

リベルサス錠 3mg
リベルサス錠 7mg
リベルサス錠 14mg

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

	ページ
目次	2
表目次	3
付録	3
略語一覧.....	4
2.6.6.1 まとめ.....	6
2.6.6.1.1 毒性試験プログラム	6
2.6.6.1.2 結果及び結論	8
2.6.6.1.3 試験概要の概論	8
2.6.6.2 単回投与毒性試験.....	10
2.6.6.3 反復投与毒性試験.....	10
2.6.6.3.1 ラットにおける反復投与毒性試験	11
2.6.6.3.1.1 ラットにおける用量範囲設定試験（M2.6.7.6、208301）	11
2.6.6.3.1.2 ラットにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（M2.6.7.7.A、208300） ..	12
2.6.6.3.1.3 ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（M2.6.7.7.B、210196） ..	14
2.6.6.3.2 サルにおける反復投与毒性試験	17
2.6.6.3.2.1 カニクイザルにおける最大耐量試験（M2.6.7.6、208302）	17
2.6.6.3.2.2 カニクイザルにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（M2.6.7.7.C、 209153）	19
2.6.6.3.2.3 カニクイザルにおける 17 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（M2.6.7.7.D、 209428）	22
2.6.6.4 遺伝毒性試験.....	23
2.6.6.5 がん原性試験.....	24
2.6.6.6 生殖発生毒性試験.....	24
2.6.6.6.1 幼若動物を用いた試験	24
2.6.6.7 局所刺激性試験.....	24
2.6.6.8 その他の毒性試験.....	24
2.6.6.8.1 免疫原性.....	24
2.6.6.8.2 免疫毒性.....	25
2.6.6.8.3 依存性.....	25
2.6.6.8.4 代謝物.....	25
2.6.6.8.5 経口セマグルチドの臨床処方に含まれる添加剤の評価	25
2.6.6.8.6 不純物.....	25

2.6.6.8.6.1 目的物質由来不純物の評価.....	25
2.6.6.9 曝露量及び MRHD (14 mg/日) の曝露量比較.....	27
2.6.6.10 考察及び結論.....	28
参考文献.....	30

表目次

	ページ
表 2.6.6-1 経口セマグルチドの毒性試験プログラム	7
表 2.6.6-2 経口セマグルチドの重要な反復投与毒性試験の概要	10
表 2.6.6-3 ラットにおける用量範囲設定試験 (208301)	11
表 2.6.6-4 ラットにおける 6 週間経口投与毒性試験 (208300)	12
表 2.6.6-5 ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験 (210196)	15
表 2.6.6-6 カニクイザルにおける MTD 試験 (用量漸増フェーズ) (208302)	18
表 2.6.6-7 カニクイザルにおける MTD 試験 (薬物動態フェーズ) (208302)	18
表 2.6.6-8 カニクイザルにおける MTD 試験 (固定用量投与フェーズ) (208302)	18
表 2.6.6-9 カニクイザルにおける 6 週間経口投与毒性試験 (209153)	20
表 2.6.6-10 カニクイザルにおける 17 週間経口投与毒性試験 (209428)	22
表 2.6.6-11 毒性試験で評価した不純物レベル及び申請する有効期間規格.....	26
表 2.6.6-12 重要な毒性試験における動物及びヒトの曝露量比	27

付録

2.6.6.11 付録 サルカプロザートナトリウム：毒性試験の概要文

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)
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)

2.6.6.1 まとめ

オゼンピック皮下注 2 mg（以下、オゼンピック）の登録資料（M 1.13.1 参照）には、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）の皮下投与（以下、皮下投与セマグルチド）による包括的な非臨床毒性評価が示されている。

これに加えて、Sprague Dawley 系ラット及びカニクイザルを用いて、セマグルチドの経口投与（以下、経口セマグルチド）による反復投与毒性試験を実施した。これらの試験の概要を以下に示す。

新添加剤であるサルカプロザートナトリウム（SNAC）の毒性評価の概要は、M2.6.6.11 付録に示す。

2.6.6.1.1 毒性試験プログラム

経口セマグルチドの毒性評価は、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¹の推奨事項に準拠している。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、試験実施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」²に基づいて実施した。2015 年に発出されたガイドラインの最終版³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適切であることが確認された。

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、吸収促進剤が製剤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、米国 FDA の「Guidance for Industry - Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients」⁴に従って、別途非臨床試験プログラムによる評価が実施されており、本ガイダンスは ICH M3¹ガイドラインに示されている推奨事項に全面的に準拠するものである。

がん原性ならびに生殖発生への影響を含むセマグルチドの全身作用は、投与経路に依存せず、皮下投与の毒性試験プログラムで十分に評価されていると考えられる（M 1.13.1 参照）。ラット及びカニクイザルにおける *in vivo* 代謝試験の結果から、経口投与後にみられた代謝物プロファイルは、皮下投与後の代謝物プロファイルと同様であったと考えられる。

毒性試験プログラムを実施当時の FDA ガイドラインである「Draft Guidance for Industry and Review Staff: Nonclinical Safety Evaluation of Reformulated Drug Products and Products Intended for Administration by an Alternate Route」²では、処方変更及び経口投与への投与経路の変更に関して、急性及び反復投与

局所毒性試験を1種の動物種で実施することが推奨されていた。このことに基づいて、ラットにおけるセマグルチドの経口投与（セマグルチドとSNACを同時投与）による26週間慢性毒性試験において、局所及び全身毒性を評価した。本試験を実施する前に、ヒトにおける初回投与に先立ち、ラット及びサルにおける6週間の経口投与試験を実施した。急性局所毒性試験は不要と判断した。経口投与と皮下投与の試験結果を比較したところ、セマグルチドに関連した毒性学的に意義のある差異は認められず、SNAC単剤の毒性試験で認められた影響と比較して、セマグルチドの経口投与（セマグルチドとSNACを同時投与）による新たな毒性は認められなかった。

げっ歯類以外の動物種に対するセマグルチドの経口投与による亜慢性作用を確認するため、セマグルチドと別の吸収促進剤（*物質C）をカニクイザルに同時経口投与した17週間反復投与毒性試験（ノボ ノルディスク社における ██████████ を支持するために実施）も試験の概要に記載した。

経口セマグルチドの毒性試験の概要を[表 2.6.6-1](#)に示す。

表 2.6.6-1 経口セマグルチドの毒性試験プログラム

Study type and duration	Route of administration	Absorption enhancer used	Species	GLP Compliance	Study ID
Repeat dose toxicity					
2 weeks dose range finding	Oral (gavage)	SNAC	Rat/Sprague Dawley	No	208301
6 weeks	Oral (gavage)	SNAC	Rat/Sprague Dawley	Yes	208300
26 weeks	Oral (gavage)	SNAC	Rat/Sprague Dawley	Yes	210196
2 weeks dose range finding	Oral (capsule)	SNAC	Monkey/cynomolgus	No	208302
6 weeks	Oral (capsule)	SNAC	Monkey/cynomolgus	Yes	209153
17 weeks	Oral (capsule)	*物質C	Monkey/cynomolgus	Yes	209428

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、皮下投与セマグルチドの一般毒性試験においても使用した。

ラットにおける試験では、セマグルチドとSNACを含有する水溶液を強制経口投与し、サルにおける試験では、セマグルチドと吸収促進剤（SNAC又は*物質C）の混合末をカプセルに充てんし、動物に投与した。

2.6.6.1.2 結果及び結論

経口セマグルチドの非臨床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、経口セマグルチドのプログラムで認められた所見は、ヒトにおける安全性上の懸念とは考えられなかった。

経口セマグルチドの試験結果から、以下に述べるように、GLP-1 受容体の活性化を介した薬理作用、すなわち、摂餌量及び体重への直接的又は二次的作用と考えられる影響が主に認められた。

本プログラムにおいて実施された試験において、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 週間試験の最高用量群（60 mg/kg/日）の雌ラット 2 例が死亡し、本所見は、摂餌量の減少及び持続的な体重減少による二次的影響、すなわち、過剰な薬理作用によるものであると考えられた。観察された所見のほとんどは、セマグルチドで予想される影響、すなわち、摂餌量の減少、体重減少又は体重増加抑制であった。26 週間のラット試験で認められた、用量に関連したアルカリホスファターゼ（ALP）の増加は、4 週間の休薬期間中に回復した。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するものであった。いずれの試験においても、尿管における投与に関連した変化が認められなかったことから、尿中評価項目に毒性学的に懸念される変化はないと考えられた。投与に関連したブルンナー腺の組織学的変化がげっ歯類で認められ、げっ歯類ほど明らかでなかったものの、サルにおいても同様の変化がみられた。ブルンナー腺では GLP-1 受容体が高発現しており、皮下投与セマグルチドで詳しく述べられているように（M 1.13.1）、これらの所見は GLP-1 受容体の活性化に関連している可能性が高いと考えられる。これらの変化は、皮下投与セマグルチドの毒性試験プログラムのげっ歯類において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。ブルンナー腺の変化は、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、休薬により回復性が認められたこと、及び皮下投与セマグルチドのがん原性試験において、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る。

消化管に対するセマグルチドの局所作用に関連する安全性上の懸念は、いずれの試験においても認められなかった。

2.6.6.1.3 試験概要の概論

経口セマグルチドの毒性試験の概要文（M 2.6.6）及び概要表（M 2.6.7）に示すすべての試験では、セマグルチドの投与による影響があったと考えられる項目のみを記述、考察した。経口セマグルチドの試験では、セマグルチドのみを経口投与時の影響を評価できるよう、SNAC 又は *物質C

のいずれかを投与する同時溶媒対照群を設定した。吸収促進剤に関連すると考えられる影響は本概

要文には述べないが、SNACの影響に関する情報は2.6.6.11 付録を参照のこと。投与に関連した変化の記述で特に明記しない限り、値は対照群と比較して統計学的有意差があるとした。M 2.6.7 では統計学的有意差が明らかにされている。

有害でない、毒性学的意義のない又は毒性学的関連のない（同義として使用）と考えられた変化に関して、本概要文では用量や、どの性で認められた所見かといった詳細情報を提供しない場合がある。詳細は M 2.6.7 を参照のこと。

すべての重要な毒性試験は実施時のガイドラインに準拠して実施したことから、本概要では投与群及び評価項目について簡潔な記述に留めることとする。結果の解釈が重要でない限り試験デザインの詳細は記載しない。代わりに各試験デザインや評価項目に関する詳細は、個別の試験報告書を参照すること。

すべての毒性試験において、予定されている臨床投与経路である経口投与経路を用いた。ラットにおける試験では、強制経口投与によってセマグルチドを投与した。動物に、セマグルチドと SNAC を含む水溶液の pH を 8.5 に調整して投与した。対照群には、SNAC のみの水溶液の pH を 8.5 に調整して投与し、これに加えて、26 週間ラット試験では、対照物質として水のみを投与する対照群も設定した。サルにおける試験では、吸収促進剤として SNAC 又は *物質C のいずれかを含有した混合粉末として、ゼラチン又はヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）カプセルを用いてセマグルチドを投与した。サルにおける重要な試験では、各試験で 2 群の対照群を設定し、一方の群には SNAC 又は *物質C のみを投与し、もう一方のプラセボ対照群には空のカプセルを投与した。カプセルをサル咽喉部の奥に処置し、カプセルを飲み込ませた。

すべての重要な試験において、曝露の確認、トキシコキネティクス（TK）の評価とともに製剤中濃度分析を実施した。特に示さない限り、曝露量はセマグルチド投与群で確認した。これらの試験において、対照群の動物から得られた血漿試料の一部から、測定法における LLOQ をわずかに上回る、測定可能な濃度のセマグルチドが検出された。いずれの場合も、陽性試料の原因が *in vivo* に汚染である可能性は低いと考えられる、又は TK 評価への影響がみられなかったことから、試験の結果及び完全性に及ぼす影響は認められなかったと判断した。

TK に関する情報は、任意の所見の評価において重要であると考えられる場合のみ、毒性試験の概要文に示す。セマグルチドの TK の詳細については、M 2.6.7、M 2.6.4 及び M 2.6.5 を参照のこと。

毒性試験の高用量は、忍容性又は投与可能な最大用量に基づいて選択した。すべての試験における用量制限影響は、GLP-1 受容体作動薬で予想される摂餌量及び体重に及ぼす薬理作用と一致するもの

であった。摂餌量及び体重減少は、臨床においては、概して意図される有益な効果であると考えられることから、これらの影響は毒性試験において有害でないと判断した。

投与頻度は、ラットとサルともに臨床で予定している投与頻度である 1 日 1 回とした。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

経口セマグルチドの単回投与毒性試験は実施していない。皮下投与セマグルチドの単回投与毒性試験は、オゼンピックの非臨床試験の登録資料（M 1.13.1）に示されている。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

経口セマグルチドの反復投与毒性試験は、ラット及びサルにおける用量範囲設定（DRF）試験及び 6週間試験で構成した。さらに、ラットにおける 26 週間試験を実施し、サルにおける 17 週間試験（
*物質C を吸収促進剤として使用）を実施した。

サルにおける重要な反復投与試験では、目標とする用量期間の前に用量漸増期間を設けることでセマグルチドに対する忍容性を改善して、より高用量の投与を行った。重要な試験の概要中の記載として、目標とする用量に達する前の週／日は負の数で示した。すなわち第-1 週／第-1 日は目標とする用量期間等の前の週／日である。主試験の週／日、すなわち目標とする用量での試験期間は、いずれも正の数で示した。回復期間は「第 Rx 週」と記載し、例えば回復期間の第 2 週は「第 R2 週」と記載した。

重要な反復投与毒性試験の概要を[表 2.6.6-2](#)に示す。

表 2.6.6-2 経口セマグルチドの重要な反復投与毒性試験の概要

Species	Duration	Nominal dose levels (mg/kg/day)	NOAEL (mg/kg/day)	Effect(s) defining NOAEL	Study ID
Rat	6 weeks	0, 6.67, 33.36, 66.67	66.67	No treatment related adverse findings	208300
Rat	26 weeks	0, 6, 20, 60	20	The premature deaths of 2 animals at 60 mg/kg/day which were attributed to exaggerated pharmacodynamic effects on food consumption and body weight.	210196
Monkey	6 weeks	0, 5, 10	10	No treatment related adverse findings	209153
Monkey	17 weeks	0, 5, 20	20	No treatment related adverse findings	209428

2.6.6.3.1 ラットにおける反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1 ラットにおける用量範囲設定試験（M2.6.7.6、208301）

本非 GLP 試験の目的は、経口セマグルチドの毒性を評価し、以降に予定する重要なラット毒性試験で用いる適切な用量範囲を設定することであった。Sprague Dawley 系ラットにセマグルチド溶液を 1 日 1 回 2 週間強制経口投与した。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6-3 に示す。セマグルチド及び SNAC の比を 1/15 に固定した。バイオアベイラビリティが最大になるよう、投与前約 3 時間～投与後約 1 時間まで動物を絶食させた。

表 2.6.6-3 ラットにおける用量範囲設定試験（208301）

Group	Treatment	Semaglutide Nominal dose (mg/kg/day)	SNAC Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
				Males	Females
1	Control (SNAC)	0	1000	6	6
2	Oral semaglutide	6.67	100	6	6
3	Oral semaglutide	33.36	500	6	6
4	Oral semaglutide	66.67	1000	6	6

投与期間中又は終了時に下記に示す項目を評価した：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、TK、臓器重量（肝臓及び腎臓）、肉眼的病理検査及び選択した臓器の病理組織学的検査。

試験中に 4 例の死亡が認められた。これらの死亡はいずれも経口セマグルチドとの関連はないと考えられた。低用量群の雄 1 例では、採血後に眼窩神経叢からの出血が継続したことから安楽死させた。高用量群の雄 1 例が鼻及び口腔から泡を噴出して死亡し、中用量群の雌 1 例及び高用量群の雌 1 例は、努力性呼吸、立毛、受動性、円背位などの一般状態変化が生じたことから安楽死させた。後者の 3 例の死亡は誤投与によるものと推定されたが、このことを確認するための剖検を行わなかったため、死亡が SNAC に起因する可能性を否定できなかった。同様に、2 例に一過性の一般状態変化が認められ、試験報告書には投与操作自体に関連する所見であると記述されているが、後に考察した結果、SNAC による影響である可能性を否定できなかった（SNAC に関連する死亡の詳細は M2.6.6.11 付録を参照）。

高用量及び中用量群で投与初期の一過性の体重減少が認められ、全用量で投与期間を通じて体重増加抑制が認められた。2 週間の体重増加抑制率は、雄で最大 68%、雌で最大 40%であった。全用量で摂餌量の減少がみられており、体重変化は概して摂餌量を反映するものであった。

最低用量群の雄を除く全用量において、赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの軽微な低下が認められた。変化の程度が極めて小さかったことから、毒性学的意義はないと判断した。全用量において、血漿中トリグリセリド濃度の低下が認められた。これらの変化は、摂餌量の減少によって生じた可能性が高いと考えられた⁵。

雄では、肝臓の絶対及び相対重量が用量に関連して減少した。なお、最低用量である 6.67 mg/kg/日では、統計学的有意差は認められなかった。33.36 及び 66.67 mg/kg/日群の雌雄の両方で、肝細胞の染色希薄化の軽微な減少が認められた。肝臓の変化に関連する臨床検査項目に影響は認められず、これらの所見は、摂餌量の減少によるグリコーゲン枯渇に関連するものと考えられた。

以上より、セマグルチドを 66.67 mg/kg/日までの用量で 1 日 1 回 2 週間経口投与時の忍容性は良好であり、予想された摂餌量の減少及び体重増加抑制、ならびに摂餌量の減少による肝臓及び臨床検査項目に及ぼす影響が認められた。したがって、以降の毒性試験における適切な用量は 66.67 mg/kg/日であると考えられた。

2.6.6.3.1.2 ラットにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 (M2.6.7.7.A、208300)

本試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットにセマグルチド溶液を 1 日 1 回 6 週間強制経口投与時の毒性及び TK を評価することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6-4 に示す。用量選択は、以前に実施した用量範囲設定試験 (208301、[2.6.6.3.1.1](#)) で得られた情報に基づいて行った。セマグルチド及び SNAC の比を 1/15 に固定した。バイオアベイラビリティが最大となるよう、投与前約 3 時間～投与後約 1 時間まで動物を絶食させた。

表 2.6.6-4 ラットにおける 6 週間経口投与毒性試験 (208300)

Group	Treatment	Semaglutide Nominal dose (mg/kg/day)	SNAC Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
				Main study		Recovery study	
				Males	Females	Males	Females
1	Control (SNAC)	0	1000	10	10	6	6
2	Oral semaglutide	6.67	100	10	10	6	6
3	Oral semaglutide	33.36	500	10	10	6	6
4	Oral semaglutide	66.67	1000	10	10	6	6

投与期間中又は終了時に、以下の項目を評価した：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

溶媒対照群における製剤濃度分析の2試料とも、極めて低濃度（低用量濃度の1/10未満）ではあるが、セマグルチドが検出された。これは、分析中のキャリーオーバーによるものであると考えられたことから、投与に用いた溶媒への混入ではないと判断した。

試験中に10例の死亡が認められた。これらの死亡は、いずれもセマグルチドに関連するものではないと考えられた。対照群1例と低用量群1例の計2例の雄を、採血時の損傷により安楽死させた。雌8例（対照群2例、中用量群5例及び高用量群1例）が誤投与により死亡又は安楽死させた。これらの動物は、いずれも肺の肥大、赤色化及び硬化がみられ、これらの動物の一部では、胸腔中に液状物が認められた。

高用量群の全例で、第1～2日に活動性の低下、立毛及び円背が認められた。このことは、高用量及び中用量群において、投与初期かつ一過性の体重減少が認められたことと一致しており、セマグルチド投与に関連する可能性があると考えられた。また、高用量及び中用量群において、投与期間を通じて体重増加抑制が認められた。6週間の投与期間中の体重増加抑制率は、雄で最大47%、雌で最大54%であった。高用量及び中用量群では摂餌量が減少しており、体重推移は概して摂餌量を反映していた。概して、体重及び摂餌量に及ぼす影響はいずれも回復性が認められた。

高用量である66.67 mg/kg/日において、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）値の軽微な上昇がみられた。ただし、統計学的有意差が認められたのは雌のみであった。同様の傾向がより低用量においても認められたが、休薬期間の動物のALT値は対照群の動物と同程度であった。ラットでは、摂餌量の減少による二次的変化としてALT値の軽微な上昇が観察されている⁵。上昇は50%未満と軽微であり、相関する病理組織学的所見が認められなかったことから、ALT値の上昇は有害でないと考えられた。

雌では統計学的有意差は認められなかったものの、全投与群でトリグリセリドの低値が認められた。本所見は、2週間の休薬期間中に回復しなかった。本変化は、体重増加抑制及び摂餌量の減少による二次的変化であり⁵、有害ではないと考えられる。

尿検査の結果、投与期間終了時に、本剤を投与した雄の尿量及びpHがわずかに増加したが、1週間の休薬期間後には、このような増加は認められなかった。尿量の増加は、近位尿細管からのナトリウム再吸収に対するGLP-1の既知の阻害作用によるものであると考えられる⁶。尿管に関して、投与に関連した病理組織学的変化が認められなかったことから、尿中評価項目の変化は有害でないと考えられた。

複数の臓器重量に、セマグルチド投与の影響が認められた。影響がみられた臓器は、副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣等であった。絶対重量が減少したが相対重量に影響が認

められなかった場合、又は絶対重量に影響はないが、相対重量が増加した場合のいずれかが認められたことから、臓器重量に及ぼす影響は、体重に対するセマグルチドの薬理作用によるものであることが示された。なお、例外として高用量群の雄の前立腺の絶対及び相対重量がともに対照群に比べて減少した。摂餌量を制限したラットにおいても、同様の減少が報告されている⁵。相関する病理組織学的変化が認められなかったことから、前立腺重量の減少は有害でないと考えられた。休薬期間終了時、本剤を投与した動物の臓器重量はいずれも対照群と同程度であった。

病理組織学的検査の結果、セマグルチド投与群では、対照群に比べて、十二指腸のブルンナー腺の軽微な肥大の発現頻度が用量依存的に増加した。2週間の休薬期間後にブルンナー腺の肥大が認められなかったことから、本変化の回復性が示された。ブルンナー腺は、上部消化管管の酵素液として、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^{7,8}、肥大はセマグルチドによる GLP-1 受容体の活性化に関連するものと考えられた。ブルンナー腺で認められた所見は、ブルンナー腺又は消化管粘膜の炎症、又は細胞障害のいずれにも関連しなかったこと、及び休薬後に回復性が認められたことから、本所見は有害でないと考えられた。

以上より、有害な変化が認められなかったことから、試験した最高用量である 66.67 mg/kg/日が NOAEL と考えられた。

2.6.6.3.1.3 ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 (M2.6.7.7.B、210196)

本試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットにセマグルチド及び SNAC 溶液を 1 日 1 回 26 週間強制経口投与時の毒性及び TK を評価することであった。3 用量のセマグルチドを SNAC と同時投与し、対応する 3 用量の SNAC 単剤を対照物質として投与した。さらに、SNAC の影響を評価するため、水を投与する対照群を設定した。セマグルチドに対する忍容性を確保するため、目標用量での 26 週間投与期間の前に、2 週間の用量漸増期間を設けた。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6-5 に示す。セマグルチドの用量選択は、以前に実施されたラットにおける 6 週間試験 (208300、2.6.6.3.1.2) に基づいて行った。SNAC 投与群の概要の詳細は、M 2.6.6.11 付録 (JLY0278、210196 と同一試験) を参照のこと。

表 2.6.6-5 ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験 (210196)

Group	Treatment	Nominal dose of semaglutide/SNAC (mg/kg/day)			Number of animals			
		Week -2 ^a	Week -1 ^a	Weeks 1-26 ^b	Main study		Recovery study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (Water)	0	0	0	20	20	10	10
2	Control (SNAC)	0/90	0/90	0/90	20	20	10	10
3	Control (SNAC)	0/90	0/300	0/300	20	20	10	10
4	Control (SNAC)	0/90	0/300	0/900	20	20	10	10
5	Oral semaglutide	6/90	6/90	6/90	20	20	10	10
6	Oral semaglutide	6/90	20/300	20/300	20	20	10	10
7	Oral semaglutide	6/90	20/300	60/900	20	20	10	10

a: Dose escalation period

b: Main study period

投与及び休薬期間中又は終了時に、以下の項目を評価した：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血糖値、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

投与期間中、計 14 例の死亡が認められた。60 mg/kg/日群で認められた雌 2 例の死亡（安楽死 1 例、死亡 1 例）は、動物の一般状態が悪化していたことから、セマグルチドに関連する可能性があると考えられた。一般状態の悪化は、摂餌量の減少及び持続的な体重減少によって生じたと考えられることから、セマグルチドの過剰な薬理作用による可能性が考えられる。残りの 12 例の死亡のうち、1 例の死亡は投与中の損傷、残りの 11 例の死亡はいずれも SNAC に起因するものであり、詳細は 2.6.6.11 付録（JLY0278）に記載した。

20 及び 60 mg/kg/日群では、投与期間を通じて体重増加抑制が認められた。26 週間の投与期間中の体重増加抑制率は、雄で最大 45%、雌で最大 46%であった。投与期間終了時に高用量群の雌 10 例にやせた個体が認められ、うち 1 例が死亡した。20 mg/kg/日（雄のみ）及び 60 mg/kg/日では摂餌量の減少がみられており、体重推移は概して摂餌量を反映していた。概して、体重及び摂餌量に及ぼす影響はいずれも回復性が認められた。

血液学的検査の結果、雄では網赤血球数が減少したが、雌では本変化は認められなかった。摂餌量の減少により網赤血球数の減少が認められていることから⁵、セマグルチドを投与した雄でみられた影響は、摂餌量に対するセマグルチドの薬理作用による可能性が考えられる。本変化は軽微であり、部分的な回復性が認められ、赤血球評価項目に関して、各 SNAC 対照群と比べてその他の生物学的に意味のある変化が認められなかったことから、網赤血球数の減少は有害でないと考えられた。

セマグルチドとの関連性が不明な一部の生化学検査評価項目の変化が認められた。これらには、血漿クレアチニンの軽微な低下、尿素、リン及びカリウム濃度の軽微な増加が含まれた。血漿トリグリセリド濃度については、投与に関連した低下が明らかであった。雄におけるリン濃度の軽微な増加を除き、これらの変化は、部分的～完全な回復性が認められた。これらの生化学検査項目の変化は、摂餌量に対するセマグルチドの薬理作用による二次的な影響⁵、又は既知の GLP-1 の腎機能に及ぼす二次的な影響であると考えられた⁹。いずれの所見も軽微であり、有害でないと考えられた。

血液生化学検査の結果からは、ALP 活性のわずかな高値もみられたが、4 週間の休薬期間中に完全又は部分的な回復性が認められた。ラットでは、小腸性及び骨性アイソザイムが血漿中 ALP の主要構成成分であり¹⁰、これらの組織において投与に関連した有害な変化が認められなかったことから、ALP の増加は有害でないと考えられた。

尿中評価項目の変化として、尿量の増加、ナトリウム及び塩化物濃度の上昇などが認められた。これらの所見が、セマグルチド又は SNAC のいずれかに明らかに起因するとは判断できなかった。尿量の増加及びナトリウム濃度の上昇は、近位尿細管からのナトリウム再吸収に対する GLP-1 の既知の阻害作用によるもの⁶、又は、尿中評価項目の変化は SNAC 分子からのナトリウム排出に対する適応反応である可能性が考えられる。尿管への投与に関連した病理組織学的変化が認められなかったことから、尿中評価項目の変化はいずれも有害でないと考えられた。

ほぼすべての臓器の重量に、セマグルチド投与の影響が認められた。ほとんどの場合、絶対重量の減少又は相対重量の増加が認められたことから、臓器重量に及ぼす影響は、概して、体重に対するセマグルチドの薬理作用によるものであることが示された。絶対重量が減少したが、相対重量が変化しない場合〔肝臓、精巣上体、心臓、下垂体（雌）、卵巣、前立腺、唾液腺、精嚢、脾臓、胸腺〕、又は相対重量が増加した場合〔腎臓、脳、精巣及び下垂体（雄）〕が認められた。セマグルチド 20 又は 60 mg/kg/日群の肝臓、腎臓及び精巣上体の重量を除いて、すべての変化は、休薬後に体重と共に回復し、これらの変化はいずれも有害でないと考えられた。セマグルチドに起因するその他の臓器重量の変化として、雄で軽微な副腎重量の増加が認められた。本変化は SNAC 対照群では認められなかったことから、セマグルチドに起因するものであり、摂餌量及び体重に及ぼす影響による二次的なストレスに関連した変化であると考えられた。臓器重量の変化に病理組織学的な相関性はみられなかったことから、有害でないと判断した。

肉眼的病理検査の結果、60/900 mg/kg/日群の雌 6 例に異常な内容物を伴わない十二指腸の拡張が認められたが、相関する病理組織学的変化はなく、雄に同様の所見が認められなかったことから、十二指腸の拡張とセマグルチドとの関連性は不明であると考えられた。病理組織学的検査の結果からは、主に中用量及び高用量において、十二指腸のブルンナー腺に投与に関連した軽微～軽度の肥大も認め

られた。4週間の休薬期間後にブリンナー腺の肥大が認められなかったことから、本変化の回復性が示された。ブリンナー腺の所見がブリ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するものではなかったこと、休薬後に回復性が認められたことから、この所見は有害でないと考えられた。

病理検査では剖検時の子宮の菲薄化も認められ、組織検査時には子宮壁のすべての層に軽微～中程度の萎縮が認められた。これらの回復性の変化は、各個体の臓器重量の低値と相関しており、体重に及ぼすセマグルチドの影響による可能性が高いと考えられた。

SNAC 対照群では、軽微な小葉中心性肝細胞肥大の発現頻度がわずかに増加し、中用量及び高用量のセマグルチド投与群では、発現頻度がわずかではあるがさらに増加した。この増加は雌にのみ認められ、顕著でなかったことから、セマグルチド投与との関連性は不明であると考えられた。さらに、肝毒性を示唆する病理組織学的変化及び臨床検査の変化が認められなかったことから、肝細胞の肥大は有害でないと考えられた。休薬後に肝細胞の肥大が認められなかったことから、本所見は偶発的又は回復性の所見であることが示された。

以上より、摂餌量及び体重に対する過剰な薬理作用によるものと考えられる死亡が2例（60 mg/kg/日）に生じたことから、NOAELは20 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.2 サルにおける反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1 カニクイザルにおける最大耐量試験（M2.6.7.6、208302）

本試験（非 GLP）の目的は、経口セマグルチドの毒性及び TK を評価し、最大耐量（MTD）及び以降の重要なサルにおける毒性試験で用いる適切な用量範囲を設定することであった。本試験は、経口投与による用量漸増フェーズ、経口及び皮下投与による薬物動態フェーズ、経口投与による固定用量投与フェーズの3フェーズで構成した。経口セマグルチドは、SNACを含むカプセル投与によって行った。セマグルチドと SNAC の比は 1/15 に固定した。バイオアベイラビリティが最大になるよう、給餌の約2時間前に投与を行った。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6-6、表 2.6.6-7 及び表 2.6.6-8 に示す。動物福祉上の理由により、1日2カプセル（00号）の投与が、カニクイザルに投与可能な最大用量であると判断した。

表 2.6.6-6 カニクイザルにおける MTD 試験（用量漸増フェーズ）（208302）

Group	Treatment	Day	Semaglutide	SNAC	Number of animals	
			Nominal dose (mg/animal/day) ^a	Nominal dose (mg/animal/day) ^b	Males	Females
1	Oral semaglutide	1-4	10.69	160.31	2	2
		8-11	15.63	234.37		
		15-18	31.26	468.74		

a: Corresponding to 2.7-3.9, 4-6, and 8.1-12.3 mg/kg/day, respectively

b: Corresponding to 39.8-57.9, 60.4-90.5, and 121.8-184.5 mg/kg/day, respectively

表 2.6.6-7 カニクイザルにおける MTD 試験（薬物動態フェーズ）（208302）

Group	Treatment	Day	Semaglutide	SNAC	Number of animals	
			Nominal dose	Nominal dose (mg/animal) ^b	Males	Females
2	S.C. semaglutide	1	0.01 mg/kg	N/A	2	2
	Oral semaglutide	15	31.26 mg/animal ^a	468.74		

a: Corresponding to 6.7-11.9 mg/kg

b: Corresponding to 99.9-178.2 mg/kg

表 2.6.6-8 カニクイザルにおける MTD 試験（固定用量投与フェーズ）（208302）

Group	Treatment	Day	Semaglutide	SNAC	Number of animals	
			Nominal dose (mg/animal/day) ^b	Nominal dose (mg/animal/day) ^c	Males	Females
3 ^a	Oral semaglutide	1-14	31.26	468.74	4	4

a: Consisting of animals previously used in Groups 1 and 2

b: Corresponding to 6.8-13.0 mg/kg/day

c: Corresponding to 102-194 mg/kg/day

投与期間中又は終了時に、以下の項目を評価した：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、TK、臓器重量及び肉眼的病理検査。

経口セマグルチドの忍容性は概して良好であった。試験中に死亡は生じず、用量漸増フェーズ及び薬物動態フェーズに、投与に関連した一般状態変化は認められなかった。雌 2 例に、嘔吐、円背位、活動性低下等の投与に関連すると考えられる軽微な一般状態変化が、固定用量投与フェーズの初回投与後 2 日間に認められた。試験のすべてのフェーズで、摂餌量及び体重の減少又は体重増加抑制が認

められた。体重増加抑制がみられた雄 1 例及び雌 1 例を除いて、固定用量投与フェーズの第 1～15 日の全体的な体重減少は 7～13%であった。

固定用量投与フェーズ終了時の網赤血球数は投与前に比べて少なく、ほとんどの動物の網赤血球数は、背景データの下限值未満であった。一方、その他の赤血球評価項目には生物学的に意義のある変化は認められなかった。血液生化学的検査の結果、尿素、リン及びトリグリセリドの血漿中濃度が低値であった。これらの臨床検査所見は摂餌量の減少に起因することから、セマグルチドの薬理作用によるものと考えられる。

雄 2 例及び雌 2 例において、背景データと比べて、胸腺の小型化又は胸腺重量の低値が認められた。胸腺重量の低値は、投与操作及び摂餌量の減少によるストレスに関連した所見であると考えられる¹¹。

以上より、カニクイザルにセマグルチドカプセルを 31.26 mg/例/日（6.8～13.0 mg/kg/日に相当）までの用量で 1 日 1 回最長 2 週間経口投与時の忍容性は良好であり、あらかじめ想定された摂餌量及び体重の減少、摂餌量の減少による臨床検査項目及び臓器重量に及ぼす影響が認められた。したがって、本用量は以降の毒性試験において、用量漸増後に投与する用量として適していると判断した。

2.6.6.3.2.2 カニクイザルにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（M2.6.7.7.C、209153）

本試験の目的は、カニクイザルにセマグルチドカプセルを 1 日 1 回 6 週間経口投与時の毒性及び TK を評価することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6-9 に示す。用量は、以前に実施された MTD 試験（208302）において、投与可能な最大用量が 00 号カプセル 2 個であると判断されたことに基づいて選択した。セマグルチドと SNAC の比は約 1/15 に固定した。バイオアベイラビリティが最大になるよう、給餌の約 2 時間前に投与を行った。

表 2.6.6-9 カニクイザルにおける 6 週間経口投与毒性試験 (209153)

Group	Treatment	Semaglutide Nominal dose (mg/kg/day)		SNAC Nominal dose (mg/kg/day)		Number of animals			
		Week -1 ^b	Week 1-6 ^c	Week -1 ^b	Weeks 1-6 ^c	Main study		Recovery study	
						Males	Females	Males	Females
1	Control (Placebo) ^a	0	0	0	0	4	4	0	0
2	Control (SNAC)	0	0	78.35	156.7	4	4	2	2
3	Oral semaglutide	5.0	5.0	78.35	78.35	4	4	2	2
4	Oral semaglutide	5.0	10.0	78.35	156.7	4	4	2	2

a: Dosed with an empty capsule

b: Dose escalation period

c: Main study period

投与期間中又は終了時に以下の項目を評価した：生存数、一般状態観察、体重、神経行動学的評価、眼科学的検査、心電図、血圧、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

カプセルは、各個体の体重に基づいて週 1 回作製した。概して、カプセルの含量は許容可能であると考えられたが、セマグルチド投与群の動物に投与される分析カプセルの含量に関して、2/65 個で軽微な低値（標準量の約 80%）又は高値（標準量の約 140%）が認められた。カプセル含量の逸脱が認められたものの、逸脱はわずかであり、試験の結果に影響を及ぼすことはないと考えられる。

セマグルチド経口投与の忍容性は概して良好であった。死亡は認められず、セマグルチド投与に関連すると考えられる一般状態変化は認められなかった。

用量漸増フェーズ及び主試験フェーズのセマグルチド投与群において、対照群に比べて体重減少又は体重増加抑制が認められた。雌では、両群とも概してわずかな体重減少が認められた。体重に及ぼす影響は休薬後に回復した。

第 6 週の投与後 2 及び 24 時間に、10 mg/kg/日群の雄の心拍数が、SNAC 対照群に比べてわずかに増加（+10%）した。この増加には、ある程度、投与開始前にみられた傾向が反映されており、毒性学的懸念はないと考えられた。また、高用量群の雄において、第 6 週の投与後 2 又は 24 時間に、SNAC 対照群に比べて ST、QT 及び QTc 間隔の軽微な短縮が認められた。一方、プラセボ対照群との差異は認

められず、投与前にも同様の傾向が認められていたことから、これらの所見に毒性学的懸念はないと考えられた。

目標用量での投与第2日に、セマグルチド投与群で網赤血球数が減少した。ただし、低用量群の雌では統計学的有意差は認められなかった。一方、第6週では本所見はみられず、赤血球評価項目にその他の変化が認められなかったことから、網赤血球数の減少は有害でないと考えられた。

血液生化学的検査の結果、高用量群の雌において尿素の増加が認められたが、セマグルチドを投与した雄では、本所見は認められなかった。2週間の休薬後、高用量を投与した雌の尿素濃度は投与終了時よりも低く、回復性が確認された。尿素の増加に関して、有害な原因を示唆する徴候が認められなかったことから、本変化は有害でなく、タンパク質の異化作用を増加させる可能性がある、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの影響によるものと考えられた。

尿検査の結果、おそらく SNAC に起因すると考えられる少数の変化が認められたが、塩化物濃度の軽微な低値は、雄のプラセボ対照群との差のみ統計学的に有意であり、SNAC 対照群との差は有意でなかったものの、セマグルチドに関連する可能性も否定できないと考えられた。雄の休薬期間終了時の塩化物濃度は予想値よりも依然として低かった。腎臓重量に影響は認められず、関連する病理組織学的所見がみられなかったため、尿の本変化は有害でないと考えられた。

6週間の投与後及び休薬期間後の両方において、本剤を投与した動物の数例に、退縮／萎縮による胸腺重量の減少が認められた。SNAC 対照群の動物2例（投与期間終了時に1例、休薬期間終了時に1例）にも軽微な変化が認められたことから、セマグルチド投与との関連性は不明である。本所見は、体重に及ぼす影響及び投与操作によるストレスに関連した所見¹¹である可能性が考えられる。発現頻度及び重症度が低かったことから、本所見に毒性学的意義はないと考えられる。

5 mg/kg/日群の1例及び10 mg/kg/日群の2例に、十二指腸のブルンナー腺の軽微な拡張及び好酸性細胞質が認められた。2週間の休薬期間後には、本所見は認められなかった。ブルンナー腺では GLP-1 受容体が高発現しているが²⁸、これらの所見の発現頻度が低く、軽微であったこと、及びブルンナー腺の病理組織学的検査において解剖学的／生物学的変動が大きいことから、セマグルチド投与との関連性は不明である。ブルンナー腺で認めれた所見は、ブルンナー腺又は消化管粘膜の炎症又は細胞障害のいずれにも関連するものではなかったことから、これらの所見は有害でないと考えられた。

以上より、投与に関連した有害な影響が認められなかったことから、NOAEL はセマグルチドの最高用量である 10 mg/kg/日と設定された。

2.6.6.3.2.3 カニクイザルにおける 17 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（M2.6.7.7.D、209428）

本試験の目的は、カニクイザルにセマグルチドカプセルを 1 日 1 回 17 週間経口投与時の毒性及びTK を評価することであった。本試験では、吸収促進剤として、SNAC ではなく *物質C を使用した。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6-10 に示す。用量選択は予備試験¹²で得られた情報に基づいて行い、投与可能な最大用量に近いと考えられ、体重減少（体重増加抑制）をもたらすと予想される用量とした。セマグルチドと *物質C の比は約 1/15 に固定した。バイオアベイラビリティが最大になるよう、給餌の約 2 時間前に投与を行った。

表 2.6.6-10 カニクイザルにおける 17 週間経口投与毒性試験（209428）

Group	Treatment	Semaglutide		*物質C		Number of animals			
		Nominal dose (mg/kg/day)		Nominal dose (mg/kg/day)		Main study		Recovery study	
		Week -1 ^b	Week 1-17 ^c	Week -1 ^b	Weeks 1-17 ^c	Males	Females	Males	Females
1	Control (Placebo) ^a	0	0	0	0	4	4	0	0
2	Control (*物質C)	0	0	75/150	300	4	4	2	2
3	Oral semaglutide	5/5	5	75/75	75	4	4	2	2
4	Oral semaglutide	5/10	20	75/150	300	4	4	2	2

a: Dosed with an empty capsule

b: Dose escalation period, day 1-4/day 5-7

c: Main study period

投与期間中又は終了時に下記の項目を評価した：生存数、一般状態観察、体重、神経行動学的評価、眼科学的検査、心電図、血圧、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK、抗体産生、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

経口セマグルチドの忍容性は概して良好であった。投与期間の第 8 週以降、高用量群の雌 2 例にやせた個体が認められたが、投与に関連したその他の一般状態変化は認められなかった。プラセボ対照群の雄 1 例において、右腕の偶発的骨折が継続したことから、当該動物を用量漸増期間中に安楽死させた。

用量漸増フェーズ及び主試験フェーズのセマグルチド投与群において、対照群に比べて体重減少又は体重増加抑制が認められた。休薬後、体重に及ぼす影響は回復した。

目標用量での投与第2日に、セマグルチド投与群で網赤血球数が減少した。ただし、低用量群の雄では統計学的有意差は認められなかった。一方、第17週では本所見は認められず、赤血球評価項目にその他の変化が認められなかったことから、網赤血球数の減少は有害でないと考えられた。

血液生化学的検査の結果、高用量群の主試験期間の第2日で尿素の増加が認められ、高用量群の雄では、投与期間の終了時にも認められた。2週間の休薬期間後の尿素濃度は対照群と同程度であり、回復性が示された。尿素の増加に関して、有害な原因を示唆する徴候が認められなかったことから、本変化は、タンパク質の異化作用を増加させる可能性がある、摂餌量及び体重に及ぼすセマグルチドの影響によるものと考えられる。さらに、第2日及び第17週の高用量群の雄の血漿中グルコース濃度は対照群よりも低く、すべての動物において、個体値は投与前値よりも低かった。2週間の休薬期間終了時のグルコース濃度は、投与期間終了時の値よりも高かったことから、回復性が確認された。

主に高用量群で腎臓及び下垂体の絶対重量が減少した。一方、相対重量に影響は認められなかったことから、これらの所見が体重に及ぼすセマグルチドの二次的な影響によるものが示された。下顎唾液腺の絶対重量の減少、及びそれに伴う体重に対する相対重量の減少傾向が、高用量群の雄、

*物質C 対照群の雌ならびに低用量及び高用量群の雌で認められた。パターンに一貫性が認められなかったことから、セマグルチドとの関連性は不明である。しかしながら、病理組織学的変化が認められなかったことから、本所見に毒性学的懸念はないものと考えられた。

高用量群の雌において胸腺重量の減少が認められた。さらに、病理組織学的検査の結果、17週間の投与後及び休薬期間後の両方とも、セマグルチド投与群及び対照群に胸腺の退縮／萎縮が認められた。したがって、セマグルチド投与との関連性は不明である。本所見は、体重に及ぼす影響及び投与操作によるストレスに関連した所見¹¹である可能性が考えられ、毒性学的意義はないと考えられる。

以上より、投与に関連した有害な影響が認められなかったことから、NOAELはセマグルチドの最高用量である20 mg/kg/日と設定された。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

セマグルチドの遺伝毒性評価は、オゼンピックの非臨床試験の登録資料（M 1.13.1）に示されている。

2.6.6.5 がん原性試験

セマグルチドのがん原性評価は、オゼンピックの非臨床試験の登録資料（M 1.13.1）に示されている。

全身性のがん原性を含め、セマグルチドの全身作用は投与経路に依存しないことから、皮下投与プログラムで十分に評価されていると考えられる。ラット（及びサル）において、経口投与経路に特有の主要代謝物は認められなかった。ラットにおける経口及び皮下投与を用いた最長 26 週間の試験結果を比較したが、セマグルチドに関連した毒性学的に意義のある差異が認められなかったこと、及び SNAC 単剤の毒性試験で認められた影響と比較して、セマグルチドの経口投与（セマグルチド及び SNAC を同時投与）による新たな毒性は認められなかったことから、セマグルチドの経口投与によるがん原性試験は実施していない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

セマグルチドの生殖発生毒性評価は、オゼンピックの非臨床試験の登録資料（M 1.13.1）に示されている。

生殖及び発生に及ぼす影響を含め、セマグルチド経口投与の全身作用は投与経路に依存しないことから、皮下投与プログラムで十分に評価されていると考えられる。ラット及びサルにおいて、経口投与経路に特有の主要代謝物は認められず、経口投与と皮下投与を比較した代謝物プロファイルは同様であった。このことから、セマグルチドの経口投与による生殖発生毒性試験は実施していない。

2.6.6.6.1 幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いたセマグルチドの毒性の評価は、オゼンピックの非臨床試験の登録資料（M 1.13.1）に示されている。

2.6.6.7 局所刺激性試験

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（[2.6.6.3](#) 項）。結論として、消化管に対する局所毒性は認められなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 免疫原性

ペプチド医薬品に対する抗体産生により、薬剤の曝露量が減少し、毒性試験の評価を妨げる可能性がある。したがって、セマグルチドのすべての重要な反復経口投与毒性試験において、抗セマグルチ

ド抗体産生を検討した。これらの試験において、抗セマグルチド抗体が検出された動物は認められなかった。

2.6.6.8.2 免疫毒性

免疫毒性試験は実施していない。血液学的評価項目、血漿グロブリン、免疫臓器の重量及び病理組織学といった標準的な免疫毒性評価項目を重要な反復毒性試験に含めた。免疫毒性の徴候は認められなかった。

2.6.6.8.3 依存性

セマグルチドの化学構造及び基礎薬理学から、乱用性／依存性薬物との類似性はみられない。さらに、乱用性／依存性に関連した神経伝達物質システム受容体／トランスポーターとセマグルチドとの結合性は示されていない。以上のこと及び心血管系作用、体温及び自然発生活動に関する非臨床試験に基づくと、セマグルチドは乱用性／依存性に関連しないものと考えられる。さらに、乱用性／依存性は市販の GLP-1 受容体作動薬では知られていない。したがって、皮下投与及び経口投与のいずれにおいても、セマグルチドの非臨床薬物乱用性／依存性試験による評価は実施していない。

2.6.6.8.4 代謝物

セマグルチドは、ペプチド骨格のタンパク分解及び脂肪酸側鎖の連続的 β 酸化により代謝される。ヒト血漿中のセマグルチドの代謝物プロファイルは、ラット及びサルに皮下投与時のプロファイルと同様である。したがって、代謝物の安全性を評価する毒性試験は必要ないと考えられた。

2.6.6.8.5 経口セマグルチドの臨床処方に含まれる添加剤の評価

新添加剤である SNAC の非臨床安全性評価は M2.6.6.11 付録に示す。さらに、錠剤にはセルロース（結晶）、ポビドン及びステアリン酸マグネシウムが含有されており（M 2.3.P.1、製剤及び処方）、これらは長期経口投与に用いる他の市販製剤で十分な実績がある。

2.6.6.8.6 不純物

2.6.6.8.6.1 目的物質由来不純物の評価

セマグルチドの製剤規格には、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。HMWP 及びこれらの不純物は、セマグルチドの目的物質由来不純物であり、不純物の特性（M 3.2.P.5.5）に示されている。申請する有効期間規格（proposed shelf-life acceptance criteria）は規格及び試験方法（M 3.2.P.5.1）に示す。

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、**法**（**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、**法**を**法**に**法**させて**法**する方法（**法**）を開発した。**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**法**を、**法**を**法**する新たな**法**を用いて改良した（**法**）。**法**によるセマグルチドを、第3相臨床試験で用いた。

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）。セマグルチドの製剤開発の概要は製剤開発の経緯（M 2.3.P.2）に示す。

非臨床安全性試験に用いた経口セマグルチドのロットの概要は、M2.6.7.4に示す。

不純物の遺伝毒性試験は実施していない。セマグルチドは遺伝毒性を有さないことが示されており（[2.6.6.4](#)項）、不純物は構造的にセマグルチドと類似することから、変異原性誘発性はないものと考えられる。

ラットにおける26週間毒性試験（210196）で検討した不純物レベル及び申請する有効期間規格の比較を[表 2.6.6-11](#)に示す。

表 2.6.6-11 毒性試験で評価した不純物レベル及び申請する有効期間規格

Impurity group	Proposed shelf-life limits (%)	Impurity level tested in 26-week rat toxicity study (%)	Rat impurity dose at NOAEL (mg/kg/day)	Human impurity dose (mg/kg/day)	Animal to human ratio (fold)
Hydrophilic impurities					
Hydrophobic impurities 1					
Hydrophobic impurities 2					
Sum of impurities					
HMWP					

経口セマグルチドのラットにおける26週間毒性試験では、NOAELで検討した動物用量は、すべての不純物に関して、最大臨床用量（MRHD）の14 mg/日におけるヒト用量よりも**～**倍高かった。したがって、セマグルチド製剤から同定された不純物は非臨床試験で安全性が確認されたと考えら

れ、申請する有効期間規格は妥当と考えられる。一部の不純物に関しては、3 mg 及び 7 mg 錠に対して申請する有効期間規格が、14 mg 錠の規格よりも [REDACTED] 設定されている。ただし、これらの錠剤は不純物の [REDACTED] ことから、3 mg 及び 7 mg 錠に対して申請する有効期間規格も妥当と考えられる。

2.6.6.9 曝露量及び MRHD（14 mg/日）の曝露量比較

重要な毒性試験に関して、試験終了時に全用量で測定したセマグルチドの曝露量と、MRHD の 14 mg/日における定常状態のヒト曝露量との比較を [表 2.6.6-12](#) に示す。ヒト曝露量は、日本人の 2 型糖尿病患者の曝露量に関する第 3a 相の日本人におけるモデリング報告書（M 5.3.3.5）に基づいている。

表 2.6.6-12 重要な毒性試験における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} ^a (nmol/L)	Exposure multiple ^b
Human (type 2 diabetes) - 14 mg/day	18.8	400.8	16.7 ^c	
Repeated Dose Toxicity				
<u>Rat, 6-week (208300)</u>				
6.67 mg/kg/day	10.9	41.6	1.7	0.1
33.36 mg/kg/day	98.3	891	37	2.2
66.67 mg/kg/day (NOAEL)	388	3825	159	9.5
<u>Rat, 26-week (210196)</u>				
6 mg/kg/day	9.4	86	3.6	0.2
20 mg/kg/day (NOAEL)	780	1752	73	4.4
60 mg/kg/day	336	3695	154	9.2
<u>Monkey, 6-week (209153)</u>				
5.0 mg/kg/day	45	811	34	2.0
10.0 mg/kg/day (NOAEL)	221	4011	167	10
<u>Monkey, 17-week (209428)</u>				
5 mg/kg/day	4.8	91	3.8	0.2
20 mg/kg/day (NOAEL)	133	2578	107	6.4

Abbreviations: NOAEL: No observed adverse effect level

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

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

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

2.6.6.10 考察及び結論

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作用と考えられる影響が主に認められた。

がん原性ならびに生殖及び発生に及ぼす影響を含め、セマグルチドの全身作用は投与経路に依存しないことから、皮下投与プログラムで十分に評価されていると考えられる。ラット及びカニクイザルにおける *in vivo* 代謝試験の結果、経口投与後にみられた代謝物プロファイルは、皮下投与後の代謝物プロファイルと同様であったと考えられる^(13及び M 2.6.4)。さらに、経口投与及び皮下投与を用いた最長 26 週間の試験結果を比較したが、セマグルチドに関連した毒性学的に意義のある差異が認められなかったこと、及び SNAC 単剤の毒性試験で認められた影響と比較して、セマグルチドの経口投与（セマグルチド及び SNAC を同時投与）による新たな毒性は認められなかった。このことから、経口セマグルチドの毒性試験パッケージは適切と考えられる。

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 例が死亡した。これらはいずれも、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。忍容性が確立されるまで、試験間を通じて、ごくわずかな一過性の一般状態変化が認められた。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評価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¹⁴。

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するものであった⁶。いずれの試験においても、尿管への投与に関連した変化が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 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依存的に増加し、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¹⁵、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。経口及び皮下投与でそれぞれラットに 26 週間投与した 2 試験では、同一曝露量において、本所見の発現頻度及び重症度が同等であった。ブルンナー腺のこれらの変化は有害でないと考えられ、ヒトにおいて安全性上の懸念とは考えられなかった。ブルンナー腺の変化は、ブルンナー腺及び消化管粘膜の炎症及び細胞障害のいずれにも関連しなかった。休薬により回復性が認められ、皮下投与のがん原性試験において、過形成及び腫瘍形成への進展は認められなかった。

セマグルチドとの関連性が不明であった 2 つの所見に関しては、毒性学的懸念はないと考えられた。ラットにおける 26 週間試験の SNAC 対照群において、軽微な小葉中心性肝細胞肥大の発現頻度がわずかに増加し、中用量及び高用量のセマグルチド投与群では、発現頻度がわずかではあるがさらに増加した。この増加は雌にのみ認められわずかであること、ラットにセマグルチドを皮下投与した試験では同様の変化が認められなかったことから、セマグルチド投与との関連性は不明であると考えられた。さらに、肝毒性を示す病理組織学的変化又は臨床検査的变化が認められなかったことから、肝細胞の肥大は有害でないと考えられた。休薬後に肝細胞の肥大が認められなかったことから、本所見は偶発的又は回復性の所見であることが示された。さらに、サルにおける 6 週間の試験において、雄の心拍数が約 10%増加したが、この増加には、ある程度投与開始前にみられた傾向が反映されていた。雌の心拍数に対照群との差異は認められなかった。サルにおける 17 週間試験では、心拍数の増加は認められなかった。

参考文献

- ¹ 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.
- ² 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.
- ³ 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.
- ⁴ FDA. Guidance for Industry. Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients. May 2005.
- ⁵ Moriyama T, Tsujioka S, Ohira T, Nonaka S, Ikeda H, Sugiura H, et al. Effects of reduced food intake on toxicity study parameters in rats. *J Toxicol Sci.* 2008;33(5):537-47.
- ⁶ Moreno C, Mistry M, Roman RJ. Renal effects of glucagon-like peptide in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002;434(3):163-7.
- ⁷ Körner M, Stöckli 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.
- ⁸ Pyke C, Heller RS, Kirk RK, Ørskov 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.
- ⁹ Whalan JE. A Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals. Office of Research and Development, United States Environmental Protection Agency, Washington DC , USA. 2015:p. 89. A Toxicologist's Guide to Clinical Pathology in Animals2015.
- ¹⁰ Evans GO. Animal Clinical Chemistry, A Practical Handbook for Toxicologists and Biomedical Researchers. 2nd ed. London: CRC Press; 2009. p. 17-36 (specifically: p. 24). 2009.
- ¹¹ 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.
- ¹² Jensen L, Helleberg H, Roffel A, van Lier JJ, Bjørnsdottir I, Pedersen PJ, et al. Absorption, metabolism and excretion of the GLP-1 analogue semaglutide in humans and nonclinical species. *Eur J Pharm Sci.* 2017;104:31-41.
- ¹³ Jensen L, Helleberg H, Roffel A, van Lier JJ, Bjørnsdottir I, Pedersen PJ, et al. Absorption, metabolism and excretion of the GLP-1 analogue semaglutide in humans and nonclinical species. *Eur J Pharm Sci.* 2017;104:31-41.

リベルサス錠 3mg
リベルサス錠 7mg
リベルサス錠 14mg

2.6.6.11 付録
サルカプロザートナトリウム
毒性試験の概要文

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	5
表目次	5
略語一覧	8
2.6.6.11.1 まとめ	12
2.6.6.11.1.1 非臨床毒性試験プログラム	12
2.6.6.11.1.2 結果及び結論	14
2.6.6.11.1.2.1 一般毒性	15
2.6.6.11.1.2.2 遺伝毒性及びがん原性	16
2.6.6.11.1.2.3 生殖発生毒性	16
2.6.6.11.1.2.4 局所刺激性	16
2.6.6.11.1.3 試験概要の概論	17
2.6.6.11.2 単回投与毒性試験	18
2.6.6.11.2.1 マウスにおける単回投与毒性試験	18
2.6.6.11.2.1.1 マウスにおける単回経口投与毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.5、EMIS/R96007） ..	18
2.6.6.11.2.2 ラットにおける単回投与毒性試験	19
2.6.6.11.2.2.1 ラットにおける単回経口投与毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.5、EMIS/R96009） ..	19
2.6.6.11.3 反復投与毒性試験	20
2.6.6.11.3.1 マウスにおける試験	21
2.6.6.11.3.1.1 マウスにおける DRF 試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.6、JLY0382）	21
2.6.6.11.3.1.2 マウスにおける 13 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.A、A16705）	23
2.6.6.11.3.2 ラットにおける試験	24
2.6.6.11.3.2.1 ラットにおける DRF 試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.6、WIL-315002）	24
2.6.6.11.3.2.2 ラットにおける 2 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.B、WIL-315004）	26
2.6.6.11.3.2.3 ラットにおける 13 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.C、WIL-315003） ..	27
2.6.6.11.3.2.4 ラットにおける 13 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.D、A62807）	28
2.6.6.11.3.2.5 ラット 26 週間経口毒性試験及び 4 週間回復試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.E、 JLY0278）	29
2.6.6.11.3.2.6 ラットにおける 26 週間中間群を含む 52 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、 2.6.7.18.7.F、BNA00004）	32
2.6.6.11.3.3 サルにおける試験	34
2.6.6.11.3.3.1 アカゲザルにおける 2 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.G、3007-97）	34

2.6.6.11.3.3.2	カニクイザルにおける 4 週間経口毒性試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.H、694-95)	35
2.6.6.11.3.3.3	アカゲザルにおける 13 週間経口毒性試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.I、3060-98)	37
2.6.6.11.3.3.4	カニクイザルにおける 16 週間経口毒性試験及び 2 週間回復性試験 (M 2.6.7.18 付録、 2.6.7.18.7.J、JLY0387)	38
2.6.6.11.3.3.5	アカゲザルにおける 39 週間経口毒性試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.K、 BNA00003)	39
2.6.6.11.4	遺伝毒性試験	40
2.6.6.11.4.1	<i>In vitro</i> 遺伝毒性試験	41
2.6.6.11.4.1.1	4 種のヒスチジン要求性株の <i>Salmonella typhimurium</i> 及び 1 種のトリプトファン要求 性株の <i>Escherichia coli</i> を用いた復帰突然変異試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.8.A、 0725-2140)	41
2.6.6.11.4.1.2	培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.8.B、 0545-3300)	41
2.6.6.11.4.2	<i>In vivo</i> 遺伝毒性試験	41
2.6.6.11.4.2.1	SNAC 投与マウスの骨髄を用いた小核試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.9.A、0374- 1521)	41
2.6.6.11.5	がん原性試験	42
2.6.6.11.5.1	rasH2 トランスジェニックマウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験 (M 2.6.7.18 付 録、2.6.7.18.10.A、JLY0436)	42
2.6.6.11.5.2	Sprague Dawley 系ラットにおける 104 週間経口がん原性試験 (M 2.6.7.18 付録、 2.6.7.18.10.B、JLY0366)	44
2.6.6.11.6	生殖発生毒性試験	46
2.6.6.11.6.1	ラットにおける受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験	47
2.6.6.11.6.1.1	ラットにおける受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験 (M 2.6.7.18 付録、 2.6.7.18.12.A、805-003)	47
2.6.6.11.6.2	ラットにおける胚・胎児の発生に関する試験	48
2.6.6.11.6.2.1	ラットにおける予備的 DRF 及び胚・胎児の発生に関する試験 (M 2.6.7.18 付録、 2.6.7.18.11、805-002P)	48
2.6.6.11.6.2.2	ラットにおける胚・胎児の発生に関する試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.13.A、805- 002)	49
2.6.6.11.6.3	ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験	50
2.6.6.11.6.3.1	ウサギにおける DRF 及び胚・胎児の発生に関する予備試験 (M 2.6.7.18 付録、 2.6.7.18.11、805-001P)	50

2.6.6.11.6.3.2	ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.13.B、805-001）	51
2.6.6.11.6.4	ラットにおける胚・胎児の発生ならびに出生前及び出生後の発生に関する試験	52
2.6.6.11.6.4.1	Sprague Dawley 系ラットにおける胚・胎児及び出生前ならびに出生後の発生に関する試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.14.A、805-004）	52
2.6.6.11.6.5	幼若動物を用いた試験	54
2.6.6.11.7	局所刺激性試験	54
2.6.6.11.7.1	イヌにおける単回投与胃局所刺激性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.16、JLY0558）	54
2.6.6.11.8	その他の毒性試験	55
2.6.6.11.8.1	免疫原性試験	55
2.6.6.11.8.2	免疫毒性試験	55
2.6.6.11.8.2.1	ラットにおける 4 週間免疫毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.B、523561）	56
2.6.6.11.8.3	依存性試験	57
2.6.6.11.8.4	代謝物	57
2.6.6.11.8.5	不純物	57
2.6.6.11.8.6	動物の死亡を検討するメカニズム試験	57
2.6.6.11.8.6.1	<i>In vitro</i> 試験	58
2.6.6.11.8.6.1.1	ラット肝ミトコンドリアの ATP 産生及び酵素活性に及ぼす影響（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.G、NN-2013-001）	58
2.6.6.11.8.6.1.2	細胞の酸素消費速度により測定した細胞呼吸に及ぼす SNAC の影響（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.G、■140919、■140926、■140912、■141003 及び ■141010）	59
2.6.6.11.8.6.2	<i>In vivo</i> 試験	61
2.6.6.11.8.6.2.1	マウスにおける単回投与忍容性及び TK 試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.H、JLY0557）	61
2.6.6.11.8.6.2.2	ラットにおけるテレメトリー及びプレチスモグラフィ併用試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.I、0NNC11）	62
2.6.6.11.8.6.2.3	ラットにおける単回経口投与検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.J、JLY0412）	63
2.6.6.11.8.6.2.4	ラットにおける単回静脈内投与検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.K、JLY0413）	66
2.6.6.11.8.6.2.5	グルコースを併用投与したラットにおける単回経口投与検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.L、JLY0468）	67
2.6.6.11.8.6.2.6	異なる絶食レジメンを用いたラットにおける単回経口投与検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.M、JLY0517）	69

2.6.6.11.8.6.2.7 ラットにおける 13 週間経口毒性検討試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.N、JLY0532)	72
2.6.6.11.8.6.2.8 ラットにおける心臓組織の ATP 濃度を評価する検討試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.O、 XXXXXXXXXX 140701)	73
2.6.6.11.8.6.2.9 ラットにおける心臓及び肝組織の ATP 濃度を評価する検討試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.P、 XXXXXXXXXX 141102)	74
2.6.6.11.9 300 mg/日でのヒト曝露量との関連性	75
2.6.6.11.10 考察及び結論	78
2.6.6.11.10.1 一般毒性	78
2.6.6.11.10.2 遺伝毒性及びがん原性	80
2.6.6.11.10.3 生殖発生毒性	80
2.6.6.11.10.4 局所刺激性	81
2.6.6.11.10.5 免疫毒性	81
2.6.6.11.10.6 総括	81
参考文献	83

図目次

	ページ
図 2.6.6.11-1 安楽死させた動物における SNAC の血漿中濃度	64
図 2.6.6.11-2 一般状態変化を呈した動物における血漿中及び CSF 中グルコース濃度	65
図 2.6.6.11-3 細胞呼吸及び電子伝達系に及ぼす SNAC の影響	79

表目次

	ページ
表 2.6.6.11-1 SNAC の非臨床毒性試験	12
表 2.6.6.11-2 SNAC の毒性メカニズム試験	13
表 2.6.6.11-3 単回投与毒性試験の概要	18
表 2.6.6.11-4 マウスにおける単回経口投与毒性試験 (EMIS/R96007)	19
表 2.6.6.11-5 ラットにおける単回経口投与毒性試験 (EMIS/R96009)	20
表 2.6.6.11-6 SNAC の反復投与試験の概要	21
表 2.6.6.11-7 マウスにおける経口 DRF 試験 (JLY0382)	22
表 2.6.6.11-8 マウスにおける 13 週間経口毒性試験 (A16705)	23
表 2.6.6.11-9 ラットにおける経口 DRF 試験 (WIL-315002)	25

表 2.6.6.11-10	ラットにおける 2 週間経口毒性試験 (WIL-315004)	26
表 2.6.6.11-11	ラットにおける 13 週間経口毒性試験 (WIL-315003)	27
表 2.6.6.11-12	ラットにおける 13 週間経口毒性試験 (A62807)	28
表 2.6.6.11-13	ラットにおける 26 週間経口毒性試験 (JLY0278)	30
表 2.6.6.11-14	ラットにおける 52 週間経口毒性試験 (BNA00004)	32
表 2.6.6.11-15	アカゲザルにおける 2 週間経口毒性試験 (3007-97)	34
表 2.6.6.11-16	カニクイザルにおける 4 週間経口毒性試験 (694-95)	36
表 2.6.6.11-17	アカゲザルにおける 13 週間経口毒性試験 (3060-98)	37
表 2.6.6.11-18	カニクイザル 16 週間経口毒性試験 (JLY0387)	38
表 2.6.6.11-19	アカゲザルにおける 39 週間経口毒性試験 (BNA00003)	40
表 2.6.6.11-20	がん原性試験の概要	42
表 2.6.6.11-21	rasH2 トランスジェニックマウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験 (JLY0436)	43
表 2.6.6.11-22	Sprague Dawley 系ラットにおける 104 週間経口投与がん原性試験 (JLY0366)	44
表 2.6.6.11-23	重要な生殖発生毒性試験の概要	46
表 2.6.6.11-24	ラットにおける受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験 (805-003)	47
表 2.6.6.11-25	ラットにおける DRF 及び胚・胎児発生 (805-002P)	48
表 2.6.6.11-26	ラットにおける胚・胎児発生 (805-002)	49
表 2.6.6.11-27	ウサギにおける DRF 及び胚・胎児の発生に関する試験 (805-001P)	50
表 2.6.6.11-28	ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験 (805-001)	52
表 2.6.6.11-29	ラットにおける胚・胎児及び出生前ならびに出生後の発生に関する試験 (805-004)	53
表 2.6.6.11-30	イヌにおける単回投与胃局所刺激性試験 (JLY0558)	55
表 2.6.6.11-31	ラットにおける免疫毒性試験 (523561)	56
表 2.6.6.11-32	ミトコンドリアへの影響の <i>in vitro</i> 評価 (NN-2013-001)	58
表 2.6.6.11-33	Seahorse XF96 を用いた細胞呼吸に及ぼす影響	59
表 2.6.6.11-34	マウスにおける単回投与忍容性及び TK (JLY0557)	61
表 2.6.6.11-35	ラットにおけるテレメトリー及びプレチスモグラフィ併用試験 (0NNC11)	62
表 2.6.6.11-36	ラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0412)	63
表 2.6.6.11-37	ラットにおける単回静脈内投与検討試験 (JLY0413)	66
表 2.6.6.11-38	グルコースを併用投与したラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0468)	67
表 2.6.6.11-39	異なる絶食レジメンを用いたラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0517)	70
表 2.6.6.11-40	ラットにおける 13 週間経口毒性検討試験 (JLY0532)	72
表 2.6.6.11-41	ラットにおける心臓組織の ATP 濃度を評価する検討試験 (140701)	74

表 2.6.6.11-42	ラットにおける心臓及び肝組織の ATP 濃度を評価する検討試験 (■■■■141102)	74
表 2.6.6.11-43	NOAEL における SNAC の動物及びヒトの曝露量比 (AUC 及び C _{max})	75
表 2.6.6.11-44	毒性試験における NOAEL での SNAC 代謝物の曝露量.....	76
表 2.6.6.11-45	死亡の認められなかった最低用量における動物及びヒトの曝露量比 (C _{max} 、非結合型)	77

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じて使用されている全略語の一覧である。したがって、すべての略語が毒性試験の概要の項で使用されているとは限らない。

3T3-L1	mouse pre-adipocyte cell-line (マウス前脂肪細胞株)
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion (吸収・分布・代謝・排泄)
AME	absorption, metabolism, and excretion (吸収・代謝・排泄)
ATP	adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
AUC	area under the plasma drug concentration-time curve (血漿中濃度－時間曲線下面積)
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue (気管支関連リンパ組織)
BCRP	breast cancer resistance protein (乳癌耐性タンパク質)
BHA	β -hydroxy butyric acid (β -ヒドロキシ酪酸)
BSEP	bile salt export pump (胆汁酸トランスポーター)
C2C12	mouse myoblast cell-line (マウス筋芽細胞株)
CAS	Chemical Abstracts Service (ケミカル・アブストラクツ・サービス)
cDNA	complementary DNA (deoxyribonucleic acid) [相補的デオキシリボ核酸 (DNA)]
CF	Carboxyfluorescein (カルボキシフルオレセイン)
CHO	chinese hamster ovary (cells) [チャイニーズハムスター卵巣 (細胞)]
C _{max}	maximum drug concentration observed in plasma (最高血漿中濃度)
CNS	central nervous system (中枢神経系)
CSF	cerebrospinal fluid (脳脊髄液)
CYP	cytochrome P450 (チトクローム P450)
DDI	drug-drug interaction (薬物相互作用)
DLS	dynamic light scattering (動的光散乱)
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine (ジミリストイルホスファチジルコリン)
DRF	dose range finding (用量範囲設定)
DSC	differential scanning calorimetry (示差走査熱量測定)
E1245	glucuronic acid conjugate of SNAC (SNAC のグルクロン酸抱合体)
E1246	glucuronic acid conjugate of E494 (E494 のグルクロン酸抱合体)
E1247	glucuronic acid conjugate of E506 (E506 のグルクロン酸抱合体)
E494	SNAC β -oxidisation metabolite (2 carbon less) [SNAC の β 酸化代謝物 (2 炭素喪失型)]

E506	SNAC β -oxidisation metabolite (4 carbon less) [SNAC の β 酸化代謝物 (4 炭素喪失型)]
*不純物D	
*不純物E	
ECG	Electrocardiogram (心電図)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
EFD	embryo-foetal development (胚・胎児発生)
EM	electron microscopy (電子顕微鏡)
EPC	egg phosphatidylcholine (卵黄ホスファチジルコリン)
ETC	electron transport chain (電子伝達系)
F	female (雌)
FD4	fluorescein-labelled dextran (4 kDa) [フルオレセイン標識デキストラン (4 kDa)]
FDA	US Food and Drug Administration (米国食品医薬品局)
GD	gestation day (妊娠日)
GI	gastrointestinal (消化管)
GLDH	glutamate dehydrogenase (グルタミン酸脱水素酵素)
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)
HEC-1B	human endometrial cell-line (ヒト子宮内膜細胞株)
HEK293	human embryonic kidney 293 (cells) [ヒト胎児腎臓 293 (細胞)]
hERG	human ether-a-go-go related gene (ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子)
HSA	human serum albumin (ヒト血清アルブミン)
i.v.	intravenous (静脈内)
IC ₅₀	inhibitory concentration (at which 50% inhibition is observed) [阻害濃度 (50%の阻害がみられる濃度)]
ICH	International Conference on Harmonisation (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)
IS	internal standard (内部標準)
ISR	incurred sample re-analysis (実試料の再分析)
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)

LN319	human astrocyte cell-line (ヒト星細胞株)
LSC	liquid scintillation counting (液体シンチレーション計数)
M	male (雄)
m/z	mass to charge ratio (質量電荷比)
MATE	multidrug and toxin extrusion (1 or 2K) [多剤・毒性化合物排出 (1 又は 2K)]
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare (Japan) (厚生労働省)
MPCE	micronucleated polychromatic erythrocytes (小核を有する多染性赤血球)
MRM	multiple reaction monitoring (多重反応モニタリング)
MRP2	multidrug resistance-associated protein 2 (多剤耐性関連タンパク質 2)
MTD	maximum tolerated dose (最大耐量)
MW	molecular weight (分子量)
N/A	not applicable (該当なし)
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form) [ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (還元型)]
NCI-N87	human gastric cell line (ヒト胃細胞株)
NMR	nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)
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)
OAT	organic anion transporter (1 or 3) [有機アニオントランスポーター (1 又は 3)]
OATP1B	organic anion transporting polypeptide 1B (1 or 3) [有機アニオン輸送ポリペプチド 1B (1 又は 3)]
OCT	organic cation transporter (1 or 2) [有機カチオントランスポーター (1 又は 2)]
OECD	organisation for Economic Co-operation and Development (経済協力開発機構)
p.o.	per oral (経口)
P _{app}	apparent permeability (見かけの透過係数)
PBMC	rat peripheral blood mononuclear cells (ラット末梢血単核球)
P-gp	P-glycoprotein (multidrug resistance protein 1) [P-糖タンパク (多剤耐性タンパク質 1)]
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)
R	predicted ratio of a victim drug's AUC in the presence and absence of an inhibitor (阻害剤の存在下及び不在下における被相互作用薬の AUC の予測比)

R _B	blood-to-plasma concentration ratio (血液／血漿中濃度比)
SD	single dose (単回投与)
SEM	standard error of the mean (平均値の標準誤差)
SGF	simulated human gastric fluid (疑似ヒト胃液)
SNAC	salcaprozate sodium (サルカプロザートナトリウム)
SPE	solid-phase extraction (固相抽出)
t _{1/2}	terminal plasma half-life (終末相半減期)
TEER	trans-epithelial electrical resistance (経上皮電気抵抗)
TK	toxicokinetic (トキシコキネティクス)
T _m	transition temperature (転移温度)
t _{max}	time at which the highest drug concentration of drug in plasma occurs (最高血漿中濃度到達時間)
UGT	UDP glucuronosyltransferases (UDP グルクロン酸転移酵素)

2.6.6.11.1 まとめ

2.6.6.11.1.1 非臨床毒性試験プログラム

サルカプロザートナトリウム (SNAC) は新規添加剤であると考えられ、実施した非臨床毒性試験プログラムは米国 FDA の「Guidance for Industry - Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients¹」に準拠しており、当該ガイダンス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²に示されている推奨要件に全面的に準拠している。したがって、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により構成される (表 2.6.6.11-1)。さらに動物試験において認められた毒性について検討し、それらに関連した薬物動態プロファイルを明らかにする一連の検討試験及びメカニズム試験が実施されている (表 2.6.6.11-2)。これらの試験は ████████ にわたり、██████ により ████████、██████、及びセマグルチド (遺伝子組換え) (以下、セマグルチド) 等の有効成分の開発と並行して実施されている。したがって、各有効成分について一部重複した試験が存在し、また一部の試験では SNAC1 群のみの試験及び複数群設けられた試験も存在する。

表 2.6.6.11-1 SNAC の非臨床毒性試験

Study type and duration	Route of administration	Species	GLP Compliance	Study ID
Single dose toxicity				
	Oral (gavage)	Mouse/ICR	No	EMIS/R96007
	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	No	EMIS/R96009
Repeat dose toxicity				
6 weeks	Oral (gavage)	Mouse/rasH2	Yes	JLY0382
13 weeks	Oral (gavage)	Mouse/CD-1	Yes	A16705
2 weeks	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	WIL-315002
2 weeks	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	WIL-315004
13 weeks	Oral (gavage)	Rat/Wistar	Yes	A62807
13 weeks	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	WIL-315003
26 weeks	Oral (gavage)	Rat/ Sprague Dawley	Yes	JLY0278
52 weeks	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	BNA00004
2 weeks	Oral (gavage)	Monkey/Rhesus	Yes	3007-97
4 weeks	Oral (gavage)	Monkey/Cynomolgus	Yes	694-95
13 weeks	Oral (gavage)	Monkey/Rhesus	Yes	3060-98
16 weeks	Oral (tablet)	Monkey/Cynomolgus	Yes	JLY0387
39 weeks	Oral (gavage)	Monkey/Rhesus	Yes	BNA00003
Genotoxicity				
Bacterial mutagenicity assay (Ames test)	<i>In vitro</i> assay	Not applicable	Yes	0725-2140
Cultured human peripheral blood lymphocytes	<i>In vitro</i> assay	Not applicable	Yes	0545-3300
Induction of micronuclei in the bone marrow	Oral (gavage)	Mouse/CD-1	Yes	0374-1521

Study type and duration	Route of administration	Species	GLP Compliance	Study ID
Carcinogenicity				
26 weeks	Oral (gavage)	Mouse/rasH2	Yes	JLY0436
104 weeks	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	JLY0366
Developmental and reproductive toxicity				
11-day dose range finder	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	805-002P
Effect on fertility and general reproduction	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	805-003
Embryo-foetal development	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	805-002
Pre- and postnatal development	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	805-004
12-day dose range finder	Oral (gavage)	Rabbit/New Zealand White	Yes	805-001P
Embryo-foetal development	Oral (gavage)	Rabbit/New Zealand White	Yes	805-001
Local tolerance				
Stomach local tolerance	Oral (gavage and tablet)	Dog/Beagle	No	JLY0558
Other				
Immunotoxicity study	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	523561

表 2.6.6.11-2 SNAC の毒性メカニズム試験

Study type and duration	Route of administration	Test system/species	GLP Compliance	Study ID
<i>In vitro</i>				
Effect on ATP and enzymes in mitochondria	<i>In vitro</i>	N/A	No	NN-2013-001
Effect on cellular respiration	<i>In vitro</i>	Multiple cell lines	No	■■■■140919
Effect on cellular respiration	<i>In vitro</i>	C2C12 cells	No	■■■■140926
Effect on cellular respiration	<i>In vitro</i>	Hepatocytes	No	■■■■140912
Effect on cellular respiration	<i>In vitro</i>	C2C12 cells	No	■■■■141003
Effect on cellular respiration	<i>In vitro</i>	C2C12 cells	No	■■■■141010
<i>In vivo</i>				
Toxicokinetics and tolerability study	Oral (gavage)	Mouse/CD-1	No	JLY0557
Mechanistic respiratory and cardiovascular study	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	No	0NNC11
Investigative single dose study	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	Yes	JLY0412
Investigative single dose study	Intravenous	Rat/Sprague Dawley	Yes	JLY0413
Investigative single dose study	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	No	JLY0468
Investigative single dose study	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	No	JLY0517

Study type and duration	Route of administration	Test system/species	GLP Compliance	Study ID
13-week investigative repeat dose study	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	No	JLY0532
Effect on ATP tissue concentration	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	No	■■■■140701
Effect on ATP tissue concentration	Oral (gavage)	Rat/Sprague Dawley	No	■■■■141102

一般毒性試験はマウス、ラット及びサルを用いて実施した。SNAC のがん原性誘発性について、前述の添加剤ガイドライン及び ICH S1B ガイドライン³において 2 種のげっ歯類を用いることが推奨されていることから、26 週間 rasH2 トランスジェニックマウス試験及び 2 年間ラット試験を実施した。免疫毒性試験はラットを、局所刺激性（胃）試験はイヌを用いて実施した。生殖毒性試験はラット及びウサギで実施した。最後に、一連のメカニズム試験を *in vitro* 及び *in vivo* で、主にラットを用いて実施した。SNAC 及び主要代謝物は、ヒトを含むすべての動物種の血漿中に存在した。

すべての関連する重要な毒性試験において、投与経路は臨床の投与経路である経口投与（p.o.）とした。SNAC は、概して溶液として動物に強制経口投与した。しかしながら、イヌにおける単回投与消化管局所刺激性試験及びカンクイザルにおける 16 週間反復投与毒性試験では、市販錠剤の添加剤組成と同様の組成の錠剤を投与した。すべての経口投与試験において、SNAC は 1 日 1 回投与した。ラットにおける一部のメカニズム試験では、SNAC を静脈内投与した。

重要な長期一般毒性試験及び一連のメカニズム試験にトキシコキネティクス（TK）評価を組み入れた。げっ歯類の一般毒性試験における初回採血時点は、概して最高血漿中濃度到達時間（ t_{max} ）に対して遅く、適切ではないと考えられた。以降に実施したメカニズム試験では、採血時間を早くすることにより、完全かつ正確に SNAC 曝露プロファイルの評価を行った。ヒトに 300 mg/日を投与時の曝露量に対する曝露量比を算出し、[2.6.6.11.9](#) 項に示す。

SNAC の毒性を検討した試験概要表を M2.6.7.18 付録に示す。

2.6.6.11.1.2 結果及び結論

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。毒性試験に使用されたいずれの動物種においても、特に 500 mg/kg/日を超える用量において、SNAC は一般状態変化及び死亡との関連性が認められた。これらの所見に関して、メカニズム試験において認められた血漿中及び脳脊髄液（CSF）中グルコースの低下、血漿中及び CSF 中乳酸の上昇、肝臓及び心臓の ATP 低下との関連性が認められた。これらの所見は細胞呼吸阻害に関連すると考えられ、ヒトでの SNAC 曝露量よりもはるかに高い曝露量で認められた。

2.6.6.11.1.2.1 一般毒性

試験を行ったすべての動物種（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生じ、ラットがん原性試験を含む反復投与毒性試験に基づき無毒性量（NOAEL）を設定した。最も低い NOAEL はラットがん原性で設定された 75 mg/kg/日であった。

概して、死亡は高用量の投与後数時間以内に認められた。いずれの動物種においても死亡の前に、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認められ、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变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。

反復投与毒性試験を通して、一貫して動物の一般状態変化又は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。ただし、サルの試験において 500 mg/kg/日以上を投与した個体では、一般状態変化の特性から低血糖様症状と判断されたことから、これらの個体には適宜ブドウ糖や果物を与えた。採血のタイミングが原因と考えたが、血漿中グルコース濃度に一貫した影響は認められなかった。一般状態変化はほとんどが一過性であったが、試験全体を通してみると、全体的に低血糖に対する治療効果はないと考えられた。これらの知見は、ラットにおけるメカニズム試験において、血漿中グルコースが低かったがグルコース投与の効果は認められなかった知見と一致するものであった。その他に一貫した臨床検査評価項目の変化は認められなかったが、ラットではアルカリホスファターゼ及びトリグリセリド濃度の上昇、グロブリン濃度の低下が認められた。ラット及びサルの両方において、尿組成の変化（最も一貫性がみ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。

以上のことに基づいて、一連のメカニズム試験を実施し、一般状態変化及び死亡の原因を検討した。*In vitro* では、SNAC が主に電子伝達系の複合体 I の阻害を介して、細胞呼吸を阻害した。Sprague Dawley 系ラットを用いた *in vivo* 試験では、SNAC は動物の呼吸を急激に活性化し、血液及び CSF 中のグルコース濃度を低下させ、血漿及び CSF 中乳酸濃度を上昇させ、心臓及び肝臓の ATP 濃度を低下させた。これらの作用が、細胞呼吸の阻害による急激な全身性のエネルギー欠乏に起因し、高濃度の SNAC に曝露された動物が呈した症状の原因であると考えられた。SNAC で認められた作用機序の詳細については、細胞呼吸に及ぼす影響（M 4.2.3.7.7-B-1）を参照のこと。

動物で認められた一般状態変化の発現は、SNAC 投与直後に認められる SNAC の高血漿中濃度と良好に相関していた。さらに、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は明確な関連性が認められた。概して、データにより、血漿中濃度が SNAC により誘発される一般状態変化の最も重要な決定因子であることが示された。したがって、 C_{max} に基づく曝露量比が、経口錠剤を投与時のヒトにおけるリスク評価に適切であると考えられる。曝露量比の詳細を [2.6.6.11.9](#) に示す。

結論として、動物の死亡及び一般状態変化は、急激な全身性のエネルギー欠乏に至る細胞呼吸障害が原因であることが明らかになった。動物の死亡は、300 mg (3~4 mg/kg) の SNAC を投与時のヒトの曝露量と比較して高い曝露量、特に動物の各個体における投与初期の非常に高い血漿中濃度で生じていた。このような高い血漿中濃度は、ヒトに 300 mg SNAC 錠を投与しても到達することはないことから、動物で認められた死亡はヒトにおける SNAC の使用に関して、臨床的な問題にならないと考えられる。

2.6.6.11.1.2.2 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。いずれの試験においても、マウスでは 300 mg/kg/日まで、ラットでは 500 mg/kg/日まで投与したが、SNAC のがん原性誘発性は認められなかった。

2.6.6.11.1.2.3 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 単剤の 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・胎児発生に影響を及ぼさなかったことから、胚・胎児の NOAEL は 1000 mg/kg/日であった。ラットにおける出生前及び出生後の発生に関する試験において、死産及び出生後数日以内の死亡の増加が認められたが、これは母動物の毒性によるものと考えられた。これらの結果より、本試験で単剤投与した SNAC 1000 mg/kg/日の 1 用量が NOAEL とは考えられなかった。

2.6.6.11.1.2.4 局所刺激性

サルに SNAC を 39 週間強制経口投与した場合、又は 300 mg の SNAC 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）。急性局所刺激性の検討を目的としたイヌ試験において、SNAC 錠及び液剤は胃における局所的な影響を示さなかった。反復投与一般毒性試験において、投与 24 時間後に安楽死処置したラットの胃／十二指腸粘膜は正常であった。しかしながら、ラットに SNAC 溶液を強制経口投与（900 mg/kg/日）し、投与後 20~60 分に安楽死処置したところ、腺胃又は十二指腸に最急性の粘膜壊死が認められた。投与後 24 時

間には所見がみ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／十二指腸にみられた最急性の変化は腫瘍性病変をもたらさないことが示された。

2.6.6.11.1.3 試験概要の概論

本毒性試験の概要文（M 2.6.6）及び概要表（M 2.6.7）に示すすべての試験では、SNAC 投与による影響があったと考えられる項目のみを記述、考察した。投与に関連した変化の記述で特に明記しない限り、値は対照群と比較して統計学的有意差があるとした。M 2.6.7 では統計学的有意差が明らかにされている。

有害でない、毒性学的意義のない又は毒性学的関連のない（同義として使用）と考えられた変化に関して、本概要文では用量や、どの性で認められた所見かといった詳細情報を提供しない場合がある。詳細は M 2.6.7 を参照のこと。

すべての重要な毒性試験は現行のガイドラインに準拠して実施したことから、投与群及び評価項目については本概要では簡潔な記述に留めることとする。結果の解釈が重要でない限り試験デザインの詳細は記載しない。代わりに各試験デザインや評価項目に関する詳細は、個別の試験報告書を参照すること。各試験の絶食スケジュール、一般観察スケジュール、及び TK 試料の採取時点は、試験間の所見の差異を理解するのに有用であることから、必要に応じて詳細を述べる。

一部の非臨床試験では、SNAC は [REDACTED]、[REDACTED]、セマグルチド（NNC0113-0217）等の有効成分又は [REDACTED] と投与された。SNAC 評価用に本概要に示された試験は主に、SNAC 単剤を投与した 2 群以上の試験である。結論として追加の情報及び関連する情報が得られる場合には、SNAC の 1 用量群のみか、又は SNAC と有効成分の同時投与群を設けた試験も本概要に示し、SNAC の非臨床安全性評価の概要に組み入れることとする。SNAC 単剤群のデータのみを示している試験の他の群（有効成分との同時投与を含む）のデータを、用量反応性、及び投与との関連性の評価に使用する場合もある。

SNAC は主に経口投与した。これは臨床と同じ投与経路である。特に指定のない場合、溶液を強制経口投与した。使用された溶媒は主に水（脱イオン水、精製水、又は注射用水）であった。その他の溶媒を用いた場合は試験概要に記載する。対照群には SNAC 投与に使用したものと同一溶媒を投与した。錠剤を経口投与した試験又は静脈内投与した試験については、溶媒／錠剤の成分も示す。

すべての重要な長期試験において、曝露の確認、TK 評価とともに製剤中濃度分析を実施した。一部の試験では、一部の対照動物の血漿試料に測定可能な濃度の SNAC が検出された。その全例で、陽性試料の原因が *in vivo* 汚染である可能性は低いか、又は TK 評価及び試験結果に影響はないと結論づけ

られた。TK を実施した大部分の試験において、初回試料採取時点は投与後 10 分～1 時間であり、マウス及びラットでは $t_{\max}$ の後であったことが後に明らかとなった。TK 試料の採取時点は安全率の算出に重要であることから、採取時点は試験ごとに記載し、考察の項でも議論する。その他の TK に関する情報は、評価の意義があると考えられる所見についてのみ本概要文に含める。SNAC の TK の詳細については、M 2.6.7.18 付録、M 2.6.4.10 付録及び M 2.6.5.16 付録を参照のこと。

毒性試験の高用量は概して忍容性に基づき選択した。用量制限毒性は有害な一般状態変化及び死亡とした。詳細は各試験の概要に示す。

2.6.6.11.2 単回投与毒性試験

SNAC の急性毒性は、2 種の動物種であるマウス及びラットを用いた単回経口投与毒性試験において評価した。マウスは以前の試験で SNAC に対して良好な忍容性が示され、SNAC の投与量が少ないことから選択した。ラットは概して毒性試験で使用されており、規制当局により推奨されていることから選択した。単回投与試験の概要を[表 2.6.6.11-3](#)に示す。

表 2.6.6.11-3 単回投与毒性試験の概要

Species	Administration route	Nominal dose levels (mg/kg)	Observed maximum non-lethal dose (mg/kg)	Approximate lethal dose (mg/kg)	Study ID
Mouse	Oral	0, 1000, 1500, 2000	1500	2000	EMIS/R96007
Rat	Oral	0, 1000, 1500, 2000, 3000	1000	1500	EMIS/R96009

2.6.6.11.2.1 マウスにおける単回投与毒性試験

2.6.6.11.2.1.1 マウスにおける単回経口投与毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.5、EMIS/R96007）

本試験の目的は、ICR 系マウスに SNAC を単回強制経口投与時の急性毒性を評価することであった。投与群、各群の用量及び動物数を[表 2.6.6.11-4](#)に示す。マウスは投与前約 4 時間絶食した。使用した溶媒は 25% v/v プロピレングリコール水溶液であった。

表 2.6.6.11-4 マウスにおける単回経口投与毒性試験 (EMIS/R96007)

Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
		Males	Females
Control (vehicle)	0	5	5
SNAC	1000	5	5
SNAC	1500	5	5
SNAC	2000	5	5

動物の生存数及び一般状態観察は、投与日は投与後 15、30、45、60 分、その後は投与後 4 時間まで 30 分ごとに行い、後は 1 日 2 回 14 日間行った。体重は試験 1 日の投与前と第 15 日の剖検前に測定した。すべての動物において第 15 日に剖検を実施した。

投与後 60 分に、2000 mg/kg 投与群の雌 3 例の死亡が発見された。このうち 2 例は 45 分後の観察で嗜眠状態を呈した。投与後 90 分 2000 mg/kg 投与群の雄 1 例が嗜眠状態を呈し、投与後 4 時間の観察時間終了時点で死亡が発見された。1500 mg/kg 群では、死亡は認められなかったが、雄 1 例が 90 分及び 120 分の観察において鎮静状態であった。当該動物は投与後 4 時間の観察時間終了時点では回復していた。剖検において死亡例に変化は認められず、死因は特定できなかった。

結論として、SNAC を ICR 系マウスに単回経口投与したときに認められた最大非致死量は、一般状態変化のみが認められた 1500 mg/kg であり、概略の致死量は 2000 mg/kg であった。1000 mg/kg では影響は認められなかった。

2.6.6.11.2.2 ラットにおける単回投与毒性試験

2.6.6.11.2.2.1 ラットにおける単回経口投与毒性試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.5、EMIS/R96009)

本試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単回強制経口投与時の急性毒性を評価することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-5 に示す。ラットは投与前一晚 (約 18~24 時間) 絶食した。使用した溶媒は 25% v/v プロピレングリコール水溶液であった。

表 2.6.6.11-5 ラットにおける単回経口投与毒性試験 (EMIS/R96009)

Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
		Males	Females
Control (vehicle)	0	5	5
SNAC	1000	5	5
SNAC	1500	5	5
SNAC	2000	5	5
SNAC	3000	5	5

動物の生存数及び一般状態の観察は、投与日は投与後 15、30、45、60 分、その後は投与後 4 時間まで 30 分ごとに行い、以降は 1 日 2 回 13 日間行った。体重は第 1 日の投与前及び第 15 日の剖検前に測定した。ほとんどの動物において剖検を実施した。

3000 mg/kg 群ではすべての動物が投与直後に嗜眠状態となり、30 分以内に死亡した。2000 mg/kg では、雄 3 例及び雌全 5 例が投与後 1～4 時間以内に死亡した。1500 mg/kg 群では雄 1 例、雌 2 例が 2～4 時間以内に死亡した。2 用量群のいずれも（2000 及び 1500 mg/kg/日）、一般状態変化として流涎、反射低下、側臥位／胃、活動低下、嗜眠、及び攣縮が認められた。2000 mg/kg 群で生存した雄 2 例には一般状態変化は認められなかったが、1500 mg/kg 群の生存動物では上記の一般状態変化が 4 時間の観察時間中にみられた。1000 mg/kg 群では一般状態変化は認められなかった。

2000 mg/kg 投与動物において、共通して投与に関連する所見として考えられるものは、胃及又は小腸の赤色化／炎症、又は心房拡張であった。しかしながら、死因は特定できなかった。1000 mg/kg の雌 3 例にも観察期間の最後である第 14 日に小腸の炎症がみられたが、これらの動物では SNAC 単回投与の 14 日後であり、投与と関連する可能性は低いと考えられた。

結論として、SNAC を Sprague Dawley 系ラットに単回経口投与時に認められた最大非致死量は 1000 mg/kg、概略の致死量は 1500 mg/kg であった。

2.6.6.11.3 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験は、用量範囲設定 (DRF) 試験、マウス、ラット又はサルを用いた重要な 2、4 及び 13 週間試験、ラットにおける 26 及び 52 週間試験、サルにおける 39 週間試験で構成された。これらの試験は SNAC の一般毒性の評価に実施された。さらに、SNAC を吸収促進剤として使用した ██████████ である ██████████ の毒性を評価する、サルにおける 16 週間試験が実施されている。本試験では、臨床製剤と同様の錠剤を用い、SNAC のみの群を設けて実施されたことから、本試験も本項に記載し、SNAC の局所作用誘発性を評価する。

反復投与試験の概要を[表 2.6.6.11-6](#)に示す。

表 2.6.6.11-6 SNAC の反復投与試験の概要

Species	Duration	Nominal dose levels (mg/kg/day)	NOAEL (mg/kg/day)	Effect(s) defining NOAEL	Study ID
Mouse	13 weeks	0, 150, 500, 1500/1000 ^a	500	Excessive mortality at 1500/1000 mg/kg/day	A16705
Rat	2 weeks	0, 500, 750 1000	1000	No treatment related adverse changes	WIL-315004
Rat	13 weeks	0, 2000	Not established	Excessive mortality at 2000 mg/kg/day	WIL-315003
Rat	13 weeks	0, 100, 500, 1000	500	One potential treatment related death at 1000 mg/kg/day	A62807
Rat	26 weeks	0, 90, 300, 900	90	Mortality at 300 and 900 mg/kg/day	JLY0278
Rat	52 weeks	0, 150 ^b , 250, 500, 750 ^b , 900	500	Mortality at 750 and 900 mg/kg/day	BNA00004
Monkey	2 weeks	0, 1000, 1000 ^b , 1500, 1500 ^b , 2500, 2500 ^b	Not established	Mortality and adverse clinical signs at 1000 mg/kg/day and above	3007-97
Monkey	4 weeks	Part 1: 0, 800 ^b , 1200 ^b , 1800 ^b Part 2: 0, 1800	Not established	Mortality at 1200 mg/kg/day and above, and adverse clinical signs at all dose levels	694-95 Part 1 694-95 Part 2
Monkey	13 weeks	0, 1800	Not established	Adverse clinical signs at all dose levels	3060-98
Monkey	16 weeks	0, ~100 ^c	~100	No adverse findings	JLY0387
Monkey	39 weeks	0, 150 ^b , 200, 300, 500 ^b , 600	300	Adverse clinical signs at 500 and 600 mg/kg/day	BNA00003

a: 1500 mg/kg/day was dosed on day 1 and 2, but due to excessive mortality, treatment was discontinued and re-commenced on day 5 at 1000 mg/kg which continued until the animals were terminated prematurely on day 9

b: This SNAC dose was administered together with ■ mg/kg/day of ■

c: Administered as tablets of 300 mg/animal

2.6.6.11.3.1 マウスにおける試験

2.6.6.11.3.1.1 マウスにおける DRF 試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.6、JLY0382)

本 DRF 試験の目的は、rasH2 トランスジェニックマウスにおける 26 週間がん原性試験の用量を選定するため、rasH2 野生型マウスに 1 日 1 回 6 週間強制経口投与時の SNAC の最大耐量、毒性及び TK を評価することであった。投与群、各群の用量及び動物数を[表 2.6.6.11-7](#)に示す。

表 2.6.6.11-7 マウスにおける経口 DRF 試験 (JLY0382)

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
			Main study		Satellite study	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10	6	6
2	SNAC	500	10	10	18	18
3	SNAC	750	10	10	18	18
4	SNAC	1000	10	10	18	18
5	SNAC	150 ^a	10	10	18	18

a: Group 5 commencement of treatment 2 weeks after first groups. Dose level adjusted due to mortality on day 9.

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態（投与前、ケージに帰す時、各群の投与終了時、投与後 1～2 時間後、各日の終了時）、体重、摂餌量、血液学的検査、TK（投与前及び投与後 15 分、1、3、7、24 時間）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

SNAC 150 又は 500 mg/kg/日投与群の外見及び行動には投与の影響は認められなかった。750 mg/kg/日では 3 例（第 9 日に雄 1 例、第 24 日及び 40 日に雌 1 例ずつ）が死亡した。雄は活動低下及び呼吸困難を呈し、死亡前には平伏姿勢及び痙攣がみられた。雌については死亡の発見以前に認められた一般状態変化は確認されなかった。1000 mg/kg/日群では雄 1 例及び雌 1 例が第 1 日の投与後 1 時間以内に死亡した。さらに、雄 3 例及び雌 3 例が第 3 日の投与後 1 時間以内に死亡したことから、1000 mg/kg/日は最大耐量を超えていると判断し、当該群の動物全例を第 3 日に安楽死処置した。活動低下、平伏姿勢、立毛、頻呼吸／不規則呼吸／呼吸困難等の一般状態変化は、750 及び 1000 mg/kg/日群の両方において、死亡動物だけでなく、第 3 日の安楽死処置まで生存した動物にも認められた。

750 mg/kg/日群では、対照群と比較して、雌で体重増加抑制の傾向がみられ、1000 mg/kg/日群では 3 日間に雌雄の各個体の体重が減少した。摂餌量に及ぼす影響は認められなかった。

血液学的検査ではヘマトクリット、ヘモグロビン濃度及び赤血球数の軽度の上昇が 500 及び 750 mg/kg/日の雌雄でみられ、同様の傾向が第 3 日の 1000 mg/kg/日の雄に認められた。

腎臓の相対重量の増加が 500 mg/kg/日投与群の雌及び 750 mg/kg/日投与群の雌雄に認められたが、対照群との差異はわずかであり、関連する病理組織学的変化も認められなかった。

剖検及び病理組織学的検査では、明らかに SNAC 投与に関連すると考えられる病変は示されなかった。肝臓における限局性微小脂肪滴の軽微な変化が 750 mg/kg/日投与群の雄 1 例及び雌 1 例に認められた。この所見は試験施設の rasH2 マウスの背景データには認められず、rasH2 トランスジェニックマウスに溶媒対照を 26 週間投与時の自然発生性の非腫瘍性病変においても報告されていない⁴。しかしなが

ら、自然発生性の脂肪肝変化は、*rasH2* マウスの元系統である BALB 系マウスでは通常認められる所見である⁵。

結論として、野生型 *rasH2* マウスに SNAC 750 又は 1000 mg/kg/日を経口投与した結果、多数の動物の死亡で示されたように、最大耐量を超えていた。肉眼的及び病理組織学的検査では死因及び標的臓器のいずれも特定されなかった。150 又は 500 mg/kg/日の投与では、毒性学的に意義のある影響は認められなかったことから、本試験で示された最大耐量は 500 mg/kg/日であった。

2.6.6.11.3.1.2 マウスにおける 13 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.A、A16705）

本試験の目的は、CD-1 系マウスに SNAC を 1 日 1 回 13 週間強制経口投与時の毒性及び TK を評価することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-8 に示す。

表 2.6.6.11-8 マウスにおける 13 週間経口毒性試験（A16705）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
			Main study		Satellite study ^a	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10	12	12
2	SNAC	150	10	10	12	12
3	SNAC	500 ^b	10	10	12	12
4	SNAC	1500/1000 ^c	10	10	12	12

a: For clinical chemistry, urinalysis and toxicokinetics

b: Due to technical problems, this group received only 75% of the nominal dose for 3 weeks (approx. week 3-5)

c: 1500 mg/kg/day was dosed on day 1 and 2, but due to excessive mortality, treatment was discontinued and recommenced on day 5 at 1000 mg/kg which continued until the animals were terminated prematurely on day 9.

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（1 日 1 回及び週 1 回の触診）、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK（投与後 1、3、7 及び 24 時間）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

高用量 1500 mg/kg/日を投与したマウスの雄 6 例及び雌 10 例が、第 1 日及び 2 日に死亡した。概して、高用量群の雄全例に被毛の乱れがみられたが、雌には一般状態変化は認められなかった。死亡が非常に多く発生したことから、当該群は第 3 日及び 4 日に休薬し、第 5 日以降に投与量を 1000 mg/kg/日に減らした。しかしながら、死亡率は依然として高く、第 7 日及び 8 日には雄 4 例及び雌 3 例が死亡し、関連する一般状態変化は認められなかった。したがって、当該群の生存動物は、血液学的検査及び血液生化学的検査用に試料を採取した後、第 9 日に安楽死処置して剖検を実施した。高用量群では 23/44 例（雄 10 例、雌 13 例）が死亡した。さらに、中、低用量群及び対照群の雄 1 例及び雌 1 例が死亡した。

が、いずれも偶発的であり、SNAC との関連性はないと考えられた。高用量群で認められた高い死亡率について、組織学的所見との関連性は認められなかった。

摂餌量に及ぼす明らかな影響は認められなかったものの、高用量群では他の群に比べて各個体の摂餌量の個体差が大きく、摂餌量の増加も減少もみられた。しかし概して体重に及ぼす投与の影響は認められなかった。

臨床検査では、低及び中用量での投与の影響は示されなかったが、第 9 日に安楽死処置した高用量群では、安楽死処置前の血液学的検査において、背景データと比較して軽度～顕著な赤血球評価項目の低下（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）及び相対的網状赤血球数の軽度の増加が示された。また背景データと比較して、これらの動物はグルコース、クレアチニン及びトリグリセリド濃度が軽度に高く、ビリルビン及び総タンパク濃度が軽度に低かった。さらに、電解質バランスの異常（ナトリウム及び塩素の軽度の低下、ならびにカリウム及びリンの軽度の増加）が考えられた。しかし第 9 日における背景データは得られておらず、8～12 週齢の動物から得られた背景データのみであることから、高用量群の臨床検査データの解釈には注意を要する。

臓器重量では 500 mg/kg/日投与群の雌に腎重量の軽度の増加が認められ（相対重量のみ統計学的有意差あり）、雄にも同様の傾向がみられた。

病理組織学的検査では、1500/1000 mg/kg/日投与群の雄において、びまん性肝グリコーゲンの発現頻度が対照群に比べてわずかに低かったが、これは対照群の健康状態の悪化によるものと考えられた。

結論として、CD-1 系マウスに SNAC を 13 週間経口投与した結果、1500/1000 mg/kg/日における過剰な死亡、及び複数の臨床検査評価項目の変化と腎重量の増加が認められた。病理組織学的検査又は臨床検査において、死因を特定することはできなかった。高用量で死亡が認められたことから、中用量である 500 mg/kg/日が NOAEL と考えられた。

2.6.6.11.3.2 ラットにおける試験

2.6.6.11.3.2.1 ラットにおける DRF 試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.6、WIL-315002）

本 DRF 試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単剤、又は[REDACTED]との同時投与で 1 日 1 回 2 週間強制経口投与時の毒性を評価し、以降の重要な毒性試験に用いる適切な用量範囲を設定することであった。本項では、対照群と SNAC 単剤を投与した 4 群のデータのみを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-9 に示す。

表 2.6.6.11-9 ラットにおける経口 DRF 試験 (WIL-315002)

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	5	5
2	SNAC	1000	5	5
3	SNAC	1667	5	5
4	SNAC	2334	5	5
5	SNAC	3000	5	5

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与時、投与の1時間後、及び詳細な検査週1回）、摂餌量、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、肉眼的病理検査、臓器重量（脳、腎臓及び肝臓）。

2334 及び 3000 mg/kg/日において、各群雄1例及び雌2例が死亡した。雄2例の死因はいずれもおそらく挿管時の過誤（食道穿孔）であった。雌はそれぞれ第2、12、13 及び 13 日に死亡した。これらの雌のうち1例には、死亡が発見された前日の投与後1時間に活動性低下がみられた。それ以外では、すべての投与群において第1日以降、赤色鼻汁、ならびに鼻周辺（最も顕著）、口、前脚及び躯幹に赤色又は黄色物質が認められ、1667 mg/kg/日以上ではラッセル音の発現頻度が上昇した。これらの一般状態変化は投与1時間後に最も頻発した。雌の死亡例を剖検したが、死因は不明であった。最終解剖時まで生存した動物には投与に関連した肉眼的変化は認められなかった。

最高用量である 3000 mg/kg/日の雄では第1週に、体重増加抑制及び摂餌量減少が生じ、同様の傾向が第2週の同用量群、及び 2334 及び 1667 mg/kg/日群（体重増加のみ）にもみられた。グロブリン濃度低下、また、このことを反映したアルブミン／グロブリン比の上昇、総タンパク質濃度の低下が 1667 mg/kg/日以上雌雄で認められた。3000 mg/kg/日の雌では塩素濃度の軽度の低下がみられ、同用量群の雌1例ではアルカリホスファターゼ活性が顕著に上昇した。

臓器重量については、1667 mg/kg/日以上で肝及び腎臓重量が増加し、主に 3000 mg/kg/日で統計学的有意差が認められた。

結論として、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 2334 及び 3000 mg/kg/日の用量で2週間経口投与した結果、これらの用量で死亡が発生したことから最大耐量を超えていた。赤色鼻汁、ならびに鼻周辺（最も顕著）、口、前脚及び躯幹にみられた赤色又は黄色物質等の一般状態変化が全投与群に認めら

れたが、これらの所見は以降の試験における類似用量の投与を否定する理由にはならないと考えられた。

2.6.6.11.3.2.2 ラットにおける 2 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.B、WIL-315004）

本試験の目的は、異なる 2 工程（B 及び C）で製造された SNAC を Sprague Dawley 系ラットに 1 日 1 回 2 週間強制経口投与時の、それぞれの毒性を評価し比較することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-10 に示す。

表 2.6.6.11-10 ラットにおける 2 週間経口毒性試験（WIL-315004）

Group	Treatment	Process	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
				Males	Females
1	Control (Vehicle)	N/A	0	20	20
2	SNAC	B	500	10	10
3	SNAC	B	750	10	10
4	SNAC	B	1000	10	10
5	SNAC	C	500	10	10
6	SNAC	C	750	10	10
7	SNAC	C	1000	10	10

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与時、投与後 1 時間、及び週 1 回の詳細な検査）、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

死亡例はなく、一般状態変化は認められず、体重、摂餌量、臨床検査、眼科学的検査又は臓器重量に投与に関連した影響は認められなかった。

病理組織学的変化として主に腺胃粘膜下組織の軽微な好中球浸潤が、SNAC の全用量で 1 又は 2 例に認められたが、投与との関連性は不明であった。当該所見は、発現頻度及び重症度が低いことから、毒性学的意義はないと考えられた。

結論として、異なる 2 工程（B 及び C）で製造された SNAC による影響に差は認められなかった。したがって両工程とも NOAEL は 1000 mg/kg/日とした。

2.6.6.11.3.2.3 ラットにおける 13 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.C、WIL-315003）

本試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単剤、又は██████との同時投与で 1 日 1 回 13 週間強制経口投与時の毒性を評価することであった。本項では対照群及び SNAC 単剤投与群のデータのみを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-11 に示す。

表 2.6.6.11-11 ラットにおける 13 週間経口毒性試験（WIL-315003）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	20	20
5	SNAC ^a	2000	20	20

a: Due to the increased mortality in the SNAC treated group, all surviving females were terminated in week 10 in order to obtain timely necropsy and histopathological evaluation of tissues

本試験では投与日を第 0 日としていた。以下の概要では、日数表示を調整し、投与日を第 1 日とした他の試験と一致させた。

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数及び一般状態観察（投与時、投与後 1 時間、及び週 1 回の詳細な検査）、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

SNAC 投与群で非常に多くの死亡が認められ、雄 4 例及び雌 10 例はいずれも死亡が発見され、雄 1 例は第 74 日に安楽死させた。死亡は時間的には試験期間を通して散発的に認められており、初回投与後に最初の死亡例が発見された。病理組織学的検査では死因を特定できなかった。これらの動物のうち数例には、死亡日の投与時又は投与 1 時間後に活動性低下、虚脱及び眼からの分泌物等の一般状態変化が認められた。概して、SNAC を投与した動物では、鼻又は口周囲、前脚、及びその他の部位（主に頸部ならびに体幹腹側及び肛門泌尿生殖器領域）の乾性又は湿性の黄色又は赤色物質の発現頻度が高く、これは最終投与まで生存した動物でも同様であった。さらに、数例では投与 1 時間後にラッセル音が認められた。

体重増加量（軽微な変化であり、必ずしも統計学的有意差が認められるわけではなかった）は、対照群と比較して雄で軽度な抑制傾向がみられたが、雌では軽度な増加傾向がみられた。変化が雌雄間で一致しないことから、投与との関連性は不明と考えられた。

血液生化学的検査では SNAC 投与群の雌におけるアルカリホスファターゼの軽度の上昇が認められた。グロブリン濃度の低下を伴う総タンパク質の低下及び A/G 比上昇が主に雄に認められたが、同様の傾向は雌でもみられた。さらに、尿素及び塩素濃度の低下が雌雄共に認められたが、いずれの時点

においても統計学的有意差は認められなかった。これらの変化の病因学的及び毒性学的意義は不明である。

肝及び腎重量は SNAC 投与動物で増加したが、関連した病理組織学的変化はなく、本所見の毒性学的意義は不明である。

胃の病理組織学的検査において、対照群と比較して腺胃の好中球浸潤の重症度上昇（軽微から軽度へ）及び非腺胃境界縁の軽微な上皮過形成の発現頻度の上昇が SNAC 投与群に認められた。この胃の変化は SNAC の局所作用によるものと考えられた。さらに、下垂体前葉細胞の空胞化が SNAC を投与した雄で認められたが、雌では認められなかった。SNAC を投与した雌 1 例に赤脾髄の軽微な壊死が認められた。本所見の毒性学的意義は不明であるが、以降に実施したラットにおける毒性試験では同様の変化が認められなかったため、SNAC 投与に関連する可能性は低いと考えられる。

結論として、2000 mg/kg/日で死亡が認められたことから、NOAEL は特定できなかった。

2.6.6.11.3.2.4 ラットにおける 13 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.D、A62807）

本試験の目的は、Wistar 系ラットに SNAC を単剤、又は██████████と同時投与で 1 日 1 回 13 週間強制経口投与時の毒性を評価することであった。本項では、対照群及び SNAC のみを投与した 3 群のデータを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-12 に示す。高用量である 1000 mg/kg/日が最大耐量となると予測された。

表 2.6.6.11-12 ラットにおける 13 週間経口毒性試験（A62807）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
			Main study		Satellite study	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10	5	5
5	SNAC	100	10	10	5	5
6	SNAC	500	10	10	5	5
7	SNAC	1000	10	10	5	5

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（1 日 1 回、及び詳細な一般状態検査を週 1 回）、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK（投与後 30 分、1、3、7 及び 24 時間）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

SNAC の最高用量である 1000 mg/kg/日において、2 例に死亡が発生した。雄 1 例は、誤投与（食道穿孔）が確認されたため第 71 日に安楽死させた。1 例の雌は第 76 日に自然発生的に死亡した。この動物で認められた所見は眼球膨大のみであった。したがって、この雌の死亡と SNAC 投与との関連性は否定できない。

臨床検査において赤血球分布幅、網状赤血球数、リンパ球数、及び活性化部分トロンボプラスチン時間の上昇、グルコース、クレアチニン、及びビリルビンの低下、ナトリウム及びカリウム上昇、アルブミン／グロブリン比上昇が認められた。これらの変化は軽微又は軽度であり、主に 1000 mg/kg/日において認められた。変化の程度が小さいこと及び病理組織学的所見との関連性が認められないことから、これらの臨床検査学的変化は、いずれも有害ではないと考えられた。

腎及び肝重量の増加が 1000 mg/kg/日の雌ならびに 500 及び 1000 mg/kg/日の雄に認められたが、1000 mg/kg/日の雄の肝重量絶対値に統計学的有意差はみられなかった。臓器重量に及ぼす影響は軽微であり、対応する病理組織学的所見もみられなかったため、有害ではないと考えられた。

結論として、1000 mg/kg/日で雌 1 例が死亡し、投与との関連性が否定できなかったことから、NOAEL は中用量である 500 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.11.3.2.5 ラット 26 週間経口毒性試験及び 4 週間回復試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.E、JLY0278）

本試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットにセマグルチド及び SNAC を 1 日 1 回 26 週間強制経口投与時の毒性及び TK を評価することであった。SNAC はセマグルチドとの同時投与で 3 用量、対照物質として単剤で 3 用量を投与した。さらに、SNAC の影響を評価するため水溶媒対照群を設けた。本項では、水溶媒対照群及び SNAC 単剤の 3 用量群のデータのみを示す。セマグルチドに対する忍容性を確認するため、目標用量を 26 週間投与する前に 2 週間の用量漸増期間を設けた〔セマグルチド投与群に関する詳細は、経口セマグルチド M 2.6.6.3.1（210196 : JLY0278 と同試験）を参照のこと〕。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-13 に示す。用量は以前に実施された 52 週間試験（BNA00004、[2.6.6.11.3.2.6](#)）の結果の概要に基づいて設定した。SNAC は 900 mg/kg/日が NOAEL とされたため、当該用量が 26 週間試験の高用量として適切であると考えられた。その後、52 週間試験の報告書案のレビューにおいて NOAEL の再検討が行われ、500 mg/kg/日を超える用量において、投与に関連すると考えられる死亡が認められたことから、NOAEL は 500 mg/kg/日と判断した。

表 2.6.6.11-13 ラットにおける 26 週間経口毒性試験 (JLY0278)

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)			Number of animals			
		Week -2 ^a	Week -1 ^a	Weeks 1-26 ^b	Main study		Recovery study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (vehicle)	0	0	0	20	20	10	10
2	SNAC	90	90	90	20	20	10	10
3	SNAC	90	300	300	20	20	10	10
4	SNAC	90	300	900	20	20	10	10

a: Dose escalation period; b: Main study period

以下の評価項目を、投与及び回復期間中、又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与前、ケージに帰す時、各群の投与終了時、投与後 1～2 時間、各日の終了時、試験期間中の選択した日、及び週 1 回の詳細な検査）、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK（投与前、投与後 2、6、12 及び 24 時間＋最終投与後 336 及び 672 時間）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

900 mg/kg/日を投与した雄 2 例及び雌 8 例、及び 300 mg/kg/日を投与した雄 1 例の死亡が発見された。いずれの死亡も投与期間中に発生し、回復期間に死亡例は認められなかった。死亡は時間的には試験期間を通して分散的に認められた。すべてではないが、多くの動物の死亡は投与 1～2 時間後に発見された。死亡前に有意な一般状態変化は認められず、病理組織学的検査により死因は特定できなかった。

さらに、90 mg/kg/日の雌 1 例が、第 49 日の投与後 40 分に死亡していることが発見されたが、肉眼的所見及び病理組織学的所見から、食道穿孔に一致するものであり、投与時点では生存していた。したがって、本死亡例と SNAC 投与との関連性は認められなかった。

300 及び 900 mg/kg/日を投与後、用量依存的な顎擦り及び流涎の発現頻度の増加が認められた。900 mg/kg/日を投与した雄 1 例では、第 8 週に頻呼吸及び身体の緊張低下が認められ、不安定となった。その他の症状として、300 及び 900 mg/kg/日で第 14 週～20 週に耳部の発赤がみられた。この発現頻度は用量依存的であったが、数日間に数例で認められたのみであったことから、明らかに SNAC 投与に関連するものとは考えられなかった。

血液学的検査では最高用量 900 mg/kg/日におけるヘマトクリット、ヘモグロビン及び赤血球数の軽微な上昇が示された。これらの変化は可逆的であり、変化の程度が小さかったことから、有害ではないと考えられた。

さらに、アルカリホスファターゼの軽度の上昇、血漿中トリグリセリド濃度、及びグロブリン画分減少による総タンパク質低値等、複数の血液生化学的検査項目が 900 mg/kg/日において変化した。これらの変化は可逆的であり、変化の程度が小さかったことから、有害ではないと考えられた。アルカリ

ホスファターゼ及びトランスアミナーゼ活性の上昇が雄 2 例にみられたが、関連する病理組織学的な肝臓の変化は認められなかった。トランスアミナーゼ活性上昇の毒性学的意義は不明である。

血漿中リンの上昇、尿量の増加、尿中ナトリウム及び塩素排泄量の増加、及び尿 pH 上昇が主に 300 及び 900 mg/kg/日で認められ、これらの用量では腎重量増加もみられたことから、SNAC の腎機能に及ぼす影響が示唆された。これらの変化の一部は不可逆的であった（血漿中リン及び尿中 pH）。しかしながら、関連する病理組織学的所見は認められなかったことから、腎臓に及ぼす影響は SNAC 分子からのナトリウム排出によると思われる適応反応であり、有害反応ではないと考えられた。ヘマトクリット、ヘモグロビン濃度及び赤血球数の軽度の上昇といった赤血球の変化は、水分バランスに及ぼす影響と考えられる。

肝重量の増加が 900 mg/kg/日の雌に認められた。肝毒性を示す組織学的又は臨床検査学的変化は認められなかった。本所見は有害ではないと考えられ、投与終了後 4 週間で回復性が認められた。

軽微～軽度の腺胃の粘膜下組織の炎症及び上皮過形成、境界縁における上皮過形成の発現頻度の軽度の上昇が 300 及び 900 mg/kg/日の雄に認められた。しかし、用量反応性は明らかではなく、これらの変化は可逆的であった。これらの所見の毒性学的意義は不明であるが、高用量の SNAC が局所刺激性を有する可能性を示している。

肺の病理組織学的変化として、肺泡マクロファージ数増加、肺炎、気管支関連リンパ組織（BALT）の細胞充実性上昇、及び血管周囲性リンパ球凝集が SNAC を投与した動物に対照群より高い発現頻度又は重症度で認められたが、用量反応性は認められなかった。ただし、これらの所見は対照群にも認められたため、肺病理の原因に関する詳細な検討を実施した。検討の結果、両群（対照群及び高用量群）に *Pneumocystis carinii* による感染が認められ、その発現頻度は同程度であった。感染が認められたものの、本試験の完全性及び結論に影響を及ぼさなかった。動物福祉に及ぼす影響は認められなかった。対照動物では病理組織学的変化の程度は小さく、SNAC 全群で発現頻度及び重症度が高いことから、SNAC により増悪化したことが示唆された。鼻咽頭検査では、これらの変化が SNAC 製剤の胃食道逆流によるものとは示されなかった。少なくともリンパ球凝集の可逆性は明らかであった、高用量群の雄における BALT の細胞充実性の軽度の重症度の発現頻度上昇には、可逆性を示す所見がみられなかった。これらの肺所見の毒性学的意義は不明であったが、*P.carinii* による感染が認められたことから、本試験における NOAEL 評価には影響を及ぼさなかった。SNAC の免疫毒性誘発性については、ラットにおける 4 週間免疫毒性試験（523561、[2.6.6.11.8.2.1](#)）で詳細に検討した。この免疫毒性試験では、SNAC を最大 500 mg/kg/日まで経口投与したが、リンパ系組織の病理組織学的変化、免疫反応又は免疫表現型検査への影響との関連性は認められず、SNAC の免疫毒性誘発性は認められないことが確認された。

900 mg/kg/日群の2例に乳腺腺癌、及び1例に皮膚線維肉腫が認められた。これらの発現頻度は背景データの上限を超えており、本試験の時点では投与との関連性を完全に否定できなかった。しかしながら、以降に実施されたラット2年間がん原性試験（JLY0366、[2.6.6.11.5.2](#)）により、SNACのがん原性誘発性認められないことが確認された。

結論として、Sprague Dawley系ラットにSNACを90 mg/kg/日までの用量で1日1回26週間経口投与した結果、忍容性は良好であるが、300及び900 mg/kg/日において死亡が認められた。死因は特定されなかった。死亡に基づき、90 mg/kg/日がNOAELであると判断した。

2.6.6.11.3.2.6 ラットにおける26週間中間群を含む52週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.F、BNA00004）

本試験の目的は、Sprague Dawley系ラットにSNACを単剤で、又は██████との併用で1日1回26又は52週間強制経口投与時の毒性及びTKを評価することであった。SNACは██████との同時投与で2用量、単剤で3用量を投与した。本試験については、SNAC及び██████併用群のデータもSNACの評価に重要と考えられることから、本項に示す。投与群、各群の用量及び動物数を表2.6.6.11-14に示す。用量は以前に実施された13週間試験（WIL-315003、[2.6.6.11.3.2.3](#)）の結果に基づいて設定した。

表 2.6.6.11-14 ラットにおける52週間経口毒性試験（BNA00004）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals					
			52-week main study		26-week interim study		Satellite study	
			Males	Females	Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10	10	10	8	8
2	SNAC ^a	150	10	10	10	10	8	8
3	SNAC	250	10	10	10	10	8	8
4	SNAC	500	10	10	10	10	8	8
5	SNAC ^a	750	10	10	10	10	8	8
6	SNAC	900	10	10	10	10	8	8

a: This dose of SNAC was administered together with █████ mg/kg/day of █████

以下の評価項目を投与及び回復期間中、又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与後1～2時間及び週1回の詳細な検査）、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK（投与前、投与後10及び30分、1、2、及び4時間）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

投与期間中に合計で対照群 1 例及び投与群 16 例で死亡を発見、又は安楽死処置された。SNAC 投与動物の死亡は、投与期間を通して均等に認められた。SNAC を投与した 3 例の死亡は被験物質と関連性のない誤投与によるものであった。さらに、SNAC を投与した 4 例は心筋症、宿便及び皮下腫瘍等、異なる症状による二次的な一般状態変化が認められたことから、安楽死させた。これらの症状は SNAC と関連しないと考えられたため、これらの動物の安楽死も SNAC との関連はないと考えられた。SNAC 250、750 又は 900 mg/kg/日を投与した 3 例の死因は悪性腫瘍（悪性リンパ腫及び組織球性肉腫）であり、投与に関連する可能性は低いと判断され、NOAEL に及ぼす影響は認められなかった。最後に、死因が特定されなかった 6 例は、いずれも 750 又は 900 mg/kg/日群であった。これらの死亡には SNAC の投与と関連性があると考えられた。これらの動物はすべて死亡しているのが発見され、死亡の前に一般状態変化は認められなかった。

血液生化学的検査では SNAC 投与動物において、対照群と比較して様々な変化、すなわちアルカリホスファターゼ、ビリルビン、トリグリセリド、A/G 比、カルシウム、リンの上昇、及び尿素、クレアチニン、グルコース、総タンパク質、グロブリン、塩素の低下が示された。これらの変化はすべての用量で多くみられ、主に高用量では統計学的に有意であったが、概して用量反応性はなく、一部の变化は片性にのみ認められた。結果として、血液生化学的变化の投与との関連性は不明と判断された。アルカリホスファターゼ、総タンパク質／グロブリン／A/G 比、尿素、リン及び塩素については、一部の動物で背景データの範囲外であり、一方、ビリルビン、トリグリセリド、グルコース、クレアチニン及びカルシウムは、概して背景データの範囲内であった。

尿量は SNAC を概して 500 mg/kg/日以上投与した動物で増加したが、この変化は必ずしも統計学的に有意ではなく、用量反応性は 26 週試験群にのみ認められ、52 週試験群では認められなかった。他の尿中評価項目に対応する変化はなかった。腎重量が一部の用量で増加した。病理組織学的関連がみられなかったことから、これらの変化は有害ではないと考えられた。

軽微な肝重量の増加が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。相関する病理組織学的変化はなく、この所見は有害ではないと考えられた。

肉眼的病理検査では、SNAC を概して 500 mg/kg/日以上投与した動物において、腺胃の巣及び変色の発現頻度がわずかに上昇した。

主に軽微～軽度の過形成の発現頻度上昇が SNAC 750 及び 900 mg/kg/日を投与した動物の非腺胃に認められた。より低用量では過形成が認められなかったが、これらの用量で検査した胃は一部のみであった。発現頻度及び重症度の観点から、過形成への進行を示す徴候は認められず、腫瘍への進行を示す所見もみられなかった。通常は境界縁近くに認められる局所性変化である好酸球性水疱⁶が、500 mg/kg/日以上を投与したラットの非腺胃角質層にみられたが、過形成所見との一貫した関連性はなかった。

た。これらの所見は対照群にも時折認められた。低頻度ではあるが、軽微～軽度の線維化、出血／浮腫及びまれな炎症、びらん性炎症及び壊死が腺胃に認められた。さらに、250 mg/kg/日を投与した中間群のラット 1 例に腺胃の軽微な壊死が認められた。当該動物ではその他の変化及び動物福祉に及ぼす影響が認められないことから、本変化は有害ではないと考えられた。

腫瘍性変化が死亡動物ならびに中間動物及び主試験動物のいずれにおいても認められた。しかしながら、2 年ラットがん原性試験（JLY0366、[2.6.6.11.5.2](#)）でも確認されたように、いずれも投与との関連性はないと考えられた。

結論として、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 1 日 1 回 52 週間経口投与した結果、750 及び 900 mg/kg/日において死亡が認められた。死因は特定されなかった。認められた死亡に基づき、500 mg/kg/日が NOAEL であると判断した。

2.6.6.11.3.3 サルにおける試験

2.6.6.11.3.3.1 アカゲザルにおける 2 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.G、3007-97）

本試験の目的は、アカゲザルに SNAC を単剤、又は██████との同時投与で 1 日 1 回 2 週間強制経口投与時の毒性及び TK を評価することであった。SNAC は██████との同時投与で 3 用量、単剤で 3 用量を投与した。本試験は SNAC の評価に重要と考えられるため、SNAC 及び██████の同時投与群のデータも示す。投与群、各群の用量及び動物数を[表 2.6.6.11-15](#)に示す。

表 2.6.6.11-15 アカゲザルにおける 2 週間経口毒性試験（3007-97）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
			Main study		Satellite study	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	2	2		
2	SNAC	1000	2	2		
3	SNAC	1500	2	2		
4	SNAC	2500	2	2		
5	SNAC	1000 ^a	2	2	2	2
6	SNAC	1500 ^a	2	2		
7	SNAC	2500 ^a	2	2	2	2

a: This dose of SNAC was administered together with ██████U/kg/day of ██████

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与前、投与直後から投与後 2 時間後まで、同日の後の時点、及び週 1 回の詳細な検査）、体重、食欲、眼科学的検査、

血液学的検査、血液生化学的検査、グルコースモニタリングを含む、尿検査、TK（投与前、投与後 15、30、45 分及び 1、1.5、2、4、6、8 及び 12 時間）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

SNAC 単剤を投与した動物に死亡例はなかった。SNAC 1000 及び 2500 mg/kg+ [] を投与した 2 例が投与初日に死亡した。低血糖様症状を呈した後、50%ブドウ糖の経口又は静脈内投与したが、これらの動物は昏睡状態になり、いずれも投与約 2 時間後に死亡した。TK 解析において、これらの動物では曝露量が大きかったことが示された。この 2 例の剖検を行ったが、主試験の一部ではなかったことから、臓器は保存したものの検査は行わず、死因は特定されなかった。

その他に試験期間中の死亡は認められなかったが、様々な一般状態変化が主に投与 2 時間後付近で認められた。一般状態変化として、嘔吐、自発運動量の低下、一過性の側臥位、眼瞼下垂及び流涎がみられた。これらの一般状態変化は低血糖様症状と解釈され、バナナの供与及び 50%ブドウ糖の経口／静脈内投与等、1 例ごとに低血糖に対する治療を行った。しかしながら、グルコースモニタリングでは個体間変動が大きく、グルコース濃度からは SNAC による血糖降下作用は示唆されなかった。

本試験では死亡及び一般状態変化の他に投与に関連した影響は認められなかった。

結論として、アカゲザルに SNAC 及び [] を 1 日 1 回 2 週間経口投与した結果、1000 及び 2500 mg/kg/日において死亡が認められた。死因は特定されなかった。死亡の前には一般状態変化が認められ、また生存動物にも認められた。一般状態変化は、活動低下、側臥位、閉眼、流涎及び嘔吐であった。死亡及び一般状態変化が認められたことから、NOAEL は設定できなかった。

2.6.6.11.3.3.2 カニクイザルにおける 4 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.H、694-95）

本試験の目的は、カニクイザルに SNAC を [] との同時投与で（Part 1）、及び単剤で（Part 2）1 日 1 回 4 週間強制経口投与時の毒性を評価することであった。SNAC は [] との同時投与で 3 用量、単剤で 1 用量を投与した。本試験については、SNAC の評価に重要と考えられるため SNAC と [] の同時投与群のデータも示す。投与群、用量及び各群の動物数を [表 2.6.6.11-16](#) に示す。

表 2.6.6.11-16 カニクイザルにおける 4 週間経口毒性試験 (694-95)

	Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
				Main study		Satellite study	
				Males	Females	Males	Females
Part 1	1	Control (Vehicle)	0	3	3		
	2	SNAC	800 ^a	3	3		
	3	SNAC	1200 ^a	3	3		
	4	SNAC	1800 ^a	3	3		
Part 2	5	Control (Vehicle)	0	3	3	2	2
	6	SNAC	1800	3	3	3	3

a: This dose of SNAC was administered together with ■ mg/kg/day of ■

本試験の Part 1 において、第 1～6 日の朝に給餌を行わず（投与 1.5～3 時間前に餌を引き上げ）、第 7 日以降及び Part 2 では、朝に 2 時間自由給餌させ、その後投与 1.5～3 時間前に餌を引き上げた。投与約 2～2.5 時間後に再度給餌した。

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与直後及び投与後 2 時間は連続、その後必要に応じて 1 日 2 回以上）、体重、食欲、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

SNAC 1200、1800 及び 1800 mg/kg/日を単独投与又は■との同時投与した雄 3 例を、それぞれ試験 27、3 及び 2 日に一般状態変化のために安楽死させた。一般状態変化は投与直後に発現し、活動性低下、その後側臥位、閉眼及び昏睡がみられた。ブドウ糖の投与に効果がみられなかったことから、投与約 2.5 時間後に安楽死させた。これらの動物は低血糖ショックと診断され、治療に対する反応は認められなかった。一過性ではあるが、同様の一般状態変化が、主に 2 時間の観察時間中に SNAC を投与した全群で認められ、動物には概して低血糖様症状に対するブドウ糖投与が行われた。一般状態変化の発現頻度は、早朝給餌導入後の第 7 日に低下した。病理組織学的検査では、これらの動物の状態を説明できる所見は示されなかった。

第 29 日に、1800 mg/kg/日の SNAC と■を併用投与した雌 2 例及び 1800 mg/kg/日の SNAC を単剤投与した雌 1 例で血小板が軽度上昇した。この所見の SNAC との関連性及び毒性学的意義は不明である。第 15 日に、無機リン濃度が SNAC を投与した一部の動物で有意に低下したが、第 29 日には正常値に回復した。本所見は、おそらく主に第 1 週にみられた嘔吐の二次的変化と考えられた。

尿検査では、対照動物及び投与前の値に比べて尿中ケトン体の発現頻度の上昇及び尿 pH の軽微な低下が示された。さらに、相対腎重量が 1200 及び 1800 mg/kg/日で、肝重量が全用量でわずかに増加した。

が、いずれも用量反応性は認められなかった。これらの所見は関連する病理組織学的変化がなかったことから、有害ではないと考えられた。

結論として、カニクイザルに SNAC を 1 日 1 回 4 週間経口投与した結果、1200 及び 1800 mg/kg/日で死亡が認められた。死因は特定されなかった。死亡の前に一般状態変化が認められ、生存動物にも認められた。一般状態変化は活動性低下、側臥位、閉眼、流涎及び嘔吐であった。認められた死亡及び一般状態変化により、NOAEL は特定できなかった。

2.6.6.11.3.3.3 アカゲザルにおける 13 週間経口毒性試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.I、3060-98)

本試験の目的は、アカゲザルに SNAC を単剤、又は██████との同時投与で 1 日 1 回 13 週間強制経口投与時の毒性を評価することであった。SNAC は██████との同時投与で 3 用量、単剤で 1 用量を投与した。本試験では、対照群と SNAC 単剤群のデータのみを示す。投与群と各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-17 に示す。用量は以前に実施されたアカゲザルにおける 2 週間毒性試験 (3007-97、2.6.6.11.3.3.1) の結果に基づき選定した。

表 2.6.6.11-17 アカゲザルにおける 13 週間経口毒性試験 (3060-98)

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	4	4
2	SNAC	1800	4	4

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与前、投与後 2 時間連続、同日の後の時点、及び週 1 回の詳細な検査）、体重、食欲、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

本試験において死亡は認められなかったが、有害な一般状態変化が頻繁に認められた。SNAC を投与した動物において投与直後以降に流涎の発現頻度の上昇がみられた。その他の一般状態変化の嘔吐、活動性低下、ケージの床での横臥、傾眠、及び非協調運動などはさらに、主に投与の 1～3 時間後に認められたが、この時間以外にも時折認められた。さらに、ケージトレイ上の物質及びトレイ上に未消化の餌が認められる頻度が、SNAC を投与した動物で高頻度に認められた。生存に関わる低血糖を防ぐため、ブドウ糖の経口又は静脈内投与が複数回行われた。

体重に及ぼす影響は認められなかったが、SNAC を投与した動物では食欲が少し抑制されたようであった。

尿検査において、尿中電解質の軽微な変化傾向がみられ、カリウム及び塩素濃度の軽微な低下及びナトリウム濃度の軽微な上昇が認められた。雄において腎重量の軽微な増加がみられたが、尿中電解質の変化は腎臓の病理組織学的変化と関連しなかったことから、有害ではないと考えられた。

肝重量は SNAC 投与群で中等度に増加したが、臨床検査による変化又は病理組織学的所見との関連がなく、この肝重量増加に毒性学的意義はないと考えられた。さらに、胸腺重量が SNAC 投与群で軽度減少し、雄 1 例では軽微な胸腺萎縮と関連していた。これらの胸腺の所見はストレスによる二次的变化と考えられた⁷。

結論として、アカゲザルに SNAC を 1 日 1 回 13 週間経口投与した結果、1800 mg/kg/日において有害な一般状態変化が認められたが、死亡は認められなかった。以上より NOAEL を設定できなかった。

2.6.6.11.3.3.4 カニクイザルにおける 16 週間経口毒性試験及び 2 週間回復性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.J、JLY0387）

本試験の目的は、吸収促進剤として SNAC を含有した [REDACTED] の錠剤を、カニクイザルに 1 日 1 回計 18 週間（用量漸増 2 週間＋主試験 16 週間）経口投与時の毒性を評価することであった。SNAC に関連する所見と [REDACTED] に関連する所見を識別するため、1 群には 300 mg SNAC を含有するが [REDACTED] を含まない錠剤を投与し、対照群には錠剤と同サイズの空カプセルを投与した。錠剤及びカプセルを動物の咽頭後方部に留置させて飲み込ませた。本項では、対照群及び SNAC 投与群のデータのみを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-18 に示す。以前に実施された試験に基づき、SNAC の用量である 300 mg/動物/日の忍容性は良好であると予測された。SNAC 300 mg 含有錠剤の成分及び含量は臨床用錠剤と同じであった。

表 2.6.6.11-18 カニクイザル 16 週間経口毒性試験（JLY0387）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/animal/day) ^a			Number of animals			
		Week -2 ^b	Week -1 ^b	Week 1-16	Main study		Recovery study	
					Males	Females	Males	Females
1	Control (Empty capsule)	0	0	0	4	4	0	0
2	SNAC	300	300	300	4	4	3	3

a: 300 mg/animal/day corresponded to an average dose of approx. 100 mg/kg/day.

b: A dose escalation period of 2 weeks was included to ensure tolerability towards [REDACTED], the SNAC dose was 300 mg/animal/day throughout the escalation period

餌は投与の約 3 時間前に引き上げ、投与の約 2 時間後に再度給餌した。

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与直前、投与中及び投与直後、投与後 30 分～2 時間、同日の可能な限り遅い時点、及び週 1 回の詳細な検査）、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK（投与前、投与の 15 分、1、2、4、12 及び 24 時間後）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

動物の外見及び行動に投与の影響は認められず、試験期間中に死亡はなかった。しかし、投与に対する抵抗及びそれに引き続き生じた悪心及び流涎が SNAC を投与した動物に認められ、投与直後でも高頻度に認められた。投与手順は対照動物と同様であったことから、これらの徴候は SNAC に関連すると考えられ、味が原因である可能性が考えられたが、一過性であることと症状の特性から、有害ではないと考えられた。

摂餌量は SNAC 投与群で軽微に減少したが、対照と比較して概して体重増加抑制が雄のみで認められたのに対し、雌の体重増加は軽微に促進された。したがって、投与との関連性は不明であり、これらの所見に毒性学的意義はないと考えられた。

尿検査では、雌において軽微なナトリウム排泄量の増加傾向を伴う軽微な塩素排泄量の増加が認められた。これらの変化はわずかであり、雄ではみられなかったことから、投与との関連性は不明と考えられた。これらの変化について、病理組織学的変化との関連性は認められなかった。したがって、SNAC 分子由来のナトリウム排泄に適応した増加であると考えられた。

SNAC 投与群の雄において胸腺重量の低下が認められ、そのうちの 1 例で認められた本所見について、肉眼的病理検査で胸腺の小型化、及び病理組織学的検査で胸腺皮質の細胞充実性の低下との関連性が認められた。これらの胸腺の所見は、SNAC の味による投与中のストレスに関連すると考えられることから²、胸腺重量の低下について毒性学的意義はないと考えられた。

結論として、カニクイザルに SNAC 300 mg を含有する錠剤を 1 日 1 回 16 週間経口投与した結果、主に投与に対する抵抗、悪心及び流涎が認められた。これらはいずれも SNAC の味によるものであり、投与手順によるものではないと考えられた。毒性が認められなかったことから、NOAEL は 300 mg/動物/日（約 100 mg/kg/日に相当）と考えられた。

2.6.6.11.3.3.5 アカゲザルにおける 39 週間経口毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.7.K、BNA00003）

本試験の目的は、アカゲザルに SNAC を単剤、又は██████との同時投与で、1 日 1 回 39 週間強制経口投与時の毒性を評価することであった。SNAC は██████との同時投与で 2 用量、単剤で 3 用量を投与した。本試験は SNAC の評価に重要と考えられるため、SNAC 及び██████の同時投与群のデータも示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-19 に示す。用量は以前に実施されたアカゲザルにおける 13 週間毒性試験（3060-98、[2.6.6.11.3.3.3](#)）の結果に基づき選定した。

表 2.6.6.11-19 アカゲザルにおける 39 週間経口毒性試験 (BNA00003)

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	3	3
2	SNAC	150 ^a	3	3
3	SNAC	200	3	3
4	SNAC	300	3	3
5	SNAC	500 ^a	3	3
6	SNAC	600	3	3

a: This dose of SNAC was administered together with ■ mg/kg/day of ■

餌は朝、投与の約 3 時間前に引き上げ、投与後約 2 時間まで給餌しなかった。

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（朝 1 回、投与後 1 時間、及び午後に 1 回、さらに、必要に応じて追加の観察）、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK（投与前、投与後 15 及び 30 分、1、2、3、4 及び 8 時間）、臓器重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

全投与群を通して、雄 7 例及び雌 2 例に活動性低下、嗜眠又は側臥位が散発的に認められた。500 及び 600 mg/kg/日では、これらの症状は、1 日のうち横臥した 4 例の発現頻度及び治療（ブドウ糖、乳酸リンゲル液又は果物）の必要性に関する評価結果から、有害であると考えられた。150 及び 200 mg/kg/日では、2 例がそれぞれ 1 日に 1 回嗜眠を発現した。これらの動物は横臥せず治療の必要はなく、また、個別に発現したことから、2 例に認められた一般状態変化は有害ではないと考えられた。

150、200 及び 300 mg/kg/日の雄 4 例において、第 26 週又は第 39 週の眼科学的検査で結膜腫脹が認められた。試験報告書では、投与との関連性は不明と記載されていたが、最高用量及び高用量及び雌では同様の所見がみられなかったことから、結膜腫脹について投与との関連性はないものと考えられた。

結論として、アカゲザルに SNAC を 1 日 1 回経口投与した結果、500 及び 600 mg/kg/日において散発的ではあるが、治療を要する活動性低下、嗜眠又は側臥位等の一般状態変化が認められ、有害と考えられた。したがって、300 mg/kg/日が NOAEL であると判断された。

2.6.6.11.4 遺伝毒性試験

当時のガイダンス文書である ICH S2A 及び ICH S2B（現行のガイダンス文書は ICH S2⁸）に準拠して、SNAC を用いたフルセットのバッテリー遺伝毒性試験（*in vitro* 試験を 2 試験、*in vivo* 試験を 1 試験）を

実施した。すべての試験は GLP に準拠して実施した。これらの試験において SNAC の遺伝毒性誘発性は認められなかった。

2.6.6.11.4.1 *In vitro* 遺伝毒性試験

2.6.6.11.4.1.1 4 種のヒスチジン要求性株の *Salmonella typhimurium* 及び 1 種のトリプトファン要求性株の *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.8.A、0725-2140)

4 種のヒスチジン要求性株である *Salmonella typhimurium* (TA98、TA100、TA1535、TA1537) 及び 1 種のトリプトファン要求性株である *Escherichia coli* (WP2 uvrA) を用いて、SNAC の変異原性を評価した。SNAC を脱イオン水に溶解し、313、625、1250、2500 及び 5000 µg/plate の濃度で、ラット肝代謝活性系 (S-9) の存在下及び非存在下で、2 回の独立した試験を実施した。

結論として、SNAC は検討したいずれの株においても、代謝活性系 (ラット誘導肝 S-9) の存在下又は非存在下で復帰変異コロニー数の有意な増加を誘発しなかった。これらの結果は、同一条件で行った 2 回目の試験 (確認試験) により確認された。

2.6.6.11.4.1.2 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.8.B、0545-3300)

女性ドナーから得られたヒト末梢血リンパ球を培養し、代謝活性系 (S-9) の存在下及び非存在下で *in vitro* 染色体異常試験を実施し、SNAC の染色体損傷性を検討した。DRF 試験の結果に基づき、SNAC を脱イオン蒸留水で希釈し、400、1000、2000、4000、及び 5000 µg/mL の濃度で試験を実施した。培養プレートは各試験につき 2 枚用いた。その後、代謝活性系 (S-9) の存在下及び非存在下で 2000、4000 及び 5000 µg/mL の濃度で処理した細胞の染色体異常をスコア化した。確認試験 (S-9 非存在下) も実施し、本試験では、400、1000 及び 2000 µg/mL の濃度で処理した細胞の染色体異常をスコア化した。

結論として、SNAC は検討したいずれの濃度においても、代謝活性系 (S-9) の存在下及び非存在下で、溶媒対照に比べて染色体異常の有意な増加を誘発しなかった。

2.6.6.11.4.2 *In vivo* 遺伝毒性試験

2.6.6.11.4.2.1 SNAC 投与マウスの骨髄を用いた小核試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.9.A、0374-1521)

雌雄 CD-1 系マウスの骨髄細胞における SNAC の小核を有する多染性赤血球 (MPCE) 誘発性を検討した。SNAC を 25% v/v プロピレングリコール溶液で調製し、マウスに強制経口投与した。本試験では

各群雌雄 5 例に 0、200、500 及び 1000 mg/kg（最大耐量）の濃度で単回投与した。MPCE の発現頻度を SNAC 投与の 24、48 及び 72 時間後に測定した。

DRF 試験を 10～2000 mg/kg の範囲で実施した（3 例/雌雄/群）。2000 mg/kg の雄 2/3 例、雌 1/3 例が、1000 mg/kg の雌 1 例が投与後約 30 分に死亡した。動物が死亡する前に痙攣がみられた。

小核試験において最大 1000 mg/kg まで動物に投与したが、一般状態変化は認められなかった。検討したいずれの濃度及び試料採取時間においても、同時溶媒対照群と比較して、SNAC 投与群の MPCE 数に有意な増加はみられなかった。

結論として、SNAC は最大 1000 mg/kg（最大耐量）まで投与した雌雄マウスにおける小核試験において陰性であった。

2.6.6.11.5 がん原性試験

SNAC のがん原性誘発性について、現行ガイドラインに従い実施した 26 週間トランスジェニック rasH2 マウス試験及び 104 週間ラット試験において評価した。これらの試験を開始する前に、試験デザイン及び用量設定について米国食品医薬品局（FDA）医薬品評価研究センター新薬審査部門との相談を行った。用量漸増の詳細については以下の各試験概要を参照のこと。

がん原性試験の概要を以下の表 2.6.6.11-20 に示す。

表 2.6.6.11-20 がん原性試験の概要

Species	Duration	Administration route	Nominal dose levels (mg/kg/day)	NOAEL (mg/kg/day)	Effect(s) defining NOAEL	Study ID
Mouse	26 weeks	Oral	0, 30, 100, 300	300	No toxicologically significant findings and SNAC was not carcinogenic	JLY0436
Rat	104 weeks	Oral	0, 75, 200, 500	75 (females) and 500 (males)	SNAC caused increased mortality in females at 200 and 500 mg/kg/day but was not carcinogenic	JLY0366

2.6.6.11.5.1 rasH2 トランスジェニックマウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.10.A、JLY0436）

本試験の目的は、SNAC を rasH2 トランスジェニックマウスに 1 日 1 回 26 週間経口投与時の SNAC のがん原性誘発性を評価することであった。野生型（非トランスジェニック）rasH2 マウスを TK 評価

に用い、導入遺伝子の機能性と検討に用いたトランスジェニックマウスの当該バッチの適切性を確認するために陽性対照群を設けた。陽性対照群のデータは本項では示さないが、N-メチル-n-ニトロソウレアを単回腹腔内投与した結果、予想した通り腫瘍が高頻度に発現し、明確に示された。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-21 に示す。用量は以前に実施された野生型 rasH2 マウスにおける 6 週間 DRF 試験（JLY0382 試験、2.6.6.11.3.1.1）の結果及び FDA の推奨に基づいて設定した。高用量 300 mg/kg/日が本試験における最大耐量と予測された。750 mg/kg/日において認められた死亡と上記の DRF 試験から、300 mg/kg/日を超える用量を 26 週間投与した場合、雌雄共有意に死亡が生じると予測された。

表 2.6.6.11-21 rasH2 トランスジェニックマウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験（JLY0436）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
			Main study		Satellite study	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	25	25	6	6
2	SNAC	30	25	25	21	21
3	SNAC	100	25	25	21	21
4	SNAC	300	25	25	21	21
5 ^a	MNU	37.5	25	25	0	0

a: Positive control group administered a single intraperitoneal dose of N-methyl-n-nitrosourea (MNU) on day 1 only

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、腫瘍の触診を含む一般状態観察（試験週ごとに異なるスケジュール、詳細は報告書参照）、体重、摂餌量、TK（投与前、投与後 15 分、1、3、5、7 及び 24 時間）、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

すべての動物の外見及び行動について、投与の影響は認められなかった。26 週間の投与期間中、合計で雄 4 例及び雌 3 例が死亡又は安楽死処置された。これらの死亡例のうち 4 例は対照群、1 例は高用量群の雄、2 例は中用量群及び高用量群の雌であった。高用量群の雄を剖検したところ、胸腔に血餅がみられ、当該動物の死亡は誤投与による偶発的なものであると考えられた。高用量群の雌は死亡が発見され、脾臓にみられた血管肉腫が主たる死因であった。これは rasH2 トランスジェニックマウスでよく認められる腫瘍であり、また、血管肉腫は対照群の雌の死亡例にも認められたことから、高用量群の雌で認められた死亡について、投与と関連性はないものと考えられた。動物福祉上の理由から安楽死させた中用量群の雌にも血管肉腫が認められた。このことは、動物の一般状態の悪化が主たる死因ではないと考えられるものの、死亡率が雌対照群と同程度であること、高用量群では投与に関連した死亡がなかったことから、中用量群の雌の死亡について、投与との関連性はないものと考えられた。

SNAC を投与したいずれの動物にも触知可能な腫瘍は検出されなかったことから、触知可能な腫瘍の群分布、数及び平均発現時間について投与の影響は認められなかった。肉眼的病理検査及び病理組織学的検査の結果、SNAC 投与に関連すると考えられる毒性学的意義のある病変、特に、投与に関連した腫瘍所見は認められなかった。

投与との関連性が不明な所見が膀胱に認められ、雄においてリンパ球凝集の発現頻度の上昇が認められた（0、30、100 及び 300 mg/kg/日でそれぞれ 0、12、16、及び 32%）。雌では差異が認められなかった。中用量群及び高用量群の雄の発現頻度は、試験実施施設の背景データの範囲（平均 4%、0～12%）を上回っていた。しかしリンパ球凝集はマウスでは多くみられる所見である⁹。当該所見について、細胞損傷、炎症又はその他の細胞反応との関連性は認められないことから、毒性学的意義はないと考えられた。

結論として、rasH2 トランスジェニックマウスに SNAC を 30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で 26 週間経口投与したが、毒性学的意義のある所見は認められず、SNAC が rasH2 トランスジェニックマウスにがん原性を誘発する根拠は認められなかった。したがって、NOAEL は検討した最高用量である 300 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.11.5.2 Sprague Dawley 系ラットにおける 104 週間経口がん原性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.10.B、JLY0366）

本試験の目的は、SNAC を Sprague Dawley 系ラットに 1 日 1 回 104 週間経口投与時の SNAC のがん原性誘発性を評価することであった。投与群と各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-22 に示す。用量は以前に実施された長期毒性試験（JLY0278、[2.6.6.11.3.2.5](#) 及び BNA00004、[2.6.6.11.3.2.6](#)）の結果に基づき設定し、最高用量はこれら 2 試験より本試験期間中の最大耐量と予測された 500 mg/kg/日とした。試験開始前に、FDA と本試験のデザイン及び用量に関する相談を行った。

表 2.6.6.11-22 Sprague Dawley 系ラットにおける 104 週間経口投与がん原性試験（JLY0366）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
			Main study	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	72	72
2	SNAC	75	72	72
3	SNAC	200	72	72
4	SNAC	500	72	72

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、腫瘍の触診を含む一般状態観察（試験週ごとに異なるスケジュール、詳細は報告書参照）、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、TK（投与前、投与後 10 及び 30 分、1、2、及び 4 時間）、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

合計で雄 175 例及び雌 197 例が投与期間中に死亡、又は安楽死処置された。第 99 週に高用量群（500 mg/kg/日）の雌の生存数が 20 例に減少し、この群の雌への投与を第 100 週から投与終了時まで停止した。第 103 週には中用量群（200 mg/kg/日）の雌の生存数が 20 例に減少し、この群の雌への投与を投与終了時まで停止した。その他の群の雌及び雄の全群は予定通り 104 週間投与された。

200 又は 500 mg/kg/日投与群の雌において対照群と比較して死亡率が上昇したが、関連する一般状態変化は認められず、病理組織学的検査において一貫した死因は特定されなかった。雄の死亡率には対照群と比較して影響はみられなかったが、500 mg/kg/日の雄では、第 8 週以降に軽微な摂餌量の減少を伴う軽微な体重増加抑制が認められた。しかしながら、これらの雄の体重増加及び摂餌量の所見は、変化の程度が小さいことから有害ではないと考えられた。

複数の赤血球評価指標の変化（平均細胞ヘモグロビン及び平均細胞用量の低下、赤血球数の増加）が 500 mg/kg/日投与群の雌雄で認められた。しかしながら、変化は軽微であり、ヘモグロビン濃度に影響はなかったことから、これらは有害ではないと考えられた。

500 mg/kg/日投与群の雌における血漿中トリグリセリド濃度の上昇及び血漿中総コレステロール濃度の低下は、肝細胞内の脂質代謝異常を示唆する可能性がある。しかしながら、この影響について、肝細胞の病理組織学的変化との関連性が認められなかったことから、これらの変化に毒性学的意義はないと考えられた。

尿中カリウム排泄量の減少及び尿中 pH の低下を伴うナトリウム排泄量の増加が、主に 200 及び 500 mg/kg/日群の雌雄に認められた。投与に関連した病理組織学的所見が認められなかったことから、これらの変化は有害ではなく、SNAC 分子由来のナトリウムが排出速度が適応的に上昇したことによるものと考えられた。

SNAC 投与によると考えられる腫瘍性又は非腫瘍性変化は認められなかったことから、本試験において、SNAC のラットに対するがん原性は認められないことが示された。

結論として、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 75、200 又は 500 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回、最長 104 週間経口投与した結果、200 及び 500 mg/kg/日において雌の死亡率が上昇し、500 mg/kg/日において雄の体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。病理組織学的検査の結果、投与に関連した腫瘍性又

は非腫瘍性変化が示されなかったことから、SNAC の Sprague Dawley 系ラットに対するがん原性は認められなかった。NOAEL は、雌では 200 及び 500 mg/kg/日 で死亡率が上昇したことから 75 mg/kg/日、雄では有害な所見がみられなかったことから 500 mg/kg/日 と判断した。

2.6.6.11.6 生殖発生毒性試験

ICH S5 ガイドライン¹⁰に従い、SNAC の受胎能ならびに出生前及び出生後の発生に及ぼす影響を 1 動物種（ラット）において、胚・胎児の発生（EFD）に及ぼす影響を 2 動物種（ラット及びウサギ）において検討した。重要な生殖発生毒性試験の概要を以下の表 2.6.6.11-23 に示す。

表 2.6.6.11-23 重要な生殖発生毒性試験の概要

Species	Study Type	Administration route	Nominal dose levels (mg/kg/day)	Maternal NOAEL (mg/kg/day)	NOAEL (mg/kg/day)	Effect(s) defining NOAEL	Study ID
Rat	FEED	Oral (gavage)	0, 1000	1000	1000	No treatment related adverse changes	805-003
Rat	EFD	Oral (gavage)	0, 1000	<1000 ^a	1000	No treatment related adverse changes on embryo-foetal development	805-002
Rabbit	EFD	Oral (gavage)	0, 1000	<1000 ^a	1000	No treatment related adverse changes on embryo-foetal development	805-001
Rat	PPND	Oral (gavage)	0, 1000	<1000 ^a	Not established	A NOAEL could not be established due to increased incidence of still born F1 pups and increased pup deaths <i>postpartum</i>	805-004

Abbreviations: FEED: Fertility and early embryonic development; EFD: Embryo-foetal Development; PPND: Pre- and Postnatal Development

a: Maternal body weight gain and food consumption were adversely reduced at 1000 mg/kg/day

2.6.6.11.6.1 ラットにおける受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験

受胎能及び胚・胎児発生に関する評価を、雌雄ラットの同居開始のそれぞれ 2 及び 4 週間前から妊娠 7 日（GD7）までの期間に実施した。

2.6.6.11.6.1.1 ラットにおける受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.12.A、805-003）

本試験の目的は、SNAC の単剤投与又は██████との同時投与時における受胎能及び胚・胎児の発生に及ぼす影響を評価することであった。SNAC を Sprague Dawley 系ラットに 1 日 1 回強制経口投与した。雌に同居開始 2 週間前から GD7 まで投与した。GD0 を交配日とした。雄に同居開始 4 週間前から大部分の雌を安楽死処置する時点（GD20）まで投与した。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-24 に示す。

表 2.6.6.11-24 ラットにおける受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験（805-003）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	25	25
5	SNAC	1000	25	25

以下の評価項目を試験期間中又は終了時に評価した：

成体雄雌：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、性周期、CASA 解析による精子運動率及び濃度、交配能、受胎能、妊娠成績、雄の生殖臓器重量及び肉眼的病理検査。

胎児：体重及び外表検査。

本試験において投与に関連した死亡はなかったが、明らかに投与との関連のない切歯及び口蓋損傷が認められたことから、第 17 日に雌 1 例を安楽死させた。

SNAC 1000 mg/kg/日を投与した動物において最も一貫した一般状態変化は過度の流涎であった。その他の投与に関連する可能性のある一般状態変化として、雄において触診時の低体温、自発運動量の低下、努力性呼吸、口周囲の赤色の乾燥性物質、色素鼻汁、不十分な毛繕い及び腹部被毛部の着色尿がみられた。これらは雄の 1～3 例に散発的に発現した。

雄に体重増加抑制が投与期間中、特に第 56～70 日に認められたが、統計学的に有意であったのは第 56～63 日のみであった。雌では、体重増加抑制が GD0～GD8 において明らかにみられ、第 2 週から GD8 までの妊娠期間を通して摂餌量が減少した。

結論として、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 1000 mg/kg/日の用量で経口投与したが、受胎能、交配能、妊娠成績又は同腹児評価項目について、投与に関連した影響は認められなかった。受胎能及び胚・胎児の発生に関する NOAEL は 1000 mg/kg/日と判断した。

2.6.6.11.6.2 ラットにおける胚・胎児の発生に関する試験

ラットを用いて胚・胎児の発生に関する試験を 2 試験実施した。1 試験は予備試験であり、主試験の用量設定を最適化するため、主試験の前に実施した。

2.6.6.11.6.2.1 ラットにおける予備的 DRF 及び胚・胎児の発生に関する試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.11、805-002P）

本試験の目的は、主試験における適切な SNAC 用量を特定すること、及び SNAC の^{(b) (4)}との同時投与又は単剤投与が胚・胎児発生に影響を及ぼす可能性についての予備情報を得ることであった。SNAC は妊娠 Sprague Dawley 系ラットに GD7～GD17 までの器官形成期に 1 日 1 回強制経口投与した。すべての動物を GD20 に安楽死処置し評価した。本項では、対照群と SNAC 単剤投与群のデータのみを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-25 に示す。

表 2.6.6.11-25 ラットにおける DRF 及び胚・胎児発生（805-002P）

Group	Treatment	Treatment days (GD)	Nominal dose (mg/kg/day) ^a	Number of females
1	Control (Vehicle)	7 to 17	0	8
7	SNAC	7 to 17	1000	8
8	SNAC	7 to 17	2000	8

以下の評価項目を試験期間中又は終了時に評価した：

母動物：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、妊娠成績及び肉眼的病理検査。

胎児：体重及び外表検査。

1000 及び 2000 mg/kg/日の各群 1 例で、それぞれ GD9 及び GD7 に死亡が認められた。1000 mg/kg/日の動物には軽微な体重減少が GD7～GD9 に認められた。2 例とも一般状態変化はみられず、剖検において死因は特定されなかった。

1000 及び 2000 mg/kg/日を投与した動物では、一般状態変化として口周囲の赤色物質がみられ、1000 mg/kg/日では過度の流涎及び色素鼻汁も認められた。これらの症状は一過性であり、各群 1～2 例に発現した。

用量依存的な体重減少が 1000 及び 2000 mg/kg/日投与群で、特に GD7～GD12 に認められ、2000 mg/kg/日では投与期間を通して摂餌量減少が明らかであった。胎児の体重減少が 2000 mg/kg/日で明らかであったが、その他に影響を受けた同腹児評価項目は認められなかった。これらの変化に統計学的有意差はみられなかった。

結論として、妊娠 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 1000 及び 2000 mg/kg/日の用量で経口投与した結果、母動物の死亡、一過性の一般状態変化及び体重増加抑制が認められた。2000 mg/kg/日では、摂餌量減少及び胎児体重減少もみられたことから、以後に実施する主試験には 1000 mg/kg/日が推奨された。

2.6.6.11.6.2.2 ラットにおける胚・胎児の発生に関する試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.13.A、805-002）

本試験の目的は、SNAC の単剤投与及び██████との同時投与が胚・胎児の発生に及ぼす影響を評価することであった。SNAC は妊娠 Sprague Dawley 系ラットに GD7～GD17 までの器官形成期に 1 日 1 回強制経口投与した。すべての動物を GD20 に安楽死処置し評価した。本試験では、対照群及び SNAC 単剤投与群のデータのみを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-26 に示す。

表 2.6.6.11-26 ラットにおける胚・胎児発生（805-002）

Group	Treatment	Treatment days (GD)	Nominal Dose (mg/kg/day)	Number of Females
1	Control (Vehicle)	7 to 17	0	25
5	SNAC	7 to 17	1000	25

以下の評価項目を試験期間中又は終了時に評価した：

母動物：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、妊娠成績、及び肉眼的病理検査。

胎児：体重、外表、内臓及び骨格検査。

投与に関連した死亡は認められなかったが、SNAC を投与した雌 1 例で、明らかに被験物質投与とは関連のない挿管時の過誤による死亡が発見された。

SNAC を投与した母動物に顕著な体重増加抑制及び摂餌量の低下が、特に GD7～GD10 に認められた。変化の程度から、これらの所見は有害であると考えられた。

結論として、妊娠 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 1000 mg/kg/日の用量で経口投与した結果、母動物の体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。これらの影響により、母動物の NOAEL は 1000 mg/kg/日未満であった。胚・胎児の発生について、投与に関連した影響は認められず、NOAEL は 1000 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.11.6.3 ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験

ウサギを用いた胚・胎児の発生に関する試験を 2 試験実施した。1 試験は予備試験であり、主試験の用量設定を最適化するため、主試験に先行して実施した。

2.6.6.11.6.3.1 ウサギにおける DRF 及び胚・胎児の発生に関する予備試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.11、805-001P）

本試験の目的は、主試験に適切な SNAC 用量を特定すること、及び SNAC の単剤投与又は ████████ との同時投与が胚・胎児の発生に影響を及ぼす可能性についての予備情報を得ることであった。SNAC を妊娠ニュージーランドホワイト種ウサギに GD6～GD18 までの器官形成期に 1 日 1 回強制経口投与した。すべての動物を GD29 に安楽死処置し評価した。対照群と SNAC 単剤投与群のデータのみを本項に示す。投与群、各群の用量及び動物数を [表 2.6.6.11-27](#) に示す。

表 2.6.6.11-27 ウサギにおける DRF 及び胚・胎児の発生に関する試験（805-001P）

Group	Treatment	Treatment days (GD)	Nominal Dose (mg/kg/day)	Number of Females
1	Control (Vehicle)	6 to 18	0	6
2	SNAC	6 to 18	1000	6
3	SNAC	6 to 18	1500	6
4	SNAC	6 to 18	2000	6
5	SNAC	6 to 18	2500	6
6	SNAC	6 to 18	3000	6

以下の評価項目を試験期間中又は終了時に評価した：

雌／母動物：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、TK、妊娠成績及び肉眼的病理検査。

胎児：体重及び外表検査。

最低用量を除く全用量において用量依存的な死亡率の上昇が認められた。投与に関連した死亡が、1500、2000、2500 又は 3000 mg/kg/日においてそれぞれ 2、4、5 及び 6 例発生した。いずれの動物も剖検において死因は特定されなかった。投与に関連した肉眼的変化として、胃底部及び胃底部以外の領域における極小な赤色部位が、2000 mg/kg/日を投与した 1 例に認められた。

1500 mg/kg/日以上 of SNAC を投与した動物（死亡例を含む）に認められた一般状態変化は、自発運動量の低下、軽微な運動失調、努力性呼吸、虚脱、正向反射障害／消失、過度の流涎、便の減少／無便、消瘦又は啼鳴であった。1000 mg/kg/日では 1 例に一過性の自発運動量の低下が認められた。

2000 mg/kg/日以上では、大半の動物で死亡が発見されるまで、又は安楽死させるまで、摂餌量の減少を伴う体重減少が認められた。1500 mg/kg/日では体重減少が GD6～GD9 に、また、体重増加抑制が GD10～GD24 にみられた。体重に及ぼす影響は、投与期間を通して、また、GD24 まで明らかな摂餌量の減少を伴っていた。1000 mg/kg/日では、体重及び摂餌量の減少は、投与開始後 3 日間においてのみ認められた。これらの変化に統計学的有意差はみられなかった。

同腹児評価項目に及ぼす影響が、1500 mg/kg/日以上を投与した動物においてみられた。1500、2000 及び 2500 mg/kg/日では再吸収胚の増加が認められると同時に再吸収胚のみられた母動物の割合が上昇した。1500 mg/kg/日では、母動物 1 例に死亡胎児 1 例がみられ、また、本用量の胎児 1 例において、通常は子宮圧迫に関連した奇形である後肢内転及び彎曲が認められた。1000 mg/kg/日では、同腹児評価項目に影響は認められなかった。

結論として、妊娠ニュージーランドホワイト種ウサギに SNAC を 1500 mg/kg/日以上 of 用量で経口投与した結果、多数の死亡（ただし死因は特定されなかった）が認められたように、最大耐量を超えていた。これらの用量では、多様な一般状態変化、体重、摂餌量及び同腹児評価項目に及ぼす影響が認められた。1000 mg/kg/日では母動物の毒性が認められたが、1 例における自発運動量の低下及び投与初期の体重及び摂餌量減少に限られていた。したがって、本試験の結果から、1000 mg/kg/日までの用量は、ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験の主試験において、GD6～GD18 に投与時の忍容性が予測可能であることが示された。

2.6.6.11.6.3.2 ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.13.B、805-001）

本試験の目的は、SNAC の単剤投与及び██████との同時投与が胚・胎児の発生に及ぼす影響を評価することであった。SNAC を妊娠ニュージーランドホワイト種ウサギに GD6～GD18 までの器官形成期に 1 日 1 回強制経口投与した。すべての動物を GD29 に安楽死処置し評価した。本試験では、対照群と SNAC 単剤投与群のデータのみを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-28 に示す。

表 2.6.6.11-28 ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験（805-001）

Group	Treatment	Treatment days (GD)	Nominal Dose (mg/kg/day)	Number of Females
1	Control (Vehicle)	6 to 18	0	20
5	SNAC	6 to 18	1000	20

以下の評価項目を試験期間中又は終了時に評価した：

雌／母動物：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、肉眼的病理検査及び妊娠成績。

胎児：体重、外表ならびに内臓及び骨格検査。

投与に関連した唯一の所見は、投与中及び投与後における母動物の体重増加パターンの異常及び摂餌量の減少であり、これらは有害と考えられた。

結論として、妊娠ニュージーランドホワイト種ウサギに SNAC を 1000 mg/kg/日の用量で経口投与した結果、母動物の体重増加抑制及び摂餌量減少が認められた。したがって、母動物の NOAEL は 1000 mg/kg/日未満であった。胚・胎児の発生に関して、投与に関連した影響は認められず、NOAEL は 1000 mg/kg/日と判断された。

2.6.6.11.6.4 ラットにおける胚・胎児の発生ならびに出生前及び出生後の発生に関する試験

胚・胎児の発生、ならびに出生前及び出生後の発生に関する評価を、ラットを用いて妊娠 7 日から授乳期の第 20 日まで実施した。

2.6.6.11.6.4.1 Sprague Dawley 系ラットにおける胚・胎児及び出生前ならびに出生後の発生に関する試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.14.A、805-004）

本試験の目的は、SNAC の単剤投与及び██████との同時投与が母動物の妊娠、分娩、及び授乳期間、及び胚・胎児発生、生存数、成長、出生後の発生及び児動物の生殖能に及ぼす影響を評価することであった。SNAC は妊娠 Sprague Dawley 系ラットに GD7～出生後第 20 日まで 1 日 1 回強制経口投与した。出生後第 21 日に、すべての F1 母動物を安楽死処置し評価した。未出生ラットは GD24 まで投与し、GD25 に安楽死処置した。F1 児動物には投与しなかった。出生後第 21 日に、各群雄 25 例及び雌 25 例の F1 児動物を割り付けて詳細な評価を行い、残りの児動物は処分した。約 90 日齢時点でこれらの動物をペア交配させ、GD20 に安楽死処置し評価した。本試験では、対照群及び SNAC 単剤投与群のデータのみを示す。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-29 に示す。

表 2.6.6.11-29 ラットにおける胚・胎児及び出生前ならびに出生後の発生に関する試験（805-004）

Group	Treatment	Treatment days	Nominal Dose (mg/kg/day) ^a	Number of Females
1	Control (Vehicle)	GD 7 to day 20 <i>post-partum</i>	0	25
5	SNAC	GD 7 to day 20 <i>post-partum</i>	1000	25

以下の評価項目を試験期間中又は終了時に評価した：

F0 雌：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、妊娠成績及び肉眼的病理検査

F1 同腹児（離乳前）：生存数、一般状態観察及び体重

児動物（安楽死処置）：肉眼的病理検査

F1 ラット（離乳後）：生存数、一般状態観察、体重、摂餌量、神経行動学的機能、性成熟、交配能、妊娠成績、雄の生殖臓器重量及び肉眼的病理検査

F2 同腹児：体重及び外表変化

SNAC を投与した母動物には一般状態変化として過度の流涎がみられ、概して妊娠期間終盤及び授乳期の最初の 1 週間に発現した。膺周囲の赤色物質も授乳期の最初の数日間にみられた。体重増加抑制及び摂餌量の減少が妊娠期間中明らかであった。摂餌量は出生後第 1～14 日の授乳期間中にも減少したが、統計学的有意差はみられなかった。

SNAC 投与群では妊娠期間が 3%延長し、死産児を有する母動物数が増加し、これらの個体では、同腹児あたりの死産児の割合が高かった。さらに、出生後第 2～4 日に死亡が発見された又は食殺されたと推察された児動物数が増加した。したがって、SNAC 投与群では同腹児の生存数は減少した。また、出生後第 21 日における同腹児あたりの児動物の体重は 12%増加したが、本所見について毒性学的意義はないと考えられた。

結論として、妊娠 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 1000 mg/kg/日の用量で器官形成期から出生後第 20 日まで経口投与した結果、一般状態変化として過度の流涎及び膺周囲の赤色物質、体重増加抑制及び摂餌量の減少、妊娠期間の延長が認められた。SNAC 投与群では、死産児及び出生後数日以内に死亡が発見された児動物の発現頻度が高かった。これらの所見により、本試験で SNAC を単剤投与した唯一の用量である 1000 mg/kg/日を NOAEL と判断することはできなかった。

2.6.6.11.6.5 幼若動物を用いた試験

幼若動物を用いた試験は実施しなかった。

ラットを用いた一般毒性試験における試験開始時点の動物齢は、大部分の器官系がヒトの小児後期／思春期早期に相当すると考えられる。これらの試験において、試験期間を通して散発的に死亡が発生しており、幼若動物が成熟動物に比べて特に感受性が高いとは考えられなかった。

幼若動物を用いた SNAC の毒性試験の必要性については、小児臨床試験計画（PIP）の一部として EMA/PDCO 及び FDA とも議論を行ってきた。いずれの当局にも SNAC の幼若動物を用いた試験は実施不要と判断された。

2.6.6.11.7 局所刺激性試験

ICH M3 ガイドライン²に従い、局所刺激性の検討を反復投与毒性試験一部に組み入れた。これらの試験でラットに SNAC 溶液を強制経口投与したが、軽微な消化管刺激がまれに認められたのみであった。このような所見はサルでは認められなかった。しかしながら、ラットにおける単回投与毒性検討試験（JLY0412）では、腺胃及び十二指腸に軽微～中等度の最急性の粘膜壊死が、900 又は 1500 mg/kg の SNAC を投与後 20 分又は 1 時間に認められた。同様の所見は、反復投与毒性試験の標準的な時間である投与後 24 時間に安楽死処置した動物では認められなかった。錠剤の SNAC の局所作用は、胃について詳細な検討を行った一般毒性 16 週間サル試験で検討したが（JLY0387、[2.6.6.11.3.3.4](#)）、SNAC に関連した胃の所見は認められなかった。SNAC 錠及び SNAC 溶液をイヌに強制経口投与し、胃における急性影響を比較した単回投与試験では、これらの所見はいずれも認められなかった（下記参照）。

2.6.6.11.7.1 イヌにおける単回投与胃局所刺激性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.16、JLY0558）

本検討試験の目的は、ビーグル犬に SNAC の錠剤を単回経口投与時、又は溶液を単回強制経口投与時の胃における急性期の局所刺激性影響を評価することであった。2 群に SNAC 水溶液の強制経口投与又は SNAC 錠の経口投与のいずれかを行った。SNAC 300 mg 含有錠剤の成分及び含量は臨床用錠剤と同じであった。投与群、各群の用量及び動物数を[表 2.6.6.11-30](#)に示す。

表 2.6.6.11-30 イヌにおける単回投与胃局所刺激性試験 (JLY0558)

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/animal)	Number of Animals			
			Termination 1 h		Termination 24 h	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	2	2	2	2
2	SNAC (Liquid)	300 ^a	2	2	2	2
3	Control (Untreated)	0	2	2	2	2
4	SNAC (Tablet)	300 ^a	2	2	2	2

a: Corresponding to an individual dose of 24-35 mg/kg

試験期間中、すべての動物において一般状態観察を投与前、投与中、投与直後、投与後 0.5 及び 1 時間に行った。投与後 24 時間解剖群では、さらに投与 2～3 時間後、同日のできるだけ遅い時刻、及び安楽死処置前に一般状態観察を行った。剖検は安楽死処置直後に行った。全動物の胃、及び肉眼的病理所見が認められた動物の腸管から組織試料を採取し、病理組織学的処理を行い評価した。病変又は錠剤残存物の位置／溶解位置（残存部位）を図示した。

試験期間中に投与による毒性は認められず、顕著な一般所見は認められなかった。SNAC 錠投与 1 時間後に安楽死処置したイヌ 1/4 例において、錠剤が胃に残っていることが肉眼的に確認されたが、その残存部位に関連する病理組織学的所見は特定されなかった。錠剤残存物の徴候は、SNAC 錠を投与した他のイヌの食道、胃又は腸に認められなかった。SNAC 300 mg/動物の溶液又は錠剤の投与に関連した肉眼的病理所見（投与 1 又は 24 時間後に安楽死処置した動物）又は病理組織学的所見（投与 1 時間後に安楽死処置した動物）は認められなかった。

結論として、ビーグル犬に SNAC を 300 mg/動物の錠剤で単回経口投与又は溶液を強制経口投与したが、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査の結果から、胃における急性期の局所刺激性は認められなかった。

2.6.6.11.8 その他の毒性試験

2.6.6.11.8.1 免疫原性試験

SNAC の免疫原性試験は実施しなかった。

2.6.6.11.8.2 免疫毒性試験

ラットにおける 26 週間強制経口投与試験 (JLY0278、[2.6.6.11.3.2.5](#)) において、肺の病理組織学的変化として、肺泡マクロファージ数の増加、肺炎、血管周囲性リンパ球凝集及び気管支関連リンパ組

織（BALT）の細胞充実性の上昇が全群に認められた。水溶媒対照と比較して、発現頻度又は重症度の増加がすべての SNAC 投与群で認められた。対照群で認められた *Pneumocystis carinii* による感染が所見の原因である可能性が高く、SNAC 投与群で認められた発現頻度及び重症度の増加について、SNAC が肺の変化を悪化させた可能性があるとの結論づけられた。これらの所見の毒性学的意義は不明であり、詳細な検討を行うため、ラットを用いた 4 週間免疫毒性試験を実施した。

2.6.6.11.8.2.1 ラットにおける 4 週間免疫毒性試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.B、523561）

本試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 28 日間以上強制経口投与時の免疫毒性の可能性を検討することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-31 に示す。

表 2.6.6.11-31 ラットにおける免疫毒性試験（523561）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10
2	SNAC	75	10	10
3	SNAC	200	10	10
4	SNAC	500	10	10

以下の評価項目を投与期間中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与直後ならびに投与後 1 及び 2 時間、及び週 1 回の詳細な検査）、摂餌量、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、曝露量（投与前及び投与後 30 分）及び肉眼的病理検査。免疫反応は、抗原としてキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）を第 8 及び 22 日に皮下投与して評価した。さらに、免疫表現型及び臓器重量の評価、及びリンパ系の病理組織学的検査〔骨髓スメア、消化管関連リンパ組織（GALT）、腋窩、下顎及び腸間膜リンパ節、脾臓及び胸腺〕を行った。

本試験において死亡は認められず、75 又は 200 mg/kg/日を投与した動物では、投与に関連した一般状態変化は認められなかった。500 mg/kg/日を投与した雌 1 例において、第 2 日の投与直後に円背位及び立毛が認められた。さらに 500 mg/kg/日を投与した動物では、投与期間中、投与直後に過剰な流涎及びケージのチップ材を掘る動作が散発的に発現した。

臨床検査評価項目、総リンパ球数、又は免疫表現型検査におけるリンパ球集団の比について、SNAC に関連した影響は認められなかった。KLH を抗原に使用した T 細胞依存性抗体反応により免疫反応を評価したところ、SNAC は対照に比べて、投与した動物の IgM 反応又は IgG 反応能に影響を及ぼさないことが示された。SNAC 投与による臓器重量の変化、肉眼的又は病理組織学的所見はみられなかった。

骨髓検査の結果、骨髓細胞、赤血球細胞及び巨核球細胞の M/E 比、成熟段階の分布及び形態について、SNAC に関連した影響は特定されなかった。

結論として、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を最大 500 mg/kg/日までの用量で 4 週間経口投与したが、リンパ系の病理組織学的検査変化、免疫反応又は免疫表現型に及ぼす影響、又は臨床検査評価項目の変化との関連性は認められなかった。したがって、最大 500 mg/kg/日までの用量において、免疫毒性作用はないと結論づけられた。

2.6.6.11.8.3 依存性試験

SNAC の依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.11.8.4 代謝物

SNAC 代謝物の毒性試験は実施しなかった。しかしながら、5 種の主要代謝物の TK 特性を複数の SNAC 試験から検討した。詳細は M 2.6.4.10 付録を参照のこと。

2.6.6.11.8.5 不純物

3 種の SNAC 関連不純物である、*不純物F、*不純物D 及び *不純物E の評価を、SNAC 中の最高濃度 ■■■ % (Salcaprozate Sodium、Justification of Specification、M 3.2.P.4.6) に基づいて行った。この濃度は ICH Q3A (R2) ガイドライン¹¹における不純物の適格性閾値に相当する。

ラットにおける SNAC の 104 週間毒性試験において、NOAEL を投与した動物は、ヒトにおける投与量の ■■■ 倍の *不純物F を投与されていた。

*不純物D 及び *不純物E は、NOAEL が設定された非臨床毒性試験で用いられた SNAC バッチには、定量可能な量が含まれていなかった。しかしながら、これら 2 種の化合物には、SNAC の構造要素のみが含まれている。また、いずれの化合物もコンピューターを用いた（定量的）構造活性相関〔(Q) SAR〕スクリーニングでは陰性と判定されており、ICH M7 に記載の通り、これらの不純物はクラス 5（非変異原性不純物）に分類された。

結論として、非臨床評価により *不純物F、*不純物D 及び *不純物E の上限値を ■■■ % にすることが裏付けられた。

2.6.6.11.8.6 動物の死亡を検討するメカニズム試験

高用量投与で認められた死亡の機序を解明し、SNAC の薬物動態特性を詳細に探索し、関連性のある動物及びヒトの曝露量比を推定するため、一連の *in vitro* 及び *in vivo* メカニズム試験を実施し、同時に、

より早期時点で試料採取した詳細な薬物動態評価も組み入れた。以下の項にメカニズム試験の概要を述べる。

詳細な死亡の評価については、細胞呼吸に及ぼす影響（M 4.2.3.7.7-B-1）にも要約する。

2.6.6.11.8.6.1 *In vitro* 試験

2.6.6.11.8.6.1.1 ラット肝ミトコンドリアの ATP 産生及び酵素活性に及ぼす影響（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.G、NN-2013-001）

本試験の目的は、SNAC 及び 2 種の代謝物（E494 及び E506）がミトコンドリア機能、特に電子伝達系及び ATP 産生に影響を及ぼす可能性を検討することであった。

肝ミトコンドリアを雌性 Sprague Dawley 系ラットより単離し、完全体ミトコンドリアにおける ATP 生合成、及び亜ミトコンドリア粒子複合体 I 及び II 活性に及ぼす SNAC、E494、又は E506 の影響を測定した。測定用緩衝液を対照として使用した。試験内容の概要を表 2.6.6.11-32 に示す。

表 2.6.6.11-32 ミトコンドリアへの影響の *in vitro* 評価（NN-2013-001）

Test compound	Concentration	Test system	Parameter	Substrate	Substrate target
SNAC	100-1000 μM	Isolated mitochondria	ATP synthesis	Glutamate/malate	Complex I
SNAC	100-1000 μM	Submitochondrial particles	Enzyme activity	NADH	Complex I
SNAC	100-5000 μM	Isolated mitochondria	ATP synthesis	Succinate	Complex II
SNAC	100-10000 μM	Submitochondrial particles	Enzyme activity	Succinate	Complex II
E494/E506	1000-30000 μM	Isolated mitochondria	ATP synthesis	Glutamate/malate	Complex I
E494/E506	1000-30000 μM	Isolated mitochondria	ATP synthesis	Succinate	Complex II

SNAC は、複合体 I（グルタミン酸／リンゴ酸基質）を介してエネルギー供給を受けたミトコンドリアの ATP 生合成を濃度依存的に阻害し、500 $\mu\text{mol/L}$ 以上で統計学的有意差がみられた（50～90%阻害）。この影響が複合体 I の酵素活性の直接的阻害に起因する可能性を検討するため、SNAC の亜ミトコンドリア粒子に及ぼす影響を、複合体 I 基質としての NADH 存在下で評価した。SNAC は亜ミトコンドリア粒子の複合体 I の酵素活性を濃度依存的に阻害し、500 $\mu\text{mol/L}$ 以上で統計学的有意差がみられた（50～60%阻害）。1000 $\mu\text{mol/L}$ では、いずれの測定でも完全な阻害が認められた。

ミトコンドリア及び重ミトコンドリア粒子が複合体 II（コハク酸基質）を介してエネルギー供給を受けた場合、SNAC は 5000 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で ATP 生合成と複合体 II の酵素活性の両方を阻害した。

E494 及び E506 は、複合体 I 及び複合体 II を介してエネルギー供給を受けたミトコンドリアの ATP 生合成に対する阻害作用が弱く、これらのアッセイにおいて 50%阻害するには 10000 $\mu\text{mol/L}$ (E494) 及び 30000 $\mu\text{mol/L}$ (E506) を超える濃度が必要であった。

結論として、SNAC は 500 $\mu\text{mol/L}$ 以上の濃度で、複合体 I を介してエネルギー供給を受けたラット単離ミトコンドリア／重ミトコンドリア粒子の ATP 生合成及び複合体 I の酸素活性を統計学的有意に阻害した。SNAC と比較して、代謝物 E494 及び E506 のミトコンドリア ATP 生合成阻害作用は弱かった。

2.6.6.11.8.6.1.2 細胞の酸素消費速度により測定した細胞呼吸に及ぼす SNAC の影響 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.G、XXXXXXXXXX140919、XXXXXXXXXX140926、XXXXXXXXXX140912、XXXXXXXXXX141003 及び XXXXXXXXXX141010)

SNAC 又は主要代謝物が細胞呼吸に影響を及ぼす可能性を検討するため、以下の試験を実施した。Seahorse XF96 を用いて、細胞呼吸を反映する全細胞の酸素消費速度 (OCR) を測定した。マイクロプレート内に単層培養した細胞上の少量 (約 2 μL) の培地を分離することにより、OCR のリアルタイム測定を行った。細胞が酸素を消費すると、専用マイクロチャンバー内の溶存酸素濃度が速やかに変化する。これを細胞単層の 200 μm 上部に位置する固相センサープローブで測定した。実施した OCR 試験の概要を表 2.6.6.11-33 に示す。

表 2.6.6.11-33 Seahorse XF96 を用いた細胞呼吸に及ぼす影響

Study ID	Test compound	Test system	Aim
XXXXXXXXXX 140919	SNAC	C2C12, 3T3-L1, HEC-1B, LN319 and PBMC cells ^a	Effect in C2C12 cells and comparison between different cell lines of different origin
XXXXXXXXXX 140926	E1245, E494, E1246, E506, E1247, SNAC	C2C12 cells	Effect of principle metabolites in C2C12 cells
XXXXXXXXXX 140912	SNAC	Cryopreserved hepatocytes (mouse, rat, monkey, human) Freshly isolated hepatocytes (rat)	Effect in primary cells and comparison across species
XXXXXXXXXX 141003	SNAC	C2C12 cells	Effect in the presence of human serum albumin
XXXXXXXXXX 141010	SNAC	Permeabilised C2C12 cells	Location of effect within the electron transport chain

a: C2C12 (mouse myoblast cell-line), 3T3-L1 (mouse pre-adipocyte cell-line), HEC-1B (human endometrial cell-line), LN319 (human astrocyte cell-line), PBMC (rat peripheral blood mononuclear cells)

SNAC は検討したすべての細胞種において細胞呼吸を阻害し、平均 IC₅₀ 値は 175 $\mu\text{mol/L}$ (C2C12 細胞)、181 $\mu\text{mol/L}$ (PBMC)、199 $\mu\text{mol/L}$ (HEC-1B 細胞)、315 $\mu\text{mol/L}$ (LN319 細胞) 及び 666 $\mu\text{mol/L}$ (3T3-L1 細胞) であった (■140919)。これらの IC₅₀ 値により、種々の組織及び動物種 (ヒトを含む) 由来の細胞の感受性差は限定的であることが示された。

SNAC は 1000 $\mu\text{mol/L}$ で C2C12 細胞の細胞呼吸を完全に阻害した (■140926)。 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) の細胞呼吸に及ぼす影響はわずかであり、10000 $\mu\text{mol/L}$ で認められた阻害は 10% 未満であった。全体として、細胞呼吸阻害能は SNAC >> E494 > E506 > E1245 = E1246 = E1247 であった。

SNAC による細胞呼吸阻害は用量依存的であり、検討したすべての動物種由来の肝細胞において 5000 $\mu\text{mol/L}$ で完全に阻害した (■140912)。平均 IC₅₀ は 226 $\mu\text{mol/L}$ (マウス)、558 $\mu\text{mol/L}$ (ラット)、752 $\mu\text{mol/L}$ (ヒト) 及び 1214 $\mu\text{mol/L}$ (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。

さらに、アルブミンが SNAC の細胞呼吸阻害能に影響を及ぼす可能性を検討した (■141003)。0.2、0.5 又は 1.0% (約 30~150 $\mu\text{mol/L}$) ヒト血清アルブミン (HSA) をアッセイ培地に添加すると IC₅₀ 曲線が右にシフトした。このことから、細胞呼吸阻害が誘発されるのに必要な SNAC 濃度は、アルブミン存在下で上昇することが示された。

SNAC が電子伝達系 (ETC) の特定の要素に及ぼす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、(■141010)。SNAC は 1000 $\mu\text{mol/L}$ の濃度まで複合体 I ミトコンドリア呼吸を用量依存的に阻害した。SNAC 4000 $\mu\text{mol/L}$ では、複合体 I の下流のミトコンドリア呼吸も阻害した。

結論として、SNAC はすべての動物由来細胞種のミトコンドリア呼吸を阻害した。アルブミン存在下で細胞呼吸に対する作用の低下が認められた。電子伝達系の異なる部分における活性を検討した試験では、SNAC の作用が、主に複合体 I の阻害を介していることが示された。 β 酸化代謝物である E494 及び E506 のミトコンドリア呼吸の阻害能は弱く、一方でグルクロン酸抱合代謝物 E1245、E1246 及び E1247 には意義のある作用はみられなかった。

2.6.6.11.8.6.2 *In vivo* 試験

2.6.6.11.8.6.2.1 マウスにおける単回投与忍容性及び TK 試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.H、JLY0557）

本試験の目的は、雌雄 CD-1 系マウスに SNAC を単回強制経口投与時の、SNAC 及び 5 種の主要代謝物の忍容性及び TK を評価することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-34 に示す。用量は、以前に実施された 13 週間毒性試験（A16705、[2.6.6.11.3.1.2](#)）に基づき設定した。なお、当該試験では、1 回目の TK 試料採取時点が投与 1 時間後であったことから、適切な TK 特性評価ができなかった。また、高用量は初回投与時では 1500 mg/kg/日であったが、死亡が頻発したことから、第 3 日及び 4 日に休薬し、第 5 日以降は用量を 1000 mg/kg/日に減量したが、依然として死亡が発生したことから、高用量群を第 9 日に安楽死処置した。死亡が発生した最低用量における TK 特性を適切に評価するため、本試験では 1000 mg/kg を選択した。中用量である 500 mg/kg/日は、13 週間試験において NOAEL と判断された。

表 2.6.6.11-34 マウスにおける単回投与忍容性及び TK（JLY0557）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
			Main study	
			Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10
2	SNAC	150	25	25
3	SNAC	500	25	25
4	SNAC	1000	40	40

以下の評価項目を投与中又は終了時に評価した：生存数、一般状態観察（投与 2 時間後に、異常行動を呈した動物の Irwin 式客観的行動観察）、SNAC 及び 5 種の主要代謝物の TK（投与後 2、5、10、20、40 分、1、3、8、12 及び 24 時間）。

雌における SNAC 及び β 酸化代謝物の曝露量は概して雄に比べて高かった。雌では代謝物の曝露量も概して高かったが、 β 酸化代謝物の曝露量が高い代謝物であった。

SNAC 150 又は 500 mg/kg を投与した動物に一般状態変化は認められなかった。しかしながら、1000 mg/kg/日では、SNAC を投与直後に有害な一般状態変化が 4 例（雄 1 例及び雌 3 例）で認められた。一般状態変化は、無関心、呼吸異常、異常移動、注意力／聴覚性驚愕反射／接触反射／体の緊張の低下、円背位、半閉眼、受動性及び正向反射消失であった。一般状態変化が重症であることから、雌 3 例を

安楽死させた。曝露量及び安楽死に至った有害な一般状態変化の関連性について明確な結論は得られなかった。このことは、安楽死処置動物の試料採取が少数であったことに関連すると考えられた。

結論として、CD-1 系マウスに SNAC を 500 mg/kg の用量で単回強制経口投与時の忍容性は概して良好であった。しかしながら、1000 mg/kg を投与したマウスの 4/80 例が投与後に有害な一般状態変化を呈し、うち 3 例が重症のため安楽死処置された。概して雌の SNAC 曝露量が雄より大きかったが、血漿中 SNAC 濃度と有害な一般状態変化との関連性は不明であった。

2.6.6.11.8.6.2.2 ラットにおけるテレメトリー及びプレチスモグラフィ併用試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.I、ONNC11）

本試験の目的は、雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単回投与及び 8 日間反復投与時の心血管及び呼吸機能に及ぼす影響を評価することであった。テレメトリー及び全身プレチスモグラフィを併用してデータを得た。試験の概要を[表 2.6.6.11-35](#)に示す。

表 2.6.6.11-35 ラットにおけるテレメトリー及びプレチスモグラフィ併用試験（ONNC11）

Treatment	Dose (mg/kg)	Administration	No. of animals
Control (vehicle) ^a	0	p.o. (gavage), 8 day repeat dose	8
SNAC	900	p.o. (gavage), 8 day repeat dose	8
SNAC	1500	p.o. (gavage), 8 day repeat dose	8
Control (vehicle) ^a	0	p.o. (gavage), single dose	6
SNAC	900	p.o. (gavage), single dose	6
SNAC	1500	p.o. (gavage), single dose	6

a: Water for injection was used as vehicle

血圧及び呼吸機能を本試験の最初のパートで検討した。心律動に対して認められた SNAC の影響に基づいて、さらに、血圧、ECG、呼吸器及び温度の各項目を評価する試験を実施した。

SNAC 900 及び 1500 mg/kg/日を投与した結果、統計学的に有意な急性期の血圧低下（5～11 mmHg）及び統計学的に有意な急性期の呼吸数（最高 30 回/分）及び心拍数（51～75 bpm）の上昇が誘発された。第 1 日の投与後 2.5 時間以内に、900 mg/kg/日群の 4/14 例及び 1500 mg/kg/日群の 3/14 例が死亡した。これらの動物では洞停止、接合部補充収縮及び接合部補充調律の発現頻度の上昇がみられた。さらに、これらの動物の一部には顕著な血圧低下がみられ、また 1 例に心拍数低下、2 例に PR 延長及び顕著な呼吸数の上昇がみられた。これらの動物はいずれも、心停止により死亡する 1～5 分前に呼吸停止が認められた。8 日間投与後では、SNAC 1500 mg/kg/日投与群の心拍数上昇が唯一認められた統計学的に有意な影響であった。体温に関して、統計学的に有意な影響は認められなかった。

結論として、SNAC を 900 及び 1500 mg/kg/日の用量で経口投与した結果、急性期の平均血圧低下ならびに心拍数及び呼吸数上昇が認められた。7/28 例の死亡が認められ、死亡する前には ECG の不整脈がみられ、また、心停止による死亡の 1～5 分前に呼吸停止が認められた。

2.6.6.11.8.6.2.3 ラットにおける単回経口投与検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.J、JLY0412）

本検討試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単回強制経口投与時に認められた死亡に関連すると考えられる影響を評価することであった。SNAC の最高用量は単回投与により予測される最大耐量であったが、反復投与時に投与に関連した一般状態変化及び死亡の発現が明らかな用量に可能な限り近づけた。分子構造が似ていることから、サリチル酸ナトリウムを実薬対照とした。雌は、雄より SNAC に対する感受性が高いため採用した。各群を、投与後 20 分、1 時間又は 24 時間に安楽死処置する 3 つのサブグループに分割した。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-36 に示す。動物は投与前に一昼夜及び投与 1 時間後まで絶食させた。

表 2.6.6.11-36 ラットにおける単回経口投与検討試験（JLY0412）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals		
			Subgroup		
			20 min ^a	1 h ^a	24 h ^a
1	Control (Vehicle)	0	11 F	11 F	11 F
2	SNAC	900	11 F	11 F	11 F
3	SNAC	1500	11 F	11 F	11 F
4	Sodium salicylate	800	11 F	11 F	11 F

a: Time of termination after dosing. F: Females

以下の評価項目を試験実施中に評価した：5 分間隔の Irwin 式客観的行動観察、血液ガス及び電解質、血中及び脳脊髄液（CSF）中グルコース濃度、血漿中インスリン、SNAC 血漿中曝露量（投与後 20 分、1 時間又は 24 時間）、胃評価項目（胃損傷を含む）及び選択した臓器の肉眼的病理検査及び病理組織学的検査。

死亡が SNAC 900 及び 1500 mg/kg 両方において投与 15～39 分後の間に認められた。900 mg/kg では、20 分サブグループで死亡した動物はいなかったが、1 時間サブグループでは 1 例が投与 24 分後に死亡し、24 時間サブグループでは 1 例を投与 32 分後に安楽死させた。1500 mg/kg では、20 分サブグループで 1 例が、1 時間サブグループで 5 例が死亡し、24 時間サブグループでは 3 例を安楽死させた。生体試料中薬物濃度測定用の血漿試料は死亡例のうち 3 例から得られた。これら 3 例の血漿中濃度は測定された試料中最も高く、いずれも 1 mg/mL (1,000,000 ng/mL)（図 2.6.6.11-1）を超えていた。

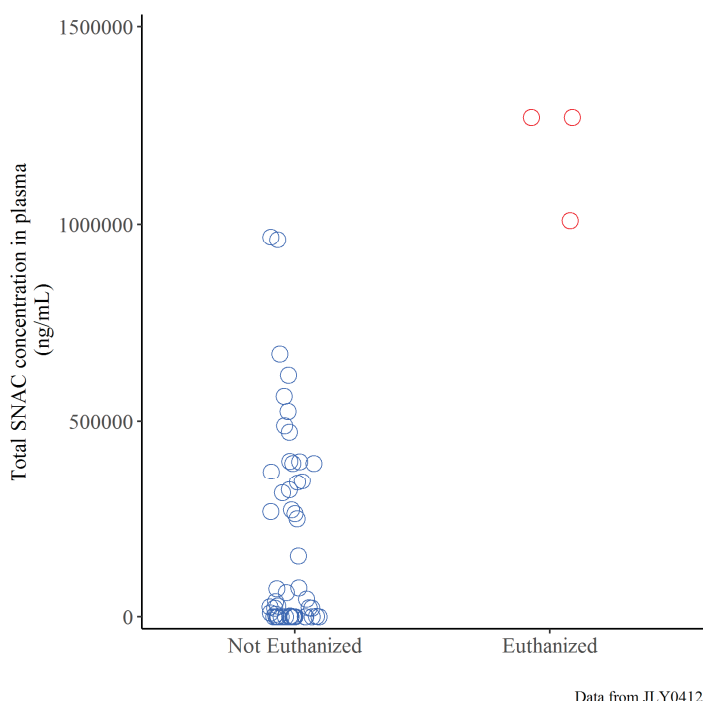


図 2.6.6.11-1 安楽死させた動物における SNAC の血漿中濃度

900 及び 1500 mg/kg においてそれぞれ 5/33 例及び 16/32 例が一般状態変化を呈した。これらの徴候は投与後 5 分～1 時間に、死亡／安楽死した動物と最終投与時まで生存した動物（予定通り投与 24 時間後に安楽死処置された動物を含む）の両方に認められた。一般状態変化は、無関心、呼吸異常、注意力低下及び聴覚性驚愕反射、異常な移動、歩行異常、瞳孔径増大、受動性、体の緊張低下、筋攣縮、流涎であり、最終的には痙攣に至った。1500 mg/kg を投与し、長時間の一般状態変化（試験中 1 時間持続）を呈した 2 例では、SNAC の血漿中濃度が同じ 1 時間サブグループの生存動物に比べて有意に高かった。

血液生化学的検査では、SNAC に関連した血液の pH、pO₂、sO₂、HCO₃⁻ 及び塩基過剰の上昇が示された。pCO₂ の上昇は 1500 mg/kg を投与した動物でのみ記録された。死亡例における血中 sO₂ 及び塩基過剰は概して低かった。さらに、血中ナトリウムの上昇、血中カリウム及びカルシウム、血中及び CSF 中グルコースの低下が両用量で認められた。2 つの評価項目、血中及び CSF 中グルコースのみが、SNAC に関連した一般状態変化及び死亡と明確に関連付けることができた（図 2.6.6.11-2）。SNAC 投与群の死亡例では、血中及び CSF 中グルコースの低下がより顕著であり、また血中 K⁺ 濃度は同群の生存例に比べて概して高かった。SNAC による影響は主に投与後 20～40 分に記録された。しかし血中 pO₂、sO₂ 及びカルシウム、及び CSF 中グルコースに及ぼす影響は、1500 mg/kg を投与した動物では投

与 1 時間後でも記録されており、これらの評価項目に及ぼす影響の持続時間は用量依存的に延長することが示唆された。血漿中インスリン濃度に関して、SNAC の影響は認められなかった。

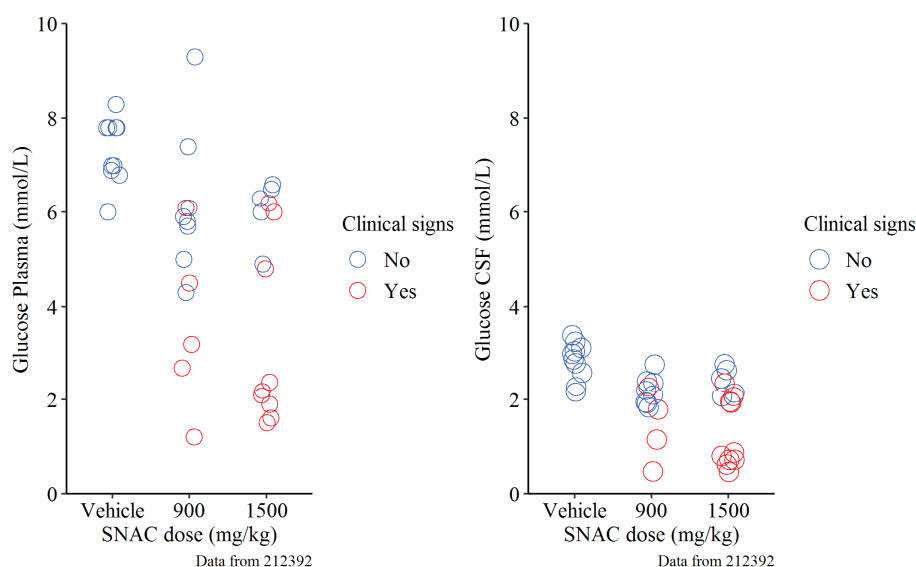


図 2.6.6.11-2 一般状態変化を呈した動物における血漿中及び CSF 中グルコース濃度

SNAC 900 及び 1500 mg/kg 投与群において、投与後 20 分の安楽死処置サブグループでは腎重量の増加、投与後 1 時間及び 20 分の安楽死処置サブグループでは、それぞれ心臓及び肝重量の減少が認められた。一般状態変化がみられた動物のデータを除外すると、肝重量に関して統計学的有意差はなくなることから、一般状態変化及び肝重量に及ぼす影響には関連性が示唆された。

胃の評価では、SNAC を投与した動物では対照群に比べて胃内容物の重量及び胃液量の増加が示された。胃内 pH が上昇したが、対照群の動物から解析に必要な容量を採取できなかったことから、胃内電解質に及ぼす影響を評価できなかった。胃損傷スコアは SNAC 投与群で投与 1 時間後に上昇した。胃損傷スコアは病理組織学的所見と関連しており、900 又は 1500 mg/kg の SNAC を投与した動物の多くで投与 20 分後又は 1 時間後に腺胃の最急性粘膜壊死が認められた。1500 mg/kg/日の動物の約半数及び 900 mg/kg/日の少数のみにおいて一般状態変化又は死亡がみられたため、胃でみられた変化は、重症度が中等度以下だが、SNAC を投与した動物でみられた一般状態変化と直接関連する可能性は低いと考えられた。同様の病理組織学的所見が SNAC を投与した動物の十二指腸でもみられたが、一般状態変化／死亡との関連性は認められなかった。SNAC 投与で認められた変化の多くは、肉眼的及び病理組織学的胃病変を除いて、一般状態変化／死亡が認められなかったサリチル酸ナトリウム実薬対照群でも認められており、また SNAC 投与群内で、一般状態変化がみられた動物／死亡例と一般状態変化のなかった動物の間で均等に分布していた。CSF 中グルコースに及ぼす軽微な影響がサリチル酸ナトリウムを投与した動物にも記録されたが、各個体の CSF 中グルコース濃度は、SNAC 投与後に死亡した動物

と同様に非常に低かった。サリチル酸ナトリウムを投与した動物に、胃又は十二指腸の最急性粘膜壊死は認められなかった。

結論として、雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 900 又は 1500 mg/kg の用量で単回投与した結果、用量依存的な有害な一般状態変化及び死亡が誘発された。SNAC により血液生化学的評価項目、肝、心臓及び腎重量、及び消化管に広範な変化が認められ、特に、血中及び CSF 中グルコースの低下、アルカローシス及び胃／十二指腸における最急性粘膜壊死が認められた。SNAC によるこれらの影響は投与後 20 分～1 時間に認められ、投与後 24 時間には認められなかった。2 つの評価項目、血中及び CSF 中グルコース低下のみが、SNAC に関連した一般状態変化及び死亡と明確に関連付けることができた。

2.6.6.11.8.6.2.4 ラットにおける単回静脈内投与検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.K、JLY0413）

本検討試験の主要目的は、SNAC の静脈内投与時に認められる一般状態変化が C_{max} 曝露量又は累積曝露量（AUC）のどちらに起因するかを評価することであった。本評価は、雌性 Sprague Dawley 系ラットに、同用量を単回急速静脈内投与した場合と、単回急速投与時に血漿中 SNAC 濃度が測定可能である時間と同時間で持続注入した場合の、一般状態変化を比較することで実施した。理想的には、本検討の結果、AUC は同様であるが、異なる TK プロファイルが得られると推測された。さらに、別の試験で認められた一般状態変化及び死亡の原因を評価するため、詳細な検討を行った。

投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-37 に示す。動物は投与前一昼夜及び投与 1 時間後まで絶食させた。

表 2.6.6.11-37 ラットにおける単回静脈内投与検討試験（JLY0413）

Group	Treatment	Administration method	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
				Main ^a	Satellite ^a
1	SNAC	i.v. bolus	200	4 F	4 F
2	SNAC	i.v. continuous infusion, 3.5 h	200	4 F	4 F

a: Behavioural observations from main study animals and toxicokinetic (TK) sampling in satellite animals, other endpoints in both subgroups. F: female

以下の評価項目を試験期間中に評価した：5 分間隔で 3.5 時間の Irwin 式客観的行動観察、CSF 中グルコース、TK（投与後 5、10、15、30、及び 45 分、1、1.25、1.5、2、2.5、3 及び 3.5 時間）、臓器重量（選択した臓器）、胃評価項目（胃損傷を含む）及び選択した臓器の病理組織学的検査。

雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 200 mg/kg の用量で静脈内急速投与した結果、3 例において投与後 5～10 分に一般状態変化又は死亡が認められた。対照的に、同用量である SNAC 200 mg/kg の 3.5 時間静脈内持続投与では、特筆すべき変化は認められなかった。静脈内急速投与した場合と静脈内持続注入した場合ではクリアランスが異なり、そのため持続注入後の AUC が急速投与後より小さかったことから、本試験の主要目的、すなわち SNAC を静脈内投与時の一般状態変化が C_{max} 曝露量又は累積曝露量 (AUC) のいずれに起因するかを明らかにすることはできなかった。

2.6.6.11.8.6.2.5 グルコースを併用投与したラットにおける単回経口投与検討試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.L、JLY0468)

本試験の目的は、雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を強制経口投与及びグルコース静脈内注入を併用時の SNAC に関連した毒性を評価することであった。SNAC 又は溶媒投与と同時に生理食塩水又はグルコースのいずれかを静脈内注入した。4 投与群をそれぞれ 2 つのサブグループに分け、それぞれ経口投与後 20 分又は 60 分に安楽死処置した。グルコース又は生理食塩水の静脈内注入は、SNAC 又は溶媒の経口投与 60 分前に開始し、試験終了まで継続した。さらに、SNAC 及び 5 種の主要代謝物の曝露量と一般状態変化との関連性を雌雄で評価した。

用量は、以前に実施されたメカニズム試験 (JLY0412、[2.6.6.11.8.6.2.3](#)) において、1500 mg/kg により有害な一般状態変化及び死亡が認められ、認められた副作用の原因が SNAC に関連した血中及び CSF 中グルコース濃度の低下であることが示唆されたことに基づき設定した。投与群と各群の用量及び動物数を表 [2.6.6.11-38](#) に示す。動物は投与前一昼夜及び試験実施中を通して又は SNAC 投与 1 時間後まで絶食させた。

表 2.6.6.11-38 グルコースを併用投与したラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0468)

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	I.v. infusion	Number of animals			
				Subgroup			
				20 min ^a	60 min ^a	24 h ^a	
1	Control (Vehicle)	0	Saline	7 F	8 F	N/A	N/A
2	Control (Vehicle)	0	Glucose	7 F	7 F	N/A	N/A
3	SNAC	1500	Saline	14 F	15 F	N/A	N/A
4	SNAC	1500	Glucose	15 F	15 F	N/A	N/A
5 ^b	SNAC	1500	N/A	N/A	N/A	15 F	15 M

a: Scheduled termination time point.

b: Only clinical signs and toxicokinetics assessed.

F: Females, M: Males, N/A not applicable

以下の評価項目を試験実施中に評価した：Irwin 式客観的行動観察（投与後 20 分又は 60 分まで 5 分間隔、又は TK 評価動物では、投与 2 時間後まで 5 分間隔、以降は投与後 6、12 及び 24 時間）、血液ガス、電解質、グルコース、インスリン、及びグルカゴン（投与後 10、15、20 及び 60 分）、SNAC 及び 5 種の主要代謝物の TK（投与後 5、10、15、20、40 分、及び 1、1.5、2、3、4、6、12 及び 24 時間）、血漿中グルタミン酸脱水素酵素（GLDH）、 β -ヒドロキシ酪酸（BHA）、及び乳酸（投与後 20 及び 60 分）、CSF 中グルコース及び乳酸（投与後 20 及び 60 分）、肝グリコーゲン（投与後 20 及び 60 分）。

SNAC 1500 mg/kg において、SNAC を投与した 33/89 例を、一般状態変化の重症度により安楽死させた。SNAC により、主に投与初期の投与後 2 時間以内に急性期の一般状態変化の特性パターンが生じ、動物には呼吸、歩行及び姿勢の異常、体の緊張及び注意力の消失に引き続き生じた正向反射消失及び強直性痙攣がみられた。完全に影響を受けなかったか、又は一部の軽微な一般状態変化のみを呈した動物はわずかであった。

グルコースの併用は一般状態変化の有無又は重症度に影響を及ぼさなかったが、個体間では SNAC の曝露量と認められた一般状態変化の重症度及び死亡との間に明確な関連性が認められた。投与後の SNAC の $t_{\max}$ は早く、5 分から 20 分の範囲、ほとんどの値は 5 分又は 10 分であり、一般状態変化の発現と密接に関連していた。一般状態変化の重症度により安楽死させた動物の血漿中 $C_{\max}$ は、一般状態変化の認められなかった動物の $C_{\max}$ に比べて高かった（M 2.4、図 2.4-5）。5 種の主要代謝物（E494、E506、E1245、E1246 又は E1247）のいずれの曝露量（AUC 又は $C_{\max}$ ）にも一般状態変化との関連性を示唆する所見はなかった。顕著な一般状態変化が認められた動物では、CSF 中の SNAC 濃度も一般状態変化の重症度が低い動物より高かった。代謝物 E494、E506、E1245、E1246 又は E1247 の CSF 中濃度と、一般状態変化との明確な関連性は認められなかった。

SNAC により血中、肝臓及び CSF 中のグルコース濃度が低下した。グリコーゲンはいずれの群の肝臓にも検出されなかったが、これは一晩の絶食によるものと考えられた。生理食塩水併用群では個体間での血中グルコースの低下と一般状態変化及び死亡との明らかな関連性がみられた一方、グルコース併用群（生理食塩水投与群に比べて血中グルコース濃度が高い）では、個体間でのグルコース濃度と一般状態変化及び死亡との関連性はみられなかった。血漿中及び CSF 中乳酸濃度は SNAC により上昇し、グルコース投与の有無にかかわらず個体間で明らかな一般状態変化との関連がみられた。さらに、特にグルコースを併用投与した場合に、SNAC によりケトン BHA の血漿中濃度が低下し、血漿中インスリン濃度に上昇傾向がみられたが、高インスリン濃度によるグルコース濃度低下を示す所見はなかった。SNAC を投与した動物における血漿中グルカゴン濃度の上昇は、血中グルコース濃度の低下と明らかな関連性が認められた。

SNAC の投与後、血液 pH の上昇が $p\text{CO}_2$ 及び HCO_3^- 両方の低下とともに認められた。投与後、血液の $p\text{O}_2$ 及び $s\text{O}_2$ の上昇も認められた。血液のこれらの評価項目の変化は、pH を除き、一般状態変化及び死亡との関連性が認められた。塩基の過剰な低下はグルコースを併用しない場合に認められた。 Ca^{2+} 濃度の低下を伴う Na^+ 及び Cl^- の血中濃度の上昇が認められた。しかしながら、一般状態変化及び死亡との関連性が認められたのは血漿中 Cl^- の変化のみであった。

結論として、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 1500 mg/kg の用量で単回強制経口投与した結果、有害な一般状態変化が、主に投与後 5 分～60 分に誘発され、このことは血漿中及び CSF 中の高 SNAC 濃度と関連していた。SNAC により複数の血液生化学評価項目の変化も誘発され、特に注目すべき変化として、インスリン非誘発性の血中及び CSF 中グルコース低下、血漿中乳酸の上昇及び呼吸性アルカローシスが認められた。これらの変化は一般状態変化の有無及び重症度と関連し、またいずれも投与後 10～20 分に認められた。グルコースの静脈内併用投与を実施したが、一般状態変化の有無又は重症度について、影響は認められなかった。SNAC により認められた影響は、SNAC の細胞呼吸に及ぼす影響と一致すると考えられた。

2.6.6.11.8.6.2.6 異なる絶食レジメンを用いたラットにおける単回経口投与検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.M、JLY0517）

本試験の目的は、雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単回強制経口投与時に生じる副作用のメカニズムを検討すること、反復投与に適した用量を設定すること、及び異なる絶食レジメンを比較することであった。さらに、SNAC 及び主要代謝物の一般状態変化に関連した TK 特性を評価した。主要フェーズの動物は投与後 20 分に、TK 用動物は投与後 24 時間に安楽死処置した。投与群、各群の絶食レジメン、用量及び動物数を [表 2.6.6.11-39](#) に示す。

表 2.6.6.11-39 異なる絶食レジメンを用いたラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0517)

Group	Treatment	Fasting regimen prior to dosing	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals	
		Main phase ^a		Main phase ^a	TK Phase ^b
1	Control (Vehicle)	3 h	0	8 F	-
2	SNAC	3 h	75	8 F	3 F
3	SNAC	3 h	200	8 F	3 F
4	SNAC	3 h	500	8 F	3 F
5	SNAC	3 h	900	10 F	6 F
6A	SNAC	3 h	1500	15 F	-
6B	SNAC	Overnight	1500	15 F	-

a: Terminated 20 min post dose.

b: Fasted overnight prior to dosing. Terminated 24 h post dose

F: Females, - : No TK phase animals included in groups 1, 6A and 6B

以下の評価項目を試験実施中に評価した：Irwin 式客観的行動観察（投与後 20 分まで 5 分間隔、又は TK 用動物において投与後 2 時間まで 5 分間隔、その後は投与後 6、12 及び 24 時間）、血漿中グルコース、乳酸、ピルビン酸、 β -ヒドロキシ酪酸（BHA）、アセト酢酸、グルタミン酸脱水素酵素（GLDH）、遊離脂肪酸及びトリグリセリド（投与前及び投与後 20 分）、SNAC 及び 5 種の主要代謝物の TK；血漿中（投与後 2、5、10、20、40 分、及び 1、1.75、3、4、6、12 及び 24 時間）及び CSF 中（投与後 20 分及び 24 時間）、CSF 中グルコース及び乳酸（投与後 20 分）、肝グリコーゲン（投与後 20 分）、選択した臓器の肉眼的病理検査、病理組織学的検査及び電子顕微鏡検査（最終投与後 20 分に安楽死処置した動物）。

3 時間絶食し 75～900 mg/kg の SNAC を投与した動物には、投与に関連した有害な一般状態変化又は死亡は認められなかった。しかしながら、一晩絶食した TK 用動物では、SNAC 500 及び 900 mg/kg の投与により、呼吸、歩行及び姿勢の異常、体の緊張及び注意力の消失に引き続き生じた正向反射消失及び強直性痙攣などの有害な一般状態変化が誘発された。900 mg/kg では、TK 動物 2/6 例を投与直後（投与後 15 分及び 20 分）に、一般状態変化の重症度のために安楽死させた。1500 mg/kg では、SNAC により投与直後（投与後 15 分及び 20 分）に有害な一般状態変化が誘発され、発現頻度及び重症度は、一晩絶食した動物のほうが投与前 3 時間絶食した動物より高かった。合計 6 例（3 時間絶食群で 1 例が、一晩絶食群で 5 例）を一般状態変化の重症度のために安楽死させた。

1500 mg/kg を投与したときの SNAC 及び代謝物の曝露量には、一晩絶食した動物と 3 時間絶食した動物の間に明らかな差異は認められなかったことから、絶食レジメンは SNAC の曝露量に影響しないことが示された。

SNAC の $t_{\max}$ は投与直後であり、主に投与後 2 又は 5 分であった。SNAC の血漿中及び CSF 中濃度と一般状態変化の重症度との間には明らかな関連性が認められた。一般状態変化の重症度のため安楽死させた動物ではいずれも、SNAC の血漿中及び CSF 中濃度が、一般状態変化が軽微又は認められなかった動物に比べて高かった。5 種の主要代謝物の曝露量 (AUC 又は $C_{\max}$) と一般状態変化との間に関連性は認められなかった。

500 mg/kg 以上の SNAC により血漿中 BHA が約 1/3 に低下し、それに伴い BHA/アセト酢酸比が低下した。CSF 中乳酸の用量依存的な上昇が 900 及び 1500 mg/kg で認められたが、血漿中乳酸の上昇は一晚絶食後に 1500 mg/kg を投与した動物にのみ認められた。ただし、3 時間絶食群でも死亡例を含む数例では、顕著な血漿中乳酸上昇がみられた。さらに、一晚絶食後の 1500 mg/kg SNAC では血漿中グルコース濃度の低下傾向がみられ、このことは、3 時間絶食した動物ではみられなかった。同様に CSF 中グルコース濃度が、特に死亡例において、3 時間絶食した動物に比べて顕著に抑制された。しかしながら、これらの影響は、一晚絶食対照群を設けた先行試験 (JLY0468、[2.6.6.11.8.6.2.5](#)) の結果を考慮すると、空腹レジメンではなく SNAC に起因するものであった。

3 時間絶食した動物では、肝臓の基礎グルコースレベルは 200 mg/kg 以上で用量依存的に上昇し、同用量では肝グリコーゲンも低下した。一晚絶食した動物では、肝臓の基礎グルコースレベル及び肝グリコーゲンは非常に低く、おそらく当該群の一晚絶食レジメンによるものと考えられた。

病理組織学的検査において、1500 mg/kg の SNAC を投与した 3 時間絶食動物の半数にグリコーゲン含量低下を示す肝臓の染色希薄化の減少が認められた。この所見は重度の一般状態変化を呈するとみられ、対照群には認められないことから、SNAC に関連した影響を示している可能性がある。しかしながら、染色希薄化の低下は絶食動物に多くみられる所見であり、投与群 6 例に対して対照群は 3 例のみであったことから、確実に SNAC に関連していると結論づけることはできなかった。絶食レジメンが異なるため、一晚絶食群と対照群 (絶食 24 時間 vs 3 時間) との比較は行わなかった。

透過電子顕微鏡検査において、ミトコンドリアの形態 (肝臓、褐色脂肪組織、心臓及び骨格筋) に及ぼす影響は示されなかった。本試験には一晚絶食対照群を設けなかったため、認められたミトコンドリア体積 (体積分率) の上昇が SNAC 又は一晚絶食レジメンと関連するかどうかは不明である。

結論として、SNAC 75~1500 mg/kg を単回経口投与した結果、500 mg/kg 以上の用量で、投与後 20 分以内に血漿中及び CSF 中の高 SNAC 濃度に関連する有害な一般状態変化が誘発された。一晚絶食により、SNAC の影響に対する動物の感受性が増強された。SNAC は急激な血漿中及び CSF 中乳酸濃度の上昇を誘発するとともに、血漿中ケトン体 (BHA)、血漿中及び CSF 中グルコース、及び肝グリコーゲンを低減した。ミトコンドリアの形態に及ぼす影響は認められなかった。

2.6.6.11.8.6.2.7 ラットにおける 13 週間経口毒性検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.N、JLY0532）

本試験の目的は、Sprague Dawley 系ラットに 1 日 1 回 13 週間強制経口投与時の SNAC の TK 及び毒性、及び標準的には使用しない生化学及び形態学的評価項目に及ぼす不顕性の影響について検討することであった。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-40 に示す。

表 2.6.6.11-40 ラットにおける 13 週間経口毒性検討試験（JLY0532）

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg/day)	Number of animals			
			Main study		Satellite study ^a	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (Vehicle)	0	10	10	8	8
2	SNAC	75	10	10	8	8
3	SNAC	200	10	10	8	8
4	SNAC	500	10	10	8	8

a: Satellite animals for toxicokinetic sampling

以下の評価項目を試験実施中に評価した：第 1 日、42 及び 91 日における 5 分間隔（投与後 2 時間まで、以降は投与後 5～6 時間）の Irwin 式客観的行動観察、一般状態観察（Irwin 観察日を除く毎日の投与後 1 時間）、血漿中グルコース、乳酸、ピルビン酸、BHA、アセト酢酸、グルタミン酸脱水素酵素、遊離脂肪酸、トリグリセリド（投与前及び投与後 20 分）、酸化ストレス、SNAC 及び 2 種の β 酸化代謝物の TK（投与後 5、10、20、40 分、及び 1、1.75、3、4、6、12 及び 24 時間）、CSF 中グルコース及び乳酸（投与後 20 分）、肝グリコーゲン（20 分）、投与後 20 分の安楽死処置、選択した臓器の肉眼的病理検査、病理組織学的検査及び電子顕微鏡検査。

投与した全用量における SNAC の忍容性は概して良好であった。投与に関連した死亡はなく、500 mg/kg/日の雌 1 例のみが投与に関連した一般状態変化を呈した。当該動物では第 1 日の投与直後に呼吸異常及び後肢の持ち上げが認められた。投与後 3 時間及び以降の投与期間を通して、当該動物は正常と考えられた。雌ラットの SNAC 曝露量は雄より概して高かった。

200 mg/kg/日を投与した動物 1 例を、誤投与のため第 8 日に安楽死させた。

全 SNAC 投与群の雌において、投与後 20 分に、血漿中ケトン体、BHA 又はアセト酢酸の低下が認められた。雄では、SNAC 200 又は 500 mg/kg/日群において投与 20 分後又は投与前のトリグリセリド濃度が中等度に上昇した。これらの変化は脂質代謝に及ぼす軽微な影響と考えられた。

血漿中又は CSF 中グルコース濃度、又は肝グリコーゲン濃度に及ぼす影響は認められなかったが、CSF 中乳酸濃度の軽微な上昇が、13 週間の投与期間終了時の投与後 20 分に、200 及び 500 mg/kg/日の雌及び 500 mg/kg/日の雄で認められた。統計学的に有意な血漿中乳酸濃度の上昇は認められなかったが、同用量において軽微な上昇傾向がみられ、数例に 1 件ずつ、投与 20 分後に同時対照群及び投与前値に比べて顕著に高い乳酸濃度が認められた。CSF 中乳酸濃度の上昇を考慮すると、血漿中乳酸濃度の変化は投与に関連した影響の可能性が考えられた。

酸化ストレスの増加傾向は、血漿中又は肝臓バイオマーカーに認められなかった。さらに、心臓、骨格筋及び褐色脂肪組織のミトコンドリアの超微細構造は、SNAC を投与した動物と溶媒を投与した対照動物とで同様と考えられた。その他の細胞小器官にも投与に関連した形態学的変化は認められなかった。

投与に関連した病理組織学的変化が胃に認められた。主に 200 又は 500 mg/kg/日を投与した群の雌雄において、軽微～軽度の表在性壊死性又は炎症性変化、充血、上皮の剥離、腺胃粘膜内の小窩細胞における頸部粘液細胞過形成又は好酸性小球がみられた。これらは用量又は濃度の上昇に伴い発現率又は重症度が上昇したが、びらん及び潰瘍への進行は認められなかった。いずれの影響も SNAC の刺激性作用に関連すると考えられた。

結論として、雌雄 Sprague Dawley 系ラットに SNAC 75、200 及び 500 mg/kg/日を 1 日 1 回経口投与した結果、忍容性は概して良好であり、投与に関連した死亡は発生しなかった。CSF 中及び血漿中乳酸濃度の軽微な上昇が 200 mg/kg/日以上で認められた。SNAC 投与に関連した酸化ストレスの増加傾向はなかった。心臓、骨格筋及び褐色脂肪組織のミトコンドリアの超微細構造は、SNAC の影響を受けないものと考えられた。SNAC の局所刺激性誘発性を示す病理組織学的変化が腺胃の粘膜に、主に 200 又は 500 mg/kg/日投与群に認められた。

2.6.6.11.8.6.2.8 ラットにおける心臓組織の ATP 濃度を評価する検討試験（M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.O、XXXXXXXXXX140701）

本試験の目的は、一晩絶食した雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単回強制経口投与時の、心臓組織の ATP 濃度に対する急性期の影響の可能性を検討することであった。さらに ATP 濃度、血漿中グルコース及び乳酸濃度との関連性を評価した。投与群、各群の用量及び動物数を [表 2.6.6.11-41](#) に示す。

表 2.6.6.11-41 ラットにおける心臓組織の ATP 濃度を評価する検討試験 (140701)

Group	Treatment	Nominal Dose (mg/kg)	Number of Animals
1	Control (Vehicle)	0	10 F
2	SNAC	1750	10 F

F: Females

以下の評価項目を試験中に評価した：行動観察、血漿中グルコース及び乳酸（投与前及び投与後 20 分）、心臓組織の ATP。

1750 mg/kg の SNAC を投与したすべての動物が、受動性、腹式呼吸、よろめき及び歩行異常などの一般状態変化を呈した。4/10 例が軽度、6/10 例は中等度の一般状態変化を呈した。中等度の徴候がみられた 6 例は投与後 12～19 分に安楽死させた。

SNAC を投与した動物では、血漿中グルコース濃度は低下し、乳酸濃度は上昇した。SNAC を投与した動物の心臓の ATP 濃度は、溶媒対照群に比べて 68%低下していた。血漿中乳酸濃度が高かったラットは心臓組織の ATP 濃度も非常に低く、多くのラットで血漿中グルコース濃度も非常に低かった。

結論として、雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を 1750 mg/kg の用量で単回経口投与した結果、一般状態変化が認められ、また、心臓組織の ATP 濃度低下に関連する可能性が考えられる乳酸濃度の上昇及びグルコース濃度の低下も認められた。

2.6.6.11.8.6.2.9 ラットにおける心臓及び肝組織の ATP 濃度を評価する検討試験 (M 2.6.7.18 付録、2.6.7.18.17.P、141102)

本試験の目的は、一晚絶食した雌性 Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単回強制経口投与時の、心臓及び肝組織の ATP 濃度に及ぼす急性期の影響を検討することであった。さらに ATP 濃度、血漿中グルコース及び乳酸濃度との関連性を評価した。投与群、各群の用量及び動物数を表 2.6.6.11-42 に示す。

表 2.6.6.11-42 ラットにおける心臓及び肝組織の ATP 濃度を評価する検討試験 (141102)

Group	Treatment	Nominal dose (mg/kg)	Number of animals
1	Control (Vehicle)	0	10 F
2	SNAC	75	10 F
3	SNAC	200	10 F
4	SNAC	500	10 F
5	SNAC	900	10 F
6	SNAC	1750	10 F

F: Females

以下の評価項目を試験実施中に評価した：投与後 20 分間の行動観察、血漿中グルコース及び乳酸（投与前及び投与後 20 分）、投与後 20 分に安楽死処置時の心臓及び肝組織の ATP。

75 及び 200 mg/kg では、SNAC による行動変化は誘発されなかった。12 例（500 mg/kg 群の 2 例、900 mg/kg 群の 6 例及び 1750 mg/kg 群の 4 例）が軽度の一般状態変化を呈した一方で、中等度の一般状態変化が 8 例（900 mg/kg 群の 2 例及び 1750 mg/kg 群の 6 例）に認められた。認められた一般状態変化は、主に受動性、腹式呼吸、よろめき、歩行異常及び無関心であった。中等度の一般状態変化がみられた動物は投与 11～17 分後に安楽死させた。

血漿中グルコース濃度は最高 SNAC 900 mg/kg の用量まで用量依存的に低下したが、統計学的有意差は 900 mg/kg のみ認められた。1750 mg/kg ではこのような影響はみられず、グルコース濃度の範囲は非常に幅広であった。血漿中乳酸濃度は SNAC を投与した動物において用量依存的に上昇したが、統計学的有意差は 900 及び 1750 mg/kg でのみ認められた。

ATP 濃度は SNAC を投与した動物の心臓及び肝臓において用量依存的に低下し、心臓では 1750 mg/kg で、肝臓では 500 mg/kg 以上で統計学的有意差が認められた。

結論として、Sprague Dawley 系ラットに SNAC を単回経口投与した結果、血漿中グルコースの低下、血漿中乳酸の上昇、肝臓及び心臓組織の ATP 濃度の低下が認められた。さらに、有害な一般状態変化が 500 mg/kg 以上で認められた。

2.6.6.11.9 300 mg/日でのヒト曝露量との関連性

動物で認められた毒性所見のヒトにおけるリスクを評価するため、動物及びヒトの曝露量比を算出した。曝露量比には、毒性特性及びメカニズムに基づき $C_{\max}$ 又は AUC を使用した。無毒性量（NOAEL）におけるヒトの SNAC 曝露量（ $C_{\max}$ 及び AUC）、動物の SNAC 曝露量、及び曝露量比を以下に示す（表 2.6.6.11-43）。

表 2.6.6.11-43 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		
			Total $C_{\max}$ (ng/mL)	Free $C_{\max}$ (ng/mL)	AUC ^g (h×ng/mL)	$C_{\max}$ (total)	$C_{\max}$ (free)	AUC
Human	300 mg ^b	Trial 4140 ^f	1083	19.0	1340			
Mouse (13 weeks)	500 mg/kg ^c	A16705	81750	12500	18050	75	659	13
Rat (104 weeks)	75 mg/kg ^d	JLY0366	32800	2330	5985	30	123	4.5
Monkey	300 mg/kg ^e	BNA00003	24100	922	40300	22	49	30

(39 weeks)

a: Exposure data in rodents obtained from separate studies: JLY0557 (mouse); JLY0517, JLY0532 (rat). Free concentration calculated based on plasma protein binding (M 4.2.2.3-B-8, 309773)
b: Clinical dose of SNAC in oral semaglutide tablets, independent of semaglutide dose
c: The NOAEL defining toxicity was excessive mortality at 1500/1000 mg/kg/day
d: The NOAEL defining toxicity was increased mortality in females at 200 and 500 mg/kg/day
e: The NOAEL defining toxicity was adverse clinical signs at 500 and 600 mg/kg/day
f: Geometric mean in healthy male Japanese subjects, Day 91 (n = 17)
g: Steady-state AUC values (AUC_{0-24h}) are reported for humans. In animal studies, AUC_{0-24h} was reported in mouse, AUC values to the last measurable concentration (AUC_{last}) was reported in rats, and AUC_{0-8h} in monkey, following either single or multiple doses. Due to the rapid absorption and rapid elimination of SNAC in both human and animal species, and lack of accumulation on repeated dosing, these differing AUC calculations yield similar values and are directly comparable

さらに、NOAELにおける SNAC の 5 種の主要代謝物（E494、E506、E1245、E1246 及び E1247）の動物の曝露量（ C_{max} 及び AUC）を、SNAC 代謝物のヒト曝露量とともに示す（表 2.6.6.11-44）。

表 2.6.6.11-44 毒性試験における NOAEL での SNAC 代謝物の曝露量

Species	Dose	Trial/Study ID	SNAC metabolites				
			E494	E506	E1245	E1246	E1247
C _{max} (ng/mL)							
Human	300 mg ^a	Trial 4082	125	1075	3030	1811	6523
Mouse	500 mg/kg	JLY0557	28900	109050	66850	69650	110000
Rat	75 mg/kg	JLY0517	20300	40600	6560	4230	8330
AUC (h× ng/mL)							
Human	300 mg ^a	Trial 4082	125	1563	10338	5310	35122
Mouse	500 mg/kg	JLY0557	11360	96350	67600	147500	435500
Rat	75 mg/kg	JLY0517	9980	58500	8080	4740	17300

a: Human metabolite plasma exposure in healthy subjects (N=22; geometric mean) in Trial 4082 on day 10

動物に SNAC を経口投与時に認められた死亡について、投与初期の高曝露量と毒性との関連性を検証した。結果としての動物及びヒトの C_{max} 比較が、ヒトでのリスク評価に最適な評価項目であると考えられた。

SNAC を投与した動物に認められた死亡の原因は、電子伝達系の複合体 I を介した細胞呼吸阻害と考えられた（細胞呼吸に及ぼす影響、M 4.2.3.7.7-B-1）。この阻害はミトコンドリア内で生じるため、血

漿中の総 SNAC 濃度ではなく非結合型 SNAC 濃度（非結合型濃度）の曝露量比のほうが、ヒトのリスクに関してより意義のある推定が得られると考えられる。これらのデータを表 2.6.6.11-45 に示す。

表 2.6.6.11-45 死亡の認められなかった最低用量における動物及びヒトの曝露量比（C_{max}、非結合型）

Species	Dose	Trial/Study ID	Exposure ^a		Animal-to-human ratio	
			Total C _{max} (ng/mL)	Free C _{max} (μM)	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	BNA00004	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: Expose 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 (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

2.6.6.11.10 考察及び結論

SNAC の毒性試験プログラムは、実施した非臨床毒性試験プログラムは米国 FDA の「Guidance for Industry - Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients¹」に準拠しており、当該ガイダンスは ICH M3 ガイドライン²に示されている推奨要件に全面的に準拠している。

SNAC の忍容性は、各動物種に対して 75～500 mg/kg/日以下の用量では、概して良好であった。毒性試験に使用されたいずれの動物種においても、特に 500 mg/kg/日を超える用量において、SNAC は一般状態変化及び死亡との関連性が認められた。これらの所見に関して、メカニズム試験において認められた血漿中及び CSF 中グルコースの低下、血漿中及び CSF 中乳酸の上昇及び肝臓及び心臓の ATP 低下との関連性が認められた。これらの所見は、細胞呼吸阻害に関連すると考えられ、ヒトでの SNAC 曝露量よりもはるかに高い曝露量で認められた。

2.6.6.11.10.1 一般毒性

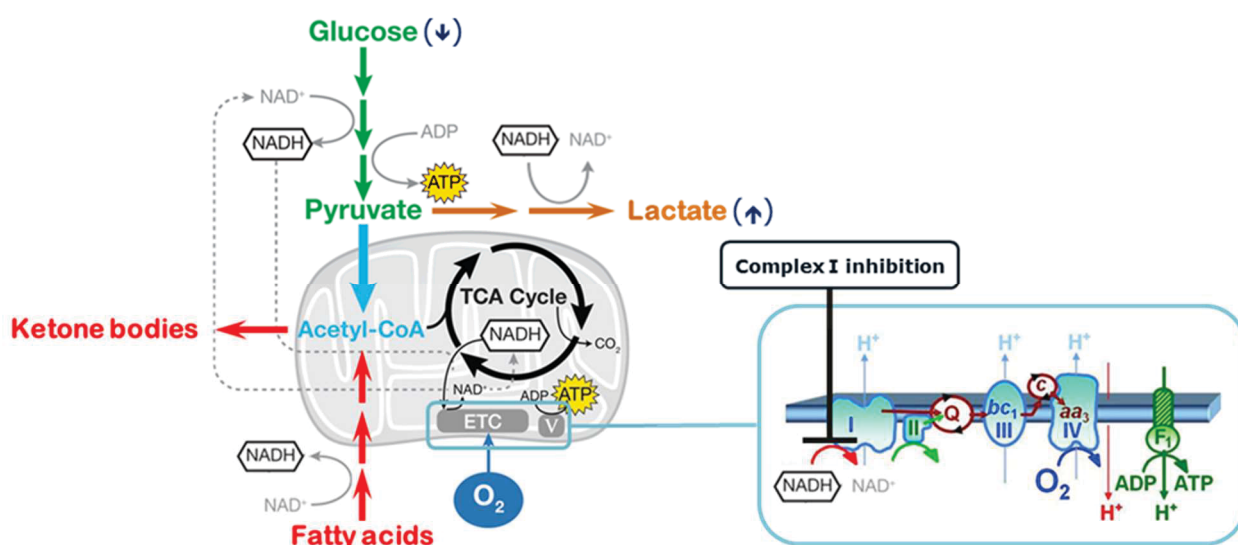
試験を行ったすべての動物種（マウス、ラット、ウサギ及びサル）において、SNAC の投与により有害な一般状態変化及び死亡が生じ、ラットがん原性試験を含む反復投与毒性試験におけるこれらに基づき NOAEL を設定した。曝露量及びヒト曝露量に対する比は表 2.6.6.11-45 に示した。死亡が発生した最低用量はラットにおける 200 mg/kg/日であり、これは他の動物種で死亡がみられた用量よりも非常に低かった。概して、死亡は高用量かつ初回投与後 1 時間以内の高 SNAC 曝露量の時点で発生した。一方、5 種の主要代謝物の曝露量と一般状態変化との関連性を示す所見はなかった。いずれの動物種においても死亡の前に、嗜眠、呼吸異常、運動失調、異常姿勢、活動性、身体緊張及び反射の低下等の一般状態変化が時折認められ、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变化は、死亡がみられない用量において一過性で認められた。

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ことから、投与期間の長さ及び死亡には関連がないことが示された。

反復投与毒性試験を通して、一貫して動物の一般状態変化又は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。ただし、サルの試験において 500 mg/kg/日以上を投与した動物では、一般状態変化の特性から低血糖様症状と判断されたことから、これらの動物には適宜ブドウ糖や果物を与えた。採血のタイミングが原因と考えられたが、血漿中グルコース濃度に及ぼす一貫した影響は認められなかった。一般状態変化はほとんどが一過性であったが、試験全体を通してみると、全体的に低血糖に対する治療効果はないと考えられた。これらの知見は、ラットにおけるメカニズム試験（JLY0468）において、血漿中グルコースが低かったがグルコース投与の効果は認められなかった知見と一致するものであった。その他に一貫した臨床検査評価項目の変化は認められ

なかったが、ラットではアルカリホスファターゼ及びトリグリセリド濃度の上昇、グロブリン濃度及びケトン体の低下が認められた。ラット及びサル両方において、尿組成の変化（最も一貫性がみ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。In vitro では、検討したすべての細胞種及び動物種において SNAC が細胞呼吸を阻害した。SNAC の細胞呼吸に及ぼす影響は、主に電子伝達系の複合体 I の阻害を介していた。Sprague Dawley 系ラットを用いた in vivo 試験では、SNAC が動物の呼吸を急激に活性化し、血中及び CSF 中のグルコース濃度を低下させ、血漿中及び CSF 中乳酸濃度を上昇させ、心臓及び肝臓の ATP 濃度を低下させることが示された。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 2.6.6.11-3](#)）。



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, 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 in 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 2.6.6.11-3 細胞呼吸及び電子伝達系に及ぼす SNAC の影響

細胞呼吸の阻害による急激な全身性のエネルギー欠乏が、高濃度の SNAC に曝露した動物が呈した症状及び血液生化学的変化の原因と考えられるが、動物で死亡が発生した曝露量は 300 mg/日におけるヒトの曝露量の 276 倍を超えていた（表 2.6.6.11-45）。SNAC で認められた作用機序の詳細については、細胞呼吸に及ぼす影響（M 4.2.3.7.7-B-1）を参照のこと。

結論として、動物の死亡及び一般状態変化は、細胞呼吸阻害が原因であること、及び 300 mg/日におけるヒトの曝露量に比べて高い曝露量、特に動物個体における投与後初期の非常に高い血漿中濃度において発生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、セマグルチド経口錠に含まれる 300 mg の SNAC をヒトに投与しても到達することはないことから、動物で認められた死亡はヒトにおける SNAC 使用に関して、臨床的な問題とはならないと考えられる。

2.6.6.11.10.2 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 30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で 26 週間経口投与したが、毒性学的意義のある所見は認められず、SNAC のがん原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 及び 500 mg/kg/日において雌の死亡率が上昇した。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。

2.6.6.11.10.3 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 1000 mg/kg/日まで受胎能及び胚・胎児の発生に影響を及ぼさなかった。ラットにおける出生前及び出生後の発生（PPND）試験において、死産児及び分娩後数日間の児動物の死亡の増加が認められたが、これは出産前後に発生するエネルギー欠乏を伴う母動物の毒性によるものと考えられた。これらの結果より、本試験で単剤投与した 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 SNAC の細胞呼吸に及ぼす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るとは考えられない〔細胞呼吸に及ぼす影響（M 4.2.3.7.7-B-1）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、許容可能と考えられる。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。

2.6.6.11.10.4 局所刺激性

局所刺激性の検討を反復投与毒性試験の一部に組み入れた。これらの試験では、ラットにわずかな消化管刺激がまれに認められたのみであり、サルに 1 日 1 回 39 週間強制経口投与した場合、又は 300 mg SNAC を含有する錠剤を 1 日 1 回 16 週間した場合のいずれにおいても、局所的な消化管毒性を示す所見は認められなかった。動物を投与後 20 又は 60 分に安楽死処置したところ、ラットにおける単回経口投与検討試験及び 13 週間検討試験と同様に、病理組織学的検査において、腺胃又は十二指腸の軽微～中等度の最急性粘膜壊死が 900 又は 1500 mg/kg の SNAC を単回投与した動物の大部分に、又は軽微～軽度の表在性壊死が 200 又は 500 mg/kg/日の SNAC を 13 週間投与した群で認められた。反復投与で重症度が低い理由として、13 週間試験における投与用量が低いことによると考えらる。しかしながら、SNAC と類似構造を有するアスピリン及びその他の局所刺激性物質の文献^{12,13}で記述されているように、SNAC の刺激作用に対する粘膜の耐性が増強した（胃の適応反応）可能性も考えられる。さらに、露出した胃表面は迅速な上皮回復（rapid epithelial restitution）プロセスにより非常に効率良く数時間で修復されることがよく知られている^{14,15}。一般反復投与毒性試験では特筆すべき腺胃の変化がなかったことにより、上皮粘膜の速やかな回復が確認されている。ラットにおけるがん原性試験では、消化管に対する局所的な SNAC の曝露によって、消化管に腫瘍性病変又は慢性的非腫瘍性病変は生じなかった。さらに、イヌに SNAC の錠剤又は溶液を投与した、急性局所刺激性試験において、投与後 1 及び 24 時間のいずれも胃における局所作用は示されなかった。

2.6.6.11.10.5 免疫毒性

ラットを用いて 28 日間免疫毒性試験を実施した。本試験では、SNAC は最大 500 mg/kg/日までの用量で免疫系に影響を及ぼさない、すなわちリンパ系に病理組織学的変化をもたらさず、投与した動物の IgM 又は IgG 応答能を変化させることなく、また免疫表現型、臨床検査評価項目、臓器重量又は骨髓の変化をもたらさないことが示された。したがって、SNAC は免疫毒性作用をもたらさないと結論づけた。

2.6.6.11.10.6 総括

SNAC の忍容性は、各動物種に対して 75～500 mg/kg/日以下で概して良好であった。毒性試験に用いたすべての動物種における有害な一般状態変化及び死亡により、反復投与毒性試験における NOAEL が設定された。一般状態変化及び死亡は、複合体 I 障害を介した細胞呼吸の障害に起因した急激な全身性のエネルギー欠乏が原因と考えられ、高い曝露量、特に動物の各個体における投与初期の非常に高い血漿中 SNAC 濃度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、ヒトに 300 mg SNAC 錠を投与しても到達することはないことから、動物で認められた死亡はヒトにおける SNAC の使用に関して、臨床的な問題にならないと考えられる。

SNAC には遺伝毒性又はがん原性は認められず、また SNAC は受胎能及び胚・胎児の発生に対して有害な影響を及ぼさなかった。

参考文献

- ¹ FDA. Guidance for Industry. Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients. May 2005.
- ² 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.
- ³ ICH S1B. Testing For Carcinogenicity Of Pharmaceuticals. Current Step 4 version, dated 16 July 1997.
- ⁴ Paranjpe MG, Shah SA, Denton MD, Elbekai RH. Incidence of spontaneous non-neoplastic lesions in transgenic CBYB6F1-Tg(HRAS)2Jic mice. *Toxicol Pathol.* 2013;41(8):1137-45.
- ⁵ Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol.* 2010;38(7 Suppl):5S-81S.
- ⁶ Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, Deschl U, Elwell MR, Greaves P, et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. *J Toxicol Pathol.* 2016;29(1 Suppl):1S-125S.
- ⁷ 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.
- ⁸ ICH S2(R1). Guidance On Genotoxicity Testing And Data Interpretation For Pharmaceuticals Intended For Human Use. Current Step 4 version, dated 9 November 2011.
- ⁹ Gaillard ET. Chapter 10 Ureter, Urinary bladder, and urethra. *Pathology of the Mouse: Reference and Atlas by Maronpot RR; Boorman GA.* 1999;235-258. In: Maronpot RR, editor. *Pathology of the Mouse* 1999. p. 235-58.
- ¹⁰ ICH S5(R2). Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products & Toxicity to Male Fertility. Current Step 4 version Parent Guideline dated 24 June 1993 (Addendum dated 9 November 2000 incorporated in November 2005).
- ¹¹ ICH Q3A(R2). Impurities in New Drug Substances. Current Step 4 version, dated 25 October 2006.
- ¹² Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Ernst H, Stachura J, Hahn EG. Gastric adaptation to injury by repeated doses of aspirin strengthens mucosal defence against subsequent exposure to various strong irritants in rats. *Gut.* 1995;37(6):749-57
- ¹³ Stachura J, Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek J, Domschke W. Pathologic basis of gastric mucosal adaptation to topical injury. *J Gastroenterol.* 1995;30(3):416-27.
- ¹⁴ Lacy ER, Morris GP, Cohen MM. Rapid repair of the surface epithelium in human gastric mucosa after acute superficial injury. *J Clin Gastroenterol.* 1993;17 Suppl 1:S125-35.
- ¹⁵ Graham DY, Smith JL. Aspirin and the stomach. *Ann Intern Med.* 1986;104(3):390-8.

リベルサス錠 3mg
リベルサス錠 7mg
リベルサス錠 14mg

2.6.7 毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

	ページ
目次	2
付録	2
2.6.7.1 毒性試験の一覧表	3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表	5
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧	6
2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧	8
2.6.7.5 単回投与毒性試験	9
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験	10
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験	12
2.6.7.7.A ラットにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（208300）	12
2.6.7.7.B ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（210196）	16
2.6.7.7.C カニクイザルにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（209153）	29
2.6.7.7.D カニクイザルにおける 17 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（209428）	33
2.6.7.8 遺伝毒性試験：in vitro	37
2.6.7.9 遺伝毒性試験：in vivo	37
2.6.7.10 がん原性試験	37
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験	37
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	37
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験	37
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験	37
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験	38
2.6.7.16 局所刺激性	38
2.6.7.17 その他の毒性試験	38
2.6.7.17.A 免疫原性	38
2.6.7.17.B 免疫毒性	38
2.6.7.17.C 依存性	38
2.6.7.17.D 代謝物	38
2.6.7.17.E 不純物	38
2.6.7.17.F 添加物	38

付録

2.6.7.18 付録 サルカプロザートナトリウム：毒性試験の概要表	
------------------------------------	--

A comprehensive nonclinical toxicology evaluation of subcutaneously administered semaglutide was made for the Ozempic registration file (Please refer to M 1.13.1).

In addition, repeat dose toxicity studies in Sprague Dawley rats and cynomolgus monkeys have been performed with oral administration of semaglutide. These studies are tabulated below.

The toxicological evaluation of the new excipient salcaprozate sodium (SNAC) is tabulated in ‘Salcaprozate sodium: Toxicology Tabulated Summary’, included in M 2.6.7.18 Appendix.

2.6.7.1 毒性試験の一覧表

Test Article: Oral semaglutide

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Repeat Dose Toxicity Studies	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage	2 weeks	0 6.67 33.36 66.67	No	Novo Nordisk A/S	208301	4.2.3.2-A-1
	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage	6 weeks	0 6.67 33.36 66.67	Yes	Novo Nordisk A/S	208300	4.2.3.2-A-2
	Rat / Sprague Dawley	Oral gavage	26 weeks	0 6 20 60	Yes	██████████ ██████████	210196	4.2.3.2-A-3
	Cynomolgus monkey	Oral capsule	2 weeks	6.8 - 13	No	██████████ ██████████	208302	4.2.3.2-A-4
	Cynomolgus monkey	Oral capsule	6 weeks	0 (empty capsules) 0 (SNAC controls) 5	Yes	██████████ ██████████	209153	4.2.3.2-A-5

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
	Cynomolgus monkey	Oral capsule	17 weeks	10 0 (empty capsules) 0 (*物質C controls) 5 20	Yes		209428	4.2.3.2-A-6

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test article: Oral semaglutide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
Repeat Dose Toxicity 2-Week Dose Range Finding Study in Sprague-Dawley Rats by Daily Oral Administration	Rat / Sprague Dawley	Oral (gavage)	6.67, 33.36, 66.67	No	208301	4.2.3.2-A-1
6-Week Oral Toxicity Study in Rats	Rat / Sprague Dawley	Oral (gavage)	6.67, 33.36, 66.67	Yes	208300	4.2.3.2-A-2
Toxicity Study by Oral Gavage Administration to Sprague-Dawley Rats for 26 Weeks Followed by a 4 Week Recovery Period	Rat / Sprague Dawley	Oral (gavage)	6, 20, 60 mg/kg	Yes	210196	4.2.3.2-A-3
Maximum Tolerated Dose Study by Oral (capsule) Administration to Cynomolgus Monkeys	Cynomolgus monkey	Oral (capsules)	Phase III: 31.26 mg (6.8 to 13 mg/kg)	No	208302	4.2.3.2-A-4
Toxicity study by Oral Capsule Administration to Cynomolgus Monkeys for 6 Weeks Followed by a 2 Week Recovery Period	Cynomolgus monkey	Oral (capsules)	5.0 and 10.0	Yes	209153	4.2.3.2-A-5
Toxicity Study by Oral Capsule Administration to Cynomolgus Monkeys for 17 Weeks Followed by a 2 Week Recovery Period	Cynomolgus monkey	Oral (capsules)	5.0 and 20	Yes	209428	4.2.3.2-A-6

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test article: Oral semaglutide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID.	Doses mg/kg/day	C _{max} (nM)				AUC _{0-24h} (h × nM)			
						Day 1		Day 14		Day 1		Day 14	
Repeat Dose Toxicity	Sprague Dawley	Oral (gavage)	2M+2F	208301	6.67	F	M	F	M	F	M	F	M
					33.36	NC	2.14	NC	0.563	NC	NC	NC	NC
						509	169	37.7	7.68	4060	1470	256	NA
					66.67	1340	1640	67.8	61.9	14400	11900	484	597

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID	Doses mg/kg/day	C _{max} (nM)				AUC _{0-24h} (h × nM)			
						Day 1		Day 42		Day 1		Day 42	
Repeat Dose Toxicity	Sprague Dawley	Oral (gavage)	1M+1F / 2M+2F / 3M + 3F	208300	6.67	F	M	F	M	F	M	F	M
					33.36	1.59	NC	10.9	NC	24.2	NC	41.6	NC
						286	141	109	87.5	2200	1350	1050	732
					66.67	2130	705	545	230	20400	6260	4720	2930

Additional information:

Animals were assessed for anti-semaglutide antibody development and all were found negative for antibody development.

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID	Doses mg/kg/day	C _{max} (nM)				AUC _{0-24h} (h × nM)			
						Day 1		Week 26		Day 1		Week 26	
Repeat Dose Toxicity	Sprague Dawley	Oral (gavage)	20F+20M (n=4)	210196	6	F	M	F	M	F	M	F	M
					20	6.01	NC	9.37	NC	53.7	NC	86.0	NC
						22.8	28.8	60.6	1500	155	316	333	3170
					60	537	234	288	383	5540	2650	4250	3140

Additional information:

Animals were assessed for anti-semaglutide antibody development and all were found negative for antibody development.

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID.	Doses (mg)	C _{max} (nM)				AUC _{0-24h} (h × nM)			
						Day 1		Day 14		Day 1		Day 14	
Repeat Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	Oral (capsules)	4M+4F	208302	31.26 (6.8 to 13 mg/kg)	F 104	M 184	F 229	M 172	F 1650	M 3040	F 4500	M 2960

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID	Doses (mg/kg/day)	C _{max} (nM)				AUC _{0-24h} (h × nM)			
						Day 1		Day 42		Day 1		Day 42	
Repeat Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	Oral (capsules)	6M+6F	209153	5.0 10.0	F 33.4 267	M 57.1 102	F 25.4 281	M 64.5 160	F 607 3580	M 979 1540	F 445 5150	M 1180 2870

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID	Doses (mg/kg/day)	C _{max} (nM)				AUC _{0-24h} (h × nM)			
						Day 1		Day 119		Day 1		Day 119	
Repeat Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	Oral (capsules)	6M+6F	209428	5.0 20.0	F 38.3 236	M 13.2 346	F 4.67 101	M 4.96 165	F 627 3370	M 256 5280	F 86.0 1910	M 95.3 3250

NC Not calculated

2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧

Test article: Oral semaglutide

Batch No.	API process	Purity	HMWP	Specified impurities (%)				Study ID	Study
				Sum of impurities	Hydrophilic impurities	Hydrophobic impurities 1	Hydrophobic impurities 2		
		(%)	(%)						
				I	I	I	I	208301	Oral dose range finding study in rats
				I	I	I	I	208302	Oral MTD study in cynomolgus monkeys
				I	I	I	I	208300	6-week oral toxicity study in rats
								210196	26-week oral toxicity study in rats
				I	I	I	I	209153	6-week oral toxicity study in monkeys
								209428	17-week oral toxicity study in monkeys
								209428	17-week oral toxicity study in monkeys

a:
b:
c:

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test article: Oral semaglutide

Single-dose toxicity studies are described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test article: Oral semaglutide

Species/strain	Method of administration (Vehicle/formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and no. per group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Study ID
Rat / Sprague Dawley	Oral gavage	2 weeks	0 6.67 33.36 66.67	6M & 6F	N/A	Oral semaglutide was well tolerated and no mortalities or clinical signs occurred which were related to oral semaglutide. Expected, pharmacologically mediated, non-adverse reductions of food consumption and body weight gain were observed together with effects on liver (reduced weights and decreased hepatocellular rarefaction) and clinical pathology (reduced triglycerides) secondary to the reduced food consumption.	208301
Monkey / cynomolgus	Dose escalation phase Pharmacokinetic phase	3 x 4 days Two single doses (s.c. on Day 1, p.o. on Day 15)	Day 1 to 4: 2.7 - 3.9* Day 8 to 11: 4 - 6** Day 15 to 18: 8.1 - 12.3*** Day 1: 0.01 (subcutaneous) □ Day 15: 6.7 - 11.9***	2M & 2F 2M & 2F	N/A	Oral semaglutide was generally well tolerated. No unscheduled deaths occurred during the study and during the dose escalation and the pharmacokinetic phases, no treatment related clinical signs were observed. There were minor possibly treatment related clinical signs such as vomiting, hunched posture and underactivity in 2 females during the first two days of the constant dose phase. Reduced food consumption and bodyweight, or bodyweight stasis, were observed during all phases of the study. Reticulocyte counts were low compared to pre-treatment values, and clinical chemistry revealed low urea, phosphorus and triglyceride plasma levels. The clinical pathology findings are considered to be due to the reduced food consumption hence secondary to the pharmacological action of semaglutide. Low thymus weights compared to the historical background range were recorded in 4 animals. The low thymus weights are considered to represent stress-related findings as a consequence of the dose	208302

Species/strain	Method of administration (Vehicle/formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and no. per group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy findings	Study ID
	Constant dose phase	2 weeks	□ Day 1 to 14 6.8 -13.0***	4M & 4F (including animals from the dose escalation and pharmacokinetic phases after a 4-week wash out-period)		administration procedure and the reduced food consumption.	

□ Doses are based on body weight in the relevant period.

* 1 size 0 capsule/day; ** 1 size 00 capsule/day; ***2 size 00 capsules/day

Capsule content:

Size 0 capsule: 10.69 mg semaglutide

Size 00 capsule: 15.63 mg semaglutide

2 size 00 capsules: 31.26 mg semaglutide

Subcutaneous non-pivotal repeat dose toxicity studies have been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Test article: Oral semaglutide

2.6.7.7.A ラットにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（208300）		Study ID: 208300
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: 6 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-A-2 GLP Compliance: Yes
Initial Age: 7 weeks	Duration of Postdose: 2 weeks	
Date of First Dose: 27 January 2009	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 6.67, 33.36 and 66.67 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: SNAC in water adjusted to pH 8.5	
Parameters collected: Viability, clinical condition, body weight, food consumption, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, urinalysis, toxicokinetics, antibody formation, organ weights, macropathology and histopathology		
Special Features: Corresponding dose of SNAC: 1000, 100, 500 and 1000 mg/kg/day, respectively		
No Observed Adverse Effect Level: 66.67 mg/kg/day		
Brief conclusion: Ten (10) unscheduled deaths occurred during the study. None of them were considered related to semaglutide. On day 1-2, all high dose animals appeared subdued with piloerection and hunched posture which coincided with an initial but transient reduction in body weight. Reduced body weight gain and food consumption were observed at the two highest dose levels, but were reversible. Minimally increased levels of alanine aminotransferase, low triglyceride levels, and organ weight changes were all considered non-adverse and secondary to the lower body weight gain and food consumption. Slightly increased urinary volume and pH in the treated males were reversible and could be due to the known inhibitory effects of GLP-1 on sodium reabsorption from the proximal tubules. In the absence of any treatment related histopathological changes in the urinary tract, the changes in urinary parameters were considered non-adverse. Histopathology revealed dose-dependent increased incidences of minimal hypertrophy of the Brunner's glands in the semaglutide treated groups which were considered to be due to activation of the GLP-1 receptor. Since the finding in the Brunner's glands was not associated with inflammation or cellular damage neither in the Brunner's glands nor in the intestinal mucosa and as recovery occurred, the finding was not considered to be adverse. In the absence of any adverse changes, the NOAEL was considered to be the highest dose tested, 66.67 mg/kg/day.		

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Control)	6.67	33.36	66.67	0 (Control)	6.67	33.36	66.67
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	1000	100	500	1000	1000	100	500	1000
Initial Number of Animals								
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Recovery	M: 6	M: 6	M: 6	M: 6	F: 6	F: 6	F: 6	F: 6
Toxicokinetics (AUC_{0-24h} (nmol*h/L))								
Day 1	N/A	NC	1350	6260	N/A	24.2	2200	20400
Day 42	N/A	NC	732	2930	N/A	41.6	1050	4720
Noteworthy Findings								
Died or euthanised/terminated prematurely	1 ^a	1 ^a	0	0	2 ^b	0	5 ^b	1 ^b
Clinical signs^c								
Hunched posture, Day 1	0/0	0/0	0/0	16/16	0/0	0/0	0/0	16/16
Subdued, Day 1 and 2	0/0	0/0	0/0	32/16	0/0	0/0	0/0	32/16
Piloerection, Day 1 and 2	0/0	0/0	0/0	32/16	0/0	0/0	0/0	32/16
Body weight gain								
Day -1-41 (g/day)	3.6	3.4	2.7***	1.9***	1.3	1.3	1.0*	0.6***
Recovery period, Day 41-56 (g/day)	2.5	2.4	3.9**	5.5***	1.0	0.7	0.9	2.5***
Food consumption								
Day 1-41 (g/animal/day)	25.9	24.5	21.2***	18.3***	17.4	16.8	14.4	13.0***
Recovery period, Day 41-56 (g/animal/week)	26.7	24.9	27.4	29.3	17.3	17.8	20.0	21.5
Clinical chemistry								
Alanine aminotransferase (U/L)								
Week 6	67.0	78.5	79.5	92.7	51.3	49.9	57.0	66.3*
Week R2	72.7	66.5	75.8	73.8	60.7	58.7	61.7	60.2
Triglycerides (mmol/L)								
Week 6	2.13	1.36*	1.13**	1.07***	1.09	0.86	0.82	0.76
Week R2	2.05	1.52	1.33	1.66	0.83	0.93	0.65	0.62
Urinalysis								
Volume (mL)								
Week 5/6	4.6	6.5	8.7**	8.5*	5.6	5.4	6.5	6.3

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Control)	6.67	33.36	66.67	0 (Control)	6.67	33.36	66.67
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	1000	100	500	1000	1000	100	500	1000
Initial Number of Animals								
Main Recovery	M: 10 M: 6	M: 10 M: 6	M: 10 M: 6	M: 10 M: 6	F: 10 F: 6	F: 10 F: 6	F: 10 F: 6	F: 10 F: 6
Week R1	3.6	3.0	5.1	4.9	3.2	4.0	4.2	3.2
pH ^d								
Week 5/6	7.4	8.1*	8.2**	8.1*	7.4	7.2	7.7	7.3
Week R1	8.5	8.3	8.4	8.3	7.0	7.7	7.3	7.8
Organ Weights (main study animals) ^e								
Adrenal glands								
Absolute weight (mg)	60.3	58.6	60.3	61.4	83.3	80.9	77.5	85.1
% of body weight	0.0138	0.0139	0.0152	0.0168**	0.0293	0.0287	0.0288	0.0329
Brain								
Absolute weight (mg)	2156	2121	2161	2195	2054	2043	2057	2054
% of body weight	0.495	0.501	0.545**	0.600***	0.725	0.724	0.764	0.799*
Epididymis								
Absolute weight (mg)	1269	1235	1209	1220	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.291	0.291	0.306	0.334*	N/A	N/A	N/A	N/A
Heart								
Absolute weight (mg)	1431	1330	1254**	1184***	1056	1007	902*	950
% of body weight	0.328	0.313	0.316	0.323	0.372	0.357	0.336	0.367
Kidneys								
Absolute weight (mg)	2901	2760	2822	2828	1992	1883	2055	2077
% of body weight	0.664	0.649	0.711	0.773***	0.703	0.665	0.763	0.804**
Liver								
Absolute weight (mg)	17226	15008*	15055*	13778***	10731	9035	10070	10317
% of body weight	3.92	3.52*	3.79	3.77	3.77	3.19***	3.73	3.99

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Control)	6.67	33.36	66.67	0 (Control)	6.67	33.36	66.67
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	1000	100	500	1000	1000	100	500	1000
Initial Number of Animals								
Main Recovery	M: 10 M: 6	M: 10 M: 6	M: 10 M: 6	M: 10 M: 6	F: 10 F: 6	F: 10 F: 6	F: 10 F: 6	F: 10 F: 6
Prostate								
Absolute weight (mg)	1142	1020	963*	725***	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.262	0.240	0.244	0.199**	N/A	N/A	N/A	N/A
Spleen								
Absolute weight (mg)	1004	973	825**	771***	737	759	617	681
% of body weight	0.229	0.231	0.207	0.211	0.260	0.267	0.229	0.262
Testes								
Absolute weight (mg)	3772	3640	3716	3746	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.866	0.858	0.937	1.025***	N/A	N/A	N/A	N/A
Thymus								
Absolute weight (mg)	546.5	554.4	452.6	525.6	468.9	413.8	367.6*	363.1*
% of body weight	0.125	0.131	0.114	0.144	0.166	0.147	0.136	0.140
Histopathology								
Duodenum, main study (no. examined)	9	10	9	7	8	10	9	6
Hypertrophy of Brunner's glands, minimal	1	2	8	7	0	2	7	6
Duodenum, recovery study (no. examined)	6	6	6	6	6	6	3	5
Hypertrophy of Brunner's glands	0	0	0	0	0	0	0	0

* p≤0.05, ** p ≤0.01, *** p≤0.001 vs. control (pairwise test)

NC Not calculated

a: Euthanised due to physical injury occurring during blood sampling, i.e. unrelated to treatment

b: One (1) female euthanised due to dosing error, 7 animals found dead due to dosing error, all considered unrelated to treatment

c: Total occurrence/No. of animals

d: Statistical significance based on comparison of incidences of pH values

e: After the 2-week recovery period, no notable differences were observed between controls and groups previously treated with semaglutide, demonstrating that full or partial recovery from the effects of semaglutide had occurred (data not shown)

2.6.7.7.B ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 (210196)

Study ID: 210196

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: 26 weeks – preceded by 2 weeks dose escalation	Location in CTD: 4.2.3.2-A-3
Initial Age: 40-46 days at dosing start	Duration of Postdose: 4 weeks	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 12 October 2010	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 6 ^a , 20 ^a and 60 ^a mg/kg/day	Vehicle/Formulation: SNAC in Water for injection adjusted to pH 8.5	
Parameters collected: Viability, clinical condition, body weight, food consumption, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, blood glucose levels, urinalysis, toxicokinetics, antibody formation, organ weights, macropathology, and histopathology		
Special Features: Semaglutide was administered with an absorption enhancer, SNAC. In addition to a water control group, three SNAC control groups were included to distinguish findings potentially caused by semaglutide from those potentially caused by SNAC. Generally, only findings considered related to semaglutide are described here.		
No Observed Adverse Effect Level: 20 mg/kg/day		
Brief conclusion: Administration of semaglutide caused reduced body weight gain and food consumption which were expected effects, attributed to the pharmacological action of semaglutide. The premature deaths of 2 semaglutide treated animals were probably due to exaggerated pharmacodynamic effects on food consumption and body weight. Minor changes in clinical pathology parameters and organ weight changes were generally considered to be secondary to the effect of semaglutide on food consumption and body weight and were, due to their limited magnitude and/or lack of associated histopathological findings, considered non-adverse. Increased urinary volume and sodium and chloride concentrations could not be clearly attributed to either semaglutide or SNAC, but could possibly be due to the known inhibitory effects of GLP-1 on sodium reabsorption from the proximal tubules. In the absence of any treatment related histopathological changes in the kidneys, all changes in urinary parameters were considered non-adverse. Atrophy of the uterine wall was most likely secondary to the effect of semaglutide on body weight. Minimal to slight hypertrophy of Brunner’s glands in the duodenum was observed mainly at 20 and 60 mg/kg/day and was considered to be due to activation of the GLP-1 receptor. Since the finding in the Brunner’s glands was not associated with inflammation or cellular damage neither in the Brunner’s glands nor in the intestinal mucosa and as full recovery occurred, the finding was not considered to be adverse. A slight increase in incidence of minimal centrilobular hepatocyte hypertrophy was observed in the SNAC control group, and the incidence was a bit further increased in the intermediate and high dose semaglutide treated groups. As this was observed in females only and as the increase was modest, it was considered of uncertain relationship to administration of semaglutide. As no histopathology or clinical pathology alterations indicative for liver toxicity were observed, the hepatocellular hypertrophy was considered non-adverse. The hepatocyte hypertrophy was not seen after the recovery period indicating that the finding was either incidental or fully reversible. Based upon the premature deaths of 2 animals at 60 mg/kg/day, the NOAEL was considered to be 20 mg/kg/day.		

[illegible]

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main Recovery	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10
Week 13	1.83	1.94	2.01	1.92	1.86	1.43*** #	1.42*** #	1.95	2.02	1.84	1.89	2.17	1.86	1.80*
Week 26	1.94	1.94	1.91	2.11	2.02	1.65** #	1.63*** #	1.60	1.83	1.89	1.75	1.89	1.66	1.53
Week R4	1.87	1.89	2.08	2.77	2.15	1.83	1.86	1.84	1.99	1.60	1.75	1.84	1.63	1.50
Clinical chemistry (main study animals)														
Alkaline phosphatase (U/L)														
Week 13	70	74	77	77	69	85**	107*** ##	37	39	37	42	43	56*** ##	87*** ##
Week 26	62	65	65	78*	62	76*	98*** ##	26	30	25	34**	36*** #	42*** ##	72*** ##
Week R4	54	58	74	56	55	58#	60	27	24	26	26	24	32	39*** ##
Triglycerides (mmol/L)														
Week 13	0.63	0.66	0.64	1.01**	0.67	0.52	0.36*** #	0.48	0.54	0.56	0.62*	0.46	0.53	0.60
Week 26	0.88	0.85	0.82	1.20	1.05	0.67	0.45*** ##	0.71	0.86	0.81	1.01*	0.83	0.68	0.66*** ##
Week R4	1.30	1.20	1.18	1.18	1.40	0.87*	0.66*** ##	1.29	0.78	0.75	0.83	1.10	0.75	0.60*
Urea (mmol/L)														
Week 13	5.35	5.34	5.34	5.42	5.27	5.08	5.46	6.60	5.98	6.32	5.83*	6.14	6.39	5.40**
Week 26	5.04	5.00	5.45	5.43	5.32	5.53	5.27	6.02	5.49	5.84	5.65	5.87	5.12*** #	5.15**
Week R4	5.22	4.71	4.68	4.71	4.30*	4.53*	4.55*	5.00	5.99	5.93	5.25	6.05**	6.42**	6.00**
Creatinine (µmol/L)														
Week 13	35	34	32*	32*	31*** #	30**	31**	43	44	42	41	40* #	40*	36*** ##
Week 26	40	39	38	39	40	36	37	43	42	45	39	42	37*** ##	36**
Week R4	36	33	33	30**	30*	33*	31*	39	44	41	40	42	42	39

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main Recovery	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10
Phosphorus (mmol/L)														
Week 13	1.56	1.58	1.65	1.75**	1.70**#	1.77**#	1.79**	1.48	1.43	1.42	1.57	1.67**##	1.73**##	2.06**##
Week 26	1.52	1.54	1.54	1.74**	1.65**#	1.75**##	1.76**	1.32	1.37	1.38	1.39	1.45	1.46	1.65**##
Week R4	1.46	1.42	1.49	1.60*	1.75**##	1.83**##	1.98**##	1.40	1.27	1.24	1.28	1.42	1.29	1.45##
Potassium (mmol/L)														
Week 13	4.6	4.6	4.7	4.5	4.5	4.7	4.6	3.9	3.8	3.8	3.7	4.2#	4.3*##	4.4**##
Week 26	4.7	4.8	4.8	4.7	4.8	4.9	5.1*#	3.8	3.7	3.7	3.8	4.1*#	4.1*#	4.3*
Week R4	5.3	4.5*	4.3**	4.4**	4.4*	4.6*#	4.2**#	3.9	3.7	3.8	3.8	3.9	3.9	3.9
Urinalysis (main study animals)														
Volume (mL)														
Week 13	6.6	7.3	6.3	7.4	5.9	6.2	8.8**	3.7	3.5	4.1	4.5	4.5	6.0**##	5.5**
Week 26	7.7	8.4	7.6	9.6*	8.3	7.8	9.0	3.8	3.9	4.1	5.6**	5.4*#	4.7*	5.4**
Week R4	8.0	9.0	8.6	7.7	8.4	7.0	6.6	3.6	4.1	3.9	4.1	3.6	4.2	2.0*##
Sodium (mmol)														
Week 13	0.494	0.654*	0.786**	1.207**	0.497#	0.592	1.354**	0.280	0.296	0.404	0.527**	0.357	0.497**	0.773**##
Week 26	0.453	0.697*	0.785**	1.595**	0.672*	0.748**	1.358**#	0.287	0.326	0.382	0.722**	0.354	0.325	0.856**
Week R4	0.601	0.658	0.550	0.542	0.521	0.432	0.568	0.302	0.267	0.259	0.249	0.216	0.342	0.166*
Chloride (mmol)														
Week 13	0.350	0.449	0.406	0.432	0.343	0.285	0.510*	0.205	0.219	0.256	0.320**	0.295	0.401**##	0.512**#
Week 26	0.300	0.326	0.286	0.510**	0.316	0.235	0.421*	0.174	0.211	0.226	0.395**	0.267	0.255	0.440**
Week R4	0.390	0.381	0.337	0.322	0.344	0.301	0.265	0.196	0.217	0.166	0.175	0.134	0.192	0.101*

[illegible]

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main Recovery	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10
Absolute weight (g)	1.470	1.458	1.466	1.430	1.508	1.387	1.289** ##	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.240	0.232	0.242	0.225	0.241	0.250	0.258##	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Epididymis, recovery animals														
Absolute weight (g)	1.559	1.511	1.536	1.576	1.518	1.452	1.380*#	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.237	0.225	0.224	0.233	0.248	0.238	0.250	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Heart, main study animals														
Absolute weight (g)	1.699	1.780	1.762	1.748	1.705	1.571##	1.405** ##	1.094	1.137	1.133	1.151	1.117	1.056#	0.906** ##
% of body weight	0.276	0.282	0.288	0.274	0.272	0.281	0.280	0.339	0.336	0.324	0.352	0.324	0.323	0.326##
Heart, recovery animals														
Absolute weight (g)	1.792	1.826	1.988	1.956	1.803	1.750#	1.644##	1.174	1.224	1.160	1.205	1.152	1.210	1.113
% of body weight	0.273	0.271	0.290	0.287	0.293	0.287	0.298	0.342	0.347	0.339	0.339	0.334	0.347	0.360
Kidneys, main study animals														
Absolute weight (g)	3.81	3.91	4.08	4.62**	3.91	3.80	3.99##	2.02	2.18	2.27**	2.43**	2.29**	2.38**	2.33**

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main Recovery	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10
% of body weight	0.619	0.622	0.666*	0.723**	0.625	0.679**	0.797** ##	0.626	0.642	0.650	0.743**	0.664	0.730** ##	0.842** ##
Kidneys, recovery animals														
Absolute weight (g)	3.88	3.93	4.01	4.27	3.90	3.66	3.41*##	2.23	2.20	2.18	2.32	2.11	2.19	2.07
% of body weight	0.588	0.583	0.584	0.626	0.633	0.596	0.621	0.651	0.625	0.637	0.647	0.611	0.630	0.670
Liver, main study animals														
Absolute weight (g)	24.16	24.46	22.62	25.36	23.52	21.09*	18.95** ##	11.83	12.54	12.75	13.35*	13.01	13.19*	11.59##
% of body weight	3.90	3.89	3.69	3.94	3.71	3.78	3.75	3.66	3.70	3.64	4.08**	3.77	4.04** #	4.16**
Liver, recovery animals														
Absolute weight (g)	25.89	24.46	23.38	24.96	25.42	20.68**	19.03** ##	12.40	12.53	11.58	12.17	12.47	12.28	11.27
% of body weight	3.93	3.62	3.41	3.63	4.10#	3.36*	3.45*	3.60	3.55	3.41	3.41	3.61	3.52	3.64
Ovaries, main study animals														
Absolute weight (g)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.092	0.110	0.087	0.107	0.113	0.090	0.060** ##
% of body weight	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.0280	0.0335	0.0250	0.0334	0.0335	0.0275	0.0216

[illegible]

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main Recovery	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10
Absolute weight (g)	1.408	1.290	1.410	1.367	1.350	1.240	1.313	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.217	0.193	0.206	0.206	0.222	0.202	0.236	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Salivary glands, main study animals														
Absolute weight (g)	0.713	0.740	0.746	0.733	0.746	0.652*#	0.566**	0.445	0.452	0.429	0.418	0.475	0.429	0.333**
% of body weight	0.116	0.118	0.122	0.115	0.119	0.117	0.112	0.138	0.134	0.123*	0.128*	0.138	0.131	0.120**
Salivary glands, recovery animals														
Absolute weight (g)	0.764	0.720	0.725	0.755	0.719	0.657*	0.641**	0.448	0.451	0.466	0.459	0.475	0.460	0.431
% of body weight	0.116	0.107	0.106	0.111	0.117	0.107	0.117	0.131	0.128	0.136	0.129	0.137	0.132	0.139
Seminal vesicles, main study animals														
Absolute weight (g)	1.741	1.901	1.946	1.907	1.724	1.454*#	1.366**	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.283	0.304	0.319	0.302	0.277	0.264#	0.273	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Seminal vesicles, recovery animals														
Absolute weight (g)	1.982	1.637	1.987	1.830	1.961	1.826	1.802	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main Recovery	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	F: 20 F: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10	M: 20 M: 10
% of body weight	0.301	0.242	0.291	0.272	0.319#	0.301	0.327#	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Spleen, main study animals														
Absolute weight (g)	0.895	0.954	0.997	0.952	0.963	0.767** ##	0.723** ##	0.548	0.613	0.559	0.583	0.604	0.565	0.514#
% of body weight	0.145	0.152	0.161	0.149	0.153	0.137##	0.145	0.169	0.181	0.160	0.180	0.175	0.173	0.186
Spleen, recovery animals														
Absolute weight (g)	0.938	0.939	0.971	1.054	0.915	0.839	0.828#	0.612	0.622	0.552	0.607	0.591	0.578	0.572
% of body weight	0.141	0.140	0.142	0.154	0.149	0.138	0.148	0.179	0.176	0.163	0.171	0.171	0.165	0.184
Testes, main study animals														
Absolute weight (g)	3.83	3.81	3.84	3.64	3.91	3.71	3.61	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.626	0.607	0.636	0.573	0.625	0.672** #	0.722** ##	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Testes, recovery animals														
Absolute weight (g)	3.96	3.84	3.80	3.88	3.86	3.75	3.69*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
% of body weight	0.603	0.572	0.556	0.574	0.631#	0.615#	0.675*# #	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20	M: 20	M: 20	M: 20
Recovery	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	M: 10	M: 10	M: 10
Thymus, main study animals														
Absolute weight (g)	0.183	0.178	0.153	0.191	0.166	0.164	0.150*#	0.143	0.159	0.159	0.163	0.162	0.125#	0.127#
% of body weight	0.0296	0.0285	0.0250	0.0297	0.0265	0.0294	0.0298	0.0442	0.0472	0.0456	0.0497	0.0466	0.0384	0.0459
Thymus, recovery animals														
Absolute weight (g)	0.155	0.151	0.162	0.142	0.137	0.141	0.144	0.148	0.127	0.118	0.168	0.149	0.140	0.151
% of body weight	0.0236	0.0225	0.0238	0.0208	0.0226	0.0231	0.0258	0.0416	0.0359	0.0347	0.0477	0.0434	0.0404	0.0485
Macropathology^e														
Duodenum, main study animals (no. examined)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	23 ^d	20	20	20
Distension, no abnormal content	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
General appearance, main study (no. examined)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	23 ^d	20	20	20
Animal thin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 (1)
Uterus (no. examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	20	20	20	23 ^d	20	20	20
Thin uterus	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	5 (1)

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60	0 (Water control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	0 (SNAC control)	6	20	60
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	90	300	900	90	300	900	0	90	300	900	90	300	900
Initial Number of Animals														
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20	M: 20	M: 20	M: 20
Recovery	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	M: 10	M: 10	M: 10
Histopathology ^{ef}														
Duodenum, main study animals (number examined)	20	0	0	20	20	20	20	20	1	0	21 ^d	20	20	20
Hypertrophy of Brunner's glands														
Minimal	0	0	0	0	0	18	18	0	0	0	0	1	8	15 (2)
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Total	0	0	0	0	0	18	18	0	0	0	0	1	8	18 (2)
Uterus, main study animals (number examined)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	20	1	0	23 ^d	0	0	20
General atrophy														
Slight	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	3
Moderate	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	1
Total	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	4
Liver, main study animals (no. examined)	20	2	0	18	1	0	20	20	19	20	23 ^d	20	20	20
Hepatocyte hypertrophy, centrilobular														
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	4	4

* p<0.05 ** p<0.01 (For comparisons with the water control group); # p<0.05 ## p<0.01 (For comparisons of semaglutide treated groups vs. respective SNAC control groups)

- a: Death probably related to administration of SNAC, i.e. unrelated to semaglutide
- b: Death due to trauma sustained during dosing, i.e. unrelated to semaglutide
- c: Death possibly related to semaglutide as the poor condition of the animals may have been secondary to reduced food intake and persistent reduction of bodyweight and, hence, may possibly be due to exaggerated pharmacological effects of semaglutide.
- d: Including 3 recovery animals; Brunner's glands not localised in 2 of these.
- e: Values in brackets () indicate incidence of findings in premature decedents. To get the total incidence, both values should be combined.
- f: All histopathological changes were reversible, data not shown.

2.6.7.7.C カニクイザルにおける 6 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 (209153)		Study ID: 209153
Species: Cynomolgus monkey	Duration of Dosing: 6 weeks. Preceded by a 1 week dose escalation phase	Location in CTD: 4.2.3.2-A-5
Initial Age: 29 to 34 months	Duration of Postdose: 2 weeks	
Date of First Dose: 11 June 2009	Method of Administration: Oral (capsule)	
Nominal Dose Levels: 0, 0, 5.0 and 10.0 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) capsules with SNAC (semaglutide:SNAC ratio 1:15.67)	GLP Compliance: Yes
Parameters collected: Viability, clinical condition, body weight, neurobehavioral assessment, ophthalmoscopy, electrocardiography, blood pressure, haematology, clinical chemistry, urinalysis, toxicokinetics, antibody formation, organ weights, macropathology and histopathology		
Special Features: Semaglutide was administered with SNAC as an absorption enhancer. In addition to a placebo control group, receiving empty capsules, a SNAC control group was included to distinguish findings potentially caused by semaglutide from those potentially caused by SNAC. Generally, only findings considered related to semaglutide are described here.		
No Observed Adverse Effect Level: 10 mg/kg/day		
Brief conclusion: Administration of semaglutide caused body weight loss or low body weight gains. The effect upon bodyweight was reversible. In week 6, the heart rate and pulse rate of high dose males were slightly high compared with the SNAC controls. To a certain extent, this reflected a trend seen before treatment commenced. The changes in heart rate from pre-treatment values were approximately +10% and was therefore considered of no physiological relevance and of no toxicological concern. On day 2 at the target dose, reticulocyte counts were reduced in the semaglutide treated groups. However, a similar finding was not evident at week 6 and in the absence of any other changes of erythrocytic parameters, the transient reduction in reticulocytes was not considered adverse. Increased urea was seen in high dose females. Following the 2-week recovery period, urea concentrations were lower than that at the end of the treatment period, signifying that recovery had occurred. It is considered most likely that the increased urea was secondary to the effects of semaglutide on food consumption and body weight. Urinalysis revealed a slightly low chloride concentration which could possibly be related to semaglutide. At the end of the recovery period, chloride levels were still lower than expected in the males. Since there was no effect upon kidney weight and there were no associated histopathological findings, this change in the urine was considered non-adverse. A reduction of thymus weight, with correlating involution/atrophy, was observed both after 6 weeks of treatment and after the recovery period. Since minimal changes were also seen in 2 SNAC control animals, and in view of the low incidence and the low severity, the relation to treatment with semaglutide is uncertain and the finding may represent a stress-related response. Minimal glandular dilation and eosinophilic cytoplasm were observed in the Brunner's glands of duodenum. Similar findings were not present after the 2-week recovery period. Due to the low incidence and severity of the findings, and the anatomical/biological variation in the microscopic appearance of the Brunner's glands, the relation to treatment with semaglutide is uncertain, although Brunner's glands show high GLP-1 receptor expression. Since the findings in the Brunner's glands were not associated with inflammation or cellular damage neither in the Brunner's glands nor in the intestinal mucosa, the findings were not considered adverse. In the absence of any adverse effects, the NOAEL was established at 10 mg/kg/day.		

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Placebo control)	0 (SNAC control)	5.0	10.0	0 (Placebo control)	0 (SNAC control)	5.0	10.0
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	156.7	78.35	156.7	0	156.7	78.35	156.7
Initial Number of Animals								
Main	M: 4	M: 4	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Recovery	M: 0	M: 2	M: 2	M: 2	F: 0	F: 2	F: 2	F: 2
Toxicokinetics (AUC _{0-24h} (nmol*h/L))								
Day 1	N/A	N/A	979	1540	N/A	N/A	607	3580
Day 42	N/A	N/A	1180	2870	N/A	N/A	445	5150
<u>Noteworthy Findings</u>								
Body weight gain (main and recovery animals)^a								
Dose escalation phase, Day -7 to -1 (kg)	0.08	0.09	0.01#	-0.02*##	0.08	0.05	-0.09**##	-0.08**##
Main study phase, Day 1 to 43 (kg)	0.07	0.16	0.08	0.09	0.09	0.12	0.06	-0.08**##
Entire dosing period, Day -7 to 43 (kg)	0.19	0.26	0.07*##	0.04*##	0.14	0.15	-0.02*#	-0.17**##
Electrocardiography and blood pressure								
Heart rate (beats/min)								
Pre-treatment	236	223	222	248	245	229	254	205
Week 6, 2 h post dose	250	221	229	270##	244	221	261	240
Week 6, 24 h post dose	223	224	231	274*##	237	226	263	248
Pulse rate (beats/min)								
Pre-treatment	235	227	218	245	245	227	265	210
Week 6, 2 h post dose	243	218	227	277##	253	222	258	242
Haematology								
Reticulocytes (%)								
Pre-treatment	1.22	1.04	1.16	0.94	0.81	0.90	0.78	0.79
Day 2	1.39	1.19	0.50*##	0.47*##	1.08	0.89	0.67	0.63*
Week 6	0.92	0.73	0.84	0.74	0.75	0.94	1.10	0.84
Clinical chemistry								
Urea (mmol/L)								
Pre-treatment	6.20	9.72	7.60	5.78	5.90	6.55	6.81	6.44
Day 2	4.46	5.91*	4.90	5.13	3.94	4.05	4.92	4.13

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Placebo control)	0 (SNAC control)	5.0	10.0	0 (Placebo control)	0 (SNAC control)	5.0	10.0
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	156.7	78.35	156.7	0	156.7	78.35	156.7
Initial Number of Animals								
Main	M: 4	M: 4	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Recovery	M: 0	M: 2	M: 2	M: 2	F: 0	F: 2	F: 2	F: 2
Week 6	7.13	9.33	8.46	7.54	5.95	6.03	6.50	8.82**##
Urinalysis								
Chloride ^b (mmol/L)								
Pre-treatment	74.3	67.7	82.3	81.7	16.0	20.7	23.5	21.2
Week 6	56.5	46.7	26.8*	27.3*	60.5	60.3	62.7	33.0
Organ Weights (main study animals)								
Thymus ^c								
Absolute weight (g)	3.25	2.84	1.56	2.69	2.86	2.20	1.85	1.63
% of body weight	0.1265	0.1076	0.0637	0.1126	0.1101	0.0852	0.0735	0.0742
Macropathology								
Thymus, main study (no. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Small	0	0	3	1	1	2	2	3
Thymus, recovery study (no. examined)	-	2	2	2	-	2	2	2
Small	-	0	0	2	-	1	1	1
Histopathology								
Duodenum, main study animals (no. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Brunner's gland – dilatation/eosinophilic cytoplasm, minimal	0	0	1	1	0	0	0	1

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Placebo control)	0 (SNAC control)	5.0	10.0	0 (Placebo control)	0 (SNAC control)	5.0	10.0
Vehicle, dose of SNAC (mg/kg/day)	0	156.7	78.35	156.7	0	156.7	78.35	156.7
Initial Number of Animals								
Main	M: 4	M: 4	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Recovery	M: 0	M: 2	M: 2	M: 2	F: 0	F: 2	F: 2	F: 2
Thymus, main study animals (no. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Involution/atrophy – cortex, minimal	0	0	0	1	0	1	1	1
Involution/atrophy – cortex, slight	0	0	0	0	0	0	1	1
Involution/atrophy – cortex, total	0	0	0	1	0	1	2	2
Thymus, recovery animals (no. examined)	0	2	2	2	0	2	2	2
Involution/atrophy – cortex, minimal	-	0	1	2	-	1	1	0

* p<0.05 ** p<0.01 (For comparisons with the water control group); # p<0.05 ## p<0.01 (For comparisons of semaglutide treated group vs. the SNAC control group)

a: During the recovery period, animals previously treated with semaglutide generally exhibited a marked body weight gain demonstrating reversibility of the effects of semaglutide on body weight. Data not shown to avoid mean of two animals.

b: At the end of the recovery period, urinary chloride concentrations were still lower than expected in the males. Data not shown to avoid mean of two animals.

c: Thymus weights for males previously receiving the high dose and for one female previously given the low dose were still slightly low at the end of the recovery period

2.6.7.7.D カニクイザルにおける 17 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 (209428) Study ID: 209428

Species: Cynomolgus monkey	Duration of Dosing: 17 weeks. Preceded by a 1 week dose escalation phase	Location in CTD: 4.2.3.2-A-6
Initial Age: 28 to 38 months	Duration of Postdose: 2 weeks	
Date of First Dose: 13 January 2010	Method of Administration: Oral (capsule)	
Nominal Dose Levels: 0, 0, 5, 20 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) capsules with *物質C (semaglutide: *物質C ratio 1:15.67)	GLP Compliance: Yes
Parameters collected: Viability, clinical condition, body weight, neurobehavioral assessment, ophthalmoscopy, electrocardiography, blood pressure, haematology, clinical chemistry, urinalysis, toxicokinetics, antibody formation, organ weights, macropathology and histopathology		
Special Features: Semaglutide was administered with *物質C as an absorption enhancer. In addition to a placebo control group, receiving empty capsules, a *物質C control group was included to distinguish findings potentially caused by semaglutide from those potentially caused by *物質C. Generally, only findings considered related to semaglutide are described here.		
No Observed Adverse Effect Level: 20 mg/kg/day		
Brief conclusion: Oral semaglutide was generally well tolerated with no treatment related mortality although 2 high dose females were reported to be thin from week 8 of the dosing period and onwards. Body weight loss or reduced body weight gain was noted in the semaglutide treated groups but the effect was reversible following cessation of treatment. On day 2 at the target dose, reticulocyte counts were reduced, however, a similar finding was not evident at week 17 and in the absence of any other changes of erythrocytic parameters, the reduction in reticulocytes was not considered adverse. Clinical chemistry revealed an increase in urea on day 2 of the main study period in the high dose group and also by the end of the dosing period in high dose males. Following the 2-week recovery period, urea concentrations were similar to control values. The urea increase was considered most likely to be secondary to the effects on food consumption and body weight. Further, on day 2 and in week 17, the high dose males had lower plasma glucose concentrations than the controls, but at the end of the 2-week recovery period, the glucose concentrations were higher, signifying that recovery had occurred. Decreased absolute weight of kidneys and the pituitary gland was observed mainly at the high dose level. However, body weight-relative weights were unaffected, indicating that these findings were secondary to the effect of semaglutide on body weight. A decrease in absolute mandibular salivary weight, which was accompanied by a trend towards slightly low body weight-relative weight, was observed in high dose males, *物質C control females, and low and high dose females. Due to this inconsistent pattern, the relationship to semaglutide is uncertain. However, as it was not associated with any histopathological changes, the finding was considered to be of no toxicological concern. A reduction of thymus weights was observed in the high dose females. Further, thymic involution/atrophy was observed both after 17 weeks of treatment and after the recovery period, both in semaglutide treated animals and in control animals. Consequently, the relation to treatment with semaglutide was uncertain and the finding may represent a stress-related effect secondary to the body weight effect and the dosing procedure and was thus considered of no toxicological significance. In the absence of any treatment related adverse effects, the NOAEL was established at the highest semaglutide dose level, 20 mg/kg/day.		

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Placebo control)	0 (*物質C control)	5	20	0 (Placebo control)	0 (*物質C control)	5	20
Vehicle, dose of *物質C (mg/kg/day)	0	300	75	300	0	300	75	300
Initial Number of Animals								
Main	M: 4	M: 4	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Recovery	M: 0	M: 2	M: 2	M: 2	F: 0	F: 2	F: 2	F: 2
Toxicokinetics (AUC _{0-24h} (nmol*h/L))								
Day 1	N/A	N/A	256	5280	N/A	N/A	627	3370
Day 119	N/A	N/A	95.3	3250	N/A	N/A	86.0	1910
<u>Noteworthy Findings</u>								
Died or euthanised/terminated prematurely	1 ^a	0	0	0	0	0	0	0
Clinical signs								
Thin	0	0	0	0	0	0	0	2
Body weight gain (main and recovery animals)								
Dose escalation phase, Day -7 to -1 (kg)	0.07	0.07	-0.02*	-0.06**	0.11	0.14	0.03**	-0.03**
Main study phase, Day 1 to 120 (kg)	0.33	0.47	0.34	0.13	0.35	0.23	0.43	0.02*
Haematology								
Reticulocytes (%)								
Pre-treatment	0.64	0.79	0.96	0.79	0.87	1.04	0.86	0.85
Day 2	1.02	1.11	0.90	0.53*	1.12	1.31	0.72*	0.48**
Week 17	1.02	1.14	1.23	1.04	1.20	1.43	1.24	0.92
Clinical chemistry								
Urea ^b (mmol/L)								
Pre-treatment	6.30	6.34	5.50	6.27	5.80	6.05	5.18	5.93
Day 2	4.61	5.28*	5.34	6.82*	5.30	5.24	5.13	7.14*
Week 17	5.52	6.57	5.82	8.27**	5.27	6.07	4.50	4.80

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Placebo control)	0 (*物質C control)	5	20	0 (Placebo control)	0 (*物質C control)	5	20
Vehicle, dose of *物質C mg/kg/day)	0	300	75	300	0	300	75	300
Initial Number of Animals								
Main	M: 4	M: 4	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Recovery	M: 0	M: 2	M: 2	M: 2	F: 0	F: 2	F: 2	F: 2
Glucose ^b (mmol/L)								
Pre-treatment	5.12	4.60	4.75	5.30	4.70	4.10	4.47	4.01
Day 2	4.10	4.56	4.05	3.31	4.62	4.55	4.18	4.62
Week 17	4.21	3.83	3.47	3.35*	4.70	4.14	4.90	4.28
Organ Weights (main study animals)								
Thymus ^c								
Absolute weight (g)	3.17	3.77	3.62	2.70	2.53	2.55	3.12	1.10*
% of body weight	0.116	0.146	0.142	0.116	0.096	0.098	0.120	0.049
Mandibular salivary gland								
Absolute weight (g)	1.90	1.87	1.75	1.40*	2.36	1.76**	1.73**	1.65**
% of body weight	0.0700	0.0714	0.0692	0.0596	0.0884	0.0704	0.0660	0.0741
Kidneys								
Absolute weight (g)	10.91	10.10	9.74	9.34*	8.95	9.64	8.78	8.22
% of body weight	0.401	0.389	0.389	0.396	0.336	0.379	0.335	0.367
Pituitary gland								
Absolute weight (g)	0.050	0.043	0.040	0.033*	0.048	0.043	0.049	0.044
% of body weight	0.0018	0.0016	0.0016	0.0014	0.0018	0.0017	0.0018	0.0020
Macropathology								
Thymus, main study (no. examined)	4	4	4	4	4	4	4	4
Small	0	0	0	2	2	1	0	4
Thymus, recovery study (no. examined)	-	2	2	2	-	2	2	2
Small	-	0	0	1	-	1	0	1

Semaglutide, nominal dose (mg/kg/day)	0 (Placebo control)	0 (*物質C control)	5	20	0 (Placebo control)	0 (*物質C control)	5	20
Vehicle, dose of *物質C (mg/kg/day)	0	300	75	300	0	300	75	300
Initial Number of Animals								
Main	M: 4	M: 4	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4
Recovery	M: 0	M: 2	M: 2	M: 2	F: 0	F: 2	F: 2	F: 2
Histopathology								
Thymus, main study animals (no. examined)	3	4	4	4	4	4	4	4
Involution/atrophy, minimal	0	1	0	1	1	1	1	2
Thymus, recovery animals (no. examined)	-	2	2	2	-	2	2	2
Involution/atrophy – cortex, minimal	-	0	0	0	-	0	0	1

a: Euthanised in the dose escalation phase of the study because of a fracture sustained accidentally to the right arm.

b: At the end of the recovery period, no difference in urea concentrations and glucose concentration for treated groups compared to control. Data not shown to avoid mean of two animals.

c: By the end of the recovery period, one male had low thymus weight, but there was an overall suggestion that recovery was occurring.

* p<0.05 ** p<0.01 for comparisons with Group 1

Subcutaneous pivotal repeat dose toxicity studies have been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.8 遺伝毒性試験 : *in vitro***Test article:** Oral semaglutide

The *in vitro* genotoxicity evaluation of semaglutide has been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.9 遺伝毒性試験 : *in vivo***Test article:** Oral semaglutide

The *in vitro* genotoxicity evaluation of semaglutide has been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.10 がん原性試験**Test article:** Oral semaglutide

The carcinogenicity evaluation of semaglutide has been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.11 生殖発生毒性試験 : 重要な試験以外の試験**Test article:** Oral semaglutide

The evaluation of the reproductive and developmental toxicity of semaglutide has been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.12 生殖発生毒性試験 : 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験**Test article:** Oral semaglutide

The evaluation of the reproductive and developmental toxicity of semaglutide has been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.13 生殖発生毒性試験 : 胚・胎児の発生に関する試験**Test article:** Oral semaglutide

The evaluation of the reproductive and developmental toxicity of semaglutide has been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.14 生殖発生毒性試験 : 出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験**Test article:** Oral semaglutide

The evaluation of the reproductive and developmental toxicity of semaglutide has been described in the Ozempic nonclinical registration file (M 1.13.1).

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験**Test article:** Oral semaglutide

The juvenile toxicity of semaglutide has been evaluated as part of the Ozempic nonclinical programme (M 1.13.1).

2.6.7.16 局所刺激性**Test article:** Oral semaglutide

Local tolerance assessment (gastrointestinal tract) was conducted as an integral part of the toxicology studies, see [2.6.7.6](#) and [2.6.7.7](#).

2.6.7.17 その他の毒性試験**Test article:** Oral semaglutide**2.6.7.17.A 免疫原性**

No antigenicity studies have been conducted with s.c. or oral semaglutide.

2.6.7.17.B 免疫毒性

No immunotoxicity studies have been conducted with s.c. or oral semaglutide.

2.6.7.17.C 依存性

No dependence studies have been conducted with s.c. or oral semaglutide.

2.6.7.17.D 代謝物

No toxicity studies with metabolites of semaglutide have been conducted.

2.6.7.17.E 不純物

Evaluation of impurities is included in M 2.6.6.8.6.

2.6.7.17.F 添加物

For qualification of the novel excipient SNAC, salcaprozate sodium, please refer to M 2.6.7.18 Appendix.

リベルサス錠 3mg
リベルサス錠 7mg
リベルサス錠 14mg

2.6.7.18 付録
サルカプロザートナトリウム
毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

	ページ
目次	2
2.6.7.18.1 毒性試験の一覧表	4
2.6.7.18.2 トキシコキネティクス試験の一覧表	14
2.6.7.18.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧	17
2.6.7.18.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧	24
2.6.7.18.5 単回投与毒性試験	27
2.6.7.18.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験	29
2.6.7.18.7 反復投与毒性試験：重要な試験	31
2.6.7.18.7.A マウスにおける 13 週間経口投与毒性試験（A16705）	31
2.6.7.18.7.B ラットにおける 2 週間経口投与毒性試験（製造工程 B 及び C の比較）（WIL-315004）	35
2.6.7.18.7.C ラットにおける 13 週間経口投与毒性試験（WIL-315003）	37
2.6.7.18.7.D ラットにおける 13 週間経口投与毒性試験（A62807）	42
2.6.7.18.7.E ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（補足報告書） （JLY0278）	46
2.6.7.18.7.F ラットにおける 52 週間経口投与毒性試験（26 週間中間群を含む）（BNA00004）	53
2.6.7.18.7.G アカゲザルにおける 2 週間経口投与毒性試験（3007-97）	59
2.6.7.18.7.H カニクイザルにおける 4 週間経口投与毒性試験（694-5 Part 1 及び Part 2）	61
2.6.7.18.7.I アカゲザルにおける 13 週間経口投与毒性試験（3060-98）	64
2.6.7.18.7.J カニクイザルにおける 16 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（JLY0387）	66
2.6.7.18.7.K アカゲザルにおける 39 週間経口投与毒性試験（BNA00003）	69
2.6.7.18.8 遺伝毒性試験：In vitro	71
2.6.7.18.8.A 4 系統のヒスチジン要求株 <i>Salmonella typhimurium</i> 及び 1 系統のトリプトファン要求 株 <i>Escherichia coli</i> を用いた復帰突然変異試験（0725-2140）	71
2.6.7.18.8.B 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験（0545-3300）	72
2.6.7.18.9 遺伝毒性試験：In vivo	73
2.6.7.18.9.A SNAC 投与マウスにおける骨髄小核試験（0374-1521）	73
2.6.7.18.10 がん原性試験	74
2.6.7.18.10.A rasH2 マウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験（JLY0436）	74
2.6.7.18.10.B Sprague Dawley ラットにおける 104 週間経口投与がん原性試験（JLY0366）	76
2.6.7.18.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験	79
2.6.7.18.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	81

2.6.7.18.12.A	ラットにおける受胎能及び初期胚発生に関する試験 (805-003)	81
2.6.7.18.13	生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験	84
2.6.7.18.13.A	ラットにおける胚・胎児の発生に関する試験 (805-002)	84
2.6.7.18.13.B	ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験 (805-001)	86
2.6.7.18.14	生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験	88
2.6.7.18.14.A	ラットにおける胚・胎児の発生ならびに出生前及び出生後の発生に関する試験 (805-004)	88
2.6.7.18.15	幼若動物を用いた試験	91
2.6.7.18.16	局所刺激性	91
2.6.7.18.17	その他の毒性試験	92
2.6.7.18.17.A	免疫原性	92
2.6.7.18.17.B	免疫毒性	92
2.6.7.18.17.C	依存性	92
2.6.7.18.17.D	代謝物	92
2.6.7.18.17.E	不純物	92
2.6.7.18.17.F	添加物	93
2.6.7.18.17.G	メカニズム試験	93
2.6.7.18.17.H	マウスにおける単回投与忍容性及びトキシコキネティクス試験 (JLY0557)	96
2.6.7.18.17.I	ラットにおけるテレメトリー及びプレチモグラフィ併合試験 (0NNC11)	98
2.6.7.18.17.J	ラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0412)	100
2.6.7.18.17.K	ラットにおける静脈内投与検討試験 (JLY0413)	106
2.6.7.18.17.L	ラットにおける単回経口投与及びグルコース投与併用検討試験 (JLY0468)	108
2.6.7.18.17.M	異なる絶食条件ラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0517)	114
2.6.7.18.17.N	ラットにおける 13 週間経口投与探索毒性試験 (JLY0532)	119
2.6.7.18.17.O	ラット心臓組織における ATP レベルの評価に関する検討試験 (140701)	123
2.6.7.18.17.P	ラット心臓及び肝臓組織における ATP レベルの評価に関する検討試験 (141102)	125

2.6.7.18.1 毒性試験の一覧表

**Test article: salcaprozate sodium
(SNAC)**

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Single Dose Toxicity	Mouse/ICR	Oral (gavage)	Single dose	0 1000 1500 2000	No	■■■■■ ■■■■■	EMIS/R96007	209239	4.2.3.1-B-1
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Single dose	0 1000 1500 2000 3000	No	■■■■■ ■■■■■	EMIS/R96009	209238	4.2.3.1-B-2
Repeat Dose Toxicity	Mouse/rasH2 wild type	Oral (gavage)	6 weeks	0 150 500 750 1000	Yes	■■■■■ ■■■■■	JLY0382	212159	4.2.3.2-B-1
	Mouse/CD-1	Oral (gavage)	13 weeks	0 150 500 1500/1000	Yes	■■■■■ ■■■■■	A16705	209247	4.2.3.2-B-2
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	14 days	0 1000 1667 2334 3000	Yes	■■■■■ ■■■■■ ■■■	WIL-315002	211245	4.2.3.2-B-3

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	14 days	0 Process B 500 750 1000 Process C 500 750 1000	Yes	██████████ ██████████ ████	WIL-315004	209241	4.2.3.2-B-4
	Rat/Wistar	Oral (gavage)	13 weeks	0 100 500 1000	Yes	██████████ ██████████	A62807	209242	4.2.3.2-B-5
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	13 weeks	0 2000	Yes	██████████ ██████████ ████	WIL-315003	211246	4.2.3.2-B-6
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	26 weeks	0 90 300 900	Yes	██████████ ██████████	JLY0278	210196	4.2.3.2-B-7
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	52 weeks	0 150 + █████ ██████████ 250 500 750 + █████ ██████████ 900	Yes	██████████ ██████████	BNA00004	209243	4.2.3.2-B-8

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
	Rhesus monkey	Oral (gavage)	14 days	0 1000 1000+ 1500 1500+ 2500 2500+	Yes	  	3007-97	209244	4.2.3.2-B-9
	Cynomolgus monkey	Oral (gavage)	28 days	Part 1 0 800+ 1200+ 1800+	Yes	  	694-95 Part 1	211248	4.2.3.2-B-10
				Part 2 0 1800			694-95 Part 2	211248	4.2.3.2-B-11
	Rhesus monkey	Oral (gavage)	13 weeks	0 1800	Yes	  	3060-98	209245	4.2.3.2-B-12
	Cynomolgus monkey	Oral (tablet)	16 weeks	300 mg/animal/day	Yes	 	JLY0387	212246	4.2.3.2-B-13

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Genotoxicity	Rhesus monkey	Oral (gavage)	39 weeks	0 150 +   200 300 500 +   600	Yes	 	BNA00003	209258	4.2.3.2-B-14
	Salmonella typhimurium and Escherichia coli	In vitro assay	Not applicable	With and without activation Up to 5000 µg/plate	Yes	  	0725-2140	209248	4.2.3.3.1-B-1
	Cultured human Peripheral blood lymphocytes	In vitro assay	Not applicable	With and without activation Up to 5000 µg/ml	Yes	  	0545-3300	209249	4.2.3.3.1-B-2
	Induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow cells	In vivo assay	Single dose	200 500 1000	Yes	  	0374-1521	209250	4.2.3.3.2-B-1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Carcinogenicity	Mouse/tg rasH2	Oral gavage	26-weeks	0	Yes		JLY0436	213067	4.2.3.4.2-B-1
				30					
				100					
				300					
Reproductive and Developmental Toxicity	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	104 weeks (preliminary data after 52 weeks included)	0	Yes		JLY0366	211519	4.2.3.4.1-B-1
				75					
				200					
				500					
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	11 days, i.e., gestational days 7-17	0	Yes		805-002P	209252	4.2.3.5.2-B-1
				1000					
				2000					
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Males: up to 80 days Females: up to 37 days	0	Yes		805-003	209251	4.2.3.5.1-B-1
				1000					
									
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	11 days, i.e., gestational days 7-17	0	Yes		805-002	209253	4.2.3.5.2-B-2
				1000					
									

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Local Tolerance (gastrointestinal tolerance) Other Toxicity Studies Mechanistic studies In vitro Assessment of mitochondrial effects	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	F0 Females: 37 days, i.e., gestational day 7 to lactation day 20	0 1000	Yes		805-004	209254	4.2.3.5.3-B-1
	Rabbit/New Zealand White	Oral (stomach tube)	13 days, i.e., gestational days 6-18	0 1000 1500 2000 2500 3000	Yes		805-001P	209255	4.2.3.5.2-B-3
	Rabbit/New Zealand White	Oral (stomach tube)	13 days, i.e., gestational days 6-18	0 1000	Yes		805-001	209256	4.2.3.5.2-B-4
	Dog/Beagle	Oral (gavage and tablet)	Single dose	0 300 mg/animal	No		JLY0558	214326	4.2.3.6-B-1
	Isolated rat mitochondria and submitochondrial particles	<i>In vitro</i>	Not applicable	SNAC, E494 and E506; 0-30000 µM	No		NN-2013-001	213327	4.2.3.7.3-B-1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Effect on cellular respiration	Mouse myoblast (C2C12), mouse pre-adipocyte (3T3-L1), human endometrial (HEC-1B), human astrocyte (LN319) cell line and rat peripheral blood mononuclear cells (PBMC).	<i>In vitro</i>	Not applicable	SNAC: 0-5000 µM	No	Novo Nordisk	██████140919	-	4.2.3.7.3-B-2
Effect on cellular respiration	Mouse myoblast (C2C12) cell line	<i>In vitro</i>	Not applicable	SNAC and SNAC metabolites (E494, E506; E1245, E1246 and E1247): 0-10000 µM	No	Novo Nordisk	██████140926	-	4.2.3.7.3-B-3
Effect on cellular respiration	Cryopreserved hepatocytes (mouse, rat, monkey, human) Freshly isolated hepatocytes (rat)	<i>In vitro</i>	Not applicable	SNAC: 0-10000 µM	No	Novo Nordisk	██████140912	-	4.2.3.7.3-B-4
Effect on cellular respiration	Mouse myoblast (C2C12) cell line	N/A	Not applicable	SNAC: 0-4000 µM HSA: 0-1%	No	Novo Nordisk	██████141003	-	4.2.3.7.3-B-5

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Effect on cellular respiration	Mouse myoblast (C2C12) cell line	N/A	Not applicable	SNAC: 0-4000 µM	No	NN	██████141010	-	4.2.3.7.3-B-6
<i>In vivo</i> Tolerability and TK	Mouse/CD-1	Oral gavage	Single dose	0 150 500 1000	No	████████ ████████	JLY0557	214311	4.2.3.7.3-B-7
Mechanistic respiratory and cardiovascular study	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Single dose and 8 days repeat dosing	0 (control) 900 1500	No	██████ ████████ ████████ ██████	0NNC11	212471	4.2.3.7.3-B-8
Investigative study	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Single dose	0 (control) 900 1500 0 (sodium salicylate comparator 800 mg/kg)	Yes	████████ ████████	JLY0412	212392	4.2.3.7.3-B-9
Investigative Study	Rat/Sprague Dawley	Intravenous (bolus and infusion)	Single dose	200	No	████████ ████████	JLY0413	212434	4.2.3.7.3-B-10

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Investigative study	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Single dose	0 (with saline infusion) 0 (with glucose infusion) 1500 (with saline infusion) 1500 (with glucose infusion) 1500 (TK)	No	■■■■■ ■■■■■	JLY0468	213299	4.2.3.7.3-B-11
Investigative study	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Single dose	0 75 200 500 900 1500	No	■■■■■ ■■■■■	JLY0517	214112	4.2.3.7.3-B-12
Investigative study	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	13 weeks	0 75 200 500	No	■■■■■ ■■■■■	JLY0532	214214	4.2.3.7.3-B-13
Effect on ATP tissue concentration	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Single dose	0 1750	No	Novo Nordisk	■■■■■ 140701	-	4.2.3.7.3-B-14

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Nominal Dose ^a (mg/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Effect on ATP tissue concentration	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	Single dose	0 75 200 500 900 1750	No	Novo Nordisk	 141102	-	4.2.3.7.3-B-15
<i>Other studies</i>									
Immunotoxicity study	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	28 days	0 75 200 500	Yes	 	523561	212329	4.2.3.7.2-B-1

a: Nominal dose in mg/kg/day, once-daily, unless otherwise stated

DRF Dose Range Finding, N/A not applicable, - no NN reference number as studies was conducted at Novo Nordisk

2.6.7.18.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: SNAC

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Repeat dose Toxicity 13-week oral (gavage) toxicity study	Mouse/CD-1	Oral (gavage)	150 500 1500/1000	Yes (OECD)	A16705	209247	4.2.3.2-B-2
13-week oral toxicity (gavage) study followed by a 4-week recovery period	Rat/Wistar	Oral (gavage)	100 500 1000	Yes (OECD)	A62807	209242	4.2.3.2-B-5
26-week oral toxicity study by oral gavage followed by a 4-week recovery period	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	300 900 300 + 20 semaglutide 900 + 60 semaglutide	Yes (OECD)	JLY0278	210196	4.2.3.2-B-7
12-month oral toxicity (gavage) study with 6-month interim sacrifice	Rats/Sprague Dawley	Oral (gavage)	150 +  250 500 750 +  900	No	BNA00004 (TK report 211504)	209243	4.2.3.2-B-8

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
14-day oral toxicity (gavage) study	Rhesus monkey	Oral (gavage)	0 1000 1000+  1500 1500+  2500 2500+ 	No	3007-97 (TK report 215104)	209244	4.2.3.2-B-9
9-month oral toxicity (gavage) study	Rhesus monkey	Oral (gavage)	150 +  200 300 500 +  600	No	BNA00003 (TK report 211503)	209258	4.2.3.2-B-13
Reproductive and Developmental Toxicity DRF oral (stomach tube) developmental toxicity	Rabbit	Oral (stomach tube)	1000 1000+  unit  2000 2000+  unit 	No	805-001P (TK report 215066)	209255	4.2.3.5.2-B-3

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg/day)	GLP Compliance	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Other Toxicity Studies <i>Mechanistic studies</i> <i>In vivo</i> Single dose oral (gavage) tolerability study Single intravenous dose investigative study Single dose oral (gavage) investigative study Single dose oral (gavage) investigative study	Mouse/CD-1	Oral (gavage)	150 500 1000	No	JLY0557	214311	4.2.3.7.3-B-7
	Rat/Sprague Dawley	Intravenous (bolus and infusion)	200	No	JLY0413	212434	4.2.3.7.3-B-10
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	1500	No	JLY0468	213299	4.2.3.7.3-B-11
	Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	75 200 500 900 1500	No	JLY0517	214112	4.2.3.7.3-B-12

2.6.7.18.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: SNAC

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)						AUC (h×ng/ml)					
						Day 1		Day 41		Day 90		Day 1		Day 41		Day 90	
						M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Repeat dose Toxicity	Mice / CD-1	Oral	12M+12F (n=3)	A16705/ 209247	150	462	431	719	836	418	1040	1630	1320	1820	1710	1810	2250
					500	2050	2310	3140	1710	2720	1720	5110	11600	8450	4770	7240	8980
					1500*	2770	4340					14500	20800				

Additional information:

*Treatment with 1500 mg/kg stopped after day 2, restarted with 100 mg/kg from day 5 onwards, stopped on day 9

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)				AUC (h×ng/ml)			
						Day 1		Week 13		Day 1		Week 13	
						F	M	F	M	F	M	F	M
Repeat dose Toxicity	Rats / Wistar	Oral	5M+5F (n=2)	A62807/ 209242	100	1370	1530	3530	1030	4990	5460	8020	2560
					500	7990	4830	6770	3880	22500	25500	38800	18500
					1000	41400	15000	29100	5800	93100	65200	108000	44400

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)				AUC _{0-24hr} (h×ng/ml)			
						Week 1		Week 26		Week 1		Week 26	
						F	M	F	M	F	M	F	M
Repeat dose Toxicity	Rats/ Sprague Dawley	Oral	10M+10F (n=4)	JLY0278/ 210196	300	1800	1230	1670	1500	6810	5140	14300	8970
					900	2420	6210	7420	3250	20200	23900	42000	18800
					300*	754	693	906	495	5540	7490	15300	9440
					900**	229	434	3740	1390	2890	5010	33200	11700

Additional information:

*Dosed together with 20 mg/kg/day semaglutide

** Dosed together with 60 mg/kg/day semaglutide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)				C _{max} (ng/ml)			
						Day 1		Day 91		Day 273		Day 364	
						F	M	F	M	F	M	F	M
Repeat dose Toxicity	Rats / Sprague Dawley	Oral	8M+8F (n=3)	211504*	150**	3970	3050	20200	8190	6510	14900	19800	9550
					250	8010	6810	29600	13600	19600	15300	8070	28900
					500	28900	22000	171000	66700	144000	243000	131000	177000
					750**	72300	82800	54900	90100	193000	273000	57600	341000
					900	204000	143000	191000	90000	288000	243000	33800	229000

Additional information:* TK report 211504 based on data from [BNA00004/209243](#)

** Dosed together with ■ mg/kg/day ■

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	AUC _{0-4h} (h×ng/ml)				AUC _{0-4h} (h×ng/ml)			
						Day 1		Day 90		Day 273		Day 364	
						F	M	F	M	F	M	F	M
Repeat dose Toxicity	Rats / Sprague Dawley	Oral	8M+8F (n=3)	211504*	150**	2490	1540	7230	4150	2960	4390	6100	3790
					250	8170	3230	12700	7150	6110	5780	4190	12100
					500	21500	11300	34600	31900	39200	70900	30500	51600
					750**	28500	40900	19300	31700	44100	83700	23300	77000
					900	88800	42300	73000	27500	88200	46700	16500	47400

Additional information:* TK report 211504 based on data from [BNA00004](#)/209243

** Dosed together with ■ mg/kg/day ■

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)				AUC (h×ng/ml)			
						Day 1		Day 14		Day 1		Day 14	
						M	F	M	F	M	F	M	F
Repeat dose Toxicity	Monkey/Rhesus	Oral	3M+3F (n=3)	215104*	1000**	352000	66300	157000	80600	602000	161000	183000	191000
					2500**	373000	397000	87800	108000	386000	573000	394000	341000

Additional information:*TK report 215104 based on data from [3007-97](#)/209244

** Dosed together with ■ mg/kg/day ■

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)				C _{max} (ng/ml)	
						Day 1		Day 90		Day 180	
						F	M	F	M	F	M
Repeat dose Toxicity	Monkey/Rhesus	Oral		211503*	150**	52300	26500	13100	9000	11700	12500
					200	17400	50500	7260	16300	7810	12500
					300	37500	39400	16100	16400	21500	13400
					500**	44800	58100	43400	29400	35700	17500
					600	114000	142000	62600	105000	62500	55200

Additional information:* TK report 211503 based on data from [BNA00003/209258](#)

** Dosed together with ■ mg/kg/day ■

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	AUC _{0-8h} (h×ng/mL)				AUC _{0-8h} (h×ng/mL)	
						Day 1		Day 90		Day 180	
						F	M	F	M	F	M
Repeat dose Toxicity	Monkey/Rhesus	Oral		211503*	150**	32000	27900	16800	15000	16400	15400
					200	23900	29100	21700	24000	18700	20100
					300	50500	45300	41500	35800	38100	30200
					500**	63600	75100	83100	58900	80900	50600
					600	188000	130000	114000	165000	86100	114000

Additional information:* TK report 211503 based on data from [BNA00003/209258](#)

** Dosed together with ■ mg/kg/day ■

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)		AUC (h×ng/ml)	
						GD 6	GD 18	GD 6	GD 18
						F	F	F	F
DRF Developmental Toxicity	Rabbit /New Zealand White	Oral	3 (n=3)	215066*	1000/0	350000	181000	156000	96400
					2000/0	1020000	443000	1110000	292000
					1000/5000**	413000	547000	207000	320000
					2000/5000**	912000	670000	776000	499000

Additional information:*TK report 215066 based on data from [805-001P](#)/209255

** Dosed together with [REDACTED] units/kg/day [REDACTED]

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)		AUC (h×ng/ml)	
						M	F	M	F
Single-Dose Tolerability	Mice / CD-1	Oral	10M+10F (n=5)	JLY0557/ 214311	150	11000	8940	2410	3550
					500	80200	83300	12100	24000
					1000	121000	183000	37300	62200

Additional information:

There was an indication of possible sex differences with a generally higher exposure in female CD-1 mice for SNAC. The higher SNAC exposure in females were more pronounced for the higher given dose of SNAC

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} * (ng/ml)		AUC _{last} (h×ng/ml)	
						Bolus	Infusion	Bolus	Infusion
Single intravenous dose investigative study	Rat/Sprague Dawley	Intravenous (bolus and infusion)		JLY0413/ 212434	200	547000	19800	169000	37300

Additional information:

*Concentration at 5 minutes post dose following i.v. bolus administration.

The accumulated AUC from 0 to 3.5 h post dose (AUC_{last} = 37300 h*ng/mL) following i.v. infusion did not exceed the AUC from 0 to 5 minutes post dose following i.v. bolus (AUC_{0-0.083h} = 47300 h*ng/mL) where clinical signs and mortality occurred. Consequently, it was not possible to meet the primary objective of the study, i.e. to investigate whether clinical signs observed after intravenous administration of SNAC were driven by C_{max} exposure or accumulative exposure (AUC).

Type of study	Test system	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	Clinical signs	Group			
Investigative study	Rats/ Sprague Dawley	Oral	15F (group 3, 4 and 5) 15M (group 5)	JLY0468/ 213299	1500		3A+4A combined	3B+4B combined	5 (female)	5 (male)
							C_{max} (ng/mL)			
						None	467000	NC	503000	396000
						Mild	679000	NC	692000	577000
						Moderate	1080000	NC	851000	538000
						Marked	1180000	NC	833000	663000
						Marked – euthanised	1480000	NC	1190000	799000
							AUC_{last} (h×ng/mL)			
						None	106000	424000	281000	163000
						Mild	173000	237000	411000	323000
						Moderate	274000	227000	437000	361000
						Marked	299000	616000	1190000	521000
						Marked – euthanised	213000	274000	350000	511000

NC: Not calculated

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study ID/ NN Reference No.	Doses mg/kg/day	C _{max} (ng/ml)	AUC (h×ng/ml)
						F	F
Single-Dose Toxicity	Rat / SD	Oral	F (n=3-5)	JLY0517/ 214112	75	56700	6580
					200	210000	44600
					500	434000	214000
					900	348000	226000

2.6.7.18.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: SNAC

Batch No.	Purity (%)	Study ID	Type of Study
██████	██	EMISR96007	Acute toxicity in Mouse
██████	██	EMISR96009	Acute toxicity in Rat
██████	████	A16705	13 Week Repeat Dose Toxicity in Mouse
████████████████████	████	WIL-315004	2 Week Repeat Dose Toxicity in Rat
██████	████		
██████████████████	██	WIL-315002	2 Week Repeat Dose Toxicity in Rat
██████	████	A62807	13 Week Repeat Dose Toxicity in Rat
████████████████████	████	WIL-315003	13 Week Repeat Dose Toxicity in Rat
██████	████		
██████	████	JLY0278	26 Week Repeat Dose Toxicity in Rat
██████████	████	BNA00004	52 Week Repeat Dose Toxicity in Rat
██████	████		
██████████████████	██	3007-97	2 Week Repeat Dose Toxicity in Monkey
██████████████████	████	694-95	4 Week Repeat Dose Toxicity in Monkey
██████████	████		
██████	██	3060-98	13 Week Repeat Dose Toxicity in Monkey
██████	████	JLY0387	16 Week Repeat Dose Toxicity in Monkey
██████████	████	BNA00003	39 Week Repeat Dose Toxicity in Monkey
██████	████		
██████	██	0725-2140	<i>In vitro</i> Genotoxicity (Ames test)
██████████	████	0545-3300	<i>In vitro</i> Genotoxicity (Chromosome Aberration)
██████	████	0374-1521	<i>In vivo</i> Genotoxicity (Micronucleus Assay)

Batch No.	Purity (%)	Study ID	Type of Study
██████████	████	805-002P	Dose-Range Finder Developmental Toxicity in Rat
██████████	████		
██████████	████	805-001P	Dose-Range Finder Developmental Toxicity in Rabbit
██████████████████	████	805-003	Fertility and General Reproduction Toxicity in Rat
██████████	████	805-002	Developmental Toxicity in Rat
██████████████	████	805-001	Developmental Toxicity in Rabbit
██████████	████		
██████████████████	████	805-004	Development and Peri/Postnatal Reproduction Toxicity in Rat
██████████	████	JLY0382	6-Week tolerability Study in Transgenic rasH2 Mouse
██████████	████	JLY0436	26-Week Carcinogenicity Study in Transgenic rasH2 Mouse
██████████	████	JLY0366	2-Year Carcinogenicity Study in Rat
██████████	████	JLY0558	GI tract Local Tolerance in Dog
██████████	████	NN-2013-001	<i>In vitro</i> assessment of mitochondrial effects
██████████	████	████140912	<i>In vitro</i> effect on cellular respiration
██████████	████	████140919	<i>In vitro</i> effect on cellular respiration
██████████	████	████140926	<i>In vitro</i> effect on cellular respiration
██████████	████	████141003	<i>In vitro</i> effect on cellular respiration
██████████	████	████141010	<i>In vitro</i> effect on cellular respiration
██████████	████	JLY0557	Toxicokinetics and Tolerability in Mouse
██████████	████	0NNC11	Mechanistic respiratory and cardiovascular study in Rat
██████████	████	JLY0412	Investigative Single Dose Study in Rat
██████████	████	JLY0468	Investigative Single Dose Study in Rat

Batch No.	Purity (%)	Study ID	Type of Study
██████	██████	JLY0517	Investigative Single Dose Study in Rat
██████	██████	JLY0413	Investigative Single Dose i.v. Study in Rat
██████	██████	JLY0532	Investigative 13 week repeat dose study in Rat
██████	██████	██████140701	Effect on ATP tissue concentration in Rat
██████	██████	██████141102	Effect on ATP tissue concentration in Rat
██████	██████	523561	28-Day Immunotoxicity Study in Rat
██████████			

2.6.7.18.5 単回投与毒性試験

Test Article: SNAC

Species/ Strain	Route of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number
Mouse/ ICR	Oral (gavage) ^a	0 1000 1500 2000	5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F	1500	2000	At 2000 mg/kg, 3 females were found dead at 60 min post-dose. Two (2) of these were lethargic at 45 min. At 90 min, 1 male, also at 2000 mg/kg, was lethargic and at 4 h, it was found dead. At 1500 mg/kg, 1 male appeared sedated at 90 and 120 min but had recovered at 4 h. The cause of death could not be established for these animals. The acute maximum non-lethal dose was established to be 1500 mg/kg while no effects were observed at 1000 mg/kg.	EMIS/R96007	209239

Species/ Strain	Route of Administration	Nominal Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number
Rat/ Sprague Dawley	Oral (gavage) ^a	0 1000 1500 2000 3000	5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F	1000		At 3000 mg/kg, all animals were lethargic immediately after dosing and died within 30 min. At 2000 mg/kg, 3/5 males and 5/5 females died within 1 to 4 hours post dose. At 1500 mg/kg, 1/5 males and 2/5 females died within 2 to 4 hours. At both dose levels, clinical signs observed included salivation, weak reflexes, lying on the side/stomach, sluggish, lethargic, and twitching. No clinical signs were observed at 1000 mg/kg. In animals dosed with 2000 mg/kg, red/irritated stomach and/or small intestine, and/or enlarged atria were observed. The observed maximum non-lethal dose was 1000 mg/kg.	EMIS/R96009	209238

a: Vehicle: 25% v/v aqueous propylene glycol

2.6.7.18.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: SNAC

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Maximum Tolerated Dose (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number
Mouse / rasH2 wild type	Oral	6 weeks	0 150 500 750 1000	10M&10F(main) 6M&6F (sat.) 10M&10F(main) 18M&18F (sat.) 10M&10F(main) 18M&18F (sat.) 10M&10F(main) 18M&18F (sat.) 10M&10F(main) 18M&18F (sat.)	500	Doses of 750 or 1000 mg/kg/day exceeded the maximum tolerated dose, as indicated by the premature deaths of a number of animals. Pathology did not identify a cause of death, nor a target organ. There were no toxicologically significant effects of treatment at 150 or 500 mg/kg/day and, consequently, 500 mg/kg/day was considered the maximum tolerated dose and suitable for a subsequent 26-week carcinogenicity study in transgenic rasH2 mice.	JLY0382	212159
Rat / Sprague Dawley	Oral	2 weeks	0 1000 1667 2334 3000	5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F 5M & 5F	Approx. 1667	At 2334 and 3000 mg/kg/day, treatment related mortality occurred in 2 females in each group. Necropsy did not reveal the cause of death. Impaired equilibrium and hypoactivity was observed in one female 1 hour post dose, on the day prior to the day it was found dead. Red nasal discharge, red or yellow material most notably around the nose, mouth, forelimbs and trunk were observed in all treated groups, and an increased incidence of rales occurred at 1667 mg/kg/day and above, most frequently 1 hour post	WIL- 315002	211245

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Maximum Tolerated Dose (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number
						dosing. Body weight gain and food consumption were decreased in males at 3000 mg/kg/day. Decreased globulin values were observed at 1667 mg/kg/day and above. Slightly decreased chloride levels were observed in females at 3000 mg/kg/day, and a single female at this dose had markedly increased alkaline phosphatase. Increases in liver and kidney weights were observed at 1667 mg/kg/day and above. Administration of 2334 and 3000 mg/kg/day to Sprague Dawley rats for 2 weeks exceeded the maximum tolerated dose due to mortality at these dose levels whereas the clinical signs observed at lower dose levels were not considered to preclude administration of similar dose levels in subsequent studies.		

2.6.7.18.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Test Article: SNAC

2.6.7.18.7.A マウスにおける 13 週間経口投与毒性試験（A16705）		Study ID: A16705 NN Reference Number: 209247
Species/Strain: Mouse/CD-1	Duration of Dosing: 13 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-2
Initial Age: Approx. 7 weeks at dosing start	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 18 August 2005	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 150, 500 and 1500/1000 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Deionised water, pH adjusted to 8.2	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: 1500 mg/kg/day was dosed on day 1 and 2, but due to excessive mortality, treatment was discontinued and re-commenced on day 5 at 1000 mg/kg which continued until the animals were terminated prematurely on day 9		
No Observed Adverse Effect Level: 500 mg/kg/day		
Brief conclusion: SNAC caused excessive mortality at 1500/1000 mg/kg/day, and a few changes in clinical pathology parameters and increased kidney weights. Neither histopathology, nor clinical pathology, could establish the cause of death for the decedents. Due to the mortality observed at the high dose level, the intermediate dose level, 500 mg/kg/day, was considered to be the NOAEL		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	150	500	1500/1000*	0 (Control)	150	500	1500/1000*
Initial Number of Animals								
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite	M: 12	M: 12	M: 12	M: 12	F: 12	F: 12	F: 12	F: 12
Toxicokinetics								
AUC _{0-24h} (ng*h/mL)								
Day 1	N/A	1630	5110	14500	N/A	1320	11600	20800
Day 41	N/A	1820	8450	N/A	N/A	1710	4770	N/A
Day 90	N/A	1810	7240	N/A	N/A	2250	8980	N/A
C _{max} (ng/mL)								
Day 1	N/A	462	2050	2770	N/A	431	2310	4340
Day 41	N/A	719	3140	N/A	N/A	836	1710	N/A
Day 90	N/A	418	2720	N/A	N/A	1040	1720	N/A
Noteworthy Findings								
Died or euthanised/terminated prematurely ^a	1	1	1	10	1	1	1	13
Clinical signs^b								
Ruffled fur	0	1	1	19	0	0	1	0
Behaviour, sedated ^c	0	1	1	0	0	0	0	0
Hunched posture ^c	0	1	1	0	0	0	0	0
Haematology (Day 9)^d								
Red Blood Cells (*10 ¹² /L)	N/A	N/A	N/A	6.75	N/A	N/A	N/A	6.58
Haemoglobin (mmol/L)	N/A	N/A	N/A	6.8	N/A	N/A	N/A	6.7
Haematocrit (L/L)	N/A	N/A	N/A	0.34	N/A	N/A	N/A	0.32
Reticulocytes (%)	N/A	N/A	N/A	4.1	N/A	N/A	N/A	3.6
Clinical chemistry (Day 9)^d								
Glucose (mmol/L)	N/A	N/A	N/A	9.59	N/A	N/A	N/A	8.15
Triglycerides (mmol/L)	N/A	N/A	N/A	1.74	N/A	N/A	N/A	1.36
Bilirubin, total (μmol/L)	N/A	N/A	N/A	2.08	N/A	N/A	N/A	1.84

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	150	500	1500/1000*	0 (Control)	150	500	1500/1000*
Total protein (g/L)	N/A	N/A	N/A	51.40	N/A	N/A	N/A	52.79
Creatinine (μmol/L)	N/A	N/A	N/A	25.3	N/A	N/A	N/A	25.9
Sodium (mmol/L)	N/A	N/A	N/A	145.5	N/A	N/A	N/A	145.6
Potassium (mmol/L)	N/A	N/A	N/A	6.23	N/A	N/A	N/A	5.61
Chloride (mmol/L)	N/A	N/A	N/A	108.8	N/A	N/A	N/A	109.6
Phosphorus (μmol/L)	N/A	N/A	N/A	2.19	N/A	N/A	N/A	2.19
Organ weights (main study animals)								
Kidney								
Absolute weight (g)	0.496	0.497	0.546	N/A	0.378	0.353	0.405	N/A
% of body weight	1.441	1.459	1.533	N/A	1.260	1.241	1.371*	
Histopathology (main study animals)								
Liver (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10
Congestion ^c	0	0	0	0	0	0	0	3
Diffuse hepatic glycogen, minimal	8	5	7	5	6	6	6	5
Diffuse hepatic glycogen, slight	2	1	1	0	1	2	2	2
Diffuse hepatic glycogen, total	10	6	8	5	7	8	8	7
Lungs (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10
Congestion ^c	0	0	0	6	0	0	0	2
Nasal cavity (number examined)	10	19	10	10	10	10	10	10
Congestion ^c	0	0	0	0	0	0	0	3
Stomach (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10
Advanced autolysis ^c	0	0	0	4	0	0	0	5
Thymus (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10
Congestion ^c	0	0	0	3	0	0	1	0

a: One animal, a male at 500 mg/kg/day, was killed in extremis with the following clinical signs: sedated appearance, hunched posture, ruffled fur and lacrimation, all other animals were found dead

b: Number of animals with clinical sign

c: Observed in animals prior to death/euthanasiation

d: At week 2 only blood samples from group 4 were collected. The measurements are compared to historical control values collected 29-APR-02 to 06-JUN-05:

Haematology (mean ±SD)

Red Blood Cells (*10 ¹² /L):	Males: 9.44 ±0.34	Females: 9.42 ±0.42
Haemoglobin (mmol/L):	Males: 9.4 ±0.5	Females: 9.7 ±0.4
Haematocrit (L/L):	Males: 0.46 ± 0.03	Females: 0.47 ±0.02
Reticulocytes (%):	Males: 2.6 ± 0.5	Females: 3.0 ±0.5
<u>Clinical Chemistry (mean ±SD)</u>		
Glucose (mmol/L):	Males: 6.8 ±1.93	Females: 6.16 ±1.76
Triglycerides (mmol/L):	Males: 0.68 ±0.32	Females: 0.52 ±0.19
Bilirubin, total (μmol/L):	Males: 2.69 ±0.55	Females: 2.42 ±0.40
Total protein (g/L):	Males: 55.59 ±3.50	Females: 55.12 ±2.82
Creatinine (μmol/L):	Males: 13.7 ±5.8	Females: 15.3 ±6.8
Sodium (mmol/L):	Males: 153.8 ±4.2	Females: 151.5 ±2.6
Potassium (mmol/L):	Males: 4.52 ±0.58	Females: 4.34 ±0.36
Chloride (mmol/L):	Males: 115.4 ±7.0	Females: 113.5 ±4.5
Phosphorus (mmol/L):	Males: 1.85 ±0.25	Females: 1.74 ±0.20

e: All affected animals died spontaneously, including the intermediate dose female at 500 mg/kg/day

- No data

* p≤0.05 vs. control (pairwise test)

N/A Not applicable

2.6.7.18.7.B ラットにおける 2 週間経口投与毒性試験（製造工程 B 及び C の比較）（WIL-315004）

Study No.: WIL-315004
NN Reference Number: 209241

Species/Strain: Rat / Sprague Dawley	Duration of Dosing: 2 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-4 GLP Compliance: Yes
Initial Age: Approx. 7 weeks at dosing start	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 14 June 1999	Method of Administration: Oral gavage	
Nominal Dose Levels: 0, 500, 750 and 1000 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Deionised water	
Parameters Collected: viability, clinical condition, body weight, food consumption, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, organ weights, macropathology, and histopathology.		
Special Features: The study was designed to compare two SNAC manufacturing processes (Process B and C)		
No Observed Adverse-Effect Level: 1000 mg/kg/day		
Brief Conclusion: Histopathological changes consisting of neutrophil infiltration of the submucosa of the glandular stomach indicative of local irritation in the stomach were evident in one or two animals at all dose levels of SNAC. Relationship to treatment was uncertain due to the low incidence and lack of dose response in males. However, due to the low degree of severity, and innocuous morphologic appearance, this finding was considered of no toxicological significance. There were no other effects considered possibly related to treatment and there were no meaningful differences between SNAC manufactured by the two different processes, B and C. Consequently, the NOAEL was assessed to be 1000 mg/kg/day for both processes.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	500 (Process B)	750 (Process B)	1000 (Process B)	500 (Process C)	750 (Process C)	1000 (Process C)	0 (Control)	500 (Process B)	750 (Process B)	1000 (Process B)	500 (Process C)	750 (Process C)	1000 (Process C)
Initial Number of Animals														
Main	M: 20	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 20	F:10	F:10	F:10	F:10	F:10	F:10
Noteworthy Findings														
Histopathology														
Stomach (number examined)	20	10	10	10	10	10	10	20	10	10	10	10	10	10
Infiltration, neutrophil, minimal	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2
Infiltration, neutrophil, mild	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infiltration, neutrophil, total	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2

2.6.7.18.7.C ラットにおける 13 週間経口投与毒性試験 (WIL-315003)

Study ID: WIL-315003

NN Reference Number: 211246

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: 13 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-6
Initial Age: Approx. 7 weeks at dosing start	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 02 December 1997	Method of Administration: Oral gavage	
Nominal Dose Levels: 0, and 2000 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Deionised water	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Organ Weights, Antibody formation, Macropathology, Histopathology		
Special Features: This study was designed to assess the toxicity of SNAC administered alone and in combination with [REDACTED]. Only data from controls and the single group receiving SNAC only are presented here		
No Observed Adverse-Effect Level: Not established for SNAC alone		
Brief conclusion: SNAC caused excessive mortality although no cause of death was identified. Increased liver and kidney weights, without histopathological correlates, and vacuolation of cells in the pars distalis of the pituitary were, together with a few changes in clinical chemistry, of uncertain toxicological significance. Adverse neutrophil infiltration of the glandular stomach and epithelial hyperplasia of the non-glandular stomach were observed and considered to reflect local effects of SNAC. Due to these findings, the only dose level of SNAC given alone in this study, 2000 mg/kg/day, could not be considered a NOAEL.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	2000	0 (Control)	2000
Initial Number of Animals Main	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20
Noteworthy Findings				
Died or euthanised/terminated prematurely ^a	0	4	0	10
Clinical signs^b				
Weekly detailed examinations				
Hypoactivity	0/0	2/2	0/0	0/0
Prostrate	0/0	1/1	0/0	0/0
Dried red material around nose	3/2	12/8	0/0	6/6
Dried red material around mouth	0/0	22/13	0/0	26/10
Dried yellow material around mouth	0/0	19/12	0/0	7/5
Dried yellow material, ventral trunk	0/0	4/4	0/0	2/2
Dried yellow material, urogenital area	0/0	13/4	0/0	10/5
Dried yellow material, anogenital area	0/0	15/4	0/0	3/2
Dried yellow material, ventral neck	0/0	3/3	0/0	1/1
Dried yellow material, forelimb(s)	0/0	8/6	0/0	4/3
Dried red material, forelimb(s)	0/0	34/16	1/1	34/11
Wet yellow material, urogenital area	0/0	0/0	0/0	6/4
Wet yellow material, anogenital area	0/0	1/1	0/0	2/2
At time of dosing				
Hypoactivity	0/0	1/1	0/0	0/0
Dried red material around nose	1/1	2/1		
Dried red material around mouth	0/0	5/3	0/0	
Dried yellow material, ventral trunk	0/0	2/2	0/0	3/2
Dried yellow material, urogenital area	0/0	36/4	1/1	17/3
Dried yellow material, anogenital area	0/0	38/3	0/0	7/2
Dried red material, forelimb(s)	0/0	4/2	0/0	
Wet clear material around mouth	0/0	9/4	0/0	8/6
1 hour post dosing				
Hypoactivity	0/0	2/2	0/0	2/2
Rales	0/0	3/3	0/0	4/3
Prostrate	0/0	0/0	0/0	1/1
Dried red material around nose	0/0	18/10	0/0	6/4
Dried red material around mouth	1/1	101/17	0/0	79/15

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	2000	0 (Control)	2000
Initial Number of Animals Main	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20
Dried yellow material around mouth	0/0	87/17	0/0	38/13
Dried yellow material, ventral trunk	0/0	7/6	0/0	9/7
Dried yellow material, urogenital area	0/0	18/8	0/0	11/7
Dried yellow material, anogenital area	0/0	10/5	0/0	3/2
Dried yellow material, ventral neck	0/0	22/9	0/0	20/10
Dried red material, forelimb(s)	0/0	71/15	0/0	77/16
Dried red material, ventral neck	0/0	4/4	0/0	2/2
Wet yellow material, urogenital area	0/0	6/5	0/0	19/8
Wet yellow material, anogenital area	0/0	2/2	0/0	1/1
Wet yellow material, ventral trunk	0/0	4/4	0/0	1/1
Wet yellow material, forelimb(s)	0/0	6/4	0/0	5/2
Wet yellow material around mouth	0/0	13/7	0/0	10/5
Wet yellow material, ventral neck	0/0	3/3	0/0	2/2
Wet clear material around mouth	0/0	3/2	0/0	2/2
Wet red material around mouth	0/0	4/3	0/0	1/1
Wet red material, forelimb(s)	0/0	3/2	0/0	1/1
Clear discharge, left eye	0/0	1/1	0/0	2/2
Clear discharge, right eye	0/0	1/1	0/0	3/3
Body weight gain				
Day 1- Week 13	349	315	N/A	N/A
Day 1- Week 10	312	285	116	128
Clinical chemistry				
Alkaline phosphatase (U/L)				
Week 5	196	181	126	153*
Week 10/13 ^c	104	110	60	97
Total protein (g/dL)				
Week 5	7.0	6.3**	7.0	6.9
Week 10/13 ^c	6.8	6.1**	7.0	6.7

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	2000	0 (Control)	2000
Initial Number of Animals Main	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20
Globulin (g/dL)				
Week 5	2.3	1.7**	2.2	1.8**
Week 10/13 ^c	2.3	1.6**	2.1	1.6
A/G ratio				
Week 5	2.00	2.76**	2.25	2.81
Week 10/13 ^c	2.00	2.83**	2.33	3.13
Urea (mg/dL)				
Week 5	14.5	12.9	16.4	13.3*
Week 10/13 ^c	14.8	11.6**	15.9	12.5
Chloride (mEq/L)				
Week 5	101	98**	103	99**
Week 10/13 ^c	95	93**	97	95
Organ Weights^d				
Kidney				
Absolute weight (g)	3.95	4.68**	2.15	2.61
% of body weight	0.760	0.947**	0.802	0.975
Liver				
Absolute weight (g)	15.50	18.92**	8.10	11.15
% of body weight	2.982	3.803**	3.029	4.153

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	2000	0 (Control)	2000
Initial Number of Animals Main	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20
Histopathology^e				
Pituitary (number examined)	20	16 (4)	20	10 (10)
Vacuolation, pars distalis, minimal	0	6 (1)	0	0
Vacuolation, pars distalis, mild	0	3	0	0
Vacuolation, pars distalis, total	0	9 (1)	0	0
Stomach (number examined)	20	16 (4)	20	10 (10)
Glandular, infiltration , neutrophil, minimal	13	1 (2)	18	4 (6)
Glandular, infiltration , neutrophil, mild	7	15 (2)	2	6 (3)
Glandular, infiltration , neutrophil, total	20	16 (4)	20	10 (9)
Non-glandular, hyperplasia, epithelial, minimal	3	13 (2)	2	5
Spleen (number examined)	20	16 (4)	20	10 (10)
Necrosis, red pulp, minimal	0	0	0	0 (1)

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control; (pairwise test)

N/A Not applicable

a: All animals were found dead, except from one male which was euthanised *in extremis* on day 74. Deaths occurred on the following days: 1, 3, 23, 26, 33, 36, 39, 58, 58, 61, 69, 73, 74, and 89.

b: Total occurrence/No. of animals

c: Males: all samples taken week 13; Females: samples from SNAC treated group taken before termination in week 10, control females sampled as scheduled in week 13.

d: Data presented for SNAC treated females were collected at termination in week 10, whereas data for males and for control females were collected at scheduled termination in week 13.

e: Values in brackets () indicate incidence of findings in premature decedents. To get the total incidence, both values should be combined.

2.6.7.18.7.D ラットにおける 13 週間経口投与毒性試験 (A62807)

Study ID: A62807

NN Reference Number: 209242

Species/Strain: Rat Wistar	Duration of Dosing: 13 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-5 GLP Compliance: Yes
Initial Age: Approx. 7 weeks	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 27 March 2006	Method of Administration: Oral gavage	
Nominal Dose Levels: 0, 100, 500, and 1000 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Purified water	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: This study was designed to assess the toxicity of SNAC administered alone and in combination with [REDACTED]. Only data from controls and the three groups receiving SNAC only are presented here		
No Observed Adverse-Effect Level: 500 mg/kg/day		
Brief conclusion: At 1000 mg/kg/day, one satellite female died spontaneously on day 76. The only observation recorded for this animal was an enlarged eye. Consequently, a relationship between the death and administration of SNAC cannot be excluded. Clinical pathology revealed changes in a range of parameters, and increased absolute and body weight-relative kidney and liver weights were observed at 500 and 1000 mg/kg/day. However, as all changes were minor and as there were no corresponding histopathology findings, they were considered to be non-adverse. Minimal to slight erosion(s) of the pyloric or fundic part of the stomach were seen in a few animals at 500 and 1000 mg/kg/day. The relationship to administration of SNAC is considered uncertain, but due to the limited severity, the findings are considered non-adverse. In conclusion, due to the death of one female at 1000 mg/kg/day, which could not be excluded to be related to treatment, the NOAEL was considered the intermediate dose level, 500 mg/kg/day.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	100	500	1000	0 (Control)	100	500	1000
Initial Number of Animals								
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
<u>Toxicokinetics</u>								
AUC _{0-24h} (ng*h/mL)								
Day 1	N/A ^a	5460	25500	65200	N/A ^a	4990	22500	93100
Week 13	N/A	2560	18500	44400	N/A	8020	38800	108000
C _{max} (ng/mL)								
Day 1	N/A ^a	1530	4830	15000	N/A ^a	1370	7990	41400
Week 13	N/A	1030	3880	5800	N/A	3530	6770	29100
<u>Noteworthy Findings</u>								
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	1 ^b	0	0	0	1
Body weight gain								
Day 1-91 (g)	244.2	254.7	261.6	236.0	108.0	91.8	106.9	98.3
Haematology								
Haemoglobin Distribution Width (mmol/L)								
Week 5	1.58	1.65	1.59	1.60	1.47	1.45	1.49	1.57*
Week 12	2.01	2.14*	2.12	2.10	1.55	1.63	1.64	1.66*
Reticulocytes (g/L)								
Week 5	199	194	215	230**	231	204	201	222
Week 12	191	214	193	225*	190	203	209	209
Lymphocytes (G/L)								
Week 5	4.78	5.49	5.70	6.20*	3.78	3.80	3.60	3.75
Week 12	5.36	5.19	5.82	6.93**	3.84	2.58**	3.12	4.45
Activated Partial Thromboplastin Time (sec)								
Week 5	21.3	21.2	20.9	23.0	23.9	27.1*	32.3	27.1*
Week 12	20.7	23.1*	25.1*	25.3*	30.7	33.5	30.4	32.8

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	100	500	1000	0 (Control)	100	500	1000
Clinical chemistry								
Glucose (mmol/L)								
Week 12	5.27	5.60	5.26	3.89**	4.68	5.83**	5.51	3.89
Creatinine (μmol/L)								
Week 5	23.1	15.2**	12.5**	11.5**	19.8	17.9	18.0	15.5**
Bilirubin (μmol/L)								
Week 5	1.28	1.15	1.05*	1.07	2.09	1.88	1.63	1.70
Week 12	1.83	1.60	1.52	1.29*	2.41	2.10	1.67*	2.13
Sodium (mmol/L)								
Week 5	143.3	147.7**	149.0**	147.8**	141.3	146.9**	147.3**	147.3**
Week 12	146.2	149.2*	149.7**	149.0*	141.2	144.6**	145.9**	145.4**
Potassium (mmol/L)								
Week 5	3.48	3.98**	4.09**	3.74	3.03	3.40**	3.49**	3.47**
Total protein (g/L)								
Week 5	61.97	62.74	61.68	60.82	64.21	65.94	64.69	63.01
Week 12	68.64	68.46	65.85*	64.96**	74.00	75.85	75.67	71.06
Albumin (g/L)								
Week 5	39.5	40.72*	40.76*	41.10**	43.54	45.84	44.43	44.42
Week 12	43.25	43.16	42.26	42.99	50.78	52.76	52.17	50.87
Globulin (g/L)								
Week 5	22.46	22.02	20.92*	19.71**	20.67	20.11	20.25	18.60*
Week 12	25.39	25.30	23.39*	21.97**	23.22	23.09	23.50	20.19**
Albumin/Globulin ratio								
Week 5	1.76	1.85	1.95*	2.09*	2.11	2.28*	2.20	2.39*
Week 12	1.72	1.71	1.82	1.97*	2.20	2.29	2.23	2.53*
Organ weights								
Kidney								
Absolute weight (g)	2.20	2.32	2.62**	2.59**	1.48	1.37	1.44	1.69**
% of body weight	0.51	0.52	0.59**	0.62**	0.59	0.58	0.58	0.71**
Liver								
Absolute weight (g)	12.47	14.03	14.78*	14.43	7.76	7.76	8.37	8.98*
% of body weight	2.89	3.15	3.28**	3.45**	3.11	3.28	3.37	3.78**

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	100	500	1000	0 (Control)	100	500	1000
Histopathology								
Stomach (number examined)	10	10	10	9	10	10	10	10
Erosion(s), pyloric, minimal	0	0	1	0	0	0	0	1
Erosion(s), pyloric, slight	0	0	0	1	0	0	0	1
Erosion(s), pyloric, total	0	0	1	1	0	0	0	2
Erosion(s), fundic, minimal	0	0	0	1	0	0	0	0

a: day 3 for the Control group

b: Confirmed dosing error – perforated oesophagus

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ vs. control (pairwise test)

N/A Not Applicable

NE Not Examined

- No data

2.6.7.18.7.E ラットにおける 26 週間経口投与毒性試験及び 4 週間回復性試験（補足報告書）
(JLY0278)

Study ID: JLY0278
NN Reference Number: 210196

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: 26 weeks – preceded by 2 weeks dose escalation	Location in CTD: 4.2.3.2-B-7
Initial Age: 40-46 days at dosing start	Duration of Post-dose: 4 weeks	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 12 October 2010	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 90, 300 and 900 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Water for injection, adjusted to pH 8.5	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, and Histopathology		
Special Features: In this study, SNAC was administered together with semaglutide at three dose levels and alone as control substance at three dose levels. Further, a water control group was included to assess the effects of SNAC. Only data for the water control group (hereafter just ‘control group’) and the three groups dosed with SNAC alone are presented here. To ensure tolerability towards semaglutide, a 2-week dose escalation phase preceded the 26 weeks at the target dose levels.		
No Observed Adverse Effect Level: 90 mg/kg/day		
Brief Conclusion: SNAC was tolerated up to 90 mg/kg/day, whereas mortality occurred at 300 and 900 mg/kg/day. The cause of death was not established. SNAC also caused increased plasma alkaline phosphatase activity and triglycerides, low plasma protein levels, and increased liver weights. Increased kidney weights and urinary parameter changes were possibly a consequence of excretion of sodium from the SNAC molecule. In addition, SNAC seemed to cause an exacerbation of <i>P. carinii</i> induced lung changes. Inflammation and epithelial hyperplasia of the stomach may indicate an irritative potential of SNAC. Based on the mortality and the stomach changes observed at 300 and 900 mg/kg/day, 90 mg/kg/day was considered to be the NOAEL.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	90	300	900	0 (Control)	90	300	900
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Recovery	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
<u>Toxicokinetics</u>								
AUC _{0-24h} (ng*h/mL)								
Day 1	N/A	ND	5120	23900	N/A	ND	6810	20200
Week 26	N/A	ND	8970	18800	N/A	ND	14300	42000
C _{max} (ngl/mL)								
Day 1	N/A	ND	1230	6210	N/A	ND	1800	2420
Week 26	N/A	ND	1500	3250	N/A	ND	1670	7420
<u>Noteworthy Findings</u>								
Died or euthanised/terminated prematurely ^a	0	0	1	2	0	1	0	8
<u>Clinical signs^b</u>								
Salivation, Week 1-26								
Average number of animals per week (range)	0 (0-0)	0 (0-0)	2.15 (0-13)	17.8 (3-28)	0 (0-0)	0 (0-0)	2.55 (0-8)	11.2 (0-21)
Chin rubbing, Week 1-26								
Average number of animals per week (range)	0 (0-0)	0.25 (0-3)	11.8 (0-27)	20.1 (3-28)	0 (0-0)	0.25 (0-3)	12.45 (0-24)	23.45 (14-30)
Fast breathing	0	0	0	1	0	0	0	0
Reduced body tone	0	0	0	1	0	0	0	0
Unsteady	0	0	0	1	0	0	0	0
Reddening of the ears								
Week 14	0	0	0	12	0	0	0	6
Week 16	0	0	7	14	0	0	0	0
Week 20	0	0	0	0	0	0	1	11
<u>Haematology (main study animals)</u>								
Haematocrit (L/L)								
Week 13	0.429	0.426	0.431	0.450**	0.413	0.424	0.416	0.432**
Week 26	0.460	0.463	0.459	0.478**	0.444	0.453	0.448	0.465**

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	90	300	900	0 (Control)	90	300	900
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Recovery	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Week R4	0.455	0.446	0.432	0.433	0.421	0.413	0.414	0.428
Haemoglobin (g/dL)								
Week 13	14.9	14.6	15.0	15.4*	14.3	14.8	14.5	14.9**
Week 26	14.8	14.7	14.6	15.1	14.4	14.7	14.5	14.9**
Week R4	14.7	14.6	14.3	14.2	14.2	13.9	13.9	14.3
Red Blood Cells (*10 ¹² /L)								
Week 13	8.45	8.73	8.68	9.02**	7.95	8.11	8.08	8.37**
Week 26	8.73	9.04	8.74	9.11**	8.02	7.98	8.04	8.39**
Week R4	8.66	8.57	8.28	8.47	7.99	7.77	7.89	8.15
Clinical chemistry (main study animals)								
Alkaline phosphatase (U/L)								
Week 26	62	65	65	78*	26	30	25	34**
Week R4	54	58	74	56	27	24	26	26
Triglycerides (mmol/L)								
Week 13	0.63	0.66	0.64	1.01**	0.48	0.54	0.56	0.62*
Week 26	0.88	0.85	0.82	1.20	0.71	0.86	0.81	1.01*
Week R4	1.30	1.20	1.18	1.18	1.29	0.78	0.75	0.83
Total protein (g/L)								
Week 13	66	66	66	63**	70	71	70	67*
Week 26	69	70	67	64**	73	73	76	68**
Week R4	70	70	69	70	75	76	75	73
Albumin (g/L)								
Week 13	30	29	29	29	36	35	36	37
Week 26	30	29	29	30	38	37	41*	37
Week R4	28	29	29	28	38	37	38	38
Albumin/globulin ratio								
Week 13	0.83	0.80	0.82	0.89*	1.07	0.98	1.07	1.21
Week 26	0.75	0.73	0.77	0.86**	1.07	1.04	1.15*	1.22**
Week R4	0.69	0.70	0.72	0.65	1.02	0.96	1.02	1.05
Phosphorus (mmol/L)								

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	90	300	900	0 (Control)	90	300	900
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Recovery	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Week 13	1.56	1.58	1.65	1.75**	1.48	1.43	1.42	1.57
Week 26	1.52	1.54	1.54	1.74**	1.32	1.37	1.38	1.39
Week R4	1.46	1.42	1.49	1.60*	1.40	1.27	1.24	1.28
Urinalysis (main study animals)								
Volume (mL)								
Week 13	6.6	7.3	6.3	7.4	3.7	3.5	4.1	4.5
Week 26	7.7	8.4	7.6	9.6*	3.8	3.9	4.1	5.6**
Week R4	8.0	9.0	8.6	7.7	3.6	4.1	3.9	4.1
pH								
Week 13	7.4	7.4	7.1	6.8**	6.4	6.4	6.3	6.2
Week 26	7.2	7.4	7.0	6.5**	6.4	6.2	6.2	6.2
Week R4	7.8	7.6	7.9	7.2**	6.5	6.3	6.6	6.3
Sodium (mmol)								
Week 13	0.494	0.654*	0.786**	1.207**	0.280	0.296	0.404	0.527**
Week 26	0.453	0.697*	0.785**	1.595**	0.287	0.326	0.382	0.722**
Week R4	0.601	0.658	0.550	0.542	0.302	0.267	0.259	0.249
Chloride (mmol)								
Week 13	0.350	0.449	0.406	0.432	0.205	0.219	0.256	0.320**
Week 26	0.300	0.326	0.286	0.510**	0.174	0.211	0.226	0.395**
Week R4	0.390	0.381	0.337	0.322	0.196	0.217	0.166	0.175
Organ weights								
Kidney, main study animals								
Absolute weight (g)	3.81	3.91	4.08	4.62**	2.02	2.18	2.27**	2.43**
% of body weight	0.619	0.622	0.666*	0.723**	0.626	0.642	0.650	0.743**
Kidney, recovery animals								
Absolute weight (g)	3.88	3.93	4.01	4.27	2.23	2.20	2.18	2.32
% of body weight	0.588	0.583	0.584	0.626	0.651	0.625	0.637	0.647
Liver, main study animals								
Absolute weight (g)	24.16	24.46	22.65	25.36	11.83	12.54	12.75	13.35*

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	90	300	900	0 (Control)	90	300	900
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Recovery	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
% of body weight	3.90	3.89	3.69	3.94	3.66	3.70	3.64	4.08**
Liver, recovery animals								
Absolute weight (g)	25.89	24.46	23.38	24.96	12.40	12.53	11.58	12.17
% of body weight	3.93	3.62	3.41	3.63	3.60	3.55	3.41	3.41
Histopathology^c								
Lungs (main study animals, number examined)	20	20	20	20	20	20	20	23 ^d
Prominent numbers of alveolar macrophages								
Minimal	2	11	9	7	4	4	4	3(3)
Slight	0	0	1	1	0	0	0	0
Total	2	11	10	8	4	4	4	6
Alveolitis								
Minimal	9	8	5	9	4	11 (1)	5	6 (1)
Slight	0	0	0	5	0	1	0	1
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	9	8	5	15	4	13	5	8
Perivascular lymphoid aggregates								
Minimal	12	5	9	3	16	12	8	5 (1)
Slight	5	12	9	8	0	7	10	7 (1)
Moderate	0	3	1 (1)	4	0	0	1	0
Marked	0	0	0	2	0	0	0	0
Total	17	20	20	17	16	19	19	14
BALT, increased cellularity								
Minimal	6	6	6	10	2	6	5	3
Slight	0	3	1 (1)	3	0	0	1	1
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	6	9	8	14	2	6	6	4
Lungs (recovery animals, number examined)	10	10	10	10	10	10	10	7 ^e
Prominent numbers of alveolar macrophages								
Minimal	3	0	2	2	1	2	1	1
Alveolitis								

Nominal Dose (mg/kg/day)		0 (Control)	90	300	900	0 (Control)	90	300	900
Initial Number of Animals		M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Main		M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Recovery		M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Perivascular lymphoid aggregates	Minimal	2	0	1	1	1	0	0	1
	Minimal	8	4	6	1	3	7	7	0
	Slight	0	6	4	8	1	1	2	0
	Total	8	10	10	9	4	8	9	0
BALT, increased cellularity	Minimal	3	5	4	5	1	1	3	0
	Slight	0	0	0	2	0	0	0	0
	Total	3	5	4	7	1	1	3	0
Stomach (main study animals, number exam.)		20	20	20	20	20	20	20	23 ^d
Epithelial hyperplasia – limiting ridge	Minimal	0	2	3	3	1	1	0	1 (1)
	Slight	0	0	4	0	0	0	0	0
	Total	0	2	7	3	1	1	0	2
Epithelial hyperplasia, glandular region	Slight	2	2	0	6	0	2	3	0
	Submucosal inflammation, glandular region								
Submucosal inflammation, glandular region	Minimal	0	0	4	4	0	0	0	1
	Slight	0	0	2	(1)	0	0	0	(2)
	Total	0	0	6	5	0	0	0	3
Stomach (recovery animals, number exam.)		10	10	10	10	10	10	10	7
Epithelial hyperplasia, limiting ridge		1	1	0	0	0	0	1	0
Epithelial hyperplasia, glandular region		0	0	0	0	1	1	1	3
Submucosal inflammation, glandular region		0	0	0	0	0	1	0	0

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	90	300	900	0 (Control)	90	300	900
Initial Number of Animals								
Main	M: 20	M: 20	M: 20	M: 20	F: 20	F: 20	F: 20	F: 20
Recovery	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Mammary (recovery animals, number exam.)	0	0	0	0	0	0	0	0
Mammary adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	2
Skin (recovery animals, number exam.)	0	0	0	1	0	0	0	0
Fibrosarcoma	0	0	0	1	0	0	0	0

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control ; (pairwise test)

a: All decedents found dead (days 24, 25, 38, 55, 68, 69, 84, 146, 146, 165, 176)

b: Number of animals with clinical sign

c: Values in brackets () indicate incidence of findings in premature decedents. To get the total incidence, both values should be combined.

d: Three recovery animals which died prematurely included.

e: The three recovery animals which died prematurely during the dosing period are described together with the main study animals, as described in ^d.

BALT: Bronchus associated lymphoid tissue

N/A Not applicable

ND Not done

2.6.7.18.7.F ラットにおける 52 週間経口投与毒性試験（26 週間中間群を含む）
 (BNA00004)

Study ID: BNA00004
NN Reference Number: 209243

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: 26 or 52 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-8
Initial Age: at dosing start	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose:	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 150 [#] , 250, 500, 750 [#] , 900 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Reverse osmosis deionised water	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, and Histopathology		
Special Features: In this study, SNAC was administered together with [REDACTED] at two dose levels and alone at three dose levels. For this study, also data from the groups receiving both SNAC and [REDACTED] are presented, as they are considered relevant for the evaluation of SNAC.		
No Observed Adverse Effect Level: 500 mg/kg/day		
Brief Conclusion: Mortality occurred at SNAC doses of 750 and 900 mg/kg/day. The cause of death was not established. SNAC caused an increase in plasma alkaline phosphatase activity which could possibly be secondary to histopathological changes in the stomach. Further, a range of clinical chemistry changes, increased urinary volume, and increased liver and kidney weights were observed but were without histopathological correlates or other indications of abnormal function, and were therefore considered non-adverse. Macropathology revealed foci and discolouration in the non-glandular and glandular stomach in the SNAC treated animals, generally at 500 mg/kg/day and above, but findings also in premature decedents suggested a treatment-related effect from 250 mg/kg/day. Hyperplasia of the non-glandular stomach were observed at 750 and 900 mg/kg/day, together with other histopathological stomach changes indicative of an irritative potential of SNAC at 500 mg/kg/day and above. Based on the mortality and the hyperplasia of the non-glandular stomach observed at 750 and 900 mg/kg/day, 500 mg/kg/day was considered to be the NOAEL.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	150 [#]	250	500	750 [#]	900	0 (Control)	150 [#]	250	500	750 [#]	900
Initial Number of Animals												
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Interim	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8
Toxicokinetics												
AUC _{0-4h} (ngl* [#] h/mL)												
Day 1	N/A	1540	3230	11300	40900	42300	N/A	2490	8170	21500	28500	88800
Week 52	N/A	3790	12100	51600	77000	47400	N/A	6100	4190	30500	23300	16500
C _{max} (ng/mL)												
Day 1	N/A	3050	6810	22000	82800	143000	N/A	3970	8010	28900	72300	204000
Week 52	N/A	9550	28900	177000	341000	229000	N/A	19800	8070	131000	57600	33800
Noteworthy Findings												
Died or euthanised/terminated prematurely ^a	0	1	1	0	4	3	1	0	1	1	2	3
Clinical chemistry (main study animals)												
Alkaline phosphatase (U/L)												
Week 26	77	64	66	86	67	94	44	38	35	29	43	48
Week 52	64	66	100	88	90	96*	51	33	25	31	54	48
Bilirubin (mg/dL)												
Week 26	0.48	0.54	0.54	0.60	0.56	0.51	0.57	0.68	0.64	0.56	0.59	0.63
Week 52	0.49	0.51	0.52	0.51	0.57	0.56	0.50	0.53	0.55	0.59	0.61*	0.61*
Urea (mg/dL)												
Week 26	16	15	14	15	12*	14	20	15*	14*	16*	14*	16*
Week 52	16	13	14	13	15	14	16	11*	13*	12*	13*	14
Creatinine (mg/dL)												
Week 26	0.52	0.44*	0.45*	0.48	0.42*	0.50	0.64	0.53*	0.51*	0.53*	0.53*	0.59
Week 52	0.57	0.41*	0.48*	0.43*	0.44*	0.45*	0.62	0.48*	0.51*	0.44*	0.50*	0.51*

[illegible]

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	150[#]	250	500	750[#]	900	0 (Control)	150[#]	250	500	750[#]	900
Initial Number of Animals												
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Interim	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8
Kidney, Week 26, interim animals												
Absolute weight (g)	3.45	3.68	3.68	3.98*	3.92	4.22*	2.12	2.32	2.26	2.33	2.64*	2.60*
% of body weight	0.606	0.607	0.622	0.650	0.690*	0.688*	0.670	0.718	0.718	0.719	0.799*	0.798*
Kidney, Week 52, main animals												
Absolute weight (g)	3.87	4.37	4.05	4.72*	4.55	4.74*	2.54	2.74	2.81	3.06*	3.15*	3.08*
% of body weight	0.554	0.616	0.602	0.646*	0.706*	0.693*	0.626	0.699	0.700	0.724	0.784*	0.753*
Liver, Week 26, interim animals												
Absolute weight (g)	14.65	15.19	15.52	16.18	15.57	16.41	8.91	8.79	8.97	9.12	10.13	10.23
% of body weight	2.563	2.494	2.601	2.621	2.718	2.658	2.815	2.707	2.847	2.777	3.064	3.135
Liver, Week 52, main animals												
Absolute weight (g)	16.79	16.70	16.96	19.90	16.65	18.42	10.45	10.50	10.97	11.62	11.27	11.74
% of body weight	2.404	2.353	2.482	2.746	2.568	2.663	2.549	2.657	2.720	2.745	2.815	2.867

[illegible]

Nominal Dose (mg/kg/day)		0 (Control)	150 [#]	250	500	750 [#]	900	0 (Control)	150 [#]	250	500	750 [#]	900
Initial Number of Animals													
Main		M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Interim		M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite		M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8
Atrophy, glandular mucosa	Minimal	1	0	0	0	1 (1)	1 (1)	0	0	0	0	1	0
	Mild	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	Total	1	0	0	0	3 (1)	1 (1)	0	0	0	0	1	0
Necrosis	Minimal	0	0	0	0	1 (1)	0	0	0	0	0	0	0
	Mild	0	0	0	0	0	(1)	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

[#] This SNAC dose was administered together with ■ mg/kg/day of ■

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control (pairwise test))

a: 12 animals were found dead, 5 were euthanised moribund.

b: Glandular and non-glandular stomach, all main study and interim animals, incl. decedents. Satellite decedents not examined.

c: Values in brackets () indicate incidence of findings in premature decedents. To get the total incidence, both values should be combined.

d: Values in brackets () indicate number of tissues examined in premature decedents. To get the total number examined, both values should be combined.

N/A not applicable

2.6.7.18.7.G アカゲザルにおける 2 週間経口投与毒性試験 (3007-97)

Study ID: 3007-97

NN Reference Number: 209244

Species/Strain: Rhesus monkey	Duration of Dosing: 2 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-9 GLP Compliance: Yes
Initial Age: Unknown ^a	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 21 August 1997	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 1000, 1500, 2500, 1000 [#] , 1500 [#] , 2500 [#]	Vehicle/Formulation: Deionised water	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Appetite, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical Chemistry, including glucose monitoring, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: In this study, SNAC was administered together with [REDACTED] at three dose levels and alone at three dose levels. For this study, also data from the groups receiving both SNAC and [REDACTED] are presented, as they are considered relevant for the evaluation of SNAC.		
No Observed Adverse-Effect Level: Not established		
Brief conclusion: Two animals dosed with SNAC at 1000 and 2500 mg/kg, respectively, plus [REDACTED], died on the first day of dosing approximately 2 hours post dose. Clinical signs preceded death, but the cause of death was not established. No further deaths were observed during the study, but a range of clinical signs were observed, mainly around 2 hours post dose. Clinical signs comprised emesis, reduced motor activity, transitory recumbency, ptosis and salivation. As the clinical signs were interpreted as signs of hypoglycaemia, interventions were made on a case by case basis, where animals were given bananas or oral/intravenous administration of 50% dextrose, to counteract hypoglycaemia. However, glucose monitoring showed that inter-animal variability was wide and that glucose levels did not suggest a hypoglycaemic effect of SNAC. No other treatment related effects than mortality and clinical signs were observed in this study. Due to the mortality and clinical signs observed, a NOAEL could not be established.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1000	1500	2500	1000 [#]	1500 [#]	2500 [#]	0 (Control)	1000	1500	2500	1000 [#]	1500 [#]	2500 [#]
Initial Number of Animals														
Main	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	F: 2	F: 2	F: 2	F: 2	F: 2	F: 2	F: 2
Satellite					M: 3 ^b		M: 2					F: 2		F: 3 ^b
Toxicokinetics														
AUC _{0-24h} (ng*h/mL)														
Day 1	ND	ND	ND	ND	509000	ND	388000	ND	ND	ND	ND	162000	ND	608000
Day 14	ND	ND	ND	ND	183000	ND	394000	ND	ND	ND	ND	191000	ND	341000
C _{max} (ng/mL)														
Day 1	ND	ND	ND	ND	352000	ND	373000	ND	ND	ND	ND	66300	ND	397000
Day 14	ND	ND	ND	ND	157000	ND	87800	ND	ND	ND	ND	80600	ND	108000
Noteworthy Findings														
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Clinical signs^c														
Vomiting	0	0	2	2	6	3	12	0	0	9	9	2	5	11
Salivation	0	1	8	5	3	1	6	0	3	14	12	12	8	27
Material on tray (mucoid/liquid/wet, beige/brown/red)	0	0	4	1	0	2	10	0	1	5	7	0	0	12
Activity decreased	0	1	0	1	3	0	2	0	0	0	4	2	3	10
Lying on cage floor	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Eyes closed, partially or fully	0	0	0	0	4	0	2	0	0	0	3	2	2	1

[#] This dose of SNAC was administered together with ■■■ U/kg/day of ■■■■

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. control ; (pairwise test)

a: Age at start of dosing does not appear from the report, however, the weight range was 2.4-3.8 kg for males and 2.0-3.7 kg for females, indicating that animals were infants/juveniles.

b: A satellite male at 1000# mg/kg/day and a satellite female at 2500# mg/kg/day died on day 1 and was immediately replaced with two other animals.

c: Number of occasions

ND Not done.

2.6.7.18.7.H カニクイザルにおける 4 週間経口投与毒性試験 (694-5 Part 1 及び Part 2)

Study ID: 694-5, Part 1 and 2
NN Reference Number: 211248

Species/Strain: Cynomolgus monkey	Duration of Dosing: 4 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-10 (Part 1) and 4.2.3.2-B-11 (Part 2)
Initial Age: Young adults ^a	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: Part 1: 20 November 1995; Part 2: 23 January 1996	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 800 [#] , 1200 [#] , 1800 [#] , 0, 1800	Vehicle/Formulation: 25% v/v aqueous propylene glycol in water	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Appetite, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: In this study, SNAC was administered together with [REDACTED] at three dose levels (Part 1) and alone at one dose level (Part 2). For this study, also data from the groups receiving both SNAC and [REDACTED] are presented, as they are considered relevant for the evaluation of SNAC.		
No Observed Adverse-Effect Level: Not established		
Brief conclusion: Three males treated with SNAC were euthanised approx. 2.5 h post dose due to clinical signs, on days 27, day 2 and day 3, respectively. Clinical signs occurred shortly after dosing and consisted of decreased activity, then recumbency, closed eyes and coma. Treatment with dextrose was unsuccessful. Similar, but transient, clinical signs were observed across all SNAC treated groups mainly during the 2 hour observation period. The incidence of clinical signs decreased as of day 7 after the introduction of an early morning feeding. Histopathology revealed no findings which could explain the condition of the animals. Platelets were slightly elevated for three individual SNAC treated females. The relationship to SNAC and the toxicological significance of this finding is uncertain. On day 15, levels of inorganic phosphorus were significantly decreased in some individual SNAC treated animals, but had reached normal levels on day 29. This was considered possibly secondary to the emesis observed mainly during the first week of dosing. Urinalysis revealed increased ketones in the urine and slightly low urinary pH. In addition to this, body weight-relative kidney weights and liver weights were slightly increased, although the dose response was not clear in all cases. As there were no correlating histopathological changes to these findings, they were not considered adverse. Due to the mortality and clinical signs observed, a NOAEL could not be established.		

	Part 1								Part 2			
Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	800 [#]	1200 [#]	1800 [#]	0 (Control)	800 [#]	1200 [#]	1800 [#]	0 (Control)	1800	0 (Control)	1800
Initial Number of Animals Main	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	F: 3	F: 3	F: 3	F: 3	M: 2	M: 3	F: 2	F: 3
<u>Noteworthy Findings^b</u>												
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Clinical signs^c												
Emesis	1	15	25	34	0	9	14	42	0	7	0	19
Salivation	0	2	6	3	1 ^d	3	16	8	0	2	0	8
Activity decreased	0	12	16	15	3 ^d	2	6	10	0	4	0	7
Lying down	0	1	11	1	0 ^d	1	0	7	0	5	0	6
Eyes closed	0	4	6	7	2 ^d	3	2	4	0	1	0	0
Urinalysis												
Ketones												
Pretreatment	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Day 15, trace ^e	N	N	N	N	N	1	1	1	N	1	N	N
Day 29, trace, 1.5 or 3.9 mmol/L ^e	N	1	2	N	N	1	2	2	1	2	N	2
pH												
Pretreatment	7.7	7.5	6.8	7.8	7.2	7.3	7.3	≥7.8	7.3	≥8.0	7.5	7.3
Day 15	7.5	7.7	6.5	7.3	8.0	6.8	5.2	5.0	7.0	5.5	7.3	6.8
Day 29	7.0	6.2	5.0	5.3	6.3	6.0	5.0	5.0	7.0	5.0	7.3	5.3
Organ weights												
Kidney												
% of body weight	0.459	0.449	0.602	0.540	0.444	0.500	0.479	0.528	0.397	0.562	0.399	0.491
Liver												
% of body weight	2.033	2.372	2.553	2.205	1.819	2.155	2.543	2.593	1.988	2.516	2.149	2.325

This dose of SNAC was administered together with ■mg/kg/day of ■■■■■

a: Age at start of dosing does not appear from the report, however, the weight range was 2.4-3.8 kg for males and 2.0-3.7 kg for females, indicating that animals were infants/juveniles.

b: No statistical analysis carried out due to the low number of animals in each group.

c: Number of occasions

d: These signs were all observed in one single animal and were considered part of normal resting behaviour.

e: Incidence

N: negative

2.6.7.18.7.1 アカゲザルにおける 13 週間経口投与毒性試験 (3060-98)

Study ID: 3060-98

NN Reference Number: 209245

Species/Strain: Rhesus monkey	Duration of Dosing: 13 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-12 GLP Compliance: Yes
Initial Age: 2-3 years old	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 07 January 1999	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0 and 1800 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Deionised water	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Appetite, Ophthalmoscopy, Electrocardiography, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: This study was designed to assess the toxicity of SNAC administered alone and in combination with [REDACTED]. Only data from controls and the group receiving SNAC only are presented here		
No Observed Adverse-Effect Level: Not established		
Brief conclusion: Increased incidences of salivation were observed in SNAC treated animals both immediately after dosing and slightly later. Other clinical signs, such as vomiting, decreased activity, lying on cage floor, somnolence, and uncoordinated movements, were observed later, mainly between 1 and 3 hours post dose, but were sometimes also observed outside this range. There were no effects on body weight, but appetite seemed slightly reduced in the SNAC treated animals. Urinalysis revealed slight changes in urinary electrolytes. Although there was a minimal increase in kidney weights, the electrolyte changes in the urine were not associated with any histopathological changes, and were consequently considered non-adverse. Liver weights were moderately increased in the SNAC treated group, but in the absence of any associated clinical pathology changes or histopathological findings, the increased liver weights were considered of uncertain toxicological significance. In addition, thymus weights were slightly low in the SNAC treated group. Due to the observed clinical signs and the uncertain effect on liver weights, a NOAEL could not be established.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1800	0 (Control)	1800
Initial Number of Animals				
Main	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4
Noteworthy Findings				
Clinical signs^a				
Salivation, ≤ 4 min post dose	71/4	267/4	18/4	241/4
Salivation, > 4 min post dose	2/1	15/4	0/0	16/3
Vomiting, > 4 min post dose	2/1	83/4	5/4	28/4
Material on cage tray	1/1	42/4	1/1	21/4
Undigested food on tray	0/0	3/2	0/0	3/2
Decreased activity	0/0	7/3	0/0	14/4
Lying on cage floor	0/0	8/2	0/0	1/1

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	1800	0 (Control)	1800
Initial Number of Animals				
Main	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4
Somnolence	0/0	4/2	0/0	6/2
Uncoordinated movements	0/0	0/0	0/0	6/4
Appetite				
Day 1- 91(%)	99	91	100	81
Urinalysis				
Potassium (mmol/L)				
Pre-treatment	68	72	87	61
Week 13	74	33	78	51
Sodium (mmol/L)				
Pre-treatment	72	58	63	66
Week 13	65	90	69	162
Chloride (mmol/L)				
Pre-treatment	72	75	91	82
Week 13	54	36	55	36
Organ weights				
Liver				
Absolute weight (g)	75.2	117.0	76.4	101.8
% of body weight	1.950	2.859	2.199	2.981
Kidneys				
Absolute weight (g)	15.52	18.32	15.37	15.72
% of body weight	0.403	0.447	0.443	0.464
Thymus				
Absolute weight (g)	6.23	3.26	4.48	3.39
% of body weight	0.157	0.080	0.131	0.100

a: Number of occasions/animals with clinical sign

2.6.7.18.7.J カニクイザルにおける 16 週間経口投与毒性試験及び 2 週間回復性試験
(JLY0387)

Study ID: JLY0387
NN Reference Number: 212246

Species/Strain: Cynomolgus monkey	Duration of Dosing: 16 weeks, preceded by a 2-week escalation period	Location in CTD: 4.2.3.2-B-13
Initial Age: 32-44 months	Duration of Post-dose: 2 weeks	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 18 September 2012	Method of Administration: Oral (tablet)	
Nominal Dose Levels: 0 and 300 mg/animal/day	Vehicle/Formulation: Tablet containing 300 mg SNAC, 80 mg microcrystalline cellulose (filler), 8 mg povidone (binder), 9.7 mg magnesium stearate (lubricant). Control animals were dosed with an empty capsule of hydroxypropyl methylcellulose.	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Electrocardiography, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology		
Special Features: This study was designed to assess the toxicity of NNC0113-0987 when administered by tablets containing SNAC as an absorption enhancer. To distinguish potential findings between those related to SNAC and those related to NNC0113-0987, a SNAC only group and a control group were included. Only data for the control group and the group receiving SNAC only are presented here.		
No Observed Adverse-Effect Level: 300 mg/animal/day ~ 100 mg/kg/day		
Brief conclusion: Resistance to dosing, followed by retching and salivation, most frequent immediately after dosing, were observed in the SNAC dosed animals. As the dosing procedure was similar to the procedure in the control animals, these signs were considered related to SNAC, possibly due to the taste, but due to the transient nature of the signs, they were considered to be non-adverse. Food consumption was slightly reduced in the SNAC treated group, however, only males had an overall reduction in body weight gain compared with the controls, whereas the body weight gain in females was slightly increased. Consequently the relationship to treatment is uncertain and the findings considered of no toxicological significance. Urinalysis revealed a slight, non-adverse, increase in sodium and potassium output in females, potentially an adaptive effect secondary to excretion of sodium from the SNAC molecule. Thymus weights were low in the SNAC treated males and in one male this correlated with a macroscopically small thymus and a histologic finding of decreased cellularity in the cortex of thymus. The thymus findings might be related to the stress observed during dosing due to the taste of SNAC, and thus the reduced thymus weights were considered to be of no toxicological significance. In the absence of any adverse findings, a NOAEL of 300 mg/animal/day, corresponding to approximately 100 mg/kg/day, was established.		

Nominal Dose (mg/animal/day)		0 (Control)	300	0 (Control)	300
Initial Number of Animals					
Main		M: 4	M: 4	F: 4	F: 4
Recovery		M: 0	M: 0	M: 3	M: 3
Toxicokinetics					
AUC _{0-24h} (ng*h/mL)					
	Week 1	N/A	23100	N/A	23000
	Week 16	N/A	25300	N/A	21300
C _{max} (ng/mL)					
	Week 1	N/A	9050	N/A	8970
	Week 16	N/A	9440	N/A	8340
<u>Noteworthy Findings</u>					
Clinical signs					
Rethcing, Week -1-16					
Average number of animals per week (range)		0 (0-0)	0.5 (0-1)	0 (0-0)	0.6 (0-2)
Salivation, Week -1-16					
Average number of animals per week (range)		0.2 (0-2)	6.1 (3-7)	0.11 (0-1)	6.5 (3-7)
Resistant to dosing, Week -1-16					
Average number of animals per week (range)		0.1 (0-1)	1.7 (0-4)	0.1 (0-1)	1.8 (0-4)
Urinalysis					
Volume (mL)					
Pre-treatment		25	27	27	32
Week 16		125	108	40	91**
Sodium (mmol)					
Pre-treatment		1.923	1.845	1.257	1.670
Week 16		3.610	3.498	2.690	4.032
Chloride (mmol)					
Pre-treatment		1.851	1.397	2.356	2.344
Week 16		4.920	3.214	2.219	4.031*
Organ weights					
Thymus					
Absolute weight (g)		4.889	2.308*	1.579	1.946

Nominal Dose (mg/animal/day)	0 (Control)	300	0 (Control)	300
Initial Number of Animals				
Main	M: 4	M: 4	F: 4	F: 4
Recovery	M: 0	M: 0	M: 3	M: 3
% of body weight	0.1448	0.0627**	0.0549	0.0651
Macropathology				
Thymus (number examined)	4	4	4	4
Small	0	1	0	0
Histopathology				
Thymus (no. examined)	4	4	4	4
Cellularity decreased, cortex, minimal	0	1	0	0

* p<0.05, ** p<0.01, vs. control; (pairwise test)

N/A not applicable

2.6.7.18.7.K アカゲザルにおける 39 週間経口投与毒性試験 (BNA00003)

Study ID: BNA00003

NN Reference Number: 209258

Species/Strain: Rhesus monkey	Duration of Dosing: 39 weeks	Location in CTD: 4.2.3.2-B-14
Initial Age: 2.6-4.8 years	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 10 April 2007	Method of Administration: Nasogastric (gavage)	GLP Compliance: Yes
Nominal Dose Levels: 0, 150 [#] , 200, 300, 500 [#] , 600 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Deionised water	
Parameters collected: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Electrocardiography, Haematology, Clinical Chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Organ Weights, Macropathology, Histopathology.		
Special Features: In this study, SNAC was administered together with [REDACTED] at two dose levels and also data from the groups receiving both SNAC and [REDACTED] are presented, as they are considered relevant for the evaluation of SNAC.		
No Observed Adverse-Effect Level: 300 mg/kg/day		
Brief conclusion: Decreased activity, lethargy and/or recumbency were observed sporadically across the treated groups. At 500 and 600 mg/kg/day, these signs were considered to be adverse due to the incidences and the assessment of need for treatment (dextrose, lactate Ringers solution or fruit) of 4 animals which were recumbent on one day each. At 150 and 200 mg/kg/day, two animals were lethargic, each on one single day. As these animals were not recumbent and did not require treatment, and as it were isolated occurrences, the clinical signs observed in these two animals were not considered adverse. Consequently, 300 mg/kg/day was considered to be the NOAEL.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	150 [#]	200	300	500 [#]	600	0 (Control)	150 [#]	200	300	500 [#]	600
Initial Number of Animals Main	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	F: 3	F: 3	F: 3	F: 3	F: 3	F: 3
Toxicokinetics												
AUC (ng*h/mL)												
Day 1	N/A	27900	29100	46800	76600	94100	N/A	16800	27900	53800	70400	189000
Day 90	N/A	15200	24000	29800	73600	176000	N/A	17200	23600	49000	103000	148000
Day 180	N/A	15500	20600	32500	50800	85500	N/A	16600	27300	40200	104000	65600
C _{max} (ng/mL)												
Day 1	N/A	26500	50500	39400	58100	142000	N/A	52300	17400	37500	44800	114000
Day 90	N/A	9000	16300	16400	29400	105000	N/A	13100	7260	16100	43400	62600
Day 180	N/A	12500	12500	13400	17500	55200	N/A	11700	7810	21500	35700	62500
Noteworthy Findings												
Clinical signs^a												
Decreased activity	0/0	0/0	1/1	0/0	43/3	10/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	12/2
Lethargy	0/0	1/1	1/1	0/0	4/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Recumbent	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1

[#] This dose of SNAC was administered together with ■ mg/kg/day of ■

a: Number of occasions/animals with clinical sign. The incidences are combined a.m. cage side observations and 1 h post dose observations. If an observation appeared both a m. and post dose, this is given as one occasion

N/A not applicable

2.6.7.18.8 遺伝毒性試験 : *In vitro*

Test Article: SNAC

2.6.7.18.8.A 4 系統のヒスチジン要求株 *Salmonella typhimurium* 及び 1 系統のトリプトファン要求株 *Escherichia coli* を用いた復帰突然変異試験 (0725-2140)

Study ID: 0725-2140

NN Reference No.: 209248

Test for Induction of: Reverse mutation in bacterial cells	No. of Independent Assays: 2	Location in CTD: 4.2.3.3.1-B-1
Strains: <i>Salmonella typhimurium</i> and <i>Escherichia coli</i> (TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2 uvrA)	No. of Replicate Cultures: 3 No. of Cells Analysed/Culture: 250-500	GLP Compliance: Yes
Metabolising System: Aroclor-induced rat liver S-9		Date of Treatment: 31 January 2002
Vehicles: For Test Article: sterile, deionised, distilled water For Positive Controls: NaAz and MMS: Sterile, deionised, distilled water. Others: DMSO		
Treatment: Treated/incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for approximately 69.5 hours (assay 1) and 70.25 hours (assay 2) up to 5000 µg/plate with and without induced rat liver S-9		
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		
Brief conclusion: SNAC did not induce any significant increase in the number of revertant colonies in any of the tester strains with or without a metabolic activation system (induced rat liver S-9) when tested at up to 5000 µg/plate.		

2.6.7.18.8.B 培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (0545-3300)

Study ID: 0545-3300

NN Reference No.: 209249

Test for: Induction of chromosome aberrations	No. of Independent Assays: 3 without activation and 1 with activation	Location in CTD: 4.2.3.3.1-B-2
Strains: Human peripheral blood lymphocytes from female donors	No. of Replicate Cultures: 2	GLP Compliance: Yes
Metabolising System: phenobarbital/β-naphthoflavone-induced rat liver S-9	No. of Cells Analysed/Culture: 100	
Vehicles: For Test Article: Deionised, distilled water For Positive Controls: Deionised, distilled water		
Treatment: 3 hours treatment and 21 hours harvest Maximum tested concentration = 5000 µg/mL.		Date of Treatment: 12 April 1999
Cytotoxic Effects: None		
Genotoxic Effects: None		
Brief conclusion: SNAC did not induce statistically significant increases in chromosome aberrations compared to the solvent controls when tested at concentrations up to 5000 µg/ml, neither in the absence nor the presence of metabolic activation (S-9).		

2.6.7.18.9 遺伝毒性試験 : *In vivo*

Test Article: SNAC

2.6.7.18.9.A SNAC 投与マウスにおける骨髓小核試験 (0374-1521)

Study ID: 0374-1521

NN Reference No.: 209250

Test for: Induction of micronuclei in the bone marrow of treated mice	Treatment Schedule: One administration.	Location in CTD: 4.2.3.3.2-B-1
Species/Strain: Mouse/CD-1	Sampling Time: 24, 48 and 72 hours after dose administration. 24 hours for the positive control.	GLP Compliance: Yes
Age: 42 days	Method of Administration: Oral gavage	
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes (PCE), normochromatic erythrocytes (NCE) and micronucleated polychromatic erythrocytes (MPCE)	Vehicle/Formulation: 25% v/v propylene glycol solution	Date of Treatment: 5 December 1995
No. of Cells Analysed/Animal: at least 2000 PCE		
Special Features: None		
Toxic/Cytotoxic Effects: A range-finding test was performed at dose levels ranging from 10-2000 mg/kg. Two of three males and one of three females died at 2000 mg/kg, and one female died at 1000 mg/kg approximately 30 minutes after dosing. Animal deaths were preceded by convulsions. No clinical signs were noted in the micronucleus assay animals dosed up to 1000 mg/kg.		
Genotoxic Effects: None		
Brief conclusion: SNAC was negative in the micronucleus assay in male and female mice treated up to 1000 mg/kg (the maximum tolerated dose).		

2.6.7.18.10 がん原性試験

Test Article: SNAC

2.6.7.18.10.A rasH2 マウスにおける 26 週間経口投与がん原性試験 (JLY0436)

Study ID: JLY0436
NN Reference No.: 213067

Species/Strain: Mouse/tg rasH2	Duration of Dosing: 26 weeks	Location in CTD: 4.2.3.4.2-B-1 GLP Compliance: Yes Treatment of Controls: Vehicle
Initial Age: Approximately 9 weeks at dosing start	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 16 July 2013	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 30, 100 and 300 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Water for injection, pH adjusted to 8-8.5	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition (including palpation of masses), Body Weight, Food Consumption, Toxicokinetics, Macropathology, Histopathology

Basis for High-Dose Selection: The high dose level of 300 mg/kg/day was considered to be the maximum tolerated dose for 26 weeks

No Observed Adverse Effect Level: 300 mg/kg/day

Brief conclusion: In total, 4 males and 3 females died or were euthanised during the study. None of the deaths were considered treatment related. There were no palpable masses detected in any animal treated with SNAC and, consequently, the group distribution, multiplicity and mean onset time of palpable swellings were unaffected by treatment. The macroscopic and histopathological examination did not reveal any lesions of toxicological significance considered to be related to treatment with SNAC. Specifically, there were no treatment-related neoplastic findings. A finding of uncertain relationship to treatment was seen in the urinary bladder where higher incidences of lymphoid aggregates were seen in treated males. The finding was not associated with any cell damage, inflammation or other cell reactions and was therefore considered of no toxicological significance.

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	30	100	300	0 (Control)	30	100	300
Initial Number of Animals								
Main	M: 25	M: 25	M: 25	M: 25	F: 25	F: 25	F: 25	F: 25
Satellite	M: 6	M: 21	M: 21	M: 21	F: 6	F: 21	F: 21	F: 21
<u>Toxicokinetics</u>								
AUC _{last} (ng*h/mL)								
Day 1	N/A	41.9	397	1680	N/A	42.9	535	1770
Day 182	N/A	56.7	387	2070	N/A	271	666	4380
C _{max} (ng/mL)								
Day 1	N/A	56.2	201	512	N/A	73.1	367	1030
Day 182	N/A	90.6	334	2310	N/A	209	628	1750
Group Distribution of Mortality (main study)^a								
Number of decedents	3	0	0	1	1	0	1	1
Number of survivors	22	25	25	24	24	25	24	24
% survival	88	100	100	96	96	100	96	96
<u>Noteworthy Findings</u>								
Histopathology								
Urinary bladder (no. exam.)	25	25	25	25	24	25	25	25
Aggregates. lymphoid								
Minimal	0	3	4	8	13	12	13	13
Slight	0	0	0	0	0	0	1	1
Total	0	3	4	8**	13	12	14	14

a: None of the deaths were considered related to SNAC

** p<0.01 vs. control (pairwise test)

N/A not applicable

2.6.7.18.10.B Sprague Dawley ラットにおける 104 週間経口投与がん原性試験
(JLY0366)

Study ID: JLY0366
NN Reference No.: 211519

Species/Strain: Rat / Sprague Dawley	Duration of Dosing: 104 weeks	Location in CTD: 4.2.3.4.1-B-1 GLP Compliance: Yes Treatment of Controls: Vehicle
Initial Age: 36-42 days at dosing start	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 23 May 2012	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 75, 200 and 500 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Water for injection, pH adjusted to 8-8.5	

Parameters collected: Viability, Clinical Condition (including palpation of masses), Body Weight, Food Consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Clinical chemistry, Urinalysis, Toxicokinetics, Macropathology and Histopathology

Basis for High-Dose Selection: The high dose level of 500 mg/kg/day was considered to be the maximum tolerated dose for 104 weeks

No Observed Adverse Effect Level: 75 mg/kg/day in females and 500 mg/kg/day in males

Brief conclusion: Although mortality was increased in females given 200 or 500 mg/kg/day compared to control animals there were no associated clinical signs observed and no consistent cause of death identified at the histopathological examination. These females had a slightly higher weight gain than the controls, which may have been contributory to the increased mortality. Males showed slightly reduced weight gain from Week 8 at 500 mg/kg/day which associated with a small reduction of food consumption. However, these findings in the males on bodyweight gain and food consumption were not considered adverse due to the small magnitudes of the findings. Variations of some erythrocyte indices were apparent in at 500 mg/kg/day. However, as the changes were minimal, and in the absence of any effect on haemoglobin concentrations, they were considered non-adverse. High plasma triglyceride and low total plasma cholesterol concentrations in females receiving 500 mg/kg/day may suggest a disruption of intra-hepatocyte fat metabolism. However, this effect did not associate with any histopathological changes in the hepatocytes and consequently these changes were considered to be of no toxicological significance. An increase in urinary sodium output was observed together with decreased potassium output and low urinary pH. In the absence of any associated treatment related histopathological findings, these changes were considered non-adverse and were attributed to an adaptive increased rate of excretion of sodium derived from the SNAC molecule. There were no neoplastic or non-neoplastic changes that were attributable to treatment with SNAC and this study therefore demonstrated that SNAC was not carcinogenic to rats. The NOAEL was considered to be 75 mg/kg/day in females due to the increased mortality at the higher dose levels, and 500 mg/kg/day in males in the absence of any adverse findings.

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	75	200	500	0 (Control)	75	200	500
Initial Number of Animals	M: 72	M: 72	M: 72	M: 72	F: 72	F: 72	F: 72	F: 72
Toxicokinetics								
AUC _{0-4h} (ng*h/L)								
Week 1	N/A	904	3420	27600	N/A	919	9070	39800
Week 50	N/A	3100	17400	55900	N/A	3520	26600	82600
Week 99	N/A	6800	22100	64600	N/A	1520	3970	43700
C _{max} (ng*h/mL)								
Week 1	N/A	404	1780	94200	N/A	670	27400	110000
Week 50	N/A	4880	37800	156000	N/A	9520	120000	258000
Week 99	N/A	29100	82000	197000	N/A	1930	9170	160000
Group Distribution of Mortality								
Number of decedents	43	50	44	38	44	46	53	54
Number of survivors	29	22	28	34	28	26	19	18
% survival	40	31	39	47	39	36	26	25
Noteworthy Findings								
Bodyweight gain								
Week 8 to Week 52 (g)	287	295	289	259**	136	142	160*	149*
Week 0 to 104 (g)	586	626	614	566	326	372	379	377
Food consumption								
Mean Week 1-52 (g/animal/week)	200	199	197	196	136	135	135	136
Mean Week 1-104 (g/animal/week)	201	201	200	195*	143	139	141	140
Haematology Week 99 (females) or Week 104 (males)								
Red Blood Cell (RBC) (*10 ¹² /L)	7.63	7.49	8.23	8.21	6.85	7.22	7.33	7.55*
Mean Cell Haemoglobin (MCH) (pg)	18.0	17.2	17.6	16.9*	19.9	19.4	19.6	18.7**
Mean Cell Volume (MCV) (fL)	56.5	54.8	54.9	53.3**	61.5	59.4	60.2	58.0**
Clinical chemistry Week 99 (females) or Week 104 (males)								
Cholesterol (mmol/L)	2.86	2.60	3.40	2.55	3.54	3.52	3.13	2.89*

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	75	200	500	0 (Control)	75	200	500
Initial Number of Animals	M: 72	M: 72	M: 72	M: 72	F: 72	F: 72	F: 72	F: 72
Triglycerides (mmol/L)	1.39	1.43	1.80	1.35	1.11	1.47	1.49	2.10**
Urinalysis Week 99 (females) or Week 104 (males)								
pH	7.4	7.1	7.0*	6.9**	6.4	6.4	6.2	6.2
Sodium (mmol/L)	56.6	74.9*	71.7*	105.7**	59.4	60.8	64.9	67.8
Potassium (mmol/L)	108.0	108.1	96.0	88.2*	94.5	84.9	86.9	72.9**

* p<0.05, ** p<0.01 vs. control; (pairwise test)

N/A not applicable

2.6.7.18.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: SNAC

Species / Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number:
Rat/Sprague Dawley	Oral (gavage)	GD 7 – 17	0 1000 2000	8 F 8 F 8 F	At 1000 and 2000 mg/kg/day, 1 female in each group was found dead on GD 9 and GD 7, respectively. There were no adverse clinical signs and necropsy did not reveal the cause of death. Clinical signs of excess salivation, chromorhinorrhea and red perioral substance were seen in one or both treated groups but were limited to 1-2 animals per group. Dose-dependent reduction in maternal bodyweight gain was seen at both dose levels, particularly between GD 7 – GD 12 with reduced food consumption being evident throughout treatment at 2000 mg/kg/day. Foetal weight was reduced at 2000 mg/kg/day. No other foetal development or litter parameters were affected.	805-002P	209252
Rabbit / New Zealand White	Oral (gavage)	GD 6-18	0 1000 1500 2000 2500 3000	6 F 6 F 6 F 6 F 6 F 6 F	Treatment related mortalities (euthanised moribund or found dead) occurred in 2/6, 4/6, 5/6 and 6/6 animals at 1500 ^a , 2000 ^b , 2500 ^c and 3000 ^d mg/kg/day, respectively. Necropsy did not identify the cause of death. Clinical signs of decreased motor activity, laboured breathing, prostration, slight ataxia, impaired/lost righting reflex, vocalisation, scant/no faeces, excess salivation and emaciation were seen in one or more groups	805-001P	209255

Species / Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number:
					treated at ≥ 1500 mg/kg/day. At 1000 mg/kg/day, clinical sign was limited to decreased motor activity in 1 animal. Body weight loss and reduced food consumption was seen at ≥ 2000 mg/kg/day in the initial dosing period. At 1500 mg/kg/day, body weight loss or reduced body weight gain and food consumption was evident throughout treatment up till GD24 with the 1000 mg/kg/day dose group showing body weight loss and reduced food consumption only during the first three days of treatment. At 1500 mg/kg/day and higher doses ^e , increase in resorptions and percentage of does with any resorptions were seen. Furthermore, at 1500 mg/kg/day, 1 dead foetus was seen in 1 litter and in another litter 1 foetus showed medially rotated and flexed hindlimbs. No foetal development or litter parameters were affected at 1000 mg/kg/day.		

a: One (1) female was euthanised on GD9 and one female aborted on GD24 and was subsequently euthanised

b: One (1) female was found dead on GD7 and 3 females were euthanised on GD8, GD8 and GD16, respectively. The female euthanised on GD16 showed pinpoint red areas in fundic and non/fundic regions of the stomach

c: One (1) female was found dead and 3 females were euthanised on GD7. One female was euthanised on GD8

d: Four (4) females were found dead on GD6, GD7, GD7 and GD8, respectively. Two (2) females were euthanised on GD7

e: Pregnant animals at 1500, 2000 and 2500 mg/kg/day: 3, 1, and 1 respectively.

2.6.7.18.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Test Article: SNAC

2.6.7.18.12.A ラットにおける受胎能及び初期胚発生に関する試験（805-003）

Study ID: 805-003
NN Reference No.: 209251

Design similar to ICH S5 Paragraph 4.1.1 : Yes		Location in CTD: 4.2.3.5.1-B-1
Species/Strain: Rat /Sprague Dawley	Day of Mating: Day 0	GLP Compliance: Yes
Duration of Dosing: Males: From 28 days prior to cohabitation continuing through a 21-day cohabitation period and until termination (77-81 days of dosing) Females: 15 days before cohabitation and continuing through day 7 of gestation		
Initial Age:Approx.79 days (males) and 91 days (females) at dosing start	Day of Caesarean Section: Gestation day 20	
Date of First Dose: Males 14 July 1998 Females 27 July 1998	Method of Administration: Oral (gavage)	Nominal Dose Levels: 0, and 1000 mg/kg/day
	Vehicle/Formulation: Reverse osmosis deionized water	
Parameters collected: Dams and Males: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Oestrous Cycle, Sperm motility and concentration (CASA analysis), Mating Performance, Fertility, Pregnancy Performance, Macropathology, Male Reproductive Organ Weights Foetuses: Body Weight and External Pathology		
Special Features: This study was designed to assess the toxicity of SNAC administered alone and in combination with [REDACTED] Only data from controls and the single group receiving SNAC only are presented here.		
NOAEL		
Reproductive performance and fertility: 1000 mg/kg/day		
Early embryonic development: 1000 mg/kg/day.		
Brief conclusion: Once-daily oral administration of SNAC at a dose level of 1000 mg/kg/day resulted in clinical signs, predominantly excessive salivation in both sexes. In males and pregnant females, reduced body weight gain was seen along with decreased food consumption (females only). There were no effects related to treatment on mating performance, fertility, pregnancy performance or litter data. Consequently, the NOAEL for fertility and early embryonic development was considered to be 1000 mg/kg/day.		

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	1000
Initial number of animals		
Main	25 M & 25 F	25 M & 25 F
<u>MALES</u>		
<u>Noteworthy Findings</u>		
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0
Clinical signs^b		
Excess salivation	0/0	430/25**
Cold to touch	0/0	3/2
Decreased motor activity	0/0	1/1
Laboured breathing	0/0	1/1
Red and perioral dry substance	0/0	1/1
Chromorhinorrhea	0/0	4/2
Ungroomed coat	0/0	8/1
Urine-stained abdominal fur	0/0	19/3
Bodyweight gain		
Day 56- 63	9.8	3.8*
Day 63- 70	9.2	3.3
<u>FEMALES (dams/does)</u>		
<u>Noteworthy Findings</u>		
Died or euthanised/terminated prematurely	0	1 ^a
Clinical signs^b		
Excess salivation (precohabitation)	0/0	64/23**
Excess salivation (gestation)	0/0	71/21**
Bodyweight gain (g)		
GD0- 8	29.1	24.5

Nominal Dose Levels (mg/kg/day)	0 (Control)	1000
Initial number of animals		
Main	25 M & 25 F	25 M & 25 F
Food consumption (g/kg/day)		
Day 8- 15	84.4	76.3*
GD0 - 8	87.3	81.2*

* p<0.05, ** p<0.01, vs. control (pairwise test)

GD - Gestation day(s)

a: Animal No.11336 was moribund sacrificed on study day 17 (day 2 of cohabitation) due to broken incisors and palate which was clearly unrelated to treatment

b: Total occurrence/No. of animals

2.6.7.18.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験

Test Article: SNAC

2.6.7.18.13.A ラットにおける胚・胎児の発生に関する試験（805-002）

Study ID: 805-002
NN Reference No.: 209253

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: Gestation day (GD)7 to 17	Location in CTD: 4.2.3.5.2-B-2
Initial Age: Approx. 11weeks at dosing start	Day of Mating: Day 0	GLP Compliance: Yes
Date of First Dose: 17 March 1998	Day of Caesarean Section: GD20	
Nominal Dose Levels: 0 and 1000 mg/kg/day	Vehicle: Reverse osmosis deionised water	Method of Administration: Oral (gavage)

Parameters collected:**Dams:** Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Macropathology, Pregnancy Performance**Foetuses:** Body Weight and External, Visceral, and Skeletal Foetal Pathology**Special Features:** This study was designed to assess the toxicity of SNAC administered alone and in combination with [REDACTED]. Only data from controls and the single group receiving SNAC only are presented here**Maternal NOAEL:** <1000 mg/kg/day**Developmental NOAEL:** 1000 mg/kg/day**Brief conclusion:**

Once-daily oral administration of SNAC at a dose level of 1000 mg/kg/day resulted in adversely reduced maternal body weight gain and food consumption. There were no effects related to treatment on pregnancy performance or litter data. Consequently, the maternal NOAEL was lower than 1000 mg/kg/day and the NOAEL for embryo-foetal development was considered to be 1000 mg/kg/day.

Nominal Dose Level (mg/kg/day)	0 (Control)	1000
Initial Number of Animals	25 F	25 F
<u>DAMS</u>		
<u>Noteworthy Findings</u>		
Died or euthanised/terminated prematurely	0	1 ^a
Body weight change (g)		
GD7-10	14.2	8.9**
Food consumption (g/kg/day)		
GD7-10	78.1	71.8*

* p<0.05, ** p<0.01 vs. control (pairwise test)

GD – Gestation day(s)

a: Animal no. 5205 was found dead on GD17 due to an intubation accident which was clearly unrelated to treatment

2.6.7.18.13.B

ウサギにおける胚・胎児の発生に関する試験（805-001）

Study ID: 805-001

NN Reference No.: 209256

Species/Strain: Rabbit / New Zealand White	Duration of Dosing: Gestation day (GD) 16 to 18	Location in CTD: 4.2.3.5.2-B-4
Initial Age: Approx. 25 weeks at dosing start	Day of Mating: day 0	
Date of First Dose: 11 October 1997	Day of Caesarean Section: GD29	GLP Compliance: Yes
Nominal Dose Levels: 0 and 1000 mg/kg	Vehicle/Formulation: Reverse osmosis deionised water	Method of Administration: Oral (gavage)
Parameters collected:		
Females: Viability, Clinical Condition, Body Weight, Pregnancy Performance, Toxicokinetics, Macropathology,		
Foetuses: Foetal Body Weight, External, Visceral and Skeletal Foetal Pathology,		
Special Features: This study was designed to assess the toxicity of SNAC administered alone and in combination with [REDACTED]. Only data from controls and the single group receiving SNAC only are presented here		
Maternal NOAEL: <1000 mg/kg/day		
Developmental NOAEL: 1000 mg/kg/day		
Brief conclusion: Once-daily oral administration of SNAC at a dose level of 1000 mg/kg/day to pregnant New Zealand white rabbits resulted in adverse changes in maternal body weight gain and reduction in food consumption. There were no effects related to treatment on pregnancy performance or litter data. Consequently, the maternal NOAEL was lower than 1000 mg/kg/day and the NOAEL for embryo-foetal development was considered to be 1000 mg/kg/day.		

Nominal Dose Levels (mg/kg day)	0 (Control)	1000
Initial Number of Animals	20 F	20 F
<u>DAMS</u>		
<u>Noteworthy Findings</u>		
Body weight change(kg)		
GD12- 15	0.12 ^a	0.07**
GD15- 19	0.03 ^a	0.09**
GD19- 24	0.15 ^a	0.08*
GD6- 29	0.51 ^a	0.50
Food consumption		
GD6-9 (g/kg/day)	49.2 ^a	41.8
GD6-9 (g/animal/day)	177.9 ^a	150.4*

* p<0.05, ** p<0.01 vs. control (pairwise test)

GD: Gestation Day

a: Excludes value for dam 6420 which had litter consisting of two conceptuses

2.6.7.18.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 **Test Article: SNAC**

2.6.7.18.14.A ラットにおける胚・胎児の発生ならびに出生前及び出生後の発生に関する試験（805-004） **Study ID: 805-004**
NN Reference No.: 209254

Species/Strain: Rat /Sprague Dawley	Duration of Dosing(F₀ dams only): Gestation day (GD)7 to day 20 <i>post-partum</i> (PPD20) (rats that littered) or GD24 (rats that did not litter)	Location in CTD: 4.2.3.5.3-B-1 GLP Compliance: Yes
Initial Age: Approx. 11 weeks at dosing start	Day of Mating: day 0	
Date of First Dose: 10 August 1998	Day of necropsy of F₀ dams: day 21 <i>post-partum</i> (rats that littered) or GD25 (rats that did not litter) Day of necropsy of F₁ generation: Gestation day 20	
Nominal Dose Levels: 0 and 1000 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Reverse osmosis deionised water	Method of Administration: Oral (gavage)
Litters Culled/Not Culled: Culled on day 21 postpartum		

Parameters collected:**F₀ Females:** Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Pregnancy Performance, Macropathology**F₁ generation litter:** Viability, Clinical Condition, Body Weight,**Culled Pups:** Macropathology**F₁ generation rats:** Viability, Clinical Condition, Body Weight, Food Consumption, Neurobehavioral Performance, Sexual Maturation, Mating Performance, Pregnancy Performance, Male Reproductive Organ Weights (testis and epididymis), Macropathology**F₂ generation litter:** Body Weight, External Alterations**Special Features:** This study was designed to assess the potential effects of SNAC administered alone and in combination with [REDACTED]. Only data from controls and the single group receiving SNAC only are presented here**NOAEL:** Not established**Brief conclusion:** Once-daily oral administration of SNAC at a dose level of 1000 mg/kg/day to pregnant Sprague Dawley from GD7 to PPD20 caused clinical signs of excess salivation and a red perivaginal substance, and reduction in body weight and food consumption. The duration of gestation was increased by 3%, and there was an increase in the number of SNAC-treated dams with stillborn pups and the percentage of stillborn pups. Furthermore, there was an increase in the number of dead pups during the first few days of lactation and the average pup weight per litter was increased by 12% on postpartum day 21. These changes are considered adverse, and hence, no NOAEL could be established.

Nominal Dose Levels (mg/kg every day)	0 (Control)	1000
<u>F0 FEMALES</u>		
Initial Number of Animals	25 F	25 F
<u>Noteworthy Findings</u>		
Number Pregnant	24	24
Clinical signs^a		
<i>Gestation</i>		
Excess salivation	0/0	67/22**
<i>Lactation</i>		
Excess salivation	0/0	24/13**
Red perivaginal substance	1/1	9/9**
Body weight change(g)		
GD7-10	12.1	9.3
GD18-20	27.2	20.9**
GD7-20	105.2	93.5**
Food consumption (g/kg/day)		
GD7-10	87.4	78.8**
GD18-20	67.8	62.8*
GD7-20	81.6	78.2*
PPD1-14	167.8	160
Pregnancy Performance		
Number of dams that delivered litters	24	24
Duration of gestation in days ^b	22.7	23.4**
Number of dams delivering		
Days 22.1-23	17	2**
Days 23.1-24	4	19**
Dams with stillborn pups	5	11**
Total pups delivered per litter	14.1	13.4
Liveborn per litter (%)	13.7 (97.3)	12.4(92.2)**
Stillborn per litter (%)	0.4 (2.7)	1.0(7.4)**

Nominal Dose Levels (mg/kg every day)	0 (Control)	1000
<u>F1 LITTER DATA (preweaning)</u>		
<u>Noteworthy Findings</u>		
Number of litters evaluated	24	24
Pups found dead/presumed cannibalised PPD2-4 (%)	9 (2.8)	18 (6.2)**
Live litter size		
PPD 1	13.3	12.2
PPD 4	13.5 ^{c,d}	11.3**
PPD 7	13.5 ^c	11.4**
PPD 14	13.6 ^{c,e}	11.4**
PPD 21	13.6 ^{c,e}	11.4**
Pup weight per litter (grams) PPD 21	33 ^{c,e}	36.9**

* p<0.05, ** p<0.01 vs. control (pairwise test)

GD-Gestation Day

PPD *Post Partum* Day

a: Total occurrence/No. of animals

b: Calculated as the time (to the nearest tenth of a day) elapsed between confirmed mating (defined as 0 hour) and the time the first pup was delivered. Excludes litters in which delivery of first pup was not observed.

c: Excludes values for litters that had no surviving pups

d: Excludes values that were not recorded

e: Excludes value for litter 12620 since the dam was misdosed on PPD 7

2.6.7.18.15 幼若動物を用いた試験

Test Article: SNAC

No studies in juvenile animals conducted.

2.6.7.18.16 局所刺激性

Test Article: SNAC

Species / Strain	Route of Administration	Nominal Doses (mg/animal)	Gender and No. per Group**	Noteworthy Findings	Study ID Number	NN Reference Number
Dog / Beagle	Oral (tablet or liquid gavage)*	0 (liquid gavage) 300 (liquid gavage) 0 (sham tablet) 300 (tablet)	4 M & 4 F 4 M & 4 F 4 M & 4 F 4 M & 4 F	In one of the four dogs which was terminated one hour after dosing with a SNAC tablet, tablet remnants in the stomach were identified macroscopically but no correlating microscopic findings were present at the 'area of rest'. No signs of tablet remnants were seen in the stomachs or intestines of the other dogs given the SNAC tablet. There were no macroscopic (animals terminated at 1 or 24 hours after dosing) or microscopic findings (animals terminated at 1 hour after dosing) related to dosing with the liquid or tablet formulation of 300 mg SNAC/animal.	JLY0558	214326

* Vehicle: liquid: water for injection adjusted to pH 8.5; tablet: 80 g microcrystalline cellulose, 8 mg povidone, 9.7 mg magnesium stearate

** Half of each group was terminated 1 h post dose and the other half at 24 h post dose

2.6.7.18.17 その他の毒性試験

2.6.7.18.17.A 免疫原性

No immunogenicity studies have been conducted with SNAC.

2.6.7.18.17.B 免疫毒性

Species/ Strain	Route of Administration	Duration of Dosing	Nominal Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL (mg/kg/day)	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number
Rat/Sprague Dawley	Oral	4 weeks	0 75 200 500	10 M & 10 F	500	Administration of SNAC was not associated with any lymphoid system histopathology changes, immune response or immunophenotyping effects or any changes in clinical pathology parameters. Based on this, dose levels of up to 500 mg/kg/day were concluded not to produce any immunotoxic effects.	523561	212329

2.6.7.18.17.C 依存性

No dependence studies have been conducted with SNAC.

2.6.7.18.17.D 代謝物

No toxicity studies with metabolites of SNAC have been conducted. However, toxicokinetics of the five principal metabolites have been characterised in several SNAC studies. See Pharmacokinetic Written Summary M 2.6.4.10, Appendix for details.

2.6.7.18.17.E 不純物

Evaluation of impurities is included in Toxicology Written Summary M 2.6.6.11, Appendix, section 2.6.6.11.8.5.

2.6.7.18.17.F 添加物

Not applicable.

2.6.7.18.17.G メカニズム試験

ミトコンドリアの影響に関する *in vitro* 評価

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
Isolated rat mitochondria, submitochondrial particles and HepG2 cells	<i>In vitro</i>	N/A	SNAC: 0-5000µM E494 and E506: 0-30000 µM	N/A	<u>SNAC effect on ATP biosynthesis:</u> ≥500 µM: Significant inhibition in mitochondria energised through complex I (glutamate/malate substrate) ≥5000 µM: Significant inhibition in mitochondria energised through complex II (succinate substrate) <u>SNAC effect on electron transport chain enzyme activity:</u> ≥500 µM: Significant inhibition of complex I enzyme activity in submitochondrial particles with NADH as substrate ≥5000 µM: Significant inhibition of complex II enzyme activity in submitochondrial particles with succinate as substrate <u>E494 effect on ATP biosynthesis:</u> ≥10000 µM: Significant inhibition in mitochondria energised through complex I (glutamate/malate	NN-2013-001	213327	4.2.3.7.3-B-1

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
					substrate) $\geq 30000 \mu\text{M}$: Significant inhibition of complex II enzyme activity in submitochondrial particles with succinate as substrate <u>E506 effect on ATP biosynthesis:</u> $\geq 30000 \mu\text{M}$: Significant inhibition in mitochondria energised through complex I (glutamate/malate substrate) $\geq 30000 \mu\text{M}$: Significant inhibition of complex II enzyme activity in submitochondrial particles with succinate as substrate			
Mouse myoblast (C2C12), mouse pre-adipocyte (3T3-L1), human endometrial (HEC-1B), human astrocyte (LN319) cell lines and rat peripheral blood mono-nuclear cells (PBMC).	<i>In vitro</i>	N/A	SNAC: 0-5000 μM	N = 3	Inhibition of cellular respiration (oxygen consumption rate): C2C12 cells: $\text{IC}_{50}=175 \mu\text{M}$ PBMC cells: $\text{IC}_{50}=181 \mu\text{M}$ HEC-1B: $\text{IC}_{50}=199 \mu\text{M}$ LN319: $\text{IC}_{50}=315 \mu\text{M}$ 3T3-L1 cells: $\text{IC}_{50}=666 \mu\text{M}$	■■■■140919	-	4.2.3.7.3-B-2
Mouse myoblast (C2C12) cell line	<i>In vitro</i>	N/A	SNAC: 0-1000 μM SNAC metabolites (E494, E506;	N = 3	Oxygen consumption rate (% of basal respiration): SNAC (1000 μM): 34% E494 (10000 μM): 43%	■■■■140926	-	4.2.3.7.3-B-3

Species / Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID	NN Reference Number	Location in CTD
			E1245, E1246 and E1247): 0-10000 µM		E506 (10000 µM): 77% E1245, E1246 and E1247 (10000 µM): ≥90%			
Cryopreserved hepatocytes (mouse, rat, monkey and human)	<i>In vitro</i>	N/A	SNAC: 0-10000 µM	N = 3. Cryo-preserved hepatocytes were pools from 3-30 livers	Inhibition of cellular respiration (oxygen consumption rate): Mouse hepatocytes: IC ₅₀ =226 µM Rat hepatocytes: IC ₅₀ =558 µM Human hepatocytes: IC ₅₀ =752 µM Monkey hepatocytes: IC ₅₀ =1214 µM	■■■■140912	-	4.2.3.7.3-B-4
Mouse myoblast (C2C12) cell line	<i>In vitro</i>	N/A	SNAC: 0-4000 µM HSA: 0-1%	N = 3	Inhibition of cellular respiration (oxygen consumption rate) at increasing human serum albumin (HSA) levels: IC ₅₀ =127 (0% HSA) IC ₅₀ =208 (0.2% HSA) IC ₅₀ =361 (0.5% HSA) IC ₅₀ =581 (1% HSA)	■■■■141003	-	4.2.3.7.3-B-5
Permeabilized mouse myoblast (C2C12) cell line	<i>In vitro</i>	N/A	SNAC: 0-4000 µM	N = 4	SNAC≤1000 µM: Dose dependent inhibition of complex I mitochondrial respiration SNAC at 4 mM: Inhibition of mitochondrial respiration downstream of complex I	■■■■141010	-	4.2.3.7.3-B-6

N/A not applicable, - No NN reference number as studies was conducted at Novo Nordisk

ミトコンドリアの影響に関する *in vivo* 検討試験

2.6.7.18.17.H マウスにおける単回投与忍容性及びトキシコキネティクス試験
(JLY0557)

Study ID: JLY0557
NN Reference No.: 214311

Species/Strain: Mouse/CD/1	Duration of Dosing: Single dose	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-7
Initial Age: 7-9 weeks (males) and 9-11 weeks (females)	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: No
Date of First Dose: 12 September 2014	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 150, 500, 1000 mg/kg	Vehicle/Formulation: Water for injection, adjusted to pH 8-8.5	
Parameters collected: Viability, Clinical condition (for 2 hours post dose, Irwin style subjective behavioural observations of any animal exhibiting abnormal behaviour) toxicokinetics of SNAC and 5 principal metabolites (2, 5, 10, 20, and 40 min and 1, 3, 8, 12 and 24 h post-dose, only SNAC data shown)		
Special Features: Mechanistic study to assess tolerability and toxicokinetics of SNAC and its five principal metabolites after a single dose of SNAC		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief conclusion: SNAC was generally well tolerated. However, at 1000 mg/kg, 4 mice, out of a total of 80 mice dosed at this level, displayed adverse clinical signs shortly after dosing which resulted in premature euthanasia of 3 females due to the severity of the clinical signs. There was generally a higher exposure of SNAC in female mice compared to male mice but there was no clear relationship between plasma levels of SNAC and the adverse clinical signs.		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	150	500	1000	0 (Control)	150	500	1000
Initial Number of Animals Main	M: 10	M: 25	M: 25	M: 40	F: 10	F: 25	F: 25	F: 40
<u>Toxicokinetics of SNAC</u>								
AUC _{last} (ng*h/mL)	N/A	2410	12100	37300	N/A	3550	24000	62200
C _{max} (ng/mL)	N/A	11000	80200	121000	N/A	8940	83300	183000
<u>Noteworthy Findings</u>								
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	0	0	0	3 ^a
<u>Clinical signs</u> ^b								
Abnormal respiration (fast/slow abdominal/gasping)	0	0	0	1	0	0	0	2
Apathy	0	0	0	0	0	0	0	1
Reduced startle response	0	0	0	0	0	0	0	2
Reduced alertness	0	0	0	0	0	0	0	2
Reduced touch response	0	0	0	0	0	0	0	2
Passivity	0	0	0	0	0	0	0	2
Reduced body tone	0	0	0	0	0	0	0	1
Walking lower on limbs	0	0	0	0	0	0	0	1
Hunched posture	0	0	0	1	0	0	0	0
Eyes half closed	0	0	0	1	0	0	0	0
Subdued	0	0	0	1	0	0	0	0
Loss of righting reflex	0	0	0	0	0	0	0	2
Restlessness	0	0	0	0	0	0	0	1

a: The 3 animals were euthanised at 7, 15 and 22 min post dose due to the severity of the clinical signs

b: Number of animals showing clinical sign

2.6.7.18.17.I ラットにおけるテレメトリー及びプレチモグラフィ併合試験（0NNC11）

Study ID: 0NNC11
NN Reference No.: 212471

Species/Strain: Rat / Sprague Dawley	Duration of Dosing: 8 days (part 1), 1 day (part 2)	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-8
Initial Age: Unknown, body weight 224g-272g on day of surgical implantation	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: No
Date of First Dose: 27 November 2012	Method of Administration: Oral gavage	
Nominal Dose Levels: 0, 900 and 1500 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Water for injection	
Parameters collected/calculated : Study part 1: Blood pressure (systolic, diastolic and mean), heart rate, respiratory rate, tidal volume, inspiratory time, expiratory time, peak inspiratory flow and peak expiratory flow. Study part 2: Blood pressure (systolic, diastolic and mean), heart rate, ECG (RR, PR, QRS, QT and QTc intervals), respiratory rate, tidal volume, inspiratory time, expiratory time, peak inspiratory flow, peak expiratory flow and body temperature.		
Special Features: The study was designed to assess SNACs combined cardiovascular and respiratory effects.		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief Conclusion: Oral administration of SNAC at 900 and 1500 mg/kg/day resulted in acute decrease in blood pressure and increase in heart rate and respiratory rate. Mortality observed in 7 out of 28 animals was preceded by ECG arrhythmias and respiratory arrest was observed 1 to 5 min prior to death by cardiac arrest.		

Study part and day	Study part 1 (day 1)			Study part 1 (day 8)			Study part 2 (day 1)		
Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	900	1500	0 (Control)	900	1500	0 (Control)	900	1500
Initial Number of Animals Main	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 6	F: 5	F: 6	F: 6	F: 6
<u>Noteworthy Findings</u>									
Mortality^a	0/8	2/8	3/8	0/8	0/6	0/5	0/6	2/6	0/6
CV effects^b									
Systolic blood pressure (mmHg)		-6 (180 min)	-15 (720 min)					-10 (120 min)	-12 (120 min)
Diastolic blood pressure (mmHg)		-9 (30 min)	-14 (30 min)					-14 (30 min)	-8 (120 min)
Mean blood pressure (mmHg)		-5 (180 min)	-9 (30 min)					-11 (120 min)	-10 (120 min)
Heart rate (beats per minute)		+51 (30 min)	+59 (300 min)		+46 (30 min)	+85 (120 min)		+32 (30 min)	+75 (30 min)
Respiratory effects^b									
Respiratory rate (breaths/min)		+20 (30 min)	+21 (30 min)					+30 (30 min)	+16 (30 min)
Tidal volume (mL)		+0.14 (30 min)	+0.15 (30 min)		+0.22 (30 min)	+0.22 (30 min)		+0.17 (30 min)	-0.12 (30 min)
Minute volume (mL/min)		+40 (30 min)	+32 (30 min)		+28 (30 min)	+20 (30 min)		+69 (30 min)	+0.20 (30 min)

a: Number of occasions/animals out of total animal number

b: Noteworthy baseline and vehicle corrected effects representing a general treatment related effect

2.6.7.18.17.J ラットにおける単回経口投与検討試験（JLY0412）

Study ID: JLY0412

NN Reference No.: 212392

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: Single dose	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-9
Initial Age: 9-10 weeks	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 21 November 2012	Method of Administration: Oral (gavage)	GLP Compliance: Yes
Nominal Dose Levels: 0, 900, 1500 mg/kg of SNAC, and 800 mg/kg of sodium salicylate	Vehicle/Formulation: Water for injection, adjusted to pH 8.5	
Parameters collected: Clinical behavioural observations at 5 minute intervals (up to 20 min, 1 h or 2 h), Blood gases, electrolytes and glucose (predose, 20 and 40 min, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h post dose), Plasma insulin, SNAC plasma exposure (20 min, 1 h or 24 h post dose), CSF glucose, Stomach weights, pH and gastric juice electrolytes, Gastric damage, Organ weights and Histopathology (selected organs)		
Special Features: Mechanistic study to evaluate effects of SNAC which could be related to the observed mortality.		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief conclusion: SNAC induced dose dependent adverse clinical signs and mortality and produced a range of changes in clinical chemistry parameters, in liver, heart and kidney weights, and in the gastrointestinal tract, of which the most noteworthy were low blood and CSF glucose, alkalosis and peracute mucosal necrosis in the stomach/duodenum. These SNAC-induced effects occurred between 20 min and 1 h postdose and were not observed 24 h post dose. Only two parameters, reduced blood and CSF glucose, could clearly be related to the clinical effects and mortality associated with SNAC.		

[illegible]

Scheduled Termination Time	20 min post dose				1 h post dose				24 h post dose			
Nominal Dose (mg/kg)	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate
Initial Number of Animals	F: 10^a	F: 11	F: 10^a	F: 10^a	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11
Increased pupil diameter	0	1	1	0	0	0	2	0	0	1	2	0
Passivity	0	2	4	0	0	1	6	0	0	1	2	0
Reduced body tone	0	3	3	0	0	1	6	0	0	1	2	0
Twitches	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
Salivation	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Clinical chemistry												
Blood glucose (mmol/L)												
Pre-dose	7.0	6.9	7.2	7.0	5.9	6.4	6.1	6.0	7.9	7.6	7.3	8.3
20 min post dose	7.3	5.7**	5.5**	7.0	-	-	-	-	-	-	-	-
CSF glucose (mmol/L)												
20 min post dose	2.9	2.1**	2.1**	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-
1h post dose	NS	NS	NS	NS	3.0	2.9	2.3**	2.6*	-	-	-	-
Blood pH												
Pre-dose	7.48	7.49	7.47	7.46	7.48	7.47	7.47	7.47	7.47	7.47	7.49	7.48
20 min post dose	7.48	7.51*	7.52*	7.56**	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood <i>p</i> CO ₂ (kPA)												
Pre-dose	3.7	3.7	3.8	3.7	3.9	3.9	4.0	3.8	3.9	3.7	3.7	3.9
40 min post dose	-	-	-	-	3.8	4.1	4.6**	3.4**	-	-	-	-
Blood <i>p</i> O ₂ (kPA)												
Pre-dose	12.3	12.3	11.9	11.7	13.1	13.1	12.8	12.9	13.2	14.1	13.4	12.9
20 min post dose	12.0	14.9**	14.4**	13.6**	-	-	-	-	-	-	-	-
40 min post dose	NS	NS	NS	NS	12.4	13.2	14.9**	13.1	-	-	-	-
1 h post dose	NS	NS	NS	NS	11.9	12.5	14.8**	14.3**	-	-	-	-
Blood <i>s</i> O ₂ (%)												
Pre-dose	99.4	99.6	99.2	96.4	99.7	99.8	99.3	99.2	99.1	99.5	99.5	99.2
20 min post dose	98.7	100.9*	101.0*	101.2**	-	-	-	-	-	-	-	-
40 min post dose	-	-	-	-	99.6	100.1	100.4	100.2	-	-	-	-
1 h post dose	-	-	-	-	98.3	98.3	100.5*	100.4**	-	-	-	-

Scheduled Termination Time	20 min post dose				1 h post dose				24 h post dose			
Nominal Dose (mg/kg)	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate
Initial Number of Animals	F: 10^a	F: 11	F: 10^a	F: 10^a	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11
Blood HCO ₃ (mmol/L)												
Pre-dose	20.5	20.8	20.8	19.7	21.6	21.3	21.4	20.8	20.8	20.2	20.7	21.7
20 min post dose	19.9	22.2*	22.4*	21.8	-	-	-	-	-	-	-	-
40 min post dose	-	-	-	-	22.4	24.2*	24.8*	21.5	-	-	-	-
Blood base excess (mmol/L)												
Pre-dose	-1.3	-0.9	-1.2	-2.3	-0.2	-0.7	-0.7	-1.1	-1.2	-1.7	-1.0	-0.2
20 min post dose	-2.0	0.7*	1.1**	1.5**	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood sodium (mmol/L)												
Pre-dose	141.5	141.5	143.1	143.7	141.7	140.6	141.3	141.5	141.6	141.8	142.8	142.2
20 min post dose	141.8	143.9**	144.4**	143.9*	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood potassium (mmol/L)												
Pre-dose	4.2	4.0	4.2	4.1	4.1	4.2	4.3	4.0	4.0	4.1	4.0	3.9
20 min post dose	4.7	3.6**	3.9**	4.1*	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood calcium (mmol/L)												
Pre-dose	1.34	1.33	1.34	1.30	1.34	1.34	1.35	1.33	1.33	1.35	1.31	1.31
20 min post dose	1.31	1.14**	1.18**	1.22**	-	-	-	-	-	-	-	-
40 min post dose	-	-	-	-	1.28	1.20*	1.17**	1.15**	-	-	-	-
1 h post dose	-	-	-	-	1.27	1.25	1.19**	1.10**	-	-	-	-
Organ weights												
Heart												
Absolute weight (g)	0.9864	0.9086	1.0116	0.9708	1.0456	0.9062	0.8279*	0.9460	0.9494	0.9089	0.9375	0.9928
% of body weight	0.4193	0.3957	0.4369	0.4304	0.4511	0.3831*	0.3550*	0.4114	0.4122	0.3909	0.4023	0.4355
Kidney												
Absolute weight (g)	1.8913	2.2365**	2.2772**	2.0385	2.2725	2.2248	2.2617	2.1595	2.0486	2.1017	2.0786	2.1821
% of body weight	0.8044	0.9778**	0.9871**	0.9007**	0.9872	0.9392	0.9688	0.9363	0.8903	0.9030	0.8906	0.9576
Liver												
Absolute weight (g)	8.5500	7.5759*	7.6163*	7.3153**	8.0271	7.7579	7.2281	7.8402	10.5045	9.9483	10.5751	8.3402**
% of body weight	3.6388	3.3006*	3.2972*	3.2423*	3.4875	3.2800	3.0935	3.4000	4.5654	4.2726	4.5345	3.6659**

Scheduled Termination Time	20 min post dose				1 h post dose				24 h post dose			
Nominal Dose (mg/kg)	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate
Initial Number of Animals	F: 10^a	F: 11	F: 10^a	F: 10^a	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11
Stomach Parameters												
Stomach content weight (g)	0.9219	2.5381**	2.8221**	2.0609**	0.7306	2.5480**	3.2168**	2.7400**	2.8812	2.7449	2.4937	10.5803**
Gastric damage score	0.05	0.18	0.11	0.05	0.09	0.35*	0.42*	0.05	0.05	0.20	0.11	0.15
Gastric juice pH	3.4	7.3**	7.3**	6.0**	3.5	7.1**	7.3**	6.3**	4.5	3.9	4.4	4.6
Gastric juice volume (mL)	0.00	0.70**	0.99**	0.55**	0.00	0.46**	0.94**	0.81**	0.005	0.004	0.016	0.747**
Macropathology												
Stomach (number examined)	10	11	9 (1)	10	11	10 (1)	6 (5)	11	11	11	11	11
Corpus dark area	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0
Corpus mucosa red	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Histopathology												
Stomach (no. examined)	10	11	9 (1)	10	11	10 (1)	6 (5)	11	11	10	11	11
Peracute mucosal necrosis – glandular region, minimal	0	5	2	0	0	4	2	0	0	(1) ^f	(1) ^f	0
Peracute mucosal necrosis – glandular region, slight	0	4	5 (1)	0	0	4 (1)	3 (3)	0	0	0	(1) ^f	0
Peracute mucosal necrosis – glandular region, moderate	0	2	2	0	0	0	1 (1)	0	0	0	0	0
Peracute mucosal necrosis – glandular region, total	0	11	9 (1)	0	0	8 (1)	6 (4)	0	0	(1) ^f	(2) ^f	0
Duodenum (no. examined)	9	11	9 (1)	10	11	10 (1)	6 (5)	11	11	10	11	11
Peracute mucosal necrosis, minimal	0	3	3	0	0	2	3 (2)	0	0	0	(1) ^f	0

Scheduled Termination Time	20 min post dose				1 h post dose				24 h post dose			
Nominal Dose (mg/kg)	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate	0 (Control)	900 SNAC	1500 SNAC	800 sodium salicylate
Initial Number of Animals	F: 10^a	F: 11	F: 10^a	F: 10^a	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11	F: 11
Peracute mucosal necrosis, slight	0	0	2	0	0	4 (1)	0	0	0	0	(1) ^f	0
Peracute mucosal necrosis, total	0	3	5	0	0	6 (1)	3 (2)	0	0	0	(2) ^f	0

a: Only 10 animals in the group as one animal was found dead one day prior to dosing, and two animals were not used as the carotid artery indwelling cannula could not be found

b: Mean concentration do not include value from one animal sampled unscheduled at 23 min post dose. This animal had a concentration of 1270000 ng/mL

c: Mean concentration do not include values from two animals sampled unscheduled at 25 and 33 min post dose. These animals had concentrations of 1010000 and 1270000 mg/mL, respectively

d: In the 20 min and 1 h subgroups, animals died between 15 and 31 min postdose. In the 24 h subgroup, 3 animals were euthanised at 26, 32 and 39 min post dose, respectively

e: Incidences. Clinical signs were observed between 5 min and 1 h post dose. Note: the total incidence of a sign is not necessarily the sum of the types of that sign, as more than one sign may have occurred at the same time point

f: In the 24 h subgroup, 3 animals were euthanised at 26, 32 and 39 min post dose, respectively

* p<0.05, ** p<0.01, vs. control; (pairwise test)

- Not sampled at this time point

() Values in bracket indicate incidence of findings in the premature decedents or number of decedents. To get the total incidence both values should be combined
CSF Cerebrospinal fluid

2.6.7.18.17.K

ラットにおける静脈内投与検討試験 (JLY0413)

Study ID: JLY0413

NN Reference No.: 212434

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: Single dose	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-10
Initial Age: 9-10 weeks	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: No
Date of First Dose: 14 November 2012	Method of Administration: Intravenous (bolus or continuous infusion for 3.5 h)	
Nominal Dose Levels: 200 mg/kg	Vehicle/Formulation: Water for injection, adjusted to pH 8.5	
Parameters collected: Clinical behavioural observations at 5 minute intervals (up to 3.5 h), Toxicokinetics (5, 10, 15, 30, 45, min, 1 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3 and 3.5 h post dose), CSF glucose, Stomach weights, pH and gastric juice electrolytes, Organ weights and Histopathology (selected organs)		
Special Features: Mechanistic study to investigate whether clinical signs observed after intravenous administration of SNAC were driven by C _{max} exposure or accumulative exposure (AUC). Comparison was made between the two SNAC treated groups and no vehicle control group was included.		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief conclusion: Intravenous bolus administration of SNAC caused clinical signs or mortality in three animals at 5-10 min after dosing. In contrast, 3.5 h of continuous intravenous administration of the same dose of SNAC, 200 mg/kg, produced no noteworthy changes. Due to differences in clearance following i.v. bolus administration and i.v. continuous infusion, leading to a lower AUC after continuous infusion than after bolus administration, it was not possible to meet the primary objective of the study, i.e. to investigate whether clinical signs observed after intravenous administration of SNAC were driven by C _{max} exposure or accumulative exposure (AUC).		

Nominal Dose (mg/kg)	200 (Bolus)	200 (Continuous infusion)
Initial Number of Animals		
Main (Behavioural observations)	F: 6	F: 6
Satellite (Toxicokinetics)	F: 7 ^a	F: 6
Toxicokinetics		
AUC _{0-3 5h} (ng*h/mL)	169000	37300
AUC _{0-0 083h} (ng*h/mL)	47300	278
C _{max} (ng/mL)	547000	19800
Clearance (mL/h/kg)	1190	5360
Noteworthy Findings		
Died or euthanised/terminated prematurely ^a	1	0
Clinical signs^b		
Apathy	1	0
Reduced body tone	2	0
Passivity	2	0
Abnormal gait	1	0
Walking lower on limbs		

a: One animal died approximately 7 min post dose and was immediately discarded and replaced with another animal without further examination as a dosing error was assumed

b Number of animals with sign

CSF Cerebrospinal fluid

2.6.7.18.17.L ラットにおける単回経口投与及びグルコース投与併用検討試験（JLY0468）

Study ID: JLY0468

NN Reference No.: 213299

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: Single dose	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-11
Initial Age: 7-10 weeks	Duration of Post-dose: N/A	
Date of First Dose: 24 September 2013	Method of Administration: Oral (gavage)	GLP Compliance: No
Nominal Dose Levels: 0 and 1500 mg/kg	Vehicle/Formulation: Water for injection, adjusted to pH 8.5	

Parameters collected: Clinical behavioural observations at 5 minute intervals (up to 2 h, then 6, 12 and 24 h post dose), Blood gases, electrolytes, glucose, insulin, and glucagon (10, 15, 20, 60 min post dose), Toxicokinetics of SNAC and 5 principal metabolites (5, 10, 15, 20, 40 min, and 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 12 and 24 h post dose), Plasma GLDH, BHA, and lactate (20 and 60 min post dose), CSF glucose and lactate (20 and 60 min post dose), Liver glycogen (20 and 60 min post dose).

Special Features: Mechanistic study to evaluate the effect of concomitant intravenous glucose infusion on SNAC related adverse effects

No Observed Adverse-Effect Level: N/A

Brief conclusion: 33 out of 89 SNAC treated animals were euthanised due to the severity of clinical signs, which occurred mainly within the first 2 hours of dosing. Animals had abnormal respiration, gait and body posture, loss of body tone and alertness, culminating in loss of righting reflex and tonic convulsions. A few animals were completely unaffected or showed only few mild clinical signs. There was no effect of concomitant glucose administration on the clinical signs, but there was a clear correlation at the individual animal level between SNAC exposure and clinical signs. The time to maximum concentration of SNAC was early after dosing, correlating with the development of clinical signs. SNAC decreased glucose levels in the blood, liver and CSF. There was a clear individual correlation between low blood glucose and clinical signs in the group concomitantly dosed with saline. Plasma and CSF lactate levels were increased by SNAC with a clear individual correlation to clinical signs regardless of glucose administration. Furthermore, SNAC decreased plasma levels of the ketone β -hydroxybutyric acid (BHA) and tended to increase plasma insulin levels, especially when administered concomitantly with glucose, but there was no indication of the low glucose levels being due to high insulin levels. An increase in plasma glucagon levels in the SNAC treated animals was clearly correlated to decreased blood glucose levels. SNAC further caused changes in blood gases and electrolytes. The observed effects were considered to be consistent with an effect of SNAC on cellular respiration.

Scheduled Termination Time	20 min post dose				60 min post dose				24 h post dose	
Nominal Dose (mg/kg)	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	1500	1500
Concomitant Intravenous Infusion	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	N/A	N7A
Initial Number of Animals Main	F: 7	F: 7	F: 14	F: 15	F: 8	F: 7	F: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Toxicokinetics										
AUC _{last} (ng*h/mL)										
No clinical signs	N/A	N/A	106000		N/A	N/A	424000		163000	281000
Mild clinical signs	N/A	N/A	173000		N/A	N/A	237000		323000	411000
Moderate clinical signs	N/A	N/A	274000		N/A	N/A	227000		361000	437000
Marked clinical signs	N/A	N/A	299000		N/A	N/A	616000		521000	1190000
Marked clinical signs and euthanised	N/A	N/A	213000		N/A	N/A	274000		511000	350000
C _{max} (ng/mL)										
No clinical signs	N/A	N/A	467000		N/A	N/A	!		396000	503000
Mild clinical signs	N/A	N/A	679000		N/A	N/A			577000	692000
Moderate clinical signs	N/A	N/A	1080000		N/A	N/A			538000	851000
Marked clinical signs	N/A	N/A	1180000		N/A	N/A			663000	833000
Marked clinical signs and euthanised	N/A	N/A	1480000		N/A	N/A			799000	1190000
Noteworthy Findings										
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	5 ^{a,b}	4 ^a	0	0	7 ^a	7 ^a	4 ^{a,c}	6 ^a
Clinical signs^d										
Total no. of animals with signs	0	0	11	14	0	0	14	15	14	15
Apathy	0	0	8	10	0	0	10	8	8	6
Convulsions, total	0	0	4	4	0	0	6	7	3	5
Tonic	0	0	4	4	0	0	6	6	3	5
Intermittent stretching one leg	0	0	0	0	0	0	0	1		
Abnormal respiration, total	0	0	10	13	0	0	13	12	10	13

[illegible]

Scheduled Termination Time	20 min post dose				60 min post dose				24 h post dose	
Nominal Dose (mg/kg)	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	1500	1500
Concomitant Intravenous Infusion	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	N/A	N7A
Initial Number of Animals Main	F: 7	F: 7	F: 14	F: 15	F: 8	F: 7	F: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Grading of clinical signs										
None	7	7	3	1	8	7	1	0	1	1
Mild	0	0	2	2	0	0	3	4	5	5
Moderate	0	0	0	3	0	0	1	2	4	2
Marked	0	0	4	5	0	0	3	2	2	1
Marked - euthanised	0	0	5	4	0	0	7	7	3	6
Clinical Chemistry										
Glucose, blood (mmol/L)										
Pre-dose	7.2	7.9	7.1	10.6	7.6	11.1	7.5	9.4	-	-
10 min post dose	8.1	10.6	11.9	12.1††	9.0	11.0	5.9*	9.4††	-	-
20 min post dose	9.8	19.8*	5.9*	11.1†	9.8	16.4**	7.9	9.4##	-	-
Glucose, CSF (mmol/L)										
20 min post dose	4.16	4.83*	2.77**	3.57	-	-	-	-	-	-
60 min post dose	-	-	-	-	3.80	4.66	2.99	4.40††	-	-
Glucose, liver (mmol/L)										
20 min post dose	0.16	0.32	0.04**	0.10##	-	-	-	-	-	-
60 min post dose	-	-	-	-	0.14	0.39**	0.06**	0.08##	-	-
Lactate, plasma (mg/dL)										
20 min post dose	21.2	30.3	69.3**	80.4##	-	-	-	-	-	-
60 min post dose	-	-	-	-	17.1	21.1	26.9	33.2	-	-
Lactate, CSF (mg/dL)										
20 min post dose	35.1	34.6	59.5**	76.1##	-	-	-	-	-	-
60 min post dose	-	-	-	-	25.0	31.2*	42.1**	44.1##	-	-
β-hydroxybutyric acid, plasma (nmol/L)										
20 min post dose	0.56	0.38*	0.18**	0.10##	-	-	-	-	-	-
60 min post dose	-	-	-	-	0.74	0.28**	0.21**	0.08#	-	-

Scheduled Termination Time	20 min post dose				60 min post dose				24 h post dose	
Nominal Dose (mg/kg)	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	1500	1500
Concomitant Intravenous Infusion	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	N/A	N7A
Initial Number of Animals Main	F: 7	F: 7	F: 14	F: 15	F: 8	F: 7	F: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Insulin, plasma (ng/mL)										
Pre-dose	0.780	1.013	0.482	0.742	1.089	1.116	0.485	0.831	-	-
10 min post dose	0.483	0.850	1.481	4.904###††	0.746	0.883	1.148	3.367###††	-	-
Glucagon, plasma (pg/mL)										
Pre-dose	205.5	77.9	162.5	407.7	544.8	418.2	221.0	58.9		
10 min post dose	188.9	51.1**	789.6**	854.2##	565.5	474.4	1513.1**	560.9##		
pH, blood										
Pre-dose	7.45	7.45	7.46	7.46	7.47	7.42	7.47	7.48	-	-
10 min post dose	7.46	7.48	7.52**	7.52#	7.53	7.49	7.53	7.52#	-	-
pCO ₂ , blood (kPa)										
Pre-dose	3.4	3.5	3.5	3.8	3.8	4.2	3.8	3.6	-	-
10 min post dose	3.5	3.7	2.9	2.6##	3.5	3.5	2.7*	2.8	-	-
15 min post dose	3.5	3.7	2.7*	2.8##	-	-	-	-	-	-
pO ₂ , blood (kPa)										
Pre-dose	12.7	12.3	12.4	11.6	13.9	13.1	13.6	13.6	-	-
10 min post dose	13.5	11.3	14.4	15.0##	13.5	13.3	16.3**	16.0##	-	-
15 min post dose	12.5	12.0	16.0**	15.1##	-	-	-	-	-	-
20 min post dose	11.7	12.8	14.2*	15.4#	12.9	11.9	16.0**	15.6##	-	-
sO ₂ , blood (%)										
Pre-dose	99.8	98.1	99.1	98.4	99.8	97.4	98.1	99.5	-	-
10 min post dose	98.6	97.8	100.4*	100.8##	100.5	99.7	99.5	100.6	-	-
15 min post dose	97.8	98.6	100.9**	97.9	-	-	-	-	-	-
HCO ₃ ⁻ , blood (mmol/L)										
Pre-dose	17.7	18.3	18.6	19.8	20.7	20.1	20.5	19.8	-	-
10 min post dose	18.6	20.4	17.7	15.9#	22.0	20.0	16.9*	17.0	-	-
Base excess, blood (mmol/L)										
Pre-dose	-4.4	-4.0	-3.4	-2.4	-1.4	-3.1	-1.5	-1.9	-	-
10 min post dose	-3.4	-1.5	-3.2	-4.9	0.8	-1.8	-3.6*	-3.8	-	-

Scheduled Termination Time	20 min post dose				60 min post dose				24 h post dose	
Nominal Dose (mg/kg)	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	Control (Vehicle)	Control (Vehicle)	1500	1500	1500	1500
Concomitant Intravenous Infusion	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	Saline	Glucose	N/A	N7A
Initial Number of Animals Main	F: 7	F: 7	F: 14	F: 15	F: 8	F: 7	F: 15	F: 15	M: 15	F: 15
Na ⁺ , blood (mmol/L)										
Pre-dose	144	144	145	144	144	143	144	144	-	-
10 min post dose	146	143	145	146##	140	143*	145**	146#	-	-
15 min post dose	143	143	147**	147##	-	-	-	-	-	-
20 min post dose	143	140	146**	146##	141	141	144**	146##	-	-
Ca ²⁺ , blood (mmol/L)										
Pre-dose	1.26	1.29	1.27	1.28	1.30	1.34	1.30	1.27	-	-
10 min post dose	1.26	1.28	1.15**	1.16##	1.25	1.19	1.16**	1.14	-	-
15 min post dose	1.21	1.25	1.14*	1.14#	-	-	-	-	-	-
20 min post dose	1.22	1.14	1.13*	1.16	1.24	1.24	1.19	1.18	-	-
Cl ⁻ , blood (mmol/L)										
Pre-dose	112.7	112	113	112	112	113	113	115	-	-
10 min post dose	111.4	111	116*	118##	111	113	119**	118##	-	-
15 min post dose	113	112	118**	118##	-	-	-	-	-	-
20 min post dose	112.3	110	118**	118##	110	111	114	117#	-	-

CSF Cerebrospinal fluid

a: All animals were euthanised due to the severity of their clinical signs

b: Three of these animals lost their righting reflex at 20, 18 and 20 min post dose and were therefore considered as euthanised although they were terminated at the scheduled time point

c: One of these animals were euthanised due to problems with the dorsal carotid artery cannula access and this was not considered treatment related

d: Incidences. Clinical signs were generally observed between 5 min and 2 h post dose. Note: the total incidence of a sign is not necessarily the sum of the types of that sign, as more than one sign may have occurred at the same time point

- Not sampled/ Not sampled at this time point

Statistical significance of difference from Control+saline-group: * p<0.05, ** p<0.01

Statistical significance of difference from Control+glucose-group: # p<0.05, ## p<0.01

Statistical significance of difference from SNAC+saline-group: † p<0.05, †† p<0.01

2.6.7.18.17.M

異なる絶食条件ラットにおける単回経口投与検討試験 (JLY0517)

Study ID: JLY0517

NN Reference No.: 214112

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: Single dose	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-12
Initial Age: 9-11 weeks	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: No
Date of First Dose: 03 April 2014	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 75, 200, 500, 900 and 1500 mg/kg	Vehicle/Formulation: Water for injection, adjusted to pH 8.5	
Parameters collected: Clinical behavioural observations at 5 minute intervals (up to 2 h, then 6, 12 and 24 h post dose), Plasma glucose, lactate, pyruvate, β-hydroxybutyric acid, acetoacetate, glutamate dehydrogenase, free fatty acids, triglycerides, (predose and 20 min post dose), Toxicokinetics of SNAC and 5 principal metabolites in plasma (2, 5, 10, 20, 40 min, and 1, 1.75, 3, 4, 6, 12 and 24 h post dose) and CSF (20 min and 24 h post dose), CSF glucose and lactate (20 min post dose), Liver glycogen (20 min and 24 h post dose), Macropathology, histopathology and electromicroscopy of selected organs.		
Special Features: Mechanistic study to investigate the mechanisms underlying the side effects of SNAC, the dose response, and the effect of different fasting regimens.		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief conclusion: SNAC induced adverse clinical signs which occurred at 500 mg/kg and above, within 20 min after dosing, and which correlated with SNAC concentrations in plasma and CSF. Clinical signs comprised abnormal respiration, gait and body posture, loss of body tone and alertness, culminating in loss of righting reflex and tonic convulsions. Overnight fasting made the animals more sensitive towards the effects of SNAC. At 900 mg/kg, 2 out of 6 overnight fasted TK animals were euthanised shortly after dosing due to the severity of the clinical signs. At 1500 mg/kg, SNAC induced clinical signs were more frequent and severe in the overnight fasted animals than in the animals fasted for 3 hours prior to dosing. In total, 6 animals were euthanised due to the severity of clinical signs, one animal in the group which was fasted for 3 hours and 5 animals in the group which was overnight fasted. SNAC induced acute increases in plasma and CSF lactate concentration as well as reduced plasma ketone bodies (β-hydroxybutyrate), plasma and CSF glucose, and liver glycogen. No effects were observed on mitochondrial morphology, but the mitochondrial mass in the hepatocytes seemed to increase in animals treated with 1500 mg/kg SNAC after overnight fasting, although the relationship to SNAC was uncertain.		

[illegible]

[illegible]

Scheduled Termination Time	20 min post dose							24 h post dose			
Nominal Dose (mg/kg)	Control (Vehicle)	75	200	500	900	1500	1500	75	200	500	900
Fasting regimen	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	3 h	Overnight	Overnight	Overnight	Overnight	Overnight
Initial Number of Animals											
Main	8 F	8 F	8 F	8 F	10 F	15 F	15 F	0	0	0	0
Satellite (Toxicokinetics)	0	0	0	0	0	0	0	3 F	3 F	3 F	6 F
20 min post dose	5.95	6.46	4.56	3.46	3.57	4.13*	-0.02##	-	-	-	-
Lactate, plasma (mg/dL)											
Predose	34.3	38.9	33.2	40.5	40.0	39.2	34.7	-	-	-	-
20 min post dose	32.1	36.1	28.8	35.4	34.3	42.0	65.3##	-	-	-	-
Lactate, CSF (mg/dL)											
20 min post dose	28.6	30.3	29.3	33.6	35.1**	43.6**	59.5	-	-	-	-
β -hydroxybutyric acid (BHA), plasma(mmol/L)											
predose	0.14	0.10	0.08	0.12	0.10	0.10	0.65##	-	-	-	-
20 min post dose	0.14	0.07	0.05	0.04*	0.03**	0.04**	0.19##	-	-	-	-
Acetoacetate (mmol/L)											
Pre-dose	0.0416	0.0222	0.0406	0.0581	0.0835	0.0446	0.2662##	-	-	-	-
20 min post dose	0.0480	0.0271	0.0687	0.0744	0.0703	0.0374	0.1272##	-	-	-	-
BHA/acetoacetate ratio											
Pre-dose	5.36	5.00	2.26	2.63	1.25	3.78	2.74	-	-	-	-
20 min post dose	3.51	3.62	0.87	0.76**	0.52**	1.48*	1.55	-	-	-	-
Histopathology											
Liver (no. examined)	3	0	0	0	0	6	6	-	-	-	-
Decreased rarefaction, minimal	0	0	0	0	0	3	6	-	-	-	-
Electron Microscopy											
Liver (no. examined)	2	-	-	-	-	3	3	-	-	-	-
Mitochondrial mass (volume fraction, %)	12.5-	-	-	-	-	14.0	19.6	-	-	-	-
Number of mitochondria	15	-	-	-	-	16	21	-	-	-	-

-: As there were only two sampling time points in main study animals, these are not considered suitable for description of $t_{\max}$ and AUC

a: SNAC data presented here. For information on toxicokinetics of the five principal metabolites (E494, E506, E1245, E1246 or E1247) see study report M 4.2.3.7.3-B-12, JLY0517 (page 438/Appendix C - TK section report)

b: All animals were euthanised due to the severity of their clinical signs

Statistically significant difference from the control * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Statistically significant difference from 1500 mg/kg with 3 h fasting: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$

- Not sampled, or not sampled at this time point

2.6.7.18.17.N

ラットにおける 13 週間経口投与探索毒性試験 (JLY0532)

Study ID: JLY0532

NN Reference No.: 214214

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: 13 weeks	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-13
Initial Age: 8-10 weeks (males) and 10-12 weeks (females)	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: No
Date of First Dose: 08 July 2014	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 75, 200, and 500 mg/kg/day	Vehicle/Formulation: Water for injection, adjusted to pH 8.5	
Parameters collected: Clinical behavioural observations at 5 minute intervals (up to 2 h, then 5-6 h post dose) on day 1, 42 and 91, and general observations for 1 h post dose on all other days, Plasma glucose, lactate, pyruvate, β-hydroxybutyric acid, acetoacetate, glutamate dehydrogenase, free fatty acids, triglycerides, (predose and 20 min post dose), Oxidative stress, Toxicokinetics of SNAC and two β-oxidised metabolites (2, 5, 10, 20, 40 min, and 1, 1.75, 3, 4, 6, 12 and 24 h post dose), CSF glucose and lactate (20 min post dose), Liver glycogen (20 min post dose), Macropathology, Histopathology and Electron microscopy of selected organs.		
Special Features: Mechanistic study to assess the toxicity of SNAC and its possible subclinical effects on non-standard biochemical and morphological parameters. Termination of animals was 20 min after the last dose.		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief conclusion: SNAC was generally well tolerated and no treatment related mortality occurred. Treatment related clinical signs were only observed in one female on day 1. Decreases in plasma ketone bodies in females and moderate increases in plasma triglyceride levels in males were observed. A small increase in CSF, and possibly plasma, lactate levels was observed at 200 mg/kg/day and above. There were no indications of increased oxidative stress associated with administration of SNAC. The ultrastructure of the mitochondria in the heart, skeletal muscle and brown adipose tissue appeared unaffected by SNAC but the hepatic mitochondrial volume fraction was significantly increased in females at 500 mg/kg/day. Histopathological changes indicating a local irritative potential of SNAC were observed in the mucosa of the glandular stomach, mainly in the groups treated with 200 or 500 mg/kg/day		

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	75	200	500	0 (Control)	75	200	500
Initial Number of Animals								
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8
Toxicokinetics								
AUC _{0-0.33h} (ng*h/mL)								
Week 1	N/A	3250	4510	23100	N/A	12800	29500	65700
Week 13	N/A	1890	17000	30100	N/A	1770	23100	68200
C _{max} (ng/mL)								
Week 1	N/A	22800	38800	118000	N/A	71800	130000	273000
Week 13	N/A	14000	81600	123000	N/A	13500	115000	302000
Noteworthy Findings								
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	0	0	1 ^a	0
Clinical signs^b								
Abdominal respiration	0	0	0	0	0	0	0	1
Hindquarters raised	0	0	0	0	0	0	0	1
Clinical chemistry								
β-hydroxybutyric acid (BHA), plasma(mmol/L)								
Week 6, predose	0.09	0.10	0.12	0.15	0.21	0.17	0.12	0.18
Week 6, 20 min post dose	0.11	0.06	0.07	0.07	0.17	0.07*	0.04*	0.04**
Week 13, predose	0.07	0.09	0.11	0.16*	0.10	0.14	0.09	0.15
Week 13, 20 min post dose	0.07	0.05	0.05	0.07	0.11	0.06**	0.04**	0.05**
Acetoacetate, plasma(mmol/L)								
Day 1, predose	0.0520	0.0693	0.0526	0.0795	0.0616	0.0577	0.0779	0.0631
Day 1, 20 min post dose	0.0258	0.0321	0.0245	0.0325	0.0449	0.0294	0.0279*	0.0312*
Week 6, predose	0.0574	0.0454	0.0517	0.0755	0.0723	0.0472	0.0447	0.0609
Week 6, 20 min post dose	0.0508	0.0340	0.0314	0.0540	0.0561	0.0324*	0.0247**	0.0341**
Week 13, predose	0.0359	0.0497	0.0562	0.0652	0.0497	0.0436	0.0441	0.0656
Week 13, 20 min post dose	0.0394	0.0364	0.0276	0.0394	0.0479	0.0362	0.0301	0.0296*

Nominal Dose (mg/kg/day)	0 (Control)	75	200	500	0 (Control)	75	200	500
Initial Number of Animals								
Main	M: 10	M: 10	M: 10	M: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Satellite	M: 8	M: 8	M: 8	M: 8	F: 8	F: 8	F: 8	F: 8
Triglycerides, plasma (mmol/L)								
Week 6, predose	1.23	1.14	1.57**	1.63**	1.11	1.10	1.05	1.34
Week 6, 20 min post dose	1.03	1.00	1.36*	1.25*	1.04	0.84	0.87	0.91
Week 13, predose	1.26	1.34	1.89*	1.60*	1.22	1.04	1.04	1.08
Week 13, 20 min post dose	1.14	1.09	1.58	1.12	1.15	0.87	0.81	0.71
Lactate, plasma (mg/dL)								
Week 13, predose	26.5	22.8	26.9	16.6	29.3	27.3	22.4	24.9
Week 13, 20 min post dose	29.6	30.8	35.6	39.8	39.6	33.9	39.4	53.3
Lactate, CSF (mg/dL)								
Week 13, 20 min post dose	25.4	24.7	27.4	30.5**	26.9	27.9	31.5**	34.1**
Electron Microscopy								
Liver (no. examined)	0	0	0	0	3	0	0	3
Mitochondrial mass (volume fraction, %)	-	-	-	-	19.57	-	-	23.18***
Histopathology								
Stomach (number examined)	10	10	10	10	10	10	10	10
Hyperaemia, glandular region, minimal	0	3	8	10	0	1	4	10
Globules, eosinophilic, foveolar, minimal	0	0	0	8	0	0	0	7
Hypertrophy, mucous neck cell, minimal	0	1	0	9	0	1	0	5
Inflammatory cell infiltrate, mucosal/submucosal, glandular region, minimal	0	0	0	8	0	0	0	4
Necrosis, mucosal, glandular, suberficial, minimal	0	1	3	8	0	0	3	7
Necrosis, mucosal, glandular, suberficial, slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Necrosis, mucosal, glandular, suberficial, total	0	1	3	8	0	0	3	9
Desquamation, epithelial cell, minimal	0	0	0	7	0	0	0	8

a: Pathology findings (perforated oesophagus and dark coloured lungs) confirmed that the premature death was due to a dosing error and not related to treatment.

b: Both signs observed in the same female on day 1, from 30 to 120 min post dose

Statistical significance of difference from Controls: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

BHA: Statistical analysis was carried out on simple means due to the paucity of data for day 1 (pre-dose). Due to the paucity of quantifiable data (many values were below the limit of quantification), statistical analysis was not carried out on day 1 (20 min) time point of both sexes.

2.6.7.18.17.O ラット心臓組織における ATP レベルの評価に関する検討試験
(██████140701)

Study ID: ██████140701

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: Single dose	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-14
Initial Age: Approx. 11 weeks	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: No
Date of First Dose: 27 July 2014	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0 and 1750 mg/kg	Vehicle/Formulation: Sterile water, adjusted to pH 8.25	
Parameters collected: Behavioural observations (in case a treated animal was euthanised due to the severity of clinical signs, a control animal was terminated at the same time point post dose), plasma glucose and lactate (predose and 20 min post dose), ATP in heart tissue.		
Special Features: Mechanistic study to assess the effect of SNAC on ATP levels in heart and glucose and lactate levels in plasma		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief conclusion: All SNAC treated animals showed clinical signs such as passivity, abdominal respiration, lurching and abnormal gait. Four (4) out of 10 rats had mild and 6 had moderate clinical signs. The 6 animals with moderate signs were euthanised 12-19 min post dosing. Plasma glucose levels decreased and lactate levels increased in the SNAC treated animals. ATP levels were found to be lowered by 68% in the hearts of the SNAC-treated animals, compared to the control animals. Rats with high plasma lactate levels also had the lowest ATP levels in heart tissue and predominantly the lowest plasma glucose levels.		

Nominal Dose (mg/kg)	0 (Control)	1750
Initial Number of Animals Main	F: 10	F: 10
Noteworthy Findings		
Died or euthanised/terminated prematurely	0	6 ^a
Clinical signs ^b		
Total no. of animals with signs	0	10
Passivity	0	9
Abdominal respiration	0	2
Abnormal gait	0	8
Lurching	0	5
Pica	0	3
Walking or standing on hind leg	0	8
Flat on stomach	0	8
Grading of clinical signs		
None	10	0
Mild	0	4
Moderate- euthanised	0	6
Clinical Chemistry		
ΔGlucose, plasma (mmol/L)	-0.63	-0.11**
ΔLactate, plasma (mmol/L)	0.46	1.99***
ATP, heart (nmol/mg tissue) 20 min post dose ^c	1955	625***

a: Animals were euthanised due to severity of clinical signs 12-19 min post dose

b: Number of animals with sign

c: At scheduled termination 20 min post dose or before euthanasiation

Δ: 20 min post dose minus predose values

p<0.01, * p<0.001

2.6.7.18.17.P ラット心臓及び肝臓組織における ATP レベルの評価に関する検討試 Study ID: ■■■■ 141102
 験 (■■■■ 141102)

Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing: Single dose	Location in CTD: 4.2.3.7.3-B-15
Initial Age: Approx. 12 weeks	Duration of Post-dose: N/A	GLP Compliance: No
Date of First Dose: 30 October 2014	Method of Administration: Oral (gavage)	
Nominal Dose Levels: 0, 75, 200, 500, 900 and 1750 mg/kg	Vehicle/Formulation: Sterile water, adjusted to pH 8.25	
Parameters collected: Behavioural observations for 20 minutes post dose, plasma glucose and lactate (predose and 20 min post dose), ATP in heart and liver tissue at termination 20 min post dose.		
Special Features: Mechanistic study to assess the effect of SNAC on ATP levels in heart and liver, and glucose and lactate levels in plasma		
No Observed Adverse-Effect Level: N/A		
Brief conclusion: Mild to moderate clinical signs were observed at 500 mg/kg and above. The clinical signs observed were primarily passivity, abdominal respiration, lurching, abnormal gait and apathy. Animals with moderate clinical signs were euthanised 11-17 min post dosing. Plasma glucose levels were dose dependently decreased up to 900 mg/kg SNAC, but statistical significance was only attained at 900 mg/kg. A similar effect could not be seen at 1750 mg/kg where the glucose concentration range was quite wide. Plasma lactate concentrations were dose dependently increased in the SNAC treated animals, although only attaining statistical significance at 900 and 1750 mg/kg. ATP levels were dose dependently reduced in the heart and liver of the SNAC dosed animals, attaining statistical significance at 1750 mg/kg for the heart and at 500, mg/kg and above for the liver.		

Nominal Dose (mg/kg)	0 (Control)	75	200	500	900	1750
Initial Number of Animals						
Main	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10	F: 10
Noteworthy Findings						
Died or euthanised/terminated prematurely	0	0	0	0	2 ^a	6 ^a
Clinical signs ^b						
Total no. of animals with signs	0	0	0	2	8	10
Passivity	0	0	0	3	9	9
Abdominal respiration	0	0	0	1	6	8
Abnormal gait	0	0	0	0	1	3
Lurching	0	0	0	0	2	7
Pica	3	4	6	7	6	2
Walking or standing on hind leg	0	0	1	3	6	2
Flat on stomach	0	0	0	0	3	9
Ptosis	0	0	0	1	2	3
Grading of clinical signs						
None	10	10	10	8	2	0
Mild	0	10	0	2	6	4
Moderate- euthanised	0	0	0	0	2	6
Clinical Chemistry						
ΔGlucose, plasma (mmol/L)	0.69	0.57	-0.09	0.05	-0.07*	0.37
ΔLactate, plasma (mmol/L)	0.65	0.40	0.65	0.98	1.71*	2.88***
ATP, heart (nmol/mg tissue)						
20 min post dose ^c	3475	2964	2720	2589	1711	1251*
ATP, liver (nmol/mg tissue)						
20 min post dose ^c	836	716	653	614*	595*	515**

a: Animals were euthanised due to severity of clinical signs 11-17 min post dose

b: Number of animals with sign

c: At scheduled termination 20 min post dose or before euthanasiation

*p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001

Δ: 20 min post dose minus predose values