

リベルサス錠 3mg
リベルサス錠 7mg
リベルサス錠 14mg

2.4 非臨床試験の概括評価

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	4
略語一覧	5
2.4.1 非臨床試験計画概要	7
2.4.1.1 開発アプローチ及び規制当局との交渉	8
2.4.2 セマグルチドの薬理試験	9
2.4.2.1 GLP-1 受容体作動薬の概論	9
2.4.2.1.1 GLP-1 受容体の発現	9
2.4.2.1.2 GLP-1 受容体作動薬の薬理作用	9
2.4.2.2 経口セマグルチドの薬理試験プログラム	10
2.4.2.3 効力を裏付ける試験	11
2.4.2.4 安全性薬理試験	11
2.4.2.5 薬力学的薬物相互作用	12
2.4.3 セマグルチドの薬物動態試験	12
2.4.3.1 測定法	14
2.4.3.1.1 生体試料中薬物濃度測定法	14
2.4.3.1.2 抗セマグルチド抗体の分析	15
2.4.3.2 吸収	15
2.4.3.3 分布	15
2.4.3.4 代謝	15
2.4.3.5 排泄	16
2.4.3.6 薬物相互作用	16
2.4.4 セマグルチドの毒性試験	16
2.4.4.1 一般毒性	18
2.4.4.2 遺伝毒性及びがん原性	19
2.4.4.3 生殖発生毒性	19
2.4.4.4 その他の毒性試験	19
2.4.4.4.1 局所刺激性	20
2.4.4.4.2 幼若動物を用いた試験	20
2.4.4.4.3 添加物の評価	20
2.4.4.4.4 非臨床試験と臨床試験で用いた有効成分の同等性／同質性	20

2.4.4.4.5	不純物の安全性評価	21
2.4.4.5	動物及びヒトの曝露量比較	21
2.4.5	SNAC の非臨床評価	23
2.4.5.1	吸収促進剤としての SNAC の作用	24
2.4.5.2	SNAC 及び主要代謝物の副次的及び安全性薬理試験	25
2.4.5.3	SNAC の薬物動態試験	26
2.4.5.3.1	測定法	27
2.4.5.3.2	薬物動態	27
2.4.5.3.3	分布	27
2.4.5.3.4	代謝及び排泄	27
2.4.5.3.5	薬物相互作用	28
2.4.5.3.5.1	被相互作用薬としての SNAC	28
2.4.5.3.5.2	相互作用薬としての SNAC	29
2.4.5.3.6	総括	30
2.4.5.4	SNAC の毒性試験	30
2.4.5.4.1	一般毒性	31
2.4.5.4.2	遺伝毒性及びがん原性	33
2.4.5.4.3	生殖発生毒性	33
2.4.5.4.4	局所刺激性	33
2.4.5.5	細胞呼吸に及ぼす SNAC の影響	34
2.4.5.5.1	<i>In vivo</i> メカニズム試験	34
2.4.5.5.2	<i>In vitro</i> メカニズム試験	37
2.4.5.5.3	濃度及び影響の関連性	37
2.4.5.5.4	総括	40
2.4.6	総合的考察及び結論	40
2.4.6.1	セマグルチド	40
2.4.6.2	SNAC	41
2.4.6.3	総括	42
参考文献		43

図目次

	ページ
図 2.4-1 セマグルチドの構造	7
図 2.4-2 SNAC の構造	8
図 2.4-3 ヒトにおける SNAC の代謝経路	28
図 2.4-4 細胞呼吸及び電子伝達系に及ぼす SNAC の影響	35
図 2.4-5 一般状態変化の重症度と SNAC の血漿中濃度 $C_{\max}$	36
図 2.4-6 SNAC の血漿中濃度とラットの血漿中及び CSF 中の乳酸濃度	36
図 2.4-7 血漿中 SNAC 濃度と乳酸濃度の相関	38

表目次

	ページ
表 2.4-1 皮下投与セマグルチドの薬理試験の概要	11
表 2.4-2 経口セマグルチドの薬理試験の概要	11
表 2.4-3 皮下投与セマグルチドの薬物動態試験の概要	13
表 2.4-4 経口セマグルチドの薬物動態試験の概要	13
表 2.4-5 用量正規化 (1 mg/kg) セマグルチドの平均薬物動態パラメータの種間比較	14
表 2.4-6 皮下投与セマグルチドの毒性試験プログラムの概要	17
表 2.4-7 経口セマグルチドの毒性試験プログラムの概要	18
表 2.4-8 反復投与毒性試験及びがん原性試験におけるセマグルチドの動物及びヒトの曝露 量比	22
表 2.4-9 生殖発生毒性試験におけるセマグルチドの動物対ヒトの曝露量比	23
表 2.4-10 SNAC の吸収経路試験の概要	24
表 2.4-11 副次的及び安全性薬理試験の概要	25
表 2.4-12 SNAC の薬物動態試験の概要	26
表 2.4-13 トランスポーター基質としての SNAC 及び代謝物の <i>in vitro</i> 評価	29
表 2.4-14 SNAC の毒性試験の概要	31
表 2.4-15 NOAEL における SNAC の動物及びヒトの曝露量比 (AUC 及び $C_{\max}$)	32
表 2.4-16 SNAC のメカニズム試験の概要	34
表 2.4-17 死亡がみられなかった最高用量における SNAC の動物及びヒトの曝露量比 ($C_{\max}$ 、遊離濃度)	39

略語一覧

以下に示す略語一覧は、非臨床試験の概要全体を通して使用される全略語の一覧である。したがって、すべての略語がこの非臨床試験の概要の項で使用されているとは限らない。

Ado	8-amino-3,6-dioxaoctanic acid (8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸)
ALP	alkaline phosphatase (アルカリホスファターゼ)
ALT	alanine transaminase (アラニントランスアミナーゼ)
AUC	area under the plasma drug concentration-time curve (血漿中濃度－時間曲線下面積)
C _{ave}	average plasma concentration (平均血漿中濃度)
CL	clearance (クリアランス)
C _{max}	maximum drug concentration observed in plasma (最高血漿中濃度)
DRF	dose range finding (用量範囲設定)
ECG	Electrocardiography (心電図)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
F	absolute bioavailability or female (絶対的バイオアベイラビリティ又は雌)
F _{rel}	relative bioavailability (相対的バイオアベイラビリティ)
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)
HPLC	high pressure liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
HPMC	hydroxypropyl methyl cellulose (ヒドロキシプロピルメチルセルロース)
i.v.	Intravenous (静脈内)
ICR	incurred sample reproducibility (実試料の再現性)
LC-MS/MS	liquid chromatography tandem-mass spectrometry (液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法)
LLOQ	lower limit of quantification (定量下限)
LOCI	luminescent oxygen channelling immunoassay (蛍光酸素チャネリング免疫測定法)
LSC	liquid scintillation counting (液体シンチレーション計数)
M	male (雄)
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare (Japan) (厚生労働省)
MRHD	maximum recommended human dose (最大臨床用量)
MTD	maximally tolerated dose (最大耐量)
NA	not applicable (該当なし)
NC	not calculated (算出せず)
NNC	Novo Nordisk compound (ノボ ノルディスク社の化合物)
NOAEL	no observed adverse effect level (無毒性量)
NR	not reported (報告なし)
OECD	organisation for Economic Co-operation and Development (経済協力開発機構)
p.o.	per oral (経口)
PK	Pharmacokinetic (薬物動態)
QC	quality control (品質管理)
Rac _{obs}	observed ratio of accumulation (累積比の観察値)
RIA	radio-immunoassay (放射免疫測定法)

s.c.	Subcutaneous (皮下)
SD	standard deviation (標準偏差)
SNAC	salcaprozate sodium (サルカプロザートナトリウム)
$t_{1/2}$	terminal plasma half-life (終末相半減期)
$t_{\max}$	time at which the highest drug concentration occurs (最高血漿中濃度到達時間)
V_z	volume of distribution (分布容積)

2.4.1 非臨床試験計画概要

有効成分であるセマグルチド（遺伝子組換え）（以下、セマグルチド）は、持続性ヒトグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬である。本概括評価では、1日1回経口投与のセマグルチド（経口セマグルチド）の使用について評価する。週1回皮下投与のセマグルチド〔日本における販売名：オゼンピック皮下注 2mg（以下、オゼンピック）〕は、EU、米国及び日本を含む主要地域で承認されている。

セマグルチドは、クリアランスが小さくなるよう設計されており、それによりヒトにおける終末相半減期（ $t_{1/2}$ ）が約1週間に延長されている。半減期延長の基本メカニズムは血清アルブミンとの非共有結合であり、長鎖脂肪酸（オクタデカン二酸）をペプチド骨格の第26位のリジンに親水性リンカー〔8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（Ado）及びグルタミン酸〕を介してペプチド骨格に附加することで可能となっている。さらに、DPP-4酵素による分解を抑制するため、ペプチド骨格の第8位をアラニンから2-アミノイソブチル酸に改変している（[図 2.4-1](#)）。

セマグルチドの分子式は $C_{187}H_{291}N_{45}O_{59}$ 、分子量は 4113.58 Da である。

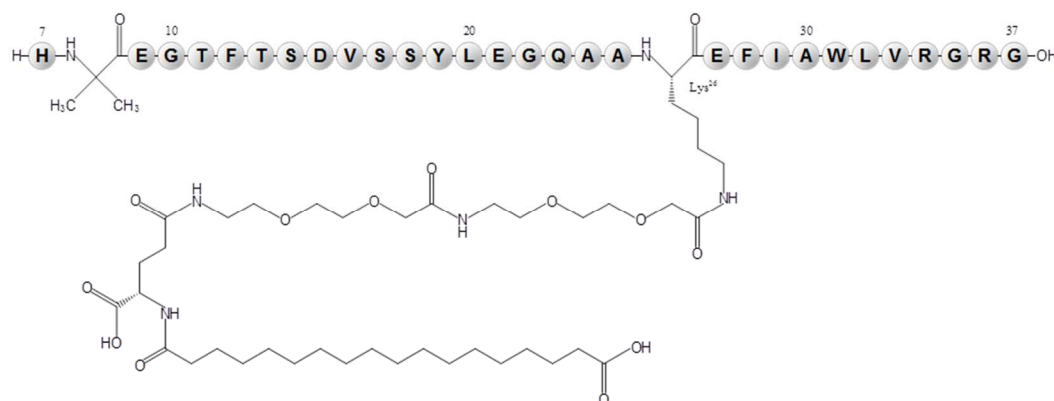


図 2.4-1 セマグルチドの構造

経口セマグルチドは、セマグルチド 3、7 又は 14 mg を含有する錠剤である。経口セマグルチドには、吸収促進剤であるサルカプロザートナトリウム（SNAC）が、1錠あたり 300 mg 含有されている（[図 2.4-2](#)）。また、経口セマグルチドは、セルロース（結晶）、ポビドン及びステアリン酸マグネシウムを含有する。

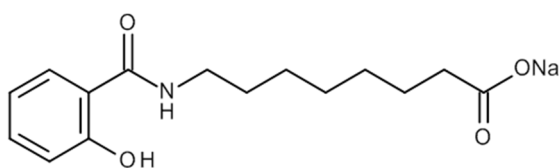


図 2.4-2 SNAC の構造

2.4.1.1 開発アプローチ及び規制当局との交渉

経口セマグルチドを支持する非臨床試験の資料は、(i) 皮下投与セマグルチド（オゼンピック）、(ii) 経口セマグルチド及び (iii) SNAC の概要資料に基づいており、これらの結果を本モジュールに要約する。すべての重要な非臨床安全性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）の原則に準拠して、OECD 加盟国又は OECD のデータ相互受け入れ（Mutual Acceptance of Data）プロセスの参加国で実施した。

経口セマグルチドの開発期間を通じて、FDA（米国）、CHMP（EMA）、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）、Health Canada 及び EU 各国の規制当局と定期的に交渉、助言を求めた。得られた助言を考慮し、開発戦略を策定した。

セマグルチド（オゼンピック）

セマグルチドの非臨床評価の大部分は、皮下投与セマグルチド（オゼンピック）の医薬品承認申請資料として提出・評価されている（M 1.13.1 参照）。

経口セマグルチド

セマグルチドのヒトへの経口投与時の安全性を確認するため、FDA のガイドライン「Nonclinical Safety Evaluation of Reformulated Drug Products and Products Intended for Administration by an Alternate Route）」¹に準拠して、非臨床安全性試験プログラムを実施した。

SNAC

SNAC は医薬品新添加剤であると考えられ、実施した非臨床試験プログラムは、米国 FDA の「Guidance for Industry - Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients」²に準拠しており、当該試験プログラムは、ヒトへの長期投与を支持するための日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）M3 ガイドライン³の推奨事項に全面的に準拠するものである。SNAC は、現在、米国で市販されている医療食（ビタミン B12 1000 µg 及び SNAC 100 mg を含有）として使用されている⁴。

2.4.2 セマグルチドの薬理試験

2.4.2.1 GLP-1 受容体作動薬の概論

GLP-1 ペプチドホルモンは、グルカゴン関連ペプチドスーパーファミリーに属する。生理学的に、GLP-1 は腸内分泌細胞である L 細胞、及び後脳の孤束核ニューロンにおける pre-proglucagon 遺伝子から摂食に対する応答として分泌される。GLP-1 の生理学及び薬理学に関しては広範な文献報告が存在する^{5,6,7}。哺乳類では GLP-1 のアミノ酸配列が保存されており、その受容体は GLP-1 受容体のみが同定されている。GLP-1 受容体は、B ファミリーに属する G タンパク質共役受容体である。哺乳類では GLP-1 受容体の動物種間相同性が高く、ラットとヒトで 90%、サルとヒトで 99% の相同性を有する⁸。GLP-1 の細胞作用は、Gs タンパク質及びアデニル酸シクラーゼの経路を介し、細胞内に cAMP が蓄積される。膵 β 細胞では、受容体結合に引き続きホスホキナーゼ A が活性化され、細胞内サイトゾル Ca^{2+} の増加及びインスリン含有顆粒のエキソサイトーシスが誘導される。

2.4.2.1.1 GLP-1 受容体の発現

ヒト及び非ヒト霊長類において、末梢臓器及び脳における GLP-1 受容体の発現は十分に解析されている^{9,10,11}。膵臓では、GLP-1 受容体は主にインスリン産生 β 細胞に局在し、膵外分泌の腺房細胞における発現は非常に低い。膵管上皮細胞では GLP-1 受容体の発現が認められない。腎臓及び肺では、GLP-1 受容体は、動脈壁及び細動脈壁の平滑筋細胞に特異的に発現する。心臓では、GLP-1 受容体は洞房結節の筋細胞に局在する。胃腸管では、十二指腸上部のブルンナー腺で最も高い発現が認められる。胃の筋層及び腸全体の筋層間神経叢ニューロンの壁細胞及び平滑筋細胞では、低レベルの発現が認められる。GLP-1 受容体は脳の複数領域で発現し、その発現パターンはげっ歯類及び非ヒト霊長類で類似している¹¹。GLP-1 受容体の発現は、肝臓及び甲状腺では認められない。GLP-1 受容体はげっ歯類の甲状腺 C 細胞で発現するが、健康なヒト又は NHP の C 細胞には発現せず、げっ歯類の肺ではヒトよりも高レベルの GLP-1 受容体が認められるように、若干の種差が認められているが、十分には理解されていない^{9,10,12}。

2.4.2.1.2 GLP-1 受容体作動薬の薬理作用

GLP-1 受容体作動薬の主要な薬理学的標的組織は膵臓 (β 細胞) 及び脳である。膵臓における機能作用として、グルコース依存性のインスリンの分泌ならびにインスリン、グルコキナーゼ及びグルコーストランスポーターの生合成の発現亢進が認められる。また、GLP-1 受容体作動薬はグルコース依存的にグルカゴン分泌を減少させ、続いて肝臓グルコース産生を抑制する。GLP-1 は胃内容排出を抑制し、食後の血漿中グルコース変動を減少させる。胃内容排出の抑制は内因性 GLP-1 及びエキセナチドやリキシセナチドのような短時間作用型 GLP-1 受容体作動薬の重要な生理学的作用であるが、リラグルチド、デュラグルチド、アルビグルチド及びセマグルチドのような持続性 GLP-1 受容体作動薬の場合

合はそれほど重要でない。この作用の違いは、部分的なタキフィラキシスを反映するものと考えられる^{6,13}。GLP-1 受容体作動薬は、満腹感及び膨満感を増強し、空腹感を減弱させることによりエネルギー摂取量を減少させる^{14,15}。エネルギー摂取減少の作用機序はよく研究されており、脳の視床下部弓状核における主要な食欲調節ニューロンにおける GLP-1 受容体、ならびに高負荷の脂肪又は炭水化物の摂取を減少させるような報酬及び食物選択に影響を及ぼすその他の受容体も関与するものと考えられている^{16,17}。

GLP-1 受容体作動薬は収縮期血圧を低下させ、心拍数を増加させることが示されている^{18,19}。GLP-1 受容体作動薬が心血管アウトカムに有益な効果を示すことの根拠として、モデルマウスによる GLP-1 受容体作動薬の心保護作用、アテローム性動脈硬化症の抑制、プラーク安定性の増加、血小板機能の減少が示されている^{20,21,22,23}。セマグルチドをマウスに投与した試験においても同様の効果が認められ、プラーク病変の進展が顕著に抑制された。こうした効果の一部は、体重及びコレステロールの減少とは独立した作用として認められている²⁴。また、急性炎症モデル（リポ多糖）において、セマグルチドは血漿中の全身性炎症マーカー濃度を低下させ、大動脈のアテローム性動脈硬化組織のトランスクリプトーム解析により、セマグルチドによって複数の炎症経路が抑制されることが示された²⁴。

すなわち、セマグルチドは持続性ヒト GLP-1 アナログであり、GLP-1 受容体を介して内因性 GLP-1 と同様の経路及び細胞活性でその作用を発揮する。

2.4.2.2 経口セマグルチドの薬理試験プログラム

皮下投与セマグルチドの薬効ならびに安全性薬理作用、及び経口セマグルチドの安全性薬理作用を評価するため、一連の薬理試験が実施されている（表 2.4-1 及び表 2.4-2）。これらの試験はオゼンピックの非臨床試験プログラムの一部として実施されており、すべての *in vivo* 試験が皮下投与で実施されている。しかしながら、セマグルチドの吸収後の全身作用は投与経路に依存しない。このことは、反復投与毒性試験において、セマグルチドで予想される GLP-1 を介した作用、特に、摂餌量減少、体重減少又は体重増加抑制が、皮下投与だけでなく経口投与でも認められていることから裏付けられる。すなわち、本薬理試験プログラムは、皮下投与だけでなく、経口投与の場合も同様に適切であると考えられる。

また、サルにおけるセマグルチドの反復経口投与毒性試験により、心電図及び心拍数に及ぼす影響を評価した。

表 2.4-1 皮下投与セマグルチドの薬理試験の概要

Study type	Administration	Test system/Species
Efficacy Pharmacology		
GLP-1 receptor activation (cAMP)	<i>in vitro</i>	Cloned human GLP-1R
Mechanism of protraction (albumin binding)	<i>in vitro</i>	Cloned human GLP-1R
Blood glucose lowering	<i>in vitro</i> s.c.	Rat pancreas (insulin secretion) db/db mouse, normal rat, normal pig
Secondary pharmacology		
Receptor specificity	<i>in vitro</i>	Glucagon receptor, broad panel (68 receptors)
Body weight lowering	s.c.	DIO rat, normal rat, normal mouse, normal pig
Other effects (atherosclerosis)	s.c.	ApoE ^{-/-} and LDL-receptor ^{-/-} knockout mice
Safety Pharmacology		
Effect on CNS, respiration, kidney	s.c.	Rat
Effect on cardiovascular system	s.c.,	Monkey
Cardiac action potential	<i>in vitro</i>	hERG (HEK293 cells), rabbit Purkinje fibres

Studies from the Ozempic file (Please refer to M 1.13.1).

Abbreviations: cAMP: cyclic adenosine monophosphate; CNS: central nervous system; db: diabetes; DIO: Diet induced obese; ApoE: Apoprotein E; LDL: low-density-lipoprotein; HEK: human embryonic kidney; hERG: human ether-ago-go related gene.

表 2.4-2 経口セマグルチドの薬理試験の概要

Study type	Administration	Test system/Species
Safety Pharmacology		
Effect on cardiovascular system	oral ^a	Monkey

a: as part of 6-week and 17-week repeat dose toxicity studies.

2.4.2.3 効力を裏付ける試験

薬理試験の結果を要約すると、セマグルチドが複数のモデル動物において血糖降下作用及び体重減少作用を示す、受容体特異的な持続性 GLP-1 受容体作動薬であることが示された。血糖降下作用はインスリン濃度の上昇によってもたらされ、体重減少の機序には脳の食欲調節経路が関与していた。また、セマグルチドはアテローム性動脈硬化の発症を抑制させ、心血管系に対する抗炎症作用を示した。

2.4.2.4 安全性薬理試験

セマグルチドを単回投与した安全性薬理試験では、ヒトの安全性に関連する懸念は認められなかった。セマグルチドを 0.47 mg/kg [経口セマグルチドの日本人における 2 型糖尿病患者の最大臨床用量 (MRHD) である 14 mg/日の 27 倍] までの用量で単回皮下投与したカニクイザルに、臨床的に問題となる所見は認められなかった。また、セマグルチドを経口投与 (6 及び 17 週間) したサル (ヒト曝露量の 8.1 倍) にも、心電図及び心拍数に及ぼす影響は認められなかった。

ラットでは、活動性の低下及び利尿増加が認められた。これらの所見は、ラットへの GLP-1 受容体作動薬投与に関してよく知られた作用である。利尿への急性の作用は、ヒトの内因性 GLP-1 でもみられているが、GLP-1 受容体作動薬の長期投与では認められていない。

2.4.2.5 薬力学的薬物相互作用

セマグルチドの非臨床薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。GLP-1 受容体作動薬は胃内容排出を遅延させることが報告されており⁶、その結果、併用薬の吸収に影響を及ぼす可能性がある。セマグルチドの胃内容の排出に及ぼす作用は臨床試験で評価されており、食事直後の胃内容排出がわずかに遅延した。臨床薬理試験（M 2.7.2.3.2.4）を参照のこと。

2.4.3 セマグルチドの薬物動態試験

セマグルチドの薬物動態（PK）特性を、非臨床安全性試験と同じ動物種であるマウス、ラット及びカニクイザルを用いて評価した。大部分の試験はオゼンピックの非臨床試験プログラムの一部として実施したものであるが（[表 2.4-3](#)）、さらに、セマグルチドの反復経口投与後の PK を、ラット及びサルを用いた毒性試験の一部として検討した。また、³H-[Oct]-セマグルチドをラット及びサルに経口投与し、血漿中代謝物プロファイルを評価した（[表 2.4-4](#)）。

表 2.4-3 皮下投与セマグルチドの薬物動態試験の概要

Study type	Administration	Species
Pharmacokinetics/Toxicokinetics		
DRF/MTD; single dose; 2-, 13-, 26 ^a - and 52 ^b -weeks, 2-year carcinogenicity ^c	s.c., i.v. ^d	mouse, rat, monkey
Fertility ^a , embryo-foetal development, pre- and postnatal development ^b	s.c.	rat, rabbit, monkey
Distribution		
QWBA	s.c., i.v.	rat
Placental transfer	s.c.	rat, rabbit
Plasma protein binding	<i>in vitro</i>	mouse, rat, rabbit, monkey, human
Metabolism		
Hepatocytes	<i>in vitro</i>	rat, monkey, human
Degradation by NEP	<i>in vitro</i>	human
Plasma	s.c.	mouse, rat, monkey, human
Urine, bile ^a , faeces	s.c.	rat, monkey, human
Metabolite identification (plasma, urine)	s.c.	human
Excretion		
Urine, bile ^a , faeces, milk ^a	s.c.	rat, monkey, human
Pharmacokinetic drug interaction		
CYP inhibition, CYP induction, transporter inhibition	<i>in vitro</i>	human hepatocytes
CYP activity in liver homogenate (from 26-week toxicity study)	s.c.	rat

Studies from the Ozempic file (Please refer to M 1.13.1).

a: rat only; b: cynomolgus monkey only; c: mouse and rat; d: single dose only; e: plasma only

Abbreviations: DRF: dose range finding; MTD: maximally tolerated dose; QWBA: quantitative whole body autoradiography; NEP: neutral endopeptidase; CYP: cytochrome P450

表 2.4-4 経口セマグルチドの薬物動態試験の概要

Study type	Administration	Species
Pharmacokinetics/Toxicokinetics		
DRF/MTD, 6- 17 ^b - and 26 ^a -weeks	oral	rat, monkey
Metabolism		
Plasma	oral	rat, monkey
Excretion		
Urine, faeces	oral, i.v	monkey

Abbreviations: DRF: dose range finding; MTD: maximally tolerated dose

これらの試験の結果、セマグルチドは皮下投与したいずれの動物種においても、予想どおり長時間の血漿中半減期を有することが確認された。セマグルチドのバイオアベイラビリティは高く (>85%)、いずれの動物種でもセマグルチドの血漿中アルブミンとの結合性は高く (>99%)、アルブミン結合が長時間の半減期の重要な要因であることを支持している。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 β 酸化により代謝される。

経口投与後の PK パラメータの概要を [表 2.4-5](#) に示す。

表 2.4-5 用量正規化 (1 mg/kg) セマグルチドの平均薬物動態パラメータの種間比較

Species	oral administration (steady-state)						i.v. administration (single dose)		
	$C_{\max}$ (nmol/L)	$t_{\max}$ (h)	$AUC_{(0-24h)}$ (h×nmol/L)	C_{avg} (nmol/L)	$t_{1/2}$ (h)	F (%)	CL (L/h/kg)	V_z (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)
Rat	8.6	2	39	1.6	6.5	-	-	-	-
Monkey	12.0	4	220	9.1	60	0.16	0.0022	0.18	54
Human	104	1.5	2215	92.3	145	~1	0.0004	0.08	137

Data from studies: Rat: 208300, 208301 (both studies group 3 and 4), 210196. Monkey: 208302, 209157, 209115 (i.v. data incl. F). Human (PK values BW normalised): Phase 3a modelling report (M 5.3.3.5), NN9535-3687 (i.v. data). $C_{\max}$, AUC_{0-24h} , C_{avg} and F and mean values, $t_{1/2}$ and $t_{\max}$ are median values

2.4.3.1 測定法

2.4.3.1.1 生体試料中薬物濃度測定法

経口投与による非臨床試験では、セマグルチドの血漿中濃度を、蛍光酵素チャネリング免疫測定 [LOCI (AlphaLISA)] 法又は液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 法の 2 種類のバリデートされた測定法のいずれかを用いて測定した。各分析法で報告されるセマグルチド濃度の整合性を担保するため、測定法バリデーションの一環として、免疫測定法を基盤とした測定法 (LOCI 法) の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) の測定結果を比較した。その比較の結果、2 つの測定法の結果が同等であることが確認された。慢性毒性試験、がん原性試験及び発生毒性試験を含む、動物にセマグルチドを皮下又は経口投与するすべての重要な毒性試験では、LC-MS/MS 法を用いた。

これらの測定では、血漿中の総セマグルチド、すなわち非結合セマグルチドとアルブミン結合セマグルチドの両方を測定する。

2.4.3.1.2 抗セマグルチド抗体の分析

4 試験の動物試験（ラットにおける 6 及び 26 週間毒性試験及びサルにおける 6 及び 17 週間試験）において、バリデートされた分析法により、経口投与時の抗セマグルチド抗体の産生を評価した。これらの 4 試験で抗セマグルチド抗体が検出された動物はみられなかった。

2.4.3.2 吸収

すべてのセマグルチド投与群のラット及びサルから採取した血液で血漿中セマグルチド濃度が定量可能であったことから、経口投与後のセマグルチドの全身曝露が示された。経口投与した動物間の血漿中曝露量には、皮下及び静脈内投与時よりも大きな個体差が認められた。すなわち、全身曝露量の個体差には吸収率の差が関係していると考えられる。 $C_{\max}$ 及び AUC_{0-24h} で評価した曝露量は用量に伴って増大し、PK パラメータの明らかな性差は認められなかった。サルにおける累積は 0.15~12 と個体差がみられ、これには吸収率の個体差による可能性が高いと考えられた。ラットでは累積は認められなかった。推定 $t_{1/2}$ はラットで最も短く（6.5 時間）、サルでは 60 時間であった。認められた累積は、投与頻度及び半減期と一致している。

2.4.3.3 分布

セマグルチドと血漿タンパク質の結合を、非臨床試験の動物種及びヒトにおいて *in vitro* で評価した。試験の結果、血漿タンパク結合率はすべての試験動物種で高く、99%を超えていた。追加の検討により、アルブミンがセマグルチドに結合する主要な血漿タンパク質であることが示された。

セマグルチドの分布は、トリチウム標識セマグルチドの単回投与を行ったラットを用いて試験されている。ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験では、セマグルチドは時間の経過とともに大部分の組織に分布し、血液ならびに肺、腎臓、歯髄及び子宮のような極めて血管の多い組織に最高レベルの放射能が認められた。血液と比較して、中枢神経系（CNS；脳及び脊髄）には低レベルの放射能しか存在せず、単回投与後に血液-脳関門を通じたセマグルチドの分布が限定的であることが示された。本分布パターンは、アルブミンの分布パターンと一致するものである。

妊娠ラットにおいて、トリチウム標識セマグルチドの分布は、非妊娠動物における分布と同様であった。セマグルチドの胎児組織への分布は、評価した全時点で母動物の血漿（<4%）よりも低レベルであることが示された。このことから、胎盤を通じた分布は限定的であることが示唆される。

2.4.3.4 代謝

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 β 酸化によって代謝され、引き続き未変化の ado リンカーが尿中に排泄される。*In vitro* 試験の結果から、セマグルチドが中性エ

ンドペプチダーゼ（NEP；ネプリライシン）によって代謝されることが示されていることから、NEP がヒトにおけるセマグルチドの代謝に関与する可能性が高いと考えられる。ただし、セマグルチドはペプチドを基本骨格とする分子であることから、*in vivo* では、他のタンパク質分解酵素もセマグルチドの代謝に関与する可能性がある。*In vitro* による評価では、内因性 GLP-1 及びリラグルチドで以前から示されているのと同様に、NEP が分解に関与する可能性があることが示された。セマグルチドの代謝に関与する酵素は体内に広く分布しているため、単一臓器が代謝に関与することはない。

ラット及びサルに経口投与時の血漿中代謝物プロファイルは、皮下投与時の血漿中代謝物プロファイルと同様であった。また、ヒトにセマグルチドを皮下投与時の代謝物プロファイルはラット及びサルと同様であり、代謝物の濃度は未変化のセマグルチド濃度よりも低かった。このように、ヒトにおけるセマグルチド代謝物の安全性は、非臨床の安全性試験において十分に確認されたと考えられる。

2.4.3.5 排泄

放射能標識セマグルチドをラット（皮下）、サル（経口、皮下、静脈内）及びヒト（皮下）に投与した排泄試験の結果から、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（<1%）及びヒト（3%）の尿中に未変化のセマグルチドがわずかに認められたのみであった。

2.4.3.6 薬物相互作用

CYP 酵素の制御ならびに阻害及び薬物トランスポーターの阻害に及ぼすセマグルチドの影響を評価した *in vitro* 及び *in vivo* 非臨床試験の結果から、セマグルチドの薬物相互作用誘発性は示唆されなかった。

薬物相互作用誘発性は臨床薬理試験においても評価しており、その結果、経口セマグルチドと併用する薬剤の用量調節は不要であり、経口セマグルチドが相互作用薬となる可能性は低いと考えられた（M 2.7.2 臨床薬理試験、2.7.2.3.1.8）。

以上より、経口セマグルチドが臨床的に問題となる薬物相互作用を誘発する可能性は低いと考えられる。

2.4.4 セマグルチドの毒性試験

経口セマグルチドの毒性評価に関する非臨床試験計画は、皮下投与セマグルチドで既に得られている完了した毒性試験プログラムに基づいて構築されており、当該試験プログラムは日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）M3 ガイドライン³の推奨事項に準拠している（表 2.4-6）。さらに、経口セマグルチドに関する毒性試験プログラムを、当時の規制ガイドライン「Draft Guidance for Industry and

Review Staff: Nonclinical Safety Evaluation of Reformulated Drug Products and Products Intended for Administration by an Alternate Route) 」 [25](#)に基づいて実施した。本プログラムには、皮下投与プログラムで用いた動物種と同じ、ラット及びサル2の2種類の動物種にセマグルチドを反復経口投与した毒性試験が含まれる。2015年に発出されたガイドラインの最終版¹に基づく、完了したラット（26週間）及びサル（17週間）における反復投与毒性試験プログラムは、経口セマグルチドの医薬品承認申請を支持する上で依然として適切であることが確認された。

経口セマグルチドの毒性試験の一覧を[表 2.4-7](#)に示す。

ペプチドはもともと経口バイオアベイラビリティが低いことから、経口投与後のセマグルチドの吸収を増加させるために、吸収促進剤が処方に含まれている。経口セマグルチドに用いられた新添加剤である SNAC は、別途非臨床試験プログラムによる評価が実施されている（[2.4.5](#) 参照）。

表 2.4-6 皮下投与セマグルチドの毒性試験プログラムの概要

Study type and duration	Administration	Species
Single-dose toxicity	s.c., i.v.	mouse, rat
Repeat dose toxicity		
DRF/MTD; 2-, 13-, 26 ^a - and 52 ^b - week	s.c.	mouse, rat, monkey
Genotoxicity		
Ames test, Chromosome aberration in human lymphocytes	<i>in vitro</i>	-
Micronucleus induction	s.c.	rat
Carcinogenicity		
2 years	s.c.	mouse, rat
Reproductive and developmental toxicity		
Combined fertility and embryo-foetal development	s.c.	rat
Embryo-foetal development	s.c.	rabbit, monkey
Pre- and postnatal development	s.c.	monkey
Juvenile toxicity		
11 weeks	s.c.	rat
Impurities		
4- and 13-week	s.c.	rat
Mechanistic studies		
C-cell changes - sequence of events	s.c.	mouse, rat

Studies from the Ozempic file (Please refer to M 1.13.1).

a: rat only; b: cynomolgus monkey only

Abbreviations: DRF: dose range finding; MTD: maximum tolerated dose; s.c.: subcutaneous, i.v.: intravenous

表 2.4-7 経口セマグルチドの毒性試験プログラムの概要

Study type and duration	Administration	Species
Repeat dose toxicity DRF, 6-, 17 ^b - and 26 ^a -weeks	oral ^c	rat, monkey

a: rat only; b: cynomolgus monkey only; c: formulated with SNAC as absorption enhancer, except 17-week monkey study where sodium caprate was used as absorption enhancer

Abbreviations: DRF: dose range finding

2.4.4.1 一般毒性

経口セマグルチドの毒性試験プログラムの結果は、皮下投与セマグルチドの毒性試験の結果と概して一致しており、GLP-1 受容体の活性化を介した薬理作用、すなわち、摂餌量及び体重に及ぼす直接的又は二次的な影響と考えられる影響が主に認められた。

実施した試験において、経口セマグルチドの忍容性は概して良好であった。しかしながら、26 週間試験の 60 mg/kg/日群の雌ラット 2 例が死亡し、摂餌量の減少及び体重減少が継続したことによる二次的影響、すなわち、過剰な薬理作用によるものと考えられた。観察された所見の大部分は、セマグルチドで予想される薬理作用及び関連する影響、すなわち、摂餌量の減少及び体重減少又は体重増加抑制による二次的な臓器重量及び臨床検査項目の有害でない変化であった。サルにおける試験でみられた胸腺の小型化／胸腺重量の低下及び胸腺の萎縮／退縮は、摂餌量及び体重の減少だけでなく、投与操作によるストレスとも関連した所見である可能性が考えられる²⁶。

尿中評価項目の変化は、近位尿細管からのナトリウム再吸収に対する GLP-1 受容体作動薬の既知の阻害作用と概して一致していた²⁷。いずれの試験においても、尿管の投与に関連した変化は認められなかったことから、尿中評価項目の変化に毒性学的懸念はないと考えられた。

消化管へのセマグルチドの影響に関連した安全性上の懸念は、いずれの試験においても認められなかった。小腸性及び骨性アイソザイムが主な血漿中アルカリホスファターゼ（ALP）であるラットでは、ALP が用量に関連して増加したが、この増加は 4 週間の休薬期間中に完全又は部分的に回復した。ラットにおける 6 及び 26 週間試験では、ブルンナー腺の軽微～軽度の肥大の発現頻度が用量段階的に増加し、サルにおける 6 週間試験では、ブルンナー腺の拡張及び好酸性細胞質の存在が認められたが、サルでは投与との関連性は不明であった。ブルンナー腺は、上部消化管の酵素液として、重炭酸塩を含むアルカリ性粘液の分泌に関与し、それにより、酸性の胃内腔内容物から上部消化管を保護する。ブルンナー腺では GLP-1 受容体が高発現しており^{10,12}、ラットでみられた肥大は（おそらく、サルでみられた内腔拡張及び好酸性細胞質も）GLP-1 受容体の活性化に関連するものと考えられる。ブルンナー腺の変化は、皮下投与セマグルチドの毒性試験プログラムのマウス及びラットにも認められていることから、経口の投与経路とは関連しない。（i）ブルンナー腺の変化がブルンナー腺及び消化管粘膜の炎症又は細胞障害のいずれにも関連しなかったこと、（ii）休薬により回復性が認められたこと、

及び (iii) 皮下投与のがん原性試験で過形成及び腫瘍形成への進展は認められなかったことから、これらの変化は有害でないと考えられ、概して、ブルンナー腺の変化はヒトにおける安全性上の懸念をもたらさないと考えられた。

2.4.4.2 遺伝毒性及びがん原性

セマグルチドに遺伝毒性を示す根拠は認められなかった。一方、がん原性試験で評価されている他のすべての GLP-1 受容体作動薬と同様、セマグルチドの皮下投与により、マウス及びラットにおいて甲状腺 C 細胞腫瘍が誘発された。C 細胞の変化は、非遺伝毒性的な機序による、げっ歯類で高感受性の GLP-1 受容体を介した特異的メカニズムによるものである。サルでは、日本人の 2 型糖尿病患者における経口セマグルチドの MRHD である 14 mg/日の最大 45 倍の曝露量で 52 週間皮下投与したが、C 細胞の変化は認められなかった。このことは、正常なサルの甲状腺 C 細胞では GLP-1 受容体の発現が認められないことと一致する公表データによれば、GLP-1 受容体は健康なヒトの甲状腺 C 細胞及び正常な非ヒト霊長類の C 細胞では発現していないことが示されており、げっ歯類における甲状腺 C 細胞腫瘍がヒトで生じる可能性は、概して低いと考えられる。第 3 相臨床試験プログラムにおける甲状腺腫瘍の所見については、臨床的安全性の概要 (M 2.7.4) に詳しく述べる。

2.4.4.3 生殖発生毒性

皮下投与による生殖毒性試験において、雄の受胎能に及ぼす投与に関連した影響は認められなかった。雌ラットでは、性周期が延長し、黄体数減少に伴う着床数及び同腹児数への影響がみられた。これらの影響は、母動物の体重減少に対する適応反応であると考えられた。セマグルチドの胎盤通過がラット及びウサギで認められ、ラットでは、乳汁中に低レベルのセマグルチドが検出された。

セマグルチドは、卵黄囊胎盤がラット胚の栄養供給に必須である妊娠期間中に、GLP-1 受容体を介した反転卵黄囊胎盤による機能不全を誘発し、ラットの胚・胎児の発生に有害な影響を及ぼした。卵黄囊の解剖学的構造及び機能に種差があること、ならびにカンクイザルの卵黄囊に GLP-1 受容体が発現しないことから、この機序がヒトに当てはまる可能性は低いものと考えられる。ただし、その他のメカニズムが関与する可能性を完全に否定できない。ウサギ及びサルで認められた妊娠損失及び胎児異常は偶発的であるか、母動物への顕著な体重減少に関連したものいずれかによると考えられる。しかしながら、現時点で得られているデータからは、ヒトとの関連性を否定できない。したがって、妊娠期のセマグルチドの使用は推奨しない。

このことは、市販の GLP-1 受容体作動薬は動物試験で生殖毒性を有することが示されており、一般的に妊娠期の使用は推奨されていないことと一致するものである。

2.4.4.4 その他の毒性試験

2.4.4.4.1 局所刺激性

経口投与後の消化管における局所刺激性の評価を、反復経口投与毒性試験の一部に組み入れた ([2.4.4.1](#))。概して、消化管に及ぼす影響に関連した安全性上の懸念は、いずれの試験においても認められなかった。

2.4.4.4.2 幼若動物を用いた試験

セマグルチドを幼若ラットに 11 週間皮下投与したところ、摂餌量の減少及び体重増加抑制が認められ、セマグルチドによる体重増加抑制の程度はペアフィード対照群との比較に基づく摂餌量の減少単独の影響よりも大きかった。セマグルチドは、雌雄に対して性成熟の遅延を誘発し、性成熟到達時の体重はペアフィード対照群よりも高値であった。しかしながら、その後の雌の性周期、雌雄の生殖器官重量又は顕微鏡的病理検査、発情行動、雌雄の受胎能、妊娠中期までの雌の妊娠維持能への影響は認められなかった。したがって、性成熟の到達遅延は有害ではないと考えられた。以上より、NOAEL は本試験の最高用量である 0.6 mg/kg/日とし、これは経口セマグルチドの日本人 2 型糖尿病患者における MRHD である 14 mg/日における曝露量の 37 倍に相当する。

2.4.4.4.3 添加物の評価

経口セマグルチドは、セマグルチド 3、7 又は 14 mg を含有する錠剤である。セマグルチド経口錠には、吸収促進剤 (SNAC) が 1 錠あたり 300 mg 含有されている。また、セマグルチド経口錠は、セルロース (結晶)、ポビドン及びステアリン酸マグネシウムを含有する (M 2.3.P.1、製剤及び処方)。セルロース (結晶)、ポビドン及びステアリン酸マグネシウムは、長期経口投与に用いられている他の市販製剤で十分な実績がある。一方、SNAC は、米国で市販されている医療食 (ビタミン B12 1000 µg 及び SNAC 100 mg を含有) として使用されているが⁴、SNAC は医薬品新添加剤と考えられることから、別途非臨床試験プログラムを実施した。SNAC の非臨床評価の概要を [2.4.5](#) に示す。

2.4.4.4.4 非臨床試験と臨床試験で用いた有効成分の同等性／同質性

開発期間中、セマグルチドを異なる製造法で製造した。当初は、合成法 (第 I 法) でセマグルチドを製造し、これを大部分の非臨床試験及び開発初期の第 1 相臨床試験で用いた。その後、セマグルチド前駆体を酵母に発現させて化学修飾する方法 (第 II 法) を開発した。第 II 法によるセマグルチドを、第 1 相ならびに第 2 相臨床試験及びラットにおける 26 週間経口投与毒性試験 (210196) 等、非臨床試験の一部で用いた。この第 II 法を、延長セマグルチド前駆体を発現する新たな酵母株を用いて改良した (第 III 法)。第 III 法によるセマグルチドを、第 3 相臨床試験及び並行して実施された臨床薬理試験で用いた。

同等性／同質性試験によって、異なる製造法で製造したセマグルチドの不純物プロファイルが同様であることが確認されている（M 3.2.S.2.6、開発中に製造した原薬の同等性）。

2.4.4.4.5 不純物の安全性評価

セマグルチドの製剤規格には、高分子量タンパク質（HMWP）及び以下の不純物（親水性不純物、疎水性不純物 1、疎水性不純物 2 及び不純物の合計）が含まれている（M 2.3.P.5、製剤の管理）。すべての不純物はセマグルチドの目的物質由来不純物であり、非臨床試験で安全性が評価されている。非臨床試験の NOAEL は、体重 60 kg の被験者に経口セマグルチドを投与する MRHD である 14 mg/日の 32～60 倍の量で不純物が試験された。HMWP は 6 倍の量で試験された（M 2.6.6 毒性試験の概要文、表 2.6.6-11）。したがって、不純物の安全性が確認され、申請する有効期間規格は妥当と考えられる。

2.4.4.5 動物及びヒトの曝露量比較

動物の NOAEL における AUC 曝露量と、経口セマグルチドの MRHD である 14 mg/日におけるヒト AUC 曝露量に関して、動物とヒトの曝露量比を [表 2.4-8](#) に示す。げっ歯類を用いたがん原性試験では、検討した全用量において C 細胞腫瘍が認められたことから、NOAEL を設定できなかった。

表 2.4-8 反復投与毒性試験及びがん原性試験におけるセマグルチドの動物及びヒトの曝露量比

Species, Study type and Dose	C _{max} (nmol/L)	AUC _{tau} (h×nmol/L)	C _{average} ^b (nmol/L)	Exposure multiple ^c
Human (type 2 diabetes) - 14 mg/day	18.8	400.8 ^c	16.7 ^c	-
Repeated Dose Toxicity				
<u>Rat, 26-week, oral (210196)</u>				
60 mg/kg/day	336	3695	154	9.2
20 mg/kg/day (NOAEL)	780	1752	73	4.4
6 mg/kg/day	9.4	86	3.6	0.2
<u>Rat, 26-week, s.c. (207377)</u>				
0.60 mg/kg/day (NOAEL)	964	18100	754	45
0.13 mg/kg/day	211	3855	161	9.6
0.03 mg/kg/day	48	902	38	2.3
<u>Monkey, oral, 6-week (209153)</u>				
10 mg/kg/day (NOAEL)	221	4011	167	10
5 mg/kg/day	45	811	34	2.0
<u>Monkey, oral, 17-week (209428)</u>				
20 mg/kg/day (NOAEL)	133	2578	107	6.4
5 mg/kg/day	4.8	91	3.8	0.2
<u>Monkey, s.c., 52-week (207288)</u>				
0.36 mg/kg/twice-weekly	1115	54700	760	45
0.06 mg/kg/twice-weekly (NOAEL)	169	9235	128	7.7
0.01 mg/kg/twice-weekly	27	1460	20	1.2
Carcinogenicity				
<u>Mouse, 2-year, s.c. (207362)^a</u>				
3.0 mg/kg/day (males only)	3450	39500	1646	99
1.0 mg/kg/day	882	11435	476	29
0.3 mg/kg/day	235	3085	129	7.7
0.1 mg/kg/day (females only)	84	1110	46	2.8
<u>Rat, 2-year, s.c. (207363)^a</u>				
0.1 mg/kg/day	184	3815	159	9.5
0.025 mg/kg/day	28	641	27	1.6
0.01 mg/kg/day	18	293	12	0.7
0.0025 mg/kg/day	BLQ	BLQ	BLQ	-

S.c. studies from the Ozempic file (Please refer to M 1.13.1)

Abbreviations: BLQ: below limit of quantification, NOAEL: No-observed-adverse-effect-level.

Human exposure based on Phase 3a Japan modelling report (M 5.3.3.5)

a: NOAEL not identified

b: C_{average} = AUC_{tau,ss}/tauc: Exposure ratio calculated as: C_{average} in animals/C_{average} in humans at steady state

表 2.4-9 生殖発生毒性試験におけるセマグルチドの動物対ヒトの曝露量比

Species, Study type and Dose	C _{max} (nmol/L)	AUC _{tau} (h×nmol/L)	C _{average} ^a (nmol/L)	Exposure multiple ^b
Human (type 2 diabetes) - 14 mg/day	18.8	400.8 ^c	16.7 ^c	-
Reproductive and development toxicity				
<u>Rat, Embryo-Foetal Development, s.c. (207361)</u> ^c				
0.09 mg/kg/day	48.5	735	31	1.8
0.03 mg/kg/day	15.4	247	10	0.6
0.01 mg/kg/day (NOAEL)	6.6	82.9	3.5	0.2
<u>Rabbit, Embryo-Foetal Development, s.c. (207360)</u> ^d				
0.0075 mg/kg/day	73.6	1530	64	3.8
0.0025 mg/kg/day	9.9	208	8.7	0.5
0.0010 mg/kg/day (NOAEL)	1.5	20.2	0.84	0.05
<u>Monkey, Embryo-Foetal Development, s.c. (208486)</u> ^e				
0.15 mg/kg/twice-weekly	625	30000	417	25
0.075 mg/kg/twice-weekly	224	10400	144	8.6
0.015 mg/kg/twice-weekly (NOAEL)	42.1	2000	28	1.7
<u>Monkey, Pre- and Postnatal Development, s.c. (210061)</u> ^f				
0.15 mg/kg/twice-weekly	349	14400	200	12
0.075 mg/kg/twice-weekly	166	6720	93	5.6
0.015 mg/kg/twice-weekly (NOAEL)	29	1320	18	1.1
<u>Rat, Juvenile Toxicity, s.c. (214479)</u>				
0.6 mg/kg/day (NOAEL)	770	15000	625	37
0.13 mg/kg/day	191	3610	150	9.0
0.02 mg/kg/day	27	456	19	1.1

Studies from the Ozempic file (Please refer to M 1.13.1)

Abbreviations: NOAEL: No-observed-adverse-effect-level.

Human exposure based on Phase 3a Japan modelling report (M 5.3.3.5)

a: C_{average} = AUC_{tau,ss}/tau

b: Exposure ratios calculated as: C_{average} in animals/C_{average} in humans at steady state

c: Average exposure of Gestation Day 6 (GD6) and GD17 (animals in steady state from GD6 and onwards)

d: Exposure on GD 19.

e: Exposure on GD 50.

f: Exposure on GD 140.

2.4.5 SNAC の非臨床評価

SNAC に対して、広範な非臨床試験プログラムを実施した。当該プログラムには、吸収促進剤として作用、薬理、PK 及び毒性に関する特性を評価する試験が含まれている。

2.4.5.1 吸収促進剤としての SNAC の作用

GLP-1 アナログのようなペプチド医薬品の経口投与には、消化管閉鎖による不十分な吸収及びタンパク分解酵素による広範な分解という大きな障壁がある。したがって、経口投与で許容可能なバイオアベイラビリティを達成するためには、吸収促進剤（例：SNAC）の使用が必要である。GLP-1 アナログであるセマグルチドの経口投与を可能にするため、SNAC を適用した研究が近年公表されており²⁸、そのデータの要約を以下に示す（表 2.4-10）。

表 2.4-10 SNAC の吸収経路試験の概要

Study type	Administration	Species
Test system		
Gastric fluid	<i>in vitro</i>	simulated gastric fluid
Intestinal fluid	<i>in vitro</i>	rat
Liposomes	<i>in vitro</i>	NA
Rat tissue, Ussing chamber	<i>in vitro</i>	rat
NCI-N87 cells	<i>in vitro</i>	human cell line
Pepsin enzyme	<i>in vitro</i>	pig
Buffer solutions	<i>in vitro</i>	NA
<i>In vivo</i> stomach	oral	rat, dog
Dogs	oral	dog

NA: not applicable

一連のメカニズム試験から、セマグルチドは胃で吸収される可能性が高いことが示されている。

幽門結紮ビーグル犬を用いた *in vivo* 試験では、結紮イヌにおけるセマグルチドの吸収率は非結紮イヌと同程度であり、別の試験でも、脾静脈（胃腔からの静脈）からの血漿中濃度が門脈（消化器系からの静脈）からの血漿中濃度よりも高かった。胃液中のセマグルチド及び SNAC の濃度が錠剤内及び錠剤近傍で最高となる濃度勾配が形成されたことから、セマグルチド及び SNAC は、いずれも胃において局所的に高濃度で放出されると考えられる。別の試験では、ラットとイヌのいずれにおいても、セマグルチドの免疫反応が錠剤下の粘膜領域に限定されていたことから、セマグルチドの吸収は胃の局所的な環境下で起こることが裏付けられた。

SNAC は緩衝作用を持つため、錠剤下の局所的な胃環境における pH を高めることで、低 pH で活性化する胃酵素による分解からセマグルチドを保護している可能性が高いと考えられた。反対に、ラット腸液を用いたインキュベーションの結果から示されるように、セマグルチドは腸内で速やかに分解される。食事により SNAC 及びセマグルチドは希釈されるため、吸収促進及び酵素による分解からの保護のための十分な濃度勾配を形成することは難しくなる。実際に、セマグルチドを経口投与したビーグル犬に餌を与えると、セマグルチドの曝露量は急速かつ時間依存的に減少した。

SNAC は、胃上皮の細胞膜に作用し、経細胞経路を介したセマグルチドの吸収を促進した。このことと一致して、SNAC は脂質膜モデルに取り込まれ、脂質膜を流動化できることが観察された。胃粘膜の細胞膜への影響を除き、SNAC は頂端面のタイトジャンクション複合体に影響をもたらさなかった。また、SNAC の吸収促進作用は一時的かつ可逆的であり、分子サイズに依存し、製剤化による投与が必要である。併用薬の吸収に対する影響（の欠如）については、[2.4.5.3](#)「相互作用薬としての SNAC」に述べる。

以上を要約すると、経口セマグルチドは主に胃で吸収され、吸収は錠剤表面近傍の領域に限定されており、SNAC との製剤化による投与が必要である。SNAC は局所的な緩衝作用によって酵素分解を防ぎ、吸収促進作用は一時的である。吸収のメカニズムとして経細胞吸収によることが示されており、タイトジャンクションへの影響を示す根拠は認められていない。

2.4.5.2 SNAC 及び主要代謝物の副次的及び安全性薬理試験

SNAC 及び主要代謝物（E494、E506、E1245、E1246 及び E1247）を、*in vitro* 及び *in vivo* の広範な結合試験及び機能試験により検討した。また、ICH S7A²⁹及び S7B³⁰ガイドラインに示されている原則に準拠して、重要な臓器機能（CNS、呼吸器系及び心血管系）に対する SNAC の影響を検討するための安全性薬理試験プログラムを計画・実施した。

表 2.4-11 副次的及び安全性薬理試験の概要

Study type	Administration	Test compound
Secondary pharmacology		
Pharmacology and receptor binding screening assays	<i>in vitro</i>	SNAC
Pharmacology screening assays	oral (gavage)	SNAC
Receptor binding assay	<i>in vitro</i>	SNAC metabolites (E494, E506, E1245, E1246, E1247)
Safety Pharmacology		
CNS		
Irwin test (rat)	oral (gavage)	SNAC
Respiration		
Plethysmography study (rat)	oral (gavage)	SNAC
Cardiovascular		
hERG patch clamp	<i>in vitro</i>	SNAC
Cardiac ion channels	<i>in vitro</i>	SNAC and E506
CV telemetry (monkey)	nasogastric	SNAC
ECG (monkey)	oral (gavage)	SNAC

Abbreviations: CNS: central nervous system; hERG: human ether-a-go-go-related gene; CV: cardiovascular; ECG: electrocardiogram

SNAC 及び主要代謝物を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 結合試験ならびに機能試験、及び安全性薬理試験では、臨床的に意義のある曝露量において、CNS、呼吸器系又は心血管系に及ぼす影響は示されなかった。

SNAC を 1000 及び 1500 mg/kg の用量で単回経口投与したラットにおいて、CNS の抑制、呼吸数の低下及び死亡が認められた。これらの影響は、電子伝達系における複合体 I の阻害を主に介した、細胞呼吸阻害によるものと考えられた。詳細は [2.4.5.5](#) に述べる。これらの影響は、高用量群で投与初期の血漿中濃度が極めて高いラットで認められた。ヒトに対する SNAC 300 mg 錠 (3~4 mg/kg) 投与では、このような高い血漿中濃度は認められておらず、ヒトでは到達しない濃度と考えられる。

2.4.5.3 SNAC の薬物動態試験

経口投与後の SNAC の PK 特性を、単回投与及び反復投与 PK 試験、トキシコキネティクス試験、ならびに分布・代謝・排泄試験で検討した ([表 2.4-12](#))。

表 2.4-12 SNAC の薬物動態試験の概要

Study type and duration	Administration	Species
Single-dose absorption		
	oral (gavage), i.v.	mouse ^a , rat, monkey
Repeat dose absorption		
2 weeks	oral (gavage) and i.v.	rat, rabbit ^a
13-, 26-, 39- and 52- weeks	oral (gavage)	mouse ^b , rat ^d , monkey ^c
Distribution		
Tissue distribution	oral (gavage)	mouse, rat
Plasma protein binding (SNAC and metabolites)	<i>in vitro</i>	mouse, rat, monkey, human
Plasma/blood cell partitioning	<i>in vitro</i>	rat, human
Metabolism		
<i>In vitro</i> metabolite profiles	<i>in vitro</i>	rat, monkey and human
<i>In vitro</i> UGT metabolism (SNAC + metabolites)	<i>in vitro</i>	human
<i>In vivo</i> plasma metabolite profile	oral (gavage) ^c	mouse, rat, monkey, human
Excretion		
Excretion – Urine and faeces	oral (gavage) ^c	mouse, human
Excretion – Urine, bile, faeces and milk	oral (gavage)	rat
Drug drug interaction		
CYP and UGT inhibition (SNAC + metabolites)	<i>in vitro</i>	human
Drug transporter inhibition (SNAC + metabolites)	<i>in vitro</i>	human
Transporter substrate (SNAC + metabolites)	<i>in vitro</i>	human
CYP induction	<i>in vitro</i>	human

Abbreviations: UGT: Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase ; CYP: Cytochrome P450
a: Oral only; b: 13-week only; c: 39-week only; d: 13-, 26- and 52-week; e: gavage only in animals

2.4.5.3.1 測定法

非臨床試験では、LC-MS/MS 法を用いて、SNAC 及び SNAC 代謝物の血漿中濃度を分析した。測定法は、生体試料中薬物濃度測定に関する現行のガイドライン^{31,32,33}に準拠して開発され、バリデートされた。

2.4.5.3.2 薬物動態

すべての動物種で、SNAC は速やかに吸収され ($t_{\max}$ はマウス及びラットでは 2~5 分以内、サルでは若干遅い)、速やかに排出される ($t_{1/2}$ は全動物種で 1~3 時間)。SNAC を経口投与後の全身バイオアベイラビリティは、ラットで 5~16%、サルで 15% である。SNAC の $C_{\max}$ 及び AUC には用量関連性が見られる。ラット及びサルにおいて、高用量 (毒性試験の用量) では、AUC は用量比を超えて増大した。ヒトにおける SNAC の臨床用量は 300 mg である。3.6 g (SNAC 300 mg 錠 12 錠) までの試験では、AUC は用量比例的に増大した (4247 試験)。マウス、ラット、サル及びヒトへの 1 日 1 回投与による明らかな累積は認められていない。

2.4.5.3.3 分布

SNAC の血漿中タンパク質結合率はヒトで 98% を超え、主に血清アルブミンに結合する。サルでは 97%、マウスでは 88% であり、SNAC とヒト血漿中タンパク質との結合は、試験動物種の血漿中タンパク質との結合よりも強い。SNAC 又は SNAC 由来代謝物は、血流量の多い組織に分布し、胎盤関門を通過し、乳汁中に分泌される。組織中濃度は血漿中濃度とほぼ同程度であり、同様の速度で低下した。

2.4.5.3.4 代謝及び排泄

すべての動物種及びヒトにおいて、SNAC はミトコンドリア内で生じる脂肪酸代謝と同様の、側鎖の連続的 β 酸化を主に介して速やかに代謝される。SNAC 及び β 酸化代謝物はグルクロン酸と抱合する。SNAC は、E494、E506、E1245、E1246 及び E1247 の 5 種の主要代謝物以外にも、様々な副次的代謝物を生成する (図 2.4-3)。ヒト血漿中で確認されている SNAC 代謝物はいずれも動物においても生成される。動物の NOAEL における代謝物曝露量はヒトよりも大幅に高い (比較の結果は M 2.6.6.18 付録、表 2.6.6.18-44 を参照)。

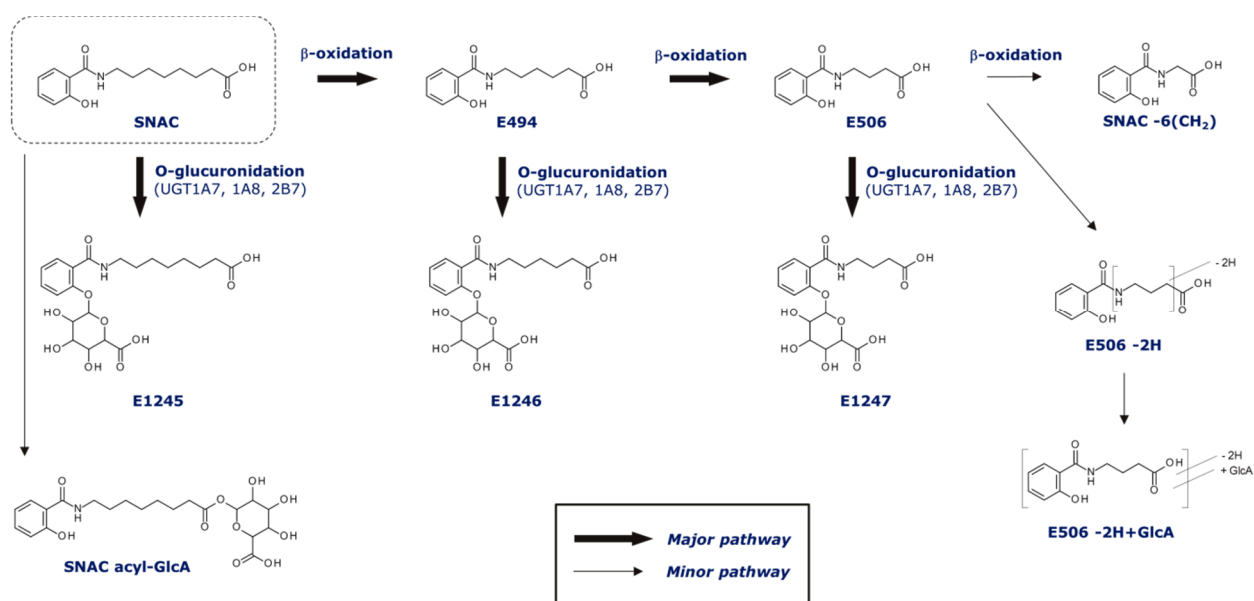


図 2.4-3 ヒトにおける SNAC の代謝経路

マウス、ラット及びヒトでは、経口投与後の ^{14}C -SNAC 由来放射能の大部分が尿中に速やかに排泄される。糞中で回収された放射能は限定的なものである。SNAC を経口投与後の全身バイオアベイラビリティが低いことも考慮すると、SNAC は消化管からほぼ完全に吸収され、その後、広範な初回通過代謝を受けることが示された。

2.4.5.3.5 薬物相互作用

SNAC 及び主要代謝物の薬物相互作用の可能性を評価するため、広範な *in vitro* 試験を実施した。本プログラムは、薬物相互作用に関する FDA のドラフトガイドライン³⁴及び本邦の薬物相互作用ガイドライン³⁵の要求事項に全面的に準拠している。

2.4.5.3.5.1 被相互作用薬としての SNAC

被相互作用薬としての SNAC の評価には、SNAC を代謝する酵素の評価と、SNAC 及び 5 種類の主要代謝物のトランスポーター基質としての評価の両方が含まれている。

FDA のガイドライン³⁴及び本邦のガイドライン³⁵に準拠した *in vitro* データの評価から、SNAC が BCRP トランスポーターの基質であり、SNAC の代謝物は BCRP、OAT1、OAT3 及び MRP2 トランスポーターのいずれか又は複数の基質であることが示唆された (表 2.4-13)。

表 2.4-13 トランスポーター基質としての SNAC 及び代謝物の *in vitro* 評価

Compound	P-gp	BCRP	OATP1B1	OATP1B3	OAT1	OAT3	OCT2	MATE1	MATE2-K	MRP2
SNAC	No	Yes	No	No	No	No	No	No	No	-
E494	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No	-
E506	No	Yes	No	No	Yes	Yes	No	No	No	-
E1245	No	No	-	-	No	Yes	No	No	No	Yes
E1246	No	No	-	-	No	Yes	No	No	No	Yes
E1247	No	No	-	-	No	Yes	No	No	No	Yes

Compounds evaluated at 1, 3, 10 and 100 μ M (MRP2 studies utilized a single concentration; 10 μ M)

“-“ denotes not evaluated

次に、プロベネシド（OAT1 及び OAT3 の典型阻害薬及び広範な UGT 阻害薬）及びシクロスポリン（BCRP、OATP1B1 及び OATP1B3 の典型阻害薬及び MRP2 の阻害剤）を相互作用薬とし、臨床薬物相互作用試験（4394 試験、M 5.3.3.4）で評価した³⁶。この試験の結果、SNAC 300 mg を含むセマグルチドを単回経口投与したときの SNAC 曝露量（ $C_{\max}$ 及び AUC）は、シクロスポリン又はプロベネシドの併用投与による影響を受けないことが示された。5 種の主要 SNAC 代謝物の曝露量は、同程度であるか、最大約 2.3 倍（E1245 の AUC に対するプロベネシドの影響）程度の増加であった。

β 酸化及びグルクロン酸抱合は SNAC の主要な代謝経路であり、これらの経路について薬物相互作用誘発性を評価した。SNAC 以外にも、E494 及び E506 が複数の UGT（UGT1A7、UGT1A8 及び UGT2B7）によるグルクロン酸抱合を受ける可能性があることから、薬物相互作用リスクは低くなる。このことは、4394 試験でプロベネシド（UGT 阻害剤）が SNAC 曝露量（ $C_{\max}$ 及び AUC）に影響しなかったことから裏付けられた。

β 酸化は代謝活性の高い代謝経路であり、約 250 mmol/日の脂肪酸を代謝が可能な内因性 β 酸化経路の代謝活性に比べると、300 mg（1 mmol）/日の SNAC の投与はごく少量である³⁷。また、 β 酸化を強力かつ持続的に抑制する化合物／薬剤は、肝毒性（脂肪変性）の懸念があることから、臨床では使用されない。したがって、SNAC の β 酸化が抑制される可能性は低いと考えられることから、*in vitro* 又は *in vivo* の薬物相互作用評価は実施しなかった。

結論として、SNAC が被相互作用薬となる薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。

2.4.5.3.5.2 相互作用薬としての SNAC

FDA のドラフトガイダンス^{34,36}及び本邦のガイドライン³⁵に従い、SNAC とその主要代謝物が主要な肝 CYP 酵素、消化管 CYP3A4/5 及び UGT 酵素を阻害する可能性を評価した。また、SNAC 及び代謝物が薬物トランスポーターを阻害又は CYP 酵素を誘導する可能性を評価した。

SNAC 及び主要代謝物（E494、E506、E1245、E1246 及び E1247）は、主要な肝 CYP 酵素又は消化管 CYP3A4/5 の直接的な時間依存性又は代謝依存性阻害剤ではなく、薬物のグルクロン酸抱合に関与する主要な肝 UGT の直接的な阻害剤ではなく、主要な肝 CYP 酵素のいずれの誘導剤でもない。

SNAC 及び主要代謝物は、肝 OATP1B1、OATP1B3 又は OCT1 を阻害しなかった。また、SNAC と主要代謝物は OAT1、OAT3、OCT2、BSEP 又は MRP2 の阻害剤ではないが、SNAC（300 mg）は消化管 BCRP を阻害する可能性がある。ただし、*in vitro* 評価に引き続き実施した臨床薬物相互作用試験（4250 試験、M 5.3.3.4）では、ロスバスタチン（BCRP の指標基質）の PK は SNAC の同時投与による影響を受けなかった。

また、併用投与される経口薬に対する SNAC の吸収促進作用を評価した。セマグルチドの吸収に及ぼす SNAC の影響を評価するための一連の非臨床試験が実施されている（M 2.6.2.7 付録、2.6.2.7.2）。これらの試験に基づいて、経口投与したセマグルチドは主に胃で吸収され、吸収は錠剤表面近傍の領域に限定されており、SNAC との製剤化による投与が必要であることが示された。したがって、併用投与薬の PK は SNAC による影響を受けないと考えられる。このことを、SNAC と共に経口投与した薬物の PK を評価する幅広い臨床薬物相互作用試験においてさらに評価した。これらの試験には、吸収促進作用の影響を最も受けやすいと考えられる、透過性が限定的で吸収が不十分な複数の薬物（BCS クラス III）が含まれている。全体として、これらの試験の結果から、SNAC の吸収促進作用には SNAC による製剤化による投与が必要であり、別の錠剤として SNAC を同時投与しても併用薬の曝露量は増大しないことが示され（M 2.7.2 臨床薬理試験 付録 5.2.3.1.8）、この機序による薬物相互作用のリスクは低いと考えられる。

以上より、SNAC が相互作用薬となる薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。

2.4.5.3.6 総括

すべての動物種において、SNAC は速やかに吸収され、代謝され、その後速やかに排出される。経口投与後の SNAC の全身バイオアベイラビリティは、広範な初回通過効果を受けるため、比較的小さい。PK や代謝の大きな性差は認められず、1 日 1 回の反復投与後に累積は生じない。また、SNAC の薬物相互作用の可能性は低い。

2.4.5.4 SNAC の毒性試験

ヒトへの長期投与を支持するための ICH M3 ガイドライン³の推奨事項に準拠して、SNAC の非臨床試験プログラムを実施した。すなわち、非臨床毒性試験プログラムは、一般毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験及び免疫毒性試験で構成される（[表 2.4-11](#)）。

表 2.4-14 SNAC の毒性試験の概要

Study type	Administration	Species
Single-dose toxicity		
	oral (gavage)	mouse, rat
	i.v.	rat, monkey
Repeat dose toxicity		
2- and 13-weeks	oral (gavage)	mouse
2-, 13-, 26-, 52-weeks	oral (gavage)	rat
2-, 4-, 13-, 16-, 39-weeks	oral (gavage) or tablet ^a	monkey
Genotoxicity		
Bacterial mutagenicity assay (Ames test)	<i>in vitro</i> assay	n/a
Cultured human peripheral blood lymphocytes	<i>in vitro</i> assay	n/a
Induction of micronuclei in the bone marrow	oral (gavage)	mouse
Carcinogenicity		
26 weeks	oral (gavage)	mouse (transgenic)
104 weeks	oral (gavage)	rat
Developmental and reproductive toxicity		
DRF, fertility, embryo-foetal development and pre- and postnatal development	oral (gavage)	rat
DRF and embryo-foetal development	oral (gavage)	rabbit
Local tolerance		
Stomach local tolerance	oral (gavage and tablet)	dog
Other		
Immunotoxicity study	oral (gavage)	rat

a: 16-week only

SNAC の忍容性は、各動物種に対して 75～500 mg/kg/日以下の用量で、概して良好であった。SNAC を投与した毒性試験のすべての動物種で、特に 500 mg/kg/日を超える用量において、一般状態変化及び死亡が認められた。これらの所見は、細胞呼吸阻害によるものであることが示され、ヒトで観察されている SNAC の曝露量と比べて、極めて高い曝露量で生じた。このことは [2.4.5.5](#) で詳しく述べる。評価の詳細は、細胞呼吸に及ぼす影響（M 4.2.3.7.7-B-1）にも示す。

2.4.5.4.1 一般毒性

すべての試験動物種（マウス、ラット、ウサギ及びサル）において、SNAC の投与により有害な一般状態変化及び死亡が認められ、このことに基づいて、ラットがん原性試験を含む反復投与毒性試験で NOAEL を設定した。NOAEL は、マウスで 500 mg/kg/日（13 週間）、ラットで 75 mg/kg/日（104 週間）、サルで 300 mg/kg/日（39 週間）であった。

NOAEL における SNAC の曝露量及び曝露量比を以下に示す (表 2.4-15)。

表 2.4-15 NOAEL における SNAC の動物及びヒトの曝露量比 (AUC 及び $C_{\max}$)

Species	NOAEL	Trial/Study ID	Exposure ^a		Animal-to-human ratio	
			$C_{\max}$ (ng/mL)	AUC (h×ng/mL)	$C_{\max}$	AUC
Human	300 mg ^b	Trial 4140 ^c	1083	1340		
Mouse (13 weeks)	500 mg/kg	A16705	81750	18050	75	13
Rat (104 weeks)	75 mg/kg	JLY0366	32800	5985	30	4.5
Monkey (39 weeks)	300 mg/kg	BNA00003	24100	40300	22	30

Abbreviations: NOAEL (No observed adverse effect level)

a: Expose data in rodents obtained from separate studies: JLY0557 (mouse); JLY0517, JLY0532 (rat)

b: Clinical dose of SNAC in oral semaglutide tablets, independent of semaglutide dose

c: Geometric mean in healthy male Japanese subjects, Day 91 (n = 18)

概して、死亡は高用量で投与後数時間以内に生じた。全動物種を通じて、死亡する前に嗜眠、異常呼吸、運動失調、異常姿勢、ならびに活動性、身体緊張及び反射の低下などの一般状態変化が時折みられ、一部の動物は安楽死させた。これらの一般状態変化のうち一部の変化は一過性であった。反復投与毒性試験では、明らかに毒性の認められない用量において、死亡は概して試験期間を通して散発的に認められ、試験期間の初期及び後期に死亡率が高まる傾向は認められなかった。

反復投与毒性試験全体を通じて、一貫した動物の一般状態変化及び死亡の原因を特定可能な標準的な臨床検査所見又は病理組織学的変化は認められなかった。ラットにおいて、ALP ならびにトリグリセリドの増加及びグロブリンの減少が認められたが、その他の臨床検査項目に一貫した変化は認められなかった。ラットとサル両方において、尿組成の変化（最も一貫性が認められた変化はナトリウム濃度の上昇）及び腎重量の増加傾向が認められたが、関連する病理組織学的変化は認められなかった。これらの変化は、SNAC 分子からナトリウムが排出された結果によるものと考えられた。さらに、肝重量の増加が、ラット及びサル両方の一般毒性試験全体を通して、比較的一貫して認められたが、病理組織学的変化とは関連しておらず、有害ではないと考えられた。

認められた一般状態変化及び死亡の原因を明らかにするため、一連のメカニズム試験を実施した (2.4.5.5)。これらの試験の結果から、投与初期に非常に高濃度の SNAC に曝露された動物が呈した症状の原因として、細胞呼吸の阻害による急激な全身性のエネルギー欠乏と考えられると結論された。

ヒトでは、このような高い血漿中濃度は認められておらず、経口セマグルチドをヒトに投与しても到達しない濃度と考えられる。

2.4.5.4.2 遺伝毒性及びがん原性

遺伝毒性試験において、SNAC の *in vitro* 又は *in vivo* での遺伝毒性誘発性は認められなかった。がん原性試験はラット及びマウスを用いて実施した。rasH2 トランスジェニックマウスに SNAC を 300 mg/kg/日までの用量で 26 週間経口投与したが、毒性学的に意義のある所見はなく、SNAC の発がん性を示す根拠は認められなかった。Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 75、200 又は 500 mg/kg/日の用量で最長 104 週間経口投与したところ、200 又は 500 mg/kg/日群の雌で死亡率が症状した。しかしながら、病理組織学的検査では SNAC 投与に起因する腫瘍性又は非腫瘍性変化は示されなかったことから、SNAC のがん原性を示す根拠は認められなかった。

2.4.5.4.3 生殖発生毒性

ラット及びウサギを用いた重要な生殖発生毒性試験を、SNAC 単剤として 1000 mg/kg/日の 1 用量で実施したところ、一貫して摂餌量減少及び母動物／児動物の体重減少が認められた。したがって、母動物の NOAEL は 1000 mg/kg/日未満であった。SNAC は胚・胎児の発生に影響を及ぼさなかったことから、胚・胎児の発生に関する NOAEL は 1000 mg/kg/日であった。ラットの出生前及び出生後の発生（PPND）試験において、母動物の毒性によるものと考えられる死産児及び出生後数日以内の死亡の増加がみられた。これらの結果から、本試験で SNAC 1000 mg/kg/日の 1 用量が NOAEL とは考えられなかった。

母動物の毒性はおそらく細胞呼吸に及ぼす SNAC の影響と考えられるが、この影響は、臨床用量として 300 mg の SNAC を含有する経口セマグルチドでは臨床的に問題とならないと考えられる（[2.4.5.5](#) 参照）。したがって、PPND 試験において NOAEL が設定されなかったものの、容認可能と考えられる。最終的に、経口セマグルチドは他の GLP-1 アゴニストと同様、妊娠中に使用すべきではない。

2.4.5.4.4 局所刺激性

SNAC をサルに 39 週間強制経口投与した場合、又は SNAC 300 mg を含有する錠剤を 16 週間投与した場合のいずれにおいても、局所的な消化管毒性は認められなかった（胃の詳細な組織検査）。SNAC 錠剤及び液剤を用いて、急性局所刺激性試験をイヌで実施したところ、胃に及ぼす局所的な影響は認められなかった。一般反復投与毒性試験において、投与 24 時間後に安楽死させたラットの胃／十二指腸粘膜は正常であった。一方、SNAC 溶液を強制経口投与したラットを投与 20～60 分後に安楽死処置したところ、腺胃又は十二指腸の最急性の粘膜壊死が認められた。投与 24 時間後に所見が認められな

かったことは、胃の適応反応及び上皮粘膜の速やかな回復性を反映している。がん原性試験の結果から、胃／十二指腸でみられた急性期の変化は腫瘍性病変をもたらさないことが示された。

2.4.5.5 細胞呼吸に及ぼす SNAC の影響

SNAC の忍容性は、各動物種に対して 75～500 mg/kg/日以下の用量で、概して良好であった。SNAC を投与した毒性試験の全動物種で、特に 500 mg/kg/日を超える用量において、一般状態変化及び死亡が認められた。

臨床用量（300 mg ～ 3、4 mg/kg/日）及び動物が死亡した用量（200 mg/kg/日以上）の間には大きな差異が認められるが、毒性試験の一環として実施した初期の標準的なトキシコキネティクス評価で、死亡がみられなかった用量における曝露量と臨床曝露量を比較したところ、特にマウス及びラットにおいて、動物及びヒトの曝露量比が比較的低いことが示唆された。したがって、死亡のメカニズムを解明し、SNAC の PK 特性を更に検討し、関連性のある動物・ヒト間の曝露量比を推定するため、一連の *in vitro* ならびに *in vivo* メカニズム試験、及び投与初期の試料採取時点を設定した詳細な PK 評価を実施した（表 2.4-16）。この評価の詳細は、「細胞呼吸に及ぼす影響（M 4.2.3.7.7-B-1）」に示す。

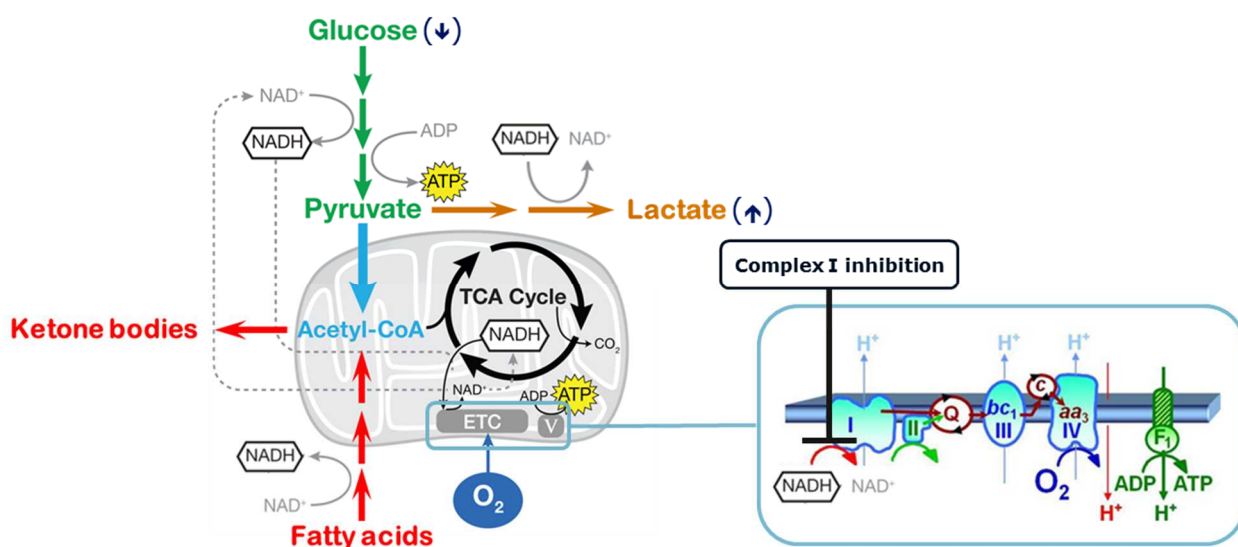
表 2.4-16 SNAC のメカニズム試験の概要

Study type	Administration	Species
Mechanistic studies		
Effect on ATP and enzymes in mitochondria	<i>in vitro</i>	rat tissue
Effect on cellular respiration	<i>in vitro</i>	multiple cell lines
Effect on cellular respiration (metabolites, albumin)	<i>in vitro</i>	C2C12 cells
Effect on electron transport chain	<i>in vitro</i>	C2C12 cells
Effect on cellular respiration	<i>in vitro</i>	hepatocytes
Toxicokinetics and tolerability study	oral (gavage)	mouse
Mechanistic respiratory and cardiovascular study	oral (gavage)	rat
Investigative single dose study	oral (gavage), i.v.	rat
13-week toxicity study	oral (gavage)	rat
Effect on ATP tissue concentration	oral (gavage)	rat

ATP: Adenosine triphosphate

2.4.5.5.1 *In vivo* メカニズム試験

Sprague Dawley 系ラットを用いた *in vivo* 試験では、高用量の SNAC（一般的には 900 又は 1500 mg/kg）により動物の呼吸が急激に活性化し、血中及び脳脊髄液（CSF）中のグルコース濃度が低下し、血漿中及び CSF 中の乳酸濃度が上昇し、心臓及び肝臓の ATP 濃度が低下することが示された。これらの重要な所見は、SNAC の細胞呼吸に及ぼす影響と一致している（図 2.4-4）。



SNAC is able to inhibit complex I in the electron transport chain (ETC), located on the inner site of the inner mitochondrial membrane.

Complex I is the first step in the ETC which ultimately is responsible for the generation of the majority of ATP; a minor part is formed during the glycolysis (green arrows, Glucose → Pyruvate). Complex I catalysing the oxidation of NADH, formed during the glycolysis and in the TCA cycle (or citric acid cycle), to NAD⁺.

An inhibition of complex I will inhibit the ATP formation, and increase the NADH/NAD⁺ ratio. To counteract the drop in ATP, glycolysis is increased (glucose↓) to form ATP. However, NAD⁺ is needed during the glycolysis process, but is reduced following an inhibition of complex I. To regenerate NAD⁺, pyruvate is reduced to lactate (orange arrows), and the lactate levels are increased (↑).

図 2.4-4 細胞呼吸及び電子伝達系に及ぼす SNAC の影響

SNAC 経口投与後の動物における SNAC 曝露量には大きな個体差があり、異なる投与群間で曝露量が大幅に重複した。一方、各個体では、一般状態変化の発現と SNAC の高血漿中濃度は良好に相関し、一般状態変化の存在及び重症度と SNAC の血漿中濃度との間に関連性が認められた (図 2.4-5)。C_{max} の高値は必ずしも一般状態変化をもたらすとは限らないが、重度 (顕著又は安楽死に至る) の一般状態変化を呈した動物は、一貫して血漿中濃度 (C_{max}) が極めて高かった (一般的には 500,000 ng/mL 以上)。一般状態変化と同様、個体では、CSF 中及び血漿中乳酸濃度と血漿中 SNAC 濃度の間にも関連性が認められた (図 2.4-6)。

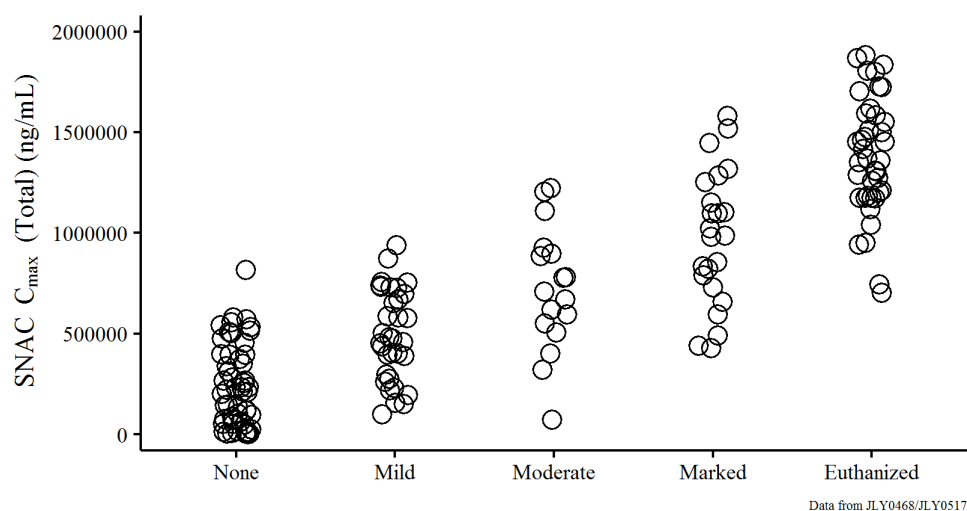
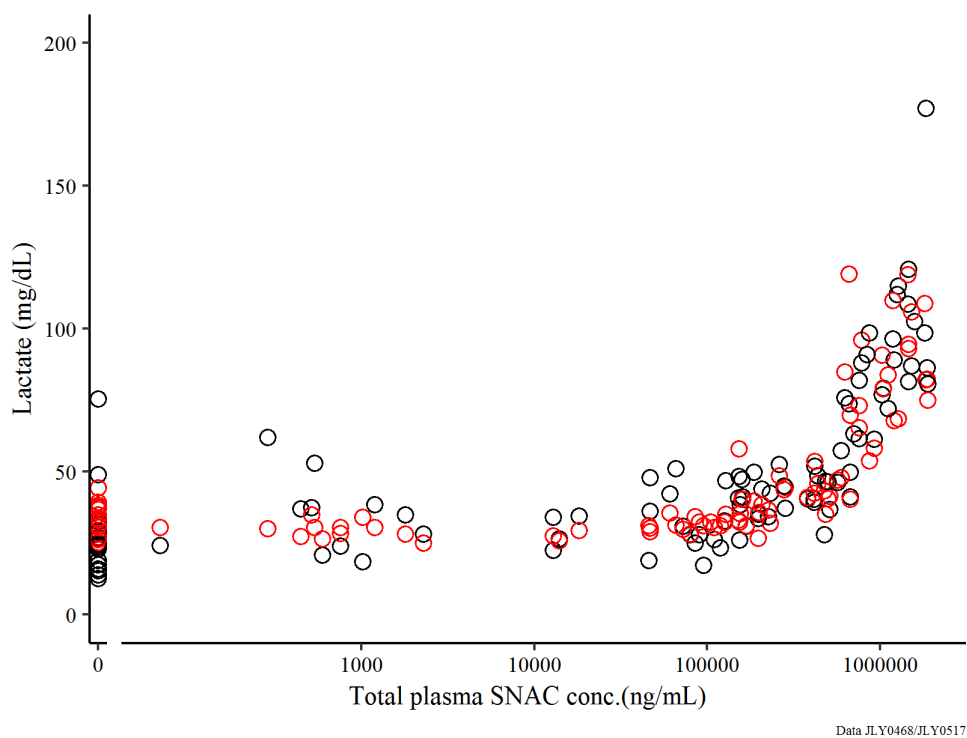


図 2.4-5 一般状態変化の重症度と SNAC の血漿中濃度 $C_{\max}$



Association between plasma (black) or CSF (red) lactate concentration and SNAC plasma concentration in rats 20 min post-dose of 75 to 1500 mg/kg SNAC

図 2.4-6 SNAC の血漿中濃度とラットの血漿中及び CSF 中の乳酸濃度

2.4.5.5.2 *In vitro* メカニズム試験

細胞呼吸に及ぼす SNAC の影響を詳細に検討するため、一連の *in vitro* 試験を実施した。SNAC の主要代謝物である E494、E506、E1245、E1246 及び E1247 (図 2.4-3) は、全動物種の血漿中で認められており、一部の代謝物は SNAC よりも高濃度であることから、これらの代謝物も検討に含めることとした。

In vitro では、SNAC は検討したすべての動物種由来細胞で細胞呼吸を阻害した。細胞呼吸は SNAC により用量依存的に阻害され、肝細胞中の平均 IC₅₀ は 226 µmol/L (マウス)、558 µmol/L (ラット)、752 µmol/L (ヒト) 及び 1214 µmol/L (サル) であり、SNAC による細胞呼吸阻害誘発性の、種々の動物種由来の細胞の感受性差は限定的であることが示唆された。β酸化代謝物 (E494 及び E506) の細胞呼吸阻害能は、SNAC の 1/10 以下である。グルクロン酸抱合代謝物 (E1245、E1246 及び E1247) は、細胞呼吸に影響をほとんど及ぼさなかった。

細胞呼吸の特定の要素に対する SNAC の影響を評価できるよう、透過処理した C2C12 細胞を使用して基質を直接ミトコンドリアに到達させ、複合体 I、II 又はチトクローム c のいずれかを介してエネルギー供給を受けられるようにした (図 2.4-4)。SNAC は、複合体 I のミトコンドリア呼吸を用量依存的に阻害し、1000 µmol/L では完全な阻害が認められた。複合体 II 又はチトクローム c のいずれかで細胞にエネルギーを供給したところ (複合体 I の下流)、1000 µmol/L では SNAC の阻害は認められなかった。単離したラット垂ミトコンドリア粒子でも同様の結果が得られ、SNAC は複合体 I の酵素活性を濃度依存的に阻害し、1000 µmol/L で完全な阻害が認められた。C2C12 細胞及び単離したラット垂ミトコンドリア粒子では、4000~5000 µmol/L の SNAC も、複合体 I の下流においてミトコンドリア呼吸を阻害した。

これらのデータに基づくと、細胞呼吸に及ぼす SNAC の影響は、電子伝達系における複合体 I の阻害を主に介していると結論された。

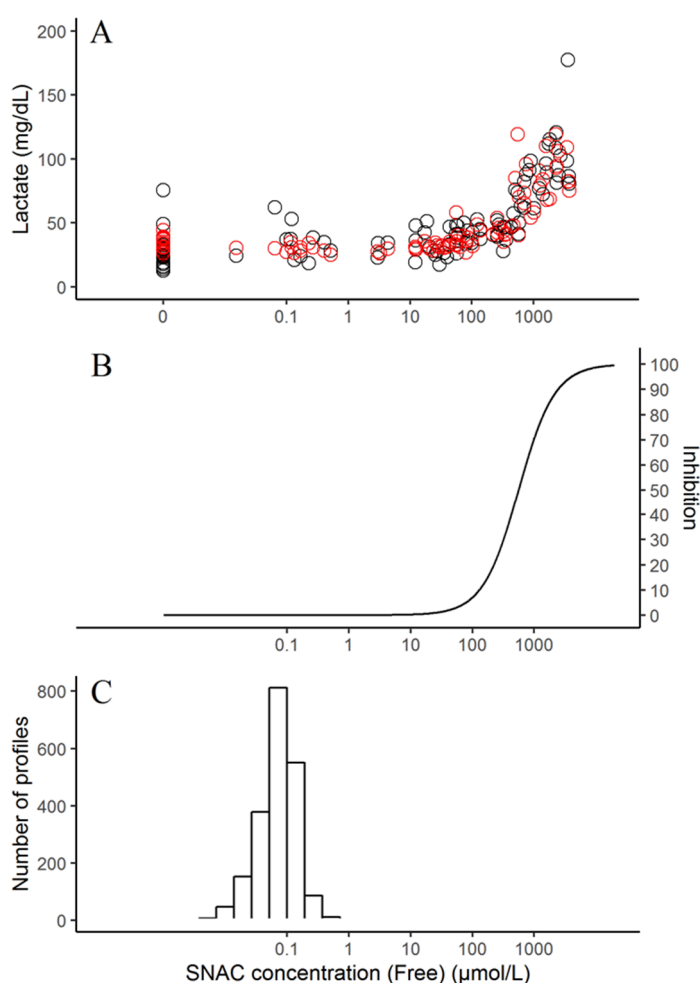
2.4.5.5.3 濃度及び影響の関連性

動物の死亡と電子伝達系における複合体 I の阻害との因果関係を評価するため、血漿中 SNAC 濃度を *in vivo* 及び *in vitro* の作用と比較した。電子伝達系 (複合体 I を含む) は、アルブミンが存在しない (SNAC は血漿中のアルブミンと高度に結合する) ミトコンドリアの内膜にあるため、ミトコンドリア内の SNAC 濃度の推定には、総 SNAC 濃度ではなく、非結合 SNAC の血漿中濃度 (遊離濃度) を用いた。

最も重度の一般徴候が認められた動物では、352 µmol/L 以上の遊離 SNAC 濃度に相当する、極めて高い血漿中濃度 (C_{max}) (一般的に 500,000 ng/mL 以上) が認められた (M 4.2.2.3-B-8、309773)。こ

の濃度は、ラット肝細胞で測定された IC_{50} 値 ($558 \mu\text{mol/L}$) の範囲内にあることから、ミトコンドリア内において、複合体 I の阻害に必要な SNAC 濃度は十分であったと考えられる。

血漿中（黒色）又は CSF 中（赤色）の SNAC 濃度と乳酸濃度との関連は前述している（図 2.4-6）。同データを、血漿中総 SNAC 濃度ではなく遊離（非結合）SNAC 濃度と乳酸濃度データとして示す事により（図 2.4-7A）、乳酸の濃度と効果を表すデータである、ラットの肝細胞を用いた細胞呼吸に関する *in vitro* の阻害曲線との重ね合わせが可能となった（図 2.4-7B）。比較のため、遊離 SNAC (C_{max}) の臨床曝露量も本図に示す（図 2.4-7C）。



(A) Effect of SNAC on plasma (O) and CSF (●) lactate concentration 20 min post dose following a single dose of SNAC (75-1500 mg/kg) to Sprague Dawley rats (JLY0468, JLY0517).
 (B) *In vitro* inhibition of cellular respiration in rat hepatocytes (PrBJ140912)
 (C) Clinical exposure (C_{max} , free) from 2046 PK profiles after administration of 300 mg SNAC in 15 Clinical Pharmacology Trials.

図 2.4-7 血漿中 SNAC 濃度と乳酸濃度の相関

細胞呼吸に及ぼす *in vivo* の影響及びラットにおける細胞呼吸阻害に関する *in vitro* 阻害曲線との間に強い相関性が認められたことから、観察された血漿中乳酸濃度、一般状態変化及び死亡の増加は細胞呼吸阻害を介しており、遊離型 SNAC の血漿中濃度が細胞呼吸（複合体 I）に及ぼす影響の程度を示す適切なマーカーであることが裏付けられる。

したがって、遊離型の $C_{\max}$ 曝露量を比較することで、最も関連性の高いヒトリスクを推定可能と考えられることから、これを用いてヒト曝露量に対する曝露量比を評価した。これらのデータを [表 2.4-17](#) に示す。

表 2.4-17 死亡がみられなかった最高用量における SNAC の動物及びヒトの曝露量比（ $C_{\max}$ 、遊離濃度）

Species	Dose	Trial/Study ID	Exposure ^a		Animal-to-human ratio	
			Total $C_{\max}$ (ng/mL)	Free $C_{\max}$ (μ mol/L)	$C_{\max}$ (total)	$C_{\max}$ (free)
Human	300 mg	Trial 4140	1083 ^b	0.068		
Mouse (13 weeks)	500 mg/kg	A16705	81750	44.8	75	659
Rat (52 weeks)	150 mg/kg	BNA0004	65600	18.8	61	276
Rabbit (EFD)	1000 mg/kg	805-001	265000	123	240	1810
Monkey (39 weeks)	600 mg/kg ^c	BNA00003	90100	19.0	83	279

a: Exposure data in rodents obtained from separate studies: JLY0557 (mouse); JLY0517, JLY0532 (rat) - exposure at 150 mg/kg estimated as twice the exposure at 75 mg/kg. Free concentration calculated based on plasma protein binding data (M 4.2.2.3-B-8, 309773)

b: Geometric mean in healthy male Japanese subjects, Day 91 (n = 18)

c: Highest dose tested in 39-week study. In a 13-week study, 800 mg/kg was tested without mortality

上表の安全比（276 倍以上）とも一致しているが、SNAC を介した細胞呼吸の阻害に関するヒトの IC_{50} （752 μ mol/L）を考慮すると、SNAC 300 mg の平均遊離 $C_{\max}$ 曝露量（0.069 μ mol/L）も、SNAC 300 mg 投与後の被験者で測定された最高濃度（0.96 μ mol/L）〔4082 試験、 $C_{\max}$ 14100 ng/mL（総濃度）～ $C_{\max}$ 0.96 μ mol/L（遊離濃度）〕（[図 2.4-7C](#)）も、複合体 I の阻害をもたらさないと考えられる。比較として、ヒトの細胞呼吸を 5% 阻害するには、SNAC 300 mg 投与後の被験者で測定された最高濃度（0.96 μ mol/L）の 100 倍を上回る、106 μ mol/L の遊離血漿中濃度が必要である。

2.4.5.5.4 総括

SNAC を投与した動物でみられた死亡は、電子伝達系における複合体 I の阻害を主に介した、細胞呼吸阻害によるものと考えられる。

動物で認められた死亡は、投与初期の非常に高い血漿中 SNAC 濃度（ヒトにおける SNAC の曝露量である 300 mg/日の 276 倍以上の曝露量）と関連することが明らかとなった。このような高い血漿中濃度はヒトでは認められておらず、経口セマグルチドをヒトに投与しても到達することはないと考えられる。

本評価は臨床データによってさらに裏付けられている。2 種類の第 3 相臨床試験（4223 試験、M 5.3.5.1 及び 4233 試験、M 5.3.5.1）では、2 型糖尿病患者 890 例を対象に、経口セマグルチドを投与後 20 及び 45 分に血漿中乳酸濃度を測定した。また、QTc に関する臨床薬理試験（4247 試験、M 5.3.4.1）では、治療用量を超える SNAC（SNAC 300 mg の 4、8 及び 12 倍）の単回投与後に血漿中乳酸濃度を測定した。これらの試験のいずれにおいても、血漿中乳酸濃度に及ぼす SNAC の影響は認められなかった。

2.4.6 総合的考察及び結論

2.4.6.1 セマグルチド

セマグルチドは、GLP-1 受容体の特異的に活性化する、持続型ヒト GLP-1 受容体作動薬である。セマグルチドは、クリアランスが小さくなるよう設計されており、それによりヒトにおける消失半減期が約 1 週間に延長されている。半減期延長は、ペプチド骨格に附加した側鎖長鎖脂肪酸を介したアルブミンとの非共有結合、及び DPP-4 酵素による分解を抑制するための第 8 位のアラニン置換によって可能となっている。

セマグルチドの非臨床評価の大部分は、皮下投与セマグルチド（オゼンピック）の承認申請資料として提出・評価されている。

皮下投与セマグルチド（オゼンピック）の非臨床開発プログラムは、ICH M3³ 及び ICH S6³⁸ ガイドラインに準拠して計画された。GLP-1 受容体作動薬の安全性評価に薬理反応の観点からげっ歯類及び非げっ歯類の動物種としてこれまでに汎用されてきたラット及びカニクイザルを、安全性薬理試験及び一般毒性試験の最適動物種として選択した。ラット及びサルは、経口セマグルチドの反復投与毒性試験を含む毒性試験プログラムにおいても使用した。

薬理試験の結果から、セマグルチドは GLP-1 受容体に対する強力かつ選択的なアゴニストであることが確認され、血糖降下及び体重減少という GLP-1 受容体作動薬クラスの既知の薬理作用が認められた。また、セマグルチドが心血管リスクに有益な効果を及ぼすという根拠も示された。

セマグルチドは、ペプチド及び脂肪酸に共通の分解経路によって代謝され、代謝物プロファイルは各動物種及びヒトで同様であった。

皮下投与後に認められた非臨床安全性所見は、概して GLP-1 受容体作動薬の既知の薬理作用に関連したものであった。げっ歯類において、既知のクラス効果である甲状腺 C 細胞の過形成及び腫瘍形成が認められた。現時点で得られている非臨床及び臨床データに基づき総合的に考察すると、げっ歯類で認められたこのクラス効果が、ヒトに関連する可能性は低いと考えられる。セマグルチドは、GLP-1 受容体を介するげっ歯類の卵黄嚢に関連したメカニズムによって、ラットの胚・胎児の発生に有害な影響を及ぼした。卵黄嚢の解剖学的構造及び機能に種差があること、カニクイザルの卵黄嚢では GLP-1 受容体の発現が認められないことから、このメカニズムがヒトに当てはまる可能性は低いと考えられる。ウサギ及びサルで認められた妊娠損失及び胎児異常の増加は、偶然的であるか、母動物の顕著な体重減少に関連したものいずれかによると考えられる。しかしながら、現時点で得られているデータからは、ヒトとの関連性を否定できない。したがって、妊娠期のセマグルチドの使用は推奨しない。

経口セマグルチドの忍容性は概して良好であった。観察された所見の大部分はセマグルチドで予想される薬理作用、すなわち、摂餌量の減少、体重減少又は体重増加抑制による二次的な臓器重量及び臨床検査項目の有害でない変化に関連しており、皮下投与で認められた所見と同様であった。

消化管へのセマグルチドの影響に関連した安全性上の懸念は、いずれの試験においても認められなかった。ラットではブルンナー腺の肥大が認められ、サルではブルンナー腺の拡張及び好酸性細胞質の存在が認められたが、サルでは投与との関連性は不明であった。この影響は、セマグルチドの皮下投与後にも認められている、ブルンナー腺に発現する GLP-1 受容体の活性化に関連すると考えられ、これらの変化が炎症又は細胞障害のいずれにも関連しなかったこと、休薬により回復性が認められたこと、及び皮下投与のがん原性試験で過形成及び腫瘍形成への進展が認められなかったことから、これらの変化は有害でなく、ヒトにおける安全性上の懸念をもたらさないと考えられた。

2.4.6.2 SNAC

ヒトへの長期投与を支持するための ICH M3²の推奨事項に準拠して、SNAC の非臨床評価を実施した。

吸収プロセスにおける SNAC の作用を評価した試験の結果から、セマグルチドは主に胃で吸収され、吸収は錠剤表面近傍の領域に限定されており、SNAC との製剤化による投与が必要であることが示され

た。SNAC は、局所的な緩衝作用によって酵素分解を防ぎ、吸収促進作用は一時的である。吸収のメカニズムとして経細胞吸収によることが示されており、タイトジャンクションへの影響を示す根拠は認められていない。

SNAC 及び主要代謝物を用いた *in vitro* 及び *in vivo* 結合試験ならびに機能試験、及び安全性薬理試験では、臨床的に意義のある曝露量において、CNS、呼吸器系又は心血管系に及ぼす影響は示されなかった。

SNAC の PK 及び代謝はマウス、ラット、サル及びヒトで同様である。すべての動物種において、SNAC は速やかに吸収され、 β 酸化及び抱合によって代謝され、速やかに排出される。経口投与後の SNAC の全身バイオアベイラビリティは比較的低い。PK 及び代謝に大きな性差は認められず、1 日 1 回の反復投与後に累積は生じない。また、SNAC が薬物相互作用の被相互作用薬又は相互作用薬となる可能性は低い。

SNAC の忍容性は、各動物種に対して 75~500 mg/kg/日以下の用量で、概して良好であった。SNAC を投与した毒性試験の全動物種で、特に 500 mg/kg/日を超える用量において、一般状態変化及び死亡が認められた。

高用量の SNAC を投与後の動物に認められた死亡は、主にミトコンドリア内膜に局在する電子伝達系の複合体 I を介した細胞呼吸阻害によるものと考えられた。動物で認められた死亡は、投与初期の非常に高い血漿中 SNAC 濃度（ヒトにおける SNAC の曝露量である 300 mg/日の 276 倍以上の曝露量）と関連することが明らかとなった。このような高い血漿中濃度はヒトでは認められておらず、経口セマグルチドをヒトに投与しても到達することはないと考えられる。

また、SNAC の生殖能に及ぼす影響は認められず、マウス及びラット試験においてがん原性は示されなかった。

2.4.6.3 総括

セマグルチドの長期投与に関する十分な特性解析が実施されており、経口投与に関連する新たな安全性上の懸念は認められなかった。また、包括的なプログラムを通じて添加剤である SNAC の十分な非臨床安全性評価が行われ、臨床的に意義のある曝露量において、ヒトへの使用に関する懸念は認められなかった。

結論として、SNAC 300 mg を含有する経口セマグルチドに関して、セマグルチド及び SNAC の包括的な非臨床試験プログラムから、ヒトへの長期経口投与を妨げる安全性上の懸念は認められなかった。

参考文献

- ¹ FDA. Guidance for Industry and Review Staff: Nonclinical Safety Evaluation of Reformulated Drug Products and Products Intended for Administration by an Alternate Route. October 2015.
- ² FDA. Guidance for Industry. Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients. May 2005.
- ³ ICH M3(R2). Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Current Step 4 version, dated 11 June 2009.
- ⁴ Eligen B12 package insert.
- ⁵ Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007;87(4):1409-39.
- ⁶ Meier JJ. GLP-1 receptor agonists for individualized treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(12):728-42.
- ⁷ Vrang N, Larsen PJ. Preproglucagon derived peptides GLP-1, GLP-2 and oxyntomodulin in the CNS: role of peripherally secreted and centrally produced peptides. *Prog Neurobiol.* 2010;92(3):442-62.
- ⁸ Knudsen LB, Hastrup S, Underwood CR, Wulff BS, Fleckner J. Functional importance of GLP-1 receptor species and expression levels in cell lines. *Regul Pept.* 2012;175(1-3):21-9.
- ⁹ Waser B, Blank A, Karamitopoulou E, Perren A, Reubi JC. Glucagon-like-peptide-1 receptor expression in normal and diseased human thyroid and pancreas. *Mod Pathol.* 2015;28(3):391-402.
- ¹⁰ Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Orskov C, Reedtz-Runge S, Kaastrup P, et al. GLP-1 receptor localization in monkey and human tissue: novel distribution revealed with extensively validated monoclonal antibody. *Endocrinology.* 2014;155(4):1280-90.
- ¹¹ Heppner KM, Kirigiti M, Secher A, Paulsen SJ, Buckingham R, Pyke C, et al. Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (*Macaca mulatta*) brain. *Endocrinology.* 2015;156(1):255-67.
- ¹² Korner M, Stockli M, Waser B, Reubi JC. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting. *J Nucl Med.* 2007;48(5):736-43.
- ¹³ Nauck MA, Kemmeries G, Holst JJ, Meier JJ. Rapid tachyphylaxis of the glucagon-like peptide 1-induced deceleration of gastric emptying in humans. *Diabetes.* 2011;60(5):1561-5.
- ¹⁴ Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest.* 1998;101(3):515-20.
- ¹⁵ van Can J, Sloth B, Jensen CB, Flint A, Blaak EE, Saris WH. Effects of the once-daily GLP-1 analog liraglutide on gastric emptying, glycemic parameters, appetite and energy metabolism in obese, non-diabetic adults. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(6):784-93.

-
- ¹⁶ Sisley S, Gutierrez-Aguilar R, Scott M, D'Alessio DA, Sandoval DA, Seeley RJ. Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2456-63.
- ¹⁷ Secher A, Jelsing J, Baquero AF, Hecksher-Sorensen J, Cowley MA, Dalboge LS, et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4473-88.
- ¹⁸ Kim M, Platt MJ, Shibasaki T, Quaggin SE, Backx PH, Seino S, et al. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat Med*. 2013;19(5):567-75.
- ¹⁹ Ussher JR, Baggio LL, Campbell JE, Mulvihill EE, Kim M, Kabir MG, et al. Inactivation of the cardiomyocyte glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) unmasks cardiomyocyte-independent GLP-1R-mediated cardioprotection. *Mol Metab*. 2014;3(5):507-17.
- ²⁰ Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, Sadi AM, Zhou YQ, Riazi AM, et al. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes*. 2009;58(4):975-83.
- ²¹ Gaspari T, Welungoda I, Widdop RE, Simpson RW, Dear AE. The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE(-/-) mouse model. *Diab Vasc Dis Res*. 2013;10(4):353-60.
- ²² Cameron-Vendrig A, Rehemian A, Siraj MA, Xu XR, Wang Y, Lei X, et al. Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Activation Attenuates Platelet Aggregation and Thrombosis. *Diabetes*. 2016;65(6):1714-23.
- ²³ Drucker DJ. The Cardiovascular Biology of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab*. 2016;24(1):15-30.
- ²⁴ Rakipovski G, Rolin B, Nohr J, Klewe I, Frederiksen KS, Augustin R, et al. The GLP-1 Analogs Liraglutide and Semaglutide Reduce Atherosclerosis in ApoE(-/-) and LDLr(-/-) Mice by a Mechanism That Includes Inflammatory Pathways. *JACC Basic Transl Sci*. 2018;3(6):844-57.
- ²⁵ FDA. Draft Guidance for Industry and Review Staff: Nonclinical Safety Evaluation of Reformulated Drug Products and Products Intended for Administration by an Alternate Route. March 2008.
- ²⁶ Everds NE, Snyder PW, Bailey KL, Bolon B, Creasy DM, Foley GL, et al. Interpreting stress responses during routine toxicity studies: a review of the biology, impact, and assessment. *Toxicol Pathol*. 2013;41(4):560-614.
- ²⁷ Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *Eur J Pharmacol*. 2002;434(3):163-7.
- ²⁸ Buckley ST, Baekdal TA, Vegge A, Maarbjerg SJ, Pyke C, Ahnfelt-Ronne J, et al. Transcellular stomach absorption of a derivatized glucagon-like peptide-1 receptor agonist. *Sci Transl Med*. 2018;10(467).
- ²⁹ ICH S7A. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. Current Step 4 version, dated 8 November 2000.
- ³⁰ ICH S7B. The Non-clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. Current Step 4 version, dated 12 May 2005.

-
- ³¹ VP S. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A et al. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies (Conference Report). *Pharm. Res.* 1992;9(4):588-92. *Pharm Res.* 1992;9(4):5.
- ³² FDA. 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.
- ³³ EMA. Guideline on Bioanalytical Method Validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, February 2012.
- ³⁴ FDA. Draft Guidance for Industry. In Vitro Metabolism- and Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies. October 2017.
- ³⁵ MHLW. Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information, July 2018.
- ³⁶ FDA. Draft Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, February 2012.
- ³⁷ Koutsari C, Basu R, Rizza RA, Nair KS, Khosla S, Jensen MD. Nonoxidative free fatty acid disposal is greater in young women than men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):541-7.
- ³⁸ ICH S6(R1). Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. Parent Guideline, dated 16 July 1997. Current Step 4 version, Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June 2011.