションしたときにも最大濃度（5.2 μg/mL）まで CYP2C9 及び CYP3A4/5 を阻害しなかった。したがって，リナクロチドに CYP2C9 及び CYP3A4/5 に対する時間依存的阻害作用はないと考えられた。

2.6.4.5.2.3 ヒト肝ミクロソームを用いたリナクロチド及び MM-419447 の CYP 分子種に対する阻害評価

添付資料 4.2.2.4-12

ヒト肝ミクロソームを用いてリナクロチド及び MM-419447 の CYP 分子種（1A2，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，2E1 及び 3A4/5）に対する阻害作用を評価した。リナクロチド及び MM-419447 は検討した最大濃度（50 ng/mL）で CYP2C9 をわずかに阻害（リナクロチド : 12.0%，MM-419447 : 20.5%）したが，その他の分子種に対してはほとんど阻害作用を示さなかった。

2.6.4.6 排泄

リナクロチドは天然型アミノ酸より構成されるペプチドで消化管において速やかに低分子ペプチド及びアミノ酸に分解されて生体内で再利用されるため，放射性同位元素で標識したリナクロチドを用いた排泄評価は困難であり，ラベル体を用いた排泄試験は実施しなかった。

2.6.4.6.1 尿，糞及び胆汁中排泄

2.6.4.6.1.1 ラットにリナクロチドを経口投与したときのリナクロチド及び MM-419447 の糞中排泄

添付資料 4.2.2.5-1

雌性ラットにリナクロチドを 10 mg/kg 経口投与し，投与後 55 時間までに糞中に排泄されたリナクロチドの回収率を RIA 法で，リナクロチド及び MM-419447 のそれぞれの排泄量を LC-MS/MS 法で測定した。RIA 法により測定した投与後 55 時間までのラット糞中のリナクロチドの回収率は投与量の 0.04%であった。また，LC-MS/MS 法により測定したリナクロチド及び MM-419447 の糞中排泄率は投与量のそれぞれ 0.03%及び 0.95%であり，その大半は投与後 24 時間までに排泄された。

2.6.4.6.1.2 ラット腎結紮モデルにおけるリナクロチドの薬物動態及び排泄評価

添付資料 4.2.2.5-2

正常ラットにリナクロチドを静脈内投与したときの血漿，尿及び胆汁中のリナクロチド並びに MM-419447 濃度を LC-MS/MS 法で測定した。正常ラットにリナクロチドの 1 mg/kg を単回静脈内投与したとき，リナクロチド及び MM-419447 は血漿中から速やかに消失（$t_{1/2}$ は両化合物共に約 1 時間）した。リナクロチドの全身クリアランスは 627 mL/h/kg であり，尿中に排泄されたリナクロチドは投与量の 21%であり，MM-419447 も検出された。また，胆汁中にリナクロチド及び MM-419447 が検出されたことから，リナクロチドの消失に胆汁排泄が寄与していることが示唆された。なお，血漿，尿及び胆汁試料中にその他の代謝物は検出されなかった。

一方，リナクロチドを腎結紮ラットに 1 mg/kg 静脈内に投与したときの血漿中リナクロチド及び MM-419447 の $t_{1/2}$ は 11.1 及び 37.4 時間であり，正常ラットと比較して大幅に延長した。リナクロチドの全身クリアランスは 28 mL/h/kg であり，正常ラットの約 20 分の 1 に低下した。したがって，リナクロチドの体内からの消失には腎臓からの排泄が大きく寄与していると考えられた。

2.6.4.6.2 乳汁への移行

リナクロチドを経口投与したときの全身への移行は，ヒト及び検討したすべての動物種で極めて少ないため，乳汁移行に関する評価は実施しなかった。

2.6.4.7 その他の薬物動態試験

2.6.4.7.1 製剤中の分解生成物の薬物動態試験

製剤中の分解生成物である 類縁物質４＊（MM-447619）及び 類縁物質５＊（MM-448623）が同定されている（表 2.6.4- 21）。いずれの分解生成物も[redacted]

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。

[redacted]生成する（[redacted]）。[redacted]，類縁物質４＊が生成する。[redacted]，[redacted]，類縁物質５＊が生成する（[redacted]）。

本項では製剤中の分解生成物である類縁物質４＊及び類縁物質５＊の薬物動態評価の結果を記載する。

2.6.4.7.1.1 ラットを用いたリナクロチド製剤中の分解生成物 MM-447619 の経口バイオアベイラビリティ試験

添付資料 4.2.2.7-1

製剤中の分解生成物である 類縁物質４＊(MM-447619) の雌ラットにおける薬物動態特性を明らかにするため，類縁物質４＊を単回静脈内及び経口投与したときの薬物動態パラメータを算出した。

類縁物質４＊の 10 mg/kg を静脈内投与したときの CL_{tot}，AUC_{inf} 及び $t_{1/2}$ は，それぞれ 248 mL/h/kg，40300 ng·h/mL 及び 0.779 時間であった。類縁物質4＊の 10 mg/kg を経口投与したときの類縁物質４＊の C_{max} 及び AUC_{inf} は，それぞれ 22.1 ng/mL 及び 43.5 ng·h/mL であった。静脈内及び経口投与時の AUC_{inf} から算出された BA は 0.108%であり，経口投与時の類縁物質４＊の全身曝露は極めて低かった。

2.6.4.7.1.2 ラットを用いたリナクロチド製剤中の分解生成物 MM-448623 の経口バイオアベイラビリティ試験

添付資料 4.2.2.7-2

製剤中の分解生成物である 類縁物質５＊（MM-448623）の雌ラットにおける薬物動態特性を明らかにするため，類縁物質５＊を単回静脈内及び経口投与したときの薬物動態パラメータを算出した。

類縁物質５＊の 10 mg/kg を静脈内投与したときの CL_{tot}，AUC_{inf} 及び $t_{1/2}$ は，それぞれ 447 mL/h/kg，17900 ng·h/mL 及び 0.996 時間であった。類縁物質５＊の 10 mg/kg を経口投与したときの 類縁物質５＊の全身曝露量は極めて少なく C_{max} 及び AUC_{inf} はそれぞれ 5.62 ng/mL 及び 9.59 ng·h/mL であった。静脈内及び経口投与時の AUC_{inf} から算出された BA は 0.0536%であり，経口投与時の全身曝露は極めて低かった。

2.6.4.7.1.3 人工胃液におけるリナクロチド製剤中の分解生成物 MM-447619 及び MM-448623 の安定性

添付資料 4.2.2.7-3

製剤中の分解生成物 類縁物質4＊(MM-447619) 及び 類縁物質５＊(MM-448623) の人工胃液中での安定性を評価した。類縁物質4＊(10 μg/mL)， 類縁物質５＊(200 μg/mL) 及びリナクロチド（10 又は 200 μg/mL）を 37℃ の人工胃液中で 2 時間インキュベーションしたときの残存率は，それぞ

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。

れ約 89%，104%及び 102%であった。類縁物質４＊及び 類縁物質５＊はリナクロチドと同様に人工胃液中で安定であった。

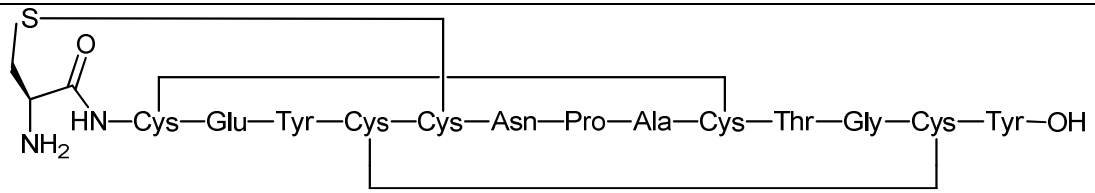
2.6.4.7.1.4　ラット腸液を用いたリナクロチド製剤中の分解生成物 MM-447619 及び MM-448623 の安定性

添付資料 4.2.2.7-4

製剤中の分解生成物である類縁物質４＊(MM-447619）及び 類縁物質５＊（MM-448623）のラット腸液中での安定性を評価した。40 µg/mL の類縁物質4＊，類縁物質5＊及びリナクロチドを 37°C のラット腸液中でインキュベーションしたところ，3 時間後にはすべての化合物が完全に消失した。類縁物質４＊及び 類縁物質５＊は，リナクロチドと同様に，ラット腸管内で速やかに代謝されると考えられた。

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。

表 2.6.4- 21　　リナクロチド及びリナクロチド製剤中の分解生成物の[redacted]及び[redacted]

化合物	[redacted]及び[redacted]	%BA[a]
リナクロチド		≤ 0.11
MM-447619 （ 類縁物質４＊）	[redacted]	0.11
MM-448623 （ 類縁物質５＊ ）	[redacted]	0.05

a.　表中の BA はラットに 10 mg/kg を投与したときの結果

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.6.4.7.2 原薬中不純物の薬物動態

2.6.4.7.2.1 ラット腸液における　類縁物質１＊　の安定性

添付資料 4.2.2.7-5

リナクロチドの　類縁物質１＊　は原薬の製造過程における副産物で，[redacted]，[redacted]。[redacted]，[redacted]，[redacted]が含まれる。そこで，リナクロチドの　類縁物質１＊　のラット腸液中での安定性を評価した。

[redacted]リナクロチドの　類縁物質１＊　を生成させた。生成した類縁物質１＊　をラット腸液とインキュベーションして安定性を評価した。リナクロチド，類縁物質１＊　はインキュベーション時間依存的に速やかに代謝され，60 分間インキュベーション後の残存率はそれぞれ 30%，18%及び 3%であった。

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.6.4.8　考察及び結論

リナクロチドは 14 個のアミノ酸から成る吸収性の極めて低い合成ペプチドである。経口投与されたリナクロチドは腸管上皮の管腔側に主に発現する GC-C 受容体と結合し，これらの受容体を活性化する。このことから，リナクロチドは循環血中からではなく腸管局所において本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。

リナクロチドの Caco-2 細胞における膜透過性は低く，検討したすべての動物種（マウス，ラット及びカニクイザル）において全身曝露量は極めて低かった。リナクロチドを 1 日 1 回最長 26 週間経口投与したマウスの組織中に活性ペプチド（リナクロチド及び MM-419447）が検出されなかったことから，経口投与後にリナクロチドが組織中に蓄積する可能性は低いと考えられた。また，臨床試験においても，リナクロチドの全身曝露量は極めて少ないことが確認されている（表 2.6.4- 22）。

マウス，ラット及びカニクイザルに静脈内投与したとき，リナクロチドは血清若しくは血漿中から速やかに消失した。ラットにリナクロチドを静脈内投与したとき，胆汁及び尿中にリナクロチド及び MM-419447 が検出された。また，腎結紮ラットでは血漿からの消失速度が無処置ラットに比べて大幅に低下し，全身クリアランスは無処置ラットの約 20 分の 1 であった。これらの結果から，ラットにおけるリナクロチドの消失には腎排泄の寄与が大きく，一部胆汁排泄も寄与すると考えられた。

リナクロチドは 6 つのシステインを有し，これらは 3 つの分子内ジスルフィド結合を形成し（Cys^{1}-Cys^{6}，Cys^{2}-Cys^{10} 及び Cys^{5}-Cys^{13}）三次構造を形成している。この三次構造が，非還元条件下では低 pH 及び蛋白分解酵素に対する安定性に寄与していると考えられた。リナクロチドは腸管腔に存在するカルボキシペプチダーゼ A よって代謝され，C 末端のチロシン残基が脱離した活性代謝物である MM-419447 が生成する。その他の活性代謝物は見つかっていないことから，消化管における薬理作用にはリナクロチド及び MM-419447 が関与していると考えられた。MM-419447 の薬物動態特性はリナクロチドに類似しており，ラットに経口投与したときの BA はリナクロチドと同様に低かった。

リナクロチド及び MM-419447 の代謝は，ジスルフィド結合の還元によって三次構造を失うことで開始されると考えられた。ジスルフィド結合の還元には消化管に存在するグルタチオン及びグルタレドキシン系の酵素群が関与していることが示唆された。還元型リナクロチドは，キモトリプシン等の消化管に存在する蛋白分解酵素や腸液によって低分子ペプチドに代謝され，更にアミノ酸まで分解された。これらの結果はリナクロチドの消化管における代謝過程が低分子ペプチドの一般的な分解経路と類似していることを示している[Silk, 1985]。リナクロチドはヒト腸液を用いた検討においても，MM-419447 の生成及びジスルフィド結合の還元を経て速やかに低分子ペプチド等に代謝されることが示されている（2.7.2.2.1.2）。これらの低分子代謝物の一部は生体内に吸収されると推察される[Daniel, 2004; Silk, 1985; Kim, 1972]。なお，ヒト肝及び腸ミクロソーム並

びにヒト肝細胞を用いた検討ではリナクロチドはCYP分子種によって代謝されず, CYP分子種に対して阻害及び誘導作用をほとんど示さなかった（2.7.2.2.1.3）。

ラットに経口投与したときのリナクロチドの糞中排泄の検討では，活性ペプチドの排泄率は低かったことから（1%未満），糞中排泄はリナクロチド及びMM-419447の主要な消失経路ではないと考えられた。一方で，糞中に排泄量は少ないものの活性ペプチドが検出されたことから，消化管全体に活性ペプチドが曝露されることが示唆された。ヒトにおいても同様に糞中に活性ペプチドが検出されている（2.7.2.2.3.1.5）。

以上の検討により，経口投与されたリナクロチドはその大部分が消化管内に分布して薬理作用を発現し，消化管内で代謝されると考えられた。活性ペプチドの全身曝露量は極めて低く，ごくわずかに吸収された活性ペプチドは腎臓からの排泄等によって速やかに消失すると考えられた。

表 2.6.4- 22　マウス，ラット，カニクイザル及びヒトにリナクロチドを経口投与したときのリナクロチド及び MM-419447 の薬物動態データ及び全身曝露量の比較

動物種	*媒体／剤型*	*用量*	*全身（血清若しくは血漿）曝露量*				*試験報告書番号*
			リナクロチド		*MM-419447*		
			C_{max} *(ng/mL)*	AUC_{po} [a, g] *(ng·h/mL)*	C_{max} *(ng/mL)*	AUC_{po} [a, g] *(ng·h/mL)*	
単回投与試験							
マウス [h]	20 mmol/L Tris-HCl 溶液	8 mg/kg	8.80	5.85	NC[b]	NC[b]	[MDP-103-003-PKR-02]
ラット [h]	20 mmol/L Tris-HCl 溶液	10 mg/kg	13.4	≤ 48.3	NC[b]	NC[b]	[MDP-103-006-PKR-02]
ラット [h]	20 mmol/L Tris-HCl 溶液	10 mg/kg	19.0	≤ 19.8	1.66	≤ 4.91	[MDP-103-010-PKR-02]
ヒト	50 mmol/L PBS 溶液	0.029～2.897 mg	< 3.00	NC	< 3.00	NC	[MCP-103-001]
ヒト	内服液	0.109，0.327，1.09 及び 3.27 mg	< 0.218	NC	< 2.00	NC	[CL-0011]
反復投与を含む試験 [c]							
マウス [i]	0.5%メチルセルロース懸濁液	100[d] mg/kg/日 × 180 日間	107 (197, 16.8)	106 (163, 48.6)	6.27 (5.07, 7.48)	4.82 (4.59, 5.05)	[MNP-103-027-TXR-01]
ラット [i]	0.5%メチルセルロース懸濁液	100 mg/kg/日 × 85 日間	28.4 (23.2, 33.5)	55.6 (38.8, 72.3)	24.7 (18.3, 31.0)	38.7 (29.2, 48.2)	[MNP-103-005-TXR-01]
カニクイザル [j]	0.5%メチルセルロース懸濁液	50 mg/kg/日 × 222 日間	78.5 (47.9, 109)	474 (292, 656)	97.5 (82.0, 113)	810 (599, 1020)	[MNP-103-028-TXR-01]
ヒト	50 mmol/L PBS 溶液	0.029～0.966 mg 1 日 1 回 × 7 日間	< 3.00	NC	< 3.00	NC	[MCP-103-002]
ヒト	カプセル	0.29 mg 1 日 1 回 × 7 日間 若しくは 2.897 mg 単回	0.735[e]	NC	< 2.00	NC	[MCP-103-103]
ヒト	カプセル	0.29 mg 1 日 1 回 × 26 週間	0.241[f]	NC	< 2.00	NC	[MCP-103-302]
ヒト	カプセル	0.29 mg 1 日 1 回 × 12 週間	< 0.200	NC	< 2.00	NC	[LIN-MD-31]
ヒト	カプセル	0.25 mg 1 日 1 回 × 7 日間 若しくは 1 mg 1 日 1 回 × 7 日間	< 0.200	NC	< 2.00	NC	[CL-0012]
ヒト	タブレット	0.0625 mg，0.125 mg，0.25 mg 及び 0.5 mg 1 日 1 回 × 12 週間	< 0.200	NC	< 2.00	NC	[CL-0021]

a.　「≤」は報告値が AUC 推定値上限であることを示し，この場合，定量下限未満の試料濃度は定量下限値を用いて計算した。
b.　本試験では試料中の MM-419447 は分析していないため，本代謝物の全身曝露量は推定不能であった。
c.　マウス，ラット及びカニクイザルを用いた反復投与試験は複数回実施したが，各動物種における最長期間の試験のデータのみを記載する。また，同試験の最高投与量による全身曝露量データを試験ごとに示す。
d.　動物の死亡により，6 日目に 100 mg/kg/日から 80 mg/kg/日に減量した。
e.　報告値は，試験期間中におけるすべての被験者の C_{max} のうち最も高い値を表す。リナクロチドは 2.897 mg を投与した 18 例中 2 例のみに検出され，被験者 12 は 2 時間後に C_{max} 0.735 ng/mL に達し，被験者 19 は 0.5 時間後に C_{max} 0.212 ng/mL に達した。
f.　報告値は，試験期間中におけるすべての被験者の C_{max} のうち最も高い値を表す。リナクロチドは IBS-C 患者 98 例中 2 例のみに検出され，1 日目のリナクロチド 0.29 mg 初回投与約 2 時間後に患者 0072006 では C_{max} 0.241 ng/mL，患者 0492006 では C_{max} 0.239 ng/mL に達した。

g. AUC_{po}: 経口投与時における AUC
h. 薬物動態データは各時点の 3 例の平均濃度を基にして算出した。
i. 薬物動態データは雌雄の平均値。括弧内の数値はそれぞれ性別毎に各時点の 3 例の平均濃度を基にして算出した雄及び雌の値。
j. 薬物動態データは雌雄の平均値。括弧内の数値はそれぞれ雄 6 例及び雌 5 例より算出された雄及び雌の平均値。
NC = 血漿中濃度が測定不能であったため算出されず。

2.6.4.9 参考文献

Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, et al. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci USA. 1992;89:947-51.

Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. Annu Rev Physiol. 2004;66:361-84.

Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, et al. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:10464-8.

Kim YS, Birtwhistle W, Kim YW. Peptide hydrolases in the brush border and soluble fractions of small intestinal mucosa of rat and man. J Clin Invest. 1972;51:1419-30.

Krause G, Bayerl A, Heim JM, Singh S, Gerzer R. Distribution of membrane bound guanylyl cyclases in human intestine. Gut. 1994;35:1250-7.

Silk DB, Grimble GK, Rees RG. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. Proc Nutr Soc. 1985;44:63-72.

目次

2.6.5　薬物動態試験概要表 2
2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表 2
2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験 6
2.6.5.3　薬物動態試験：吸収：単回投与 7
2.6.5.4　薬物動態試験：吸収：反復投与 8
2.6.5.5　薬物動態試験：組織分布 10
2.6.5.6　薬物動態試験：蛋白結合 13
2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 14
2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験 15
2.6.5.9　薬物動態試験：代謝：*In vivo* 16
2.6.5.10　薬物動態試験：代謝：*In vitro* 17
2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路 18
2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（その１） 19
2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（その２） 20
2.6.5.13　薬物動態試験：排泄（その１） 21
2.6.5.13　薬物動態試験：排泄（その２） 22
2.6.5.14　薬物動態試験：排泄・胆汁中 23
2.6.5.15　薬物動態試験：薬物相互作用 24
2.6.5.16　薬物動態試験：その他（その１） 25
2.6.5.16　薬物動態試験：その他（その２） 26
2.6.5.16　薬物動態試験：その他（その３） 27
2.6.5.16　薬物動態試験：その他（その４） 28

2.6.5　薬物動態試験概要表

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表

被験物質：リナクロチド

Study Description	Species or Test System	Assay System or Method of Administration	Testing Facility	Study Report Number CTD No.
Bioanalysis				
Method Validation for Quantitation in Serum	Mouse	LC-MS/MS	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-002-MQR-01 4.2.2.1-1
Abbreviated Method Validation for Quantitation in Plasma	Mouse	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-013-MVR-01 4.2.2.1-2
Method Validation for Quantitation in Plasma	Mouse	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-038-MVR-03 4.2.2.1-3
Method Validation for Quantitation in Plasma	Mouse	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-058-MVR-01 4.2.2.1-4
Method Validation for Quantitation in Serum and Plasma	Rat	RIA	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-004-MQR-01 4.2.2.1-5
Method Validation for Quantitation in Plasma	Rat	LC-MS/MS	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-009-MQR-01 4.2.2.1-6
Abbreviated Method Validation for Quantitation in Plasma	Rat	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-012-MVR-01 4.2.2.1-7
Method Validation for Quantitation in Plasma	Rat	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-034-MVR-01 4.2.2.1-8
Method Validation for Quantitation in Plasma	Rat	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-040-MVR-01 4.2.2.1-9
Method Validation for Quantitation in Urine	Rat	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-044-MVR-01 4.2.2.1-10
Method Validation for Quantitation in Plasma	Rabbit	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-036-MVR-01 4.2.2.1-11

Table continued on next page

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Study Description	Species or Test System	Assay System or Method of Administration	Testing Facility	Study Report Number CTD No.
Abbreviated Method Validation for Quantitation in Plasma	Cynomolgus Monkey	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-035-MVR-01 4.2.2.1-12
Method Validation for Quantitation in Plasma	Cynomolgus Monkey	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-037-MVR-01 4.2.2.1-13
Method Validation for Quantitation in Plasma	Cynomolgus Monkey	LC-MS/MS	[redacted]	MNP-103-039-MVR-02 4.2.2.1-14
Absorption				
Single-dose pharmacokinetics	CD-1 Mouse	po – 8 mg/kg iv – 8 mg/kg	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-003-PKR-02 4.2.2.2-1
Single-dose pharmacokinetics	Sprague-Dawley Rat	po – 10 mg/kg iv – 10 mg/kg	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-006-PKR-02 4.2.2.2-2
Single-dose pharmacokinetics of linaclotide and MM-419447	Sprague-Dawley Rat	po – 10 mg/kg iv – 10 mg/kg	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-010-PKR-02 4.2.2.2-3
Systemic and portal vein concentrations of linaclotide and MM-419447 after dosing with linaclotide	Sprague-Dawley Rat	po – 10 mg/kg	**In life** [redacted] **Bioanalysis** Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-087-PKR-01 4.2.2.2-4
Single-dose pharmacokinetics after dosing with MM-419447	Sprague-Dawley Rat	po – 10 mg/kg iv – 10 mg/kg	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-011-PKR-02 4.2.2.2-5
Distribution				
Bioanalysis of brain, liver, and adipose tissues for linaclotide and MM-419447 from mice dosed with linaclotide for up to 26 weeks	CD-1 Mouse	po – 5, 20, and 100/80 mg/kg/day for 26-weeks	**In-Life** [redacted] **Bioanalysis** [redacted] Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-065-BAR-02 4.2.2.3-1

Table continued on next page

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Study Description	Species or Test System	Assay System or Method of Administration	Testing Facility	Study Report Number CTD No.
Metabolism				
Metabolic stability of linaclotide and MM-419447 in the presence of conditions known to degrade peptides	Proteolytic Enzymes Simulated Gastric Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-049-IAR-01 4.2.2.4-1
Metabolic stability under various reducing conditions	Proteolytic Enzymes in the Presence and Absence of a Thiol Reducing Agent	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-038-IAR-01 4.2.2.4-2
Reduction by thiols	Thiol Reducing Agents Deproteinized Rat Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-037-IAR-01 4.2.2.4-3
Linaclotide and MM-419447 metabolic stability in fluid from mouse ligated intestinal loops	CD-1 Mouse Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-052-IAR-01 4.2.2.4-4
Linaclotide and MM-419447 metabolic stability in fluid from rat ligated intestinal loops	Sprague-Dawley Rat Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-035-IAR-01 4.2.2.4-5
Effects of temperature and thiol concentration on metabolic stability in fluid from rat ligated intestinal loops	Sprague-Dawley Rat Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-036-IAR-01 4.2.2.4-6
Metabolism and digestion pathway in fluid from rat ligated intestinal loops	Sprague-Dawley Rat Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-039-IAR-01 4.2.2.4-7
Complete digestion of linaclotide and its initial metabolic products to single amino acids	Protein-Concentrated Sprague-Dawley Rat Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-040-IAR-01 4.2.2.4-8
CYP induction (Linaclotide and MM-419447)	Human Hepatocytes	*In Vitro*	[redacted]	MDP-103-088-IAR-01 4.2.2.4-10
CYP inhibition (Linaclotide)	Human Intestinal Microsomes	*In Vitro*	[redacted]	MDP-103-066-IAR-01 4.2.2.4-11

Table continued on next page

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

Study Description	Species or Test System	Assay System or Method of Administration	Testing Facility	Study Report Number CTD No.
CYP inhibition (Linaclotide and MM-419447)	Human Liver Microsomes	*In Vitro*	[redacted]	[redacted]/21 4.2.2.4-12
Metabolic stability in rat intestine	Sprague-Dawley Rats with Ligated Intestinal Loops	Intra-Intestinal Injection (625-5000 ng)	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-034-AMR-01 4.2.2.4-9
Excretion				
Bioanalysis of stools from linaclotide-dosed rats for excreted linaclotide and MM-419447	Sprague-Dawley Rat	po – 10 mg/kg	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-033-BAR-02 4.2.2.5-1
Single-dose pharmacokinetics of linaclotide and MM-419447	Sprague-Dawley Rat (Normal and Functionally Nephrectomized)	iv – 1 mg/kg	[redacted]	MNP-103-042-PKR-02 4.2.2.5-2
Other Pharmacokinetic Studies				
Single-dose pharmacokinetics of drug product degradant MM-447619	Sprague-Dawley Rat	po – 10 mg/kg iv – 10 mg/kg	**In-Life** Ironwood Pharmaceuticals **Bioanalysis** [redacted]	MDP-103-074-PKR-01 4.2.2.7-1
Single-dose pharmacokinetics of drug product degradant MM-448623	Sprague-Dawley Rat	po – 10 mg/kg iv – 10 mg/kg	**In-Life** Ironwood Pharmaceuticals **Bioanalysis** [redacted]	MDP-103-077-PKR-01 4.2.2.7-2
Stability of linaclotide drug product degradants MM-447619 and MM-448623	Simulated Gastric Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-078-IAR-01 4.2.2.7-3
Metabolism and degradation of linaclotide drug product impurities	Sprague-Dawley Rat Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-070-IAR-01 4.2.2.7-4
Metabolism and degradation of linaclotide　類縁物質１＊	Sprague-Dawley Rat Intestinal Fluid	*In Vitro*	Ironwood Pharmaceuticals	MDP-103-055-IAR-01 4.2.2.7-5

RIA: Radioimmunoassay, LC-MS/MS: Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry

Ironwood Pharmaceuticals: 301 Binney Street Cambridge, MA, USA, [redacted], USA, [redacted], USA, [redacted], USA, [redacted], USA, [redacted], USA, [redacted], UK, [redacted], USA, [redacted], USA

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。

2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験

分析方法及びバリデーション試験に関する概要表は 2.6.4/表 2.6.4 -3 に記載した。

2.6.5.3 薬物動態試験：吸収：単回投与

被験物質：リナクロチド，MM-419447

Dosed Article	***Linaclotide***						***MM-419447***
Species	CD-1 Mouse	Sprague-Dawley Rat	Sprague-Dawley Rat		Human		Sprague-Dawley Rat
Number & Gender per Dose[a]	3 F[b]	3 F[b]	3 F[b]		1 F, 29 M[b]		3 F[b]
Feeding Condition	Fasted	Fasted	Fasted		Fasted		Fasted
Vehicle and Formulation	20 mmol/L Tris-HCl Solution	20 mmol/L Tris-HCl Solution	20 mmol/L Tris-HCl Solution		50 mmol/L PBS Solution		20 mmol/L Tris-HCl Solution
Administration	po / iv	po / iv	po / iv		po		po / iv
Dose (mg/kg)	8 / 8	10 / 10	10 / 10		0.029-2.897 mg		10 / 10
Analyte	Linaclotide	Linaclotide	Linaclotide	MM-419447	Linaclotide	MM-419447	MM-419447
Assay	LC-MS/MS	RIA	LC-MS/MS		LC-MS/MS		LC-MS/MS
t_{max} (h)	0.33	0.67	0.08	1.0	NC	NC	0.33
C_{max} (ng/mL)	8.80	13.4	19.0	1.66	< 3.0	< 3.0	27.0
AUC (ng·h/mL)[c]	po 5.85 iv 8,170	po ≤ 48.3 iv 23,700	po ≤ 19.8 iv 18,800	po ≤ 4.91 iv ≤ 81.4	NC	NC	po ≤ 29.7 iv 36,100
Time for AUC	0-4 h (po) / 0-inf (iv)	0-6 h	0-6 h	0-6 h	NC	NC	0-6 h
$t_{1/2}$ (h)	0.605	NC	NC	NC	NC	NC	NC
%BA	0.07%	≤ 0.20%	≤ 0.11%	NA	NC		≤ 0.08%
Study Report Number /CTD No.	MDP-103-003-PKR-02 /4.2.2.2-1	MDP-103-006-PKR-02 /4.2.2.2-2	MDP-103-010-PKR-02 /4.2.2.2-3		MCP-103-001 /5.3.3.1-3(参)		MDP-103-011-PKR-02 /4.2.2.2-5

a. For nonclinical studies, the number of animals sampled per time point in each dose group is reported; value does not represent the total number of dosed animals.
b. F: female, M: male
c. The "≤ "sign indicates the reported value is an upper estimate of the AUC, wherein the lowest standard was used as the concentration of any sample with a concentration below the quantitation limit.
NC : Not calculated; NA : Not applicable

2.6.5.4 薬物動態試験：吸収：反復投与

被験物質：リナクロチド

Species	***CD-1 Mouse***						***Sprague-Dawley Rat***				***Cynomolgus Monkey***						***Human***	
Feeding Condition	Non-Fasted						Non-Fasted				Non-Fasted						Non-Fasted	
Vehicle and Formulation	0.5% Methylcellulose Suspension						0.5% Methylcellulose Suspension				0.5% Methylcellulose Suspension						Capsule	
Administration	po						po				po						po	
Dose (mg/kg/day)	5		20		100/80[a]		50		100		5		10		50		0.29 mg/day	
Number per Gender[b,c]	3 F, 3 M		3 F, 3 M		3 F, 3 M		3 F, 3 M		3 F, 3 M		4 F, 4 M		4 F, 4 M		6 F, 6 M		92 F, 6 M	
Day	180		180		180		85		85		222		222		222		29[d]	
Assay	LC-MS/MS						LC-MS/MS				LC-MS/MS						LC-MS/MS	
Analyte	***Linaclotide***																	
Gender[b]	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
t_{max} ***(h)***	0.5	0.5	4.0	0.5	2.0	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	1.5	1.8	0.8	1.7	1.9	2.0	NC[e]	NC
C_{max} ***(ng/mL)***	0.48	1.0	19	5.9	17	200	15	4.5	34	23	6.1	8.0	22	10	110	48	NC[e]	NC
AUC_{po} ***(ng·h/mL)***	0.91	0.69	64	7.1	49	160	12[j]	4.2[j]	72[j]	39[j]	39	50	95	81	660	290	NC	NC
%BA[f]	0.02[g]	0.01[g]	0.31[g]	0.03[g]	0.06[g]	0.20[g]	0.02[h]	0.01[h]	0.06[h]	0.03[h]	0.14[i]	0.19[i]	0.17[i]	0.15[i]	0.24[i]	0.11[i]	NC	NC
Analyte	***MM-419447***																	
t_{max} ***(h)***	NC	NC	NC	0.5	0.5	0.5	0.5	NC	0.5	0.5	4.0	4.0	2.3	2.7	3.2	3.3	NC	NC
C_{max} ***(ng/mL)***	< 5.0	< 5.0	< 5.0	2.1	7.5	5.1	20	< 15	31	18	2.6	3.6	29	16	110	82	< 2.0	< 2.0
AUC_{po} ***(ng·h/mL)***	NC	NC	NC	1.0	5.1	4.6	14[j]	NC	48[j]	29[j]	20	11	210	150	1000	600	NC	NC
Report Number/CTD No.	MNP-103-027-TXR-01 /4.2.3.2-2						MNP-103-005-TXR-01 /4.2.3.2-4				MNP-103-028-TXR-01 /4.2.3.2-7						MCP-103-302 /5.3.5.1-5(参)	

Although multiple repeated-dose studies were conducted in each species, only data from the longest duration study in each species are reported in the table.

a. The 100 mg/kg/day dose was lowered to 80 mg/kg/day on Day 6 due to animal mortalities.

b. M: male, F: female

c. The number of animals or patients sampled per gender in each dose group at each time point is reported.

d. Although the study lasted longer, the last plasma sample was obtained on Day 29 (± 3 days).

e. Linaclotide was detected in the plasma of two females on Day 1 ~ 2 h following the initial dose (Pt 0072006 = 0.241 ng/mL and Pt 0492006 = 0.239 ng/mL).

f. $(AUC_{po} \times Dose_{iv}) / (AUC_{iv} \times Dose_{po}) \times 100$

g. AUC_{iv} was determined in single intravenous administration study (MDP-103-003-PKR-02).

h. AUC_{iv} was determined in single intravenous administration study (MNP-103-018-TXR-01).
i. AUC_{iv} was determined in repeated intravenous administration (MNP-103-019-TXR-01).
j. AUC was calculated from 0 to 4 hours.

NC : Not calculated due to lack of measurable plasma concentrations; AUC_{po} : Area under the curve after oral administration

2.6.5.5 薬物動態試験：組織分布

被験物質：リナクロチド

Study Number: MNP-103-027 (plasma) and MDP-103-065 (tissues)			***Report Numbers/CTD No.:*** MNP-103-027-TXR-01/4.2.3.2-2 (plasma) and MDP-103-065-BAR-02/4.2.2.3-1 (tissues)				
Species	***Number & Gender[a] (per dose)***	***Feeding Condition***	***Vehicle and Formulation***	***Method of Administration***	***Dose (mg/kg/day)***	***Sampling Days***	***Sampling Times (h)***
CD-1 Mouse	56 F, 56 M	Non-Fasted	0.5% Methylcellulose Suspension	po	5, 20, or 100/80[b]	1, 90, and 180	0.5, 1, 2, 4, 8, 24

5 mg/kg/day

Linaclotide Plasma and Tissue Concentrations - ng/mL (plasma) or ng/g (tissues)

	Day 1				Day 90				Day 180			
Tissue	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose
0.5 h	1.0	NS	NS	NS	0.90	NS	NS	NS	0.74	NS	NS	NS
1 h	2.1	NS	NS	NS	12	< 50	< 150	< 50	0.21	< 50	< 150	< 50
2 h	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	NS	NS	NS	0.18	< 50	< 150	< 50
4 h	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	< 50	< 150	< 50
8 h	< 0.50	NS	NS	NS	< 0.50	NS	NS	NS	< 0.50	NS	NS	NS
24 h	< 0.50	NS	NS	NS	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	NS	NS	NS

MM-419447 Plasma and Tissue Concentration - ng/mL (plasma) or ng/g (tissues)

	Day 1				Day 90				Day 180			
Tissue	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose
0.5 h	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	NS	NA	NS
1 h	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150
2 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	< 150	NA	< 150
4 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150
8 h	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	NS	NA	NS
24 h	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	NS	NA	NS

Table continued on next page

2.6.5.5 薬物動態試験：組織分布（続き）

20 mg/kg/day												
Linaclotide Plasma and Tissue Concentrations - ng/mL (plasma) or ng/g (tissues)												
	Day 1				Day 90				Day 180			
Tissue	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose
0.5 h	3.4	< 50	< 150	< 50	3.2	NS	NS	NS	6.7	< 50	< 150	< 50
1 h	7.2	< 50	< 150	< 50	2.4	< 50	< 150	< 50	1.7	< 50	< 150	< 50
2 h	0.98	NS	NS	NS	1.5	< 50	< 150	< 50	1.2	< 50	< 150	< 50
4 h	0.44	< 50	< 150	< 50	0.32	< 50	< 150	< 50	9.7	< 50	< 150	< 50
8 h	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	NS	NS	NS
24 h	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	< 50	< 150	< 50
MM-419447 Plasma and Tissue Concentration - ng/mL (plasma) or ng/g (tissues)												
	Day 1				Day 90				Day 180			
Tissue	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose
0.5 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	NS	NA	NS	1.0	< 150	NA	< 150
1 h	0.85	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150
2 h	< 5.0	NS	NA	NS	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150
4 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150
8 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	NS	NA	NS
24 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150

Table continued on next page

2.6.5.5 薬物動態試験：組織分布（続き）

100/80[b] mg/kg/day												
Linaclotide Plasma and Tissue Concentrations - ng/mL (plasma) or ng/g (tissues)												
	Day 1				Day 90				Day 180			
Tissue	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose
0.5 h	54	NS	NS	NS	21	NS	NS	NS	13	< 50	< 150	< 50
1 h	19	< 50	< 150	< 50	330	NS	NS	NS	100	< 50	< 150	< 50
2 h	48	< 50	< 150	< 50	1.8	< 50	< 150	< 50	11	NS	NS	NS
4 h	39	< 50	< 150	< 50	0.76	< 50	< 150	< 50	0.67	< 50	< 150	< 50
8 h	1.0	< 50	< 150	< 50	13	< 50	< 150	< 50	0.24	< 50	< 150	< 50
24 h	3.2	< 50	< 150	< 50	< 0.50	< 50	< 150	< 50	< 0.50	< 50	< 150	< 50
MM-419447 Plasma and Tissue Concentration - ng/mL (plasma) or ng/g (tissues)												
	Day 1				Day 90				Day 180			
Tissue	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose	Plasma	Brain	Liver	Adipose
0.5 h	14	NS	NA	NS	2.2	NS	NA	NS	6.3	< 150	NA	< 150
1 h	2.6	< 150	NA	< 150	< 5.0	NS	NA	NS	2.2	< 150	NA	< 150
2 h	0.92	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	NS	NA	NS
4 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150
8 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150
24 h	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150	< 5.0	< 150	NA	< 150

a. M: male, F: female

b. The 100 mg/kg/day dose was reduced to 80 mg/kg/day on Day 6 due to animal mortalities.

NA : Not applicable because the liver tissue samples could not be analyzed for MM-419447.

NS : No sample

Concentration in this table was described as average of 3 males and 3 females.

2.6.5.6　薬物動態試験：蛋白結合

該当する試験は実施していない。

2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当する試験は実施していない。

2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験

該当する試験は実施していない。

2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：*In vivo*

被験物質：リナクロチド

Species	Sprague-Dawley Rat	Sprague-Dawley Rat	Sprague-Dawley Rat	Human	Human
Number/Gender[a,b]	3 F	10 M	3 F (Linaclotide) 3 F (MM-419447)	1 F, 29 M	3 F, 15 M
Feeding Condition	Fasted	Non-Fasted	Fasted	Fasted	Fasted, Fed
Vehicle and Formulation	20 mmol/L Tris-HCl Solution	10 mmol/L PBS Suspension	20 mmol/L Tris-HCl Solution	50 mmol/L PBS Solution	Capsule
Administration	po	iv	po	po	po
Dose	10 mg/kg	1 mg/kg	10 mg/kg	0.029-2.897 mg	0.29 mg × 7 days

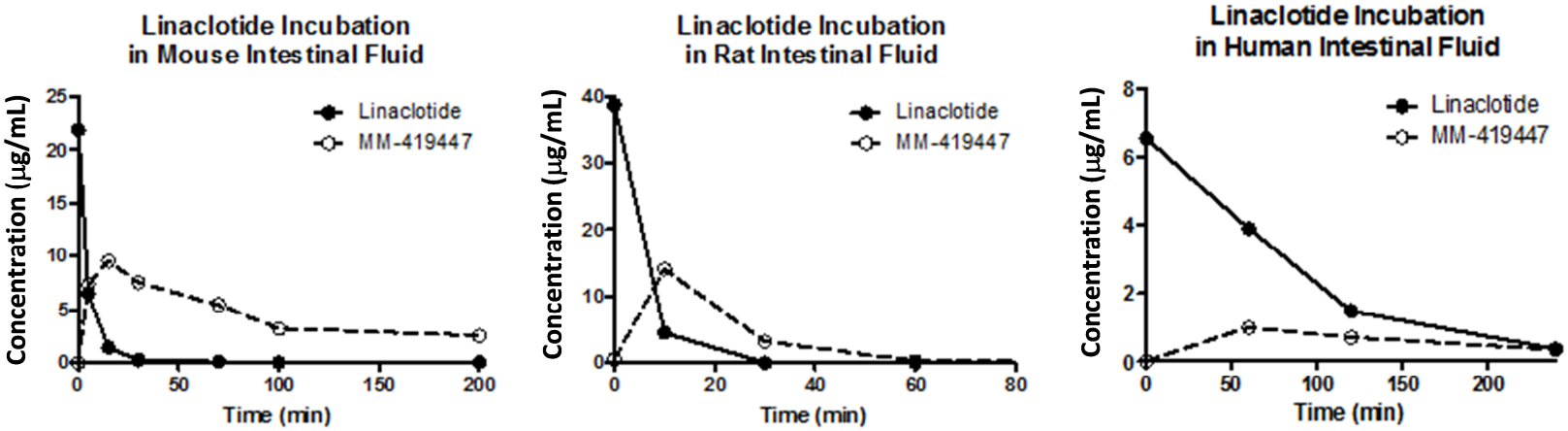
Species	***Sample***	***Sampling Time (h)***	***Compound in Sample (% of dose or C_{max})***		***Report Number / CTD No.***
			Linaclotide (Parent)	MM-419447	
Rat	Feces	0-55	0.04%	0.95%	MDP-103-033-BAR-02/4.2.2.5-1
Rat	Urine	0-24	21%	0.17%	MNP-103-042-PKR-02/4.2.2.5-2
Rat	Bile[c]	0-24	1140 ng/mL	48 ng/mL	MNP-103-042-PKR-02/4.2.2.5-2
Rat	Plasma	0-6	19.0 ng/mL	1.66 ng/mL	MDP-103-010-PKR-02/4.2.2.2-3
Human	Plasma	0-48	< 3.0 ng/mL	< 3.0 ng/mL	MCP-103-001/5.3.3.1-3(参)
Human	Feces	Dosing Day 7	< 30 ng/g	5% (Fasted), 3% (Fed)	MCP-103-103/5.3.1.1-1(参)

a. The number of animals or subjects sampled per time point is reported.
b. M: male, F: female
c. Bile was collected from five of the ten intravenously dosed animals per time point.

2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：*In vitro*

被験物質：リナクロチド

Linaclotide was incubated at 37 °C in intestinal fluid from CD-1 mice, Sprague-Dawley rats, or human cadavers. The rodent intestinal fluid was obtained by injecting buffer into surgically ligated intestinal loops *in vivo* and recovering the intestinal wash after 30 minutes. In contrast, the human intestinal fluid was obtained by rinsing the intestinal contents obtained from human cadavers. The incubation solutions were sampled at various time points and analyzed for linaclotide and the primary metabolite, MM-419447.		
Report No./CTD No. MDP-103-052-IAR-01/4.2.2.4-4	***Report No./CTD No.*** MDP-103-035-IAR-01/ 4.2.2.4-5	***Report No./CTD No.*** MDP-103-041-IAR-01/5.3.2.3-2



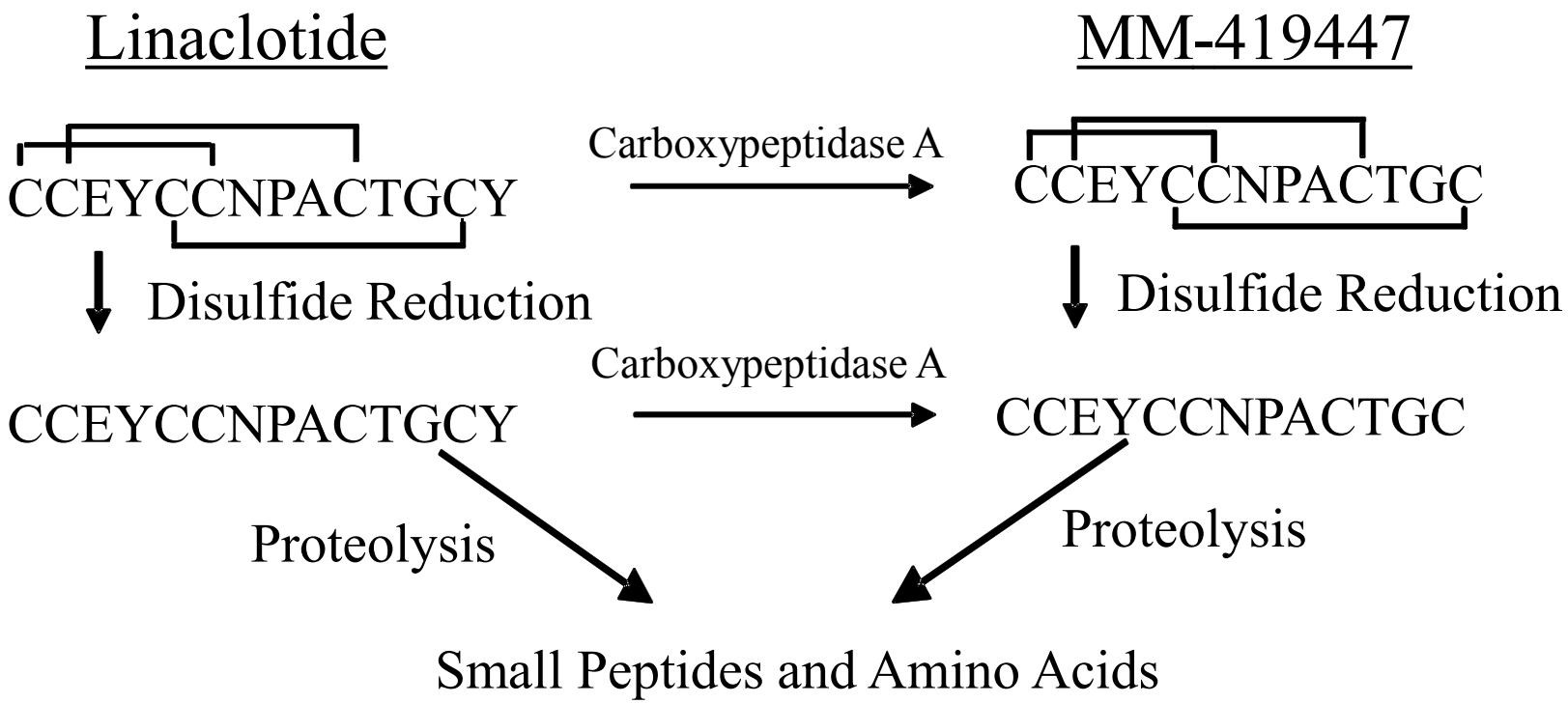
The left figure was described as mean (n=2).

The result of doner 1 was represented as a typical data in the right figure.

2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路

被験物質：リナクロチド

A series of *in vitro* experiments were conducted in intestinal fluid from Sprague-Dawley rats to characterize the metabolism and degradation pathway of linaclotide. Each experiment was implemented and designed based on the results from the experiment immediately preceding it; together, they form a comprehensive picture of the metabolic and degradation pathway of linaclotide. The experiments were repeated in human intestinal fluid from three human cadavers obtained within 1-5 hours post mortem; the results were similar to those obtained in rats, and the human degradation pathway, including isolated intermediates, appears to be the same as in the rat. The results of these studies suggest that linaclotide has the same metabolic fate in humans as it does in rats: cleavage of the terminal tyrosine to form the active metabolite MM-419447 and simultaneous reduction of disulfide bonds, followed by rapid proteolytic degradation to small peptides and individual naturally occurring amino acids which are subsequently recycled.



2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（その１）

2.6.5.12.1 ヒト肝臓における CYP 分子種に対する酵素誘導

被験物質：リナクロチド

Study Number	MDP-103-088-IAR-01	***Study Report Number / CTD No.***	MDP-103-088-IAR-01 /4.2.2.4-10	***Method***	Fresh human hepatocytes (Three different lot)

CYP Isoform Substrate Metabolic Reaction		***DMSO***	***Linaclotide Concentration (ng/mL)***						***MM-419447 Concentration (ng/mL)***						***Positive Control***[a]
		0.1%	***0.25***	***2.5***	***50***	***625***	***1250***	***5000***	***0.25***	***2.5***	***50***	***625***	***1250***	***5000***	
CYP1A2 Phenacetin *O*-dealkylation	Enzyme activity[b] (pmol/min/mg protein)	43.8	52.7	53.7	55.2	NA	NA	NA	58.3	52.1	50.7	NA	NA	NA	872
	Fold induction[c]	1.00	1.21	1.25	1.29	NA	NA	NA	1.34	1.21	1.17	NA	NA	NA	19.9
CYP2B6 Bupropion hydroxylation	Enzyme activity[b] (pmol/min/mg protein)	107	97.4	107	102	NA	NA	NA	115	95.0	101	NA	NA	NA	1460
	Fold induction[c]	1.00	0.912	0.965	0.947	NA	NA	NA	1.06	0.908	1.00	NA	NA	NA	17.8
CYP3A4/5 Testosterone 6β-hydroxylation	Enzyme activity[b] (pmol/min/mg protein)	2820	2660	2900	2790	2760	2720	2870	2890	3150	3200	3220	3250	3590	17500
	Fold induction[c]	1.00	1.02	1.06	1.06	1.03	1.05	1.12	1.03	1.18	1.31	1.23	1.27	1.39	7.83

a. 50 μmol/L Omeprazole (CYP1A2), 750 μmol/L Phenobarbital (CYP2B6), 10 μmol/L Rifampin (CYP3A4/5)

b. Values are the mean of three assays using the three different lot of human hepatocytes.

c. Fold induction were determined by dividing the enzymatic rate for each treatment group by that of the 0.1% DMSO control.

NA : Not applicable

2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（その２）

2.6.5.12.2 ヒト小腸及び肝臓における CYP 分子種に対する阻害作用

被験物質：リナクロチド

Method: Human Microsomes Incubation	***% Remaining Activity***													
	Direct Inhibition							***Time-Dependent Inhibition***						
Intestinal CYP Isoform (Substrate)	***Linaclotide Concentration (ng/mL)***							***Linaclotide Concentration (ng/mL)***						
	0	***162.5***	***325***	***650***	***1300***	***2600***	***5200***	***0***	***162.5***	***325***	***650***	***1300***	***2600***	***5200***
2C9 (Tolbutamide)	100	105	101	98	103	98	99	100	94	93	101	100	104	100
3A4 (Midazolam)	100	106	96	98	108	114	106	100	101	101	99	95	103	107
3A4 (Testosterone)	100	108	101	101	90	93	100	100	110	102	92	87	84	82
Study Report Number / CTD No. : MDP-103-066-IAR-01 / 4.2.2.4-11														
Liver CYP Isoform (Substrate)	***Linaclotide Concentration (ng/mL)***							***MM-419447 Concentration (ng/mL)***						
	0	***0.05***	***0.5***	***5***	***15***	***50***		***0***	***0.05***	***0.5***	***5***	***15***	***50***	
1A2 (Phenacetin)	-	100	100	100	99	94		-	98	99	96	95	91	
2B6 (Bupropion)	-	83[a]	93[a]	95	100	95		-	90	96	93	92	87	
2C8 (Paclitaxel)	-	100	100	97	96	100		-	94	100	100	100	97	
2C9 (Diclofenac)	-	100	97	92	84	88[a]		-	98	100	100	100	80	
2C19 (S-Mephenytoin)	-	98	100	98[a]	98	100		-	87	90	90	82	100[a]	
2D6 (Bufuralol)	-	96	97	93	94	95		-	97	100	100	97	94	
2E1 (Chlorzoxazone)	-	96	98	97	96	95		-	100	98	95	99	96	
3A4 (Midazolam)	-	100	100	100	100	100		-	95	94	98	95	92	
3A4 (Testosterone)	-	96	100	100	100	100		-	89	100	100	100	100	
Study Report Number / CTD No.: [redacted]/21 / 4.2.2.4-12														

a. Mean (n=2)

2.6.5.13 薬物動態試験：排泄（その１）

被験物質：リナクロチド

Study Number: MDP-103-033					***Report Number / CTD No.:*** MDP-103-033-BAR-02/4.2.2.5-1	
Species	***Number / Gender***	***Feeding Condition***	***Vehicle and Formulation***	***Method of Administration***	***Dose (mg/kg)***	***Assay***
Sprague-Dawley Rat	3 F	Fasted	20 mmol/L Tris-HCl Solution	po	10	RIA (Linaclotide) LC-MS/MS (MM-419447)

	Active Peptide Recovered in Feces (ng)					
	Time					
Active Peptide	0 h-4 h	4 h-10 h	10 h-24 h	24 h-36 h	36 h-55 h	**Total (% of dose)**
Linaclotide	183	260	219	23.9	63.4	**0.04%**
MM-419447[a]	14,300	810	933	321	899	**0.95%**

Study Number: MCP-103-103				***Report Number / CTD No.:*** MCP-103-103/5.3.1.1-1(参)	
Species	***Vehicle and Formulation***	***Method of Administration***	***Dose***	***Assay***	
Human	Capsule	po	0.29 mg × 7 days	LC-MS/MS	

	Active Peptide Recovered in Stools (ng)			
	Fasted (3 F, 6 M)[b]		***Fed (9 M)[c]***	
Active Peptide	***Day 7***	***Total (% of dose)***	***Day 7***	***Total (% of dose)***
Linaclotide	NC	NC	NC	NC
MM-419447	13100	5%	8350	3%

a. The feces from only one of the three dosed animals were analyzed for the metabolite (MM-419447).
b. Two of the nine subjects did not produce a stool on the seventh day of dosing and were therefore not included in the stool recovery calculations.
c. One of the nine subjects did not produce a stool on the seventh day of dosing and was therefore not included in the stool recovery calculations. The concentration of any sample (2/8) measuring below the quantitation limit for MM-419447 (30 ng/g) was treated as 0 ng/g for the stool recovery calculations.

NC : Not calculated due to lack of measurable stool concentrations

2.6.5.13 薬物動態試験：排泄（その２）

被験物質：リナクロチド

Study Number: MNP-103-042												***Report Number / CTD No. :*** MNP-103-042-PKR-02/4.2.2.5-2	
Species		***Number / Gender (per group)***		***Feeding Condition***		***Vehicle and Formulation***		***Method of Administration***		***Dose (mg/kg)***		***Assay***	
Sprague-Dawley Rat		10 M		Non-Fasted		PBS Solution		iv		1		LC-MS/MS	
	Linaclotide Plasma Concentration (ng/mL)												
	Time (h)											***CL_s[a] (mL/h/kg)***	***$t_{1/2}$ (h)***
Dose Group	***0.083***	***0.25***	***0.5***	***1***	***2***	***3***	***4***	***6***	***8***	***12***	***24***		
Normal	2230	1620	969	453	169	30.7	20.3	2.27	2.02	< 1.00	< 1.00	627	1.15
Functionally Nephrectomized	3910	2590	2820	2420	2190	1860	1800	1280	1350	846	506	28	11.14
	MM-419447 Plasma Concentration (ng/mL)												
	Time (h)											***CL_s[a] (mL/h/kg)***	***$t_{1/2}$ (h)***
Dose Group	***0.083***	***0.25***	***0.5***	***1***	***2***	***3***	***4***	***6***	***8***	***12***	***24***		
Normal	5.18	2.91	41.1	< 2.00	30.8	< 2.00	5.69	< 2.00	< 2.00	< 2.00	< 2.00	NC	1.20
Functionally Nephrectomized	2.59	2.91	15.2	11.9	43.7	26.4	52.7	29.8	50.9	26.8	31.7	NC	37.4

a. Systemic clearance

NC : Not calculated

2.6.5.14 薬物動態試験：排泄・胆汁中

被験物質：リナクロチド

Study Number: MNP-103-042[a]				***Report Number / CTD No.:*** MNP-103-042-PKR-02/4.2.2.5-2		
Species	***Number / Gender***	***Condition***	***Vehicle and Formulation***	***Method of Administration***	***Dose (mg/kg)***	***Assay***
Sprague-Dawley Rat	10 M	Non-Fasted	10 mmol/L PBS Suspension	iv	1	LC-MS/MS

Urine Excretion (ng/h)			***Bile concentration[b] (ng/mL)***		
Time (h)	***Linaclotide***	***MM-419447***	***Time (h)***	***Linaclotide***	***MM-419447***
0-2	21900	58	0	368	< 10.0
2-4	6200	59	0.5	1140	48
4-6	1060	8	1	909	31
6-8	635	53	2	295	10
8-10	173	21	4	73	< 10.0
10-12	472	6	6	39	< 10.0
12-14	118	4	8	38	36
14-16	127	6	12	< 25.0	< 10.0
16-18	134	3	18	< 25.0	< 10.0
18-20	97	3	24	< 25.0	< 10.0
20-22	36	3			
22-24	9	2			

a. Although this study involved normal and functionally nephrectomized rats, bile and urine excretion data were obtained only from normal rats.
b. Bile was collected from five of the ten intravenously dosed animals per time point.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用

該当する試験は実施していない。

2.6.5.16 薬物動態試験：その他（その１）

2.6.5.16.1 製剤中の分解生成物の吸収：単回投与

被験物質：MM-447619

Study Number: MDP-103-074		***Report Numbers/CTD No.:*** MDP-103-074-PKR-01/4.2.2.7-1					
Species	***Number & Gender***[a]	***Feeding Condition***	***Vehicle and Formulation***	***Dose (mg/kg)***			
Sprague-Dawley Rat	3 F / Group	Fasted	PBS Solution	10			
Cohorts	***Method of Administration***	***Schedule of blood collection (h)***					
Group 1A	iv	0	0.08	0.67	1.5	4	8
Group 2A	iv	0.03	0.33	1	3	6	24
Group 1B	po	0	0.08	0.67	1.5	4	8
Group 2B	po	0.03	0.33	1	3	6	24

Parameters[a]					
Method of Administration	AUC_{inf} ***(ng·h/mL)***	C_0 ***(ng/mL)***	CL_s[b] ***(mL/h/kg)***	V_d[c] ***(mL/kg)***	$t_{1/2}$ ***(h)***
iv	40300	79800	248	279	0.779
	AUC_{inf} ***(ng·h/mL)***	C_{max} ***(ng/mL)***	t_{max} ***(h)***	***F (%)***	
po	43.5	22.1	0.33	0.108	

a. PK parameters were estimated using sparse sampling method.

b. Systemic clearance

c. Volume of distribution

2.6.5.16 薬物動態試験：その他（その２）

2.6.5.16.2 製剤中の分解生成物の吸収：単回投与

被験物質：MM-448623

Study Number: MDP-103-077		***Report Numbers/CTD No.:*** MDP-103-077-PKR-01/4.2.2.7-2					
Species	***Number & Gender***[a]	***Feeding Condition***	***Vehicle and Formulation***	***Dose (mg/kg)***			
Sprague-Dawley Rat	3 F / Group	Fasted	PBS Solution	10			
Cohorts	***Method of Administration***	***Schedule of blood collection (h)***					
Group 1A	iv	0	0.08	0.67	1.5	4	8
Group 2A	iv	0.03	0.33	1	3	6	24
Group 1B	po	0	0.08	0.67	1.5	4	8
Group 2B	po	0.03	0.33	1	3	6	24

Parameters[a]

Method of Administration	***AUC_{inf} (ng·h/mL)***	***C_0 (ng/mL)***	***CL_s*** [b] ***(mL/h/kg)***	***V_d*** [c] ***(mL/kg)***	***$t_{1/2}$ (h)***
iv	17900	39300	447	642	0.996
	AUC_{inf} (ng·h/mL)	***C_{max} (ng/mL)***	***t_{max} (h)***	***F (%)***	
po	9.59	5.62	0.08	0.0536	

a. PK parameters were estimated using sparse sampling method.

b. Systemic clearance

c. Volume of distribution

2.6.5.16 薬物動態試験：その他（その３）

2.6.5.16.3 製剤中の分解生成物の代謝：*in vitro*

被験物質：リナクロチド，MM-447619 及び MM-448623

Study Number: MDP-103-078			***Report Numbers/CTD No.:*** MDP-103-078-IAR-01/4.2.2.7-3					
Assay Buffer		Simulated Gastric Fluid		***Assay Temperature***		37 °C		
	% of Remaining							
Test Article	Linaclotide				MM-447619		MM-448623	
Time (min)	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Replicate 4	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 1	Replicate 2
0	100	100	ND[a]	100	100	100	100	100
5	105	98	88	94	95	98	101	101
15	105	98	93	94	96	99	105	105
45	108	106	91	96	96	99	99	101
60	115	109	94	94	91	91	100	103
90	112	115	93	91	89	87	101	97
120	109	112	96	90	90	88	102	105

Study Number: MDP-103-070			***Report Numbers/CTD No.***: MDP-103-070-IAR-01/4.2.2.7-4					
Assay Buffer		Rat Intestinal Fluid		***Assay Temperature***		37 °C		
	% of Remaining							
Test Article	Linaclotide			MM-447619			MM-448623	
Time (h)	Replicate 1	Replicate 2	Control (PBS)	Replicate 1	Replicate 2	Control (PBS)	Replicate 1	Replicate 2	Control (PBS)
0	100	100	ND[a]	100	100	100	100	100	100
0.5	1.5	2.0	100	42.6	45.4	102	39.6	58.7	111
1	0.2	0.5	101	28.0	26.8	101	20.8	19.3	106
2	0.0	0.0	98	2.0	1.6	101	0.0	0.0	101
3	0.0	0.0	103	0.2	0.0	101	0.0	0.0	103
8	0.2	0.0	96	0.0	0.0	101	0.0	0.0	102
24	0.0	0.0	100	0.0	0.0	101	0.0	0.0	106

a. Not determined due to a missed injection by autosampler.

2.6.5.16 薬物動態試験：その他（その４）

2.6.5.16.4 原薬中不純物の代謝：*in vitro*

被験物質：リナクロチド

Study Number: MDP-103-055		***Report Numbers/CTD No.:*** MDP-103-055-IAR-01/4.2.2.7-5					
Assay Buffer		Rat Intestinal Fluid		***Assay Temperature***		37 ℃	
Substance	Linaclotide [redacted]		類縁物質１＊		類縁物質１＊		
Extracted Ion (m/z)	1526.41		[redacted]		[redacted]		
Time (min)	***Peak Area***	***% of Remainig***[a]	***Peak Area***	***% of Remainig***[a]	***Peak Area***	***% of Remainig***[a]	
0	145250551	100	32903561	100	9270488	100	
5	95584295	66	21585573	66	5621684	61	
30	58320813	40	10073709	31	1825698	20	
60	42958808	30	5861984	18	305699	3	

a % of Remaining = (Peak Area at x min) / (Peak Area at 0 min) × 100, x = 0, 5, 30 or 60

＊：新薬承認情報提供時に置き換えた。