オゼンピック皮下注 2mg

2.6.4 薬物動態試験の概要文

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
2.6.4.1 まとめ 8
2.6.4.2 測定法 11
2.6.4.2.1 血漿中セマグルチド濃度の測定法 11
2.6.4.2.1.1 ELISA 法 11
2.6.4.2.1.2 LOCI 法 12
2.6.4.2.1.3 LC-MS/MS 法 12
2.6.4.2.1.4 測定パラメータ 13
2.6.4.2.2 セマグルチド抗体測定 14
2.6.4.2.2.1 スクリーニング測定 14
2.6.4.2.2.2 中和抗体測定 15
2.6.4.2.2.3 放射能測定 17
2.6.4.3 吸収 19
2.6.4.3.1 単回投与時の PK 19
2.6.4.3.2 反復投与時の PK 20
2.6.4.3.2.1 各種動物の反復投与時の PK 20
2.6.4.3.2.2 妊娠ラット及び幼若ラットの PK 24
2.6.4.3.2.3 妊娠ウサギの PK 24
2.6.4.3.2.4 妊娠サルの PK 25
2.6.4.3.3 非臨床試験における抗セマグルチド抗体の形成 25
2.6.4.4 分布 32
2.6.4.4.1 組織分布 32
2.6.4.4.2 胎盤通過 33
2.6.4.4.3 タンパク結合 33
2.6.4.5 代謝 34
2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝 34
2.6.4.5.2 *In vivo* 代謝 34
2.6.4.5.2.1 マウス、ラット及びサル 35
2.6.4.5.2.2 ヒト 36

2.6.4.5.2.3　代謝物の同定.....37
2.6.4.5.2.4　代謝の比較.....38
2.6.4.6　排泄.....42
2.6.4.6.1　ラット及びサル.....42
2.6.4.6.2　ヒト.....43
2.6.4.6.3　乳汁中排泄.....43
2.6.4.7　薬物動態学的相互作用.....44
2.6.4.7.1　酵素誘導.....44
2.6.4.7.2　酵素阻害.....44
2.6.4.7.3　トランスポーター阻害.....44
2.6.4.8　その他の薬物動態試験.....45
2.6.4.9　考察及び結論.....46
2.6.4.9.1　結論.....48
参考文献.....49

図目次

ページ

図 2.6.4-1　セマグルチドの構造及び標識位置 8
図 2.6.4-2　セマグルチドをカニクイザルに皮下及び静脈内投与時の平均血漿中濃度－時間プロファイル 20
図 2.6.4-3　反復投与時の平均セマグルチド血漿中濃度 24
図 2.6.4-4　妊娠及び非妊娠サルにおける曝露 25
図 2.6.4-5　サルにおける定常状態の薬物動態パラメータ（AUC_{tau} 及び C_{max}） 29
図 2.6.4-6　ヒトにおけるセマグルチドの推定代謝経路（血漿中 P3B ならびに尿中 U6 及び U7） 38
図 2.6.4-7　[^{3}H]Oct-セマグルチドを皮下投与時のマウス（24 時間）、ラット（24 時間）、サル（24 時間）及びヒト（96 時間）の代謝物プロファイル 40
図 2.6.4-8　[^{3}H]Oct-セマグルチドを皮下投与時のヒト（48～120 時間）、サル（24～72 時間）及びラット（72～120 時間）の代謝物プロファイル 41

表目次

ページ

表 2.6.4-1　セマグルチドを反復皮下投与時の用量正規化（1 mg/kg）平均 PK パラメータの種間比較 9
表 2.6.4-2　非臨床及び臨床測定に関するセマグルチド測定パラメータ 13
表 2.6.4-3　非臨床試験試料におけるセマグルチドの長期安定性 13
表 2.6.4-4　抗体スクリーニング測定、バリデーションパラメータ及びバリデーション結果 15
表 2.6.4-5　マウス及びラット血清を用いた中和抗体測定のバリデーションパラメータ及びバリデーション結果 16
表 2.6.4-6　サル血清を用いた中和抗体測定のバリデーションパラメータ及びバリデーション結果 17
表 2.6.4-7　非臨床動物種における放射能の LLOQ 17
表 2.6.4-8　セマグルチドを単回皮下投与時の用量正規化（1 mg/kg）平均 PK パラメータの種間比較 19
表 2.6.4-9　セマグルチドを反復投与時の重要な PK パラメータ 21
表 2.6.4-10　非臨床試験における抗セマグルチド抗体陽性動物一覧 26
表 2.6.4-11　マウスを用いた 2 年間がん原性試験における血漿中セマグルチド濃度（nmol/L）（207362） 27
表 2.6.4-12　ラットを用いた 13 週間毒性試験における血漿中セマグルチド濃度（nmol/L）（210195） 27
表 2.6.4-13　サルを用いた 13 週間毒性試験における薬物動態パラメータ（206450） 30
表 2.6.4-14　組織分布試験の概要（単回投与） 32
表 2.6.4-15　血漿中代謝物プロファイルの概要 35
表 2.6.4-16　[^{3}H]Oct-セマグルチドを単回皮下投与時のセマグルチド関連物質の排泄（%投与量） 42

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）
Aib	:	2-aminoisobutyric acid （2-アミノイソブチル酸）
AUC	:	Area under the plasma concentration-time curve（濃度－時間推移曲線下面積）
BHK	:	Baby hamster kidney（仔ハムスター腎）
C_{avg}	:	Average plasma concentration in dosing interval（平均血漿中濃度）
C_{max}	:	Maximum plasma concentration（最高血漿中濃度）
CHO	:	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CNS	:	Central nervous system（中枢神経系）
%CV	:	Coefficient of variation （変動係数）
DRF	:	Dose range finding（用量範囲設定）
DPP-4	:	Dipeptidyl peptidase 4（ジペプチジルペプチダーゼ-4）
F	:	Bioavailability（バイオアベイラビリティ）
EFD	:	Embryo-foetal development（胚・胎児発生）
f_u	:	Unbound fraction（非結合画分）
GD	:	Gestational day（妊娠日）
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）
GLP-1R	:	Glucagon-like-peptide-1 receptor（グルカゴン様ペプチド-1 受容体）
HRP	:	Horse radish peroxidase（西洋わさびペルオキシダーゼ）
IC_{50}	:	Concentration of a drug that is required for 50% inhibition（50%阻害濃度）
ICH	:	International conference on harmonisation（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
i.v.	:	Intravenous（静脈内）
K_D	:	Dissociation constant（解離定数）
LC-MS	:	Liquid chromatography/ mass spectrometry（液体クロマトグラフィー／質量分析法）
LLOQ	:	Lower limit of quantification（定量下限）
LOCI	:	Luminescent oxygen channelling immunoassay（蛍光酸素チャンネリング免疫測定法）
LSC	:	Liquid scintillation counting（液体シンチレーション計測）
MTD	:	Maximum tolerated dose（最大耐量）
m/z	:	Mass to charge ratio（質量電荷比）
NNC0113-0217	:	Semaglutide（セマグルチドの化合物コード番号）
NPH	:	Neutral protamine Hagedorn（中性プロタミンハーゲドン）
OAT	:	Organic anion transporter（有機アニオントランスポーター）
OATP	:	Organic anion transporter polypeptide（有機アニオントランスポーターポリペプチド）
OCT	:	Organic cation transporter（有機カチオントランスポーター）
Oct	:	Octadecanedioic acid, as in [^{3}H]Oct-semaglutide（[^{3}H]Oct-セマグルチドのオクタデカン二酸）
P-gp	:	Permeability glycoprotein（P-糖タンパク）
PD	:	Pharmacodynamic（薬力学）
PK	:	Pharmacokinetic（薬物動態）
PPND	:	Pre- and postnatal development（出生前及び出生後の発生）
QWBA	:	Quantitative Whole Body Autoradiography（定量的全身オートラジオグラフィー）
R_{acc}	:	Ratio of accumulation（累積係数）

RIA	:	Radioimmunoassay（放射免疫測定）
s.c.	:	Subcutaneous（皮下）
SEM	:	Standard error of the mean（標準誤差）
SD	:	Standard deviation（標準偏差）
tau	:	Dosing interval（投与間隔）
TK	:	Toxicokinetic（トキシコキネティクス）
t_{max}	:	Time at which C_{max} occurs（最高血漿中濃度到達時間）
Tyr	:	Tyrosine, as in [^{3}H]Tyr-semaglutide（[^{3}H]Tyr-セマグルチドのチロシン）
$t_{1/2}$	:	Terminal plasma half-life（血漿中消失半減期）
V_z	:	Volume of distribution（分布容積）

2.6.4.1 まとめ

セマグルチドはクリアランスの低下による消失半減期の延長により、週 1 回投与に適したヒトグルカゴン様ペプチド 1（GLP-1）アナログである。半減期の延長は、ペプチド骨格の第 26 位のリジンに親水性の 8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（ADO）リンカーを介してオクタデカン二酸を附加したことによる血清アルブミンとの結合亢進により可能となっている。さらに、DPP-4 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（Aib）に改変している。

セマグルチドの薬物動態（PK）は、非臨床安全性プログラムで使用した動物種〔CD-1 マウス、Sprague Dawley（SD）系ラット、ニュージーランドホワイト種ウサギ及びカニクイザル〕を用いて評価した。さらに、セマグルチドの分布、代謝及び排泄を *in vitro* 及び *in vivo* で評価した。試験には放射能標識及び非標識セマグルチドを使用した。放射能標識セマグルチドを用いた試験において、ペプチド骨格のチロシン（[^{3}H]-Tyr）又は分子のオクタデカン二酸部分（[^{3}H]-Oct）のいずれかをトリチウムで標識した（図 2.6.4-1）。

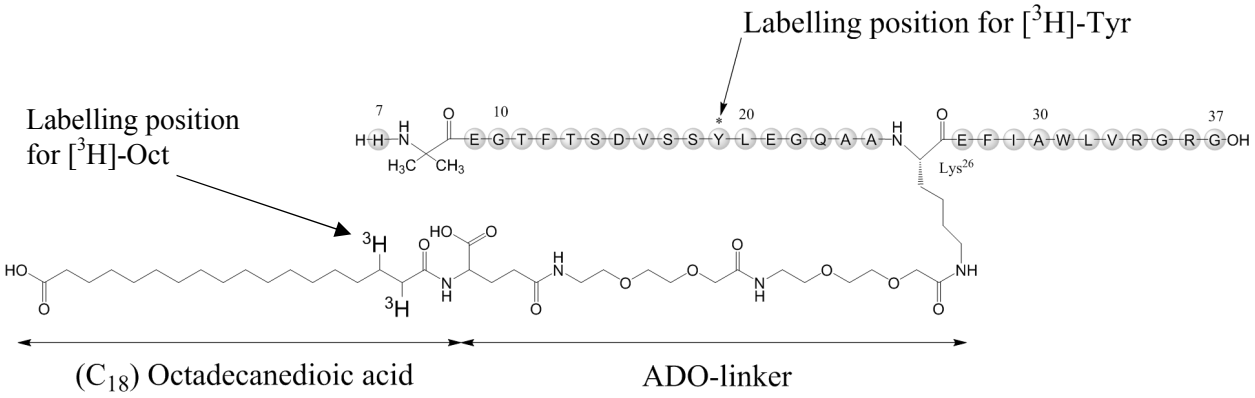


図 2.6.4-1　　セマグルチドの構造及び標識位置

非臨床試験の大部分において、セマグルチドを予定している臨床投与経路である皮下（s.c.）経路により投与した。また、PK をさらに特性解析し、皮下投与時のバイオアベイラビリティを評価するため、セマグルチドをカニクイザルに静脈内（i.v.）投与した。

反復皮下投与時の非臨床動物種におけるセマグルチドの PK パラメータの概要を表 2.6.4-1 に示す。すべての非臨床動物種及びヒトの PK が線形性を示したことから、表中には用量で正規化した全身曝露データを示した。

表 2.6.4-1　　セマグルチドを反復皮下投与時の用量正規化（1 mg/kg）平均 PK パラメータの種間比較

Species	s.c. administration (steady-state)					
	C_{max} (nmol/L)	t_{max} (h)	$AUC_{(tau)}$ (h×nmol/L)	Tau (hours)	C_{avg} (nmol/L)	$t_{½}$ (h)
Mouse	1040	4	12500	24	522	7.5
Rat	1340	3	23700	24	927	12
Minipig	1950	24	42300	72	1760	-
Monkey	2860	12	150000	72	2080	54
Human	3000	36	437000	168	2600	149

Data in mouse, rat, minipig and monkey are presented as arithmetic means, except t_{max} and $t_{½}$ which are presented as median and harmonic mean, respectively. Human data are presented as geometric mean except t_{max} and $t_{½}$ which are median and geometric mean. Data from studies in mouse: 206447, 206663, 207362; rat: 206448, 206662, 207377, 207363; monkey: 206449, 206450, 207288; minipig: 208404; human: trial 3635.

セマグルチドの PK は用量比例性を示し、性差は認められなかった。動物への継続的な曝露を確実に実施するため、マウス及びラットでは 1 日 1 回投与を、カニクイザルでは週 2 回投与をそれぞれ実施した。終末相半減期及び投与間隔に基づき、反復投与試験においてセマグルチドのある程度（1.5～5 倍）の累積が認められた。セマグルチドを皮下投与時の最高血漿中濃度（C_{max}）は、非臨床動物種において投与後 3～24 時間で認められた。最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）はマウス及びラットで最も早く、サル及びミニブタでは C_{max} に達したのは、それより遅かった。ヒトでの t_{max} は投与後 1～3 日に認められた。用量で正規化した平均血漿中濃度（C_{avg}）はサルとヒトで類似していたが、マウスとラットはクリアランスが高いことから、C_{avg} はヒトより数倍低かった。皮下投与時の循環血中の平均終末相半減期は 7.5～54 時間であり、マウス＜ラット＜サルの順で長かった。ヒトにおける平均終末相半減期は 149 時間（約 1 週間）であった。非臨床試験では、抗セマグルチド抗体の形成は極めて限定的であり、セマグルチドの曝露に及ぼす影響は認められなかった。血漿中セマグルチド及び抗セマグルチド抗体濃度測定法は、現行のガイドライン[1,2]に準拠してバリデートした。

サルにおいて、単回皮下及び静脈内投与時の終末相半減期は同様（51 及び 53 時間）であり、皮下投与部位からのセマグルチドの吸収が速く、消失速度を律速しないことが示された。皮下投与によるセマグルチドのバイオアベイラビリティは、サルで 86%、ヒトで 89%であった。血漿タンパク質との結合はいずれの動物種でも 99%以上と高く、アルブミンが主要な結合タンパク質であることが示された。サルにおいて、分布容積（Vz）は細胞外液の水分量に相当する 0.2 L/kg であり、このことはセマグルチドがアルブミンと同程度に血漿中及び末梢組織に分布することを示している。全体として、以上の結果は、セマグルチドは皮下投与部位からの吸収が良好であり、セマグルチドにおける半減期延長の主要因がアルブミン結合によるものであったことを支持する。

放射能標識セマグルチドを用いた分布試験から、セマグルチド関連物質は広範な組織に分布し、最高レベルの放射能が血液及び血流量の高い器官で認められたことが示された。

全体的に、ヒトにおけるセマグルチドの代謝物プロファイルは、非臨床動物種の代謝物プロファイルに類似していた。いずれの動物種でも、セマグルチドは循環血漿中の主要成分であった。セマグルチドは、ペプチド骨格のタンパク質分解及び脂肪酸側鎖の連続的なβ酸化により代謝された。一般的に、ペプチド分解及びβ酸化は、特定の器官に限定されるものではなく、ヒトと動物とで同様である。生体内に広範に分布する中性エンドペプチダーゼ（NEP）は、*in vitro* でセマグルチドを代謝することが示された。

検討したいずれの動物種でも、血漿中に存在する代謝物の曝露は、セマグルチドと比較して低かった。ヒトで認められた代謝物はいずれも総曝露の 10%未満であると推定され、非臨床安全性試験において十分に安全性が確認された。

尿及び糞が、セマグルチド関連物質の重要な排泄経路であることが示された。セマグルチドは排泄前に代謝され、動物及びヒトの尿中では、極めて微量のセマグルチド未変化体のみが認められた。

ラット、ウサギ及びサルにセマグルチドを反復投与後、妊娠動物と非妊娠動物に曝露の差異は認められなかった。放射能標識セマグルチドを投与された妊娠ラットでは、微量のセマグルチド関連物質しか胎盤を通過せず、セマグルチド未変化体が胎児に認められた。放射能標識セマグルチドを投与された泌乳ラットでは、少量のセマグルチド関連物質、主としてセマグルチド未変化体の乳汁中排泄が認められた。

ヒト肝細胞を用いたチトクローム P450（CYP）酵素及びトランスポーターに関する *in vitro* 薬物相互作用試験を実施したが、セマグルチドが臨床的に意味のある薬物相互作用を生じる可能性は低いと考えられた。

セマグルチドの PK 及び代謝の特性を検討する試験一覧表を、Module 2.6.5.1 に示した。

2.6.4.2 測定法

2.6.4.2.1　　血漿中セマグルチド濃度の測定法

非臨床試験において、3 種類のバリデートされた測定法〔酵素免疫吸着測定法（ELISA 法）、蛍光酸素チャンネリング免疫測定法（LOCI 法）又は液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法（LC-MS/MS 法）〕を用いて、セマグルチドの血漿中濃度を測定した。測定法間でのセマグルチド濃度の整合性を保証するため、測定法バリデーションの一部として、免疫測定を基盤とした測定法（LOCI 法）による測定結果と、クロマトグラフィーを基盤とした測定法（LC-MS/MS 法）による測定結果との比較を実施した。サルを用いた探索試験（208477）では、当初すべての血漿試料を LOCI 法で測定し、その後 LC-MS/MS 法（Module 4.2.2.1, 209285）により再測定した。その結果、2 種類の測定法の測定結果は同等であることが確認された。非臨床試験で使用した生体試料中薬物濃度分析法の一覧を、Module 2.6.5.2.1 に示した。マウス、ラット及びサルを用いたすべての重要な長期毒性試験では、LC-MS/MS 法により測定した。

免疫測定を基盤とした測定法に後述の性能上の問題が生じたことから、開発中に測定法を変更した。第 1 相臨床試験を支持する早期非臨床試験で使用された、バリデートされた ELISA 法は、許容基準の逸脱により使用を中止したが、根本原因は特定できなかった。検出抗体は、その後、LOCI 法の開発及びバリデーションの実施に使用した。LOCI 法では、後にマトリックス効果（血漿マトリックスの影響及び希釈直線性の問題）の影響を受けることが示された。したがって、最終的に測定法はマトリックス効果（血漿）の影響を受けないことが示された LC-MS/MS 法に変更された。

真度、精度、選択性、感度、室間再現精度及び安定性に関して現行の生体試料中薬物濃度分析法ガイドライン[1,2]に準拠し、ノボ ノルディスク社内ですべての測定法を開発し、バリデートした。バリデートした測定法におけるパラメータの概要を表 2.6.4-2 に、血漿中安定性データの概要を表 2.6.4-3 に示す。比較のために、ヒトにおける測定パラメータを含めた。ヒトにおける測定法の詳細については、Module 2.7.1 を参照のこと。

非 GLP の最大耐量（MTD）試験（Module 2.6.5.4.S, 208404）では、ミニブタ試料中の薬物濃度を分析するため、バリデートしていない LOCI 法を用いた。

2.6.4.2.1.1　ELISA 法

概要を以下に示す。マイクロタイタープレートをセマグルチド N 末端特異的モノクローナル抗体（GLPb-7F1）でコーティングした。ビオチン化セマグルチド C 末端特異的モノクローナル抗体（GLP162-3F15）と共に、検量線試料、Quality Control（QC）検体及び未知試料を添加し、続いて西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）標識ストレプトアビジンを用いて検出し、続いて SuperSignal® Femto

基質による化学発光を行った。発光シグナルを TecanGENios® Pro Multilabel リーダーで読み取った。未知試料、検量線試料及び QC 検体を、EDTA-血漿中でサンプリング又は調製し、各 2 回測定した。weighted logistic fitting を用いて血漿試料濃度を算出した。

マウス、ラット、ウサギ及びサルから得られた EDTA 血漿を用いて、ELISA 法をバリデートした（表 2.6.4-2）。

2.6.4.2.1.2 LOCI 法

概要を以下に示す。LOCI 法は、ユウロピウムでコートされたアクセプタービーズ及びストレプトアビジンでコートされたドナービーズの 2 種類のビーズの近接に基づく、ホモジニアスな近接アッセイである。セマグルチドに対する特異的な抗体（GLPb-7F1）をアクセプタービーズに結合させることにより、特異性を持った試薬とした。ストレプトアビジンでコートされたドナービーズは非特異的である。セマグルチドに対するビオチン化抗体（GLP162-3F15）を免疫反応によるサンドイッチ形成のために添加した。レーザー励起により、ドナービーズから放出された化学発光シグナルがさらに増幅され、アクセプタービーズから化学発光シグナルが放出される。このシグナルを Envision®リーダーで読み取った。未知試料、検量線試料及び QC 検体は、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）加血漿として採取又は調製され、各 2 回測定した。血漿試料中濃度は weighted logistic fitting を用いて算出された。

ラット、ウサギ及びサルから採取した EDTA 加血漿を用いて、LOCI 法をバリデートした（表 2.6.4-2）。

2.6.4.2.1.3 LC-MS/MS 法

血漿中セマグルチドは、血漿中タンパク質を沈殿させた後に LC-MS/MS（エレクトロスプレーイオン化、ポジティブ MRM モード、m/z：1029.5→136.3）を用いて測定された。最も強力で選択性なイオンである、4 価の荷電分子イオン（m/z 1029.5）及びそのフラグメント（m/z 136.3）が、定量のために選択された。セマグルチドの構造類似体（NNC0113-0000-0679）又はセマグルチドの安定な標識類似体（NNC0113-0000-4168）が、測定法における内部標準（それぞれ m/z：1106.6→123.2、m/z：1033.5→136.3）として使用された。未知試料、検量線用試料及び QC 検体を、EDTA 加血漿として採取又は調製し、各 2 回測定した。weighted linear regression fitting（1/x）を用いて血漿試料中濃度を算出した。

マウス、ラット及びサルから得られた EDTA 加血漿を用いて、LC-MS/MS 法をバリデートした（表 2.6.4-2）。

2.6.4.2.1.4　測定パラメータ

バリデートされた測定法の定量下限（LLOQ）及び測定範囲を表 2.6.4-2 に示す。ELISA 法及び LOCI 法ならびに LC-MS/MS 法は、現行のガイドライン [1,2] に準拠し、関連する非臨床動物種及びヒト血漿を用いてバリデートされた。ラット（ELISA 法：Module 4.2.2.1, 208238 及び LC-MS/MS 法：Module 4.2.2.1, 209447）及びサル（LC-MS/MS 法：Module 4.2.2.1, 209446）を用いて、実試料の再現性（ISR）を検討した。ISR は両種の許容限度内であった。表 2.6.4-3 に示すように、血漿中セマグルチドの長期安定性が各動物種で示された。

表 2.6.4-2　　非臨床及び臨床測定に関するセマグルチド測定パラメータ

Species	Matrix	Assay type	LLOQ (nmol/L)	Range (nmol/L)	Validation Study ID
Mouse	EDTA plasma	ELISA	0.500	0.500 - 37.2	4.2.2.1, 207041
Mouse	EDTA plasma	LC-MS/MS	4.86	4.86 - 912	4.2.2.1, 210062
Rat	EDTA plasma	ELISA	0.500	0.500 - 35.6	4.2.2.1, 206540
Rat	EDTA plasma	LOCI	1.00	1.00 – 35.0	4.2.2.1, 209097
Rat[1]	EDTA plasma	LC-MS/MS	4.86	4.86 - 912	4.2.2.1, 209302 and 215337
Rabbit	EDTA plasma	ELISA	0.500	0.500 - 35.6	4.2.2.1, 207058
Rabbit	EDTA plasma	LOCI	1.00	1.00-100	4.2.2.1, 208258
Monkey	EDTA plasma	ELISA	0.500	0.500 - 35.0	4.2.2.1, 206550
Monkey	EDTA plasma	LOCI	1.00	1.00-100	4.2.2.1, 207416
Monkey	EDTA plasma	LC-MS/MS	4.86	4.86 - 912	4.2.2.1, 209219
Human	EDTA plasma	LOCI	0.500	0.500 - 50.0	5.3.1.4, 207163
Human	EDTA plasma	LC-MS/MS	1.94	1.94 - 194	5.3.1.4, AA91659
Human[2, 3]	EDTA plasma	LC-MS/MS	0.729	0.729 - 60.8	5.3.1.4, AA95860 and CA11388

1: The assay was partially re-validated including a stable labelled Internal Standard (Study 215337).
2: The sensitivity of the human assay (Study AA91659) was increased and the assay re-validated (Study AA95860).
3: The assay(Study AA95860) was partially re-validated including a stable labelled Internal Standard (Study CA11388).

表 2.6.4-3　　非臨床試験試料におけるセマグルチドの長期安定性

Species	Matrix	Assay	Storage stability	Storage temperature	Study ID
Mouse	EDTA plasma	LOCI	4 months	-20°C	4.2.2.1, 209055
Mouse	EDTA plasma	LOCI	4 months	-80°C	4.2.2.1, 209055
Mouse	EDTA plasma	LC-MS/MS	18 months	-20°C	4.2.2.1, 210074
Rat	EDTA plasma	LOCI	4 months	-20°C	4.2.2.1, 209056
Rat	EDTA plasma	LOCI	4 months	-80°C	4.2.2.1, 209056
Rat	EDTA plasma	LC-MS/MS	24 months	-20°C	4.2.2.1, 209437
Monkey	EDTA plasma	LOCI	7 months	-20°C	4.2.2.1, 208395

Species	Matrix	Assay	Storage stability	Storage temperature	Study ID
Monkey	EDTA plasma	LOCI	12 months	-80°C	4.2.2.1, 208395
Monkey	EDTA plasma	LC-MS/MS	28 months	-20°C	4.2.2.1, 209436

2.6.4.2.2 セマグルチド抗体測定

反復投与毒性試験における抗セマグルチド抗体の検出は、スクリーニング分析用抗体放射免疫測定（RIA）を用いて実施した。本測定法は、関連のある white paper[3,4]に準拠し、マウス、ラット、ウサギ及びサル血清を用いて確認されている。確認された抗体陽性試料は、その後、スクリーニング測定用 RIA によりヒト GLP-1 との交叉反応性を、及び仔ハムスター腎（BHK）細胞に基づく測定法により *in vitro* での中和作用を測定した。

2.6.4.2.2.1 スクリーニング測定

QC 検体を含む全ての血清試料を ^{125}I で標識したセマグルチドと共にインキュベートした。一晩インキュベーションした後、抗体に結合した放射能標識セマグルチドをポリエチレングリコールで沈降し、沈殿物中の放射能を測定した。陰性である投与前試料における 95%信頼水準に基づきカットポイントを決定した。カットポイントを上回る試料を確認用の測定に供し、過剰量の非標識セマグルチド非存在下（シリーズ A）又は存在下（シリーズ B）で試料を再測定した。シリーズ A の測定結果が測定法特異的なカットポイントを上回り、シリーズ B の測定結果がシリーズ A と比較して十分に阻害された場合に、その試料は抗体陽性と認められた。抗体陽性試料の内因性 GLP-1 に対する交叉反応性の評価は、非標識セマグルチドではなく非標識 GLP-1（シリーズ C）を添加したことを除き、確認用測定と同じ方法で行った。結果は、非標識セマグルチド非存在下での総放射能（T）に対する結合放射能（B）の比率（%）として示された。

本測定法では 4 濃度の QC 検体、すなわち、対照抗体を含まない陰性 QC 検体（QCneg）及びセマグルチドと反応性を示す対照中和抗体を添加した 3 濃度の抗体陽性 QC 検体（QC low：各動物種血清中に 0.1 µg/ mL GLIP-C1 F27、QC medium：ヒト血清中に 1 µg/mL GLIP-C1 F27、QC high：ヒト血清中に 2.5 µg/ mL GLIP-C1 F27）を使用した。

バリデーションパラメータ及びバリデーション結果を表 2.6.4-4 に示す。

表 2.6.4-4　　抗体スクリーニング測定、バリデーションパラメータ及びバリデーション結果

Parameter	Level	Mouse	Rat	Rabbit	Monkey
MRD		1/10	1/10	1/10	1/10
Intra assay Precision	QC Neg[1]	6.7 %CV	6.7 %CV	6.7 %CV	6.7 %CV
	QC Low	7.0 %CV	5.3 %CV	8.6 %CV	9.1 %CV
	QC Medium[1]	10.6 %CV	10.6 %CV	10.6 %CV	10.6 %CV
	QC High[1]	4.8 %CV	4.8 %CV	4.8 %CV	4.8 %CV
Inter assay Precision	QC Neg[1]	18.3 %CV	18.3 %CV	18.3 %CV	18.3 %CV
	QC Low	16.7 %CV	10.6 %CV	13.3 %CV	15.4 %CV
	QC Medium[1]	10.7 %CV	10.7 %CV	10.7 %CV	10.7 %CV
	QC High[1]	5.8 %CV	5.8 %CV	5.8 %CV	5.8 %CV
Assay cut point[2] at 95% confidence level	Normalisation Factor	0.4	0.6	0.6	0.7
Assay specific cut-point		Mean Negative control x normalisation factor			
Specificity and cross reactivity cut point at 99% confidence level	Difference between a sample with and without 5 µg/mL semaglutide or human GLP-1	$A - B \geq 1.96*\sqrt{2}*SD$[3] Or $A\text{-}B/A*100 \geq t(0.01, df)*\sqrt{2}*\%CV$[4]			
Recovery	150 ng/mL antibody	Above cut point	Above cut point	Above cut point	Above cut point
Haemolysis	Grade 1-4	No effect	No effect	No effect	No effect
Sensitivity	No semaglutide	8 ng/mL antibody	31 ng/mL antibody	16 ng/mL antibody	16 ng/mL antibody
	5 nmol/L semaglutide	< 120 ng/mL antibody	< 120 ng/mL antibody	< 120 ng/mL antibody	< 120 ng/mL antibody
	50nmol/L semaglutide	< 1100 ng/mL antibody	< 1100 ng/mL antibody	< 1100 ng/mL antibody	< 1100 ng/mL antibody
	500 nmol/L semglutide	< 3300 ng/mL antibody	< 3300 ng/mL antibody	< 3300 ng/mL antibody	< 3300 ng/mL antibody
Drift	First and last in assay	No drift	No drift	No drift	No drift

Data from study 207146 (Module 4.2.2.1, 207146). Abbreviation: MRD: Minimum required dilution.
1: QC neg, QC medium and QC high are all made in human serum. Only QC low is in species specific serum.
2: Assay cut point determined based on 10 species specific sera.
3: Mean SD of medium and high QC samples = 4.2.
4: Mean %CV of QC neg and QC low = 7.19.

2.6.4.2.2.2　中和抗体測定

抗セマグルチド抗体陽性試料における *in vitro* 中和作用を、BHK 細胞を用いた中和抗体測定法により評価した。本法は、公表された White paper 及びガイドライン[5,6]に準拠し、マウス、ラット血清（Module 4.2.2.1, 207196）及びサル血清（Module 4.2.2.1, 207197）を用いてバリデートされている。概要を以下に示す。本法はヒト GLP-1 受容体とルシフェラーゼレポーター遺伝子をトランスフェクトした BHK 細胞株における、セマグルチドで刺激された cAMP 産生の阻害に基づくものである。対照抗体

又は被験試料をセマグルチドとプレインキュベートした後、細胞へ添加した。約 4 時間のインキュベーション後に細胞を溶解し、得られた発光強度をセマグルチドで刺激された cAMP 産生量とした。供試試料の中和活性は、最大反応すなわち抗体非存在下における、セマグルチドで刺激された cAMP 産生に対する相対値として算出した。抗体陽性血清試料の反応が、対応する投与前試料の最大反応の 99%信頼区間と比較して、低下した場合に「中和作用あり」と分類された。

マウス及びラットを用いた測定では、3 濃度（陰性、低濃度及び高濃度の対照中和抗体）の QC 検体、すなわち、QC neg（対照抗体を有さない）、QC low（4.8 µg/mL GLIP-C1 F27）及び QC high（120 µg/mL GLIP-C1 F27）を使用した。

サルを用いた分析では、3 濃度の QC 検体、すなわち、QCB（0.02 µg/mL GLIP-C1 F27）、QCD（1.6 µg/mL GLIP-C1 F27）及び QCC（20 µg/mL GLIP-C1 F27）を使用した。

QCB 試料には中和活性の感度以下となる低濃度の対照抗体が含まれており、非中和抗体を模倣している。QCC 試料及び QCD 試料には、それぞれ高い中和活性を有する抗体、及び部分的に中和活性を有する抗体に対応する濃度の対照抗体が含まれる。

バリデーションパラメータ及びバリデーション結果を表 2.6.4-5 及び表 2.6.4-6 に示す。

表 2.6.4-5　　マウス及びラット血清を用いた中和抗体測定のバリデーションパラメータ及びバリデーション結果

Parameter	Level	Mouse	Rat
MRD		1/20	1/20
Intra assay Precision	QC Neg	182.4 %CV	61.2 %CV
	QC Low	8.1 %CV	4.9 %CV
	QC High	1.9 %CV	1.5 %CV
Inter assay Precision	QC Neg	190.3 %CV	66.3 %CV
	QC Low	15.6 %CV	14.7 %CV
	QC High	4.1 %CV	2.4 %CV
Neutralising assay cut point (99% confidence)	$2.457*\sqrt{2}*SD_{intra}$ Individual[1]	26.5 %Neutralisation	35.2 %Neutralisation
Drift	First and last in assay	No Drift	No Drift
Sensitivity	No semaglutide	1600 ng/mL antibody[1]	1600 ng/mL antibody
Drug Interference	1.5 nmol/L semaglutide	4100 ng/mL antibody	4100 ng/mL antibody
	7.3 nnmol/L semaglutide	4100 ng/mL antibody	4100 ng/mL antibody
	14.6 nnmol/L semaglutide	4100 ng/mL antibody	4100 ng/mL antibody

Data from study 207196 (Module 4.2.2.1, 207196). Abbreviation: MRD: Minimum required dilution.
1: Assay cut point for mouse and rat serum determined using 15 species specific sera analysed twice each on each plate.

表 2.6.4-6　　サル血清を用いた中和抗体測定のバリデーションパラメータ及びバリデーション結果

Parameter	Level	Monkey
MRD		1/20
Intra assay Precision	QCB[1] QCD[2] QCC[3]	50.2 %CV 3.7 %CV 1.4 %CV
Inter assay Precision	QCB[1] QCD[2] QCC[3]	52.5 %CV 4.0 %CV 1.5 %CV
Neutralising assay cut point (99% confidence)	Mean + 3SD[4]	19.6 %Neutralisation
Drift	First and last in assay	Not determined
Sensitivity	No semaglutide	50 ng/mL antibody[4]
Drug interference	7.3 nmol/L semaglutide	200 ng/mL antibody

Data from study 207197 (Module 4.2.2.1, 207197). Abbreviation: MRD: Minimum required dilution.
1: QCB corresponds to a non-neutralising antibody
2: QCD corresponds to a partly neutralising antibody
3: QCC corresponds to a highly neutralising antibody
4: The neutralising cut point and sensitivity was determined based on 10 individual monkey sera.

2.6.4.2.2.3　放射能測定

トチリウム標識セマグルチド（[^{3}H] Oct-セマグルチド及び[^{3}H] Tyr-セマグルチド）を投与時の放射能の定量は、血漿、尿、胆汁、糞、乳汁及び組織等、複数種の試料マトリックスで実施されている（207264、208349、213316、206132、207267、210018、210172、213315、210171、207265）。LLOQ を表 2.6.4-7 に示す。放射能標識セマグルチド関連物質の放射活性は、液体シンチレーション計側（LSC）及び定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）により定量された（表 2.6.4-7）。

表 2.6.4-7　　非臨床動物種における放射能の LLOQ

Species	Radio-Isotope	Matrix	Measurement method	LLOQ	Study number
Mouse	^{3}H	Plasma	LSC	Twice the mean background	210171
Rat	^{3}H	Plasma	LSC	Twice the mean background	207264
Rat	^{3}H	Blood, Plasma	LSC	Twice the mean background	213316
Rat	^{3}H	Blood, Tissue	QWBA	0.6 pg equiv/mg	206132
Rat	^{3}H	Plasma	LSC	Twice the mean background (0.022 ng equiv/g)	207267
		Tissue	QWBA	5.21 ng equiv/g	
Rat	^{3}H	Plasma	LSC	Twice the mean background (0.020 ng equiv/g)	210172
		Tissue	QWBA	3.38 ng equiv/g	
Rat	^{3}H	Blood, Plasma	LSC	Twice the mean background	213315
		Milk	LSC	Twice the mean background	

Species	Radio-Isotope	Matrix	Measurement method	LLOQ	Study number
Rat	^{3}H	Urine, Feaces, Bile	LSC	Twice the mean background	207265
Rat (Pregnant)	^{3}H	Tissue	Micro-autoradiography	Not applicable	210018
Monkey	^{3}H	Blood, Plasma, Urine, Feaces	LSC	Twice the mean background	208349

LSC: Liquid Scintillation Counting; QWBA: Quantitative Whole Body Autoradiography

2.6.4.3 吸収

主として臨床的に関連する投与経路である皮下投与時のセマグルチドの PK を評価した。さらに、サル及びミニブタを用いて静脈内投与時の PK も検討した。

2.6.4.3.1 単回投与時の PK

単回皮下及び静脈内投与時の重要な PK パラメータを表 2.6.4-8 に示す。セマグルチドを単回皮下投与時の t_{max} は、げっ歯類で 2～3 時間であったのに対し、ウサギ、サル及びミニブタでは約 24 時間であった。いずれの動物種でも PK は用量比例性を示し、性差は認められなかった。サル及びミニブタでは、マウス及びラットと比較して、高い曝露（用量正規化 $AUC_{(tau)}$で比較）が認められた。

表 2.6.4-8 セマグルチドを単回皮下投与時の用量正規化（1 mg/kg）平均 PK パラメータの種間比較

Species	s.c. administration (single dose)					i.v. administration (single dose)			
	C_{max} (nmol/L)	t_{max} (h)	$AUC_{(tau)}$ (h×nmol/L)	C_{avg} (nmol/L)	$t_{½}$ (h)	$t_{½}$ (h)	CL (L/h/kg)	V_z (L/kg)	F (%)
Mouse	910	2	9000	375	7.6	-	-	-	-
Rat	857	3	10200	279	11	-	-	-	-
Rabbit	1263	24	-	-	28	-	-	-	-
Monkey	1770	24	97500	1350	51	53	0.0026	0.200	86
Minipig	883	28	57500	798	-	46.1	0.0016	0.102	94
Human	1830	60	248600	1480	148	137	0.0004	0.080	89

Data from studies: mouse (tau = 24 h): 206663, 207362; rat (tau = 24 h): 206448, 206662, 207377, 207363; rabbit: 207005; monkey (tau = 72 h): 206449, 206450, 207288 (i.v. 207205); minipig (tau = 72 h): 208404 (i.v. [7]); human (tau = 168 h): trial 3687 (CL and V_z calculated as mean values/mean body weight).

サルを用いて、セマグルチドの皮下及び静脈内投与が検討された（Module 2.6.5.3.F, 207205）。平均血漿中プロファイルを図 2.6.4-2 に示す。静脈内投与時の全身クリアランスは 0.0026 L/h/kg であった。ヒトでは、血漿中クリアランスは 0.0004 L/h/kg であり、その結果、終末相半減期は延長した。皮下投与時の絶対的バイオアベイラビリティは、評価したすべての動物種で高く、サルで 86%、ミニブタで 94%、ヒトで 89%であった。

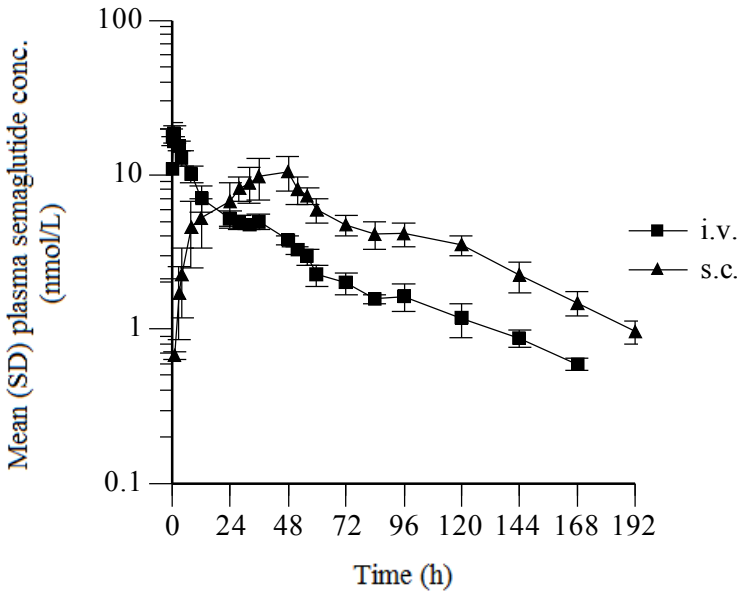


図 2.6.4-2　　セマグルチドをカニクイザルに皮下及び静脈内投与時の平均血漿中濃度－時間プロファイル

Data from study 207205 (N = 4)

セマグルチドをサルに静脈内投与時の血漿中濃度は、二相性の減少を示した（図 2.6.4-2）。第 1 相は循環血中外への分布を表し、第 2 相である終末相は循環血中からの消失を表す。Vz は 0.2 L/kg と、サルにおける細胞外液の水分量にほぼ相当し、このことはセマグルチドがアルブミンと同程度に血漿及び末梢組織に分布することを裏付けるものであった[8]。サルに皮下及び静脈内投与時の平均終末相半減期は類似した（それぞれ 51 時間及び 53 時間）。このことは、消失速度が皮下投与部位からの吸収速度に律速されず、半減期延長の主要メカニズムがセマグルチドの血清アルブミンとの結合であることを示している。同様の情報がヒトでも得られており、終末相半減期は皮下投与時で 148 時間、静脈内投与時で 137 時間であった。さらに、皮下投与時の平均滞留時間（MRT）が 229 時間〔3687 試験（Module 5.3.1.2）〕と長いことに比較して、平均吸収時間（MAT）は短かった（37.6 時間）。

2.6.4.3.2　　反復投与時の PK

2.6.4.3.2.1　　各種動物の反復投与時の PK

マウス（Module 2.6.5.4.A, 206447、Module 2.6.5.4.B, 206663、Module 2.6.5.4.C, 207362）、ラット（Module 2.6.5.4.D, 206062、Module 2.6.5.4.E, 206448、Module 2.6.5.4.G, 206662、Module 2.6.5.4.I, 207377、Module 2.6.5.4.M, 207363）及びカニクイザル（Module 2.6.5.4.T, 206449、Module 2.6.5.4.U, 206450、Module 2.6.5.4.V, 207288）を用いた反復投与毒性試験の一部として、セマグルチドを反復皮下投与時の PK を検討した。PK パラメータの概要を表 2.6.4-1（概要）及び表 2.6.4-9 に示した。生殖毒性評価を支持する目的で、ウサギ（2.6.4.3.2.3）及びミニブタ（Module 2.6.5.4.S, 208404）を用いてセマグルチドを

反復皮下投与時の PK も検討した。動物への継続的な曝露を確実に実施するため、マウス、ラット及びウサギを用いたすべての試験でセマグルチドを 1 日 1 回投与し、サル及びミニブタを用いた試験では、セマグルチドを週 2 回投与した。

高用量での忍容性を改善する目的で、ラット及びサルに対して用量漸増期間を設けた。目標用量での投与第 1 日及び投与最終日に血液試料を採取したが、用量漸増期間中には血液試料を採取しなかった。したがって、各投与用量での実際の累積係数は、ほとんど決定できなかった。PK パラメータの概要は、表 2.6.4-1 に示した。

表 2.6.4-9　　セマグルチドを反復投与時の重要な PK パラメータ

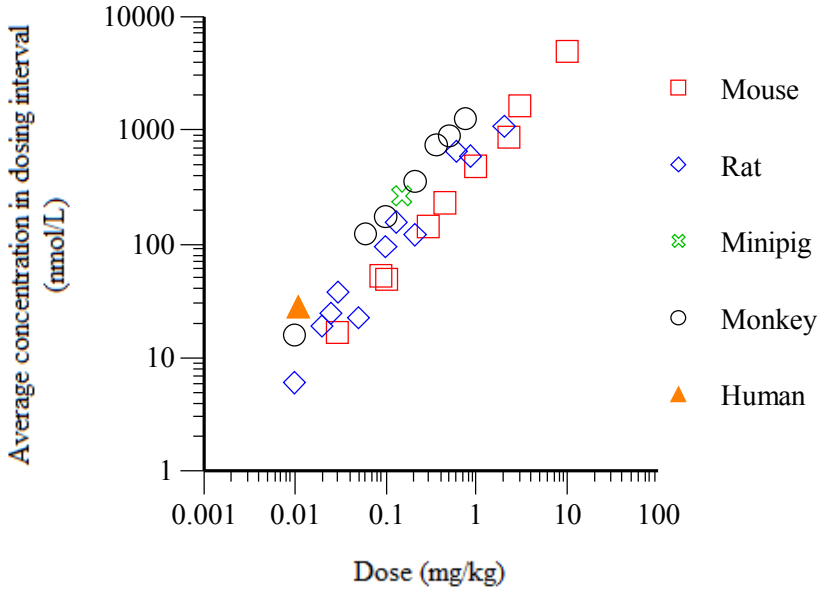
	Dose (mg/kg)	**Day**	**C_{max} (nmol/L)**		**T_{max} (h)**		**$AUC_{0\text{-}tau}$ (h×nmol/L)**		**Tau (h)**	**$T_{1/2}$ (h)**		**Study No**
			Male	Female	Male	Female	Male	Female		Male	Female	
Mice	0.024	Day 1	28.0	18.9	3.0	3.0	315	250	24	5.5	5.4	206447
		Day 14	36.5	29.2	3.0	3.0	479	323	24	6.8	6.0	
	0.078[a)]	Day 1	94.0	76.6	3.0	3.0	927	936	24	6.3	8.4	
		Day 14	124	90.7	3.0	6.0	1416	1080	24	6.6	6.6	
	0.41[a)]	Day 1	419	400	3.0	3.0	4840	5086	24	7.8	6.1	
		Day 14	500	479	6.0	3.0	5716	5154	24	7.9	5.9	
	2.1[a)]	Day 1	2417	2016	3.0	3.0	26848	27591	24	7.1	6.3	
		Day 14	1788	2404	6.0	3.0	23589	18427	24	8.2	NR	
	1.0	Day1	837	1210	4.0	4.0	11100	11100	24	8.17	7.74	206663
		Week13	1030	780	2.0	4.0	12100	10700	24	9.79	8.17	
	3.0	Day1	3160	2630	2.0	2.0	26500	31600	24	NR	5.50	
		Week13	4060	3270	2.0	4.0	39800	36900	24	8.01	6.10	
	10.0	Day1	11700	13700	2.0	2.0	112000	115000	24	7.79	8.16	
		Week13	11600	9200	1.0	1.0	116000	117000	24	5.96	6.32	
	0.1	Day1	ND	79.5	ND	8.0	ND	750	24	ND	NC	207362
		Week105	ND	83.8	ND	4.0	ND	1110	24	ND	NC	
	0.3	Day1	185	280	4.0	8.0	2490	3020	24	NC	NC	
		W105	245	225	8.0	8.0	3080	3090	24	NC	NC	
	1.0	Day1	717	771	2.0	2.0	7290	6920	24	NC	NC	
		Week105	1060	703	4.0	4.0	13900	8970	24	NC	NC	
	3.0	Day1	1720	ND	2.0	ND	11000	ND	24	NC	ND	
		Week105	3450	ND	2.0	ND	39500	ND	24	NC	ND	
Rat	0.01	Day1	10.4	13.6	3.0	3.0	131	145	24	10.0	7.3	206062
		Day12	12.4	17.8	3.0	3.0	172	194	48	7.3	9.0	

	Dose (mg/kg)	Day	C_{max} (nmol/L)		T_{max} (h)		$AUC_{0\text{-}tau}$ (h×nmol/L)		Tau (h)	$T_{1/2}$ (h)		Study No
	0.1	Day1	98	111	3.0	3.0	2070	2270	48	12.3	12.6	
		Day12	156	203	3.0	3.0	2500	2580	48	8.2	9.0	
	0.5→2.0	Day14	742	956	6.0	6.0	14400	16000	48	10.5	9.0	
		Day33	3520	3600	6.0	6.0	45100[b)]	58100	48	10.3	8.4	
	0.007	Day 1	3.18	4.38	6.0	3.0	46.7	72.6	24	26.5	12.7	206448
		Day14	6.04	6.29	6.0	6.0	103	96.1	24	12.8	7.1	
	0.041[a)]	Day 1	22.1	26.8	10	6.0	362	365	24	NC	NR	
		Day14	26.0	35.6	3.0	6.0	447	625	24	14.1	16.3	
	0.19[a)]	Day 1	130	189	6.0	10	2445	3305	24	37.9	NC	
		Day14	128	207	6.0	3.0	2503	3261	24	33.0	10.5	
	0.78[a)]	Day 1	693	646	10	10	12506	12219	24	NC	NC	
		Day14	1090	1201	6.0	3.0	18469	19456	24	17.6	10.6	
	0.004	Day1	2.77	1.31	1.5	1.5	NC	NR	24	NC	NR	206662
		Week13	4.43	4.97	6.0	3.0	68.4	78.1	24	15.1	12.3	
	0.082[a)]	Day1	73.4	94.9	8.0	6.0	1120	1450	24	17.4	13.1	
		Week13	65.1	71.0	6.0	6.0	1120	1290	24	13.2	NR	
	0.78[a)]	Day1	685	635	6.0	3.0	8570	9860	24	15.5	10.5	
		Week13	487	599	6.0	3.0	9310	9490	24	14.3	14.8	
	0.03	Day1	29.5	17.9	3.0	3.0	325	115	24[c)]	9.56	NC	207377
		Week26	41.1	55.8	3.0	3.0	815	989	24	NC	NC	
	0.13[a)]	Day1	132	159	3.0	6.0	1680	1890	24	13.2	NC	
		Week26	213	208	12	6.0	4090	3620	24	NC	NC	
	0.6[a)]	Day1	423	622	1.5	1.5	6480	11300	24	NC	NC	
		Week26	897	1030	6.0	6.0	17700	18500	24	NC	NC	
Cynomolgus Monkey	0.007	Day 1	12.7±2.78	12.5±0.35	12 (8-48)	24 (24-24)	692±86.6	629±39.7	72	68.4[d)] (57.7-84.0)	40.2[d)] (33.4-50.3)	206449
		Day 11	15.6±2.82	13.5±2.0	24 (24-24)	24 (24-24)	853±126	751±69.5	72	49.3[d)] (42.5-59.2)	54.1[d)] (41.9-64.4)	
	0.051[a)]	Day 1	105±23.2	98.9±3.53	24 (12-24)	24 (24-24)	5933±902	5411±158	72	48.1[d)] (46.1-50.3)	55.6[d)] (51.2-62.0)	
		Day 11	150±19.3	136±11.5	24 (12-24)	24 (12-24)	8238±511.9	7705±557	72	55.1 (43.7-64.0)	52.5[d)] (49.1-59.6)	
	0.19[a)]	Day 1	314±34.5	298±71.5	24 (24-24)	24 (8-24)	17686±1724	16584±3615	72	64.7[d)] (54.2-86.6)	57.0[d)] (37.1-84.0)	
		Day 11	500±90.4	407±66.7	24	12	27550±4	23395±2	72	55.7[d)]	62.1[d)]	

Dose (mg/kg)	Day	C_{max} (nmol/L)		T_{max} (h)		$AUC_{0\text{-}tau}$ (h×nmol/L)		Tau (h)	$T_{1/2}$ (h)		Study No
				(8-24)	(12-24)	085	066		(48.7-730)	(47.5-88.5)	
0.68[a)]	Day 1	1611±96.9	1249±218	24 (8-24)	12 (12-12)	87383±7628	70826±11949	72	58.5[d)] (48.0-71.1)	72.3[d)] (615-101)	
	Day 11	1648±262	1710±402	12 (12-24)	12 (12-24)	90070±4895	90984±11938	72	57.9[d)] (49.9-70.3)	68.0[d)] (37.7-125)	
0.004	Day1	11.8±1.1	11.3±1.5	24 (12-48)	24 (24-24)	618±72	586±57	72	39.8±4.1	49.7±23.3	206450
	Week13	17.5±3.0	17.3±2.5	8 (8-24)	10 (8-24)	821±93	785±142	72	41.6±6.1	39.9±4.3	
0.086[a)]	Day1	159±15	145±25	24(12-24)	24 (8-24)	8370±876	8370±912	72	46.1±5.5	71.5±23.6	
	Week13	244±14	232±31	24 (8-24)	8 (4-24)	12800±674	12500±653	72	39.5±8.4	48.4±14.6	
0.097[a)]→	Day1	1450±182	1800±197	18 (8-24)	18 (12-24)	80100±7790	95900±8060	72	55.6±13.0	56.0±13.2	
0.0467	Week13	1130±118	1270±83	24 (12-24)	18 (8-24)	61600±4880	68400±4440	72	47.8±6.4	44.4±6.2	
0.01	Day1	13.6±1.2	14.1±2.6	23±14	20±6	764±65	751±97	72	59 (39-120)	46*	207288
	Week52	24.9±2.6	29.3±3.1	18±7	14±5	1380 ±155	1540±94	72	52 (47-56)	54 (46-82)	
0.06[a)]	Day1	83.8±14.3	95.1±5.5	14±5	16±6	4570 ±892	5320 ±400	72	67 (54-84)	78 (63-95)	
	Week52	166±14	172±29	12±0	12±0	9260 ±1310	9210 ±1380	72	65 (52-97)	57 (51-70)	
0.36[a)]	Day1	663±128	720±118	13±6	17±7	36400±5020	38400 ±5190	72	60 (49-84)	71 (56-90)	
	Week52	1080 ±190	1150 ±131	11±2	11±3	52500±8970	56900 ±6530	72	57 (46-72)	62 (42-83	

a) Due to dose escalation period with lower dose, Day 1 is not 1st day of dosing. Observed accumulation rate (Robs) is not applicable.
b) tau=24h
c) tau =12 h (Female)
d) Harmonic mean (range)
NA: Not applicable, NC: Not calculated, ND: Not dosed, NR: Not reported.
*: One animal only

用量で正規化した曝露は、サル、ミニブタ及びヒトと比較して、マウス及びラットでは低かった。図 2.6.4-3 に示す通り、すべての動物種について用量と曝露との間に線形性が認められている。



Data from studies: mouse: 206447, 206663, 207362; rat: 206062, 206448, 206662, 207377, 207363; monkey: 206449, 206450, 207288; minipig: (7); human: trial 3635.

図 2.6.4-3　　反復投与時の平均セマグルチド血漿中濃度

2.6.4.3.2.2　　妊娠ラット及び幼若ラットの PK

ラットを用いた受胎能及び胚・胎児の発生に関する毒性試験において、妊娠日（GD）6 及び GD17 のラット PK は、反復投与時の非妊娠ラット PK と類似していた（Module 2.6.5.4.J, 206616、Module 2.6.4.5.4M, 207363 及び Module 2.6.5.4.L, 207361）。

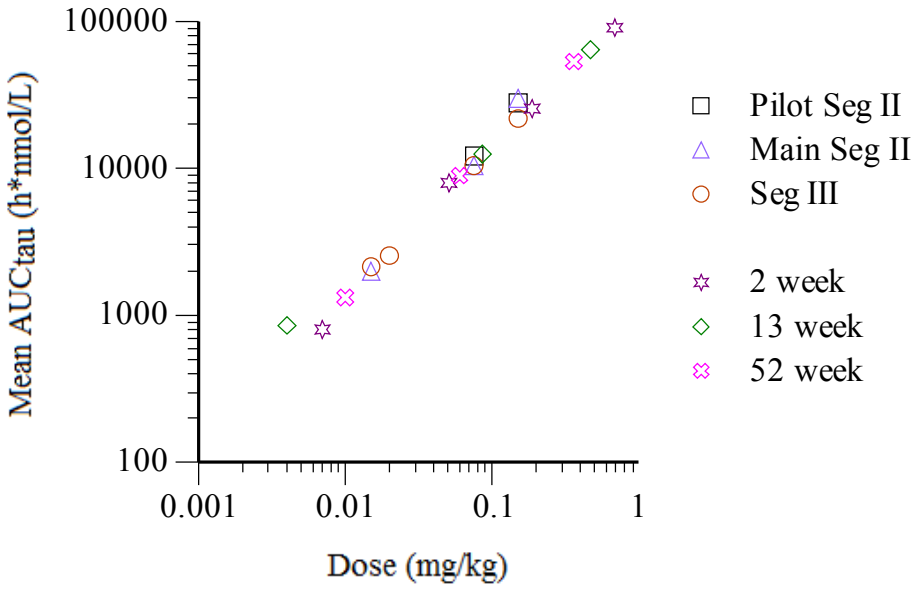
11 週間皮下投与時の幼若ラットに対する曝露（Module 2.6.5.4.O, 214479）は、1 日 1 回、26 週間皮下投与時の成熟ラットにおける曝露と同様であった（Module 2.6.5.4.I, 207377）。0.6 mg/kg を反復投与時の AUC_{tau} は、幼若及び成熟ラットでそれぞれ 15000 及び 18100 h*nmol/L であった。

2.6.4.3.2.3　　妊娠ウサギの PK

EFD 試験（予備試験）において、セマグルチドを妊娠ウサギに初回皮下投与時（GD6, 0.006mg / kg）の PK（Module 2.6.5.4.P, 206536、Module 2.6.5.4.Q, 207358、Module 2.6.5.4.R, 207360）は、非妊娠雌ウサギを用いた単回投与試験（Module 2.6.5.3.D, 207005）で認められた PK と同等であった。GD19 に妊娠ウサギで認められた累積の実測値は、単回投与時のデータから予測された累積と比較してわずかに高かった。

2.6.4.3.2.4　　妊娠サルの PK

サルを用いた EFD ならびに出生前及び出生後の発生（PPND）に関する毒性試験（Module 2.6.5.4.W, 208477、Module 2.6.5.4.X, 208486 及び Module 2.6.5.4.Y, 210061）で認められた曝露は、非妊娠サルにおける定常状態の PK と同様であった（図 2.6.4-4）。



Data from studies in monkeys: Pilot EFD (Pilot Seg II, 208477); Main EFD (Seg II, 208486); PPND (Seg III, 210061); 2-week toxicity (206449); 13-week toxicity (206450); 52-week toxicity (207288).

図 2.6.4-4　　妊娠及び非妊娠サルにおける曝露

2.6.4.3.3　　非臨床試験における抗セマグルチド抗体の形成

抗セマグルチド抗体は、マウス 2 年間皮下投与がん原性試験（Module 2.6.5.4.C, 207362）では 2/75 匹、ラット 13 週間試験（Module 2.6.5.4.H, 210195）では 2/20 匹、及びサル 13 週間試験（Module 2.6.5.4.U, 206450）では 3/34 頭に少量検出された（表 2.6.4-10）。

抗体陽性動物の詳細については、表 2.6.4-10 に示した。

表 2.6.4-10　　非臨床試験における抗セマグルチド抗体陽性動物一覧

Study	Specie	Animal no/ Sex/Group	Dose (mg/kg)	Description	Semaglutide exposure assessment
207362 (Carcino-genicity)	Mouse	488/F/3	0.3	Negative for cross reactivity to endogenous GLP-1; *in-vitro* neutralising Ab not assessed	No exposure assessment in this animal
		571/F/4	1	Negative for cross reactivity to endogenous GLP-1; *in-vitro* neutralising Ab not assessed	1 sample taken Day 1 and week 52 at 12 h post-dose
210195 (13 week)	Rat	41/M/3	0.6	Negative for cross reactivity to endogenous GLP-1; negative *for in-vitro* neutralising Ab	Exposure sample taken Day 15 and Day 99 at 12 h post-dose
		42/M/3	0.6	Negative for cross reactivity to endogenous GLP-1; negative *for in-vitro* neutralising Ab	Exposure sample taken Day 15 and Day 99 at 12 h post-dose
206450 (13 week)	Monkey	13/M/3	0.1	Positive cross reactivity to endogenous GLP-1; Negative for *in-vitro* neutralising Ab	Full PK profile Day 1, week 6 and 13
		38/F/3	0.1	Negative cross reactivity to endogenous GLP-1; Negative for *in-vitro* neutralising Ab	Full PK profile Day 1, week 6 and 13
		48/F/4	1/0.5*	Positive cross reactivity to endogenous GLP-1; Negative for *in-vitro* neutralising Ab	Full PK profile Day 1, week 6 and 13

* Dose level was lowered from 1.0 to 0.5 mg/kg twice-weekly from Day 25 and rest of study due to adverse effects.

ラット及びマウスでは個体あたりの血漿試料採取頻度が少なかったため、抗体陽性及び陰性動物の個体ごとの PK パラメータを推定することができなかった。

しかしながら、表 2.6.4-11（マウス）及び表 2.6.4-12（ラット）に示すセマグルチドの血漿中濃度のデータから、抗体陽性及び陰性の動物間に血漿中セマグルチド濃度に明確な差異は認められなかった。抗体陽性であった No.571 マウスの血漿中濃度（207362）は、同時点で採血した抗体陰性動物である No.572 のマウスの血漿中濃度よりも低いが、血液採取頻度が少ない場合に一般的にみられる変動より、このマウスの曝露量が低下したかどうかを確定することはできなかった。

抗体陰性であった No.40 ラット及び 2 匹の抗体陽性ラット（No.41 及び No.42）の血漿中濃度に差異は認められなかった（表 2.6.4-12）。

表 2.6.4-11　　マウスを用いた 2 年間がん原性試験における血漿中セマグルチド濃度（nmol/L）（207362）

Dose	Gender	Period	Animal number	Time (hr)					
				0	2	4	8	12	24
1	Female	52	565		767				
			566		822				
			567			1314			
			568			673			
			569				1120		
			570				799		
			571*					**138**	
			572					563	
			573						272
			575						252

*Antibody positive animal

表 2.6.4-12　　ラットを用いた 13 週間毒性試験における血漿中セマグルチド濃度（nmol/L）（210195）

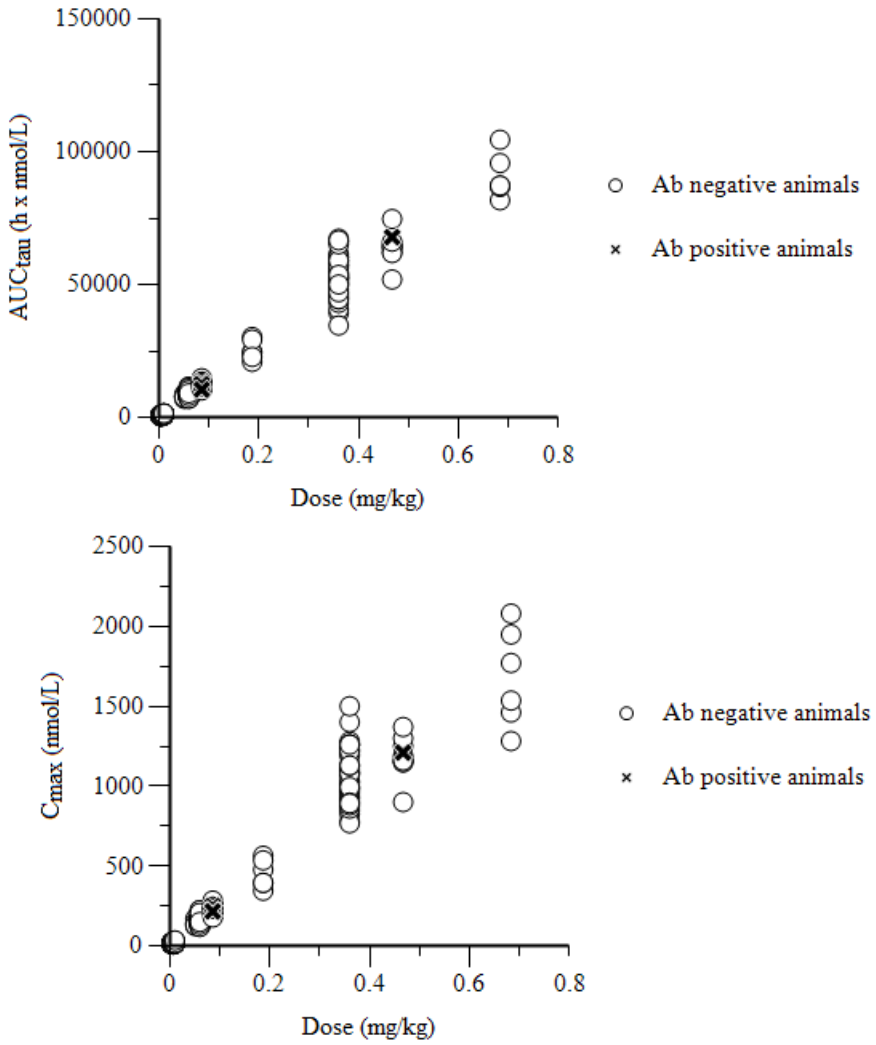
Dose	Gender	Period	Animal number	Time (hr)				
				0	3	6	12	24
1	Male	Day 99	31	381				
			32	399				
			33	338				
			34		837			
			35		661			
			36		710			
			37			940		
			38			514		
			39			737		
			40				583	
			41*				**492**	
			42*				**676**	

Dose	Gender	Period	Animal number	Time (hr)
			43	420
			44	454
			45	345

*Antibody positive animal

サルについては、すべての動物から完全な血漿中セマグルチド濃度－時間のプロファイルが得られたため、抗体陽性及び陰性であった動物を直接比較することが可能である。データの全体像を示す目的で、サルにおける 13 週間毒性試験（206450）での抗体陽性動物ならびに 2 週間毒性試験（206449）、13 週間毒性試験（206450）及び 52 週間毒性試験（207288）での抗体陰性動物の AUC_{tau} 及び C_{max} をプロットした図を示す（図 2.6.4-5）。また、サルにおける 13 週間毒性試験における抗体陽性及び抗体陰性動物の薬物動態パラメータ（C_{max}, T_{max} 及び $AUCt_{au}$）の一覧（表 2.6.4-13）を示す（Module 4.2.3.2-10、206450、Appendix EEE 及び FFF を参照)。図 2.6.4-5 及び表 2.6.4-13 から、抗体陽性動物の曝露量は、同用量における抗体陰性動物の曝露量と同様であることが示唆された。

以上から、非臨床安全性試験において、抗セマグルチド抗体が少数の動物に少量検出されたが、セマグルチド抗体の形成はいずれの試験においても曝露量の評価に影響を与えなかったと考えられた。



Top AUC_{tau} versus dose, bottom : C_{max} versus dose
Data: Studies 206449 (week 2), 206450 (week 6 and 13) and 207288 (week 13, 25, 39 and 52).
Ab：antibody

図 2.6.4-5　　サルにおける定常状態の薬物動態パラメータ（AUC_{tau} 及び C_{max}）

表 2.6.4-13　　サルを用いた 13 週間毒性試験における薬物動態パラメータ（206450）

Group	Animal No	Gender	Dose* (mg/kg)	C_{max} (nmol/L)			T_{max} (h)			AUC_{tau} (h×nmol/L)		
				Day 1	Week 6	Week 13	Day 1	Week 6	Week 13	Day 1	Week 6	Week 13
2	7	Male	0.01	13.0	16.7	15.2	24.00	12.00	12.00	633	914	741
	8	Male	0.01	10.7	22.4	13.7	12.00	24.00	8.00	594	936	736
	9	Male	0.01	12.7	14.5	17.9	48.00	8.00	24.00	730	696	888
	10	Male	0.01	12.0	22.2	18.5	48.00	24.00	8.00	635	1110	776
	11	Male	0.01	12.0	22.5	22.3	24.00	24.00	8.00	608	1130	971
	12	Male	0.01	10.3	15.5	17.2	24.00	24.00	8.00	509	712	811
	31	Female	0.01	10.2	15.5	14.9	24.00	12.00	24.00	566	823	763
	32	Female	0.01	11.4	26.6	19.4	24.00	24.00	8.00	567	1230	1060
	33	Female	0.01	11.2	24.1	17.4	24.00	24.00	8.00	589	1090	675
	34	Female	0.01	11.3	17.6	20.0	24.00	24.00	12.00	652	666	751
	35	Female	0.01	14.0	16.9	13.8	24.00	8.00	8.00	642	830	677
	36	Female	0.01	9.79	17.9	18.2	24.00	12.00	12.00	498	907	781
3	**13[a]**	**Male**	**0.1**	**169**	**252**	**221**	**24.00**	**24.00**	**24.00**	**8840**	**13500**	**13200**
	14	Male	0.1	165	180	248	24.00	12.00	24.00	8530	10300	12100
	15	Male	0.1	180	230	243	12.00	24.00	8.00	9760	12800	11900
	16	Male	0.1	146	248	252	24.00	24.00	24.00	7330	14900	13200
	17	Male	0.1	151	235	237	24.00	24.00	24.00	7920	13000	12900
	18	Male	0.1	141	246	261	24.00	8.00	24.00	7830	13500	13600
	37	Female	0.1	192	262	195	8.00	24.00	8.00	9960	13400	11200
	38[a]	**Female**	**0.1**	**123**	**218**	**224**	**24.00**	**24.00**	**24.00**	**7670**	**10600**	**12600**
	39	Female	0.1	152	223	286	24.00	8.00	4.00	8380	11600	12800
	40	Female	0.1	131	225	240	24.00	8.00	8.00	7630	11700	12400
	41	Female	0.1	143	196	216	24.00	24.00	8.00	8810	11300	13000
	42	Female	0.1	131	194	228	24.00	12.00	24.00	7740	11100	12800
4	19	Male	1.0	1690	1080	1160	24.00	8.00	24.00	93100	60700	61900
	20	Male	1.0	1300	1120	1250	12.00	8.00	24.00	73400	64800	64100
	21	Male	1.0	1250	1240	1150	24.00	8.00	24.00	73100	62500	63800
	22	Male	1.0	1400	1060	1150	24.00	24.00	12.00	82500	61700	62200
	23	Male	1.0	1390	975	901	12.00	8.00	24.00	75200	51000	52000

Group	Animal No	Gender	Dose* (mg/kg)	C_{max} (nmol/L)			T_{max} (h)			AUC_{tau} (h×nmol/L)		
	24	Male	1.0	1650	1170	1170	8.00	24.00	24.00	83400	65500	65500
	43	Female	1.0	1880	1000	1190	24.00	8.00	12.00	104000	57000	64600
	44	Female	1.0	2010	NC	NC	12.00	NC	NC	101000	NC	NC
	45	Female	1.0	1980	1020	1370	24.00	24.00	8.00	103000	52700	66200
	46	Female	1.0	1500	NC	NC	24.00	NC	NC	89000	NC	NC
	47	Female	1.0	1680	799	1300	12.00	8.00	24.00	84400	42400	74700
	48[a]	**Female**	**1.0**	**1720**	**1090**	**1210**	**12.00**	**8.00**	**24.00**	**94100**	**59400**	**67900**

a: Semaglutide antibodies were detected at Week 14 (see Table 170428-A-002-1)
tau: 72 hours
Group1 (Animal No. 1 -6 in male and 25 - 30 in female) is control group.
The animals in group 3 and 4 were pre-dosed with lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as C0 is not zero.
* Targeted dose level: Actual dose levels for Group 2, 3 and 4 were 0.004 mg, 0.086 mg and 0.977/0.467 mg, respectively; the dose level of Group 4 was decreased in Week 4 for females and Week 5 for males.
NC: Not calculated

2.6.4.4 分布

セマグルチドを用いた分布、代謝及び排泄試験は、2 種類の異なる放射能標識トレーサー、すなわち、トリチウム標識位置が、ペプチド骨格のチロシンである標識体（[^{3}H]Tyr-セマグルチド）と、オクタデカン二酸側鎖である標識体（[^{3}H] Oct-セマグルチド）を用いて実施した（図 2.6.4-1）。[^{3}H] Oct 標識は、化学的安定性の観点から安定的な C-H 結合（共有結合）が最適であることから標識位置とされた。トレーサーは溶液中ならびに血漿中及び尿中で放射化学的に安定であることが示された。

2.6.4.4.1 組織分布

ラットに単回皮下及び単回静脈内投与時の[^{3}H]-セマグルチドの分布を、QWBA を用いて検討した（表 2.6.4-14）。

表 2.6.4-14 組織分布試験の概要（単回投与）

Rat strain	Sex	Radio-labelling	Dose (mg/kg)	Dose (MBq/kg)	Route of adm.	Time points	Study ID
Wistar	Male	[^{3}H]Tyr	0.1	12	s.c. i.v.	1, 8, 24 h 6, 24, 30 h	206132
Wistar	Male	[^{3}H]Oct	0.3	41	s.c.	3, 6, 24, 72 h	207267
Wistar	Female (pregnant)	[^{3}H]Oct	0.3	41	s.c.	3, 6, 24 h	207267
Lister-Hooded	Male	[^{3}H]Oct	0.3	80	s.c.	1, 4, 8, 12, 24, 72 h 7, 14, 28 days	210172
Sprague Dawley*	Female (pregnant)	[^{3}H]Oct	0.2	89	s.c.	24 h (Days 9, 10, 11, 12 of gestation)	210018

*The results of this study are discussed in Module 4.2.3.7.3 “Embryotoxicity findings in rats: Assessment of human relevance – Section 5.4.1”.

雄性ラットに[^{3}H] Oct-セマグルチドを単回皮下投与後、セマグルチド関連物質は、時間の経過とともに大部分の組織に分布した（Module 2.6.5.5.B, 207267）。大部分の組織で組織－血液比は 1 以下であり、肺、歯髄、腎臓（皮質及び髄質）、副腎髄質及び子宮のような血流量の高い組織と関連して、セマグルチド関連物質が最も高く認められた。その他の高い放射能が認められた組織は、胆管、包皮腺、褐色脂肪及び白色脂肪であった。中枢神経系（CNS：脳及び脊髄）に認められた放射能は低く、単回投与後に血液 - 脳関門を通過したセマグルチド関連物質の分布が限定的であることを示している。[^{3}H] Tyr-セマグルチドの場合でも分布パターンは同様であった（Module 2.6.5.5.A, 206132）。

ラットでは、セマグルチド関連物質の赤血球への分布は低く、血球への移行が限定的であることが示唆された（Module 2.6.5.3.B, 207264）。

有色ラットのメラニン含有組織におけるセマグルチド関連物質の量は、メラニン非含有組織で測定された結果より高い傾向が認められた。しかしながら、全測定時点で、メラニン含有組織（ぶどう膜／網膜及び皮膚）におけるセマグルチド関連物質の曝露は血漿に比して低く、メラニンへのセマグルチド関連物質の結合は限定的かつ可逆的であることが示唆された（Module 2.6.5.5.C, 210172）。

2.6.4.4.2　　胎盤通過

[^{3}H] Oct-セマグルチドを単回皮下投与時のセマグルチド関連物質の分布は、雄ラットと妊娠雌ラットで類似していた（Module 2.6.5.7.A, 207267）。妊娠ラット（GD18）に 0.3 mg/kg を単回皮下投与したとき、胎児組織中のセマグルチド関連物質量は、検討した全測定時点で母動物の血漿、子宮及び胎盤で検出された量よりもはるかに低く、胎盤通過による胎児移行は限定的であることが示唆された。投与後 24 時間では、胎児の肝臓で最も高いセマグルチド関連物質が検出されたが、母動物の血漿中における総セマグルチド関連物質の量の 4%未満であった。ラット及びウサギを用いた EFD 試験（予備試験：Module 2.6.5.4.K, 207359 及び Module 2.6.5.4.Q, 207358）において、ラット及びウサギの胎児全血（臍帯血）中で、母動物の血漿と比較してより低濃度のセマグルチド未変化体が検出された。

2.6.4.4.3　　タンパク結合

平衡透析及び超遠心分離を用いてセマグルチド血漿タンパク結合の測定を試みたが、セマグルチドが試験系の表面と非特異的結合を生じたと考えられ、これらの技術を用いてタンパク結合を評価することはできなかった。

その後、表面プラズモン共鳴技術[9,10]に基づくバリデートされた測定法（Module 5.3.1.4, 209028 及び 214299）を用いて、ヒト及び動物におけるセマグルチドの *in vitro* タンパク結合を検討した。異なる分析条件を用いて 2 つの試験を実施した（Module 2.6.5.6, 208380 及び 213228）。結合解析は、マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト由来の希釈血漿試料を用いて、37°C で固定化セマグルチド上を通過させることにより実施した。1：1 結合モデルに基づいて動態解析を行い、各種血漿中における解離定数（K_D）、及びセマグルチドの非結合画分（fu, %）を決定した。

各動物種の 2 つの分析間で fu は約 2～3 倍変動したが、双方とも fu は<1%であり、検討したいずれの動物種でも、99%を超える血漿タンパク結合率に相当した。

ラット及びヒト血清アルブミンを用いた結合試験から、アルブミンが血漿中セマグルチドの主要な結合タンパク質であることが示された（Module 2.6.5.6, 213228）。

2.6.4.5 代謝

セマグルチドの代謝は、[^{3}H] Tyr-セマグルチド及び[^{3}H] Oct-セマグルチドを用いて *in vitro* 及び *in vivo* で検討された。マウス、ラット、サル及びヒト血漿を用いて *in vivo* 代謝を試験し、ヒト血漿及び尿中代謝物の同定を行った。

2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝

ラット、サル及びヒト肝細胞（Module 2.6.5.10.A, 206642 及び Module 2.6.5.10.B, 214064）を用いてインキュベーションを行い、[^{3}H] Tyr-セマグルチド及び[^{3}H] Oct-セマグルチドの *in vitro* 代謝を検討した。

[^{3}H] Tyr-セマグルチドは、ラット、サル及びヒト肝細胞で安定であることが示され、ラットでは少量（総放射能の 1%未満）の代謝物が 1 種類のみ認められた。

ラット、サル及びヒト肝細胞で 1.0 µmol/L の[^{3}H] Oct-セマグルチドをインキュベーション後のセマグルチド未変化体量は、それぞれ 83.7%、96.0%及び 94.5%であった。ヒト肝細胞とのインキュベーション後に、2 種類の代謝物が認められたが、いずれもラット肝細胞とのインキュベーションでも存在が認められた。サル肝細胞とのインキュベーションでは、代謝物は認められなかった。

結論として、ラット、サル及びヒト肝細胞で認められた代謝は限定的であり、ヒト特有の代謝物は認められなかった。

2.6.4.5.2 *In vivo* 代謝

放射能標識セマグルチドを投与後、非臨床動物種及びヒトから採取した血漿及び排泄試料中代謝物のプロファイリングを行い、セマグルチドの *in vivo* 代謝を検討した。血漿中代謝物同定試験の概要を表 2.6.4-15 に、排泄されたセマグルチド関連物質の総量の概要を表 2.6.4-16 に示す。

生体成分中で検出されたトリチウム水は、セマグルチド代謝物ではなく、放射能標識を含む脂肪酸部分が連続的かつ完全に分解されたことによるものと考えられた。生体試料中のトリチウム水濃度は、動物種－成分間で変動が大きいものの、経時的に増加し、非臨床動物種と比較して、ヒトでの生成物は少量であることが示された。このことは、ヒトと比較して、動物ではセマグルチドのクリアランスが速く、半減期が短いことと整合性がある。

表 2.6.4-15　　血漿中代謝物プロファイルの概要

Species	Sex	Label position	No. of doses	Dose	Samples profiled	Exposure levels*			Study ID
						Semaglutide (% of total AUC)	No. of metabolites	Individual metabolites (% of total AUC)	
Mouse	M+F	[^{3}H]Oct	1	0.4 mg/kg 41 MBq/kg	1-36 h	83	11	< 5	210299
Rat	M	[^{3}H]Tyr	1	0.3 mg/kg 16 MB/kg	2-72 h	93	1	6.9	207044
Rat	M+F	[^{3}H]Oct	1	0.3 mg/kg 10 MBq/kg	2-72 h	69	10	< 7	207347
Rat	M+F	[^{3}H]Oct	1	0.04 mg/kg 16 MBq/kg	6-24 h	84	9-12	< 3	213526
Rat	M+F	[^{3}H]Oct	5	0.04mg/kg/day 16 MBq/kg/day	6-96 h	76	12	< 4	213526
Monkey	M	[^{3}H]Oct	1	0.3 mg/kg 15 MBq/kg	0.5-168 h	71	4	0.3- 9**	209041
Human	M	[^{3}H]Oct	1	0.5 mg 16.7 MBq (450µCi)	24-840 h	83	6	< 7.7	213363***

* Tritiated water was excluded from the exposure calculations.
** One component represented an exposure of 17%, but was shown to represent a range of unresolved metabolites.
*** Part of clinical trial report 3789.

2.6.4.5.2.1　　マウス、ラット及びサル

マウス（Module 2.6.5.9.A, 210299）、ラット（Module 2.6.5.9.B, 207044 及び Module 2.6.5.9.C, 207347）及びサル（Module 2.6.5.9.F, 209041）に放射能標識セマグルチドを単回皮下投与時の血漿中代謝物プロファイルを検討した（表 2.6.4-15）。検討したいずれの動物種でも、セマグルチド未変化体が循環血漿中の主たる成分（69～93%）であり、最大 12 種類の代謝物が検出された。各代謝物は、AUC に基づくと、セマグルチド関連物質の総量の 0.3～9%であることが示された。明らかな性差は認められなかった。

[^{3}H] Oct-セマグルチドの 1 日 1 回皮下投与によるラットを用いた 5 日間反復投与試験を実施した（Module 2.6.5.3.C, 213316）。単回投与及び反復投与後の代謝物プロファイルは類似しており、雌雄の血漿中に 9～12 種類の代謝物が検出された（Module 2.6.5.9.E, 213526）。単回投与時と比較して、5 日間の投与後、セマグルチド及びセマグルチド関連物質の曝露は増加した。この累積は血漿中半減期（11 時間）及び 1 日 1 回というセマグルチドの投与間隔に基づいて予測されたとおりであった。セマグルチドー代謝物の曝露比は、投与後 1 日及び 5 日で同程度であり、代謝物はセマグルチドと少なくとも同程度に血漿中から消失することが示された。以上から、代謝物の累積がセマグルチドの累積以上になることはないと考えられた。

ラット（Module 2.6.5.9.D, 208008）及びサル（Module 2.6.5.9.F, 209041）に[^{3}H]Oct-セマグルチドを単回投与後に採取した試料を用いて尿中及び糞中代謝物プロファイルを検討した（表 2.6.4-16）。

ラットでは、糞中に少量（投与量の 1.1%）のセマグルチド未変化体が雌雄で認められ、尿中に投与量 1%未満のセマグルチド未変化体が雌のみに認められた。

雄ラット尿中では 6 種類、雌ラット尿中では 8 種類の放射能成分が認められた。尿中の主要成分はトリチウム水であり、雌雄共に 0～120 時間以内に最大で投与量の 25%が認められた。糞中では、雄ラットでは 14 種類、雌ラットで 13 種類の少量の放射能成分が排泄物中代謝物として認められた。各成分は投与量の 4%未満であった。

胆汁カニュレーション施行ラット（Module 2.6.5.9.D, 208008）では、雌雄の胆汁中に投与量の約 14%のセマグルチド未変化体が検出された。雄ラット胆汁では計 13 種類の成分、雌ラット胆汁では計 12 種類の成分が排泄物中代謝物として検出され、各成分は各採取時間でそれぞれ投与量の 5%未満であった。

サルでは、尿中に 9 種類の成分が検出され、各成分は投与量の 0.1～4.9%であった。尿中にセマグルチド未変化体は検出されなかった。糞中には 15 種類の成分が検出され、セマグルチド未変化体は投与量の 0.6%であり、その他の成分は投与量の 0.1～0.5%であった。

2.6.4.5.2.2　ヒト

3789 試験（Module 5.3.3.1）において、健康男性被験者に 0.5 mg（450 µCi）の[^{3}H] Oct-セマグルチドを単回皮下投与し、ヒトにおける代謝を検討した。

血漿（Module 2.6.5.9.G, 213363）では、セマグルチドは検討した全測定時点で循環血中の主要な成分であった（第 0～35 日）。セマグルチド未変化体は、循環血中のセマグルチド関連物質の総量の 83%であった。血漿中に 6 種類の代謝物成分が検出され、AUC に基づくと、各成分は、セマグルチド関連物質の総量の 0.4～7.7%であった。

セマグルチドは、排泄される前に広範に代謝されることが示された。尿中（Module 2.6.5.9.H, 213363）では、投与後 0 日から 42～56 日までの試料から 22 種類の成分が検出された。尿中の 2 種類の主要代謝物は、それぞれ投与量の約 14%であり、その他の代謝物は、いずれも投与量の 2%未満であった。尿中のセマグルチド未変化体は投与量の 3.1%であった。

糞中では、7 種類の代謝物が検出された。各代謝物は投与量の 0.1～1.5%であった。セマグルチド未変化体は検出されなかった。

2.6.4.5.2.3　　代謝物の同定

3789 試験において、健康男性被験者に 0.5 mg（450 μCi）の[^{3}H] Oct-セマグルチドを単回皮下投与後に得た血漿及び尿試料を用いて、LC-MS を用いて代謝物同定を実施した（Module 2.6.5.9.I, 214379）。

血漿中に最も多く存在したヒト代謝物として P3 が同定され、セマグルチド関連物質の総量の 7.7%であった。さらに超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）を実施後、MS による詳細分析を実施した結果、P3 は少なくとも 3 成分（P3A、P3B 及び P3C）から成ることが判明した。

血漿中代謝物 P3B は、セマグルチドの 20～37 位のアミノ酸から成るペプチド配列（すなわち、N 末端側の最初の 13 個のアミノ酸切断により生じた）として同定された（図 2.6.4-6）。標準品を用いて同定を確認した。本代謝物は、ペプチド骨格のタンパク質分解後に形成されると推定される。セマグルチドと NEP を *in vitro* でインキュベーションした結果、NEP によりこの代謝物 P3B が形成可能であることが示された（Module 2.6.5.10.C, 215514）。

P3C は m/z 値が、セマグルチドと類似であることに基づき、セマグルチドの異性体と考えられた。血漿中 P3A 及び P3C は、量が限られていたため、それ以上の構造情報は得られなかった。

尿中の 2 種類の主要代謝物（U6 及び U7）は、ブタン（C_4）二酸又はヘキサン（C_6）二酸側鎖が ADO リンカーを介して結合した遊離の 26 位リジンと同定された（図 2.6.4-6）。これらは、脂肪二酸側鎖の β 酸化による C_2 単位での連続的な切断（C_{18}→...→C_6→C_4）とともに、ペプチド骨格が完全にタンパク質分解されることにより生じた代謝物である。

クロマトグラムの質量スペクトル及び保持時間に基づき、尿中代謝物 U22 はセマグルチドと同定された。

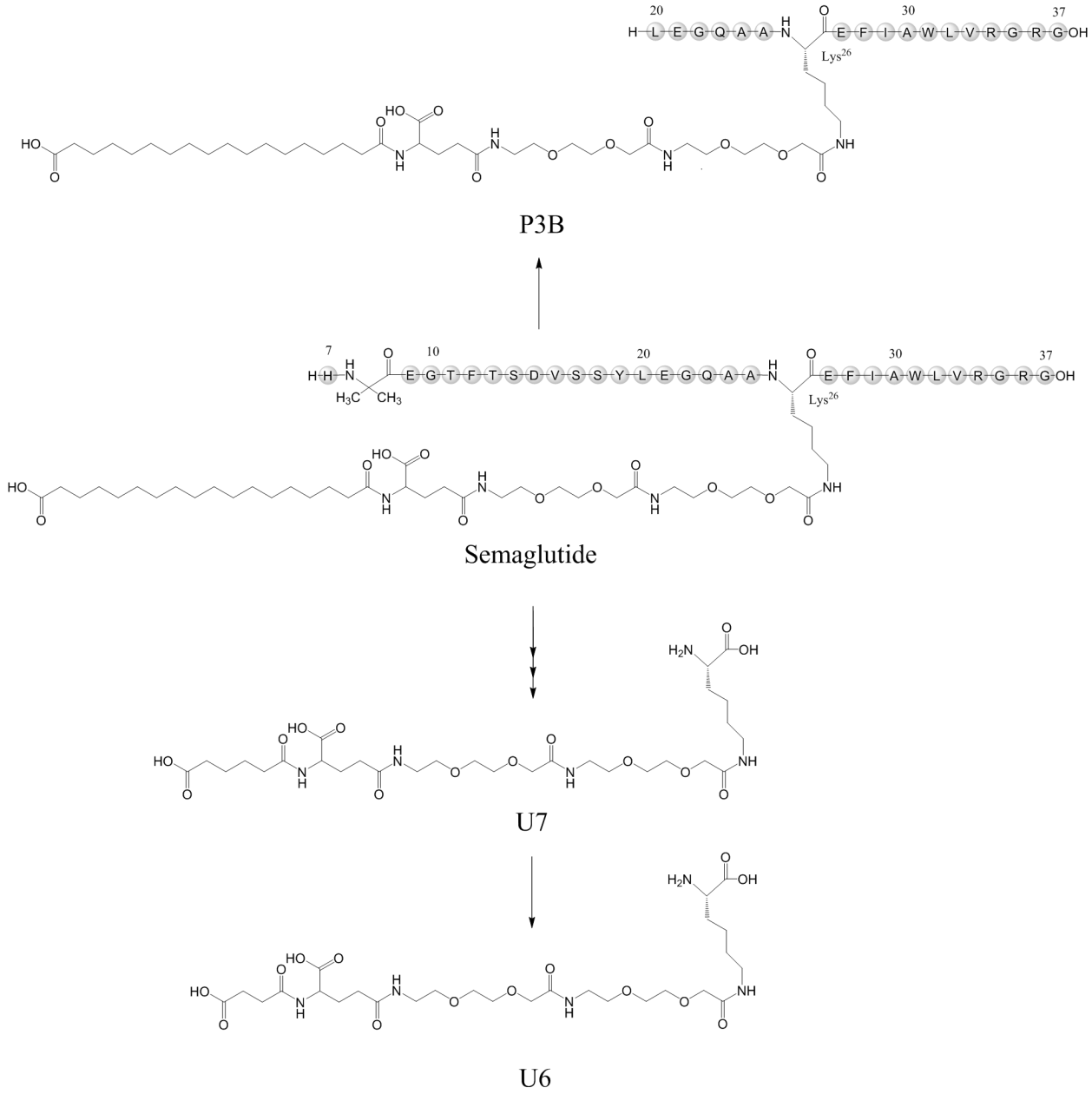


図 2.6.4-6　　ヒトにおけるセマグルチドの推定代謝経路（血漿中 P3B ならびに尿中 U6 及び U7）

2.6.4.5.2.4　代謝の比較

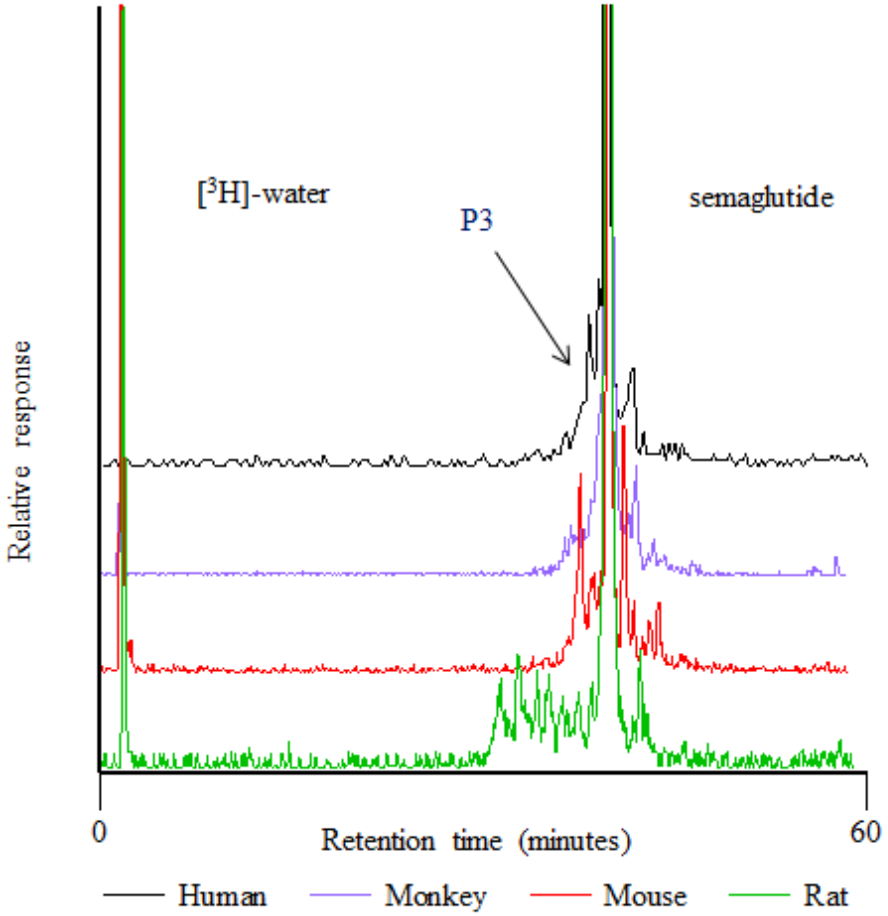
血漿中代謝物プロファイルは種間で類似していた（図 2.6.4-7）。セマグルチドのペプチド骨格は、ペプチド構造の予想通りにタンパク質分解によって代謝され、脂肪酸基は連続的なβ酸化によって分解された。

いずれの動物種でも、セマグルチドが循環血漿中の主要成分であり（表 2.6.4-15）、循環血漿中薬物関連物質の総量の 69～93%であり、それぞれの循環血漿中代謝物の曝露量は、セマグルチドと比較して低かった。

血漿中に生じた代謝物は、クロマトグラム上、セマグルチドピークの近くに溶出し、このことはアルブミン結合性かつ非極性の脂肪酸は未変化であり、ペプチド骨格の切断により代謝物が生じたことを示すものである。このことは P3B 代謝物の同定（ヒト）により支持されている。

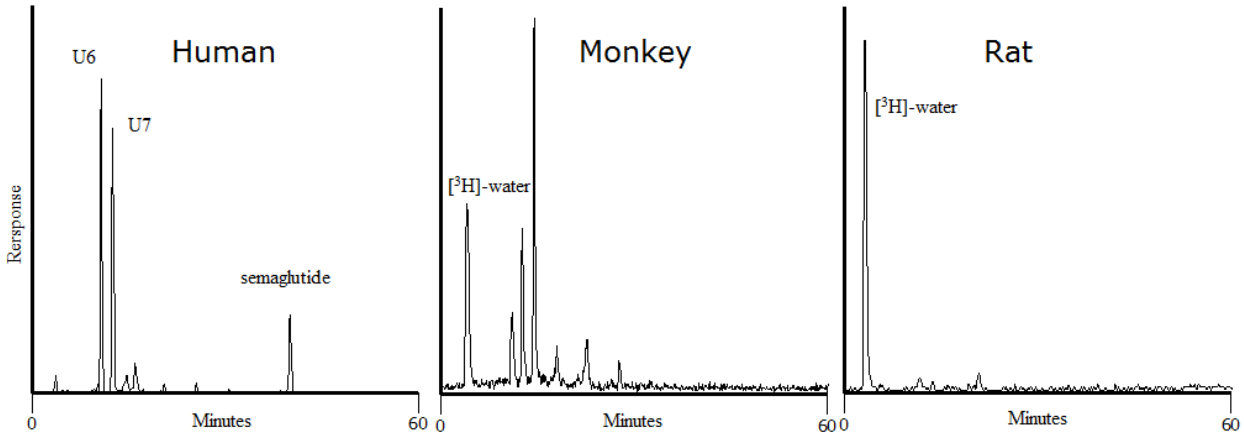
ヒト血漿中に存在する代謝物の量はセマグルチドと比較して低かった。代謝物のプロファイルの検討時で検出された最大量の代謝物（P3）は、AUC に基づく総量の 7.7%であったが、UPLC による詳細分析の結果、本成分は実際には少なくとも 3 成分（P3A、P3B 及び P3C）で構成され、各成分が合わさって 7.7%となっていた。代謝物のクリアランスは、ラットにおける反復投与時において、セマグルチドと類似することが推定されたため、代謝物は定常状態において、セマグルチドで認められた以上に累積することはないものと予想される。

検討したいずれの動物種の排泄物中代謝物プロファイルの結果からも、セマグルチドは排泄される前に代謝されることが示された（図 2.6.4-8）。いずれの動物種でも、極性代謝物がセマグルチドと比較してクロマトグラム上早く溶出しており、このことはアルブミン結合性の非極性脂肪酸に分解が生じたことを示している。代謝物を同定した結果、ヒト尿中の 2 種類の主要代謝物は、ブタン（C_4）二酸又はヘキサン（C_6）二酸側鎖が ADO リンカーを介して結合した遊離アミノ酸（26 位リジン）であり（図 2.6.4-6）、上記代謝物は、ペプチド骨格の分解及び脂肪酸側鎖の連続的な β 酸化により生じた生成物であった。



Metabolite profiles have been adjusted based on the relative retention time of semaglutide and the response are shown in % of the semaglutide response in each chromatogram. Data from studies: 210299 (mouse), 213526 (rat), 209041 (monkey) and 213363 (human).

図 2.6.4-7　[^{3}H]Oct-セマグルチドを皮下投与時のマウス（24 時間）、ラット（24 時間）、サル（24 時間）及びヒト（96 時間）の代謝物プロファイル



Data from study 213363 (human), 209141 (monkey) and 208008 (rat)

図 2.6.4-8　[^{3}H]Oct-セマグルチドを皮下投与時のヒト（48～120 時間）、サル（24～72 時間）及びラット（72～120 時間）の代謝物プロファイル

2.6.4.6 排泄

セマグルチド関連放射能の排泄について、正常及び胆管カニュレーション施行ラット、ならびにカニクイザル及びヒトに[^{3}H] Oct-セマグルチドを単回皮下投与した試験を実施している。結果の概要を表 2.6.4-16 に示す。

表 2.6.4-16　　[^{3}H]Oct-セマグルチドを単回皮下投与時のセマグルチド関連物質の排泄（%投与量）

Species	**Rat**	**Rat** **(Bile cannulated)**	**Monkey**	**Human**
Dose	0.3 mg/kg 10 MBq/kg	0.3 mg/kg 10 MBq/kg	0.03 mg/kg 15 MBq/kg	0.5 mg 16.7 MBq
Time	0-7 days	0-4 days	0-14 days	0-57 days
Sex	M+F	M+F	M	M
Urine (%)	37.3	33.3	30.3	53.0
Faeces (%)	34.5	2.42	20.7	18.6
Bile (%)	-	48.3	-	-
Expired air (%)	0.16	-	-	3.20
Carcass (%)	22.1	13.0	-	-
Other* (%)	4.04	6.21	7.19	-
Total (%)	98.1	103.6	58.2	75.1

-: not applicable; *: cage-wash and cage debris
Data from studies: rat: 207265, 207265 (bile cannulated); monkey: 208349; human: trial 3789.

セマグルチド関連物質の全体的な回収率は、マスバランス試験に残屍が含まれることからラットでは高かったものの、採取期間が長く、多量の試料を取り扱う必要があったことからサルとヒトでは低かった。血漿中半減期の長い化合物では、本質的に高い回収率を得ることが困難であること[8]、及びトリチウム水の排泄は遅いことが知られていること[11]から、総放射能を回収することは考えていなかった。

2.6.4.6.1　　ラット及びサル

ラット（Module 2.6.5.13.A, 207265 及び Module 2.6.5.14, 207265）及びサル（Module 2.6.5.13.B, 208349）において、尿及び糞の両方がセマグルチド関連物質の重要な排泄経路であった。ラットでは、投与後最初の 48 時間で排泄が遅くなり、投与量の 10%しか排泄されなかった。しかしながら、排泄は経時的に増加し、投与後 168 時間（第 7 日）に投与量の約 72%が排泄された。セマグルチド関連物質の排泄は、ラットと比較してサルでは遅くなっており、サルでは最終試料採取時点でも依然として低量のセマグルチド関連物質（第 14 日で投与量の 58%）が排泄されている。尿中及び糞中のトリチウム水含量は、いずれの動物種でも経時的に増加したが、サルと比較してラットで高かった。

ラットの排泄経路及び排泄速度に有意な性差は認められなかった。胆汁カニュレーション施行ラットの結果から、胆汁がセマグルチド関連物質を糞中に排泄する主要経路であることが示された。

2.6.4.6.2　ヒト

ヒトにおいて、セマグルチド関連物質は尿及び糞の両方に排泄され（Module 2.6.5.9.G, 213363、3789試験）、尿では投与量の 53%、糞では投与量の 18.6%であった。排泄されたセマグルチド関連物質量は、排泄物の最終回収時である第 64 日まで継時的に減少した。

尿中代謝物分析の結果、U6 及び U7 の一部として ADO リンカーが尿中に排泄されたことが明らかとなり、これらはそれぞれブタン（C_4）二酸又はヘキサン（C_6）二酸側鎖と結合した遊離アミノ酸（26 位のリジン）と同定された。これらは、セマグルチドのペプチド骨格のタンパク質分解及び脂肪二酸側鎖の連続的なβ酸化により生じた代謝物であった。DPP-4 による分解を抑制するためセマグルチドのペプチド骨格の 8 位に挿入された合成アミノ酸（Aib）も、ペプチド骨格がタンパク質分解された後、尿を介して排泄されると予想される[12,13]。

2.6.4.6.3　乳汁中排泄

[^{3}H] Oct-セマグルチドを 0.3 mg/kg（60 MBq/kg）で単回皮下投与後の泌乳ラット乳汁中にセマグルチド関連物質が検出された（Module 2.6.5.7.B, 213315）。検討した時点で、乳汁中セマグルチド関連物質量は血漿中の 1/3～1/12 倍であった。また、セマグルチドは乳汁中の主たる成分であることが示された。

2.6.4.7 薬物動態学的相互作用

ペプチド構造であることから、セマグルチドはCYP及び薬物トランスポーターの基質とは考えられていない。したがって、セマグルチドの薬物相互作用評価の焦点は、CYP及び薬物トランスポーターに及ぼすセマグルチドの影響を検討することであった。現行のガイドライン[14,15]で推奨されている手法に準拠し、臨床的に意味のある濃度で実施した。

2.6.4.7.1 酵素誘導

セマグルチドがCYP酵素活性を経時的に誘導する可能性について、26週間反復投与毒性試験におけるセマグルチドを0.03、0.13及び0.6 mg/kg/日の用量でラットに1日1回投与時の肝ミクロソームを用いて検討した（Module 2.6.5.15.A, 208501）。その結果、いずれも対照群と比較して2倍未満の軽微な変化が認められたのみであった。

ヒト肝細胞を用いて酵素誘導を *in vitro* で検討した（Module 2.6.5.15.B, 215048）。評価の結果、セマグルチドにより、CYP1A2、CYP2B6及びCYP3A4/5の活性及びmRNA量の軽微な上昇が認められたか、又は変化が認められなかった。このことから、セマグルチドが臨床的に意味のある薬物相互作用を生じる可能性は低いと考えられた。

2.6.4.7.2 酵素阻害

凍結ヒト肝細胞を用いて *in vitro* で評価したが、臨床的に意味のあるCYPであるCYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6及びCYP3A4/5について、セマグルチドの直接的又は時間依存的もしくは代謝依存的な阻害は認められなかった（Module 2.6.5.15.C, 214196）。したがって、セマグルチドが、小腸濃度及び循環血中濃度での評価時において、臨床的に意味のある薬物相互作用を生じる可能性は低いと考えられる。

2.6.4.7.3 トランスポーター阻害

セマグルチドの臨床的に意味のあるトランスポーター阻害について、ヒトトランスポーター発現細胞（P-gp：Caco-2細胞、BCRP：MDCK2細胞、OATP1B1、OATP1B3、OAT1及びOAT3：HEK293細胞）を用いて *in vitro* で評価した（Module 2.6.5.15.D, 215026）。排泄型トランスポーターであるP-糖タンパク（P-gp）及びBCRPならびに取り込み型トランスポーターであるOAT1、OAT3及びOCT2に対する阻害は認められなかった。肝取り込みトランスポーターであるOATP1B1及びOATP1B3については阻害が認められ、IC_{50}値はそれぞれ3.50及び2.95 µmol/Lであった。しかしながら、上記IC_{50}値は、予想されるセマグルチドの定常状態時におけるC_{max}〔1.0 mg/週で32 nmol/L；3635試験（Module 5.3.4.2）〕よりも約100倍高いことから、検討した薬物トランスポーターについて、セマグルチドと臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

セマグルチドの PK は、実施された単回及び反復投与試験において十分に特性解析が行われたものと考えられたことから、それ以上の PK 試験は実施しなかった。

2.6.4.9 考察及び結論

セマグルチドの PK 及び代謝は広範に試験されており、ペプチド分子で予想される特性が示されている。

皮下投与時の PK について、マウス、ラット、ウサギ、カニクイザル及びミニブタを用いて十分な特性解析が行われている。毒性試験における抗セマグルチド抗体形成の結果から、抗体形成は限定的であり、曝露に影響を及ぼさないことが示された。検討した非臨床動物種及びヒトにおけるセマグルチドの反復皮下投与時の PK パラメータの概要を表 2.6.4-1 に示す。

セマグルチドの PK は、用量比例性を示し、性差及び時間依存性は認められなかった。用量で正規化した曝露は、サル及びヒトと比較して、マウス及びラットでは低かった。皮下投与部位から吸収後、試験されたいずれの動物種でもセマグルチドの血漿中半減期は長かった。高用量での忍容性を可能とするのに用量漸増が必要であることから、各用量における累積を測定することは、ほとんどできなかった。しかしながら、試験した用量範囲において PK は予測可能であり、用量比例性であることから、全身に対する累積は、終末相半減期及び投与間隔に基づくと、種に依らず約 1.5～5 倍の範囲であると推定された。 サル及びミニブタにおける皮下投与時のバイオアベイラビリティは 86%及び 94%であり、これはヒトにおけるバイオアベイラビリティの 89%と同等であった。

ラットを用いた分布試験の結果から、血液中及び血流量の多い器官でセマグルチド関連物質が最も高く存在することが示された。セマグルチド関連物質の組織－血液比は概して 1 以下であり、肺、歯髄、腎臓（皮質及び髄質）、副腎髄質及び子宮で最も高く、CNS（脳及び脊髄）及び白色脂肪で最も低かった。セマグルチドの血漿タンパク結合は動物種間で類似しており、主にアルブミンに結合（>99%）することが示された。サルに静脈内投与時の Vz は細胞外液の水分量に相当する 0.2 L/kg であり、このことはセマグルチドがアルブミンと同程度に血漿中及び末梢組織に分布することを示している。

ラット、ウサギ及びサルにセマグルチドを反復投与したが、妊娠動物と非妊娠動物の曝露に差異は認められなかった。妊娠ラットでは、胎盤を通過したセマグルチド関連物質は少量であった。胎児におけるセマグルチド関連物質量は、セマグルチドを単回投与時の母動物血漿での曝露量の約 4%未満であり、セマグルチドが最も多い成分であった。泌乳ラットでは、セマグルチド関連物質の乳汁排泄が少量（母動物血漿の 1/3～1/12 倍）認められ、セマグルチドが主たる成分であった。

全体的に、ヒトにおけるセマグルチド代謝物プロファイルは、検討した非臨床動物種プロファイルと類似していた。血漿中では、セマグルチドは、AUC に基づくとセマグルチド関連物質の総量の 69～

93%であり、各動物種で最大 12 種類の代謝物が認められた。各代謝物の曝露は、AUC に基づくとセマグルチド関連物質の総量の約 1%未満～9%であることが示された。

代謝物同定を行った結果、ヒト血漿中代謝物がペプチド骨格のタンパク質分解及び脂肪酸側鎖の連続的なβ酸化により生じることが確認された。2 種の主要な尿代謝物（U6 及び U7）の一部として、未変化の ADO リンカーが尿中に排泄されることが示された。生体内に広範に分布する酵素である NEP は、内因性 GLP-1 及びリラグルチドでも認められるように[16,17,18]、セマグルチドも代謝することが示された。ペプチド分解及びβ酸化は、動物及びヒトに共通な代謝経路であり、特定の組織及び器官に限定されない。したがって、セマグルチドの代謝は組織に依らず、かつヒトと非臨床動物種で同様であると考えられた。

ヒト血漿中では、放射能標識体の投与時の AUC に基づくと、セマグルチドがセマグルチド関連物質の総量の 83%であった。ヒト血漿中に存在する多種の代謝物はセマグルチドと比較して低濃度であった。ヒトにおける最も多い血漿中代謝物（P3）は AUC に基づくと総曝露の 7.7%であったが、UPLC による詳細分析の結果、本成分は実際には少なくとも 3 成分で構成され、各成分が合わさって 7.7%となっていた。ラットにおける反復投与時において血漿中代謝物のクリアランスは、セマグルチドと類似することが推定されており、血漿中代謝物は定常状態において高い累積を示すことはないものと推定される。したがって、ヒトにおけるセマグルチド代謝物は非臨床安全性試験において十分に安全性が確認されているものと考えられる[19]。

尿及び糞の両方が、動物及びヒトにおけるセマグルチド関連物質の重要な排泄経路であることが示された。ラット、サル及びヒトの排泄パターンは全体的に類似していたが、ラットと比較してサル及びヒトでは排泄が遅く、このことは、サル及びヒトではセマグルチドの半減期がより長いことと整合性があった。

ラット、サル及びヒトにおける代謝及び排泄試験から、セマグルチドが排泄前に代謝されたことが示されている。しかしながら、少量のセマグルチド未変化体がヒト尿中（投与量の 3%）及び雌ラット尿中（投与量の 1%未満）ならびにサル糞中に検出された。

胆汁カニュレーション施行ラットの結果から、胆汁がセマグルチド関連物質を糞中に排泄する主要経路であることが示された。

臨床的に意味のある濃度での *in vitro* 試験の結果、セマグルチドは、CYP 及び薬物トランスポーターの活性に影響を及ぼさなかったことから、臨床的に意味のある薬物相互作用を生じないものと考えられる。

2.6.4.9.1　結論

セマグルチドの PK について十分な特性解析が行われている。セマグルチドは、皮下投与部位から吸収され、バイオアベイラビリティは 85%以上である。セマグルチドはアルブミンとの高い結合性（> 99%）が認められ、検討したいずれの動物種でも血漿中半減期が長い。血漿中曝露はいずれの動物種でも用量比例的に増加し、消失半減期及び投与間隔と整合性のある累積が認められた。性差は認められなかった。

セマグルチドの代謝は、ヒト、カニクイザル及びラットで類似していた。セマグルチドは検討したいずれの動物種でも循環血漿中の主要成分であり、血漿中のヒト代謝物はいずれも曝露の 10%未満であった。

セマグルチドは、尿及び糞中への排泄前にペプチド骨格のタンパク質分解及び脂肪酸側鎖の連続的なβ酸化により代謝される。未変化の ADO リンカーが尿中に排泄された。

CYP 酵素及びトランスポーターに関する *in vitro* 試験の結果から、セマグルチドは臨床的に意味のある薬物相互作用を生じる可能性は低いことが示された。

参考文献

[1] Guidance to Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.

[2] Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, February 2012.

[3] Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M et al. Recommendations for the Design and Optimization of Immunoassays Used in the Detection of Host Antibodies against Biotechnology Products. J Immunol Methods. 2004;289:1-16.

[4] Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. J Pharmaceut Biomed. 2008;48:1267-81.

[5] Gupta S, Indelicato SR, Jethwa V, Kawabata T, Kelley M, Mire-Sluis AR, et al. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. J Immunol Methods. 2007;321(1-2):1-18.

[6] EMEA Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-derived Therapeutic Proteins, 2007.

[7] Lau J, Bloch P, Schäffer L, Pettersson I, Spetzler J, Kofoed J et al. Discovery of the Once-Weekly Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analogue Semaglutide. J Med Chem 2015;58(18):7370-80.

[8] Diao L, Meibohm B. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Correlations of Therapeutic Peptides. Clin Pharmacokinet. 2013;52:855-68.

[9] Morton TA, Myszka DG. Kinetic Analysis of Macromolecular Interactions using Surface Plasmon Resonance Biosensors. Methods in Enzymology. 1998;295:268-94.

[10] Rich RL, Day YSN, Morton TA, Myszka DG. High-Resolution and High-Throughput Protocols for Measuring Drug/Human Serum Albumin Interactions Using BIACORE. Anal Biochem. 2001;296:197-207.

[11] Foy JM. The Biological Half-Life of Tritiated Water in The Mouse, Rat, Guinea- Pig and Rabbit under Tropical Conditions and the Effect of Climate and Saline Drinking on the Biological Half-Life of Tritiated Water in the Rat. J. Cell Comp Physiol. 1964;64:279-82.

[12] Noall MW, Riggs TH, Walker LM, Christensen HN. Endocrine Control of Amino Acid Transfer. Science. 1957;126:1002-5.

[13] Christensen HN, Aspen AJ, Rice EG. Metabolism in the rat of three amino acids lacking alphahydrogen. J Biol Chem. 1956;220:227-94.

[14] EMA. Guideline on the Investigation of Drug Interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1. 2013.

[15] FDA. Guidance for Industry (Draft). Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. 2012.

16 Malm-Erjefa M, Bjørnsdottir I, Vanggaard J, Helleberg H, Larsen U, Oosterhuis B, et al. Metabolism and excretion of the once-daily human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in healthy male subjects and its in vitro degradation by dipeptidyl peptidase IV and neutral endopeptidase. Drug Metab and Disposition. 2010;38(11):1944-53.

17 Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. Pharmacol Rev. 1993;45:87-146.

18 Turner AJ, Isaac RE, Coates D. The neprilysin (NEP) family of zinc metalloendopep-tidases: genomics and function. BioEssays. 2001;23(3):261-9.

19 FDA. Guidance for Industry. Safety Testing of Drug Metabolites. 2008.

オゼンピック皮下注 2mg

2.6.5 薬物動態試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

.

目次

ページ

目次 2
2.6.5.1 薬物動態試験の概要 5
2.6.5.2 測定法及びバリデーション報告書 12
2.6.5.2.A 非臨床試験で使用した生体試料中薬物濃度分析法の概要 12
2.6.5.3 吸収（単回投与） 14
2.6.5.3.A ラットを用いた Irwin 試験における影響 – 206443 14
2.6.5.3.B ラットに[^{3}H]-Oct-NNC 0113-0217 を皮下投与時の PK - 207264 15
2.6.5.3.C [^{3}H]Oct-セマグルチド: 単回及び反復投与時のラットにおける吸収 - 213316 16
2.6.5.3.D ウサギにおける血漿中レベル - 207005 17
2.6.5.3.E 覚醒テレメーター装着非ヒト霊長類における心血管系の影響 - 206442 18
2.6.5.3.F サルにおけるバイオアベイラビリティ - 207205 19
2.6.5.3.G サルにおけるバイオアベイラビリティ - 208349 20
2.6.5.4 吸収（反復投与） 21
2.6.5.4.A マウスを用いた 2～5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206447 21
2.6.5.4.B マウスを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 - 206663 23
2.6.5.4.C マウスを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 - 207362 25
2.6.5.4.D ラットを用いた 2～5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206062 26
2.6.5.4.E ラットを用いた 2～5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206448 28
2.6.5.4.F ラットを用いた 4 週間ブリッジング試験 - 209159 30
2.6.5.4.G ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 - 206662 32
2.6.5.4.H ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験（ブリッジング） - 210195 34
2.6.5.4.I ラットを用いた 26 週間反復皮下投与毒性試験 – 207377 36
2.6.5.4.J ラットを用いた受胎能及び胚・胎児の発生（EFD）に関する試験 - 206616 38
2.6.5.4.K 雌性 CD ラットへの皮下投与による受胎能及び EFD 試験 - 207359 40
2.6.5.4.L 雌性 CD ラットへの皮下投与による受胎能及び EFD 試験 – 207361 41
2.6.5.4.M ラットを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 - 207363 42
2.6.5.4.N 幼若ラットを用いた 5 週間予備試験 - 214276 44
2.6.5.4.O 幼若ラットを用いた 11 週間毒性試験 - 214479 45
2.6.5.4.P ウサギを用いた用量範囲設定（DRF）及び発生毒性試験 - 206536 46
2.6.5.4.Q ウサギへの皮下投与による予備 EFD 試験 - 207358 48
2.6.5.4.R ウサギへの皮下投与による EFD 試験 - 207360 50
2.6.5.4.S 非妊娠ミニブタを用いた MTD 及び 3 週間 DRF 試験 - 208404 51

2.6.5.4.T サルを用いた 2～5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206449 52
2.6.5.4.U サルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 - 206450 54
2.6.5.4.V サルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験 - 207288 56
2.6.5.4.W カニクイザルを用いた EFD 試験（探索試験） - 208477 58
2.6.5.4.X カニクイザルを用いた皮下投与（bolus）による EFD 試験 - 208486 59
2.6.5.4.Y カニクイザルを用いた EFD ならびに出生前及び出生後の発生（PPND）に関する試験 - 210061 60
2.6.5.5 分布 61
2.6.5.5.A ラットにおける組織分布 – 206132 61
2.6.5.5.B ラットにおける組織分布 - 207267 63
2.6.5.5.C 有色ラットにおける組織分布 – 210172 65
2.6.5.6 血漿タンパク質結合 67
2.6.5.7 妊娠動物又は泌乳動物を用いた試験 68
2.6.5.7.A 妊娠ラットにおける組織分布及び胎盤移行性 - 207267 68
2.6.5.7.B [^{3}H]Oct-セマグルチド: 乳汁試験 - 213315 70
2.6.5.7.C ミクロオートラジオグラフィー試験 – 210018 71
2.6.5.8 その他の分布試験 71
2.6.5.9 *In vivo* 代謝 72
2.6.5.9.A [^{3}H]Oct-セマグルチド: マウス血漿中代謝物プロファイリング –210299, 210171 72
2.6.5.9.B [^{3}H]Tyr-セマグルチド: ラット血漿中代謝物プロファイリング - 207044 73
2.6.5.9.C [^{3}H]Oct-セマグルチド: ラット血漿中代謝物プロファイリング – 207347 74
2.6.5.9.D [^{3}H]Oct-セマグルチド: 尿中、糞中及び胆汁中代謝物プロファイリング - 208008 75
2.6.5.9.E [^{3}H]Oct-セマグルチド: ラット血漿中代謝物プロファイリング – 213526 76
2.6.5.9.F [^{3}H]Oct-セマグルチド: サル血漿中、尿中及び糞中代謝物プロファイリング – 209041 77
2.6.5.9.G [^{3}H]Oct-セマグルチド: ヒト血漿中代謝物プロファイリング - 213363 78
2.6.5.9.H [^{3}H]Oct-セマグルチド: ヒト尿中及び糞中代謝物プロファイリング - 213363 79
2.6.5.9.I ヒト尿中及び糞中代謝物同定 - 214379 80
2.6.5.10 *In vitro* 代謝 81
2.6.5.10.A [^{3}H]Tyr-セマグルチド: 肝細胞における代謝 - 206642 81
2.6.5.10.B [^{3}H]Oct-セマグルチド: 肝細胞における代謝物プロファイリング及び種間比較 - 214064 82
2.6.5.10.C NEP とのインキュベーション後に *in vitro* で生成されたセマグルチド代謝物の同定 - 215514 83
2.6.5.11 推定代謝経路 84
2.6.5.12 薬物代謝酵素誘導／阻害 84

2.6.5.13　排泄 85
2.6.5.13.A　単回皮下投与時の雌雄ラットにおける[^{3}H]Oct-セマグルチドの排泄 – 207265 85
2.6.5.13.B　雄性カニクイザルにおける[^{3}H]Oct-セマグルチドの排泄 - 208349 86
2.6.5.14　胆汁中排泄 87
2.6.5.14.A　胆汁カニュレーション施行ラットに単回皮下投与時の[^{3}H]Oct-セマグルチドの排泄 - 207265 87
2.6.5.15　薬物相互作用 88
2.6.5.15.A　ラットにおける CYP 誘導 - 208501 88
2.6.5.15.B　セマグルチドによるヒト CYP 酵素の *in vitro* 誘導 - 215048 91
2.6.5.15.C　肝細胞における CYP 酵素の *in vitro* 阻害 - 214196 92
2.6.5.15.D　ヒトトランスポーターの *in vitro* 阻害 - 215026 93
2.6.5.16　その他の薬物動態試験 94

2.6.5.1 薬物動態試験の概要

Test Article: Semaglutide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Absorption, single dose					
Effect in the Irwin test in rats*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Aptuit	206443	4.2.1.3-1
Pharmacokinetics of [^{3}H]-Oct-semaglutide in rat*	Rat/ Wistar Han	Subcutaneous	Covance	207264	4.2.2.2-1
Plasma levels in rabbits*	Rabbits/New Zealand White	Subcutaneous	Charles River Laboratories	207005	4.2.2.2-2
Cardiovascular Effects in conscious Telemetered Primates*	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Aptuit	206442	4.2.1.3-5
Bioavailability in monkey	Cynomolgus monkey	Subcutaneous, inhalation, intravenous	Huntingdon Life Science	207205	4.2.2.2-3
Pharmacokinetics of [^{3}H]-Oct-semaglutide in monkey*	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Covance	208349	4.2.2.5-2
Absorption, repeat dose					
2 Week Toxicity*	Mouse/CD-1 Crl:CD1(ICR)	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206447	4.2.3.2-2

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
13 Week Toxicity*	Mouse/CD-1 Crl:CD1(ICR)	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206663	4.2.3.2-3
Carcinogenicity study*	Mouse/Crl: CD1 (ICR) (CD-1)	Subcutaneous	Huntingdon Life Science	207362	4.2.3.4.1-1
Pharmacokinetics of [^{3}H]-Oct-semaglutide in rat following repeated dosing	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Covance	213316	4.2.2.4-7
Dose range finding	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Novo Nordisk	206062	4.2.3.2-4
2-Week Toxicity*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206448	4.2.3.2-5
4-Week bridging study*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Huntingdon Life Science	209159	4.2.3.7.6-1
13-Week Toxicity*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206662	4.2.3.2-6
13-Week Toxicity*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Huntingdon Life Science	210195	4.2.3.7.6-2
26-Week Toxicity*	Rat/CD	Subcutaneous	Huntingdon Life Science	207377	4.2.3.2-7
Combined fertility and embryo-foetal toxicity study*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206616	4.2.3.5.1-1

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Combined fertility and embryo-foetal toxicity study*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Huntingdon Life Sciences	207359	4.2.3.5.1-2
Combined Fertility and embryo-foetal toxicity study*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Huntingdon Life Sciences	207361	4.2.3.5.1-3
Carcinogenicity study*	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Huntingdon Life Sciences	207363	4.2.3.4.1-2
Juvenile toxicity DRF	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Envigo	214276	4.2.3.5.4-1
Juvenile toxicity main	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Envigo	214479	4.2.3.5.4-2
DRF and developmental toxicity*	Rabbits/New Zealand White	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206536	4.2.3.5.2-2
Embryo-foetal toxicity study*	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	Huntingdon Life Sciences	207358	4.2.3.5.2-2
Embryo-foetal toxicity study*	Rabbit/New Zealand white	Subcutaneous	Huntingdon Life Sciences	207360	4.2.3.5.2-3
MTD and DRF study	Minipig	Subcutaneous	Lab Research (Scantox)	208404	4.2.3.7.7-1
2-Week Toxicity*	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206449	4.2.3.2-9

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
13-Week Toxicity*	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Charles River Laboratories	206450	4.2.3.2-10
52-Week Toxicity*	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Huntingdon Life Sciences	207288	4.2.3.2-11
Embryo-foetal toxicity study	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Covance	208477	4.2.3.5.2-4
Embryo-foetal toxicity study	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Covance	208486	4.2.3.5.2-5
Pre- and postnatal development study	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Covance	210061	4.2.3.5.3-1
Distribution					
A quantitative whole body autoradiography study of tissue distribution	Rat/Wistar	Subcutaneous and intravenous	Novo Nordisk A/S	206132	4.2.2.3-1
Tissue distribution and placenta transfer*	Rat/Wistar	Subcutaneous	Covance	207267	4.2.2.3-3
A quantitative whole body autoradiography study of tissue distribution in pigmented rats	Rat/Lister Hooded	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	210172	4.2.2.3-3
Plasma Protein Binding					
In vitro protein binding*	Mouse, rat, rabbit, pig, monkey and human plasma	N/A	Novo Nordisk A/S	208380 & 213228	5.3.2.1-1 5.3.2.1-2

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Study in Pregnant or Nursing Studies					
Distribution and placenta transfer in pregnant rats*	Rat/Wistar	Subcutaneous	Covance	207267	4.2.2.3-2
Excretion of semaglutide into milk	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Covance	213315	4.2.2.5-3
Distribution of semaglutide in rat embryo	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Covance	210018	4.2.3.7.3-15
Other Distribution Study					
No studies performed.					
Metabolism *In Vivo*					
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolite profiling of plasma	Mouse/CD-1	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	210299 & 210171	4.2.2.4-6 4.2.2.4-5
^{3}H-Tyr-semaglutide: Metabolite profiling of plasma*	Wistar rat	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	207044	4.2.2.4-1
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolite profiling of plasma	Wistar rat	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	207347	4.2.2.4-2
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolite profiling of urine, faeces and bile	Wistar rat	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	208008	4.2.2.4-3
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolite profiling of plasma after repeated dosing	Rat/Sprague Dawley	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	213526	4.2.2.4-8

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolite profiling of plasma, urine and faeces	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	209041	4.2.2.4-4
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolite profiling of plasma	Human	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	213363 (part of trial 3789)	5.3.3.1-2, Appendix 16.1.10
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolite profiling of urine and faeces	Human	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	213363 (part of trial 3789)	5.3.3.1-2, Appendix 16.1.10
Metabolite identification of human urine and plasma	Human	Subcutaneous	Novo Nordisk A/S	214379	5.3.2.3-2
Metabolism *In Vitro*					
[^{3}H]Tyr-semaglutide: Metabolism in hepatocytes	Hepatocytes from: wistar rat, cynomolgus monkey and human	N/A	Novo Nordisk A/S	206642	5.3.2.2-1
[^{3}H]Oct-semaglutide: Metabolism in hepatocytes		N/A	Novo Nordisk A/S	214064	5.3.2.2
Metabolite Identification following incubations with NEP	human	N/A	Novo Nordisk A/S	215514	5.3.2.3-1
Possible Metabolic Pathways Summary of metabolite identification studies					

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Excretion					
Excretion in normal and bile cannulated rat*	Rat/Wistar Han	Subcutaneous	Covance	207265 (normal) 207265 (bile)	4.2.2.5-1
Excretion*	Cynomolgus monkey	Subcutaneous	Covance	208349	4.2.2.5-2
Drug-Drug Interactions					
CYP Induction in rats*	Rat/Wistar Han	Subcutaneous (26 weeks)	Huntingdon	208501	4.2.2.6-1
CYP inhibition *in vitro*	Human hepatocytes	N/A	Xenotech	215048	5.3.2.2-5
CYP induction *in vitro*	Human hepatocytes	N/A	Xenotech	214196	5.3.2.2-3
Transporter inhibition *in vitro*	Human hepatocytes	N/A	Xenotech	215026	5.3.2.2-4
Other					
No other studies have been performed.					

* Conducted in accordance with Good Laboratory Practice (GLP).

2.6.5.2 測定法及びバリデーション報告書

Please see **Section 2.6.4.2** in 2.6.4 Pharmacokinetics written summary.

2.6.5.2.A 非臨床試験で使用した生体試料中薬物濃度分析法の概要

Animal	Study type and duration	Study ID	Assay
Mouse	2-Week toxicity	206447	ELISA
	13-Week toxicity	206663	ELISA
	Carcinogenicity 104 Weeks	207362	LC-MS/MS
	Single dose calcitonin level assessment	208422	LC-MS/MS
	Single dose calcitonin level assessment	213448	LC-MS/MS
Rat	Induction of Micronuclei	206409	ELISA
	Irwin Test (CNS)	206443	ELISA
	2-Week toxicity	206448	ELISA
	Preliminary fertility and developmental toxicity	206616	ELISA
	13-Week toxicity	206662	ELISA
	Preliminary combined fertility and embryofoetal toxicity	207359	ELISA
	Combined fertility and embryofoetal toxicity	207361	ELISA
	Carcinogenicity 104 Weeks	207363	LC-MS/MS
	26-Week toxicity	207377	LC-MS/MS
	Repeat dose calcitonin level assessment (6-Week toxicity)	208456	LC-MS/MS
	Investigative combined fertility and embryofoetal toxicity	208485	LC-MS/MS
	Impurities – 4-Week toxicity (fresh vs aged semaglutide)	209159	LC-MS/MS
	Impurities – 13-Week toxicity (synthetic vs recombinant semaglutide)	210195	LC-MS/MS
	Juvenile toxicity – dose range finder	214276	LC-MS/MS
	Juvenile toxicity – 11-Week	214479	LC-MS/MS
Rabbit	Preliminary dose range finder – Developmental toxicity	206536	ELISA
	Preliminary embryofoetal toxicity	207358	ELISA
	Embryofoetal toxicity	207360	LOCI

Animal	Study type and duration	Study ID	Assay
Monkey	Telemetry (cardiovascular)	206442	ELISA
	2-Week toxicity	206449	ELISA
	13-Week toxicity	206450	ELISA
	52-Week toxicity	207288	LC-MS/MS
	Pilot embryofoetal development toxicity	208477	LOCI
	Pilot embryofoetal development toxicity (208477), reanalysis - comparison to LOCI results	209285	LC-MS/MS
	Embryofoetal development toxicity	208486	LC-MS/MS
	Pre- and postnatal development toxicity	210061	LC-MS/MS
Minipig	MTD + 3 Weeks DRF Toxicology	208404	LOCI

2.6.5.3 吸収（単回投与）

Test Article: Semaglutide

2.6.5.3.A ラットを用いた Irwin 試験における影響 – 206443

Location in CTD: 4.2.1.3

Study ID:	**206443**		
Species	Rat/Sprague Dawley		
Gender (M/F) / Number of animals	8 M per dose group		
Feeding condition	Fed		
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: 412N06313 (1 mg/mL) pH 7.4 Vehicle, Batch No.: 412N06315		
Method of Administration	s.c.		
Dose (mg/kg)	0.001, 0.022 and 0.095 (actual doses)		
Sample	Plasma		
Analyte	Semaglutide		
Assay	ELISA		
Dose (mg/kg)	**0.001**	**0.022**	**0.095**
Day	**1**	**1**	**1**
PK parameters:			
C_{max} (nmol/L)	0.726	14	47.2
t_{max} (h)	10	6	6
AUC_{last} (h·nmol/l)	5.9	195	757
$t_{½}$ (h)	NA	8.6	13

Additional Information:

The exposure increased proportionally to the dose. Blood sampling timepoints up to 24 h. At the lowest dose, plasma concentrations below LLOQ at 16 and 24 h, i.e. AUC_{last}=$AUC_{0\text{-}10h}$ at 0.001 mg/kg dose level and $AUC_{0\text{-}24h}$ at the two higher dose levels.

Blood sampling time-points at 0, 3, 6, 10, 16 and 24 h, composed plasma profiles (four animals per timepoint).

NA = not applicable

2.6.5.3.B ラットに[^{3}H]-Oct-NNC 0113-0217 を皮下投与時の PK - 207264 **Location in CTD: 4.2.2.2**

Study ID:	**207264**			
Species:	Wistar Han			
Gender (M/F) / Number of animals:	3 M/3 F 5 M/5 F			
Feeding condition:	Fed			
Vehicle/Formulation:	0.1 mg/mL (3.4 MBq/mL) in an aqueous vehicle containing disodium hydrogen phosphate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL), phenol (5.5 mg/mL), pH 7.4 (batch no:1S).			
Method of Administration:	Subcutaneous			
Dose:	A and B: 0.3 mg/kg (10 MBq/kg)			
Radionuclide:	[3H]Oct-semaglutide			
Assay	Liquid scintillation counting			
	Plasma		**Blood**	
	Male	**Female**	**Male**	**Female**
PK parameters				
t_{max} (h)	8.667	12	10.67	10.67
C_{max}(nmol equiv/L)	321.6	327.2	148.2	157.5
AUC_{0-t} (nmol/equiv/L)	15243	14747	7829	8000
AUC (nmol equiv/L)	15750	15149	8335	8403
$t_{½elim}$ (h)	31.49 (20.75)	30.44 (19.75)	39.04 (26.60)	36.24 (25.83)

Additional information:

The $t_{½elim}$ values presented in brackets excludes the 96 and 168 h time point – tritiated water is expected to be the dominant component at these timepoints and by doing this $t_{½elim}$ is found to be similar to $t_{½elim}$ for parent compound. Systemic exposure of [^{3}H]Oct-Semaglutide after subcutaneous dosing was demonstrated with a slow absorption and protracted elimination. The relatively low concentration of radioactivity in whole blood indicates no preferential uptake into red blood cells. Significant levels of a volatile tritium component, which increased with time after dosing, were demonstrated in plasma samples.

2.6.5.3.C [^{3}H]Oct-セマグルチド: 単回及び反復投与時のラットにおける吸収 - 213316 **Location in CTD: 4.2.2.4**

Study ID:	**213316**
Species/strain:	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals:	Group A: 4 M/4 F (one pr. time point), Group B: 7 M/7 F (one pr. time point)
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	0.04 mg/mL (ca 16 MBq/mL) in aqueous solution containing disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL); phenol (5.50 mg/mL); pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose :	0.04 mg/kg/day (16 MBq/kg/day)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Sample:	Plasma
Assay:	Liquid Chromatography; Radiochemical detection; Liquid scintillation counting
Sampling time:	Group A: 0, 6, 12 and 24 hours / Group B: 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours

Days of dosing	**PK parameters:**	**Male**			**Female**		
	Sample	**Blood**	**Plasma**	**Reconstituted plasma**	**Blood**	**Plasma**	**Reconstituted plasma**
1	**t_{max} (h)**	12	12	6	6	6	6
Group A	**C_{max} (nmol/g)**	0.040	0.072	0.069	0.035	0.077	0.075
	AUC_{0-24} (h*nmol/g)	0.69	1.33	1.27	0.63	1.31	1.25
5	**t_{max} (h)**	12	12	12	12	6	6
Group B	**C_{max} (nmol/g)**	0.062	0.114	0.090	0.069	0.129	0.111
	AUC_{0-24} (h*nmol/g)	1.19	2.21	1.74	1.39	2.51	2.04
	AUC_{0-96} (h*nmol/g)	2.53	4.36	2.61	2.89	4.82	3.09
	AUC (h*nmol/g)	3.01	5.14	2.67	3.49	6.24	3.18
	% AUC extrapolated	16.1	15.2	2.01	17.4	22.8	2.81
	$t_{1/2}$ (h)	37.2	38.8	18.6	42.2	54.9	20.7
	(Time for calculation – h)	48-96	48-96	48-96	48-96	48-96	48-96
	Accumulation ratio	1.72	1.66	1.37	2.20	1.91	1.63

NC- not calculable, ND- not detected, Reconstituted plasma: volatile components removed following freeze drying and sample are redissolved in the water

2.6.5.3.D ウサギにおける血漿中レベル - 207005 **Location in CTD: 4.2.2.2**

Study ID:	**207005**
Species	Rabbit
Gender (M/F) / Number of animals	5 F
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, batch no. owGLP-1-06.C101 51.78 mg/mL
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.007 (achieved dose)
Sample	Plasma
Analyte	NNC 0113-0217
Assay	ELISA
Dose (mg/kg)	0.007
PK parameters:	
C_{max} (nmol/L)	8.82
t_{max} (h)	24
AUC_{0-24h} (h·nmol/L)	136
AUC_{0-216h} (h·nmol/L)	649
$AUC_{0-\infty h}$ (h·nmol/L)	717
$t_{½}$ (h)	29.76
CL/f (L/h/kg)	0.00239
V_z/f (L/kg)	0.1
Rac(predicted)	2.34

Additional Information:

Samples were taken at predose, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 120, 168 and 216 hours after dosing.

2.6.5.3.E 覚醒テレメーター装着非ヒト霊長類における心血管系の影響 - 206442

Location in CTD: 4.2.1.3

Study ID:	**206442**			
Species	Cynomolgus monkey			
Gender (M/F) / Number of animals	4 M per dose group			
Feeding condition	Fed			
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: 412_N06313 (1 mg/mL), pH 7.4 Vehicle, Batch No.: 412_N06404			
Method of Administration	s.c.			
Dose (mg/kg)	0.03, 0.1 and 0.5 (achieved doses)			
Sample	Plasma			
Analyte	Semaglutide			
Assay	ELISA			
Dose (mg/kg)	**0.03**	**0.1**	**0.5**	
Day	**1**	**5**	**9**	
PK parameters:				
C_0 (nmol/L)* **M**	<LLOQ	12	42	
C_{max} (nmol/L) **M**	23	77	440	

Additional Information:

Blood sample at 0 and 12 h. Doses given every 4th day.

* C_0 is the observed plasma concentration at time-point 0, predose.

LLOQ: 0.5 nmol/L

NA; not applicable

2.6.5.3.F サルにおけるバイオアベイラビリティ - 207205

Location in CTD: 4.2.2.2

Study ID:		**207205**					
Species		Monkey, Cynomolgus					
Gender (M/F) / Number of animals		2 M+2 F					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation		API batch 412_G07011					
Method of Administration		i.v., inhalation and s.c.					
Dose (mg/kg)		i.v. dose = 0.01 mg/kg, inhalation dose= 0.5 mg/kg and s.c. dose = 0.02 mg/kg					
Sample		Plasma					
Analyte		Semaglutide					
Assay		ELISA					
Dose (mg/kg) **Route**		**0.01** **Intravenous**		**0.02** **Subcutaneous**		**0.5** **Inhalation**	
Gender		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
PK parameters:							
C_{max} (nmol/L)	C_0 for iv (nM)	16.1	16.8	10.8	10.1	13.4	18.8
t_{max} (h)		NA	NA	48	42	26	26
AUC (h·nmol/L)		548	555	892	899	1360	1600
$AUC_{\%extrap}$		15	9.4	8.5	7.2	5.0	3.1
$t_{½}$ (h)		64	41	50	50	49	48
MRT (h)		69	53	88	85	88	82
CL/f (L/h/kg)	(f=1 for iv)	0.00265	0.00262	0.00303	0.00304	0.109	0.0902
$V_{z/f}$ (L/kg)	(f=1 for iv)	0.244	0.156	0.219	0.218	7.57	6.14
f (%)		NA	NA	86.97	86.0	2.65	3.07

Additional Information:

Plasma samples were drawn up to 17 days post dose.

Actual dose were 0.007 and 0.005 mg/kg for the iv doses, 0.01 and 0.012 mg/kg for the s.c. doses and 0.58 for the inhalation doses

2.6.5.3.G サルにおけるバイオアベイラビリティ - 208349

Location in CTD: 4.2.2.5

Study ID:	**208349**	
Species:	Cynomolgus monkey	
Gender (M/F) / Number of animals:	3 M	
Feeding condition:	Fed	
Vehicle/Formulation:	0.015 mg/mL (7.5 MBq/mL) in an aqueous vehicle containing disodium hydrogen phosphate (1.2 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL), phenol (5.5 mg/mL), pH 7.4 (batch no:8E).	
Method of Administration:	Subcutaneous	
Dose (mg/kg):	0.03 mg/kg (15 MBq/kg)	
Radionuclide / Specific Activity:	[^{3}H]-Oct / 0.53 MBq/µg (14.3 µCi/µg)	
Assay	Liquid scintillation counting	
	Plasma	**Blood**
	Male	**Male**
PK parameters		
T_{max} (hours)	44.0	48.0
C_{max}(pmol equiv/g)	45.8	25.9
AUC_{0-t} (pmol/equiv *h/g)	4996	3045
$AUC_{0-\infty}$ (pmol equiv*h/g)	7542	4378
$t_{½elim}$ (hours)	98.6	87.0

Additional information:

$t_{½elim}$ is calculated based on three data points (72, 96 and 168 h).

The relatively low concentration of radioactivity in whole blood indicates no preferential uptake into red blood cells. Significant levels of a volatile tritium component, which increased with time after dosing, were demonstrated in plasma samples (up to 97%).

2.6.5.4 吸収（反復投与）

Test Article: Semaglutide

2.6.5.4.A マウスを用いた 2～5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206447

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 31 Oct 2006
Duration of Dosing: 2 (5) weeks

Study ID:	**206447**
Species	Mouse/CD-1 Crl:CD1(ICR)
Gender (M/F) / Number of animals	14 M+14 F per dose group
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: 412_N06313 (1 mg/mL) and 412_N06314 (10 mg/mL), pH 7.4 Vehicle, Batch No.: 412N06315
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.024, 0.078, 0.414, 2.076 (achieved doses)
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group		**2**		**3***		**4***		**5***	
Dose (mg/kg)		**0.024**		**0.078**		**0.41**		**2.1**	
Day		**1**	**14**	**1**	**14**	**1**	**14**	**1**	**14**
PK parameters:									
C_0 (nmol/L)**	F	<LLOQ	3.21	4.10	10.8	10.9	84.1	116	29.4
	M	<LLOQ	5.73	4.19	22.4	16.0	61.4	165	425
C_{max} (nmol/L)	F	18.9	29.2	76.6	90.7	400	479	2016	2404
	M	28.0	36.5	94.0	124	419	500	2417	1788
t_{max} (h)	F	3.0	3.0	3.0	6.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	M	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	6.0	3.0	6.0

Group		**2**		**3***		**4***		**5***	
Dose (mg/kg)		**0.024**		**0.078**		**0.41**		**2.1**	
Day		**1**	**14**	**1**	**14**	**1**	**14**	**1**	**14**
AUC_{tau} (h·nmol/l)	F	250	323	936	1080	5086	5154	27591	18427
	M	315	479	927	1416	4840	5716	26848	23589
$t_{½}$ (h)	F	5.4	6.0	8.4	6.6	6.1	5.9	6.3	NR
	M	5.5	6.8	6.3	6.6	7.8	7.9	7.1	8.2
CL/F (L/h/kg)	F	0.022	0.018	0.017	0.018	0.018	0.020	0.017	0.027
	M	0.017	0.012	0.018	0.013	0.018	0.018	0.017	0.021
V/F (L/kg)	F	0.17	0.16	0.21	0.17	0.16	0.17	0.15	NR
	M	0.14	0.12	0.17	0.13	0.20	0.20	0.17	0.25
Rac(pred)	F	NA	1.05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	M	NA	1.05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rac(obs)	F	NA	1.29	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	M	NA	1.52	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Additional Information:

* These animals were pre-dosed with the lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as the measured plasma concentration (C_0) predose is not zero.

** C_0 is the observed plasma concentration at time-point 0, predose.

Composed plasma profiles, mean value of 2 M+2 F per timepoint. Blood sampling time-points Day 1: at 0, 3, 6, 10, 24, 48 and 72 h, and on Day 14; 3, 6, 10, 24, 48 and 72 h (24 h concentration used as predose concentration). Dosing once-daily (AUC_{tau}=$AUC_{0\text{-}24h}$), only the lowest dose level was a true Day 1 vs. Day 14, i.e. Rac was only determined for the low dose group.

LLOQ=0.542 nmol/L

NA= not applicable

NR=not reportable

2.6.5.4.B マウスを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 - 206663

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: Mar 2007
Duration of Dosing: 13 weeks

Study ID:	**206663**
Species	Mice/CD-1
Gender (M/F) / Number of animals	16 M+16 F per dose group
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: owGLP-1-06-101C (51.43 mg/mL)
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	1.0, 3.0 and 10.0
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group		**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)		**1.0**		**3.0**		**10**	
Duration		**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**
PK parameters:							
C_{max} (nmol/L)	F	1210	780	2630	3270	13700	9200
	M	837	1030	3160	4060	11700	11600
t_{max} (h)	F	4.00	4.00	2.00	4.00	2.00	1.00
	M	4.00	2.00	2.00	2.00	2.00	1.00
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	11100	10700	31600	36900	115000	117000
	M	11100	12100	26500	39800	112000	116000
$t_{½}$ (h)	F	7.74	8.17	5.50	6.10	8.16	6.32
	M	8.17	9.79	NR	8.01	7.79	5.96
Rac(pred)	F	-	1.13	-	1.05	-	1.15
	M	-	1.15	-	NR	-	1.13

Group		**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)		**1.0**		**3.0**		**10**	
Duration		**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**
Rac(obs)	F	-	0.96	-	1.17	-	1.02
	M	-	1.09	-	1.50	-	1.04

Additional Information:

Composed plasma profiles, mean value of 2 M+2 F per time-point. Blood sampling time-points; Day 1: 0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h, Week 13: 0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h; AUC_{tau}=$AUC_{(0\text{-}24h)}$; NR = not reportable

2.6.5.4.C マウスを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 - 207362

Location in CTD: 4.2.3.4.1

Date of First Dose: February 2008
Duration of Dosing: 2 years

Study ID:	**207362**
Species	Mouse/Crl: CD1 (ICR) (CD-1)
Gender (M/F) / No. of animals	12 F+12 M per dose group, mean value of 2 M+2 F per time-point
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, dehydrate, 14.0 mg/mL propylene glycol and 5.50 mg/mL phenol in water for injection, adjusted to pH 7.4. Batch No.: LP217G1T01 Weeks 1 to 47 38.60 mg/mL Batch No.: LP217G1V04 Weeks 42 to 52 36.2 mg/mL Batch No.: LP0217G1V04 Weeks 52 to 91 33.8 mg/mL Batch No.: LP0217G1V06 Week 91 onwards 35.3 mg/mL
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg/day)	0.1 (F only), 0.3, 1, 3 (M only)
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	LC-MS/MS

Group		**2**			**3**			**4**			**5**		
Dose (mg/kg)		**0.1**			**0.3**			**1**			**3**		
Duration		**Day 1**	**Week 52**	**Week 105**	**Day 1**	**Week 52**	**Week 105**	**Day 1**	**Week 52**	**Week 105**	**Day 1**	**Week 52**	**Week 105**
PK parameters:													
C_{max} (nmol/L)	F	79.5	102	83.8	280	263	225	771	994	703	ND	ND	ND
	M	ND	ND	ND	185	291	245	717	870	1060	1720	2600	3450
t_{max} (h)	F	8	4	4	8	8	8	2	4	4	ND	ND	ND
	M	ND	ND	ND	4	4	8	2	2	4	2	4	2
AUC_{0-24} (h·nmol/L)	F	750	1190	1110	3020	3590	3090	6920	12800	8970	ND	ND	ND
	M	ND	ND	ND	2490	3770	3080	7290	11300	13900	11000	41900	39500

Additional information:
ND = not dosed

2.6.5.4.D ラットを用いた 2～5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206062

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 09-Feb-2006
Duration of Dosing: 2-5 weeks

Study ID:	**206062**
Species	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals	5 M+5 F per dose group, value of 1 M+1 F per timepoint used for NCA
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: BGi-06-003-API (10 mg/mL) and (24.2 mg/mL) Vehicle, Lot no.: 3102176 and Lot no.: 3104181
Method of Administration	s.c. with a dosing frequency of 48 hours
Dose (mg/kg)	Group 2: 0.01 mg/kg for 2 weeks, Group 3: 0.1 mg/kg for 2 weeks, Group 4: 0.03 mg/kg for 1 week, 0.1 mg/kg for 2 weeks and 1.17 mg/kg Day 35, Group 5: 0.03 mg/kg Week 2, 0.1 mg/kg Week 3, 0.5 mg/kg Week 4, 1 mg/kg Week 5 and 2.0 mg/kg Week 6
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group		**2**		**3**		**4**		**5**	
Dose (mg/kg)		**0.01**		**0.1**		**0.03**	**1.17**	**0.5**	**2.0**
Day*		**1**	**12**	**1**	**12**	**1**	**26****	**14**	**33**
PK parameters:									
C_{max} (nmol/L)	F	13.6	17.8	111	203	20.2	-	956	3600
	M	10.4	12.4	98	156	19.6	-	742	3520
t_{max} (h)	F	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	-	6.0	6.0
	M	3.0	3.0	3.0	3.0	6.0	-	6.0	6.0
AUC_{0-48} (h·nmol/L)	F	145***	194	2270	2580	430	-	16000	58100
	M	131***	172	2070	2500	413	-	14400	45100***
$t_{½}$ (h)	F	7.3	9.0	12.6	9.0	10.3	-	9.0	8.4
	M	10.0	7.3	12.3	8.2	11.6	-	10.5	10.3
Rac(obs)	F	-	1.3	-	1.1	-	-	-	-
	M	-	1.3	-	1.2	-	-	-	-

Additional Information:
*Days of dosing

Group	**2**		**3**		**4**		**5**	
Dose (mg/kg)	**0.01**		**0.1**		**0.03**	**1.17**	**0.5**	**2.0**
Day*	**1**	**12**	**1**	**12**	**1**	**26****	**14**	**33**

**Last dose on study Day 35 and blood sampling for TK on study Day 40 (TK not reported)

***AUC_{0-24} hours

Blood sampling time-points at 0, 3, 6, 24 and 48 h, one samples per sex per timepoint. Dosing 3 times per week (Monday, Wednesday and Friday)

2.6.5.4.E ラットを用いた 2～5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206448

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 25-Oct-2006
Duration of Dosing: 2 (5) weeks

Study ID:	**206448**
Species	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals	10 M+10 F per dose group, mean value of 2 M+2 F per timepoint
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: 412N06313 (1 mg/mL) and 412N06314 (10 mg/mL), pH 7.4 Vehicle, Batch No.: 412N06315
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.007, 0.041, 0.188, 0.776 (achieved doses)
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group		**2**		**3**		**4**		**5**	
Dose (mg/kg)		**0.007**		**0.041**		**0.19**		**0.78**	
Day		**1**	**14**	**1***	**14**	**1***	**14**	**1***	**14**
PK parameters:									
C_0 (nmol/L)**	F	<LLOQ	1.54	2.03	16.3	12.9	<LLOQ	56.0	303
	M	<LLOQ	2.29	2.46	16.5	16.3	50.7	124	473
C_{max} (nmol/L)	F	4.38	6.29	26.8	35.6	189	207	646	1200
	M	3.18	6.04	22.1	26.0	130	128	693	1090
t_{max} (h)	F	3.0	6.0	6.0	6.0	10	3.0	10	3.0
	M	6.0	6.0	10	3.0	6.0	6.0	10	6.0
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	72.6	96.1	365	625	3305	3261	12219	19456
	M	46.7	103	362	447	2445	2503	12506	18469

Group		2		3		4		5	
Dose (mg/kg)		**0.007**		**0.041**		**0.19**		**0.78**	
Day		**1**	**14**	**1***	**14**	**1***	**14**	**1***	**14**
$t_{½}$ (h)	F	12.7	7.1	-	16.3	-	10.5	-	10.6
	M	26.5	12.8	-	14.1	37.9	33.0	-	17.6
CL/F (L/h/kg)	F	NR	0.018	NR	0.016	NC	0.014	NC	0.0097
	M	NR	0.017	NC	0.022	NR	0.021	NC	0.010
V/F (L/kg)	F	NR	0.18	NR	0.38	NC	0.21	NC	0.15
	M	NR	0.31	NC	0.45	NR	0.87	NC	0.26
Rac(pred)	F	NA	1.37	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	M	NA	2.15	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rac(obs)	F	NA	1.32	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	M	NA	2.21	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Additional Information:

* These animals were pre-dosed with the lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as the measured plasma concentration (C_0) predose is not zero.

** C_0 is the observed plasma concentration at time-point 0, predose.

Blood sampling time-points at 0, 3, 6, 10 and 24 h, composed plasma profiles. Dosing once-daily (AUC_{tau}=$AUC_{0\text{-}24h}$), only the lowest dose level was a true Day 1 vs. Day 14, i.e. Rac was only determined for the low dose group.

NA= not applicable
NR=not reportable
NC=not calculable
LLOQ=5.1 nmol/L

2.6.5.4.F ラットを用いた 4 週間ブリッジング試験 - 209159

Location in CTD: 4.2.3.7.6

Date of First Dose: 23 June 2009
Duration of Dosing: 4 (2) weeks

Study ID:	**209159**
Species	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals	12 M+12 F per dose group, mean value of 2-3 animals per time-point
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: Aged form: 412_N09051A. Fresh form: 412_N09051
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0, 0.86*
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	LC/MS/MS

Group		**2**		**3**	
Dose (mg/kg)		**0.86 (aged form)**		**0.86 (fresh form)**	
Duration		**Day 15***	**Week 6**	**Day 15***	**Week 6**
PK parameters:					
C_{max} (nmol/L)	F	1041	1456	843.5	1087
	M	1263	1159	1032	1197
t_{max} (h)	F	6	3	10	3
	M	10	3	10	3
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	15250	16530	14670	19300
	M	20330	20590	17890	21370
$AUC_{\%extrapol}$ (%)	F	NC	34.1	NC	37.9
	M	NC	54.4	NC	55.8
$t_{½}$ (h)[a]	F	NC	15.81	NC	16.79
	M	NC	26.65	NC	27.68

Group		**2**		**3**	
Dose (mg/kg)		**0.86 (aged form)**		**0.86 (fresh form)**	
Duration		**Day 15***	**Week 6**	**Day 15***	**Week 6**
Rac(obs)	F	-	1.08	-	1.32
	M	-	1.01	-	1.20
Rac(pred)	F	-	1.54	-	1.59
	M	-	2.15	-	2.21

Additional Information:

***** Animals were pre-dosed with the lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 15 is not regarded as a single dose as the measured plasma concentration (C_0) predose is not zero.

[a)] The $t_{½}$ estimate was not the elimination $t_{½}$ as about 34-56% of the exposure remained to be eliminated after 24 h

Composed plasma profiles, mean value of 2-3 animals/sex per time-point. Blood sampling time-points: 0, 3, 6, 10, and 24 h. Predose sample was not collected on Week 6, as steady state was reached, and the 24 h sample was used as the predose sample as well.

$AUC_{tau}=AUC_{(0-24h)}$

2.6.5.4.G ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 - 206662

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 24 Jan 2007
Duration of Dosing: 13 weeks

Study ID:	**206662**
Species	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals	10 M+10 F per dose group, mean value of 2 M+2 F per time-point
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: owGLP-1-06-101C
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.004, 0.082, 0.784
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group		**2**		**3***		**4***	
Dose (mg/kg)		**0.004**		**0.082**		**0.78**	
Duration		**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**
PK parameters:							
C_{max} (nmol/L)	F	1.31	4.97	94.9	71.0	635	599
	M	2.77	4.43	73.4	65.1	685	487
t_{max} (h)	F	1.5	3.0	6.0	6.0	3.0	3.0
	M	1.5	6.0	8.0	6.0	6.0	6.0
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	NR	78.1	1450	1290	9860	9490
	M	NC	68.4	1120	1120	8570	9310
$t_{½}$ (h)	F	NR	12.3	13.1	NR	10.5	14.8
	M	NC	15.1	17.4	13.2	15.5	14.3

Group		**2**		**3***		**4***	
Dose (mg/kg)		**0.004**		**0.082**		**0.78**	
Duration		**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**
Rac(pred)[a]	F	-	1.4	-	-	-	-
	M	-	1.5	-	-	-	-

Additional Information:

* Animals in Group 3 and 4 were pre-dosed with the lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as the measured plasma concentration (C_0) predose is not zero.

[a] Rac(obs) could not be reliable estimated on Day 1 for group 2 and Rac(obs) could not be calculated for dose groups 3 and 4, due to up-titration of dose levels.

Composed plasma profiles, mean value of 2M+2F per time-point. Blood sampling time-points; Day 1: 0, 1.5, 3, 6, 8, 10, 18 and 24 h,
Week 13: 0, 3, 6, 10, 24, 36, 48, and 72 h.

AUC_{tau}=$AUC_{(0\text{-}24h)}$
NR=not reportable
NC=not calculable

2.6.5.4.H ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験（ブリッジング） - 210195

Location in CTD: 4.2.3.7.6

Date of First Dose: 17 August 2010
Duration of Dosing: 13 weeks

Study ID:	**210195**
Species	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals	15 M+15 F per dose group, mean value of 3M+3F per time-point
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	1.42 mg/mL disodium hydrogenphosphate, dihydrate 14.0 mg/mL propylene glycol and 5.50 mg/mL phenol in water for injection at a target pH 7.4.
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	Group 2 (synthetic semaglutide): 0.48; Group 3 (recombinant semaglutide): 0.45
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	LC-MS/MS

Group		**2**		**3**	
Dose (mg/kg)		**0.48**		**0.45**	
Duration		**Day 1**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 13**
PK parameters:					
C_{max} (nmol/L)	F	580	1040	474	868
	M	471	857	445	736
t_{max} (h)	F	6	6	6	3
	M	6	6	6	3
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	8990	15600	8220	15400
	M	8280	14100	7420	13700
Rac(obs)[a]	F	-	1.73	-	1.88
	M	-	1.70	-	1.84

Additional Information:

[a] A true Rac(obs) could not be estimated due to the titration period. The Rac(obs) calculated is based on data from Day 1 (first day on target dose) and Week 13 (last day on target dose).

Composed plasma profiles, mean value of 3 M+3 F per time-point. Blood sampling time-points; Day 1 and Week 13: 0, 3, 6, 12 and 24 h.

Two male animals in the recombinant group were shown to have developed low levels of anti semaglutide antibodies. These did not cross react to endogenous GLP-1, nor did they display any neutralising effect *in vitro* on semaglutide. They were of such low levels that they are not considered to have had any effect on the TK analysis in this study

2.6.5.4.l ラットを用いた 26 週間反復皮下投与毒性試験 – 207377

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 02 June 2008
Duration of Dosing: 26 (2) weeks

Study ID:	**207377**
Species	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals	18 M+18 F per dose group, mean value of 3 animals per sex per time-point. During uptitration in addition 6M+6F per dose group and week
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1T01
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0, 0.03, 0.13, 0.6
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	LC/MS/MS

Group		**2**		**3***		**4***	
Dose (mg/kg)		**0.03**		**0.13**		**0.6**	
Duration		**Day 1***	**Week 26***	**Day 1***	**Week 26***	**Day 1***	**Week 26***
PK parameters:							
C_{max} (nmol/L)	F	17.9	55.8	159	208	622 [a]	1030
	M	29.5	41.1	132	213	423 [a]	897
t_{max} (h)	F	3	3	6	6	1.5 [a]	6
	M	3	3	3	12	1.5 [a]	6
T_{last} (h)	F	12	24	24	24	24 [a]	24
	M	24	24	24	24	24 [a]	24
AUC_{last} (h·nmol/L) [b]	F	115	989	1890	3620	11300 [a]	18500
	M	325	815	1680	4090	6480 [a]	17700
$t_{½}$ (h)	F	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	M	9.56	NC	13.2	NC	NC	NC

Group		**2**		**3***		**4***	
Dose (mg/kg)		**0.03**		**0.13**		**0.6**	
Duration		**Day 1***	**Week 26***	**Day 1***	**Week 26***	**Day 1***	**Week 26***
Rac(obs)	F	-	NC	-	1.9	-	1.6 [a]
	M	-	2.5	-	2.4	-	2.7 [a]
Rac(pred)[a]	F	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	M	1.2	NC	1.4	NC	NC	NC

Additional Information:

***** Animals were pre-dosed with the lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as the measured plasma concentration (C_0) predose is not zero. In total 26 weeks dosing at target levels.

a) Several animals not included in the plasma concentration time profiles, i.e. parameters only rough estimates

b) AUC_{last}= AUC_{tau} = $AUC_{0\text{-}24\ h}$ with the exception of the lowest dose level at SD, 0.03 mg/kg (females), where the last measured time-point was detected at 12 h (AUC_{last}= $AUC_{0\text{-}12\ h}$).

Composed plasma profiles. Blood sampling time-points during up titration: Days 1 and 8: predose and 6 h (not reported here); At target dose level: Day 1 and Week 26: 0, 1.5, 3, 6, 12 and 24 h.

NC=not calculable

2.6.5.4.J ラットを用いた受胎能及び胚・胎児の発生（EFD）に関する試験 - 206616

Location in CTD: 4.2.3.5.1

Date of First Dose: Jan 2007
Duration of Dosing: 2 months

Study ID:	**206616**
Species	Rat/Sprague Dawley
Gender (M/F) / Number of animals	8 F per dose group, mean value of 2F per time-point
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: owGLP-1-06-101C (51.43 mg/mL)
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.03, 0.21, 0.86 (achieved doses)
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group	**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)	**0.025**		**0.20**		**0.83**	
Duration	**Day 6**	**Day 16**	**Day 6**	**Day 16**	**Day 6**	**Day 16**
PK parameters:						
C_{max} (nmol/L)	16.8	16.3	131	107	574	562
t_{max} (h)	3	6	3	6	3	6
AUC_{0-24} (h·nmol/L)	242	205	2360	2050	8100	9510
$AUC_{0-\infty}$ (h·nmol/L)	296	250	NR	NR	NR	NR
$t_{½}$ (h)	9.20	8.60	14.13	20.58	27.03	17.34
CL/F (L/h/kg)	0.0251	0.0297	0.0201	0.0231	0.0248	0.0212
V_d/F (L/kg)	0.333	0.369	NR	NR	NR	NR
Rac(pred)[a]	1.2	1.17	1.45	1.80	2.18	1.62

Additional Information:
The animals were dosed once-daily until Day 19 of gestation (a minimum 35 days of once-daily dosing) after a dose escalation phase of two weeks followed by two weeks on full doses prior to mating. Samples were taken for toxicokinetic analysis in relation to Days 6 and 16 of gestation following dosing (a minimum 22 and 32 days of once-daily dosing respectively).
Composed plasma profiles, mean value of two animals per time-point. Blood sampling time-points; Day 1: 3, 6, 10 and 24 h.
NR=not reportable

2.6.5.4.K 雌性 CD ラットへの皮下投与による受胎能及び EFD 試験 - 207359

Location in CTD: 4.2.3.5.1

Date of First Dose: Feb 2008
Duration of Dosing: 3½ months

Study ID:	**207359**					
Species	Rat/CD (Crl:CD(SD))					
Gender (M/F) / Number of animals	10 F per dose group, mean value of 2F per time-point					
Feeding condition	Fed					
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1T01 (38.60 mg/mL)					
Method of Administration	s.c.					
Dose (mg/kg)	0.05, 0.10, 0.15					
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma					
Analyte	Semaglutide					
Assay	ELISA					
Group	**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)	**0.05**		**0.10**		**0.15**	
Duration	**Day 6**	**Day 17**	**Day 6**	**Day 17**	**Day 6**	**Day 17**
PK parameters:						
C_{max} (nmol/L)	54.3	39	87.5	78.4	82.5	81
t_{max} (h)	6	6	6	6	10	10
AUC_{0-24} (h·nmol/L)	811	555	1660	1370	1530	1440

Additional Information:
The rats were dosed once-daily until Day 17 of gestation after a dose escalation phase of two weeks followed by two weeks on full doses prior to mating. Three females per group continued treatment until Day 20 after mating so that foetal blood samples could be taken.
Samples were taken for toxicokinetic analysis in relation to Days 6 and 17 of gestation following dosing. Composed plasma profiles, mean value of two animals per time-point. Blood sampling time-points; Day 1: 1.5, 3, 6, 10 and 24 h.
The foetuses were exposed in all three dose groups (3-4% of the maternal exposure)

2.6.5.4.L 雌性 CD ラットへの皮下投与による受胎能及び EFD 試験 – 207361

Location in CTD: 4.2.3.5.1

Date of First Dose: May 2008
Duration of Dosing: 4 months

Study ID:	**207361**					
Species	Rat/ CD (Crl:CD(SD))					
Gender (M/F) / Number of animals	10 F per dose group, mean value of 2F per time-point					
Feeding condition	Fed					
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1T01 (38.60 mg/mL)					
Method of Administration	s.c.					
Dose (mg/kg)	0.01, 0.03, 0.09					
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma					
Analyte	Semaglutide					
Assay	ELISA					
Group	**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)	**0.01**		**0.03**		**0.09**	
Duration	**Day 6**	**Day 17**	**Day 6**	**Day 17**	**Day 6**	**Day 17**
PK parameters:						
C_{max} (nmol/L)	7.70	5.54	17.3	13.4	58.6	38.4
t_{max} (h)	6	10	3	3	3	3
AUC_{0-24} (h·nmol/L)	94.1	71.6	286	208	880	590
$t_{½}$ (h)	NC	NC	12.9	14.2	17.6	20.1

NC = not calculable

2.6.5.4.M ラットを用いた 104 週間反復皮下投与がん原性試験 - 207363

Location in CTD: 4.2.3.4.1

Date of First Dose: Feb 2008
Duration of Dosing: 2 years

Study ID:	**207363**
Species	Rat/ Sprague Dawley Crl:CD® (SD)IGS BR
Gender (M/F) / Number of animals	12 F+12 M per dose group, mean value of 2M+2F per time-point
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, dihydrate; 14.0 mg/mL propylene glycol; 5.50 mg/mL phenol in water for injection, adjusted to pH 7.4. Batch No.: LP217G1T01, Weeks 1 to 47, 38.60 mg/mL Batch No.: LP217G1V04, Weeks 47 to 55, 36.2 mg/mL Batch No.: LP0217G1V04, Week 55 to Week 87, 33.8 mg/mL Batch No.: LP0217G1V06, Week 87 onwards, 35.3 mg/mL
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.0025, 0.01, 0.025, 0.1
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	LC-MS/MS

Group		**2**			**3**			**4**			**5**		
Dose (mg/kg)		**0.0025**			**0.01**			**0.025**			**0.1**		
Duration		**Day 1**	**Week 52**	**Week 104**	**Day 1**	**Week 52**	**Week 104**	**Day 1**	**Week 52**	**Week 104**	**Day 1**	**Week 52**	**Week 104**
PK parameters:													
C_{max} (nmol/L)	F	NC	NC	NC	11.6*	9.2	22.1	20.2	25.0	24.4	72.3	127	219
	M	NC	NC	NC	13.4*	7.9	13.6	26.1	20.7	30.9	78.2	112	148
t_{max} (h)	F	NC	NC	NC	6*	1.5	3	3	3	3	6	1.5	3
	M	NC	NC	NC	3*	1.5	3	3	3	3	6	3	3
AUC_{0-24} (h·nmol/L)	F	NC	NC	NC	NC	247	321	244	603	609	1060	2970	4220
	M	NC	NC	NC	NC	NC	264	NC	465	673	1270	2490	3410

Additional information:
* Several animals not included in the plasma concentration time profiles, i.e. parameters only rough estimates

Group	2			3			4			5		
Dose (mg/kg)	0.0025			0.01			0.025			0.1		
Duration	Day 1	Week 52	Week 104	Day 1	Week 52	Week 104	Day 1	Week 52	Week 104	Day 1	Week 52	Week 104

NC = not calculable

2.6.5.4.N 幼若ラットを用いた 5 週間予備試験 - 214276

Location in CTD: 4.2.3.5.4

Date of First Dose: 07 October 2014
Duration of Dosing: 5 weeks

Study ID:		**214276**		
Species		Rat / Sprague Dawley		
Gender (M/F) / Number of animals		9 F+9 M per dose group, mean value of 3M+3F per time-point		
Feeding condition		Fed		
Vehicle/Formulation		Semaglutide 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, dihydrate; 14.0 mg/mL propylene glycol; 5.50 mg/mL phenol in water for injection, adjusted to pH 7.4. Batch No.: 412_N14309		
Method of Administration		s.c.		
Dose (mg/kg)		0.03, 0.13, 0.6		
Sample		Plasma		
Analyte		Semaglutide		
Assay		LC-MS/MS		
Group		**2**	**3**	**4**
Dose (mg/kg)		**0.03**	**0.13**	**0.60**
Duration		**Week 5**	**Week 5**	**Week 5**
PK parameters:				
C_{max} (nmol/L)	F	37.5	187	611
	M	25.9	161	581
t_{max} (h)	F	4.0	8.0	8.0
	M	8.0	4.0	4.0
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	514	2810	10400
	M	468	2520	10300

Additional information: $AUC_{tau} = AUC_{(0\text{-}24h)}$

2.6.5.4.O 幼若ラットを用いた 11 週間毒性試験 - 214479

Location in CTD: 4.2.3.5.4

Date of First Dose: 05 May 2015
Duration of Dosing: 11 weeks

Study ID:		**214479**					
Species		Rat/ Sprague Dawley					
Gender (M/F) / Number of animals		9 F+9 M per dose group, mean value of 3M+3F per time-point					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation		Semaglutide 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, dihydrate; 14.0 mg/mL propylene glycol; 5.50 mg/mL phenol in water for injection, adjusted to pH 7.4. Batch No.: 412_N14309 and 412_N15050					
Method of Administration		s.c.					
Dose (mg/kg)		0.02, 0.13, 0.6					
Sample		Plasma					
Analyte		Semaglutide					
Assay		LC-MS/MS					
Group		**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)		**0.02**		**0.13**		**0.60**	
Duration		**Week 5**	**Week 11**	**Week 5**	**Week 11**	**Week 5**	**Week 11**
PK parameters:							
C_{max} (nmol/L)	F	22.6	27.6	168	196	848	845
	M	17.6	25.6	151	187	646	696
t_{max} (h)	F	4	8	2	8	4	4
	M	4	4	8	8	4	8
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	344	472	2400	3660	11200	16100
	M	313	439	2290	3560	11100	13900

Additional information: $AUC_{tau} = AUC_{(0\text{-}24h)}$

2.6.5.4.P ウサギを用いた用量範囲設定（DRF）及び発生毒性試験 - 206536

Location in CTD: 4.2.3.5.2

Date of First Dose: 22 Jan 2007
Duration of Dosing: 12 days

Study ID:	**206536**
Species	Female rabbits
Gender (M/F) / Number of animals	Group 1-8: n=3 Group 5-8: n=6
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: owGLP-1-06-101C
Method of Administration	s.c.
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group	**1***		**2**	**3**		**5**		**6**		**7**		**8**	
Dose (mg/kg)	**0.01**	**0.025**	**0.01**	**0.01**		**0.0006**		**0.003**		**0.006**		**0.006**	
Dose frequency	**Daily**	**Twice-weekly**	**Twice-weekly**	**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Every second day**		**Daily**	
Day of gestation	-	-	-	-	-	6	18	6	18	6	18	6	18
PK parameters, day of dosing:	7	63	56	0	11	1	13	1	13	1	13	1	13
C_{max} (nmol/L)	27.4	41.8	13.2	3.68	75.6	0.642[b]	1.85[d]	3.65	40.5	8.15	41.5	7.80	75.9
t_{max} (h)	4	8	12	24	4	8[b]	8	24	12	24	12	24	8
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (h·nmol/L)	582	758	267	66.7	1680	12.8[a]	44.2[c]	61.9	795	136	819	116	1490
$AUC_{(0\text{-}72h)}$ (h·nmol/L)	-	1890	714	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$t_{½}$ (h)	66.16	75.12	44.90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CL/F (L/h/kg)	-	0.00323	0.00373	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rac(pred)	-	-	-	-	5.09[a]	-	1.8[a]	-	3.65[a]	-	-	-	3.78[b]
Rac(obs)	-	-	-	-	29.03	-	3.32[e]	-	13.01	-	-	-	13.15

Additional Information:
Group 1: Day 0-7: 0.01 mg/kg daily, Day 8-13: recovery (no dosing), Day 14-28: 0.01 mg/kg twice-weekly, Day 32-63: 0.025 mg/kg twice-weekly.
Samples were taken at 0, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after dosing for group 1 and 2.
Samples were taken at 0, 4, 8, 12 and 24 hours after dosing for group 3 to 8.
$t_{½}$ can not be calculated for group 3 to 8 as sampling was only done until 24 hours.
NC=not calculable
[a] = n=1
[b] = n=3
[c] = n=4
[d] = n=5
[e] = n=2

2.6.5.4.Q ウサギへの皮下投与による予備 EFD 試験 - 207358

Location in CTD: 4.2.3.5.2

Date of First Dose: 9 Jan 2008 (gr. 5,6)
Date of First Dose: 22 Jan 2008 (gr. 1-4, 7-8)
Duration of dosing: 14 days (gr. 2-4, 6)
Duration of dosing: 26 days (gr. 5)
Duration of dosing: 23 days (gr. 7-8)

Study ID:	**207358**
Species	Female rabbits
Gender (M/F) / Number of animals	Group 1-8: n=6
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1T01 (38.60 mg/mL)
Method of Administration	s.c.
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group	**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**	
Dose (mg/kg)	**0.001**		**0.005**		**0.0075**		**0.001**		**0.01**		**0.001**		**0.0075**	
Dose frequency	**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**	
Day of gestation	**6**	**19**	**6**	**19**	**6**	**19**	**6**	**19**	**-**	**-**	**6**	**19**	**6**	**19**
PK parameters, day of dosing:	**1**	**14**	**1**	**14**	**1**	**14**	**14**	**27**	**1**	**14**	**1**	**14**	**1**	**14**
C_{max} (nmol/L)	0.377	1.87	4.30	24.3	6.53	47.5	0.893	2.25	9.01	76.0	0.176	3.04	7.55	44.4
t_{max} (h)	12	4	8	12	12	4	8	4	12	12	4	4	12	8
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (h·nmol/L)	-	33.5	76.5	481	112	917	6.86	36.5	156	1430	-	52.4	142	977
$t_{½}$ (h)	-	9.86	-	42.1	-	19.5	-	-	-	-	-	-	-	40.6

Group	**2**		**3**		**4**		**5**		**6**		**7**		**8**	
Dose (mg/kg)	**0.001**		**0.005**		**0.0075**		**0.001**		**0.01**		**0.001**		**0.0075**	
Dose frequency	**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**		**Daily**	
Rac(pred)*														
Rac(obs)	-	-	-	6.28	-	6.45	-	-	-	-	-	-	-	6.88

Additional Information:

Group 6 animals were treated for 14 consecutive days at a dose of 0.01 mg/kg/day and were not mated.

Group 5 animals were treated from Day -7 to 19 of gestation at a dose of 0.001 mg/kg/day.

Animals of Groups 2 to 4 were treated from Day 6 to 19 of gestation at doses of 0.001, 0.005 or 0.0075 mg/kg/day.

Animals of Groups 7 and 8 were treated from Day 6 to 28 of gestation at doses of 0.001 or 0.0075 mg/kg/day.

Animals of the Control group (Group 1) were treated with the formulation vehicle from Day 6 to 19 of gestation.

Group 1-4 animals were sampled on Day 6 (0, 4, 8, 12 and 24 hours after dosing) and on Day 19 (0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 144 and 216 hours after mating.

Group 5 animals were sampled on the first day of dosing – one week prior to mating and on Day 6 (0, 4, 8, 12 and 24 hours) and on Day 19 (0, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 144 and 216 hours) after mating.

Group 6 animals were sampled on the first day of dosing and on Day 14 of treatment.

Group 7 and 8 animals were sampled on Days 6, 19 and 28 after mating (0, 4, 8, 12, 24 h on each day).

* $Rac_{(pred)}$ were calculated to be 1.7-3.4 fold.

NC=not calculable

Foetuses from all six rabbits had detectable levels of semaglutide in the plasma, in average about 2*LLOQ, 1.05 nmol/L (range 0.75-1.8 nmol/L)

2.6.5.4.R ウサギへの皮下投与による EFD 試験 - 207360

Location in CTD: 4.2.3.5.2

Date of First Dose: 13 April 2008
Duration of Dosing: 14 days

Study ID:	**207360**					
Species	Female rabbits (New Zealand White)					
Gender (M/F) / Number of animals	Group 2-4: n=3					
Feeding condition	Fed					
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1T01 (38.60 mg/mL)					
Method of Administration	s.c.					
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma					
Analyte	Semaglutide					
Assay	ELISA					
Group	**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)	**0.001**		**0.0025**		**0.0075**	
Dose frequency	**Daily**		**Daily**		**Daily**	
Day of gestation	**6**	**19**	**6**	**19**	**6**	**19**
PK parameters, day of dosing:	**1**	**14**	**1**	**14**	**1**	**14**
C_{max} (nmol/L)	NC	1.51	1.39	9.91	8.61	73.6
t_{max} (h)	NC	5.3[a]	9.3	11	8	5.3[a]
$AUC_{(0-24h)}$ (h·nmol/L)	NC	20.2	9.22	208	145	1530
Rac(pred)*	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Rac(obs)	NC	NC	NC	NC	NC	11

Additional Information:
Females were treated from Day 6 to Day 19 (inclusive) after mating.
Blood samples were taken from three animals per dose group on Day 6 (on the first day of dosing) and Day 19 at the following nominal time points: predose, 4, 8, 12 and 24 hours after dosing.
* Rac(pred) could not be predicted at all in the present study.
NC=not calculable
[a] n=2

2.6.5.4.S 非妊娠ミニブタを用いた MTD 及び 3 週間 DRF 試験 - 208404

Location in CTD: 4.2.3.7.7

Date of First Dose: 02 Oct 2008
Duration of Dosing: 3 (8) weeks

Study ID:	**208404**							
Species	Female minipigs							
Gender (M/F) / Number of animals	Phase 1 (dose escalating phase): 2 F/group Phase 2 (Fixed dose): 6 F/group							
Feeding condition	Fed							
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1V01							
Method of Administration	s.c.							
Sample	Plasma							
Analyte	Semaglutide							
Assay	ELISA							
Phase	**1**				**2**			
Day of dosing	**1**	**8**	**15**	**22**	**43**	**50**	**57**	**75**
Dose (mg/kg)	**0.01**	**0.05**	**0.15**	**0.5**	**0.01**	**0.05**	**0.15**	**0.15**
PK parameters:								
C_{max} (nmol/L)	8.82	64.6	170	724	12.9	68.6	193	293
t_{max} (h)	28.0	24.0	16.0	16.0	8.0	8.0	13.3	18.7
$AUC_{(0-24h)}$ (h·nmol/L)	171	1180	3790	15300	-	-	4080	6340
$AUC_{(0-72h)}$ (h·nmol/L)	574	3650	11200	43000	-	-	11400	NC
Rac(obs)	-	-	-	-	-	-	-	1.6 [a]

Additional Information:
Blood samples were taken at predose, 1, 3, 8, 24, 48 and 72 hours after dosing, except on Day 75: predose, 1, 3, 8, 24 h. Dosing twice-weekly.
a) An approximate $Rac_{(obs)}$ calculated based on $AUC_{0-24\,h}$ instead, as $AUC_{(0-72h)}$ could not be calculated on Day 75, as plasma samples were only collected until 24 h on Day 75.
NC=not calculable

2.6.5.4.T サルを用いた 2〜5 週間反復皮下投与毒性試験 - 206449

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 30-Oct-2006
Duration of Dosing: 2-5 weeks

Study ID:	**206449**
Species	Cynomolgus monkey
Gender (M/F) / Number of animals	3 M+3 F per dose group
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: 412N06313 (1 mg/mL) and 412N06314 (10 mg/mL), pH 7.4 Vehicle, Batch No.: 412N06315
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.007, 0.051, 0.187, 0.683
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group		**2**		**3***		**4***		**5***	
Dose (mg/kg)		**0.007#**		**0.051#**		**0.19#**		**0.68#**	
Day		**1**	**11**	**1**	**11**	**1**	**11**	**1**	**11**
PK parameters:									
C_0 (nmol/L)**	F	<LLOQ	6.36	6.33	64.3	38.2	205	209	834
	M	<LLOQ	7.23	8.54	70.4	47.9	215	295	754
C_{max} (nmol/L)	F	12.5	13.5	98.9	136	298	407	1249	1710
	M	12.7	15.6	105	150	346	500	1611	1648
t_{max} (h)	F	24	24	24	24	24	24	12	12
	M	12	24	24	24	24	24	24	24
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	629	751	5411	7705	16584	23395	70826	90984
	M	692	853	5933	8238	17686	27550	87383	90070
$AUC_{(0-24h)}$ (h·nmol/l)	F	192	279	1881	2831	5501	8911	25590	34595
	M	230	309	2070	3144	5747	10006	30291	33783
$t_{½}$ (h)	F	40.2	54.1	55.6	52.5	57.0	62.1	72.3	68.0
	M	68.4	49.3	48.1	55.1	64.7	55.7	58.5	57.9

Group		2		3*		4*		5*	
Dose (mg/kg)		0.007#		0.051#		0.19#		0.68#	
Day		1	11	1	11	1	11	1	11
Rac(obs)	F	NA	1.20	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	M	NA	1.24	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rac(pred)	F	NA	1.70	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	M	NA	1.59	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Additional Information:

* Groups 3-5 were pre-dosed with lower doses during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as C_0 is not zero.

0.007 mg/kg; n=12/gender. 0.051 mg/kg; n=9/gender on Day 1 and n=3/gender on Day 11. 0.19 mg/kg; n=6/gender on Day 1 and n=3/gender on Day 11. 0.68 mg/kg; n=3/gender.

** C_0 is the observed concentration at time-point 0, predose.

Blood sampling time-points up to 72 h (AUC_{tau}=$AUC_{0\text{-}72h}$). Twice-weekly dosing, only the lowest dose level is a true Day 1 vs. Day 11, i.e. Rac is only determined for this group.

$t_{½}$ given as harmonic mean. t_{max} as median value

LLOQ: 0.48 nmol/L

NA; not applicable

2.6.5.4.U サルを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験 - 206450

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 15-Jan-2007
Duration of Dosing: 13 (2) weeks

Study ID:	**206450**
Species	Cynomolgus monkey
Gender (M/F) / Number of animals	6 M+6 F per dose group
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: GLP-1-06-101C
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.004, 0.086, 0.977 (0.467**)
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	ELISA

Group		**2**			**3***			**4***		
Dose (mg/kg)		**0.004**			**0.086**			**0.977**	**0.467**	
Duration		**Day 1**	**Week 6**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 6**	**Week 13**	**Day 1**	**Week 6**	**Week 13**
PK parameters:										
C_{max} (nmol/L)	F	11.3	19.8	17.3	145	220	232	1800	977	1270
	M	11.8	19.0	17.5	159	232	244	1450	1110	1130
t_{max} (h)	F	24	18	10	24	18	8	18	8	18
	M	24	24	8	24	24	24	18	8	24
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	586	924	785	8370	11600	12500	95900	52900	68400
	M	618	916	821	8370	13000	12800	80100	61000	61600
$AUC_{(0-24h)}$ (h·nmol/L)	F	186	341	332	2680	4440	4850	35200	19600	27100
	M	196	338	329	2960	4560	5080	28100	22300	23500

Group		2			3*			4*		
Dose (mg/kg)		0.004			0.086			0.977	0.467	
Duration		Day 1	Week 6	Week 13	Day 1	Week 6	Week 13	Day 1	Week 6	Week 13
$t_{½}$ (h)	F	49.7	37.5	39.9	71.5	44.9	48.4	56.0	47.4	44.4
	M	39.8	36.4	41.6	46.1	53.8	39.5	55.6	57.2	47.8
CL/F (L/h/kg)	F	NC	0.0011	0.0013	NC	0.0018	0.0017	NC	0.0022	0.0017
	M	NC	0.0011	0.0012	NC	0.0016	0.0016	NC	0.0019	0.0019
V/F (L/kg)	F	NC	0.056	0.074	NC	0.12	0.13	NC	0.14	0.11
	M	NC	0.062	0.074	NC	0.13	0.098	NC	0.16	0.13
Rac(obs)	F	NA	1.60	1.36	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	M	NA	1.50	1.34	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rac(pred)	F	1.81	NA	NA	2.11	NA	NA	1.74	NA	NA
	M	1.41	NA	NA	1.53	NA	NA		NA	NA

Additional Information:

* These animals were pre-dosed with lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as C_0 is not zero.

** The dose level of Group 4 was decreased in Week 3 for females and Week 4 for males.

Blood sampling time-points 0, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h (AUC_{tau}=$AUC_{0\text{-}72h}$). Twice-weekly dosing, only the lowest dose level is a true Day 1 vs. Week 6 and 13, i.e. Rac(obs) is only determined for this group.

$t_{½}$ given as harmonic mean.

NA; not applicable

NC; not calculable

2.6.5.4.V サルを用いた 52 週間反復皮下投与毒性試験 - 207288

Location in CTD: 4.2.3.2

Date of First Dose: 18-Oct-2007
Duration of Dosing: 52 (2) weeks

Study ID:	**207288**
Species	Cynomolgus monkey
Gender (M/F) / Number of animals	6 M+6 F per dose group and 4M+4F in control group
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1T02
Method of Administration	s.c.
Dose (mg/kg)	0.01, 0.06, 0.36
Sample	Plasma
Analyte	Semaglutide
Assay	LC-MS/MS

Group		**2***					**3***					**4***				
Dose (mg/kg)		**0.01**					**0.06**					**0.36**				
Duration		**Day 1**	**Week 13**	**Week 26**	**Week 39**	**Week 52**	**Day 1**	**Week 13**	**Week 26**	**Week 39**	**Week 52**	**Day 1**	**Week 13**	**Week 26**	**Week 39**	**Week 52**
PK parameters:																
C_{max} (nmol/L)	F	14.1	24.9	23.1	25.8	29.3	95.1	180	165	152	172	720	1210	985	1040	1150
	M	13.6	21.9	23.9	20.2	24.9	83.8	166	153	139	166	663	1100	983	911	1080
t_{max} (h)	F	20	13	13	25	14	16	8.7	13	24	12	17	12	13	8.7	11
	M	23	14	17	16	18	14	15	13	18	12	13	10	9.3	20	11
AUC_{tau} (h·nmol/L)	F	751	1340	1300	1370	1540	5320	9630	8870	8910	9210	38400	58500	46200	55300	56900
	M	764	1200	1260	1190	1380	4570	9160	8040	8230	9260	36400	56400	48700	51700	52500
$AUC_{\%extrapol}$ (%)	F	41	45	53	41	42	59	49	42	NC	47	52	45	44	46	46
	M	50	41	52	49	40	49	56	51	46	48	46	48	54	40	43

Group		**2***					**3***					**4***				
Dose (mg/kg)		**0.01**					**0.06**					**0.36**				
Duration		**Day 1**	**Week 13**	**Week 26**	**Week 39**	**Week 52**	**Day 1**	**Week 13**	**Week 26**	**Week 39**	**Week 52**	**Day 1**	**Week 13**	**Week 26**	**Week 39**	**Week 52**
Rac(obs)	F	-	1.8	1.8	1.9	2.1	-	1.8	1.7	1.7	1.7	-	1.5	1.2	1.5	1.5
	M	-	1.6	1.7	1.6	1.8	-	2.1	1.8	1.9	2.2	-	1.6	1.4	1.4	1.4
Rac(pred)	F	-	1.7	2.1	1.7	1.7	-	2.0	1.7	NC	1.7	-	1.8	1.6	1.8	1.9
	M	-	1.7	2.0	1.9	1.6	-	2.3	2.1	1.8	1.9	-	2.0	2.3	1.7	1.7
t½ (h)	F	46	59	75	50	54	78	68	54	NC	57	71	60	53	61	62
	M	59	53	73	64	52	67	84	71	61	65	60	66	74	52	57

Additional Information:

* These animals were pre-dosed with lower doses (one dose level/week) during an adaptation period, i.e. Day 1 is not regarded as a single dose as C_0 is not zero.
Blood sampling time-points 0, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h (AUC_{tau}=AUC_{last}=AUC_{0-72h}). Twice-weekly dosing, only the lowest dose level is a true Day 1 vs. repeat dosing.
$t_{½}$ given as harmonic mean, but as $AUC_{\%extrapol}$ was about 40-50%, the $t_{½}$ is not the true elimination $t_{½}$.

NC; not calculable

2.6.5.4.W カニクイザルを用いた EFD 試験（探索試験） - 208477

Location in CTD: 4.2.3.5.2

Date of First Dose: 16 January 2009
Duration of Dosing: 30 days

Study ID:	**208477**			
Species	Cynomolgus monkey			
Gender (M/F) / Number of animals	6 F per dose group			
Feeding condition	Fed			
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1V04, 1.6 mg/mL (until 12 Feb 2009), 1.5 mg/mL (from 13 Feb 2009) 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, dihydrate; 14.0 mg/mL propylene glycol; 5.50 mg/mL phenol in water for injection (WFI), adjusted to pH 7.4			
Method of Administration	s.c.			
Dose (mg/kg)	0.08, 0.16			
Sample	Plasma			
Analyte	Semaglutide			
Assay	LOCI			
Group	**1**		**2**	
Dose (mg/kg)	**0.08**		**0.16**	
Duration	**GD 20**	**GD 50**	**GD 20**	**GD 50**
PK parameters:				
C_{max} (nmol/L)	151	258	426	601
t_{max} (h)	15	11	11	7.3
$AUC_{(0\text{-}72h)}$ (h·nmol/L)	9150	12300	23200	28000

Additional Information:
Dosing every 72 h from gestation day (GD) 20, preceeded with an up-titration period on GD16 and GD18.

2.6.5.4.X カニクイザルを用いた皮下投与（bolus）による EFD 試験 - 208486

Location in CTD: 4.2.3.5.2

Date of First Dose: 07 April 2009
Duration of Dosing: 30 days

Study ID:	**208486**					
Species	Cynomolgus monkey					
Gender (M/F) / Number of animals	16 F per dose group					
Feeding condition	Fed					
Vehicle/Formulation	Semaglutide, Batch No.: LP0217G1V04 (33.8 mg/mL) 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, dihydrate; 14.0 mg/mL propylene glycol; 5.50 mg/mL phenol in water for injection (WFI), adjusted to pH 7.4					
Method of Administration	s.c.					
Dose (mg/kg)	0.015, 0.075, 0.15					
Sample	Plasma					
Analyte	Semaglutide					
Assay	LC-MS/MS					
Group	**2**		**3**		**4**	
Dose (mg/kg)	**0.0015**		**0.075**		**0.15**	
Duration	**GD 16**	**GD 50**	**GD 18**	**GD 50**	**GD 20**	**GD 50**
PK parameters:						
C_{max} (nmol/L)	32.4	42.1	182	224	443	625
t_{max} (h)	21	12	17	8	11	9
$AUC_{(0-72h)}$ (h·nmol/L)	1270*	2000	7310*	10400	24000	30000
$AUC_{(0-24h)}$ (h·nmol/L)	581	856	3580	4410	8970	12000

Additional Information:
Dosing every 72 h from gestation day (GD) 20, preceeded with an up-titration period on GD16 and GD18.
* AUC(0-48h)

2.6.5.4.Y カニクイザルを用いた EFD ならびに出生前及び出生後の発生（PPND）に関する試験 - 210061

Location in CTD: 4.2.3.5.3

Date of First Dose: 21 April 2010
Duration of Dosing: GD16-GD140

Study ID:	**210061**								
Species	Cynomolgus monkey								
Gender (M/F) / Number of animals	24F per dose group								
Feeding condition	Fed								
Vehicle/Formulation	1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, dihydrate; 14.0 mg/mL propylene glycol; 5.50 mg/mL phenol in water for injection (WFI), adjusted to pH 7.4								
Method of Administration	s.c.								
Dose (mg/kg)	0.015, 0.075, 0.15								
Sample	Plasma								
Analyte	Semaglutide								
Assay	LC/MS/MS								
Group	**2**			**3**			**4**		
Dose (mg/kg)	**0.0015**			**0.075**			**0.15**		
Duration	**GD 16**	**GD 50**	**GD 140**	**GD 18**	**GD 50**	**GD 140**	**GD 20**	**GD 50**	**GD 140**
PK parameters:									
C_{max} (nmol/L)	31.4	54.0	29.0	201	266	166	443	512	349
t_{max} (h)	24	17.6	15.8	20.9	12.5	9.41	14.5	13.8	7.38
$AUC_{(0-48h)}$ (h·nmol/L)	1290	2170	1070	8140	10500	5530	17700	20800	11900
$AUC_{(0-72h)}$ (h·nmol/L)	-	2900	1320	-	14000	6720	24500	27900	14400

Additional Information:
Dosing every 72 h from gestation day (GD) 20, preceded with an up-titration period on GD16 and GD18.
* AUC(0-48h)

2.6.5.5 分布

Test Article: Semaglutide

2.6.5.5.A ラットにおける組織分布 – 206132

Location in CTD: 4.2.2.3

Study ID:	**206132**
Species/strain	Rat/Wistar
Gender (M/F) / Number of animals:	1M per time point
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	Aqueous solution containing 50 mM dipotasium hydrogen phosphate, 80 mM sodium chloride and 0.05% Tween 80, pH 8.0
Method of Administration:	Intravenous and subcutaneous
Dose:	0.1 mg/kg (322 µCi/kg)
Radionuclide:	[^{3}H]Tyr-semaglutide
Assay:	Quantitative whole body autoradiograhy
Sampling time:	1, 8, 24 h after i.v. administration and 6, 24, 30 h after s.c. administration

	Concentration (nCi/mg tissue)					
Tissues/organs	**1 hour**	**8 hours**	**24 hours**	**6 hours**	**24 hours**	**30 hours**
	i.v. administration			**s.c. administration**		
Blood	31.89	12.47	2.93	4.62	3.36	3.36
Brain – cerebrum	NQ	1.04	0.88	0.63	1.45	1.34
Brain - cerebellum	NQ	1.26	0.98	0.66	1.56	1.39
Heart muscle	7.23	4.55	2.29	2.13	2.50	2.26
Bone marrow	4.16	5.09	4.32	4.67	5.82	7.36
Liver	8.16	5.51	3.53	2.96	3.51	3.91
Lung	30.91	12.84	5.71	4.79	2.54	6.26
Stomach mucosa	3.58	4.45	3.04	4.08	3.48	3.14
Spleen	5.33	3.89	3.37	2.47	3.31	3.73
Kidney	14.73	9.33	4.82	7.58	5.35	5.03
Kidney medulla	16.67	8.42	3.17	3.96	3.57	3.13

	Concentration (nCi/mg tissue)					
Tissues/organs	**1 hour**	**8 hours**	**24 hours**	**6 hours**	**24 hours**	**30 hours**
	i.v. administration			**s.c. administration**		
Pancreas	9.48	4.49	0.87	8.29	4.06	6.45
Spinal cord	NQ	1.09	0.71	0.55	1.53	1.35
Skeletal muscle	3.09	2.32	1.10	0.60	1.64	1.49
Intestine mucosa	9.56	6.79	5.15	5.53	4.65	5.07
Testis	0.80	3.24	1.64	1.27	2.05	2.28
Urinary bladder	10.75	12.64	2.78	8.76	3.61	4.42
Epididymis	NQ	5.52	2.93	4.62	3.36	3.36

Additional Information:
NQ; tissue not quantifiable

2.6.5.5.B ラットにおける組織分布 - 207267

Location in CTD: 4.2.2.3

Study ID:	**207267**
Species/strain	Rats/Wistar
Gender (M/F) / Number of animals:	3 M pr. time point
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	0.12 mg/mL (17 MBq/mL) in an aqueous vehicle containing disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL), phenol (5.50 mg/mL), pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose :	0.3 mg/kg (41 MBq/kg)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Assay:	Quantitative whole body autoradiography
Sampling time:	3, 6, 24 and 72 h

Tissues/organs[a]	**3 h** **ng eq/mL**	**6 h** **ng eq/mL**	**24 h** **ng eq/mL**	**72 h** **ng eq/mL**
Plasma[1]	978	1150	1100	223
Blood	562	761	500	33.3
Adrenal medulla	236	298	211	24.0
Bone marrow	71.4	106	101	16.9
Bulbo-urethral gland	141	174	124	19.6
Caecum mucosa	58.2	56.7	153	12.6
Choroid plexus	164	391	185	17.8
Epididymis	12.4	37.6	148	8.14
Intra-orbital lachrymal gland	42.1	52.8	123	10.4
Kidney cortex	304	444	750	88.0
Kidney medulla	191	251	365	13.9
Large intestine mucosa	54.6	61.5	224	26.7
Liver	92.9	134	192	28.0
Lung	385	292	332	22.8
Pineal body	112	103	69.0	11.2
Rectum mucosa	42.6	71.1	129	14.7
Small intestine mucosa	69.5	125	91.1	16.8
Stomach mucosa (fundus)	80.5	76.9	154	8.00

Tissues/organs[a]	**3 h** **ng eq/mL**	**6 h** **ng eq/mL**	**24 h** **ng eq/mL**	**72 h** **ng eq/mL**
Thyroid	126	130	207	14.8
Tongue	35.1	52.3	168	13.9
Uveal tract	76.7	190	179	22.6

[1]plasma concentration determined by liquid scintillation counting

[a]The list represents the three major organs: liver, kidney, lung and 15 organs/tissues with the highest observed radioactivity. Plasma and blood are added for comparison.

Additional Information:

The following organs and tissues were analysed but not listed in the table above; A) adrenal cortex, brain, brown fat, exorbital lachrymal gland, haderian gland, mandibular lymph nodes, meninges, muscle, myocardium, nasal mucosa, pancreas, pituitary, prostate, salivary glands, seminal vesicles, skin, spinal cord, spleen, stomach mucosa (non-fundic), testis, thymus, tooth pulp and white fat.

Limit of quantification: 5.21 ng eq/mL

2.6.5.5.C 有色ラットにおける組織分布 – 210172

Location in CTD: 4.2.2.3

Study ID:	**210172**
Species/strain	Rat/Lister Hooded (pigmented)
Gender (M/F) / Number of animals:	1 M per time point
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	0.3 mg/mL; in aqueous solution containing disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL); phenol (5.50 mg/mL); pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose:	0.3 mg/kg (80 MBq/kg)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Specific Activity:	228 MBq/mg
Assay:	Quantitative whole body autoradiography
Sampling time:	1, 4 8, 12 h and 1, 3,7,14 and 28 days

Tissues/organs[a]	**Concentration (ng eq/g)**								
	1 h	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**	**336 h**	**672 h**
Plasma[*]	513	758	1300	1120	1080	254	51.5	11.3	1.58
Adrenal medulla	327	238	707	436	403	46.8	10.9	4.55	BLQ
Aortic wall	182	244	343	256	281	71.6	BLQ	BLQ	BLQ
Bile ducts	516	1610[#]	1880[#]	924	1530	486	BLQ	BLQ	BLQ
Blood	425	809	1390	1020	917	138	5.25	BLQ	BLQ
Brain	7.13	9.58	14.1	10.3	11.8	6.25	3.52	BLQ	BLQ
Brown fat	284[1]	111[1]	53.5[1]	89.1	324	20.2	10.8	3.49	3.46
Bulbo-urethral gland	432	307	804	700	549	75.6	7.13	BLQ	BLQ
Dose site	58800[#]	61800[#]	50100[#]	22600[#]	6180[#]	145	72.2	110	36.5
Lens	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Liver	92.7	202	369	293	376	104	8.19	BLQ	BLQ
Lung	311	491	960	593	709	95.4	5.57	BLQ	BLQ
Myocardium	65.1	156	358	287	194	40.2	4.34	BLQ	BLQ
Periodontal membrane	44.3	217	430	277	445	53.6	BLQ	BLQ	BLQ
Pineal body	143	96.9	254	207	138	28.2	5.84	BLQ	BLQ
Preputial gland	421	396	211	590	518	93.5	5.21	25.8	BLQ
Renal cortex inner	138	274	415	302	985	967	13.6	BLQ	BLQ
Renal cortex outer	161	432	596	555	821	276	8.53	BLQ	BLQ

Tissues/organs[a]	Concentration (ng eq/g)								
	1 h	4 h	8 h	12 h	24 h	72 h	168 h	336 h	672 h
Renal medulla	197	440	471	315	324	60.5	4.86	BLQ	BLQ
Stomach mucosa (fundus)	113	112	252	314	138	21.5	4.44	BLQ	BLQ
Thyroid	143	266	254	133	179	31.0	5.83	BLQ	BLQ
Tooth pulp	NS	722	1050	543	993	252	BLQ	BLQ	BLQ
Uveal tract/retina	47.6	100	246	239	263	66.1	BLQ	BLQ	BLQ

[a] The list represents: liver, kidney, lung, brain, lens and 16 organs/tissues with the highest observed radioactivity. Plasma and blood are added for comparison.

* Radioactivity determined by liquid scintillation counting (LOD Plasma = 0.020 ng eq./g),

[#] Measurement above the upper limit of quantification

BLQ= below lower limit of quantification

Upper limit of quantification = 1600 ng eq/g

Lower limit of quantification = 3.38 ng eq/g

Additional information:

The following organs and tissues were analysed but not listed in the table above: Adrenal cortex, Bone marrow, Caecum mucosa, Choroid plexus, Epididymis, Exorbital lachrymal gland, Harderian gland, Intra-orbital lachrymal gland, Large intestine mucosa, Mandibular lymph nodes, Meninges, Muscle, Nasal mucosa, Oesophageal wall, Pancreas, Peri-renal fat, Pituitary, Prostate, Rectum mucosa, Salivary glands, Seminal vesicles, Skin (Non-pigmented and pigmented), Spinal cord, Spleen, Stomach mucosa (non-fundic), Small intestine mucosa, Testis, Thymus, Tongue, Urinary bladder wall and White fat

2.6.5.6 血漿タンパク質結合

Test Article: Semaglutide

***In vitro* Plasma Protein Binding - 208380/213228**

Location in CTD: 5.3.2.1

Study ID:	**208380/213228**
Species/strain:	CD-1 mice, Wistar rats, Sprague Dawley rats, New Zealand White rabbit, Göttingen minipigs, Cynomolgus monkeys and humans
Analyte:	Semaglutide
Test system:	Pooled EDTA plasma from at least five male and five female
Method.	SPR technology, using a Biacore T100 instrument, was used to investigate binding between semaglutide and plasma proteins. Flow cells of CM5 sensor chips were immobilised with semaglutide. Plasma was passed over the flow cells in nine dilutions in the range of 0.01%-10%. Binding assays were run at 37°C. A kinetic analysis based on the 1:1 binding model was performed to determine the dissociation constant, K_D, and percentage fraction unbound (f_u)of semaglutide in each pool of plasma

	Study ID: 208380							**Study ID: 213228**						
Species	**Sex**	**% f_u Mean ±SD**			**Plasma albumin K_D (µM)**			**Sex**	**% f_uMean ±SD**			**Plasma albumin K_D (µM)**		
Mouse (CD-1)	M	0.56	±	0.23	2.21	±	0.93	M/F	0.28	±	0.05	1.07	±	0.19
	F	0.36	±	0.16	1.36	±	0.60	-	-	-	-	-	-	-
Rat (Wistar)	M	0.65	±	0.23	2.86	±	1.03	-	-	-	-	-	-	-
	F	0.60	±	0.16	2.77	±	0.77	-	-	-	-	-	-	-
Rat (Sprague Dawley)	M	0.59	±	0.25	2.42	±	1.05	M/F	0.19	±	0.04	0.80	±	0.14
	F	0.67	±	0.12	3.14	±	0.55	-		-	-		-	-
Rabbit (NZ White)	F	0.036	±	0.011	0.14	±	0.05	F	0.07	±	0.01	0.27	±	0.05
Minipig (Göttingen)	F	0.22	±	0.19	1.37	±	1.19	-	-	-	-	-	-	-
Monkey (cynomolgus)	M	0.19	±	0.05	0.94	±	0.26	M/F	0.46	±	0.09	2.19	±	0.45
	F	0.10	±	0.02	0.49	±	0.08	-	-	-	-	-	-	-
Human	M	0.18	±	0.05	1.06	±	0.30	M/F	0.36	±	0.05	2.10	±	0.31
	F	0.19	±	0.04	1.08	±	0.21		-	-		-	-	-
HSA	-	-	-	-	-	-	-	-	0.17	±	0.02	1.09	±	0.10
HSA (fatty acid free)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.04	±	0.002	0.27	±	0.02

Additional Information: In general, the plasma protein binding was comparable between species and the observed difference between the assays was 2-3 fold. The f_u was <1% for all species investigated

2.6.5.7 妊娠動物又は泌乳動物を用いた試験

Test Article: Semaglutide

2.6.5.7.A 妊娠ラットにおける組織分布及び胎盤移行性 - 207267

Location in CTD: 4.2.2.3

Study ID:	**207267**
Species/strain	Rats/Wistar (pregnant female rats)
Gender (M/F) / No. of animals:	1 F pr. time point
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	0.12 mg/mL(17 MBq/mL) in an aqueous vehicle containing disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL), phenol (5.50 mg/mL), pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose (mg/kg):	0.3 mg/kg (41 MBq/kg)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Specific Activity:	592 MBq/mmol
Assay:	QWBA
Sampling time:	3, 6 and 24 h

Tissues/organs[a]	**3 h** **ng eq/mL**	**6 h** **ng eq/mL**	**24 h** **ng eq/mL**
Plasma[1]	698	1230	1070
Blood	501	578	432
Adrenal medulla	66.6	161	104
Choroid plexus	218	124	54.0
Clitoris	81.9	NS	480
Intra-orbital lachrymal gland	10.7	56.7	156
Kidney cortex	182	404	515
Kidney medulla	74.5	189	159
Liver	59.7	116	152
Lung	161	261	250
Mandibular lymph nodes	18.6	34.2	176
Meninges	134	38.2	53.6
Myocardium	NS	NS	134
Pancreas	37.8	97.4	131

Tissues/organs[a]	**3 h** **ng eq/mL**	**6 h** **ng eq/mL**	**24 h** **ng eq/mL**
Rectum mucosa	29.6	NS	177
Small intestine mucosa	99.3	117	245
Thyroid	70.0	93.0	101
Tongue	21.6	46.8	109
Tooth pulp	427	538	403
Trachea	NS	53.4	114
Uterus	112	408	359
Uveal tract	31.2	147	176
Foetal brain	BLQ	BLQ	19.1
Foetal heart	BLQ	BLQ	12.2
Foetal liver	BLQ	10.1	36.1
Foetal lung	BLQ	BLQ	15.3
Foetal skin	BLQ	BLQ	27.6

[1]plasma concentration determined by liquid scintillation counting

[a]The list represents the three major organs: liver, kidney, lung and 15 organs/tissues with the highest observed radioactivity. Plasma and blood are added for comparison.

Additional information:

BLQ Below limit of quantification (5.21 ng eq/mL)

NS Tissue not sectioned

The following organs and tissues were analysed but not listed in the table above: Adrenal cortex, Bone marrow, Brain, Brown fat, Caecum mucosa, Harderian gland, Large intestine mucosa, Muscle, Nasal mucosa, Ovary, Pineal body, Pituitary salivary glands, Skin, Spinal cord, Spleen, Stomach mucosa (fundus and non-fundic), Thymus and White fat.

2.6.5.7.B [^{3}H]Oct-セマグルチド: 乳汁試験 - 213315 **Location in CTD: 4.2.2.5**

Study ID:	**213315**			
Species/strain:	Rat/Sprague Dawley			
Gender (M/F) / Number of animals:	F/18 (3 per sampling time)			
Feeding condition:	Fed			
Vehicle/Formulation:	0.3 mg /mL; in aqueous solution containing disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL); phenol (5.50 mg/mL); pH 7.4			
Method of Administration:	Subcutaneous			
Dose:	0.30 mg/kg (60 MBq/kg)			
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide			
Sample:	Milk, plasma and whole blood			
Analyte	[^{3}H]Oct-semaglutide			
Assay:	Liquid Chromatography; Radiochemical detection; Liquid scintillation counting			
Sampling time:	Predose, 6, 12, and 24 hours			
Time:	**Pre-dose**	**6 hours**	**12 hours**	**24 hours**
Concentration:	**Mean nmol eq/g (n=3)**			
Milk:	0.000	0.034	0.091	0.090
Plasma:	0.000	0.407	0.419	0.290
Blood	0.000	0.207	0.190	0.155
Reconstituted plasma	0.000	0.411	0.402	0.293
Reconstituted milk	0.000	0.049	0.116	0.209
Milk / plasma:	NA	0.084	0.233	0.310
Blood / plasma:	NA	0.509	0.453	0.536
Reconstituted plasma / plasma	NA	1.01	0.960	1.01

Additional Information:
NA – not applicable
Due to animal welfare and poor milk production in the animals, the study was terminated after 24 hours

2.6.5.7.C ミクロオートラジオグラフィー試験 – 210018

A microautoradiography study (Study ID 210018) has been completed as part of the investigations of mechanisms causing adverse effects on rat embryo-foetal development. This study is further described in Module 4.2.3.7.3 “Embryotoxicity findings in rats: Assessment of human relevance - Section 5.4.1”.

2.6.5.8 その他の分布試験

No other distribution studies have been performed.

2.6.5.9 *In vivo* 代謝

Test Article: Semaglutide

2.6.5.9.A [^{3}H]Oct-セマグルチド: マウス血漿中代謝物プロファイリング –210299, 210171

Location in CTD: 4.2.2.4

Study ID:	**210299 and 210171**
Species/strain:	CD-1 mice
Gender (M/F) / Number of animals:	18 M + 18 F
Feeding condition:	Fed
Formulation/Vehicle:	0.08 mg/mL in aqueous solution containing disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL); phenol (5.50 mg/mL); pH 7.4.
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose (mg/kg):	0.4 mg/kg (40.5 MBq/kg)
Test compound:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Specific Activity:	2.9 mCi/mg (107.3 MBq/mg)
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection; Liquid scintillation counting
Sampling time:	1, 3, 6, 12, 24 and 36 hours

Species	**Sample**	**Sampling Period**	**Compound in % of total AUC (water excl)**	
			Parent (P8)	**Most abundant metabolite (P9)**
Mouse (male)	Plasma	1-36 h	83%	4.8%
Mouse (female)	Plasma	1-36 h	83%	4.6%

Additional Information:

A total of thirteen peaks (P1 to P13) were detected in both males and females. The first peak (P1) was tritiated water as it was shown to be volatile and disappeared from plasma after freeze drying of the sample and is thus not regarded being a true primary metabolite. Therefore, the AUC for P1 was subtracted when calculating exposure estimates (% of compound based on AUC) for the other peaks. The exposures of the individual minor metabolites (P2 to P7 and P10 to P13) were found to be in the range of 0.1-5% (based on $AUC_{0\text{-}36h\ –\ excl.\ P1}$ levels)

2.6.5.9.B [^{3}H]Tyr-セマグルチド: ラット血漿中代謝物プロファイリング - 207044 **Location in CTD: 4.2.2.4**

Study ID:	**207044**
Species/strain:	Rat/Wistar
Gender (M/F) / Number of animals:	10 Males
Feeding condition:	Fed
Formulation/Vehicle:	1.0 mg/mL in an aqueous vehicle of 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.50 mg/mL phenol and approx. pH 7.5
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose (mg/kg):	0.30 (16 MBq/kg)
Test compound:	[^{3}H]Tyr-semaglutide
Sample:	Plasma
Specific Activity:	220 GBq/mmol
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection; Liquid scintillation counting
Sampling time:	2-72 hours

Species	**Sample**	**Profiling of samples**	**% of Dose in sample**	**Compound in % of AUC (water excl.) (total radioactivity AUC_{0-48h})**	
				Parent	**P2**
Rat	Plasma	2-72 hours	N/A	93.1	6.9

Additional Information:

A total of three peaks were detected in both male rats. The first peak (P1) was tritiated water as it was shown to be volatile and disappeared from plasma after freeze drying of the sample and is thus not regarded being a true primary metabolite. Therefore, the AUC for P1 was subtracted when calculating exposure estimates (% of compound based on AUC) for the other peaks.

2.6.5.9.C [^{3}H]Oct-セマグルチド: ラット血漿中代謝物プロファイリング – 207347 **Location in CTD: 4.2.2.4**

Study ID:	**207347**
Species/strain:	Rat/Wistar
Gender (M/F) / Number of animals:	5 M/5 F (one pr. time point)
Vehicle/Formulation:	0.1 mg/mL in an aqueous solution of 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.50 mg/mL phenol and pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose:	0.30 (10 MBq/kg)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Sample:	Plasma obtained from study 207264
Specific Activity:	136 GBq/mmol
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection
Sampling time:	2, 12, 24, 48 and 72 hours

	Sample	**Profiling of samples**	**Compound in % of total AUC (water excl.) (total radioactivity $AUC_{0\text{-}72\ excl.\ P1}$)**										
			Parent	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Rat, male	**Plasma**	2-72 hours	71	3	5	3	2	6	7	1	1	< 1	1
Rat, female			67	6	7	5	3	5	4	1	1	< 1	1

Additional Information:

A total of twelve peaks were detected in both male rats. The first peak (P1) was tritiated water as it was shown to be volatile and disappeared from plasma after freeze drying of the sample and is thus not regarded being a true primary metabolite. Therefore, the AUC for P1 was subtracted when calculating exposure estimates (% of compound based on AUC) for the other peaks.

2.6.5.9.D [^{3}H]Oct-セマグルチド: 尿中、糞中及び胆汁中代謝物プロファイリング - 208008 **Location in CTD: 4.2.2.4**

Study ID:	**208008**
Species/strain:	Rat/Wistar
Gender (M/F) / Number of animals:	3 M/3 F (urine and faeces), 3 M/2 F (bile)
Vehicle/Formulation:	0.1 mg/mL (3.4 MBq/mL)in aqueous solution containing disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL); phenol (5.50 mg/mL); pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose:	0.30 mg/kg (10 MBq/kg)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Sample:	Urine, faeces and bile (obtained from study 207265/ 2.6.5.13)
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection

Species	**Sample**	**Profiling of samples**	**Amount of drug related material in % of dose (%)**	**Compound in % of dose (%)**				
				Number of components	**Semaglutide***	**Most abundant metabolite**	**Second most abundant metabolite**	**Front peak**
Rat, male	Urine	0-120 hours	31	6	ND	2.4 (U7)	1.7 (U2)	25.5 (U1)
	Faeces	0-120 hours	26	14	1.4 (F9)	3.2 (F14)	3.0 (F3)	4.0 (F1)
	Bile	0-72 hours	43	13	12.8 (B13)	4.1 (B10)	4.0 (B11)	4.2 (B1)
Rat, female	Urine	0-120 hours	34	8	0.6% (U8)	3.9 (U7)	1.4 (U6)	24.2 (U1)
	Faeces	0-120 hours	24	13	0.8 (F9)	3.2 (F6)	2.6 (F7)	4.3 (F1)
	Bile	0-72 hours	48	11	14.6 (B13)	4.5 (B11)	4.3 (B9)	3.1 (B1)

Additional Information:

Peaks in the metabolite profiles were named by a letter code and a number. The prefix U, F and B represents the matrix (urine, faeces and bile). The front peak was tritiated water as it was shown to be volatile and disappeared from plasma after freeze drying of the sample and is thus not regarded being a true primary metabolite.

Bile was obtained from a separate group of bile-cannulated rats.

ND= not detected.

*Expected to be semaglutide based on similar retention times.

2.6.5.9.E [^{3}H]Oct-セマグルチド: ラット血漿中代謝物プロファイリング – 213526

Location in CTD: 4.2.2.4

Study ID:	**213526**
Species/strain:	Rat/Sprague Dawley
Gender/ No. of animals:	Group A: 4 M/4 F (one pr. time point), Group B: 7 M/7 F (one pr. time point)
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	0.04 mg/mL (16 MBq/mL) in an aqueous solution of 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.50 mg/mL phenol and pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose (mg/kg):	0.04 mg/kg/day (16 MBq/kg/day)
Sample:	Plasma (samples from study 213316/2.6.5.3.C)
Analyte	[^{3}H]Oct-semaglutide
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection
Sampling time:	Group A: 0, 6, 12 and 24 hours / Group B: 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours

Days of Adm.	PK	Sex	Sema-glutide	P1 Water	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	Total (water incl)	Total (no water)
1	C_{max} (nmol/L)	M	61	5	2	3	-	<1	1	2	-	<1	2	-	<1	-	<1	72	68
Gr. A		F	66	5	2	1	<1	<1	3	2	<1	<1	2	<1	<1	-	<1	77	74
	T_{max} (h)	M	6	24	12	12	-	24	12	6	-	12	6	-	6	-	6	12	6
		F	6	24	24	12	24	24	6	6	24	24	6	24	24	-	12	6	6
	T_{last} (h)	M	24	24	24	24	-	24	12	24	-	12	24	-	12	-	12	24	24
		F	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	-	12	24	24
	AUC_{last}	M	1090	59	33	39	-	4	4	24	-	8	16	-	4	-	3	1350	1240
	(nmol*h/L	F	1050	64	10	20	6	7	36	25	2	15	28	2	4	-	<1	1330	1210
5	C_{max} (nmol/L)	M	71	23	5	4	2	1	3	2	<1	2	2	1	-	2	<1	114	89
Gr. B		F	92	23	5	5	1	1	3	2	<1	2	2	-	<1	2	<1	129	107
	T_{max} (h)	M	12	12	6	6	12	-	6	6	12	6	12	24	-	6	6	12	6
		F	6	24	12	12	24	12	12	12	12	24	6	-	12	24	6	6	6
	T_{last} (h)	M	96	96	24	24	12	24	24	24	12	24	24	24	-	48	6	96	96
		F	96	96	24	48	24	24	24	48	12	48	24	-	24	24	6	96	96
	AUC_{last}	M	1970	1840	95	73	6	22	51	40	2	32	25	7	-	25	3	4450	2530
	(nmol*h/L)	F	2410	1930	72	113	7	25	47	51	4	57	20	-	10	9	1	4950	2930
	T½ (h)	M	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	11
		F	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	9

Additional Information: P1 is considered to be tritiated water

2.6.5.9.F [^{3}H]Oct-セマグルチド: サル血漿中、尿中及び糞中代謝物プロファイリング – 209041

Location in CTD: 4.2.2.4

Study ID:	**209041**
Species/strain:	Monkey/Cynomolgus
Gender (M/F) / Number of animals:	3 M
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	0.015 mg/mL (ca. 7.5 MBq/mL) in an aqueous vehicle containing disodium hydrogen phosphate (1.2 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL), phenol (5.5 mg/mL), pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose (mg/kg):	0.03 mg/kg (15 MBq/kg)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Sample:	Plasma, urine and faeces from study 208349 (2.6.5.13.B)
Assay:	Liquid Chromatography; Radiochemical detection; Liquid scintillation counting
Sampling time:	Plasma profiling: 2, 12, 24, 48, 72, 96 and 168 hours, Urine and faeces: 0-216 hours

Species	**Sample**	**Sampling Time or Period**	**% of Dose in sample**	**Compound in % of total AUC (water excl.)**			
				Parent		**Most abundant metabolite**	**2nd most abundant metabolite**
Cynomolgus monkey (M)	**Plasma**	0.5-168 h	NA	71% (P3)		17% (P2)	9% (P4)
				Fraction of dose in sample (%)			
				Parent	**Front peak***	**Most abundant metabolite**	**2nd. Most abundant metabolite**
	Urine	0-216 h	22%	NA.	13% (U1)	4.9 (U4)	2.6 (U3)
	Faeces	0-216 h	10%	0.6% (F9)	7% (F1)	0.5 (F6)	0.4 (F5)

NA= not applicable

Additional Information:

The metabolite P2 is expected to contain more than one component

6 components were detected in plasma, 9 components were detected in urine and 15 in faeces

* The front peak is tritiated water as it was volatile and disappeared after freeze drying of the sample and is thus not regarded being a metabolite.

2.6.5.9.G [^{3}H]Oct-セマグルチド: ヒト血漿中代謝物プロファイリング - 213363

Location in CTD:
5.3.3.1, Appendix 16.1.10

Study ID:	**213363**
Species/strain:	Human
Gender (M/F)/ Number of subjects:	7 Male subjects
Vehicle/Formulation:	1.0 mg/mL in an aqueous solution of 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.50 mg/mL phenol and approx. pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose:	0.5 mg per subject (ca. 450µCi)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Sample:	Plasma (samples obtained from trial 3789)
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection

Compound	**C_{max} (nmol/L)**	**t_{max} (h)**	**AUC_{last} (nmol*h/L)**	**t_{last} (h)**	**$t_{½}$ (h)**	**Metabolite in % of total AUC (%)**
P1	0.10	168	13	240	-	0.37
P2	0.38	240	134	672	-	3.90
P3	1.23	96	264	672	-	7.68
P4 (semaglutide)	8.64	72	2840	840	166	82.6
P5	0.22	240	67	672	-	1.94
P6	0.50	96	106	672	-	3.09
P7	0.16	240	33	504	-	0.95
Total	10.21	48	3437	840	153	100.0

Additional Information:
Peaks in the metabolite profiles were named by a letter code and a number. The prefix P represents the matrix (plasma).

2.6.5.9.H [^{3}H]Oct-セマグルチド: ヒト尿中及び糞中代謝物プロファイリング - 213363

Location in CTD:
5.3.3.1, Appendix 16.1.10

Study ID:	**213363**
Species/strain:	Human
Gender (M/F)/ Number of subjects:	7 Male subjects
Vehicle/Formulation:	1.0 mg/mL in an aqueous solution of 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.50 mg/mL phenol and approx. pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose:	0.5 mg per subject (ca. 450µCi)
Radionuclide:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Sample:	Urine and faces (samples obtained from trial 3789)
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection

Compound	**Urine***		**Faeces**	
	Metabolite No.	**% of dose**	**Metabolite No.**	**% of dose**
	U6	13.81	F1	0.30
	U7	14.20	F2	0.67
	U9	1.01	F3	0.57
	U10	0.96	F4	0.71
	U12	1.78	F5	0.68
	U22 (semaglutide)	3.12	F6	1.49
			F7	0.11
	Total	37.64	Total	4.53

Additional Information:

* In urine, 22 components were quantified, only metabolites present in amount higher than 1% of dose are shown in this table.

Peaks in the metabolite profiles were named by a letter code and a number. The prefix U represents urine and F faeces.

2.6.5.9.I ヒト尿中及び糞中代謝物同定 - 214379 **Location in CTD: 5.3.2.3**

Study ID:	**214379** (samples collected from trial 3789, M.5.3.3.1, Appendix 16.1.10)
Species:	Human
Gender:	7 male subjects
Formulations:	1.0 mg/mL in an aqueous solution of 1.42 mg/mL disodium hydrogen phosphate, 14.0 mg/mL propylene glycol, 5.50 mg/mL phenol and approx. pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose:	0.5 mg (ca. 450 µCi) per subject
Sampling times:	Plasma and urine collected 96 and 192-216 h post dose, respectively
Assays/Methods:	Analysis of HPLC fractions of biological samples with UPLC-MS and UPLC-RAM, and processing of mass spectrometry data with MassLynx v4.1 SCN851 software for calculation of the mono isotopic molecular weights

Biological sample	Biological components	[A]Mass of ion (g/mol)	[B]Type of ion	[C]Mass of neutral molecule (g/mol)	Proposed chemical formula	Mass of chemical formula (g/mol)	Mass Accuracy (ppm)
Plasma	**Semaglutide (P4)**	4112.1328	$[M+H]^+$	4111.1255	$C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$	4111.1154	2.5
		4165.0454	$[M-2H^++Fe^{3+}]^+$	4111.1251			2.4
	P3B	2716.5317	$[M+H^+]^+$	2715.5244	$C_{126}H_{206}N_{30}O_{36}$	2715.5211	1.2
		2769.4463	$[M-2H^++Fe^{3+}]^+$	2715.5260			1.8
	P3C-I	4112.1187	$[M+H^+]^+$	4111.1114	$C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$	4111.1154	-1.0
	P3C-II	4112.1167	$[M+H^+]^+$	4111.1094			-1.5
	P3C-III	4112.1250	$[M+H^+]^+$	4111.1177			0.6
		4165.0259	$[M-2H^++Fe^{3+}]^+$	4111.1056			-2.4
Urine	**Semaglutide (U22)**	4112.1191	$[M+H]^+$	4111.1118	$C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$	4111.1154	-0.9
		4165.0273	$[M-2H^++Fe^{3+}]^+$	4111.1070			-2.0
	U6	666.3265	[M+H+]+	665.3192	$C_{27}H_{47}N_5O_{14}$	665.3120	10.8
	U7	694.3484	[M+H+]+	693.3411	$C_{29}H_{51}N_5O_{14}$	693.3432	-3.0

[A]Monoisotopic masses of ions from UPLC-MS-peaks with matching retention times to UPLC-RAM-peaks (peaks in radio chromatogram)

[B]The monoisotopic masses of H^+ (1.0073) and Fe^{3+} (55.9349 g/mol) were used in the calculation of M

[C]Obtained monoisotopic mass in neutral state (M) = *m/z* value x charge - mass of H^+ or $[Fe^{3+} - 2H^+]$

2.6.5.10 *In vitro* 代謝

Test Article: Semaglutide

Location in CTD: 5.3.2.2

2.6.5.10.A [^{3}H]Tyr-セマグルチド: 肝細胞における代謝 - 206642

Study ID:	**206642**		
Species/strain:	Hepatocytes: Rat / Wistar Monkey / Cynomolgus Human		
Dose:	10nM and 1000 nM (37 kBq/mL)		
Radionuclide:	[^{3}H]Tyr-semaglutide		
Analyte	[^{3}H]Tyr-Semaglutide		
Assay:	Liquid Chromatography followed by radiochemical detection		
Sampling time:	4 and 24 hours		
Species	**Rat**	**Monkey**	**Human**
Time (h)	4 and 24	4 and 24	4 and 24
Concentrations (nM)	10 and 1000	10 and 1000	10 and 1000
Compounds (% of total concentration)*			
Semaglutide	>99	100	100
H1	<1	ND	ND

Additional Information:

*Based on total peak areas in HPLC radiochromatograms following subtraction of control values.

ND = not detected.

High metabolic stability was observed at both tested concentrations. In human and monkey incubations no metabolites could be detected and in the rat hepatocyte incubations one peak was detected at a very low level.

2.6.5.10.B [^{3}H]Oct-セマグルチド: 肝細胞における代謝物プロファイリング及び種間比較 - 214064

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID:	**214064**
Species/strain:	Cryopreserved pooled hepatocytes: Sprague Dawley rat (male), Cynomolgus monkey (male), Not applicable human, mixed
Dose:	10 nM (0.011MBq/mL) and 1000 nM (0.067 MBq/mL))
Analyte:	[^{3}H]Oct-semaglutide
Assay:	Liquid Chromatography; Radiochemical detection
Sampling time:	4 hours

Peak/Region	Retention time interval (min)	Rat	Monkey	Human
H1*	3.53	+	ND	ND
H2	34.67	+	ND	ND
H3	35.60-35.73	+	ND	+
H4	36.07	+	ND	ND
H5	37.20	+	ND	ND
H6	38.07	+	ND	+
H7	39.27	+	ND	ND
H8**	39.93	+	+	+
H9 (semaglutide)	41.20-41.27	+	+	+
H10	43.07	+	ND	ND

ND = not detected,
*expected to be tritiated water
** impurity, not of metabolic origin
*** no metabolites were observed in the 10 nM incubations

2.6.5.10.C NEP とのインキュベーション後に *in vitro* で生成されたセマグルチド代謝物の同定 - 215514

Location in CTD: 5.3.2.3

Study ID:	**215514**
Species:	Human
Test System:	Neutral endopeptidase 24.11 (NEP; Neprilysin)
Concentrations and buffer:	5 µM semaglutide and 25 µg/mL NEP in 40 mM potassium phosphate, pH 7.2
Assays/Methods:	Incubation with NEP (6 and 24h) and analysis with UPLC-MS and processing of mass spectrometry data with GPMAW v9.51 software for matching of molecular masses (*m/z* values) to masses of proteolytic products from semaglutide

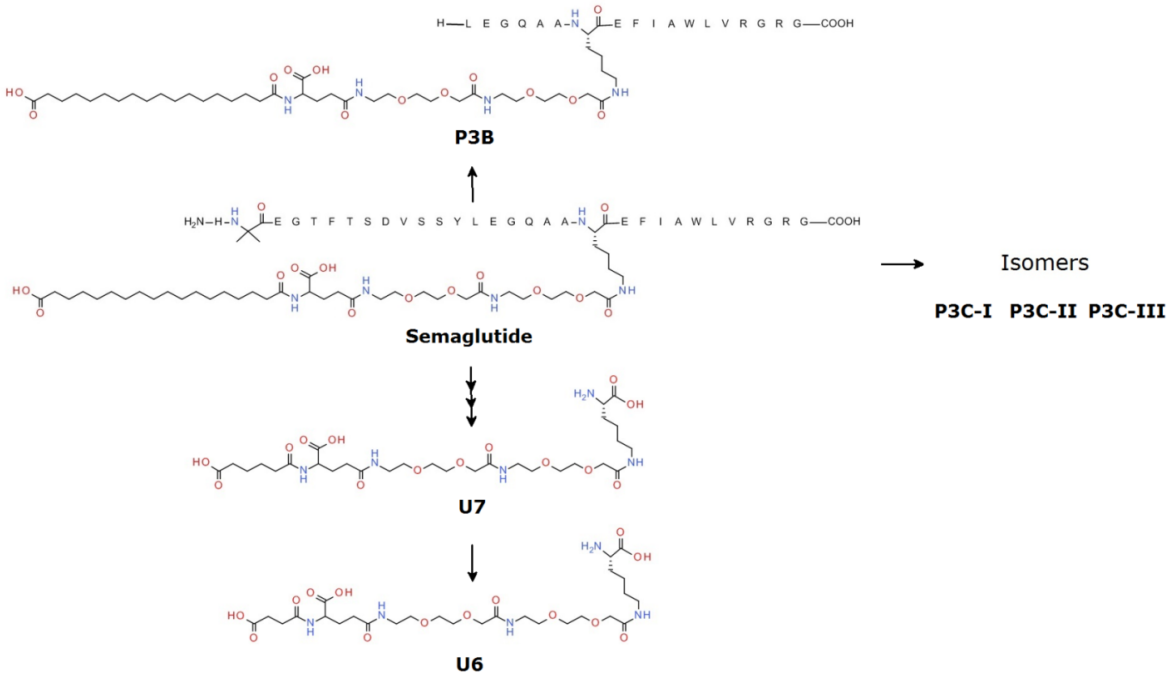
Time (h)	**Observed *m/z* value**	**[A]Type of ion**	**Obtained mass (g/mol)**	**Matched mass (g/mol)**	**Mass accuracy (ppm)**	**Peptide sequences of formed metabolites**																														
						7	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**
6	1158.5759	$[M+3H^+]^{3+}$	3472.7058	3472.7178	3.5	H	**X**	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	***K**	E	F	I	A	W						
6	986.1599	$[M+3H^+]^{3+}$	2955.4578	2955.4489	-3.0	H	**X**	E	G	T	F	T	S	D	V	S	S	Y	L	E	G	Q	A	A	***K**	E									
6	960.5378	$[M+3H^+]^{3+}$	2878.5915	2878.5844	-2.5													Y	L	E	G	Q	A	A	***K**	E	F	I	A	W	L	V	R	G	R	G
6	906.1758	$[M+3H^+]^{3+}$	2715.5055	2715.5211	5.7														L	E	G	Q	A	A	***K**	E	F	I	A	W	L	V	R	G	R	G
24	936.0005	$[M+2H^+]^{2+}$	1869.9864	1869.9863	-0.1													Y	L	E	G	Q	A	A	***K**	E	F									
24	862.4724	$[M+2H^+]^{2+}$	1722.9302	1722.9179	-7.1													Y	L	E	G	Q	A	A	***K**	E										
24	[B]854.4684	$[M+2H^+]^{2+}$	1706.9222	1706.9230	0.5														L	E E	G G	Q Q	A A	A A	***K** ***K**	E E	F F	I									
24	780.9377	$[M+2H^+]^{2+}$	1559.8608	1559.8546	-4.0														L	E	G	Q	A	A	***K**	E										
24	[B]1318.7419	$[M+H^+]^+$	1317.7346	1317.7279	-5.1															E	G G	Q Q	A A	A A	***K** ***K**	E										
24	1133.6533	$[M+H^+]^+$	1132.6460	1132.6479	1.7																		A	A	***K**	E										
24	1209.6895	$[M+H^+]^+$	1208.6822	1208.6792	-2.5																			A	***K**	E	F									
24	1138.6545	$[M+H^+]^+$	1137.6472	1137.6421	-4.5																				***K**	E	F									
24	1062.616	$[M+H^+]^+$	1061.6087	1061.6108	2.0																			A	***K**	E										
24	991.5803	$[M+H^+]^+$	990.5730	990.5736	0.6																				***K**	E										
24	933.5721	$[M+H^+]^+$	932.5648	932.5682	3.6																			A	***K**											
24	665.3356	$[M+H^+]^+$	664.3283	664.3221	-9.3																					E	F	I	A	W						
24	536.2881	$[M+H^+]^+$	535.2808	535.2795	-2.4																						F	I	A	W						

***K** = Lys^{26} with intact ADO-linker and **X** = Aib

[A]The most abundant ions in the MS spectra

[B]*m/z* values with two matching peptide sequences

2.6.5.11 推定代謝経路



Metabolites identified in human plasma and urine. Semaglutide was metabolised by proteolytic cleavages of the peptide backbone with sequential beta-oxidation of the di-fatty acid side chain. ADO-linker excreted in urine as metabolites.

2.6.5.12 薬物代謝酵素誘導／阻害

Test Article: Semaglutide

No studies have been conducted.

2.6.5.13 排泄

Test Article: Semaglutide

2.6.5.13.A 単回皮下投与時の雌雄ラットにおける[^{3}H]Oct-セマグルチドの排泄 – 207265

Location in CTD: 4.2.2.5

Study ID:	**207265**				
Species/strain:	Rat/Wistar,				
Gender (M/F) / Number of animals:	3 male and 3 female in Group A				
Feeding condition:	Fed				
Vehicle/Formulation:	0.1 mg/mL (3.4 Mbq/mL) in an aqueous solution of disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL) and phenol (5.5 mg/mL) at a pH of 7.4.				
Method of Administration:	Subcutaneous				
Dose:	0.3 mg/kg (10 MBq/kg)				
Analyte:	[^{3}H]Oct-semaglutide				
Sample:	Urine/Faeces/Expired air				
Assay:	Liquid Scintillation Counting				
Sampling time:	0-168 hours				
Excretion route (%), male	**Urine**	**Faeces**	**Expired air**	**Other**	**Total**
0-24 h	3.71	0.03	0.15	0.48[b]	**4.4**
0-168 h	35.63	32.63	0.15[a]	26.10[c]	**94.5**
Excretion route (%), female					
0-24 h	3.79	0.05	0.16	0.42[b]	**4.4**
0-168 h	39.01	36.32	0.16[a]	26.1[c]	**101.6**

Additional information:

Numbers have been rounded to two digits.

[a]Expired air was only collected 0-24 h

[b]Cage wash

[c]Including cage wash, cage debris and carcass

Excretion into bile has also been investigated (Table 2.6.5.14). Biliary elimination was confirmed to be a main source for metabolite excretion as biliary excretion was found to be a major route of elimination in bile-cannulated rats.

2.6.5.13.B 雄性カニクイザルにおける[^{3}H]Oct-セマグルチドの排泄 - 208349

Location in CTD: 4.2.2.5

Study ID:	**208349**						
Species/strain:	Monkey/Cynomolgus						
Gender (M/F) / Number of animals:	3 M						
Feeding condition:	Fed						
Vehicle/Formulation:	0.015 mg/mL (7.5 MBq/mL) in an aqueous vehicle containing disodium hydrogen phosphate (1.2 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL), phenol (5.5 mg/mL), pH 7.4						
Method of Administration:	Subcutaneous						
Dose (mg/kg):	0.03 mg/kg (15 MBq/kg)						
Sample:	Urine, Faeces, Cage Wash						
Analyte:	[^{3}H]Oct-semaglutide						
Assay	Liquid Scintillation Counting						
Sampling time:	0-336 hours						
Excretion route (% of administered dose, mean)	**Total Radioactivity (Wet samples)**				**Total Radioactivity (Freeze dried samples)**		
	Urine	**Faeces**	**Cage Wash**	**Total**	**Urine**	**Faeces**	**Total**
Time							
0-24 h	0.598	0.089	0.195	0.88	0.417	0.084	0.501
0-168 h	16.81	12.04	2.74	31.59	8.769	11.03	19.80
0-336 h	30.33	20.67	7.19 [a]	58.20	13.14	17.75	30.89

Additional Information:

Significant levels of volatile tritium components (e.g. tritiated water) were observed in urine and to a less extend in faeces (evaluated by comparing figures for wet and freeze dried samples).

LSC = liquid scintillation counting

[a]Includes final cage wash and cage debris measured after 336 h

2.6.5.14 胆汁中排泄

Test Article:Semaglutide

2.6.5.14.A 胆汁カニュレーション施行ラットに単回皮下投与時の[^{3}H]Oct-セマグルチドの排泄 - 207265

Location in CTD: 4.2.2.5

Study ID:	**207265**				
Species/strain:	Rat/Wistar,				
Gender (M/F) / Number of animals:	6 male and 6 female (to ensure data from at least three of each sex), Group B				
Feeding condition:	Fed				
Vehicle/Formulation:	0.1 mg/mL (3.4 MBq/mL) in a aqueous solution of disodium hydrogen phosphate dihydrate (1.42 mg/mL), propylene glycol (14.0 mg/mL) and phenol (5.5 mg/mL), pH of 7.4.				
Method of Administration:	Subcutaneous				
Dose :	0.3 mg/kg (10 MBq/kg)				
Analyte:	[^{3}H]Oct-semaglutide				
Sample	Urine, Faeces and Bile				
Assay	Liquid Scintillation counting*				
Sampling time	0-96 hours				
Excretion route (%), Male	**Urine**	**Faeces**	**Bile**	**Other**	**Total**
0-24 h	2.66	0.04	18.39	1.04[a]	22.13
0-96 h	29.91	2.77	45.65	24.77[b]	103.1
Excretion route (%), Female					
0-24 h	3.56	0.02	17.02	0.72[a]	21.32
0-96 h	36.65	2.06	50.98	13.73[b]	104.0

Additional information:
Numbers have been rounded to two digits
[a]Cage wash
[b]Final cage wash, cage debris and carcass.
*The percentage difference after freeze drying samples, showed there was significant evaporation of volatile tritium in urine samples, increasing from 5.5% at 12 h to 87.5% at 72 h. Bile and faeces samples do not appear to contain significant levels of volatile tritium components excluding the 24 h faeces samples (ca 29%).

2.6.5.15 薬物相互作用

Test Article: Semaglutide

2.6.5.15.A ラットにおける CYP 誘導 - 208501

Location in CTD: 4.2.2.6

Study ID:	**208501**
Species/strain:	Rat/CD
Gender (M/F) / Number of animals:	5M/5F per dose group
Method of Administration:	Subcutaneous
Sample.	Liver (samples obtained from 26-Week toxicity study; 207377, 2.6.5.4.I)
Type of study:	Effect on Hepatic Levels of Cytochrome P450 and Related Parameters in the Male and Female CD Rat after subcutaneous injection administration at 0, 0.03, 0.13 and 0.6 mg/kg/day for at least 26 weeks
Dose (mg/kg/day)	0; 0.03; 0.13; 0.6
Method:	This study was designed to investigate the effect of subcutaneous injection administration of semaglutide on hepatic cytochrome P450 (CYP) CYP1A, CYP2B, CYP2E, CYP3A and CYP4A and related parameters in the male and female CD rat. Frozen liver samples were obtained from a separate study in which groups of male and female CD rats were dosed with semaglutide by subcutaneous injection at dose levels of 0 (control), 0.03, 0.13 and 0.6 mg/kg/day for at least 26 weeks. Liver portions from all animals (5 animals/sex/treatment level) were thawed and homogenised. A microsomal subcellular fraction was prepared from each liver homogenate by differential centrifugation. The prepared fractions were stored as aliquots at *ca* -75°C until used for the measurement of the following parameters: microsomal protein and cytochrome P450 concentrations, and the activities of 7-ethoxyresorufin O-deethylase (CYP1A), 7-pentoxyresorufin O-dependentylase (CYP2B), various testosterone metabolising enzymes (for predominantly CYP3A and also CYP2C) and lauric acid 11- and 12-hydroxylase (CYP2E and CYP4A, respectively).

Tabulated results:

Summary Table Males

Data are group mean results expressed as a fraction of the corresponding control group mean.

Biomarker	Parameter	Semaglutide (mg/kg/day)		
		0.03	0.13	0.6
NA	Microsomal protein -(mg/g liver)	 1.0	 1.1	 1.2*
NA	Cytochrome P450 - (nmoles/mg protein) - (nmoles/g liver)	 1.1 1.0	 1.1 1.2	 1.0 1.2

CYP1A	7-Ethoxyresorufin O-deethylase			
	- (nmoles/min/mg protein)	1.1	1.2	1.3**
	- (nmoles/min/g liver)	1.1	1.3	1.5**
CYP2B	7-Pentoxyresorufin O-depentylase			
	- (nmoles/min/mg protein)	1.0	1.1	1.2
	- (nmoles/min/g liver)	1.0	1.2	1.4
CYP3A	Testosterone 6β-hydroxylase			
	- (nmoles/min/mg protein)	1.5	1.4	1.6*
	- (nmoles/min/g liver)	1.4	1.5	1.8*
CYP2C11	Testosterone 16α-hydroxylase			
	- (nmoles/min/mg protein)	0.8	1.0	0.9
	- (nmoles/min/g liver)	0.8	1.1	1.0
CYP2C11	Testosterone 2α- (+ 2β-) hydroxylases[1]			
	- (nmoles/min/mg protein)	0.9	1.0	0.9
	- (nmoles/min/g liver)	0.8	1.1	1.1
CYP2B, 2C11	Testosterone 17β-dehydrogenase			
	- (nmoles/min/mg protein)	0.9	1.0	0.9
	- (nmoles/min/g liver)	0.9	1.1	1.1
CYP2E	Lauric acid 11-hydroxylase			
	- (nmoles/min/mg protein)	1.3*	1.3*	1.2*
	- (nmoles/min/g liver)	1.2	1.4*	1.4*
CYP4A	Lauric acid 12-hydroxylase			
	- (nmoles/min/mg protein)	1.7	1.4	1.1
	- (nmoles/min/g liver)	1.6	1.6	1.3

*	Significance level of comparison with control, using Williams' test: $p<0.05$
**	Significance level of comparison with control, using Williams' test: $p<0.01$
[1]	Predominantly 2α-, where quantifiable
NA	Not applicable

Tabulated results:

Summary Table Females

Data are group mean results expressed as a fraction of the corresponding control group mean.

Biomarker	Parameter	Semaglutide (mg/kg/day)		
		0.03	**0.13**	**0.6**
NA	Microsomal protein - (mg/g liver)	 1.1	 1.2	 1.3**
NA	Cytochrome P450 - (nmoles/mg protein) - (nmoles/g liver)	 1.0 1.2	 1.0 1.2	 1.1 1.5**
CYP1A	7-Ethoxyresorufin O-deethylase - (nmoles/min/mg protein) - (nmoles/min/g liver)	 1.2 1.4	 1.1 1.3	 1.3* 1.7**
CYP2B	7-Pentoxyresorufin O-depentylase - (nmoles/min/mg protein) [1] - (nmoles/min/g liver)	 1.0 1.1	 0.8 1.0	 1.1 1.4
CYP2A	Testosterone 7α-hydroxylase - (nmoles/min/mg protein) - (nmoles/min/g liver)	 1.0 1.1	 1.1 1.3	 1.1 1.5*
CYP2E	Lauric acid 11-hydroxylase - (nmoles/min/mg protein) - (nmoles/min/g liver)	 1.3* 1.4*	 1.2* 1.4*	 1.2* 1.6**
CYP4A	Lauric acid 12-hydroxylase - (nmoles/min/mg protein) - (nmoles/min/g liver)	 1.3 1.5	 1.4 1.7*	 1.3 1.7*

* Significance level of comparison with control, using Williams' test: $p<0.05$

** Significance level of comparison with control, using Williams' test: $p<0.01$

NA Not applicable

Additional Information:

In conclusion, the data obtained following subcutaneous administration of semaglutide at 0.03, 0.13 and 0.6 mg/kg/day to male and female rats for at least 26 weeks indicated increases in the parameters measured on this study. There was evidence in male animals that semaglutide was acting as a weak inducer of CYP1A and CYP3A at the top dose, only, whilst CYP2E was weakly induced at all treatment levels. In females, there was minor induction of CYP1A, CYP2A, CYP2E and CYP4A. The effects were apparently dose-related for all parameters except for CYP2E activity, but in all cases the increases seen were <2-fold compared to the dose vehicle control. There were no apparent effects on CYP2B activity in either male or female rats as a consequence of semaglutide administration.

2.6.5.15.B セマグルチドによるヒト CYP 酵素の *in vitro* 誘導 - 215048

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID:	**215048**
Species/strain:	Cryopreserved human hepatocytes (CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4)/2F/1M Caucasian
Dose µM	0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 5, 10, and 15 µM
Inhibitor	Semaglutide
Type of study:	*In Vitro* Evaluation of semaglutide as an Inducer of Cytochrome P450 Expression in Cultured Human Hepatocytes
Objective:	To investigate the effects of treating primary cultures of cryopreserved human hepatocytes with semaglutide on the expression of cytochrome P450 (CYP) enzymes, hepatocytes were treated with dimethyl sulfoxide, flumazenil, semaglutide or omeprazole, phenobarbital and rifampin and incubated in situ with phenacetin, bupropion and midazolam for analysis by LC-MS/MS.

Tabulated results

Sample	Mean activity (Fold change ± SD)			Mean mRNA levels (Fold change ± SD)		
	CYP1A2	**CYP2B6**	**CYP3A4/5**	**CYP1A2**	**CYP2B6**	**CYP3A4**
0.1% DMSO	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
Semaglutide 0.03 µM	1.00 ± 0.09	1.14 ± 0.14	1.11 ± 0.06	0.919 ± 0.071	1.04 ± 0.16	1.11 ± 0.15
Semaglutide 0.1 µM	0.916 ± 0.083	1.06 ± 0.07	1.06 ± 0.02	0.887 ± 0.087	1.06 ± 0.18	1.10 ± 0.07
Semaglutide 0.3 µM	0.902 ± 0.201	1.15 ± 0.45	1.06 ± 0.28	0.812 ± 0.106	0.990 ± 0.281	1.04 ± 0.22
Semaglutide 1 µM	0.920 ± 0.035	1.15 ± 0.21	1.14 ± 0.05	0.882 ± 0.083	1.06 ± 0.20	1.17 ± 0.19
Semaglutide 3 µM	0.978 ± 0.080	1.24 ± 0.22	1.21 ± 0.07	0.923 ± 0.131	1.14 ± 0.20	1.21 ± 0.20
Semaglutide 5 µM	0.947 ± 0.098	1.20 ± 0.18	1.19 ± 0.10	0.980 ± 0.113	1.10 ± 0.14	1.21 ± 0.19
Semaglutide 10 µM	0.962 ± 0.031	1.26 ± 0.14	1.20 ± 0.03	0.887 ± 0.113	1.11 ± 0.13	1.27 ± 0.23
Semaglutide 15 µM	0.913 ± 0.056	1.19 ± 0.34	1.19 ± 0.23	0.861 ± 0.275	1.05 ± 0.15	1.21 ± 0.31
Flumazenil 25 µM	0.906 ± 0.117	0.965 ± 0.134	1.03 ± 0.13	0.943 ± 0.223	0.866 ± 0.114	1.21 ± 0.44
Omeprazole 50 µM	35.6 ± 17.9	NA	NA	50.5 ± 19.2	NA	NA
Phenobarbital 750 µM	NA	8.28 ± 3.67	NA	NA	8.67 ± 2.38	NA
Rifampin 20 µM	NA	NA	11.6 ± 5.3	NA	NA	27.6 ± 18.5

Conclusion:	Little or no increase (<2.0-fold change) in CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4/5 activity and mRNA levels.

Additional Information:
NA Not applicable, SD Standard deviation,

2.6.5.15.C 肝細胞における CYP 酵素の *in vitro* 阻害 - 214196

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID:	**214196**
Species/strain:	cryopreserved human hepatocytes (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4/5)
Dose µM	0 – 40 µM
Inhibitor	Semaglutide
Assay:	LC-MS/MS

In vitro evaluation of semaglutide as an inhibitor of human CYP enzymes:

Enzyme	**Substrate**	**Direct inhibition**		**Time-dependent inhibition**		
		Zero-minute preincubation		**240-minute preincubation without NADPH**		**Potential for metabolismdependent inhibition [c]**
		IC50 (µM) [a]	**Inhibition observed at highest concentration (%) [b]**	**IC50 (µM) [a]**	**Inhibition observed at highest concentration (%) [b]**	
CYP1A2	Phenacetin	>5	NA	>5	1.8	Little or no
CYP2B6	Bupropion	>5	NA	>5	NA	Little or no
CYP2C8	Amodiaquine	>5	1.1	>5	NA	Little or no
CYP2C9	Diclofenac	>5	NA	>5	NA	Little or no
CYP2C19	S-Mephenytoin	>5	NA	>5	NA	Little or no
CYP2D6	Dextromethorphan	>5	NA	>5	NA	Little or no
CYP3A4/5	Testosterone	>40	NA	>40	NA	Little or no
CYP3A4/5	Midazolam	>40	NA	>40	NA	Little or no

Additional Information:

a) Average data (i.e., percent of control activity) obtained from duplicate samples for each test article concentration were used to calculate IC50 values. IC50 values were calculated with XLFit.

b) Inhibition observed (%) is calculated with the following formula (results are rounded to two significant figures):
Inhibition observed (%) = 100% − Percent solvent control.

b) Metabolism-dependent inhibition was determined by comparison of IC50 values both with and without preincubation and with and without NADPH-generating system present in the preincubation, by comparison of the observed inhibition (%) for all preincubation conditions and by visual inspection of the IC50 plots.

NA = Not applicable. No value was obtained as the rates at the highest concentration of semaglutide evaluated were higher than the control rates.

2.6.5.15.D ヒトトランスポーターの *in vitro* 阻害 - 215026

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID:		**215026**					
Species/strain:		Cells expressing human transporters					
Inhibitor:		Semaglutide					
Dose µM		0.05 – 10 µM					
Objective:		Semaglutide: *In Vitro* Evaluation of Semaglutide as an Inhibitor of Human P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3 and OCT2 Transporters					
Method:		Transporter activities for the evaluation of inhibition were measured by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry or liquid scintillation counting. P-gp and BCRP incubations were performed with Caco-2 and MDCKII cells, respectively. Uptake transporter incubations were performed with HEK293 cells. Probe substrates were measured in the presence of two concentrations of the test article to evaluate inhibition. Incubations were conducted in the presence and absence of BSA (0.1%). BSA was added to reduce the non-specific binding of semaglutide. Follow up IC_{50} determinations were performed for the uptake transporters OATP1B1 and OATP1B3 with seven concentration of the test article.					
Tabulated results:	**Transporter**	**Test system**	**Substrate**	**Semaglutide concentrations evaluated (µM)**	**Percent of control at highest concentration evaluated (%)**		**IC_{50} (µM)**
					Without BSA	**With BSA**	
	P-gp	Caco-2	Digoxin	0.6, 6	113	118	NA
	BCRP	MDCKII	Prazosin	0.6, 6	89.0	95.3	NA
	OATP1B1	HEK293	Estradiol glucuronide	0.5, 5	55.8	107	NA
				0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10	39.9	56.4[a]	3.50
	OATP1B3	HEK293	Estradiol glucuronide	0.5, 5	32.7	78.4	NA
				0.1, 0.3, 0.5, 1, 3, 5, 10	28.3	57.1[a]	2.95
	OAT1	HEK293	*p*-Aminohippurate	0.05, 0.5	81.8	62.7[b]	NA
	OAT3	HEK293	Estrone sulfate	0.05, 0.5	91.5	151[b]	NA
	OCT2	HEK293	Metformin	0.05, 0.5	95.9	99.3	NA
Conclusion:	Under the conditions evaluated, semaglutide is not an inhibitor of the efflux transports P-gp and BCRP, nor is it an inhibitor of the uptake transporters OCT2, OAT1 and OAT3. Semaglutide inhibited the uptake transporters OATP1B1 and OATP1B3 resulting in IC50 values of 3.50 and 2.95 µM, respectively. [a] Uptake in the presence of BSA only evaluated at highest test article concentration (10 µM).						

Additional Information:

[b] Uptake was low in the presence of BSA, possibly due to binding of the probe substrate to BSA. Inhibition evaluated only in incubations without BSA.

NA: Not applicable

2.6.5.16 その他の薬物動態試験

No other studies have been conducted.