

オゼンピック皮下注 2mg

2.6.1 緒言

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

	ページ
目次	2
図目次	2
略語一覧	3

図目次

	ページ
図 2.6-1 セマグルチドの構造	5

略語一覧

Ado	8-amino-3,6-dioxaoctanic acid (8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸)
AUC	: Area under the concentration-time curve (濃度－時間推移曲線下面積)
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate (環状アデノシンーリン酸)
CAS	: Chemical Abstracts Service
DNA	Deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
DPP-4	: Dipeptidyl-peptidase 4
GLP	: Good laboratory practice (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準)
GLP-1	: Glucagon like peptide-1 (グルカゴン様ペプチド-1)
ICH	: International Conference on Harmonisation (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development (経済協力開発機構)

セマグルチドは、週 1 回皮下投与を目的とし開発したヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) アナログであり、以下の効能・効果取得を目的としている：

効能又は効果：2 型糖尿病

用法及び用量：通常、成人には、セマグルチド（遺伝子組換え）として、週 1 回 0.5 mg を維持用量とし、皮下注射する。ただし、週 1 回 0.25 mg から開始し、4 週間投与した後、週 1 回 0.5 mg に増量する。なお、患者の状態に応じて適宜増減するが、週 1 回 0.5 mg を 4 週間以上投与しても効果不十分な場合には、週 1 回 1.0 mg まで増量することができる。

セマグルチドは GLP-1 受容体と特異的に結合し活性化することにより、細胞内の環状アデノシンリン酸（cAMP）濃度を増加させる。セマグルチドはグルコース濃度依存的にインスリン分泌を亢進しグルカゴン分泌を抑制する。したがって、高血糖時にはインスリン分泌を亢進し、グルカゴン分泌を抑制する。一方、低血糖時にはセマグルチドはインスリン分泌を亢進させず、グルカゴン分泌を抑制しない。セマグルチドは摂餌量減少を介して体重及び体脂肪容積を減少させる。この作用メカニズムには、満腹感の増強及び空腹感の減退からなる総合的な食欲減退、ならびに、摂食調節の改善及び食事嗜好性に対する影響が関与している。更に、セマグルチドは動物モデルにおいて有益な抗動脈硬化作用及び抗炎症作用を示した。

セマグルチドはクリアランスが低下させるよう設計されており、それによりヒトにおける消失半減期が 1 週間に延長され、週 1 回投与に適したものとなっている。作用持続化の基本的なメカニズムはペプチド骨格の第 26 位のリジンに親水性リンカーを介して脂肪酸を附加することによるアルブミン結合親和性の増強である。さらに、DPP-4 酵素による分解を抑制するため、ペプチド骨格の第 8 位をアラニンから 2-アミノイソブチル酸に改変している。セマグルチドの構造を [図 2.6-1](#) に示す。

セマグルチドのペプチド骨格を *Saccharomyces cerevisiae* 種による遺伝子組換え DNA 技術により製造し、その後、脂肪酸、ならびに、グルタミン酸及び 8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（Ado）2 分子からなる親水性リンカーを附加した。セマグルチドの他に、製剤中にはリン酸二水素ナトリウム、プロピレングリコール、フェノール及び注射用水が含まれている。また、pH を 7.4 に調節するよう HCl 及び NaOH を使用した。

「セマグルチド」は化合物の国際一般名（INN）であり、一般名決定前は「NNC0113-0217」及び「NNC0113-0000-0217」といった化合物コードを用いていた。セマグルチドの CAS 登録番号は「RN910463-68-2」、分子式は「C₁₈₇H₂₉₁N₄₅O₅₉」、分子量は 4113.6 Da、化学名は Nε26 [(S)-(22,40-dicarboxy-10,19,24-trioxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18,23-triazatetracontan-1-oyl)] [Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) ペプチド」である。

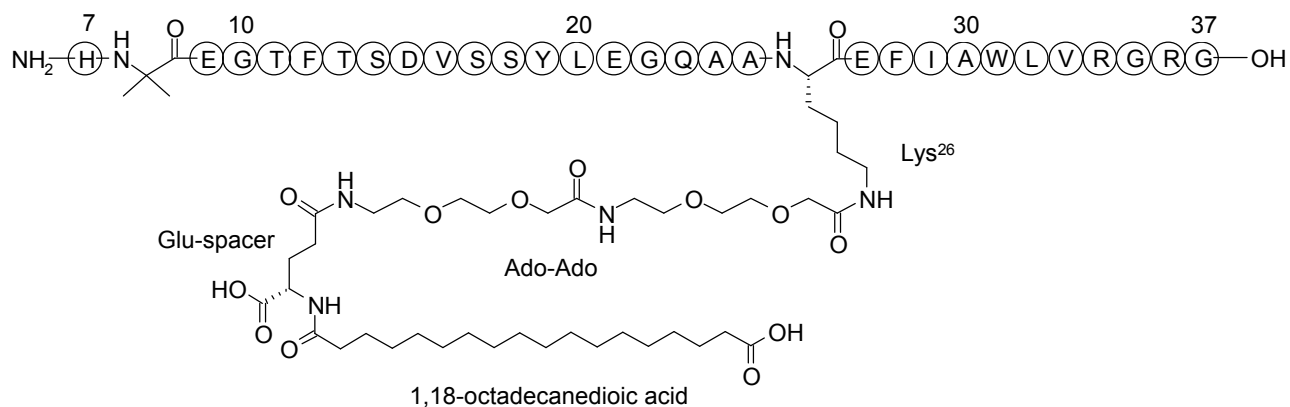


図 2.6-1 セマグルチドの構造

セマグルチドの非臨床安全性試験プログラムは、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン ICH M3「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」及び ICH S6「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に準拠し計画した。

すべての重要な非臨床安全性試験は、経済協力開発機構（OECD）加盟国の「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（GLP）の原則に準拠し、OECD 加盟国又は OECD GLP データ相互受入（Mutual Acceptance of Data: MAD）制度参加国において実施した。

オゼンピック皮下注 2mg

2.6.2 薬理試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

	ページ
目次	2
図目次	4
表目次	5
略語一覧	6
2.6.2.1 まとめ	8
2.6.2.2 効力を裏付ける試験	9
2.6.2.2.1 <i>in vitro</i> 薬効薬理	9
2.6.2.2.1.1 ヒト GLP-1 受容体に対する機能試験及び結合試験 (Module 2.6.3.2, Alal15468-086)	9
2.6.2.2.1.2 摘出灌流ラット膵臓からのインスリン分泌 (Module 2.6.3.2, JStu050701)	11
2.6.2.2.2 <i>in vivo</i> 薬効薬理	13
2.6.2.2.2.1 グルコースインフュージョンを実施した正常ラットにおける血糖降下作用 (Module 2.6.3.2, JStu051101)	13
2.6.2.2.2.2 db/db マウスの血糖及び正常マウスの摂餌量に対する効果 (Module 2.6.3.2, DXG050301-0113)	15
2.6.2.2.2.3 db/db マウスにおける体重、摂餌量、血糖及び β 細胞容積ならびに機能への影響 (Module 2.6.3.2, MmLa070620)	18
2.6.2.2.2.4 ミニブタのインスリン分泌に及ぼす薬理作用持続時間の検討 (Module 2.6.3.2, BidR050301)	26
2.6.2.3 副次的薬理試験	27
2.6.2.3.1 肥満ラットにおける体重、摂餌量及び食餌嗜好性に及ぼす影響 (Module 2.6.3.3, KiRa080803)	28
2.6.2.3.2 げっ歯類の脳へのセマグルチドの到達性 (Module 2.6.3.3, JHES151201)	32
2.6.2.3.3 DIO マウスにおける視床下部の食欲シグナルに対する作用 (Module 2.6.3.3, JCFJ151203)	37
2.6.2.3.4 LDL 受容体ノックアウトマウスにおけるアテローム性動脈硬化に及ぼす効果 (Module 2.6.3.3, GuRa150803)	41
2.6.2.3.5 セマグルチドを投与した ApoE KO マウスにおけるアテローム性動脈硬化症に及ぼす効果 (Module 2.6.3.3, BidR150901)	44
2.6.2.3.6 若齢未成熟 LYD ブタの摂餌量に及ぼす効果 (Module 2.6.3.3, MmLa050901)	46
2.6.2.4 安全性薬理試験	48
2.6.2.4.1 中枢神経系 (CNS) に及ぼす影響	49

2.6.2.4.1.1	ラットを用いた Irwin 試験 (Module 2.6.3.4, 206443)	49
2.6.2.4.2	呼吸器系に及ぼす影響	50
2.6.2.4.2.1	ラットを用いた呼吸器系に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206518)	50
2.6.2.4.3	心血管系に及ぼす影響	50
2.6.2.4.3.1	心臓カリウムチャネル (hERG) 阻害誘発性試験 (Module 2.6.3.4, 206446)	50
2.6.2.4.3.2	活動電位持続時間 (APD) に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206445)	50
2.6.2.4.3.3	覚醒カニクイザルを用いたテレメトリー計測による心血管系評価項目に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206442)	51
2.6.2.4.3.4	カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験における ECG 評価 (Module 2.6.7.7.H, 207288)	52
2.6.2.4.4	腎機能に及ぼす影響	52
2.6.2.4.4.1	ラットを用いた腎機能に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206444)	52
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験	53
2.6.2.6	考察及び結論	54
参考文献		56

図目次

	ページ
図 2.6.2-1	摘出ラット膵臓のインスリン分泌応答 12
図 2.6.2-2	セマグルチド濃度の増加に反応して分泌された総インスリンの用量反応曲線 12
図 2.6.2-3	グルコース投与 (bolus) 後 10 分及びセマグルチド (左図) 又はリラグルチド (右図) 投与後 190 分の血漿中インスリン濃度 14
図 2.6.2-4	グルコース投与 (bolus) 後 60 分及びセマグルチド (左図) 又はリラグルチド (右図) 投与後 240 分の血糖値 14
図 2.6.2-5	セマグルチド (上図) 及びリラグルチド (下図) を単回投与した db/db マウスの Δ 血糖値 16
図 2.6.2-6	セマグルチド (上図) 及びリラグルチド (下図) を単回投与した db/db マウスの Δ 体重値 17
図 2.6.2-7	セマグルチド及びリラグルチド単回皮下投与時 (10 又は 30 nmol/kg) の摂餌量に及ぼす効果 18
図 2.6.2-8	db/db マウスの摂餌量 21
図 2.6.2-9	db/db マウスのベースラインからの体重変化 21
図 2.6.2-10	db/db マウスの脂肪容積変化 (投与後 23 日) 22
図 2.6.2-11	db/db マウスの 24 時間血糖プロファイル [第 1 日 (上図) 及び第 15 日 (下図)] 22
図 2.6.2-12	db/db マウスの HbA1c 値 (ベースライン補正後) 23
図 2.6.2-13	db/db マウスの血漿中インスリン濃度 (投与後 26~28 日) 24
図 2.6.2-14	db/db マウスの ALT 値 (投与後 26~28 日) 24
図 2.6.2-15	db/db マウスの β 細胞容積 (投与後 26~28 日) 25
図 2.6.2-16	db/db マウス (n=8) の膵島数 (左図) 及びグルコース誘発インスリン分泌 (右図) (投与後 27~28 日) 25
図 2.6.2-17	セマグルチド皮下投与後の高血糖クランプ時のグルコース注入量 27
図 2.6.2-18	セマグルチド皮下投与後の高血糖クランプ時のミニプタ血漿中インスリン AUC 27
図 2.6.2-19	試験前及び試験期間中の DIO ラットの体重 30
図 2.6.2-20	DIO ラットの標準飼料及びチョコレート摂餌量 (kcal) (1 日 1 回投与 77 日後) 31
図 2.6.2-21	相対体脂肪容積変化及び除脂肪容積変化 (%) (1 日 1 回投与 77 日後) 31
図 2.6.2-22	Alexa594-セマグルチドと CART 陽性ニューロンの共局在 34
図 2.6.2-23	マウス脳における VivoTag750-セマグルチドの分布 35
図 2.6.2-24	NPY/AgRP ニューロンにおけるセマグルチドの作用 36
図 2.6.2-25	DIO マウスの体重に及ぼすセマグルチドの効果 38
図 2.6.2-26	DIO マウスの摂餌量に及ぼすセマグルチドの効果 38

図 2.6.2-27	DIO マウスにおける ARC (左図) 及び PVN (右図) の CART mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用	39
図 2.6.2-28	DIO マウスにおける ARC (左図) 及び PVN (右図) の POMC mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用	39
図 2.6.2-29	DIO マウスにおける ARC (左図) 及び PVN (右図) の AgRP mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用	40
図 2.6.2-30	DIO マウスにおける ARC (左図) 及び PVN (右図) の NPY mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用	40
図 2.6.2-31	LDLr ^{-/-} マウスにおけるセマグルチド投与後の大動脈プラーク病変	42
図 2.6.2-32	ApoE KO マウスにおけるセマグルチド投与後の大動脈弓プラーク面積	45
図 2.6.2-33	セマグルチド単回皮下投与時のブタにおける摂餌量	47
図 2.6.2-34	セマグルチド反復皮下投与時のブタにおける摂餌量	48

表目次

	ページ
表 2.6.2-1	GLP-1 及び GLP-1 アナログの GLP-1 受容体に対する効力及び結合親和性..... 11
表 2.6.2-2	試験群の概要 (MmLa070620) 19
表 2.6.2-3	DIO ラットにおける体重及び体重変化 (投与後 77 日) 30
表 2.6.2-4	最終投与約 24 時間後 (第 78 又は 79 日) に採取した血液、血清及び血漿中分析結果..... 32
表 2.6.2-5	セマグルチドの安全性薬理試験における曝露量比及び無影響量..... 49

略語一覧

AgRP	: Agouti-related peptide (アグーチ関連ペプチド)
ALT	: Alanine aminotransferase (アラニンアミノトランスフェラーゼ)
ANOVA	: Analysis of variance (分散分析)
AP	: Area postrema (最後野)
APD	: Action potential duration (活動電位持続時間)
APD60	: APD for 60% repolarization (60%再分極時活動電位持続時間)
APD90	: APD for 90% repolarization (90%再分極時活動電位持続時間)
ApoE	: Apolipoprotein E (アポリポタンパク E)
ARC	: Arcuate nucleus (弓状核)
AST	: Aspartate aminotransferase (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)
AUC	: Area under the concentration-time curve (濃度-時間曲線下面積)
BBB	: Blood brain barrier (脳血管関門)
BHK	: Baby hamster kidney (仔ハムスター腎)
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate (環状アデノシンーリン酸)
C _{avg}	: Average concentration observed (平均濃度)
cDNA	: Complementary deoxyribonucleic acid (相補的デオキシリボ核酸)
CART	: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (コカイン・アンフェタミン調節転写産物)
CNS	: Central nervous system (中枢神経系)
C _{max}	: Maximum concentration observed (最高濃度)
Cq	: Cycle of quantification (サイクル数)
CVO	: Circumventricular organ (脳室周囲器官)
DIO	: Diet induced obese (食餌誘発性肥満)
EC ₅₀	: Effective concentration 50% (50%有効濃度)
ECG	: Electrocardiogram (心電図)
ED ₅₀	: Effective dose 50% (50%有効量)
EGFP	: Enhanced green fluorescence protein (強化緑色蛍光タンパク質)
FFA	: Free fatty acids (遊離脂肪酸)
GFP	: Green fluorescent protein (緑色蛍光タンパク質)
GLP	: Good laboratory practice (医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準)
GLP-1	: Glucagon like peptide-1 (グルカゴン様ペプチド-1)
HEK293	: Human embryonal kidney cells (ヒト胚性腎細胞)
hERG	: Human <i>ether-a-go-go</i> related gene (hERG 遺伝子)
HDL	: High density lipoprotein (高密度リポタンパク質)
HKG	: Housekeeping genes (ハウスキーピング遺伝子)
hrGFP	: Humanized Renilla green fluorescence protein (ヒト化 Renilla 緑色蛍光タンパク質)
HSA	: Human serum albumin (ヒト血清アルブミン)
IC ₅₀	: Inhibitory concentration 50% (50%阻害濃度)
ICH	: International conference on harmonisation (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
IL-6	: Interleukin-6 (インターロイキン-6)
i.v.	: Intravenous (静脈内)
KO	: Knock out (ノックアウト)
LCM	: Laser capture microdissection (レーザーキャプチャーマイクロダイセクション)

LDL	: Low density lipoprotein (低密度リポタンパク質)
LDLr	: Low density lipoprotein receptor (低密度リポタンパク質受容体)
LS	: Lateral septal nuclei (外側中隔核)
LYD	: Landrace, Yorkshire and Duroc (ランドレース・ヨークシャー・デュロック)
MACE	: Major adverse cardiovascular event (主要な心血管イベント)
ME	: Median eminence (正中隆起)
MRD	: Maximal diastolic potential (最大脱分極速度)
mRNA	: Messenger ribonucleic acid (メッセンジャーRNA)
NOAEL	: No observed adverse effect level (無毒性量)
NNC	: Novo Nordisk compound (ノボ ノルディスク社の化合物コード記号)
NNC-0090-1170	: Liraglutide (リラグルチドの化合物コード番号)
NNC 0113-0217	: Semaglutide (セマグルチドの化合物コード番号)
NPY	: Neuropeptide Y (ニューロペプチド Y)
NTC	: Nucleus tractus solitarius (孤束核)
PCR	: Polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PO	: Preoptic nucleus (視索前核)
POMC	: Pro-opiomelanocortin (プロオピオメラノコルチン)
PVN	: Paraventricular hypothalamic nucleus (室傍核)
qPCR	: Quantitative polymerase chain reaction (定量 PCR)
RMP	: Resting membrane potential (静止膜電位)
RNA	: Ribonucleic acid (リボ核酸)
s.c.	: Subcutaneous (皮下)
SEM	: Standard error of the mean (標準誤差)
SD	: Standard deviation (標準偏差)
SFi	: Septofimbrial nucleus (中隔核)
SFO	: Subfornical organ (脳弓下器官)
SPA	: Scintillation proximity assay (シンチレーション近接アッセイ)
SPIM	: Single plane illumination microscopy (単一面照明顕微鏡)
TG	: Triglycerides (トリグリセリド)
t _{max}	: Time at which the highest concentration occurs (最高濃度到達時間)
UA	: Unstable angina (不安定狭心症)
VLDL	: Very low-density lipoprotein (超低密度リポタンパク質)
VOLT	: Vascular organ of the terminal field (終板血管器官)
WD	: Western diet (ウェスタンダイエット)
10N	: Dorsal motor nucleus of vagus (迷走神経背側運動核)

2.6.2.1 まとめ

セマグルチドは、皮下への週 1 回投与を目的として設計した、ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) アナログである。薬効薬理試験は *in vitro*、ならびに糖尿病マウス、正常ラット、肥満ラット、正常ブタ及び正常ミニブタを用いた *in vivo* で実施した。セマグルチドは GLP-1 受容体作動薬の薬理学的特性を有し、血糖及び体重降下薬として特異的かつ効力が期待できる開発候補品であることがこれらの試験により示された。血糖降下の作用機序にはインスリン分泌促進が関与している。体重減少用の作用機序にはエネルギー摂取の減少が関与しており、食餌の選択が可能な場合セマグルチドはチョコレートの摂取を選択的に減少させた。セマグルチドはげっ歯類の脳に作用し、食欲を抑制する神経細胞が活性化される一方で食欲を亢進する神経細胞が阻害され、満腹シグナルが増強し空腹シグナルが減弱する。

内因性 GLP-1 及び GLP-1 受容体作動薬が心血管系及び微小血管系に対して有益な作用を有する可能性が、多くの非臨床文献で支持されている。本資料には、動物モデルにおいて有益であったセマグルチドの抗動脈硬化作用及び抗炎症作用に関する試験結果も記載した。

安全性薬理試験は、セマグルチドの生命維持器官〔中枢神経系 (CNS)、心血管系及び呼吸器系〕に対する影響を検討するよう設計した。更に、GLP-1 受容体作動薬の利尿作用がラットで知られていることから腎機能に関する試験も実施した。*in vivo* 試験は Sprague Dawley (SD) 系ラット及びテレメーター装着非拘束覚醒カニクイザルへの皮下投与により実施した。これらの試験において、セマグルチドに対する良好な忍容性が示され、ラットでは活動性低下及び急性期の利尿作用といった既知の GLP-1 受容体を介した影響のみが認められた。サルでは、心血管系機能に急性期の有害な影響は認められなかった。*in vitro* で心イオンチャネルに対する影響は、ヒト ether-a-go-go related gene (hERG) 遺伝子相補的デオキシリボ核酸 (cDNA) を安定的に導入したヒト胚性腎細胞 (HEK293) 及び摘出ウサギブルキンエ繊維を用いて検討したが、これらの試験においてセマグルチド処置による影響は認められなかった。

また、カニクイザル反復投与毒性試験において、心臓の電気生理を心電図 (ECG) で観察した。週 2 回投与による 52 週間反復投与毒性試験では、高用量群〔濃度－時間曲線下面積 (AUC) 比に基づく、日本人に対する最大臨床用量である 1 mg/週の 22 倍高い曝露量に相当〕の雌 1 頭で連続性の左脚ブロック波形が認められた。当該動物の一般状態に対する影響は認められなかったが、投与との関連性は否定できなかった。したがって、本試験における無毒性量 (NOAEL) は中間用量であると考えられ、AUC 比に基づく日本人最大臨床用量の 3.6 倍高い曝露量に相当する。

セマグルチドの薬理学的特性を検討するために実施した試験の概要表は Module 2.6.3 に示した。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

GLP-1 の生理学及び薬理学に関しては広範な文献報告が存在する^{1,2}。哺乳類では GLP-1 のアミノ酸配列の保存性が高く、その受容体は GLP-1 受容体のみが同定されている³。GLP-1 受容体は G タンパク質共役受容体クラス B に分類される。哺乳類では GLP-1 受容体の動物種間相同性が高く、ラットとヒトで 90%、サルとヒトで 99% の相同性を有する⁴。GLP-1 の細胞作用は G タンパク質及びアデニル酸シクラーゼを介した環状アデノシンーリン酸 (cAMP) の蓄積によるものである³。

GLP-1 受容体作動薬の主要な標的組織は膵臓 (β 細胞)、胃腸系及び脳である。膵 β 細胞機能に対する重要な作用は、血糖依存的なインスリン分泌、インスリン合成の促進、グルコキナーゼ及びグルコーストランスポーターの生合成の発現亢進である。また、膵臓を介した重要な作用としてグルカゴン分泌の減少があり、肝臓からのグルコース放出が抑制される。セマグルチドの *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験では、受容体特異性、効力、効果及び作用持続時間を検討することを目的に設計した。薬効薬理試験のいくつかでは、1 日 1 回投与による 2 型糖尿病治療 (ビクトーザ®) 及び体重管理 (Saxenda®、本邦では未承認) の効能を取得しているノボ ノルディスク社の GLP-1 アナログであるリラグルチドを対照薬として用いた。

2.6.2.2.1 *in vitro* 薬効薬理

2.6.2.2.1.1 ヒト GLP-1 受容体に対する機能試験及び結合試験 (Module 2.6.3.2, Alal15468-086)

[目的]

ヒト GLP-1 受容体に対する機能試験及び結合試験により、セマグルチドの *in vitro* 薬理学的受容体作用の特性解析を行った。また、セマグルチドのアルブミン結合を検討した。

[試験方法]

ヒト GLP-1 受容体を高度に安定的に発現させた仔ハムスター腎 (BHK) 細胞をノボ ノルディスク社で作成した。形質膜を精製し、機能試験では 20 mmol/L Na-HEPES, 0.1 mmol/L EDTA (pH=7.4) 緩衝液、結合試験では 50 mmol/L HEPES, 5 mmol/L EGTA, 5 mmol/L MgCl₂, 0.005% Tween 20 (pH=7.4) 緩衝液に懸濁し、それぞれ試験に供した。以降に示す投与量は、天然型 GLP-1 [GLP-1(7-37)OH] 3298.7、リラグルチド 3751.2、セマグルチド 4113.6 で換算し、物質質量と質量を併記した。受容体機能試験では、受容体へのペプチド結合による cAMP 産生亢進を AlphaScreen™ cAMP technology (Perkin Elmer Life Sciences 社、米国) により測定した。本測定の原理は、アクセプタービーズに結合している抗 cAMP 特異抗体に対する内因性 cAMP 及びトレーサーであるビオチン結合 cAMP の競合的結合を利用した免疫学的測定法である。アクセプタービーズとストレプトアビジンドナービーズがビオチン化 cAMP との結合を介して近接し、ドナービーズを励起させるとアクセプタービーズが発光する。シグナル産生量

はアクセプタービーズに結合したビオチン結合 cAMP 量に比例し、内因性 cAMP 産生量に比例して減少する。cAMP 産生量はマイクロプレートアナライザーで測定・計測する。セマグルチド、リラグルチド及び対照として GLP-1 (7-37) OH を各種濃度で処置し測定した結果から、Graph-Pad Prism (GraphPad Software Inc.社、米国) を用いて 50%有効濃度 (EC_{50}) を算出した。

結合試験では、形質膜を 0.2 mg/mL のタンパク質濃度となるよう測定用緩衝液で希釈し、マイクロプレートに分注した。形質膜を、シンチレーション近接アッセイ (SPA) ビーズ (0.5 mg/well)、 ^{125}I 標識 GLP-1 ($[^{125}I]GLP-1$) (0.05 nmol/L)、各希釈段階の非標識セマグルチド又はリラグルチド、ならびにヒト血清アルブミン (HSA、0.005%又は2%) と 30°C でインキュベートし、 $[^{125}I]GLP-1$ 結合の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を Graph Pad Prism で算出した。

[結果]

ヒト GLP-1 受容体活性化を、cAMP 放出量を指標とし測定した結果、セマグルチド [平均 EC_{50} : 0.15 ± 0.062 nmol/L (0.62 ± 0.26 μ g/L)] とリラグルチド [EC_{50} : 0.15 ± 0.064 nmol/L (0.56 ± 0.26 μ g/L)] の効力は同程度であるが、GLP-1 [EC_{50} : 0.018 ± 0.014 nmol/L (0.59 ± 0.05 μ g/L)] よりも弱いことが示された。

また、2%HSA 存在下での受容体結合測定結果から、セマグルチド [IC_{50} : 125 ± 83 nmol/L (514 ± 341 μ g/L)] はリラグルチド [IC_{50} : 7.1 ± 3.5 nmol/L (27 ± 13 μ g/L)] よりもアルブミン結合親和性が高く、GLP-1 は HSA と結合しないことが示された。

表 2.6.2-1 GLP-1 及び GLP-1 アナログの GLP-1 受容体に対する効力及び結合親和性

Testing substance	Potency Mean EC ₅₀ ±SD	Binding affinity with albumin Mean IC ₅₀ ±SD	
	In the absence of HSA	In the presence of 0.005% HSA	In the presence of 2% HSA
GLP-1(7-37)OH	0.018 ± 0.014 nmol/L (0.59 ± 0.05 µg/L) (n=6)	0.44 ± 0.18 nmol/L (1.45 ± 0.59 µg/L) (n=11)	0.20 ± 0.064 nmol/L (0.66 ± 0.21 µg/L) (n=11)
Liraglutide	0.15 ± 0.064 nmol/L (0.56 ± 0.26 µg/L) (n=3)	0.25 ± 0.058 nmol/L (0.94 ± 0.22 µg/L) (n=4)	7.1 ± 3.5 nmol/L (27 ± 13 µg/L) (n=4)
Semaglutide	0.15 ± 0.062 nmol/L (0.62 ± 0.26 µg/L) (n=7)	0.95 ± 0.71 nmol/L (3.9 ± 2.9 µg/L) (n=12)	125 ± 83 nmol/L (514 ± 341 µg/L) (n=12)

Molar weights, native GLP-1 (GLP-1 (7-37)OH): 3298.7 g/mole, liraglutide: 3751.2 g/mole, semaglutide: 4113.6 g/mole.

[結論]

BHK 細胞を用いた *in vitro* 試験における cAMP 放出量を指標とすると、セマグルチドはヒト GLP-1 受容体作動薬としての効力を有することが示された。本試験系におけるセマグルチドの効力 (EC₅₀) はリラグルチドと同程度であった。また、セマグルチド及びリラグルチドはアルブミンと結合することが示された。セマグルチドはリラグルチドと比較し、アルブミン添加量の増加に伴う cAMP 放出量の濃度-反応曲線の右方シフトが大きく、アルブミン親和性がより高いことが示された。

2.6.2.2.1.2 摘出灌流ラット膵臓からのインスリン分泌 (Module 2.6.3.2, JStu050701)

[目的]

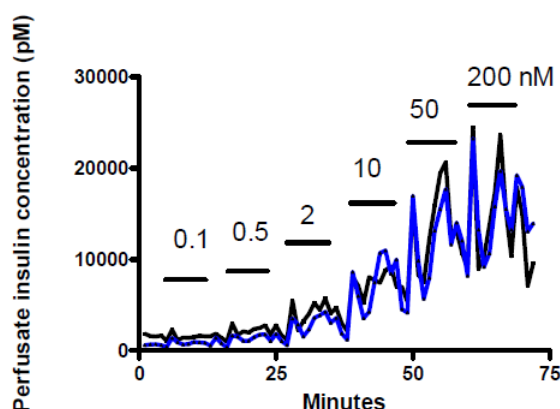
セマグルチド処置濃度と摘出灌流ラット膵臓からのインスリン分泌の関係を検討した。

[試験方法]

2匹の雄性 SD 系ラット（一晩絶食後の体重がそれぞれ 300 及び 325 g）から膵臓を摘出した。アクリル樹脂 (Plexiglass) 製の特注チャンバー中で、ペリスタルティックポンプ (Minipuls 3, Gilson Inc. 社、米国) を用い流速 1.9 mL/分、37°C 条件下で膵臓を灌流した。灌流液には oxygenated HEPES で緩衝した Krebs Ringer 溶液を用い、約 10 mmol/L のグルコースも添加した。セマグルチドを 0.1、0.5、2.0、10.0、50.0 及び 200 nmol/L (0.41、2.1、8.2、41.1、205.7 及び 822.7 µg/L) の各濃度で 8 分間処理し、3 分間の休薬の後、次用量を処理した。流出液を収集し、各 1 分画分で分泌されたインスリン量を、流速 0.0019 L/分に分時間をかけた分画中のインスリン濃度 (pmol/L) として算出した。各刺激に応答して分泌されたインスリン総量を、収集された各関連画分中に分泌されたインスリンの合計として計算した。本手順により作製された濃度反応曲線について、GraphPad Prism によるシグモイド関数を用いた非線形回帰分析により解析した。

[結果]

各膵臓のインスリン濃度曲線を図 2.6.2-1 に示す。高濃度処理に伴いインスリン分泌の増加が認められる。各 8 分間の処理中、第 1 相のインスリン分泌に引き続き第 2 相が識別可能である。ヒルスロープを 1 とした場合、及びヒルスロープ自体をモデルパラメータとした場合の 2 通りでデータをフィッティングした。

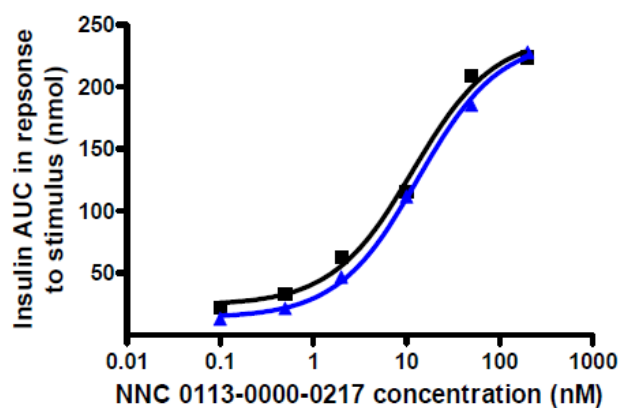


Black and blue line represents individual pancreas

Bars and number indicate periods and concentrations of applications of semaglutide

図 2.6.2-1 摘出ラット膵臓のインスリン分泌応答

セマグルチドの各濃度に応答して分泌された総インスリンの濃度反応曲線を図 2.6.2-2 に示す。



Black and blue line represents individual pancreas

図 2.6.2-2 セマグルチド濃度の増加に応答して分泌された総インスリンの用量反応曲線

ヒルスロープを 1 としたときの EC_{50} は両データセット共に 13 nmol/L (53.5 μ g/L) であった。ヒルスロープ自体をパラメータとして取り扱った場合の EC_{50} はそれぞれ 13 及び 14.5 nmol/L (53.5 及び 59.6 μ g/L) であった。

[結論]

ラット灌流膵臓において、セマグルチドはインスリン分泌を用量依存的に刺激し、グルコース 10 mmol/L で試験時の EC₅₀ は 13 nmol/L 又は 14.5 nmol/L (53.5 µg/L 又は 59.6 µg/L) (n=2) であった。

2.6.2.2.2 *in vivo* 薬効薬理

2.6.2.2.2.1 グルコースインフュージョンを実施した正常ラットにおける血糖降下作用 (Module 2.6.3.2, JStu051101)

[目的]

セマグルチド皮下投与時のグルコース刺激性インスリン分泌促進を検討した。

[試験方法]

雄性 Wistar 系ラット (体重 236~272 g) を一晩絶食させ、各試験につきフェンタニル/フルナゾン及びミダゾラムを用いて麻酔処理した。1、3、10 及び 30 nmol/kg (4.1、12.3、41.1 及び 123.4 µg/kg) の用量のセマグルチド (n=4/用量) 又は溶媒 (145 mmol/L NaCl、50 mmol/L NaPO₄、0.05% Tween 80、pH7.4) (n=8) を投与し、投与時を 0 分とした。インスリン分泌を刺激するため、180 分に 2 mL/kg のグルコース溶液 (500 g/L) を尾静脈に静脈内投与した。

リラグルチドを同様の方法で試験したが、試験溶液中のリラグルチド回収に基づく実際の投与量は 0.6、1.8、6.5 及び 19.5 nmol/kg (2.3、6.8、24.4 及び 60.0 µg/kg) であり、1、3、10 及び 30 nmol/kg (3.8、11.3、37.5 及び 112.5 µg/kg) の目標用量には届かなかった。回収率が低かった理由は明らかでないが、試験溶液調製時のセマグルチド及びリラグルチドの吸着の違いによるものと考えられる。

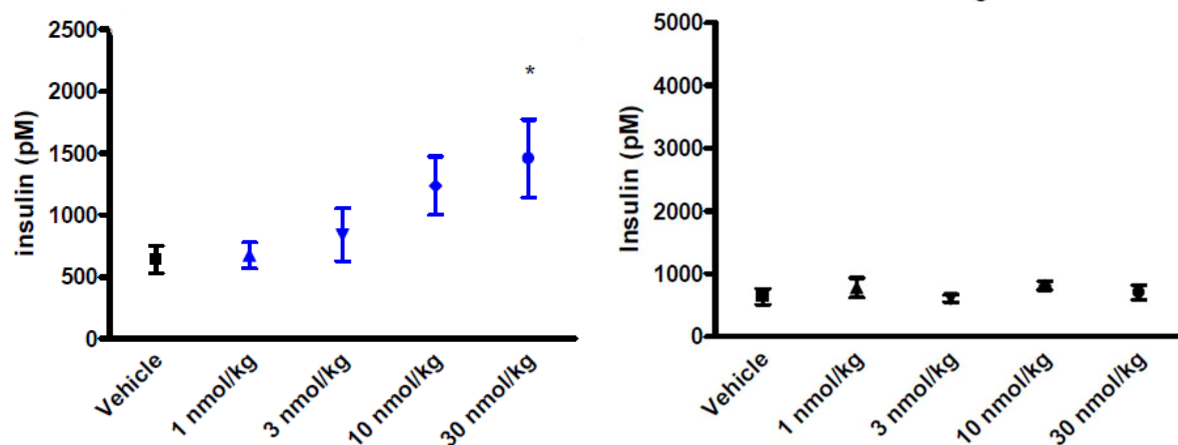
190 分に血漿中セマグルチド濃度又は血漿中インスリン濃度を測定し、240 分に血糖値を測定した。

190 分での血漿中インスリン (対数変換) 及び 240 分での血糖値は一元配置分散分析 (ANOVA) 及び Tukey-Kramer の post hoc 検定により統計学的に評価した。

[結果]

セマグルチド投与によるグルコース刺激性インスリン濃度は、10 nmol/kg (41.1 µg/kg) では上昇傾向が、30 nmol/kg (123.4 µg/kg) では有意な上昇 (対数変換データの ANOVA : p<0.04、Tukey-Kramer の post hoc 検定 : 溶媒に対して p<0.05) が認められたが、リラグルチド投与による有意な効果は示されなかった (図 2.6.2-3)。30 nmol/kg (123.4 µg/kg) のセマグルチドで認められたインスリン濃度の上昇は、グルコースを静脈内投与後 60 分での血糖値の有意な低下 (ANOVA : p<0.04、Tukey-Kramer の post hoc

検定: $p < 0.05$) と関連するものであった。一方、リラグルチドでは血糖値に有意差が認められなかった (図 2.6.2-4)。セマグルチド及びリラグルチドは、いずれも投与後 190 分で血漿中に検出され、血漿中濃度は用量依存的であった。

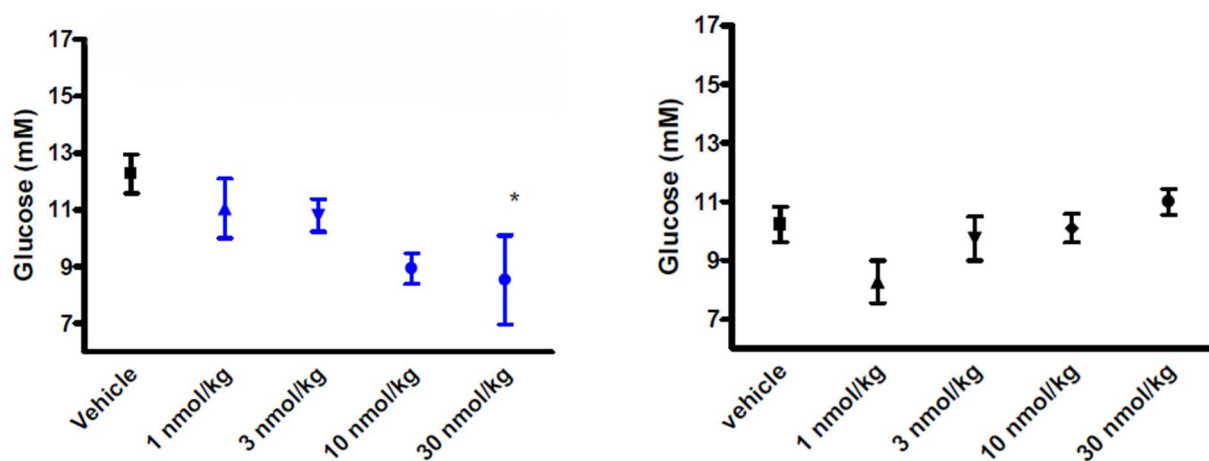


Mean ± SEM

Left: Semaglutide, $p < 0.04$ one-way ANOVA after log transformation, $*p < 0.05$ vs vehicle Tukey-Kramer post-hoc test

Right: Liraglutide, n.s. one-way ANOVA after log transformation

図 2.6.2-3 グルコース投与 (bolus) 後 10 分及びセマグルチド (左図) 又はリラグルチド (右図) 投与後 190 分の血漿中インスリン濃度



Mean ± SEM

Left: Semaglutide, $p < 0.04$ one-way ANOVA, $*p < 0.05$ vs vehicle Tukey-Kramer post-hoc test

Right: Liraglutide, n.s. one-way ANOVA

図 2.6.2-4 グルコース投与 (bolus) 後 60 分及びセマグルチド (左図) 又はリラグルチド (右図) 投与後 240 分の血糖値

[結論]

セマグルチド投与により、30 nmol/kg (123.4 µg/kg) の用量でインスリン分泌促進が認められ、血糖を降下させた。また、10 nmol/kg (41.1 µg/kg) では分泌促進傾向が認められた。同程度の用量のリラグルチド投与によりインスリン分泌促進が認められなかったことから、正常ラットでは、セマグルチドの効力が高いことが示された。

2.6.2.2.2.2 db/db マウスの血糖及び正常マウスの摂餌量に対する効果 (Module 2.6.3.2, DXG050301-0113)

[目的]

単回皮下投与後の糖尿病マウス (db/db) における血糖降下及び体重減少ならびに正常マウスにおける摂餌量の抑制に関して、セマグルチドとリラグルチドの相対効果を検討した。

[試験方法]

血糖及び体重に関する試験には、10～12 週齢の 2 型糖尿病の肥満マウスモデルである雄性 db/db マウス (Taconic 社、デンマーク) を使用した。摂餌量に及ぼす影響試験には、7～8 週齢の雄性 C57Bl/6J マウス (Taconic 社) を使用した。

マウスに固定容量の 6 mL/kg を皮下投与した。試験前に関連する評価項目 (血糖値、体重又は摂餌量) を記録し、摂餌量は 45 時間まで (連続記録)、血糖値及び体重は 48 時間 (血糖プロファイル: 1、2、3、6、24 及び 48 時間、体重: 48 時間) まで測定した。

セマグルチド及びリラグルチドを 0.05% Tween 80 を含む 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、pH を 7.5～8.0 の範囲内に調整し、0.3、1、3、10、30 及び 100 nmol/kg の各用量を投与して GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.社、米国) を使用して ED₅₀ 値を推定した。

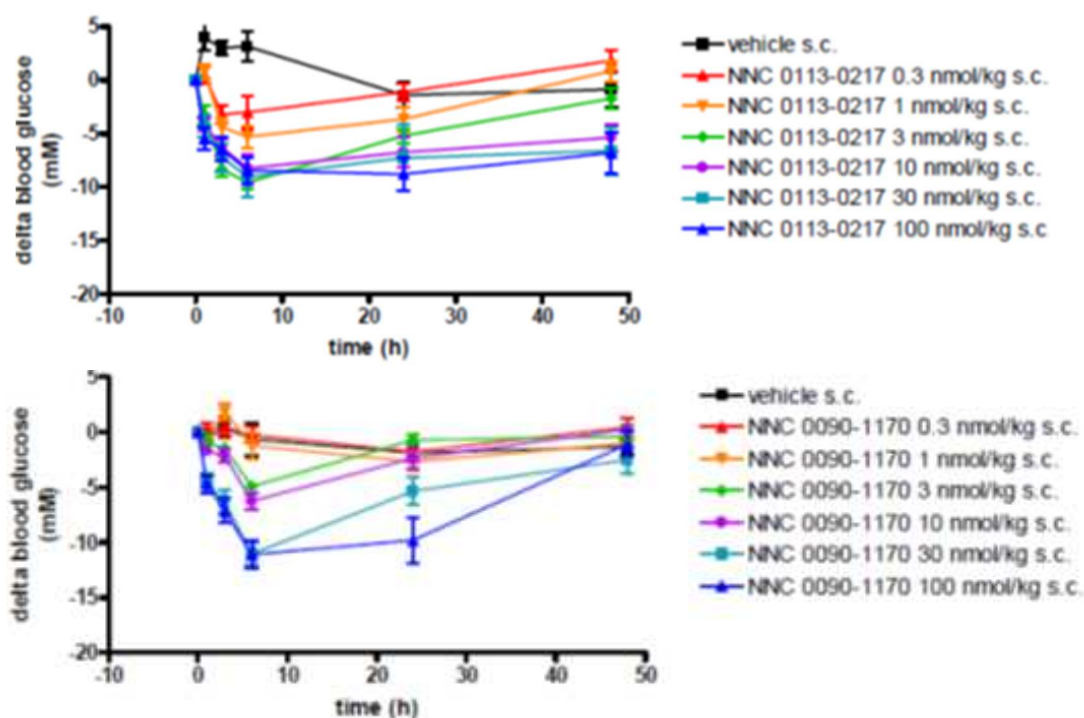
グルコース曲線下面積 (AUC) は、Δ 血糖値 (時間 0 におけるベースライン値を引いた値) として計算した。単純ロジスティックモデルが仮定された。一元配置 ANOVA 及び post hoc 検定として Bonferroni の多重比較検定を用いて統計解析を行い、p < 0.05 を統計学的に有意とみなした。血糖プロファイルは平均値 ± SEM、時間、非線形適合度は影響-対数用量の平均値 ± SEM、及び 48 時間の体重変化量は平均値 ± SEM として示す。

正常マウスの摂餌量は、試験期間中、給餌した粉末飼料の残量を連続的に記録する単飼育マウス用システムである Multi-device Interface Software を備えた Multidevice Monitoring System (Columbus Instruments International 社、米国) によってモニターされ、5 分間隔で記録した。影響を視覚的に示す

ため、群当たりの平均累積摂餌量を時間に対してプロットした。一方、10 又は 30 nmol/kg (41.1 又は 123.4 $\mu\text{g/kg}$) を投与後 24 時間での累積摂餌量を平均値 $\pm$ SEM として示し、一元配置 ANOVA 及び post hoc 検定として Bonferroni の多重比較検定を用いて統計解析を行った ($p < 0.05$ を統計的に有意とみなした)。

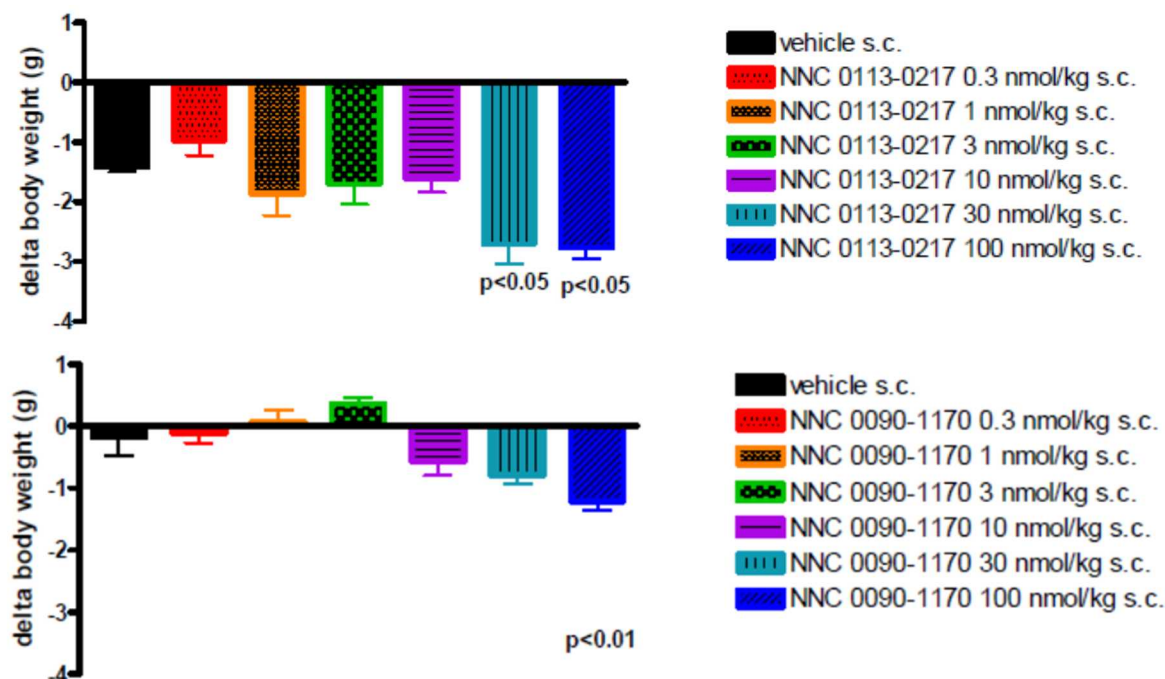
[結果]

セマグルチドは糖尿病 db/db マウスに対し、血糖値及び体重を低下させ、作用が長時間持続した。セマグルチド及びリラグチドの血糖降下作用の最大値は同等であったが (図 2.6.2-5)、セマグルチドは、リラグチドと比較して効力が高く、糖尿病マウスの血糖値を皮下投与後 48 時間低下させ[ED₅₀ AUC_Δ (0~48 時間血糖値) : 31.6 nmol/kg (118.5 $\mu\text{g/kg}$) [95%信頼区間 : 8.9~112 nmol/kg (33.4~420.1 $\mu\text{g/kg}$)] に対して 1.9 nmol/kg (7.8 $\mu\text{g/kg}$) [95%信頼区間 : 0.6~5.8 nmol/kg (2.5~23.9 $\mu\text{g/kg}$)]、溶媒投与動物と比較して、リラグチドよりも低用量で投与 48 時間後の体重を有意に低下させた [100 nmol/kg (375.1 $\mu\text{g/kg}$) に対して 30 nmol/kg (123.4 $\mu\text{g/kg}$)] (図 2.6.2-6)。同様に、投与後 6 時間の血糖降下 ED₅₀ は、セマグルチドでは 0.30 nmol/kg (1.2 $\mu\text{g/kg}$) [95%信頼区間 : 0.12~0.75 nmol/kg (0.49~3.1 $\mu\text{g/kg}$)] であると推定されたが、リラグチドでは 6.9 nmol/kg (25.9 $\mu\text{g/kg}$) [(95%信頼区間 : 2.9~16.0 nmol/kg (10.9~60.0 $\mu\text{g/kg}$)) と高かった。



NNC0113-0217: Semaglutide, NNC0090-1170: Liraglutide
Mean $\pm$ SEM

図 2.6.2-5 セマグルチド (上図) 及びリラグチド (下図) を単回投与した db/db マウスの Δ 血糖値



NNC0113-0217: Semaglutide, NNC0090-1170: Liraglutide

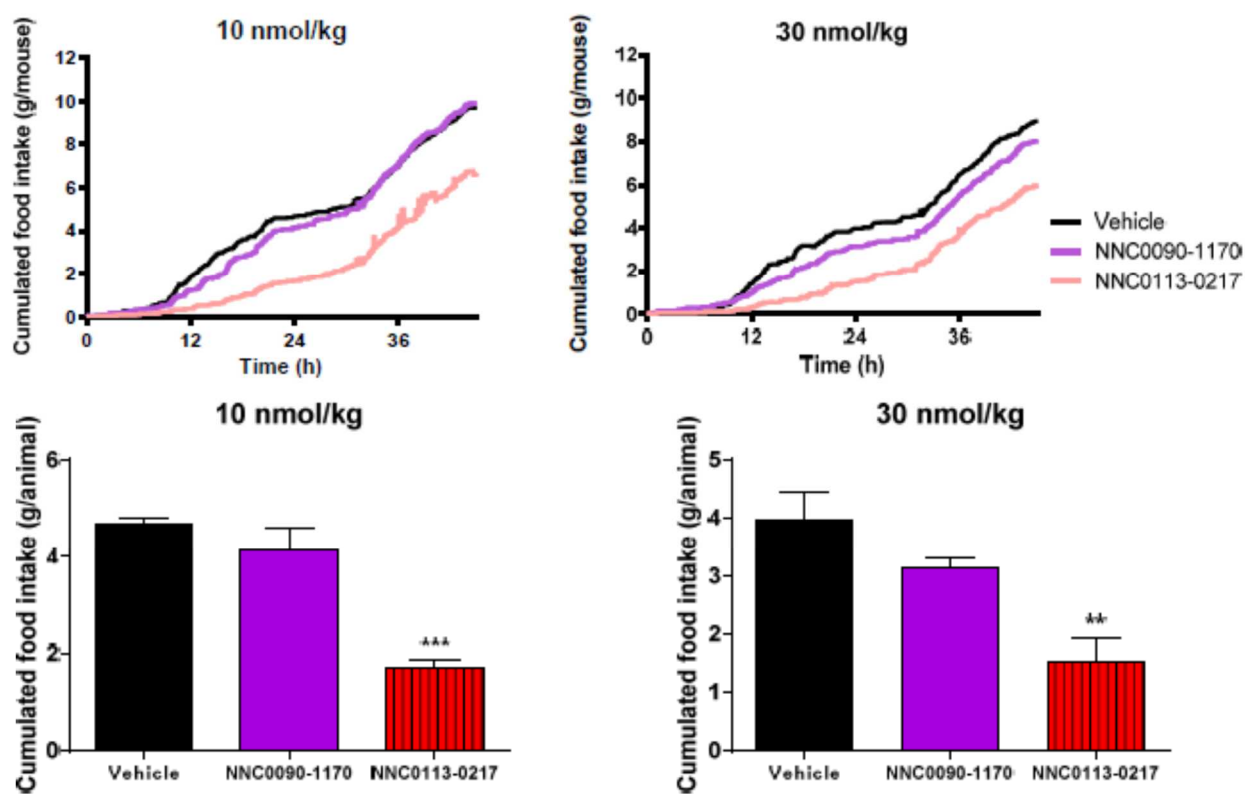
Delta BW 48 h following s.c. dose, Mean $\pm$ SEM

One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test as post hoc analysis vs vehicle

図 2.6.2-6 セマグルチド（上図）及びリラグルチド（下図）を単回投与した db/db マウスの Δ 体重値

10 又は 30 nmol/kg のセマグルチド（41.1 又は 123.4 $\mu\text{g/kg}$ ）又はリラグルチド（37.5 又は 112.5 $\mu\text{g/kg}$ ）投与後 45 時間（上図）及び最初の 24 時間（下図）におけるマウス当たりの平均累積摂取量を [図 2.6.2-7](#) に示す。

45 時間のプロットによる評価では、摂餌量は最初の 24 時間に主に影響を受けているようであった。溶媒投与動物と比較して、リラグルチドの 30 nmol/kg（112.5 $\mu\text{g/kg}$ ）で摂餌量の低下傾向がみられたが、10 又は 30 nmol/kg（37.5 又は 112.5 $\mu\text{g/kg}$ ）では 24 時間の累積摂餌量に有意な効果を及ぼさなかった。対照的に、溶媒投与動物と比較して、セマグルチドの 10 及び 30 nmol/kg（41.1 及び 123.4 $\mu\text{g/kg}$ ）では摂餌量の有意な減少が認められた。



NNC0113-0217: Semaglutide, NNC0090-1170: Liraglutide

Upper panel: Cumulated food intake for 45 hours, Lower panel: Cumulated food intake for the first 24 hours

Mean $\pm$ SEM

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs vehicle, One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test as post hoc analysis

図 2.6.2-7 セマグルチド及びリラグルチド単回皮下投与時（10 又は 30 nmol/kg）の摂餌量に及ぼす効果

[結論]

高血糖 db/db マウスにおける血糖降下評価項目及び正常マウスにおける摂餌量減少に関して、セマグルチドはリラグルチドよりも高い効力を有する。

2.6.2.2.2.3 db/db マウスにおける体重、摂餌量、血糖及び β 細胞容積ならびに機能への影響 (Module 2.6.3.2, MmLa070620)

[目的]

db/db マウスにおける摂餌量、体重、血糖及び血液生化学（代謝ならびに β 細胞の機能及び容積に関連する項目）に及ぼすセマグルチドの *in vivo* での効果を検討した。

[試験方法]

セマグルチドをリン酸緩衝液（50 mmol/L リン酸、0.05% Tween 80、pH 8）の処方で、9～10 週齢の雄性 db/db マウス（Taconic 社、デンマーク）を[表 2.6.2-2](#)の各群に割り付け、それぞれ 26～28 日間投与した。

表 2.6.2-2 試験群の概要（MmLa070620）

	Treatment	Administration	N	Animals/ Cage	Remarks
1	Vehicle	s.c., once daily	10	2	
2	0.3 nmol/kg (1.2 µg/kg)	s.c., once daily	10	2	
3	1.0 nmol/kg (4.1 µg/kg)	s.c., once daily	10	2	
4	2.0 nmol/kg (8.2 µg/kg)	s.c., once daily	10	2	
5	5 nmol/kg (20.6 µg/kg)	s.c., once daily	10	2	
6	15 nmol/kg (61.7 µg/kg)	s.c., once daily	10	2	Food intake measured daily
7	15 nmol/kg (61.7 µg/kg)	s.c., once daily	8	2	For pancreatic islets perfusion
8	15 nmol/kg (61.7 µg/kg)	s.c., every second day	10	2	
9	Vehicle	s.c., once daily	8	1	Single caged but not pair fed. For pancreatic islets perfusion.
10	Vehicle	s.c., once daily	10	1	Pair fed to the Group 6

第 1～6 群の動物（n=10/群）はケージ当たり 2 匹飼育し、0（溶媒）、0.3、1、2、5 又は 15 nmol/kg（0、1.2、4.1、8.2、20.6 又は 61.7 µg/kg）の用量で 1 日 1 回皮下投与した。

第 7 群（n=8）は試験終了時に膵臓検査を実施したこと以外は第 6 群と同様であることから、生存相のデータは両群を組み合わせ、15 nmol/kg（61.7 µg/kg）投与動物（n=18）として示す。

第 8 群（n=10）では、セマグルチドの作用が長時間持続することを実証するために、15 nmol/kg（61.7 µg/kg）を隔日投与した。

第 10 群（n=10）では、セマグルチドの効果が摂餌量の変化により直接的に説明可能か評価するため、単飼育した溶媒投与動物を、セマグルチドの最高用量群（第 6 群）にペアフィーディングした。

第 9 群（n=8）では、単飼育し、ペアフィーディングを実施しなかった。

第 6 群及び第 10 群のマウスを除き、毎週月曜及び木曜日に各ケージの摂餌量を測定した。第 6 群のマウスの摂餌量は毎日測定して平均摂餌量を計算し、次の 24 時間に、第 10 群のマウスに同量の飼料を与えた。ペアフィード群における実際の摂餌量を毎日測定した。

毎週月曜及び木曜日の投与前に、体重を測定した。

投与前日（第 0 日）及び第 23 日に、EchoMRI スキャナー（Echo MRI LLC 社、米国）にてマウスをスキャンし、脂肪容積を評価した。マウスはスキャン中覚醒していた。

初回投与日（第 1 日）、第 8 日及び第 15 日に、24 時間の血糖プロファイルを得た。24 時間の試料は、投与翌日午前の投与前に評価した。第 5、12、19、23 及び 26 日では、投与当日午前の投与直前に血糖を評価した。覚醒マウスの尾先端部毛細管から試料を採取し、血糖濃度を BIOSEN S_line（EKF Diagnostic GmbH、ドイツ）にて測定した。

投与開始日と比較して、第 0、8、15 及び 22 日に、覚醒マウスの尾先端部毛細管から HbA1c の測定用に血液試料を採取した。血液試料を自動分析装置 Roche / Hitachi 912（Roche Diagnostics GmbH、ドイツ）にて分析した。

試験終了時に、コルチコステロン、インスリン、グルカゴン、トリグリセリド（TG）、低密度リポタンパク質（LDL）コレステロール及び高密度リポタンパク質（HDL）コレステロール、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の血漿中値を評価した。

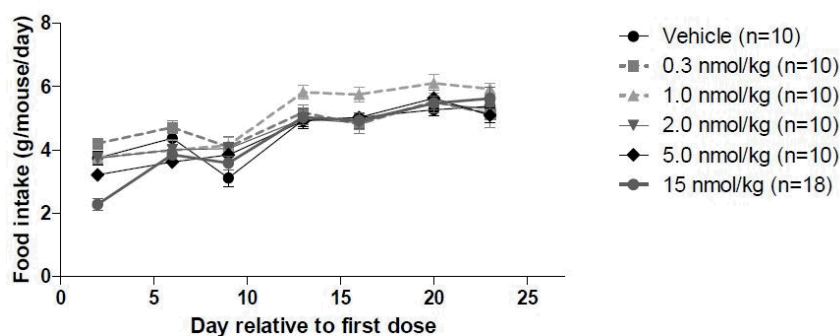
安楽死処置後、第 1、3、6 及び 10 群から膵臓を摘出した。インスリンならびにグルカゴン、ソマトスタチン及び膵ペプチドの組合せで二重染色した組織切片を、 β 細胞及び非 β 細胞容積の推定に使用し、ビデオカメラ、モニター、PC 制御電動ステージ、New CAST ソフトウェア（Visiopharm 社、デンマーク）を備えたオリンパス BX-50 顕微鏡（オリンパス社、デンマーク）を用いる立体的点計測技術により測定した。

灌流のためにそれぞれ第 27 及び 28 日に第 7 群及び第 9 群の動物（4 匹／群）から膵島を単離した。膵臓をコラゲナーゼで振とうして組織を消化した。上清をハンクス平衡塩溶液（HBSS）中で洗浄し、小島をピペッティングにより採取し、RPMI 1640 培地+ 10%新生児仔牛血清で 37°C でインキュベートした。翌日、膵島を Krebs Ringer 溶液で洗浄し、引き続き Suprafusion 2500（Brandel 社、米国）による膵島灌流試験に使用した。各動物につき、約 40 個の膵島を有する 1 又は 2 灌流カラムを使用した。膵島を Bio-gel P2（Bio-Rad 社、米国）のカラムに入れた。このカラムには、ゲルの下部及び上部にナイロンメッシュが備わっている。インスリン放出による安定的なベースラインを得るため、はじめに 3 mmol/L グルコース含有 Krebs Ringer 溶液で膵島を 40 分間灌流した。40 分経過後、緩衝液を 10 mmol/L グルコースに 40 分間（時間 40～80 分）交換した。最後に、緩衝液を低濃度グルコース（3 mmol/L）に 40 分間交換した（時間 80～120 分）。緩衝液を、流速 0.3 mL/分で灌流システムを流れるよう設定した。30 分から 120 分まで 5 分毎に試料を採取した。試料を -20°C で保存後、インスリン分析に供した。

統計解析には、一元又は二元配置 ANOVA 及び post hoc 検定として Bonferroni の多重比較検定又は Student の t 検定を実施した。分散性に有意な群間差が認められる場合、一元配置 ANOVA の代わりに Kruskal Wallis 検定と Dunn の多重比較検定を用いた。p < 0.05 を統計学的に有意とみなした。統計計算はいずれも GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.社、米国) を用いて実施した。結果を平均値 ± SEM として示す。

[結果]

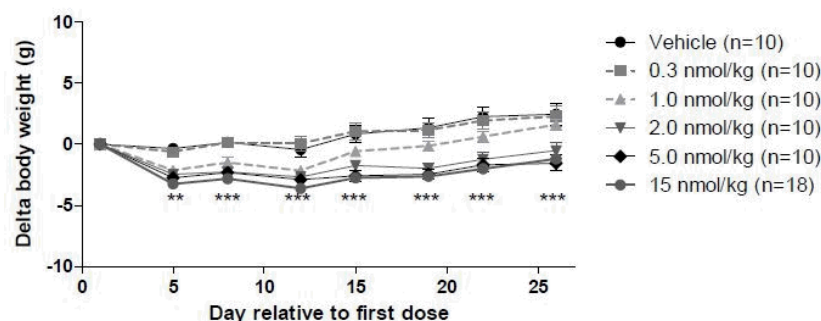
摂餌量 (g/マウス/日) は投与初期に減少傾向であったが、以降はいずれの用量でもセマグルチドによる影響はみられず (図 2.6.2-8)、体重も安定していた (図 2.6.2-9)。15 nmol/kg (61.7 µg/kg) を 1 日 1 回又は隔日投与した動物について、摂餌量の差異は認められなかった (データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す)。



Mean ± SEM

図 2.6.2-8 db/db マウスの摂餌量

試験開始前の体重は各群で完全に一致していなかったことから、試験中の体重に及ぼす効果を Δ 体重として示す。セマグルチドの 2、5 及び 15 nmol/kg (8.2、20.6 及び 61.7 µg/kg) の用量では体重減少が認められたが、それより低用量では体重に有意な効果は認められなかった (図 2.6.2-9)。

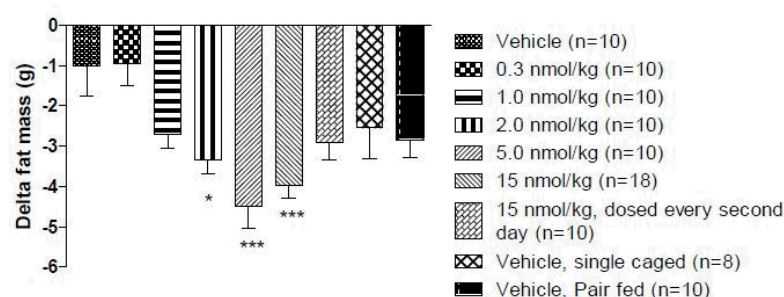


Mean ± SEM

** p < 0.01, *** p < 0.001 vs vehicle, Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test as post hoc analysis

図 2.6.2-9 db/db マウスのベースラインからの体重変化

さらに、セマグルチド 15 nmol/kg (61.7 μ g/kg) の隔日投与では、15 nmol/kg (61.7 μ g/kg) の 1 日 1 回投与で認められたものと同様に体重減少が認められた（データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。体重増加は、単飼育及び群飼育の溶媒投与群、単飼育の 15 nmol/kg (61.7 μ g/kg) セマグルチド投与群、及び単飼育ペアフィード群において同様であった（データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。セマグルチド 2、5 又は 15 nmol/kg (8.2、20.6 又は 61.7 μ g/kg) を 1 日 1 回投与後、脂肪容積は減少した〔Bonferroni の post hoc 検定：2 nmol/kg (8.2 μ g/kg) ($p<0.05$)、5 又は 15 nmol/kg (20.6 又は 61.7 μ g/kg) ($p<0.001$)〕が、それより低用量、又は 15 nmol/kg (61.7 μ g/kg) の隔日投与では、有意な影響は認められなかった（[図 2.6.2-10](#)）。

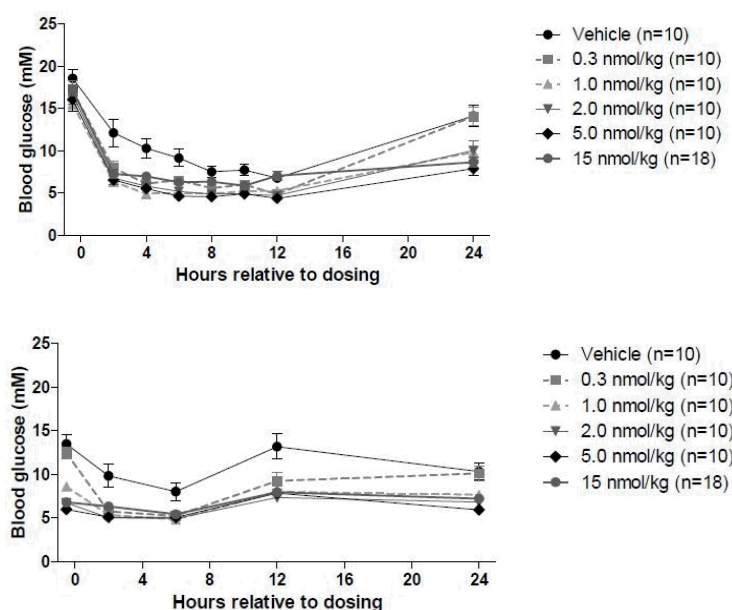


Mean $\pm$ SEM

$p<0.05$, *** $p<0.001$ vs vehicle, One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test as post hoc analysis

図 2.6.2-10 db/db マウスの脂肪容積変化（投与後 23 日）

本試験の投与後急性期及び亜急性期において、セマグルチドは血糖を降下させた（[図 2.6.2-11](#)）。



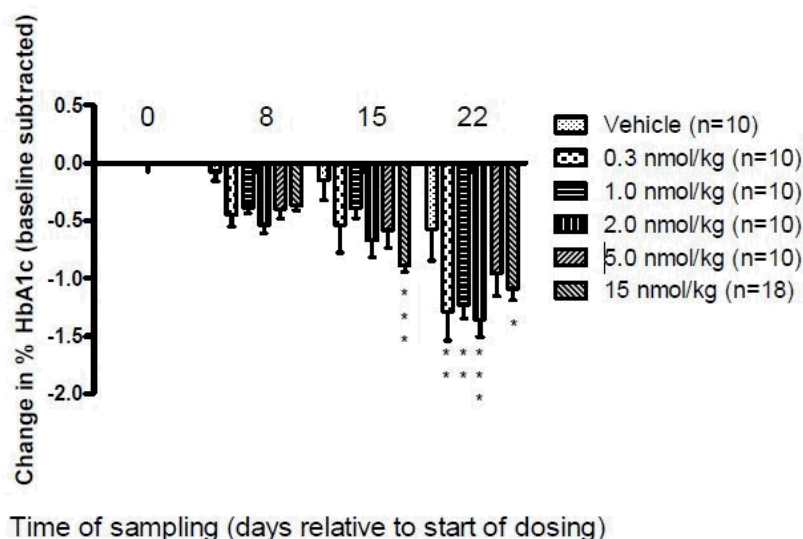
Mean $\pm$ SEM

図 2.6.2-11 db/db マウスの 24 時間血糖プロファイル〔第 1 日（上図）及び第 15 日（下図）〕

15 nmol/kg (61.7 µg/kg) の 1 日 1 回群又は隔日投与群の午前の血糖値を比較すると、2 群間で同等であることが示され、セマグルチドの作用が長時間持続することが実証された（データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。このことは、隔日投与動物には $t=0$ で投与しなかった第 8 日における 24 時間プロフィールを比較した場合にも認められた（データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。

単飼育の溶媒投与動物では、群飼育の溶媒投与動物よりも高い血糖値を示した（第 26 日： $p<0.05$ 、Kruskal-Wallis 検定及び Dunn の多重比較検定）ことから、飼育法による影響が示された（データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。セマグルチド 15 nmol/kg (61.7 µg/kg) を投与したペアフィード群動物は、溶媒を投与したペアフィード群動物よりも高い血糖値を示した（第 26 日： $p<0.001$ 、Kruskal-Wallis 検定及び Dunn の多重比較検定。データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。

セマグルチドによる血糖降下を、ベースライン補正した HbA1c 値の低下に変換した。セマグルチド投与により、溶媒投与群と比較して、第 15 日の 15 nmol/kg (61.7 µg/kg) 群、及び第 22 日の 5 nmol/kg (20.6 µg/kg) 群を除く全投与群でベースライン補正した HbA1c の低下が認められた（図 2.6.2-12）。さらに、HbA1c 値の低下は 15 nmol/kg (61.7 µg/kg) の隔日投与群でも同様に認められた。ペアフィード群では、ベースライン補正した HbA1c 値の低下は認められなかった。単飼育動物では、第 15 日に低下したが、第 22 日には低下が認められなかった（データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。



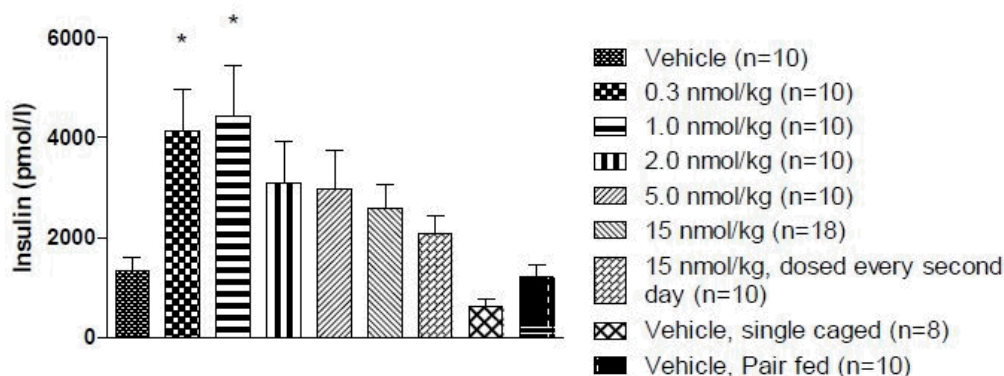
Mean $\pm$ SEM

: $p<0.01$; *: $p<0.001$ vs vehicle, Two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test as post hoc analysis

図 2.6.2-12 db/db マウスの HbA1c 値（ベースライン補正後）

ストレスの指標として、コルチコステロンを全試験群で測定したが、試験群間でコルチコステロンに有意差は認められなかった（一元配置 ANOVA。データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す）。血

漿中インスリン濃度は全セマグルチド投与群で増加傾向であったが、統計学的有意差は溶媒対照と比較して 0.3 及び 1 nmol/kg (1.2 及び 4.1 $\mu\text{g/kg}$) 群で認められたのみであった (Kruskal-Wallis 検定及び Dunn の多重比較検定) (図 2.6.2-13)。

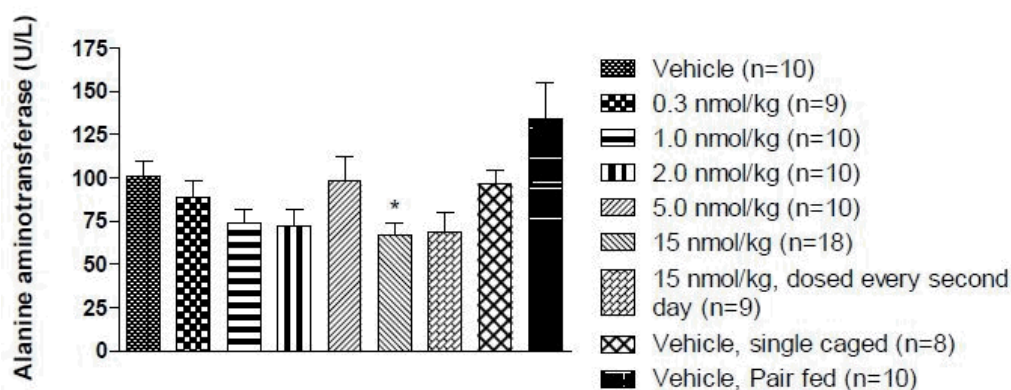


Mean $\pm$ SEM

*: $p < 0.05$ vs vehicle, Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test

図 2.6.2-13 db/db マウスの血漿中インスリン濃度 (投与後 26~28 日)

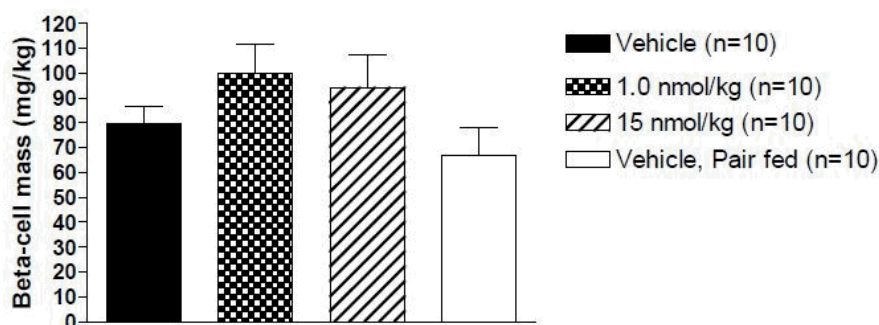
投与後 26~28 日の血漿中グルカゴン濃度は、投薬群間による差異が認められたが (Kruskal-Wallis 検定で $p < 0.01$)、Dunn の多重比較検定では群間に有意差は認められなかった (データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す)。投与後 26~28 日の血漿中 TG、LDL コレステロール、HDL コレステロール及び AST 値について、本動物モデルにおいてセマグルチドの影響は認められなかった (データを Module 4.2.1.1, LmLa070620 に示す) が、セマグルチド 15 nmol/kg (61.7 $\mu\text{g/kg}$) の 1 日 1 回投与群では、ALT 値の減少が認められた (図 2.6.2-14)。



*: $p < 0.05$ vs vehicle, Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test

図 2.6.2-14 db/db マウスの ALT 値 (投与後 26~28 日)

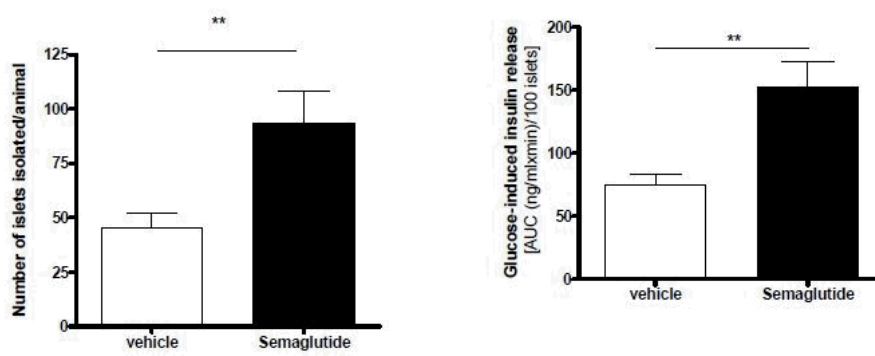
セマグルチド 1 及び 15 nmol/kg (4.1 及び 61.7 $\mu\text{g/kg}$) を投与後、 β 細胞容積の増加傾向がみられたが、単飼育のペアフィード群では、 β 細胞容積の減少傾向がみられた。しかしながら、群間で有意差は認められなかった (一元配置 ANOVA) (図 2.6.2-15)。



Mean $\pm$ SEM

図 2.6.2-15 db/db マウスの β 細胞容積 (投与後 26~28 日)

in vitro での β 細胞機能は、溶媒投与動物と比較してセマグルチド投与動物で改善された。単離可能な膵島数は、溶媒投与動物と比較してセマグルチド投与動物で有意に多く ($p < 0.01$)、グルコースで誘発したインスリン分泌もセマグルチド投与動物で有意に増加した ($p < 0.01$) (図 2.6.2-16)。



Mean $\pm$ SEM

** $p < 0.01$ vs vehicle, t-test

図 2.6.2-16 db/db マウス (n=8) の膵島数 (左図) 及びグルコース誘発インスリン分泌 (右図) (投与後 27~28 日)

[結論]

セマグルチドにより血糖降下ならびに体重及び HbA1c 値の低下が認められた。血漿中インスリンは、低用量の 2 群でのみ有意な増加が認められたが、このことは、投与初期の体重減少に伴う生理的反応として予測可能なインスリン分泌の低下と一致するものであった。*in vitro* での β 細胞の機能が増加し (図 2.6.2-15)、単離膵島数も増加した (図 2.6.2-16)。

2.6.2.2.2.4 ミニブタのインスリン分泌に及ぼす薬理作用持続時間の検討 (Module 2.6.3.2, BidR050301)

[目的]

セマグルチド投与ミニブタにおける、インスリン分泌能に関する作用持続時間を評価した。

[試験方法]

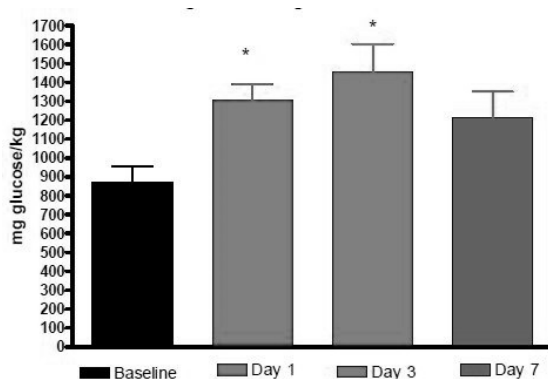
セマグルチドの試験に、 β 細胞を減少させた雄性 Göttingen 系ミニブタ (14~17 箇月齢、 $n=6$) を使用した。ニコチンアミド (67 mg/kg) 単回静脈内投与後 15 分にストレプトゾシン (125 mg/kg) を単回静脈内投与し β 細胞容積を減少させた。その後、ストレプトゾシンによる急性期の影響を排除することと、供試動物の代謝状態を安定化させるために、本試験開始前に 2~4 週間の回復期間を設定した。雄性ゲッチングンミニブタを用いたストレプトゾシン誘発性耐糖能異常動物モデルの特徴として、 β 細胞容積減少又は β 細胞機能低下、残存インスリン分泌能障害による糖処理能の減退があり、空腹時高血糖及び食後高血糖として顕在化する⁵。全例を中心静脈カテーテルにより血液採取し、試験は覚醒動物を用いて実施した。

セマグルチドを以下の要領で動物に皮下投与し、血漿中曝露を定常状態とした段階 (第 0 日) をベースラインとして高血糖クランプを実施した。用量漸増法により、第 0 日の夕方までセマグルチドを 1 週間にわたり隔日投与した [第-7 日の午後に 0.5 nmol/kg (2.1 μ g/kg)、第-5 日の午後に 1 nmol/kg (4.1 μ g/kg)、第-3 日の午後に 2.0 nmol/kg (8.2 μ g/kg)、第-1 日の夕方に 2 nmol/kg (8.2 μ g/kg)] 後、高血糖クランプを開始した。

試験前に動物を絶食させた。すなわち、試験当日に朝食を与えなかった。高血糖クランプは最終投与後 1 (最終投与後 11 時間)、3 及び 7 日に実施し、血漿中グルコース濃度が 8 mmol/L となるようグルコースを 120 分間持続注入し、150 分まで連続的に血液試料を採取した。血漿中グルコース濃度及びインスリン濃度を測定した。AUC を算出してクランプ実施時のグルコース及びインスリン応答性を評価した。一元配置 ANOVA 検定及び Dunnett の post hoc 検定を行い、 $p<0.05$ を統計的に有意とみなした。

[結果]

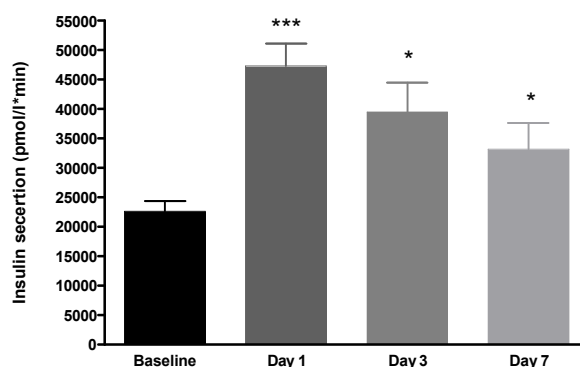
グルコース注入量は、ベースラインと比較してセマグルチドの最終投与後 1 及び 3 日に有意に増加したが、最終投与後 7 日には増加しなかった (図 2.6.2-17)。また、セマグルチドの 2 nmol/kg (8.2 μ g/kg) では、最終投与後 7 日までインスリン分泌促進が認められた (図 2.6.2-18)。



Mean±SEM

* $p < 0.05$ vs baseline, One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test

図 2.6.2-17 セマグルチド皮下投与後の高血糖クランプ時のグルコース注入量



Mean±SEM

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs baseline, One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test

図 2.6.2-18 セマグルチド皮下投与後の高血糖クランプ時のミニブタ血漿中インスリン AUC

[結論]

セマグルチドは、最終投与後 7 日まで β 細胞減少ミニブタの高血糖クランプ時のグルコース注入量及び血漿中インスリン濃度を有意に増加させ、ミニブタでは最大 7 日間作用が持続することが示唆された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

ヒトグルカゴン受容体を安定的に発現する BHK 細胞を用いて受容体機能解析を実施し、ペプチドで誘導された cAMP の蓄積をモニタリングした。上記の機能解析から、セマグルチドは、関連性の高い

グルカゴン受容体に結合せず、選択性の高い GLP-1 受容体作動薬であることが示された (Module 2.6.3.3, LER16090-035)。68 種類の生化学的受容体に対して受容体結合試験を実施し、セマグルチドによる放射能標識リガンドの結合阻害を測定した。セマグルチドは、試験した 68 種類の受容体のいずれとも相互作用を示さなかった。すなわち、50%以上の阻害はいずれの試験でもみられなかった (Module 2.6.3.3, AA93698)。

したがって、セマグルチドが ICH S7A ガイドライン⁶で示されている副次的薬理作用を有する可能性は低く、追加の評価は不要と考えられる。

GLP-1 受容体の膵臓以外に対する作用として、胃酸分泌及び胃内容排出の抑制があり、胃内容排出抑制は食後血糖の変動を減少させる。しかしながら、持続性 GLP-1 受容体作動薬の胃内容排出に対する作用は軽微である。GLP-1 受容体作動薬は、脳に分布する GLP-1 受容体を介して満腹感を増強し空腹感を減弱させることにより食欲を低下させ、その結果、エネルギー摂取が減少し体重が低下する。セマグルチドの *in vitro* 試験では、体重、摂餌量、食餌選択性に及ぼす影響及び体重減少メカニズムを検討することを目的に設計した。さらに、GLP-1 及び GLP-1 受容体作動薬の動脈硬化に対する有益な効果が文献報告されている。セマグルチドでは、広汎に使用されている 2 種の動脈硬化動物モデルを用いてこの効果を検討した。

2.6.2.3.1 肥満ラットにおける体重、摂餌量及び食餌嗜好性に及ぼす影響 (Module 2.6.3.3, KiRa080803)

[目的]

セマグルチドを 1 日 1 回 78～79 日間投与後の食餌誘発性肥満 (DIO) ラットにおける体重減少ならびに摂餌量及び食餌嗜好性に及ぼす影響を評価した。

[試験方法]

45 匹の 14 箇月齢の雌性 Wistar 系ラット (体重: 約 340g) (Taconic M&B 社、デンマーク) を組み入れた。5 匹には通常時の体重を示すよう標準飼料 (C) を自由摂餌させた一方、40 匹には標準飼料とチョコレート (C+CH) を自由摂餌させた。動物が約 23 箇月齢の時点 (動物が約 9 箇月間摂餌した時点) で試験を開始した。試験開始時の C+CH 群の平均体重は約 450 g であり、C 対照群は約 350 g であった。投与開始前に C+CH 摂餌ラットを体重で無作為化し、3 群に分けた。2 用量のセマグルチド [0.3 nmol/kg (1.2 µg/kg) (n=13) 及び 1 nmol/kg (4.1 µg/kg) (n=14)] を 1 日 1 回皮下投与した。C+CH を自由摂餌させた溶媒投与群 (n=13) と、C を自由摂餌させた溶媒対照群 (n=5) を試験に組み入れた。最終投与以降、比較可能な時点で血漿試料を確実に採取できるよう、試験終了日を 2 日 (第 78 及び 79 日) に分割した。各日につき、各群から半数の動物を安楽死処置した。

主要エンドポイントは、体重、摂餌量、食餌嗜好性及び体組成であった。セカンダリーエンドポイントは、血液中又は血漿中分析によるグルコース、HbA1c、インスリン、グルカゴン、TG、遊離脂肪酸（FFA）、HDL コレステロール、総コレステロール（T-chol）、レプチン及びアディポネクチンであった。体重ならびに飼料及びチョコレート摂餌量を第 77 日まで毎日記録した。体組成は、MR スキャナーである EchoMRI-100（Ectro Medical System 社、米国）の全身スキャン手法を用いて第-4 日及び 77 日に測定した。第 78 及び 79 日（最終投与後約 24 時間及び約 18 時間の絶食）に分析用血液を採取後、速やかに動物を安楽死処置した。

全データの提示に Graph Pad Prism 5.0（GraphPad Software Inc.社、米国）を用いた。全データを平均値±SEM として示す。全群を一元配置 ANOVA 検定により比較した。C+CH 溶媒対照群との比較は Dunnett の多重比較検定により実施した。C 溶媒対照群の試料の量が限られていたため、血液及び血漿分析に C 溶媒対照群を組み入れなかった。対応のある t 検定を用いて、第-4 日及び 77 日の相対体脂肪容積及び除脂肪容積を比較した。

[結果]

第 77 日の体重が有意に減少し、ベースラインからの体重変化は C+CH 溶媒投与群と比較してセマグルチド投与群で有意に減少した（[図 2.6.2-19](#) 及び [表 2.6.2-3](#)）。

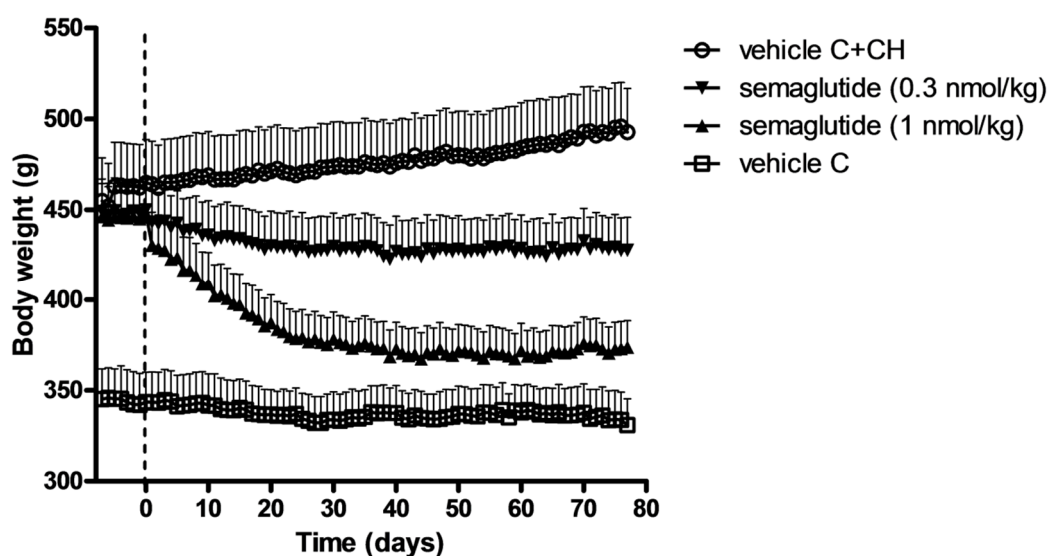


図 2.6.2-19 試験前及び試験期間中の DIO ラットの体重

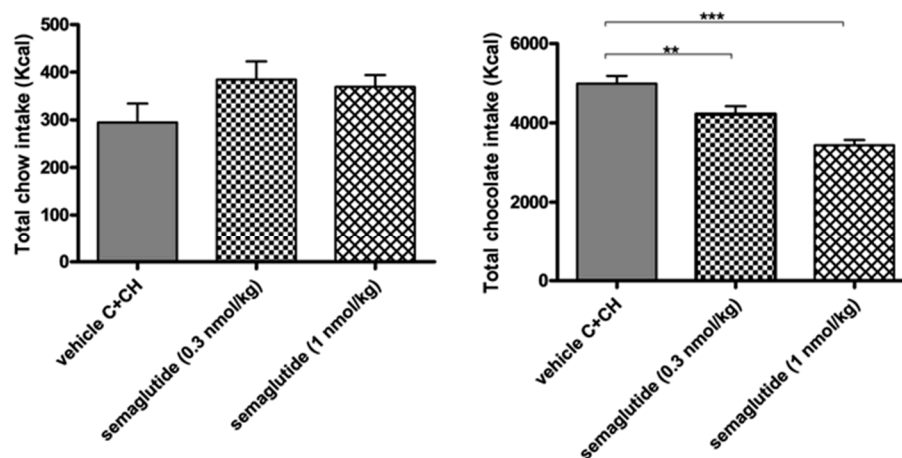
表 2.6.2-3 DIO ラットにおける体重及び体重変化（投与後 77 日）

Compound	BW at day 77	BW change, Day 0-77 (g)	N
Vehicle (C+CH)	492.7 ± 24.0	28.0 ± 6.5	13
Semaglutide 0.3 nmol/kg (1.2 µg/kg)	427.6 ± 18.2*	-22.2 ± 8.1***	13
Semaglutide 1 nmol/kg (4.1 µg/kg)	373.7 ± 14.8***	-74.0 ± 8.4***	14
Vehicle C	330.8 ± 14.5***	-12.8 ± 5.7*	5

Mean ± SEM

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs vehicle (C+CH), One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test

さらに、セマグルチドでは、ラットにチョコレートと標準飼料を選択させた場合に、チョコレート摂餌量の選択的減少を伴う摂餌量の減少が実証された。セマグルチドの 0.3 及び 1 nmol/kg (1.2 及び 4.1 µg/kg) の 1 日 1 回投与により、C+CH 溶媒投与群 (4990±198 kcal) と比較してチョコレート摂餌量の有意な減少が認められた [それぞれ 4213±200 kcal ($p < 0.01$) 及び 3449±132 kcal ($p < 0.001$)]。一方、標準飼料摂餌量に有意な増加は認められなかった [0.3 nmol/kg (1.2 µg/kg) : 379±37 kcal、1 nmol/kg (4.1 µg/kg) : 369±25 kcal、C+CH 溶媒投与群 : 294±40 kcal] (図 2.6.2-20)。

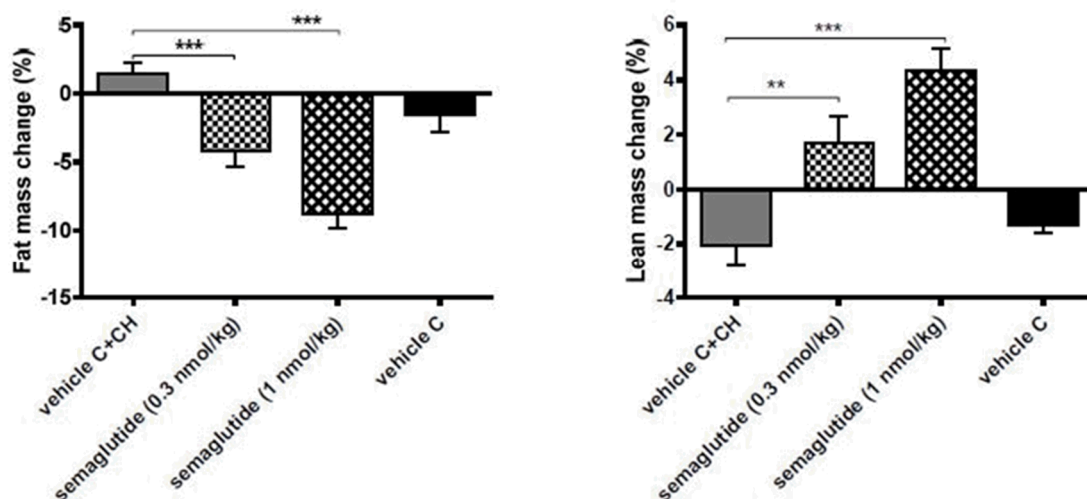


Mean $\pm$ SEM, n=13-14

p < 0.01, *p < 0.001, One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test

図 2.6.2-20 DIO ラットの標準飼料及びチョコレート摂取量 (kcal) (1 日 1 回投与 77 日後)

投与前 (第-4 日) 及び投与終了時 (第 77 日) に体組成を核磁気共鳴法により測定した結果、セマグルチド投与後の体組成に有意な作用が認められた。セマグルチド投与後、体脂肪容積は有意かつ用量依存的に減少した (セマグルチド 0.3 nmol/kg (1.2 μ g/kg) : $-4.2 \pm 0.8\%$ 、セマグルチド 1 nmol/kg (4.1 μ g/kg) : $-8.8 \pm 1.1\%$ 、C+CH 溶媒投与群 : $+1.4 \pm 0.8\%$ 、C 溶媒投与群 : $-1.5 \pm 1.3\%$) (図 2.6.2-21)。



Mean $\pm$ SEM, n=14

p < 0.01, *p < 0.001, One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test

図 2.6.2-21 相対体脂肪容積変化及び除脂肪容積変化 (%) (1 日 1 回投与 77 日後)

血糖値、HbA1c、インスリン、グルカゴン、TG、HDL コレステロール及びアディポネクチンに特記すべき変化は認められなかった。セマグルチド投与群では、レプチン、コレステロール及び FFA の血漿中濃度が低下した（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4 最終投与約 24 時間後（第 78 又は 79 日）に採取した血液、血清及び血漿中分析結果

	Vehicle (CH+C)	Semaglutide 0.3 nmol/kg (1.2 µg/kg)	Semaglutide 1 nmol/kg (4.1 µg/kg)	Vehicle (C)
Blood glucose (mmol/L)	4.0 ± 0.17 (n=13)	4.4 ± 0.12 (n=13)	4.3 ± 0.13 (n=14)	4.3 ± 0.12 (n=5)
HbA1c (% HbA1c)	3.5 ± 0.04 (n=12)	3.6 ± 0.03 (n=13)	3.6 ± 0.03 (n=14)	3.8 ± 0.05 (n=5)
Insulin (pmol/L)	334 ± 54 (n=12)	248 ± 43 (n=13)	207 ± 36 (n=12)	179 ± 40 (n=2)
Glucagon (pmol/L)	72 ± 14 (n=12)	91 ± 18 (n=13)	88 ± 17 (n=12)	247 ± 76 (n=4)
TG (mmol/L)	1.9 ± 0.27 (n=13)	2.3 ± 0.34 (n=12)	1.6 ± 0.21 (n=14)	0.72 ± 0.11 (n=5)
FFA (µmol/L)	235 ± 20 (n=13)	195 ± 20 (n=13)	169 ± 12* (n=11)	177 ± 41 (n=4)
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.11 (n=13)	1.1 ± 0.06 (n=12)	1.4 ± 0.11 (n=14)	1.6 ± 0.25 (n=5)
T-chol (mmol/L)	2.9 ± 0.16 (n=13)	2.3 ± 0.13** (n=12)	2.2 ± 0.13** (n=14)	2.3 ± 0.33 (n=5)
Leptin (ng/mL)	43 ± 5.8 (n=13)	20 ± 2.1*** (n=13)	16 ± 2.4*** (n=14)	5.1 ± 0.96 (n=5)
Adiponectin (pmol/M)	27 ± 3.0 (n=13)	20 ± 2.3 (n=13)	21 ± 2.0 (n=14)	11 ± 1.3 (n=5)

Mean ± SEM

p< 0.01, *p< 0.001 vs vehicle (CH+C), One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test

Vehicle (C) group was omitted from statically analysis due to limited sample number.

[結論]

肥満ラットにおいて、セマグルチドは体重を低下させた。さらに、セマグルチドは、ラットがチョコレートと標準飼料間の選択肢がある場合、チョコレート摂取量の選択的減少を伴う摂餌量の減少が示された。さらに、脂肪容積ならびにレプチン、コレステロール及び FFA の血漿中濃度が低下した。

2.6.2.3.2 げっ歯類の脳へのセマグルチドの到達性（Module 2.6.3.3, JHES151201）

[目的]

末梢投与後のげっ歯類の脳へのセマグルチドの到達性、及び視床下部における重要な食欲調節ニューロンのセマグルチドによる制御を評価した。

[試験方法]

VivoTag-S® 750 NIR 蛍光色素標識（Perkin Elmer 社、デンマーク）又は Alexa Fluor® 594 C5-マレイミド（Thermo Fischer Scientific 社、デンマーク）のいずれかをペプチドに結合させた蛍光標識セマグルチド分子を社内で合成した。

雄性 SD 系ラット（CrI:SD）（Taconic 社、デンマーク）に 120 nmol/kg（494 µg/kg）の用量の Alexa 594-セマグルチド（n=2）又は溶媒（n=1）を単回静脈内投与した。脳切片を Hoechst 核染色、及びコカ

イン・アンフェタミン調節転写産物 (CART) により染色して、Alexa 594-セマグルチドと神経ペプチドとの共局在を評価した。Leica 共焦点イメージングシステム TCS SP8 及び Leica Application Suite (LAS X) ソフトウェア (Leica 社、ドイツ) を用いて脳切片の 2D 画像を取得した。

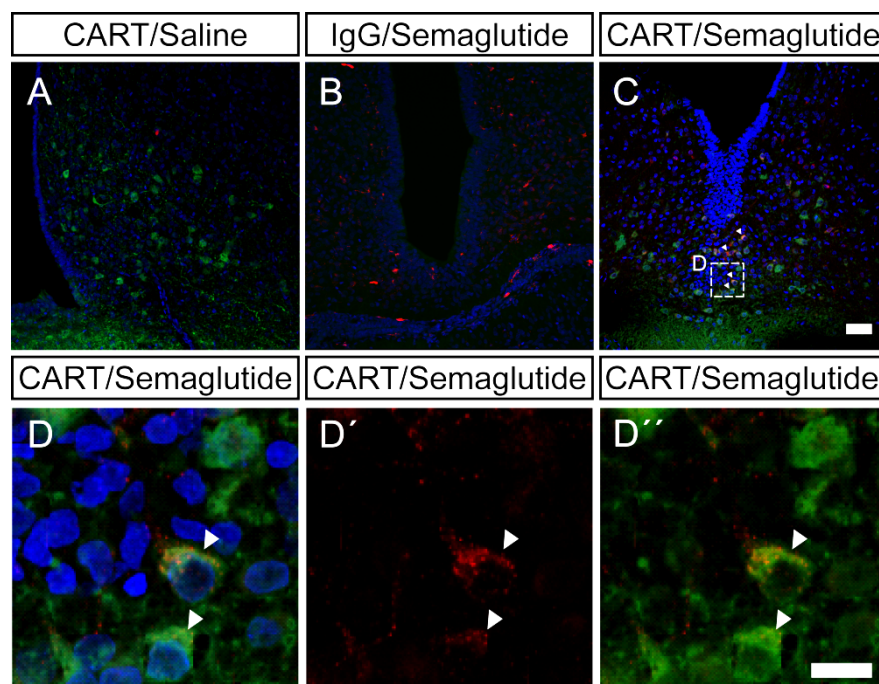
雄性 C57Bl/6J マウス (Taconic 社、デンマーク) に単回皮下投与 [120 nmol/kg (494 µg/kg)、n=8] 又は 1 日 2 回、4 日間皮下投与 [2×30 nmol/kg/日、2×60 nmol/kg/日、2×120 nmol/kg/日及び 2×120 nmol/kg/日 (2×123.4、2×246.8 µg/kg/日、2×494 µg/kg/日及び 2×494 µg/kg/日)、n=5] した。シグナル特異性をバリデートするため、機能性 GLP-1 受容体欠損 C57Bl/6J マウス (GLP-1 受容体^{-/-}マウス、Taconic 社、デンマーク) に VivoTag750-セマグルチドを単回皮下投与 (n=2) した。蛍光シグナルの存在に関して全脳切片を検査した。SuperK EXTREME (EXR-15) レーザーシステム (LaVision 社、ドイツ) を連結した light sheet 型ウルトラマイクロスコープにより、蛍光を可視化した。自動蛍光シグナルについて 620/600 又は 700 nm の励起/発光設定で、VivoTag750-セマグルチドの特異的シグナルについて 710/775 nm の励起/発光設定で、かつ 5~10 µm のステップサイズで単一平面照明顕微鏡 (SPIM) により試料をスキャンした。Imaris ソフトウェア (Bitplane 社、スイス) を用いて 2D 及び 3D 画像を作製した。

プロオピオメラノコルチン (POMC) ー増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 及びニューロペプチド Y (NPY) ーヒト化 Renilla 緑色蛍光タンパク質 (hrGFP) マウスを、繁殖用に Jackson Laboratory 社 (米国) から購入した。同腹児が正常に産仔され、POMC 又は NPY プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現を同定するため、新生児の遺伝子型を調べた。6~10 週齢の POMC-EGFP⁺成熟マウス 8 匹及び NPY-hrGFP⁺成熟マウス 4 匹から、視床下部の弓状核 (ARC) を含む冠状切片を作製し、電気生理的に記録して、セマグルチドで刺激後の食欲抑制性 POMC/CART 及び食欲促進性 NPY/アグーチ関連ペプチド (AgRP) ニューロンの活性化を評価した。

切片をチャンバーに移し、30°C で人工脳脊髄液を一定流量 (1~2 mL/分) で維持した。微小電極は 3~5MΩ の抵抗を有し、標準溶液 [125 mmol/L K-グルコン酸、2 mmol/L KCl、10 mmol/L EGTA、5 mmol/L HEPES、0.3 mmol/L GTP、POMC-GFP⁺用として 5 mmol/L ATP 又は NPY-GFP⁺用として 1 mmol/L ATP ; KOH で pH 7.25 に調整 (浸透圧~295 mosmol/L)] で充填した。落射蛍光及び赤外線による微分ビデオ正立顕微鏡を備えた顕微鏡を用いて GFP⁺ニューロンを同定した。マルチクランプ 700B 増幅器 (Molecular Devices 社、米国) を用いてデータを取得した。データを 3KHz でフィルタリングし、コンピュータインターフェース Digidata 1550A 及び pClamp 10.5 ソフトウェア (Molecular Devices 社、米国) を用いて 1KHz で収集した。セマグルチド 100 nmol/L を約 20 分間脳スライスに処理した。セマグルチドによる ARC ニューロンの活性化又は阻害作用を、膜電位変化及び自発的な活動電位発生を解析することにより測定した。対応のある t 検定を用いて統計学的に比較した。

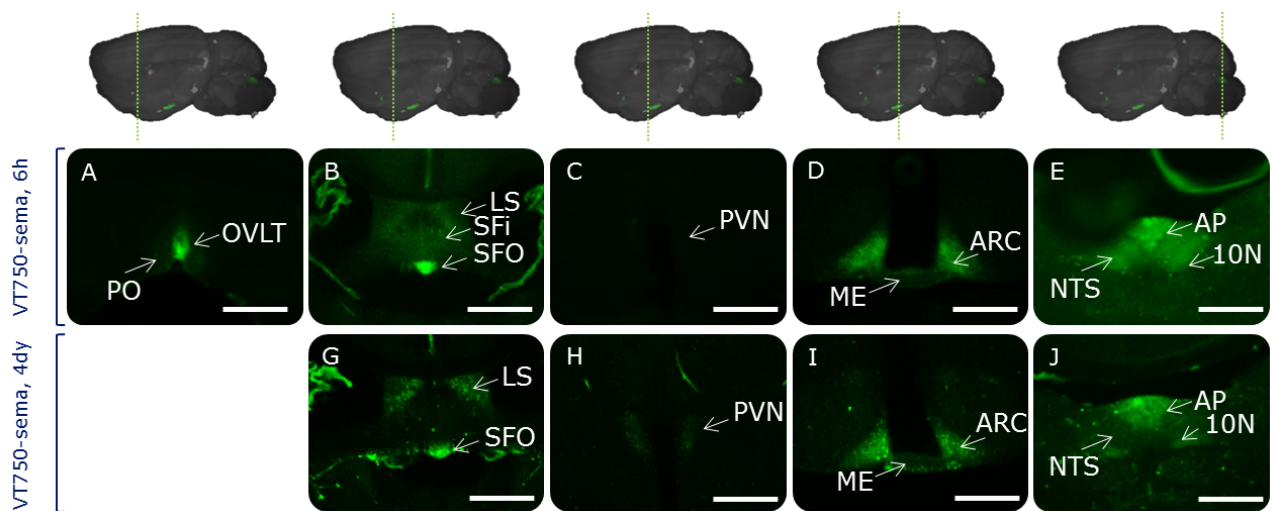
[結果]

体重減少をもたらす用量で蛍光標識セマグルチド (VivoTag750-セマグルチド) をマウスに皮下投与し、脳を摘出し、蛍光シグナルをスキャンした。血液脳関門 (BBB) が存在しない複数の脳室周囲器官 (CVO) [視床下部の ARC に近接した正中隆起 (ME)、脳幹の最後野 (AP) 及び脳弓下器官 (SFO)、及び終板血管器官 (VOLT)] に蛍光が検出された。セマグルチドは、中隔核及び孤束核 (NTS) においても測定された。ラット視床下部の ARC において、蛍光標識セマグルチド (Alexa594-セマグルチド) と CART 陽性ニューロンとの間に共局在が示された (図 2.6.2-22)。図 2.6.2-23 に、マウス脳における蛍光標識セマグルチドの分布の概要を示す。GLP-1 受容体^{-/-}マウスにおいてシグナルが認められなかったことから、上記の脳領域における蛍光シグナルは、GLP-1 受容体と結合依存的であった。CART/POMC 及び NPY/AgRP ニューロンに、それぞれ GFP タグを附加したマウスから得た脳の視床下部切片の電気生理学的試験から、セマグルチドは CART/POMC ニューロンを直接的に活性化し、NPY/AgRP ニューロンを間接的に阻害することが示された (図 2.6.2-24)。



Rat hypothalamus from a saline (A) and an Alexa594-semaglutide injected animal (B, C, D, D' D'') stained with Hoechst nuclear staining (blue) and CART (green) (A, C, D, D' and D'') or with IgG (green) (B). D, D' and D'' show high magnification confocal images (63x) of Alexa594-semaglutide (red) accumulation in CART positive cells. Arrowheads point to some of the CART/Alexa594-semaglutide positive cells (C, D, D', D''). Scale bar for the upper row is depicted in C (50um) and for the lower row in D'' (12.5um). Thickness of the maximum projection image in A= 35,36 um, B= 28,08um, C= 13,52um and D, D' and D''= 12,98um.

図 2.6.2-22 Alexa594-セマグルチドと CART 陽性ニューロンの共局在



Representative single plane images of fluorescent signals in forebrain of C57Bl/6J mice administered once (A-E, n=4) or repeatedly (F-J, n=4) with VivoTag750-sema. (A-E, n=4)

Sections are scanned at 710nm representing specific signal (green).

The top row shows a 3D whole brain in a sagittal view.

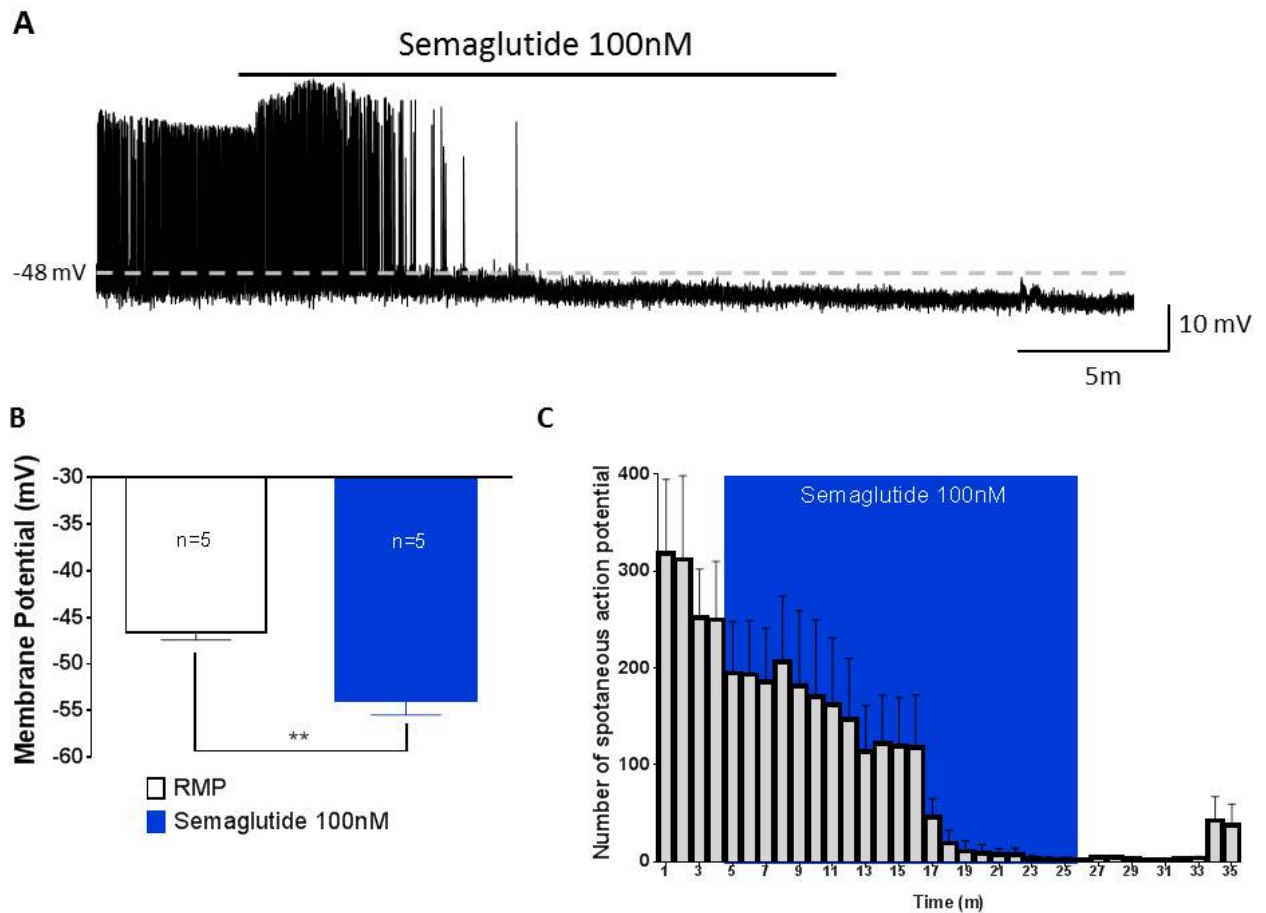
The green line traversing this brain image indicates the orientation of the corresponding 2D images below.

Sections are scanned at 710nm.

Abbreviations: ARC: arcuate nucleus, AP: area postrema, LS: lateral septal nuclei, ME: median eminence, NTS: nucleus tractus solitarius, OVLT: organum vasculosum, PO: preoptic nucleus, PVN: paraventricular hypothalamic nucleus, SFi: septofimbrial nucleus, SFO: subfornical organ, 10N: dorsal motor nucleus of vagus.

Scale bars: 500μm; B, C, G, H; 250μm; A, D, E, F, I, J

図 2.6.2-23 マウス脳における VivoTag750-セマグルチドの分布



(A) Representative trace from a NPY-GFP neuron under current clamp mode in the presence of 100nmol/L semaglutide. (B) Summary graph showing changes in membrane potential in NPY-GFP neurons after semaglutide application. (C) Histograms showing the effects of semaglutide in the firing rate of NPY-GFP neurons. Mean $\pm$ SEM, 5 cells out of 12 neurons from 4 animals. RMP= Resting Membrane Potential $p=0.0068$, paired t-test.

図 2.6.2-24 NPY/AgRP ニューロンにおけるセマグルチドの作用

[結論]

末梢投与された蛍光標識セマグルチドは、明確に区別可能な複数の CVO を含む GLP-1 受容体を発現する個々の脳領域に到達し、ARC の CART 陽性ニューロンが存在した脳幹及び視床下部の NTS のように、BBB で保護された脳領域にも到達した。シグナルの大部分は GLP-1 受容体^{-/-}マウスでは認められなかったことから、GLP-1 受容体が脳への取り込みに必要であることが示された。マウス脳切片の電気生理学的測定により、セマグルチドが POMC/CART ニューロンを直接的に刺激し、NPY 発現ニューロンにおいて神経活性を間接的に阻害することが示された。

2.6.2.3.3 DIO マウスにおける視床下部の食欲シグナルに対する作用 (Module 2.6.3.3, JCFJ151203)

[目的]

セマグルチド投与後の DIO マウスにおける、摂餌量及び体重の調節への関与が知られている視床下部核の遺伝子発現を評価した。

[試験方法]

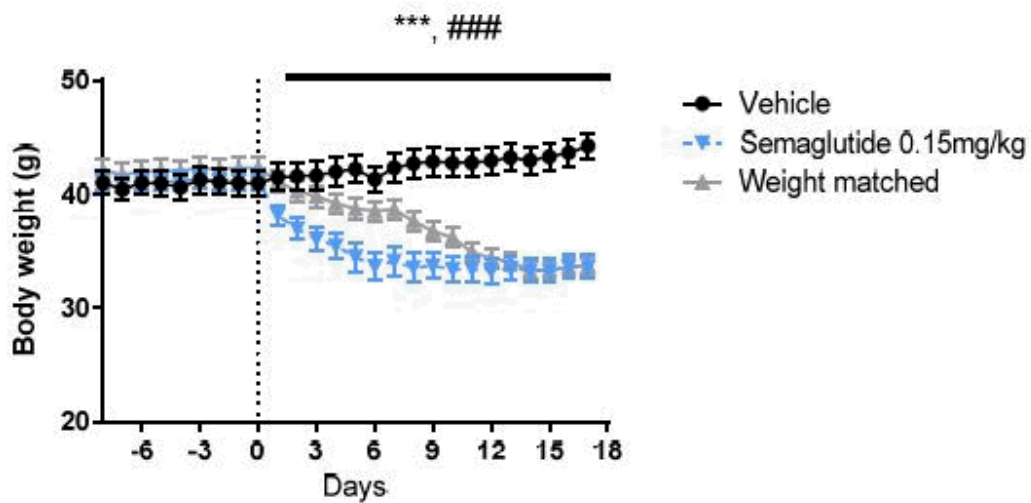
雄性 C57Bl/6J-DIO マウス (Jackson Laboratories 社、米国) (n=12) にセマグルチドの 12.2 nmol/kg (0.05 mg/kg) を Day 0 (初回投与日) に、24.3 nmol/kg (0.10 mg/kg) を Day 1 に、36.5 nmol/kg (0.15 mg/kg) を Day 2~17 に、それぞれ 1 日 1 回皮下投与した。対照群には溶媒 (pH : 7.4、50 mmol/L リン酸、70 mmol/L 塩化ナトリウム、0.05%ポリソルベート 80) を投与 (n=12) し、視床下部における重要な食欲及び空腹シグナルについてアップ及びダウンレギュレーション作用を示すことができるよう、セマグルチド投与動物の体重に合わせた溶媒投与群 (n=12) を組み入れた。

試験全体をとおして、体重及び摂餌量を毎日測定した。試験終了時に体重を測定し、曝露測定用に血液試料を採取し、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) により切り出した ARC 及び室傍核 (PVN) における遺伝子発現解析用に脳を採取した。

ARC は主として体重調節シグナルの統合に中心的な役割を果たし、摂餌に対して反対の作用を有する 2 種類の重要なニューロン群を含む。AgRP/NPY ニューロンは強力かつ中心的な空腹メディエーターである一方、POMC/CART ニューロンは重要な満腹作用を提供する⁷。ARC 及び PVN におけるこれら遺伝子の発現を、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) によって分析した。各遺伝子及び各試料についてサイクル数 (Cq) を測定し、式 $2^{-(Cq-Cq_{min})}$ に従い、各遺伝子及び各試料の相対発現値を計算した。ここで、Cq_{min} は試料をとおして遺伝子の最低 Cq 値である。試料中の 6 種類のハウスキーピング遺伝子 (HKG) の相対発現値の幾何平均を計算することにより、数値スケーリングファクターを決定した。続いて、各遺伝子及び試料の相対的発現値を本試験の試料に特異的なスケーリングファクターで割り、試験におけるリボ核酸 (RNA) 含有量の差異を正規化した。

[結果]

セマグルチド [36.5 nmol/kg (0.15 mg/kg)] を DIO マウスに投与したところ、ベースラインからの体重が 18%減少した (溶媒に対して p<0.001) ([図 2.6.2-25](#))。

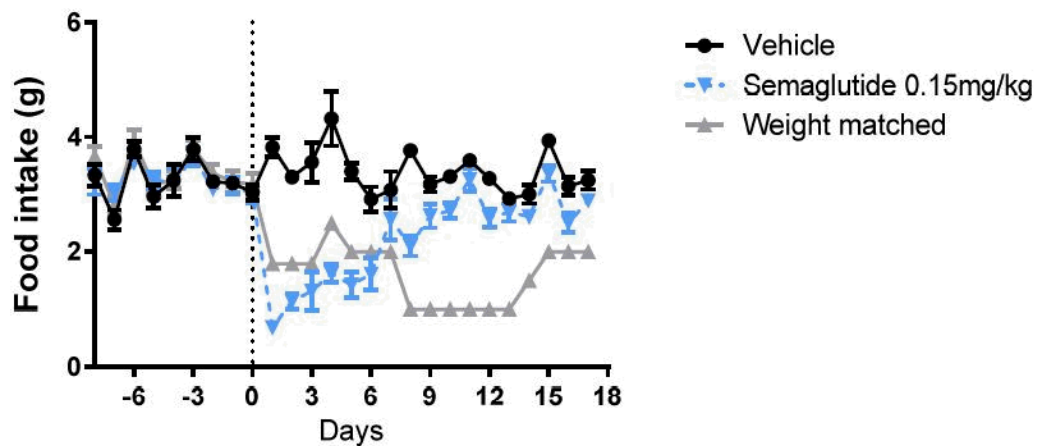


The vertical dotted line indicates dosing start. Mean $\pm$ SEM (n=12)

***p<0.001 significant effect of semaglutide, ###p<0.001 significant effect of food restriction (weight matched group) both compared with vehicle group.

図 2.6.2-25 DIO マウスの体重に及ぼすセマグルチドの効果

セマグルチドでは、試験開始時に摂餌量の減少が最も大きかった (図 2.6.2-26)。

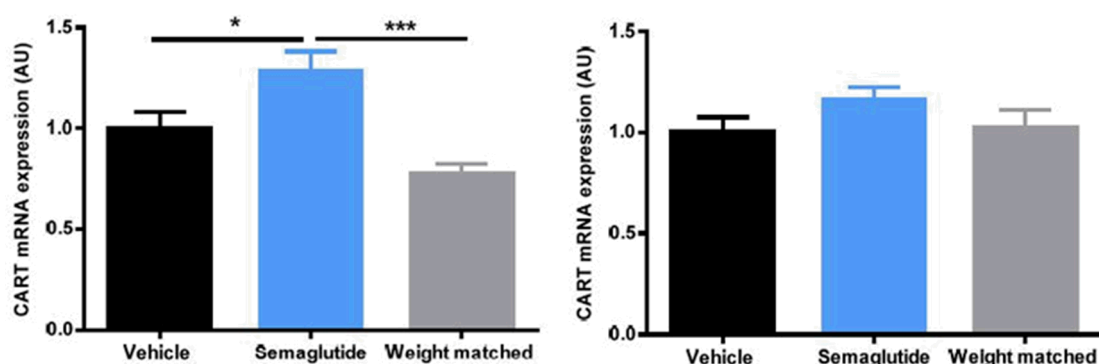


Means $\pm$ SEM, n=12. The vertical dotted line indicates dosing start.

図 2.6.2-26 DIO マウスの摂餌量に及ぼすセマグルチドの効果

満腹ペプチドである CART の mRNA は、溶媒群 (1.2 倍、p<0.05) 及び体重調整群 (1.7 倍、p<0.001) と比較して、セマグルチド投与動物の ARC で増加したが (図 2.6.2-27)、POMC の mRNA 発現量に統計学的有意な変化はみられなかった (図 2.6.2-28)。空腹ペプチドである AgRP の mRNA (図 2.6.2-29) 及び NPY の mRNA (図 2.6.2-30) は、セマグルチド群 (NPY : 1.3 倍、p<0.01、AgRP : 1.5 倍、p<0.05)

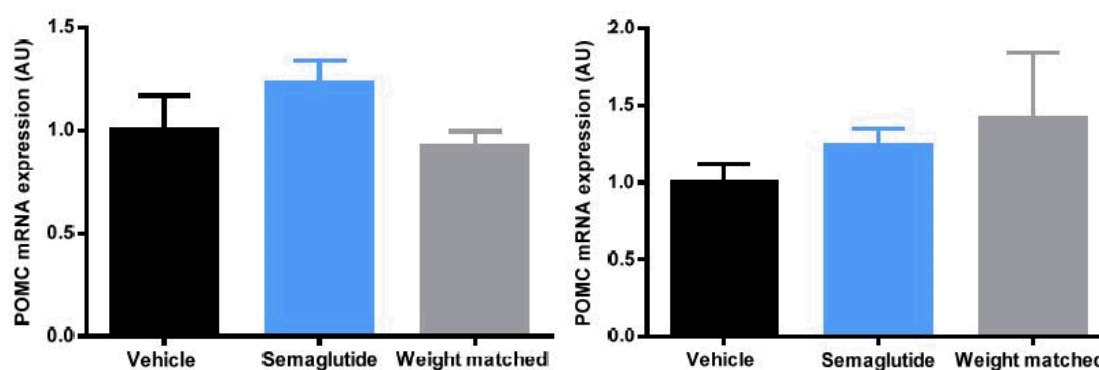
及び溶媒群（NPY：2 倍、 $p<0.001$ 、AgRP：2.8 倍、 $p<0.001$ ）と比較して体重調整群の ARC で増加した。セマグルチド投与 DIO マウス又は体重調整 DIO マウスによる食餌制限後の PVN に作用は認められなかった（[図 2.6.2-27](#)～[図 2.6.2-30](#)）。



Means of the relative expression $\pm$ SEM to the values of vehicle.

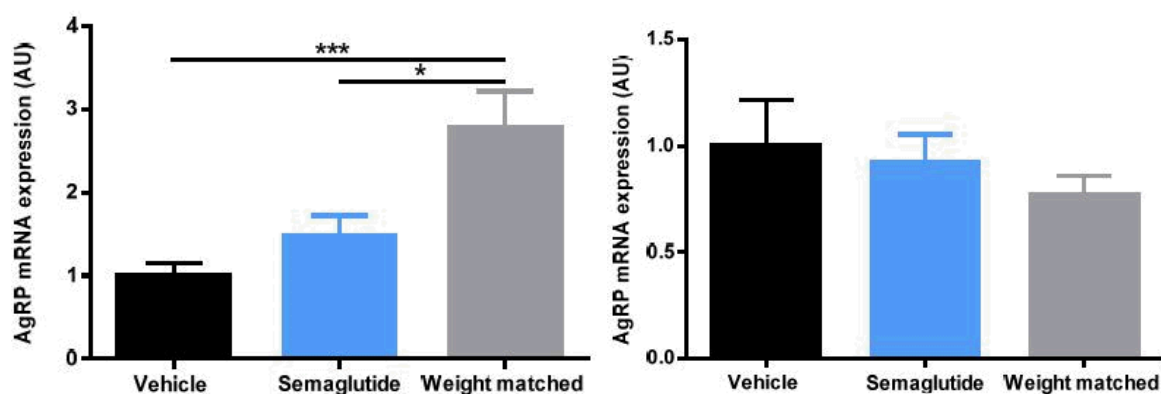
* $p<0.05$ semaglutide vs vehicle, ** $p<0.01$ semaglutide vs weight matched.

図 2.6.2-27 DIO マウスにおける ARC（左図）及び PVN（右図）の CART mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用



Means of the relative expression $\pm$ SEM to the values of vehicle.

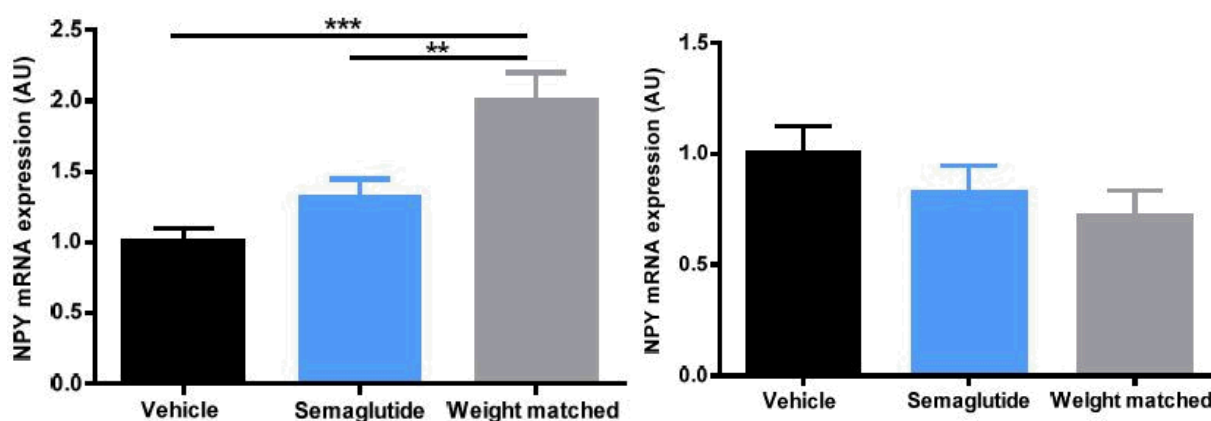
図 2.6.2-28 DIO マウスにおける ARC（左図）及び PVN（右図）の POMC mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用



Means of the relative expression $\pm$ SEM to the values of vehicle.

* $p < 0.05$ semaglutide vs weight matched, *** $p < 0.001$ vehicle vs weight matched.

図 2.6.2-29 DIO マウスにおける ARC (左図) 及び PVN (右図) の AgRP mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用



Means of the relative expression $\pm$ SEM to the values of vehicle.

** $p < 0.01$ semaglutide vs weight matched, *** $p < 0.001$ vehicle vs weight matched

図 2.6.2-30 DIO マウスにおける ARC (左図) 及び PVN (右図) の NPY mRNA 発現量に及ぼすセマグルチドの作用

[結論]

セマグルチドの 18 日間反復投与により、DIO マウスにおける摂餌量及び体重の有意な低下が認められた。このことは、満腹ペプチドである CART の mRNA 発現の増加及び視床下部の ARC における空腹ペプチドである NPY 及び AgRP の mRNA 発現量の低下と関連していた。

2.6.2.3.4 LDL 受容体ノックアウトマウスにおけるアテローム性動脈硬化に及ぼす効果 (Module 2.6.3.3, GuRa150803)

[目的]

破綻しそうな不安定プラークが認められないことを除き、ヒトとほぼ同様のアテローム性動脈硬化様病変を発症する、十分な特性解析がなされた動物モデルである LDL 受容体 (LDLr) ノックアウト (KO) マウスのアテローム性動脈硬化症の進行に対するセマグルチドの効果を評価した。主要目的として、En Face 解析により評価したプラーク病変面積、血漿中 T-chol 及び TG 値ならびに胸部大動脈における炎症マーカーの遺伝子発現量を評価した。

[試験方法]

11～13 週齢の LDLr KO マウス (n=10～23/群) (Jackson Laboratories 社、米国) を使用した。標準飼料 (CH) を与えた 1 群に溶媒を (n=10) 、また、大動脈プラーク形成促進のため、脂肪、炭水化物及びコレステロールを含む高カロリー飼料 [ウェスタンダイエット (WD) 、Research Diets 社、米国] を与えた動物に、溶媒 (pH=7.4 ; 50 mmol/L リン酸 ; 70 mmol/L 塩化ナトリウム ; 0.05%ポリソルベート 80) (n=17) 又は 3 用量のセマグルチド [0.97、2.9 及び 14.6 nmol/kg (4、12 及び 60 µg/kg) 、それぞれ n=22、23 及び 21] を、それぞれ 1 日 1 回 17 週間皮下投与した。

体重を毎週 1 回測定した。解剖時の血漿中 TG、T-chol、VLDL、LDL 及び HDL の各コレステロールを測定し、胸部大動脈を摘出し、プラーク病変面積を定量した。一元配置 ANOVA 実施後、多重比較用に Tukey の post hoc 検定による統計解析を実施した。p<0.05 を統計的に有意とみなした。

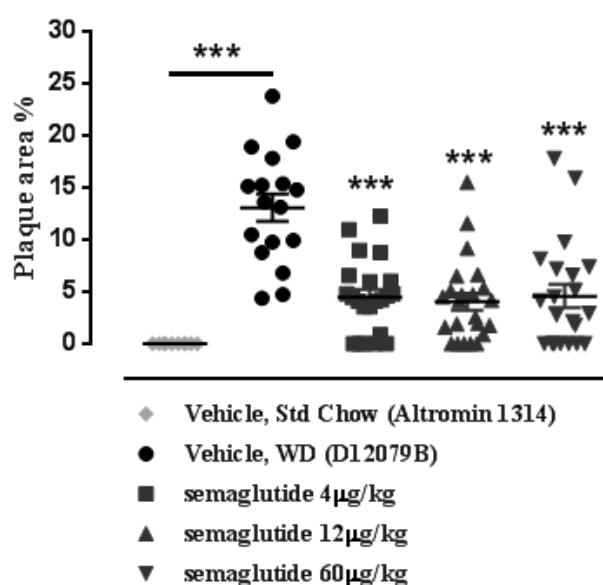
プラーク面積を測定するため、大動脈を心臓 (根部) から第 8 肋骨まで切除し、縦方向に切断し、画像分析ソフトウェア Visiomorph (Visiopharm A/S、ドイツ) を用いて En Face 解析を行った。En Face 解析後、RNA を大動脈から抽出し、複数の炎症マーカーの発現量を評価した。特に炎症反応、心血管疾患、臓器損傷及び結合組織障害マーカーからなる心臓代謝疾患パスウェイを表す外部及び内部参照に基づき選択した 275 遺伝子プローブからなるカスタム作製型 CodeSet (AME Bioscience 社、英国) を用いて、試料をハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、プローブ/標的複合体をカートリッジにならべて固定化し、GEN2 nCounter Digital Analyzer (Nanostring Technologies Inc.社、米国) を用いてスキャンし、各標的遺伝子を一斉測定した。全試料を CodeSet に存在するコントロール用スパイクイン RNA 及び HKG (Actb、B2m、Gapdh、Hprt、Ppia 及び Rps18) を nSolver Analysis Software 2.5

(Nanostring Technologies Inc.社、米国) で正規化し、ハイブリダイゼーション、精製、結合効率、及びその他の実験上のばらつきを調整した。正規化した値を log₂ 変換し、統計解析に使用した。この最初のデータセットを生データとした。群平均発現の最大値が 4.5 未満である遺伝子 (log₂ 正規化による数)

は、以降の解析から（解析前に）除外した。ノンパラメトリックな Wilcoxon 検定により溶媒投与 WD 給餌群（溶媒 WD）との群間比較を行った。

[結果]

アテローム性動脈硬化症を発症する WD を与えたアテローム性硬化症前段階の雄性 LDLr KO マウスにおいて、セマグルチドは、全用量で大動脈プラーク病変の進展が有意に抑制された（溶媒 WD : $13.1 \pm 1.3\%$ 、 0.97 nmol/kg ($4 \mu\text{g/kg}$) : $4.5 \pm 0.8\%$ 、 2.9 nmol/kg ($12 \mu\text{g/kg}$) : $4.0 \pm 0.8\%$ 、 14.6 nmol/kg ($60 \mu\text{g/kg}$) : $4.6 \pm 1.1\%$; 全用量で $p < 0.0001$) (図 2.6.2-31)。



Mean $\pm$ SEM (n=10-23)

*** $p < 0.0001$ vs vehicle, WD

Plaque area (%) was calculated as the ratio of plaque lesion area to total aortic arch area (measured from the root of the heart to 8th thoracic rib) and multiplied by 100.

図 2.6.2-31 LDLr^{-/-}マウスにおけるセマグルチド投与後の大動脈プラーク病変

セマグルチドの 0.97 及び 2.9 nmol/kg (4 及び $12 \mu\text{g/kg}$) 投与群の体重は対照群（溶媒 WD）と同様であった（溶媒 WD : $35.9 \pm 1.1 \text{ g}$ 、 0.97 nmol/kg ($4 \mu\text{g/kg}$) : $36.1 \pm 0.8 \text{ g}$ 、 2.9 nmol/kg ($12 \mu\text{g/kg}$) : $34.5 \pm 0.8 \text{ g}$; 全群で有意差なし)、セマグルチドの最高用量群でのみ、試験終了時に有意な低値が認められた ($30.5 \pm 0.7 \text{ g}$; $p < 0.0001$)。

試験終了時に、血漿中リポタンパク質コレステロール値を分析した。溶媒 WD 群では、標準飼料を与えた動物（溶媒 CH 群）と比較して、T-chol、VLDL コレステロール、LDL コレステロール及び HDL コレステロール値の有意な高値が認められた。セマグルチド投与群では、統計学的に有意ではないも

の、溶媒 WD 群と比較し T-chol 及びコレステロールリポタンパク質（VLDL、LDL 及び HDL）の低下傾向がみられた（データを Module 4.2.1.2, GuRa150803 に示す）。溶媒 WD 群では、溶媒 CH 群と比較して血漿中 TG の有意な増加が示されたが、セマグルチドの最高用量〔14.6 nmol/kg（60 µg/kg）〕投与群では、溶媒 WD 群と比較し有意な減少が示された（データを Module 4.2.1.2, GuRa150803 に示す）。

大動脈の遺伝子発現解析において、溶媒 WD 群では解析した 275 遺伝子中 112 遺伝子の mRNA 発現に有意な変動（アップ又はダウンレギュレーション）が認められた。WD 単独の作用と比較して、セマグルチド投与により、有意な変動を示す遺伝子群の数は抑制され、セマグルチドの 0.97 nmol/kg（4 µg/kg）では 87 遺伝子、2.9 nmol/kg（12 µg/kg）では 93 遺伝子、及び 14.6 nmol/kg（60 µg/kg）では 90 遺伝子が制御を受けた。オステオポンチン及びインターロイキン-6（IL-6）mRNA の WD 誘導性アップレギュレーションは、セマグルチド投与により部分的ではあるが有意に抑制された（データを Module 4.2.1.2, GuRa150803 に示す）。オステオポンチンは、動物モデルのアテローム性動脈硬化症と関連しており、臨床的には冠動脈アテローム性動脈硬化症及び心血管疾患と関連している⁸。臨床的に、オステオポンチンは心血管疾患の潜在的なバイオマーカーであることが介入研究^{9, 10}により示唆されている。IL-6 は、2 型糖尿病患者において心血管疾患を予測するバイオマーカーとして同定されている^{11, 12}。

[結論]

アテローム性動脈硬化症の LDLr KO マウスモデルにおいて、試験したセマグルチドの 3 用量のいずれも大動脈プラーク面積の有意な減少がみられたが、最高用量でのみ試験最終時の体重の有意な減少が認められた（ $p < 0.0001$ ）。セマグルチドは、白血球動員、接着及び遊走に関連した炎症パスウェイを示すタンパク質をコードする大動脈における遺伝子発現の WD 誘導性変化をある程度抑制した。以上のデータから、遺伝子制御及び大動脈プラーク病変面積の減少と体重に及ぼす効果の関連性は限定的なものであることが示唆される。本所見により抗炎症過程におけるセマグルチドの役割が支持され、セマグルチドの抗炎症作用が WD 誘発大動脈プラーク形成の有意な抑制に関する機序として考えられた。

2.6.2.3.5 セマグルチドを投与した ApoE KO マウスにおけるアテローム性動脈硬化症に及ぼす効果 (Module 2.6.3.3, BidR150901)

[目的]

破綻しそうな不安定プラークが認められないことを除き、ヒトとほぼ同様のアテローム性動脈硬化様病変を発症する、十分な特性解析がなされた動物モデルであるアポリポタンパク質 E (ApoE) KO マウスを用いて、アテローム性動脈硬化症の進行に対するセマグルチドの効果を評価した。主要エンドポイントとして、大動脈弓のプラーク病変領域面積を評価した。

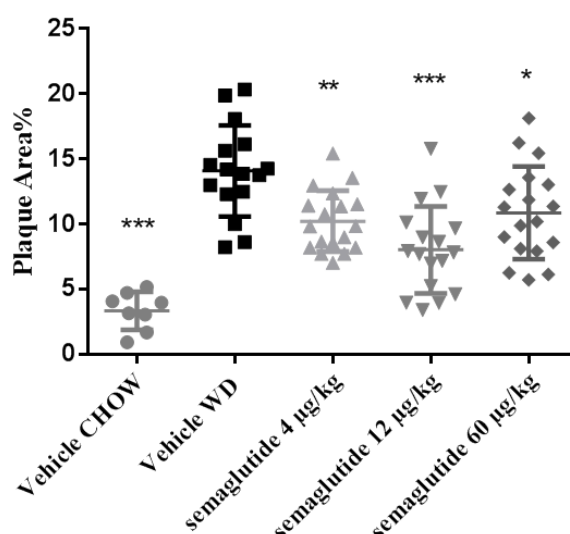
[試験方法]

80 匹の 9~12 週齢の雌性 ApoE KO マウス (Taconic 社、デンマーク) を使用した。標準飼料を与えた 1 群に溶媒を (CH 溶媒群、n=8) 、また、WD (Research Diets 社、米国) を与えた動物 (n=18/群) に、溶媒 (溶媒 WD 群、50 mmol/L リン酸、70 mmol/L 塩化ナトリウム、0.05%ポリソルベート 80、pH=7.4) 又はセマグルチド [0.97、2.9 又は 14.6 nmol/kg (4、12 又は 60 µg/kg)] を、それぞれ 1 日 1 回 13 週間皮下投与した。体重を毎週測定し、ベースライン時 (投与前) 、投与後 6 週間及び投与終了時での TG を測定するため、血液試料を採取した。胸部大動脈部位である大動脈弓を切除し、アテローム性動脈硬化様プラーク領域を、En Face 法 (Module [2.6.2.3.4](#), GuRa150803 と同じ方法にて実施) により測定した。一元配置 ANOVA 及び多重比較として Tukey の post hoc 検定による統計解析を実施した。大動脈プラーク領域の統計解析のみ、CH 溶媒群を含めた。p<0.05 を統計的に有意とみなした。

さらに、急速凍結した大動脈弓について、統計解析及びデータ処理を組み入れた遺伝子発現解析 (Module [2.6.2.3.4](#), GuRa150803 と同様の方法にて実施) を実施した。

[結果]

アテローム性動脈硬化症の前段階の雌性 ApoE KO マウスにおいて、セマグルチドは、3 用量のいずれも大動脈におけるプラークの形成を有意に抑制した：溶媒 WD 群のプラーク面積 (14.1±0.9%) に対して、セマグルチド 0.97 nmol/kg (4 µg/kg) ではプラーク面積が 10.2±0.6% (p<0.01) 、2.9 nmol/kg (12 µg/kg) では 8.0±0.8% (p<0.001) 及び 14.6 nmol/kg (60 µg/kg) では 10.9±0.8% (p<0.01) であった ([図 2.6.2-32](#)) 。



Means ± SEM, n=8-18

***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 vs. vehicle, WD

Plaque area (%) was calculated as the ratio of plaque lesion area to total aortic arch area (measured from the root of the heart to 8th thoracic rib) and multiplied by 100.

図 2.6.2-32 ApoE KO マウスにおけるセマグルチド投与後の大動脈弓プラーク面積

試験期間中、3用量のいずれも、体重増加量は溶媒 WD 群及び溶媒 CH 群の両方よりも低かった（データを Module 4.2.1.1, BidR150901 に示す）。試験終了時の体重は、溶媒 WD 群（27.0±0.6g）と比較して、セマグルチド 0.97 nmol/kg（4 µg/kg）（23.6±0.3g）、セマグルチド 2.9 nmol/kg（12 µg/kg）（23.5±0.3g）、セマグルチド 14.6 nmol/kg（60 µg/kg）（22.3±0.3g）で有意に低く、全群で p<0.001 であった。

血漿中 TG 値はセマグルチドでわずかに低く、セマグルチドの最低用量では溶媒 WD 群より有意に低かった。

大動脈の遺伝子発現解析において、溶媒 CH 群と比較して、溶媒 WD 群では解析した 275 遺伝子中 104 の mRNA 発現に有意な変動（アップ又はダウンレギュレーション）が認められた。WD 単独の作用と比較して、セマグルチド投与により、有意な変動を示す遺伝子群の数は抑制された。すなわち、セマグルチドの 0.97 nmol/kg（4 µg/kg）では 7 遺伝子、2.9 nmol/kg（12 µg/kg）では 38 遺伝子、及び 14.6 nmol/kg（60 µg/kg）では 31 遺伝子が制御を受けた（データを Module 4.2.1.2, BidR150901 に示す）。各用量のセマグルチド投与群における体重に及ぼす効果と制御された遺伝子数を比較すると、遺伝子制御の少なくとも一部は体重に及ぼす効果とは無関係であることが示唆される。セマグルチドにより制御された遺伝子は、主として白血球動員、接着及び遊走に関連したタンパク質をコードする遺伝子

であり、非臨床データから、上記遺伝子のアテローム性動脈硬化症の病理形態との関連性が示唆されている¹³。

[結論]

アテローム性動脈硬化症の ApoE KO マウスモデルにおいて、試験したセマグルチドの 3 用量のいずれにおいても大動脈プラーク面積の有意な減少が示された。セマグルチドの投与により、多くの遺伝子発現、特に免疫細胞又は細胞外マトリックスのタンパク質ターンオーバーを示すマーカーである白血球動員、接着及び遊走に関与する遺伝子に変動がみられた。各用量のセマグルチド投与群における体重に及ぼす効果と制御された遺伝子数を比較すると、遺伝子制御の少なくとも一部は体重に及ぼす効果とは無関係であることが示唆される。以上の所見は、抗炎症過程におけるセマグルチドの役割を支持するものであり、セマグルチドの抗炎症作用が WD 誘発性大動脈プラーク形成の有意な抑制に関する機序として考えられた。

2.6.2.3.6 若齢未成熟 LYD ブタの摂餌量に及ぼす効果 (Module 2.6.3.3, MmLa050901)

[目的]

セマグルチド投与若齢未成熟ブタにおける、摂餌量減少に関する効力及び作用持続時間を評価した。

[試験方法]

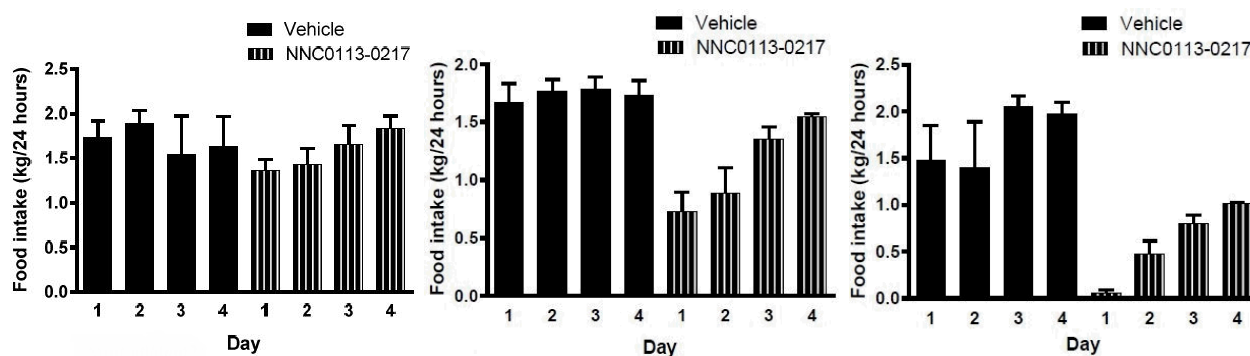
3 箇月齢、体重約 35～40kg の雌性ランドレース・ヨークシャー・デュロック交配種 (LYD) ブタ (Gundsøgård 社、デンマーク) を使用した。試験中は自由摂餌とし、個体毎に摂餌量を測定するため、個別にペンに収容した。

動物に 1、3 又は 10 nmol/kg (4.1、12.3 又は 41.1 µg/kg) のセマグルチド (n=3/用量) 又は溶媒 (50 mmol/L K₂HPO₄, pH 8, 0.05% Tween 80) (セマグルチド各用量に対する対照群としてそれぞれ n=3) を単回皮下投与し、摂餌量を 4 日間測定した。また、摂餌量測定開始時の血漿中濃度が定常状態となるよう、2 日に 1 回の反復投与、すなわち、第-5 日にセマグルチド 10 nmol/kg (41.1 µg/kg)、第-3 日に 4.5 nmol/kg (20.6 µg/kg)、第-1 日及び 1 日の両日に 5 nmol/kg (23.9 µg/kg) (n=6) 又は溶媒 (n=6) を動物に投与し、第 1 日 (投与後 144～168 時間)、第 2 日 (168～192 時間) 及び 6～8 日 (初回投与後 264～336 時間) に摂餌量を測定した。

摂餌量は、各試験日の平均値 (kg/24 時間) ±SEM を測定値とし、溶媒投与群とセマグルチド投与群の 24 時間摂餌量を比較した (n>3 の群のみ)。統計解析には、Student の t 検定ならびに二元配置 ANOVA 及び Bonferroni の多重比較検定を使用した。p<0.05 を統計的に有意とみなした。

[結果]

セマグルチド 1 nmol/kg (4.1 µg/kg) の単回投与により、第 1 及び 2 日の摂餌量 (kg/24 時間) は、それぞれ溶媒の約 79% 及び 76% と軽微な減少が認められたが、第 3 及び 4 日では、摂餌量の減少は認められなかった (それぞれ溶媒の 108% 及び 112%)。セマグルチド 3 nmol/kg (12.3 µg/kg) の単回投与により、投与後第 1、2、3 及び 4 日の摂餌量 (kg/24 時間) は、それぞれ溶媒の約 44、50、76 及び 90% と減少が認められた。セマグルチド 10 nmol/kg (41.1 µg/kg) の単回投与により、投与後第 1、2、3 及び 4 日の摂餌量 (kg/24 時間) は、それぞれ溶媒の約 4、34、39 及び 52% と減少が認められた (図 2.6.2-33)。



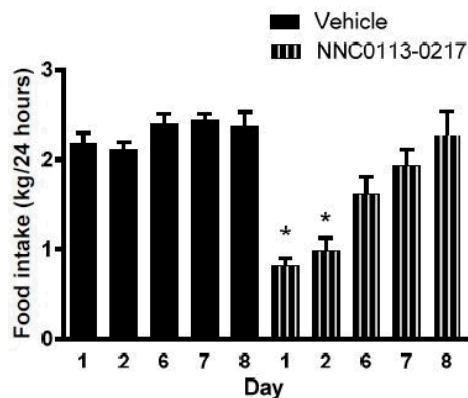
NNC0113-0217: Semaglutide,

Dosing 1 (left panel), 3 (centre panel) or 10 (right panel) nmol/kg on day 1

Mean±SEM, n=3, No statistical analysis applied

図 2.6.2-33 セマグルチド単回皮下投与時のブタにおける摂餌量

摂餌量に及ぼす効果は時間依存性であり (時間及び投与の両方について、二元配置 ANOVA : $p < 0.001$)、第 1 及び 2 日に有意な効果がみられた (Bonferroni の post hoc 検定 : $p < 0.05$) (図 2.6.2-34)。セマグルチドの反復投与では、最終投与後 7 日間にわたり摂餌量が減少した。平均摂餌量 (kg/24 時間) は、第 1、2、6 及び 7 日にそれぞれ溶媒対照の約 38、47、67 及び 80% と有意に減少した (各日の対照に対する t 検定 : $p < 0.05$) が、最終投与後第 8 日では、摂餌量の減少はみられなかった。



NNC0113-0217: Semaglutide, Dosing 10, 4.5, 5 and 5 nmol/kg on day -5, -3, -1 and 1, respectively.

Mean $\pm$ SEM (n=6), * p<0.05, Two-way ANOVA with Bonferoni's post test.

図 2.6.2-34 セマグルチド反復皮下投与時のブタにおける摂餌量

[結論]

本動物モデルにおいて、セマグルチド単回投与後に顕著な摂餌量減少が認められ、3 及び 10 nmol/kg (12.3 及び 41.1 μ g/kg) では、この効果が最低 4 日間持続した。セマグルチドのブタの摂餌量に及ぼす影響は有意かつ時間依存的であり、最大 7 日間持続した。

2.6.2.4 安全性薬理試験

セマグルチドの安全性薬理試験は、ICH S7A 及び ICH S7B ガイドライン^{6,14}に記載の原則に準拠して実施した。全ての試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準 (GLP) に準拠して実施し、重要な器官機能〔中枢神経系 (CNS)、呼吸器系及び心血管系〕に対するセマグルチドの影響を検討するよう設計した。また、GLP-1 受容体作動薬で既知のラット利尿作用¹⁵を評価するために、腎機能試験も実施した。さらに、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、ECG により心臓電気生理学をモニターした。

心臓カリウムチャネル (hERG) 阻害、及び単離ウサギプルキンエ繊維の活動電位記録に関する *in vitro* 試験を実施し、QT 延長誘発性を評価した。*in vivo* 試験として、雄性 SD 系ラット及び覚醒・非拘束下の雄性カニクイザルを用いてテレメトリー試験を実施した。

ラットを用いた CNS に及ぼす影響に関する試験 (Irwin 試験) の衛星群動物及びカニクイザルを用いた心血管系試験の主試験動物に曝露測定を組み入れて、投与動物の曝露を確認し、曝露と潜在的な影響との相関性を検討した。

セマグルチドの *in vivo* 安全性薬理試験で得られた曝露量データ及び無影響量を表 2.6.2-5 に示す。また、日本人 2 型糖尿病患者における曝露量との比も示す。ラットにおける曝露量は Irwin 試験 (206343) でのみ測定されており、当該試験における曝露量を呼吸器系に及ぼす影響を検討した試験及び腎機能に及ぼす影響を検討した試験においても用いた。

表 2.6.2-5 セマグルチドの安全性薬理試験における曝露量比及び無影響量

Study No.	Test	Dose level mg/kg	Measured doses mg/kg	C _{max} nmol/L	AUC _{tau} h*nmol/L	Ratio to human** exposure C _{max} /C _{max}	Ratio to human** exposure C _{max} /C _{avg}	Ratio to human** exposure AUC _{tau} /AUC
206443	Irwin test, rat	0.01 0.03 0.1	0.001 NOEL 0.022 NOAEL 0.095	0.73 14.0 47.2	5.94 195 757	0.02 0.4 1.2	0.02 0.4 1.3	0.01 0.2 0.9
206444	Renal function, rat	0.01 0.03 0.1	0.005 NOAEL [#] 0.023 0.089	n/a	n/a	0.02* 0.4* 1.2*	0.02* 0.4* 1.3*	0.01* 0.2* 0.9*
206518	Respiratory function, rat	0.01 0.03 0.1	0.005 0.021 0.084 NOEL/NOAEL	n/a	n/a	0.02* 0.4* 1.2*	0.02* 0.4* 1.3*	0.01* 0.2* 0.9*
206442	Cardio-vascular function, NHP	0.03 0.1 0.5	0.02 0.076 0.468 NOEL/NOAEL	23 77 440	n/a	0.6 2.0 11	0.7 2.2 13	n/a

n/a: not available – no exposure samples in the study, [#] NOEL < 0.005 mg/kg, * based on 206443 data, ** Mean human exposure in Japanese type 2 diabetics at 1 mg/week based on Japanese population PK model: C_{max} = 39.0 nmol/L, C_{avg} = 35.3 nmol/L and AUC_{0-168h} = 5930 h*nmol/L (AUC_{0-24h} in animals was multiplied by 7 for comparison to human AUC_{0-168h})

2.6.2.4.1 中枢神経系 (CNS) に及ぼす影響

2.6.2.4.1.1 ラットを用いた Irwin 試験 (Module 2.6.3.4, 206443)

本試験の目的は、雄性 SD 系ラットの行動及び生理状態全般に及ぼす影響を検討するために設計した多次元観察試験により、セマグルチドを 0.24、5.3 及び 23.1 nmol/kg (0.001、0.022 及び 0.095 mg/kg) [理論値として 2.4、7.3 及び 24.3 nmol/kg (0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg)] の用量で皮下投与した時の急性期の影響を評価することである。ラットに溶媒、被験物質又は陽性対照 (クロルプロマジン、2 mg/kg) を静脈内投与し、投与後 2、4、8 及び 24 時間に観察した。

全ての投与動物で曝露が認められた。溶媒投与動物では、曝露は認められなかった。

セマグルチドを 0.24 又は 5.3 nmol/kg (0.001 又は 0.022 mg/kg) を投与したラットでは、行動又は生理状態全般に有意な変化は認められなかった。23.1 nmol/kg (0.095 mg/kg) を投与したラットでは、投与後 2 及び 4 時間に異常歩行 (つま先歩行)、接触時の反応低下、受動性、排尿頻度の増加、鼻部の

汚れ、嗜眠及び立毛が観察され、投与後 24 時間後でも排尿頻度の増加及び受動性の発現頻度の増加が認められた。

結論として、セマグルチドを 0.24 又は 5.3 nmol/kg (0.001 及び 0.022 mg/kg) の用量でラットへ投与した時に認められた行動変化は軽度であり、主に薬理作用に関連し、有害ではないものと考えられたが、23.1 nmol/kg (0.095 mg/kg) での影響は重症度及び頻度により有害と考えられた。活動性の低下は他の GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 を投与されたラットでも認められており¹⁶、ヒトとの関連性はないものと考えられる。NOAEL は、23.1 nmol/kg (0.095 mg/kg) で観察された一般状態変化に基づき、5.3 nmol/kg (0.022 mg/kg) であると考えられた。

2.6.2.4.2 呼吸器系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1 ラットを用いた呼吸器系に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206518)

本試験の目的は、全身プレチスモグラフィーを用いて覚醒・非拘束下の雄性 SD 系ラットの分時換気回数、一回換気量及び分時換気量に対する、セマグルチド 1.2、5.1 及び 20.4 nmol/kg (0.005、0.021 及び 0.084 mg/kg) [理論値として 2.4、7.3 及び 24.3 nmol/kg (0.01、0.03 及び 0.1 mg/kg)] 皮下投与時の急性期の影響を評価することである。投与後 0.5、1、2、3、8 及び 24 時間に呼吸器評価項目を測定した。セマグルチドはいずれの用量でも呼吸機能に影響を及ぼさなかった。NOAEL は 20.4 nmol/kg (0.084 mg/kg) であった。

2.6.2.4.3 心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.3.1 心臓カリウムチャネル (hERG) 阻害誘発性試験 (Module 2.6.3.4, 206446)

hERG テールを阻害する化合物はヒトにおいて心臓活動電位の延長、すなわち QT 間隔を延長する可能性が示されている。したがって、本試験の目的はパッチクランプ法を用いて hERG cDNA が安定的にトランスフェクトされた HEK293 細胞で計測した hERG テール電流に及ぼすセマグルチド [7.8 µmol/L (32.1 mg/L)、理論濃度 10 µmol/L (41.1 mg/L)] の影響を評価することである。細胞をレコーディングチャンバーにトランスフェクトし、室温で洗浄液により連続灌流した。細胞を最初に -80 mV でクランプした。電流は、膜電位を +20 mV まで、次いで -50 mV (テール電流) までステップすることにより惹起した。セマグルチドの影響を 4 細胞で検討した。セマグルチドを 7.8 µmol/L (32.1 mg/L) の濃度 [1 mg/週の日本人最大臨床用量での血漿中平均薬物濃度 (C_{av}) の 221 倍高い濃度に相当] で処理したが、hERG テール電流を阻害しないことが結論付けられた。

2.6.2.4.3.2 活動電位持続時間 (APD) に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206445)

本試験の目的は、単離ウサギプルキンエ線維を用いて心臓活動電位に及ぼす影響を検討することにより、心筋イオンチャネルに対するセマグルチドの影響を評価することである。プルキンエ繊維調製

物を、標準的な試験方法により 0.5、1 及び 3 Hz で電氣的にペーシングした。本試験は、段階的に濃度を増加したセマグルチドを有する被験物質群〔0.1、1 及び 8.2 $\mu\text{mol/L}$ (0.41、4.1 及び 33.7 mg/L) ; n=4 繊維〕及び溶媒対照群 (0.1%逆浸透水 ; n=4 繊維) の 2 群で構成される。

本試験系において、遊離血漿中濃度として最大 8.2 $\mu\text{mol/L}$ (33.7 mg/L) [理論濃度 : 10 $\mu\text{mol/L}$ (41.1 mg/L)] までのセマグルチドを処理したが、活動電位評価項目〔静止膜電位 (RMP)、不安定狭心症 (UA)、最大拡張期電位 (MRD)、60%再分極 APD (APD60)、90%再分極 APD (APD90) 又は三角測量〕に対する影響は認められなかった。したがって、セマグルチドは、活動電位を生成する心臓イオンチャネルに直接的な影響を及ぼさないものと考えられた。本試験におけるセマグルチドの最高濃度は、日本人最大臨床用量である 1 mg/週の C_{avg} の 232 倍高い濃度に相当する。

2.6.2.4.3.3 覚醒カニクイザルを用いたテレメトリー計測による心血管系評価項目に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206442)

本試験の目的は、心血管機能に及ぼすセマグルチドの急性期の影響を評価することである。テレメトリートランスミッターを装着した雄性カニクイザルに段階的に用量を増加したセマグルチド又は溶媒を皮下投与した。4 頭に対して、第 1 日に 4.9 nmol/kg (0.02 mg/kg) [理論用量 : 7.3 nmol/kg (0.03 mg/kg)]、第 3 日に 19.4 nmol/kg (0.08 mg/kg) [理論用量 : 24.3 nmol/kg (0.1 mg/kg)]、第 5 日に 114.3 nmol/kg (0.47 mg/kg) [理論用量 : 121.5 nmol/kg (0.5 mg/kg)] を投与し、同一投与時期に別の 4 頭に対して溶媒を投与した。血行動態 (動脈圧) データ及び第 2 誘導 (Lead II) による ECG データについて、投与前 0.5 時間から投与後 46 時間まで連続的に収集した。テレメトリーデータを数時点解析し、セマグルチドの各用量について、同一時間の溶媒投与のものと比較した。114.3 nmol/kg (0.47 mg/kg) のセマグルチドを投与された動物のリズム及び形態の変化、ならびにそれぞれのベースラインデータについて ECG 波形を検討した。

投与動物の全例で曝露が確認された。溶媒投与動物では曝露は認められなかった。4.9、19.4 又は 114.3 nmol/kg (0.02、0.08 又は 0.47 mg/kg) のセマグルチドを投与したが、一般状態変化は認められなかった。動脈圧、心拍数及び第 2 誘導によるすべての ECG 評価項目 (RR、PR、QT、QTcF 及び QTcQ 間隔ならびに QRS 時間) について、セマグルチド投与動物は対照群と比較して影響を受けなかった。ECG 波形の形態及びリズムは、114.3 nmol/kg (0.47 mg/kg) のセマグルチドを投与後 22 時間まで影響を受けなかった。動脈圧及び心拍数は、全セマグルチド投与群で減少した。しかしながら、この減少はセマグルチド投与動物の投与前値が高かったことにより生じたものであることから、投与に関連しないものと考えられた。NOAEL は最高用量である 114.3 nmol/kg (0.47 mg/kg) と考えられた。

2.6.2.4.3.4 カニクイザルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験における ECG 評価 (Module 2.6.7.7.H, 207288)

第 13、26 及び 52 週に、カニクイザル [2.4、14.6 及び 87.5 nmol/kg (0.01、0.06 及び 0.36 mg/kg) の週 2 回皮下投与] を用いた 52 週間反復投与毒性試験における心血管エンドポイントを ECG により評価した。また、4 週間の回復群動物も ECG を記録した。拘束下で動物に投与後、約 24 時間にわたり第 2 誘導による ECG データを記録した。

心臓の電気生理学は、全体的に投与による影響を受けないものと考えられた。個体別の波形において、洞頻脈を含み、PR 間隔の延長 (> 75msec) を伴う異常が、試験中に対照群を含む全群の多数の動物で認められた。上記の症状の大部分は短期間に認められたものであり、すべての記録で認められたものではなかったため、投与に関連しないものと考えられた。87.5 nmol/kg (0.36 mg/kg) を投与した雌の 1/8 頭で、投与第 13 週に 2 回の洞頻脈エピソードを示す二段脈 (bigeminy rhythm) が、その後第 26 週には連続性の左脚ブロック波形が認められ、第 52 週でも同様に認められた。当該動物では、ECG に関連した一般状態変化を示さず、病理組織学的検査で対応する変化は認められなかった。心臓ブロックはサル及びヒトで時折認められ^{17,18}、大半はその他の根本的な心疾患の結果として生じるものである¹⁸。しかしながら、試験中に変化が進行したことから、投与との関連性を否定できなかった。0.36 mg/kg 群の雌 1 頭で連続性の左脚ブロック波形が認められたことから、本試験における NOAEL は中用量である 14.6 nmol/kg (0.06 mg/kg) (週 2 回投与) と考えられた。

2.6.2.4.4 腎機能に及ぼす影響

2.6.2.4.4.1 ラットを用いた腎機能に及ぼす影響に関する試験 (Module 2.6.3.4, 206444)

本試験の目的は、1.2、5.6 及び 21.6 nmol/kg (0.005、0.023 及び 0.089 mg/kg) の用量でセマグルチドをラットに皮下投与した時の、尿中 pH、尿量ならびに尿中ナトリウム、カリウム及び塩化物の排泄量に及ぼすセマグルチドの急性期の影響を評価することである。セマグルチド又は溶媒を皮下投与した。投与後 0~8 及び 8~24 時間に尿試料を採取し、分析に供した。

5.6 及び 21.6 nmol/kg (0.023 及び 0.089 mg/kg) のセマグルチドをラットに皮下投与した結果、投与後 0~8 時間に急性かつ有意な利尿に及ぼす影響が認められた。尿中ナトリウム、カリウム及び塩化物濃度は、投与後 0~8 時間に増加したが、以降 (投与後 8~24 時間) は減少した。このことは、ラットにおける GLP-1 受容体作動薬の既知の薬理作用である^{15,19}。NOAEL は 1.2 nmol/kg (0.005 mg/kg) と考えられた。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

セマグルチドの非臨床薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。GLP-1 受容体作動薬の薬力学的相互作用は一般的に認められていない。

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける薬理試験により、セマグルチドが、皮下投与後の複数の薬効評価動物モデルに対して用量依存的な血糖降下及び体重減少作用を有する持続性 GLP-1 受容体作動薬であることが示された。セマグルチドは、満腹及び空腹の制御に関与する脳の特定領域の GLP-1 受容体に作用し GLP-1 受容体を活性化する効力を有する。この効力から、セマグルチドの体重減少作用の一部が説明可能である。

セマグルチドは、汎用されているアテローム性動脈硬化症の動物モデル^{20,21}において、大動脈組織の大動脈プラーク形成及び炎症プロセスを抑制させた。減少したプラーク病変面積及び抗炎症作用と体重減少との関係は限定的であった。これらのデータは、心血管系に対してセマグルチドが有益な役割を果たすことを支持している。本結果はさらに複数の証拠によっても支持されている。したがって、種々の動物モデルにおいて、心血管アウトカムに対する GLP-1 受容体作動薬の有用性が認められており、例えば、心臓保護作用、アテローム性動脈硬化症の減少、プラーク安定性の増加、及び血小板機能の低下が文献で報告されている^{22,23,24}。また、GLP-1 受容体は心臓、血管系、免疫系及び腎臓に発現しており、直接的及び間接的メカニズムの両方を介して、GLP-1 による心血管及び微小血管に対する作用に関与している可能性を支持するデータが示されている^{25,26}。さらに、最近のゲノムワイド関連解析^{27,28}から、冠動脈疾患に関連する遺伝子とそのネットワークが同定されている。臨床的に、ネットワーク解析により 5 つの相互作用ネットワークが生成されたが、これらのネットワークにマッピングされる最も重要な 4 経路は脂質代謝及び炎症に関連するものであった²⁸。また、治療ターゲットバリデーションに対するゲノムアプローチにより、血糖降下作用を有する GLP-1 受容体のうち、冠状動脈性心疾患を抑制するヒト GLP-1 受容体変異体が同定されている²⁹。セマグルチドの非臨床試験データから、アテローム性動脈硬化症及び炎症の抑制が示されており、このことが、セマグルチドの心血管系アウトカム試験（3744 試験）で観察された主要な心血管イベント（MACE）のリスク低減に関する機序として考えられた。

心臓活動電位及び心臓カリウムチャネルに及ぼすセマグルチドの影響を調べるために設計した *in vitro* 安全性薬理試験では、セマグルチドがイオンチャネル及び心臓伝導系との直接相互作用を示す所見はいずれも認められなかった。試験濃度は、1 mg/週の日本人最大臨床用量での C_{avg} の少なくとも 221 倍以上に相当した。

in vivo 安全性薬理試験から、日本人最大臨床用量での C_{avg} の 13 倍高い曝露に相当する 114.3 nmol/kg (0.47 mg/kg) までの用量でセマグルチドのカニクイザルに対する忍容性が認められ、本動物種を用いたテレメトリー試験では、心血管系に対する有害な影響は認められなかった。すべてのラット試験を通じて、試験した最高用量は 23.1 nmol/kg (0.095 mg/kg) であり、日本人最大臨床用量での C_{avg} より 1.3 倍高い曝露であった。ラットでは、呼吸器系に及ぼす影響は認められなかった。ラットの Irwin CNS 試験では、試験された最高用量 [23.1 nmol/kg (0.095 mg/kg)] において、一般状態変化として歩

行異常、受動性、嗜眠、排尿頻度の増加及び立毛が認められた。さらに、活動性の低下が認められた。この影響は、GLP-1 受容体作動薬の薬理作用と関連しており、食欲減退をもたらすものであり、この影響は急性投与したその他の GLP-1 受容体作動薬でも観察されている¹⁶。

セマグルチドは、5.6 及び 21.6 nmol/kg (0.023 mg/kg 及び 0.089 mg/kg) の用量でラットに利尿作用を有することが明らかとなった。尿中ナトリウムの増加及び尿量の増加は、ラットにおける GLP-1 受容体作動薬の既知の影響である^{15,19}。しかしながら、セマグルチドを 1 日 1 回反復投与すると、上記の影響は急速に低下する¹⁹。1 及び 10 µg の内因性 GLP-1 を脳室内投与すると、ラットでは顕著なナトリウム利尿及び利尿作用が触媒されることが実証されている。本影響は、GLP-1 受容体阻害薬である exendin 9-39 により阻害されることから、本影響は GLP-1 受容体により触媒される³⁰。ヒトでは、内因性 GLP-1 はナトリウム利尿及び利尿を増加させることが示されているが、GLP-1 受容体作動薬の長期投与試験では、同様の影響は報告されていない^{31,32}。

ヒトでは、GLP-1 受容体作動薬は動脈圧を低下させ、心拍数を 1 分あたり 2~3 回増加させることが報告されている³³。カニクイザルでは、セマグルチドは、単回皮下投与後に測定した動脈圧、心拍数又は ECG 波形に検出可能な影響を及ぼさなかった。52 週間反復投与毒性試験の ECG 評価から、87.5 nmol/kg (0.36 mg/kg) のセマグルチドを投与した高用量群の雌のサルにおいて、連続性の左脚ブロック波形が認められ、第 52 週でも同様に認められた。当該動物では、ECG に関連した一般状態変化を示さず、病理組織学的検査で対応する変化は認められなかった。心臓ブロックはサル及びヒトの ECG 検査で時折認められ^{17,18}、大半はその他の根本的な心疾患の結果として生じるものである¹⁸。しかしながら、試験中に変化が進行したことから、投与との関連性を否定できなかった。したがって、52 週間毒性試験における NOAEL は、AUC に基づくと、日本人最大臨床用量である 1 mg/週の 3.6 倍の曝露にあたる 14.6 nmol/kg (0.06 mg/kg) であると考えられた。

結論として、セマグルチドは、血糖降下作用及び体重減少といった予想される薬理作用を示した。さらに、セマグルチドにより WD 誘発性アテローム性動脈硬化症を抑制し、大動脈組織の炎症を抑制することが示された。安全性薬理試験で認められた影響は、他の GLP-1 受容体作動薬でも報告されている既知の GLP-1 受容体を介した影響である、ラットにおける行動全般に対する影響ならびに尿量及び尿中組成物に限定された。本動物種の呼吸機能には影響が認められなかった。セマグルチドは、*in vitro* 試験系又は覚醒非拘束カニクイザルにおいて、心血管機能に有害な影響を及ぼさなかった。カニクイザルを長期間心血管評価したが、不整脈を有する高用量群のサル 1 頭（すなわち、サルで時折認められる左脚ブロック）を除き、心拍数又は ECG に及ぼす影響は特定されなかった。

参考文献

- ¹ Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007; 87 (4): 1409-1439.
- ² Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2012; 8 (12): 728-742.
- ³ Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng SP, Morel P, Widmann C. Cloning and Functional Expression of the Human Islet Glp-1 Receptor - Demonstration That Exendin-4 Is an Agonist and Exendin-(9-39) an Antagonist of the Receptor. *Diabetes.* 1993; 42 (11): 1678-1682.
- ⁴ Knudsen LB, Hastrup S, Underwood CR, Wulff BS, Fleckner J. Functional importance of GLP-1 receptor species and expression levels in cell lines. *Regul Pept.* 2012; 175 (1-3): 21-29.
- ⁵ Larsen MO, Wilken M, Gotfredsen CF., Carr, RD, Svendsen O, Rolin B. Mild streptozotocin diabetes in the Göttingen minipig. A novel model of moderate insulin deficiency and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E1342-E1351.
- ⁶ ICH S7A. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, S7A. Current Step 4 version. Dated 8 November 2000.
- ⁷ Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000; 404: 661-671.
- ⁸ Wolak T. Osteopontin - a multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis.* 2014;236(2):327-337.
- ⁹ Kadoglou NP, Sailer N, Moutzouoglou A, Kapelouzou A, Gerasimidis T, Liapis CD. Aggressive lipid-lowering is more effective than moderate lipid-lowering treatment in carotid plaque stabilization. *J Vasc Surg.* 2010;51(1):114-121.
- ¹⁰ Kurata M, Okura T, Irita J, Enomoto D, Nagao T, Jotoku M, et al. Angiotensin II receptor blockade with valsartan decreases plasma osteopontin levels in patients with essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 2011;25(5):334-339.
- ¹¹ Looker HC, Colombo M, Hess S, Brosnan MJ, Farran B, Dalton RN, et al. Biomarkers of rapid chronic kidney disease progression in type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2015;88(4):888-896.
- ¹² Collaboration IRGCERF, Sarwar N, Butterworth AS, Freitag DF, Gregson J, Willeit P, et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet.* 2012;379(9822):1205-1213.
- ¹³ Christian W, Heidi N. 2011 “Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options.” *Nature Medicine.* 2011;17(2):1410-1422.
- ¹⁴ ICH S7B. The Non-clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals, S7B. Current Step 4 version. Dated 12 May 2005.
- ¹⁵ Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *Eur J Pharm.* 2002;434:163-167.

- [16](#) Mack C, Laugero K, Liu Q, Jodka C, Young A, Parkes D. Therapeutic Applications of Incretin Mimetics for Metabolic Diseases: Preclinical Studies. *Drug Dev Res.* 2006;67:553–558.
- [17](#) Bristow JD, Malinow MR. Spontaneous Bundle Branch Blocks in Rhesus Monkeys. *Circ Res.* 1965;16:210-220.
- [18](#) Francia P, Balla C, Paneni F, Volpe M. Left Bundle-Branch Block - Pathophysiology, Prognosis and Clinical Management. *Clin Cardiol.* 2007;30:110-115.
- [19](#) Larsen PJ, Fledelius C, Knudsen LB, Tang-Christensen M. Systemic Administration of the Long-Acting GLP-1 Derivative NN2211 Induces Lasting and Reversible Weight Loss in Both Normal and Obese Rats. *Diabetes.* 2001;50:2530–2539.
- [20](#) Getz GS, Reardon CA. Animal Models of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1104-1115.
- [21](#) Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistraet T. Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1706-1721.
- [22](#) Hossein M, Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, Sadi AM, Zhou YQ, Riazi AM, et al. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes.* 2009;58:975-983.
- [23](#) Gaspari T, Welungoda I, Widdop RE, Simpson RW, Dear AE. The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE(-/-) mouse model. *Diabetes Vasc Dis Res.* 2013;10(4):353-360.
- [24](#) Cameron-Vendrig A, Reheman A, Siraj MA, Xu XR, Wang Y, Lei X, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation attenuates platelet aggregation and thrombosis. *Diabetes.* 2016;65:1714–1723.
- [25](#) Drucker DJ. The Cardiovascular Biology of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab.* 2016;24(1):15-30.
- [26](#) Yusta B, Baggio LL, Koehler J, Holland D, Cao X, Pinnell LJ, et al. GLP-1R agonists modulate enteric immune responses through the intestinal intraepithelial lymphocyte GLP-1R. *Diabetes.* 2015;64:2537-2549.
- [27](#) Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2011;43(4):333-338.
- [28](#) Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. CARDIoGRAMplusC4D Consortium. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45(1):25-33.
- [29](#) Scott RA, Freitag DF, Li L, Chu AY, Surendran P, Young R et al. A genomic approach to therapeutic target validation identifies a glucose-lowering GLP1R variant protective for coronary heart disease. *Sci Transl Med.* 1 Jun 2016;8(341):341ra76.
- [30](#) Tang-Christensen M, Larsen PJ, Göke R, Fink-Jensen A, Sessop DS, Møller M, Sheikh SP. Central administration of GLP-1-1(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *Am J Physiol.* 1996;271:R848-R859.

- [³¹](#) Gutzwiller J-P, Tschopp S, Bock A, Zehnder CE, Huber AR, Kreyenbuehl M, et al. Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. *J Clin Endocr Metab*. 2004;89:3055-3061.
- [³²](#) Skov J, Pedersen M, Holst JJ, Madsen B, Goetze JP, Rittig S, Jonassen T, Frøkiær J, Dejgaard A and Christiansen JS. Short-term effects of liraglutide on kidney function and vasoactive hormones in type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Diabetes, Obes Metab* 2016 (18) 581–589.
- [³³](#) Robinson LE, Holt TA, Rees K, Randeve HS and O'Hare1 JP. Effects of exenatide and liraglutide on heart rate, blood pressure and BW: systematic review and meta-analysis. *BMJ. Open* 2013;3:1-16.

オゼンピック皮下注 2mg

2.6.3 薬理試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

	ページ
目次	2
2.6.3.1 薬理試験一覧	3
2.6.3.2 薬効薬理試験	4
2.6.3.3 副次的薬理試験	6
2.6.3.4 安全性薬理試験	8
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験	10

2.6.3.1 藥理試験一覧

Test Article: Semaglutide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics	Cloned human receptor activation	<i>In vitro</i>	Novo Nordisk, DK	Ala115468-086	4.2.1.1-1
	Rat pancreas/insulin secretion	<i>In vitro</i>	Novo Nordisk, DK	JStu050701	4.2.1.1-2
	Rat/potency	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	JStu051101	4.2.1.1-3
	Diabetic mouse/potency	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	DXG050301-0113	4.2.1.1-4
	Diabetic mouse/glucose	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	MmLa070620	4.2.1.1-5
	Pig/insulin	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	BidR050301	4.2.1.1-6
Secondary Pharmacodynamics	Glucagon receptor selectivity	<i>In vitro</i>	Novo Nordisk, DK	Leri16090-035	4.2.1.2-1
	Broad Receptor Profile	<i>In vitro</i>	Ricerca Biosciences LLc, Taiwan	AA93698	4.2.1.2-2
	Obese rats/body weight	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	KiRa080803	4.2.1.2-3
	Mouse/rat/brain access	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	JHES151201	4.2.1.2-4
	Obese mouse/appetite	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	JCFJ151203	4.2.1.2-5
	Mouse/aorta	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	GuRa150803	4.2.1.2-6
	Mouse/aorta	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	BidR150901	4.2.1.2-7
	Pig/food intake	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	MmLa050901	4.2.1.2-8
Safety Pharmacology	Irwin's test in the rat (CNS)*	Subcutaneous	Aptuit, Edinburgh, UK	206443	4.2.1.3-1
	Pulmonary function in the rat*	Subcutaneous	Novo Nordisk, DK	206518	4.2.1.3-2
	hERG ion channel patch clamp*	Perfusion	Aptuit, Edinburgh, UK	206446	4.2.1.3-3
	Rabbit Purkinje fibre*	Perfusion	Aptuit, Edinburgh, UK	206445	4.2.1.3-4
	Telemetry in primates*	Subcutaneous	Aptuit, Edinburgh, UK	206442	4.2.1.3-5
	Renal function in the rat*	Subcutaneous	Aptuit, Edinburgh, UK	206444	4.2.1.3-6
Pharmacodynamic Drug Interactions	No pharmacodynamic Drug Interaction study has been performed with semaglutide.				

* Study conducted in accordance with Good Laboratory Practice.

2.6.3.2 薬効薬理試験

Test Article: Semaglutide

Tissue/Species/ Strain	Method of Administration	Duration of dosing	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID
<i>In vitro</i> potency and efficacy							
BHK cells expressing the cloned human GLP-1 receptor	N/A	N/A	N/A	N/A	Semaglutide activated the human GLP-1 receptor measured as cAMP release with a potency [0.15 ± 0.062 nmol/L (0.62 ± 0.26 µg/L)] similar to liraglutide [0.15 ± 0.064 nmol/L (0.56 ± 0.26 µg/L)], and both less potent than GLP-1 [0.18 ± 0.014 nmol/L (0.59 ± 0.05 µg/L)]. Semaglutide exhibited a stronger binding to albumin than liraglutide, measured as receptor binding in the presence of 2% HSA (semaglutide [125 ± 83 nmol/L (514 ± 341 µg/L)], liraglutide [7.1 ± 3.5 nmol/L (27 ± 13 µg/L)]). Native GLP-1 did not bind to HSA.	No	Ala15468-086
Sprague Dawley rat, perfused pancreas	N/A	N/A	0.1-200 nmol/L (0.41-822.7 µg/kg)	Male, n=2	Semaglutide dose-dependently released insulin from the pancreas in vitro. The EC_{50} estimated for each of the two pancreata was 13 nmol/L and 14.5 nmol/L (53.5 µg/L and 59.6 µg/L).	No	JStu050701
<i>In vivo</i> efficacy							
Wistar rats	Subcutaneous	Single	1.0-30 nmol/kg (4.1-123.4 µg/kg)	Male, n=4-8	Semaglutide dose-dependently stimulated insulin secretion at 30 nmol/kg (123.4 µg/kg) whereas the same dose of liraglutide had no effect.	No	JStu051101

Tissue/Species/ Strain	Method of Administration	Duration of dosing	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID
Diabetic db/db mice (blood glucose) and C57Bl/6J mice	Subcutaneous	Single	0.30-100 nmol/kg (1.2-400 µg/kg)	Male, n=6	Semaglutide lowered blood glucose dose-dependently and with a higher potency than liraglutide. The ED ₅₀ at 6 hours post dosing was [0.30 nmol/kg (1.2 µg/kg) [95% CI: 0.12 - 0.75 nmol/kg (0.49 - 3.1 µg/kg)] , whereas it was 6.9 nmol/kg (25.9 µg/kg) [95% CI: 2.9 - 16.0 nmol/kg (10.9 - 60.0 µg/kg)] for liraglutide. Reduction of food intake during 45 h after in C57Bl/6J mice was induced at a lower dose for semaglutide than for liraglutide [3.3 nmol/kg (13.6 µg/kg)vs. 45 nmol/kg (168.8 µg/kg).]	No	DXG050301-0113
Diabetic db/db mice	Subcutaneous	4 weeks, once- daily dosing	0.3-15 nmol/kg (1.2-62 µg/kg)	Male, n=8-10	Semaglutide reduced blood glucose, HbA1c, insulin, body weight and fat mass, and increased beta-cell function in a dose-dependent manner.	No	MmLa070620
Goettingen minipigs	Subcutaneous	1 week	2.0 nmol/kg (8.2 µg/kg)	Male, n=6	Semaglutide at 2.0 nmol/kg (8.2 µg/kg) significantly increased insulin secretion on Days 1, 3 and 7 after last dose. In a similar study with liraglutide at 3.0 nmol/kg (11.2 µg/kg), insulin secretion was increased 1 day after last dose, but not after 3 days.	No	BidR050301

2.6.3.3 副次的藥理試驗

Test Article: Semaglutide

Tissue/Species/ Strain	Method of Administration	Duration of dosing	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID
<i>In vitro</i> selectivity							
BHK cells with cloned human glucagon receptor	N/A	N/A	10 ⁻¹³ -10 ⁻⁶ mol/L (0.41 ng/kg - 4.1 mg/kg)	N/A	Semaglutide did not activate the closely related glucagon receptor.	No	Leri16090-035
Broad Receptor Profile (Radioligand Binding assays)	N/A	N/A	10 µmol/L (41.1 mg/kg)	N/A	Semaglutide did not interact with any of the 68 tested receptors (i.e., inhibition>50% was not seen in any of the assays).	No	AA93698
Obese (DIO) rats	Subcutaneous	12 weeks, once- daily	0.3 and 1.0 nmol/kg (1.2 and 4.1 µg/kg)	Female, n=5-14	Obese rats were fed with a diet standard chow and chocolate ad libitum. Semaglutide reduced body weight, fat mass, food intake and plasma levels of leptin, cholesterol and free fatty acids at both dose levels compared to control. Semaglutide changed food preference towards a diet with less chocolate compared to controls.	No	KiRa080803
Mice (C57BL/6J; GLP-1R ^{-/-}), rats (Sprague Dawley) and BHK cells expressing the cloned human GLP- 1 receptor	Subcutaneous, Intravenous, <i>in vitro</i>	Mice: 1 to 4 days Rats: 1 day	120 nmol/kg (494 µg/kg) (Vivotag750- semaglutide) 120 nmol/kg (494 µg/kg) (Alexa594- semaglutide)	Mice: Male, n=13+2 Rats: Male, n=2	Semaglutide accessed the mouse brain in a GLP-1R dependent manner, and was found in select circumventricular organs and specific areas in the hypothalamus and the brainstem. Semaglutide activated hypothalamic POMC/CART neurons, and inhibited NPY/AGRP neurons.	No	JHES151201

Tissue/Species/ Strain	Method of Administration	Duration of dosing	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID
Obese(DIO) mice	Subcutaneous	18 days	36.5 nmol/kg (150 µg/kg)	Male, n=12	Semaglutide increased mRNA levels of the satiety signal CART and decreased the hunger signals NPY and AGRP, in the hypothalamus of diet induced obese mice	No	JCFJ151203
LDLr-/- mice	Subcutaneous	17 weeks	1.0-14.6 nmol/kg (4-60 µg/kg)	Male, n=10-23	Semaglutide attenuated aortic atherosclerosis in LDLr knock-out mice; the effect was partly independent of weight loss.	No	GuRa150803
ApoE-/- mice	Subcutaneous	13 weeks	1.0-14.6 nmol/kg (4-60 µg/kg)	Female, n=8-18	Semaglutide attenuated aortic atherosclerosis in ApoE knock-out mice.	No	BidR150901
Pigs	Subcutaneous	1 week	5.1 nmol/kg (21 µg/kg) (every second day for 7 days, first dose was 10.0 nmol/kg (41 µg/kg))	Female, n=3	Semaglutide was dosed until steady state was reached, where after dosing was stopped. Mean food intake (kg/24 h) was reduced to 38% of vehicle control on Day 1, 47% on Day 2, 67% on Day 6 and 80% on Day 7 whereas no reduction in food intake was seen on Day 8 (96% relative to vehicle group) after last dose. In a similar study with liraglutide food intake was reduced to around 56% of vehicle during the first day after the last dose, 88% on Day 2, and thereafter no reduction compared to vehicle was observed.	No	MmLa050901

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Semaglutide

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses ^a	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID
Central Nervous System	Sprague Dawley Rat	Subcutaneous	0, 0.24, 5.3, 23.1 nmol/kg (0, 0.001, 0.022, 0.095 mg/kg)	Male 6	23.1 nmol/kg (0.095 mg/kg): walking on toes (2/6 at 4 and 8 hours and 3/6 at 2 hours post-dose), decreased touch response (5/6 at 8 hours and 6/6 at 4 hours post-dose), passivity (5/6 at 4 hours and 6/6 at 2, 8 and 24 hours post dose), dirty muzzle (2/6 at 8 hours post-dose), lethargic (6/6 at 8 hours post-dose) and piloerection (2/6 at 24 hours post-dose). In treated animals, plasma exposure, as measured by AUC _(0-10h) and C _{max} , increased with increasing dose. T _{max} was observed between 6 and 10 hours after dose administration. C _{max} was 0.7, 14 and 47.2 nmol/L respectively. NOAEL was 0.022 mg/kg.	Yes	206443
Respiratory system	Sprague Dawley Rat	Subcutaneous	0, 1.2, 5.1, 20.4 nmol/kg (0, 0.005, 0.021 0.084 mg/kg)	Male 6	No effect of semaglutide was observed at any dose level. NOAEL was 20.4 nmol/kg (0.084 mg/kg).	Yes	206518
Cardiovascular system	HEK293 cells expressing hERG	Perfusion	8 µmol/L (0.032 mg/mL)	4 cells in each group	No inhibition of hERG tail current was observed.	Yes	206446
Cardiovascular system	Rabbit Purkinje Fibre	Perfusion	8.2 µmol/L (0.034 mg/mL)	4 Purkinje fibres in each group	No effect on cardiac action potential parameters (RMP, UA, MRD, APD60, APD90 or triangulation)	Yes	206445

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses ^a	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID
Cardiovascular system	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	0, 4.9 (Day 1), 19.4 (Day 3), 114.3 (Day 5) nmol/kg [0, 0.02 (Day 1), 0.08 (Day 3), 0.47 (Day 5) mg/kg]	Male 4	Arterial blood pressure, heart rate and all Lead II ECG parameters (RR, PR, QT, QTcF and QTcQ intervals and QRS duration) was examined at fixed time points from 0.5 hours prior to dosing to 46 hours after dosing. Arterial blood pressure and heart rate appeared to decrease in semaglutide treated animals. This decrease was however caused by an unexpected difference in pre-dose values obtained in the semaglutide treated animals and therefore not considered treatment related. No effect related to semaglutide was observed on any parameter at any dose. Exposure was confirmed in all dosed animals and plasma concentration at 12 hours post dose was calculated to be 23, 77 and 440 nmol/L after 0.02, 0.08 and 0.47 mg/kg respectively. No exposure was detected in vehicle treated animals. NOAEL was 114.3 nmol/kg (0.47 mg/kg).	Yes	206442

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration	Doses ^a	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID																																										
Renal function	Sprague Dawley Rat	Subcutaneous	0, 1.2, 5.6, 21.6 nmol/kg (0, 0.005, 0.023, 0.089 mg/kg)	Male 8	5.6 and 21.6 nmol/kg (0.023 and 0.089 mg/kg) resulted in a statistical significant increase in parameters at 0-8 hours post-dose and a statistical significant decrease in parameters at 8-24 hours post-dose vs vehicle group. Urine composition and volume (treated vs vehicle): <table><tr><td></td><td colspan="3">0-8 hours post dose</td><td colspan="3">8-24 hours post dose</td></tr><tr><td></td><td>L</td><td>M</td><td>H</td><td>L</td><td>M</td><td>H</td></tr><tr><td>Na⁺ (mM/kg)</td><td>ns</td><td>5.11 vs 1.45</td><td>6.56 vs 1.45</td><td>ns</td><td>1.45 vs 3.08</td><td>1.19 vs 3.08</td></tr><tr><td>K⁺ (mM/kg)</td><td>1.77 vs 1.33</td><td>2.12 vs 1.33</td><td>2.29 vs 1.33</td><td>ns</td><td>1.54 vs 3.12</td><td>1.52 vs 3.12</td></tr><tr><td>Cl⁻ (mM/kg)</td><td>ns</td><td>3.41 vs 1.05</td><td>3.94 vs 1.05</td><td>ns</td><td>1.28 vs 2.84</td><td>0.62 vs 2.84</td></tr><tr><td>Vol (mL)</td><td>ns</td><td>6.26 vs 2.33</td><td>8.40 vs 2.33</td><td>ns</td><td>1.28 vs 2.64</td><td>1.43 vs 2.64</td></tr></table> L = 0.005, M = 0.023 and H = 0.089 mg/kg, ns= not significant The NOAEL was 1.2 nmol/kg (0.005 mg/kg).		0-8 hours post dose			8-24 hours post dose				L	M	H	L	M	H	Na ⁺ (mM/kg)	ns	5.11 vs 1.45	6.56 vs 1.45	ns	1.45 vs 3.08	1.19 vs 3.08	K ⁺ (mM/kg)	1.77 vs 1.33	2.12 vs 1.33	2.29 vs 1.33	ns	1.54 vs 3.12	1.52 vs 3.12	Cl ⁻ (mM/kg)	ns	3.41 vs 1.05	3.94 vs 1.05	ns	1.28 vs 2.84	0.62 vs 2.84	Vol (mL)	ns	6.26 vs 2.33	8.40 vs 2.33	ns	1.28 vs 2.64	1.43 vs 2.64	Yes	206444
	0-8 hours post dose			8-24 hours post dose																																													
	L	M	H	L	M	H																																											
Na ⁺ (mM/kg)	ns	5.11 vs 1.45	6.56 vs 1.45	ns	1.45 vs 3.08	1.19 vs 3.08																																											
K ⁺ (mM/kg)	1.77 vs 1.33	2.12 vs 1.33	2.29 vs 1.33	ns	1.54 vs 3.12	1.52 vs 3.12																																											
Cl ⁻ (mM/kg)	ns	3.41 vs 1.05	3.94 vs 1.05	ns	1.28 vs 2.84	0.62 vs 2.84																																											
Vol (mL)	ns	6.26 vs 2.33	8.40 vs 2.33	ns	1.28 vs 2.64	1.43 vs 2.64																																											

^a Single dose unless specified otherwise. Doses are presented as actual doses calculated on result from test item analysis.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

No pharmacodynamic drug interaction studies have been performed with semaglutide.