ウゴービ皮下注
非アルコール性脂肪肝炎（NASH）

2.7.1 生物薬剤学試験及び関連する分析法

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 2
略語一覧 3
2.7.1.1 背景及び概観 4
2.7.1.1.1 背景 4
2.7.1.1.2 組成 5
2.7.1.1.3 測定法 5
2.7.1.4 付録 8
参考文献 9

2.7.1.4 付録

2.7.1.4.1 NN9931 臨床開発プログラムに含まれる臨床試験の生体試料分析報告書における測定法の概要

2.7.1.4.2 中国人被験者の生体試料におけるセマグルチドの測定法のバリデーション

表目次

ページ

表 2.7.1.1-1 4553 試験に用いた製剤の組成及び注入器 5

略語及び定義一覧

DV3396	:	single-dose pen-injector（単回投与用ペン型注入器）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EU	:	European Union（欧州連合）
FDA	:	Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
GLP-1	:	glucagon-like peptide-1（グルカゴン様ペプチド-1）
ICH	:	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use（医薬品規制調和国際会議）
LC-MS/MS	:	liquid chromatography with tandem mass spectrometry（液体クロマトグラフィータンデム質量分析法）
MACE	:	major adverse cardiovascular events（主要な心血管イベント）
MASH	:	metabolic dysfunction-associated steatohepatitis（代謝機能障害関連脂肪肝炎）
MASLD	:	metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease（代謝機能障害関連脂肪性肝疾患）
NAFLD	:	non-alcoholic fatty liver disease（非アルコール性脂肪性肝疾患）
NASH	:	non-alcoholic steatohepatitis（非アルコール性脂肪肝炎）
PDS290	:	multidose pen-injector（複数回投与用ペン型注入器）
QC	:	quality control
q.s.	:	quantum satis

臨床試験の表記：

ノボ ノルディスク社の開発プログラムは、プロジェクト固有の番号を用いて表記する：

- NN9931 = 非アルコール性脂肪肝炎（NASH）治療薬としてのセマグルチド 2.4 mg 週 1 回皮下投与の開発プログラム
- NN9536 = 肥満症治療薬としてのセマグルチド 2.4 mg 週 1 回皮下投与の開発プログラム（販売名：ウゴービ）
- NN9535 = 2 型糖尿病治療薬としてのセマグルチド 0.5 mg 及び 1.0 mg 週 1 回皮下投与の開発プログラム（販売名：オゼンピック）

NN9931 開発プログラムに含まれる臨床試験は、4 桁の試験番号で表記し、他の開発プログラムに含まれる臨床試験は、プロジェクト番号と 4 桁の試験番号（例：NN9536-ABCD）で表記する。

臨床開発プログラムのすべての試験は、利用可能な規制ガイダンスに従って計画及び実施され、さらに医薬品規制調和国際会議（ICH）Good Clinical Practice[1]及び米国食品医薬品局（FDA）21 CFR 312.120[2]に準拠して実施した。

脂肪性肝疾患の病名に関して、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）及び非アルコール性脂肪肝炎（NASH）からそれぞれ代謝機能障害関連脂肪性肝疾患（MASLD）及び代謝機能障害関連脂肪肝炎（MASH）への用語の移行が開始されている。移行期間中、ノボ ノルディスク社はこれらの用語を互換性のあるものとして使用する。本概要においては、NASH におけるセマグルチドのこれまでの関連文書と合わせ、NAFLD 及び NASH を使用した。

2.7.1.1　背景及び概観

2.7.1.1.1　背景

セマグルチド 2.4 mg 週 1 回皮下投与（以下、セマグルチド 2.4 mg）は、いくつかの国と地域において肥満症／体重管理の治療薬としてウゴービの販売名で承認されている。米国では、心血管疾患を有する肥満又は過体重の成人における主要な心血管イベント〔MACE（心血管死、非致死性心筋梗塞又は非致死性脳卒中）〕のリスク低下の適応も取得している[3]。セマグルチド 0.5 及び 1.0 mg 週 1 回皮下投与（販売名：オゼンピック）は、2 型糖尿病の治療薬として承認されており[4-6]、米国では、心血管疾患を有する 2 型糖尿病患者における心血管リスク低下の適応でも承認されている。経口セマグルチド 3、7 及び 14 mg の 1 日 1 回投与（販売名：リベルサス）は 2 型糖尿病の治療薬として承認されている[7-9]。

肥満症／体重管理の治療薬としてはセマグルチド 2.4 mg が維持用量として承認されている。低用量の 0.25 mg/週から開始し、その後、段階的に 0.5、1.0、1.7 mg/週と増量し、維持用量である 2.4 mg/週に到達させる。

漸増用量及び維持用量に対応できるよう各 5 規格の単回投与用ペン型注入器（以下、DV3396 ペン型注入器）及び複数回投与用ペン型注入器（以下、PDS290 ペン型注入器）を開発した。DV3396 ペン型注入器は 5 つのセマグルチド濃度（0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、2.27 mg/mL 及び 3.2 mg/mL）の製剤があり、カナダ、欧州連合（EU）、米国、日本などの主要な地域で承認、販売されている。PDS290 ペン型注入器は 4 つのセマグルチド濃度（0.68 mg/mL、1.34 mg/mL、2.27 mg/mL 及び 3.2 mg/mL）の製剤があり、EU、カナダなどの主要な地域で承認、販売されている。日本においても肥満症に対して承認され、販売予定である。NASH の治療薬としてのセマグルチド 2.4 mg は、PDS290 ペン型注入器及び DV3396 ペン型注入器のいずれか、又は両方で提供する予定であるが、利用可能なペン型注入器は、国及び地域によって異なる。

DV3396 ペン型注入器と PDS290 ペン型注入器のセマグルチド製剤における生物学的同等性の評価の根拠及び方法の詳細は、ウゴービ皮下注 SD 申請資料（肥満症、2023 年 3 月 27 日承認）、Module 2.7.1.1.3 及びウゴービ皮下注 MD 申請資料（肥満症、2025 年 1 月 15 日承認）、Module 2.7.1.1.3 に提示したとおりである。

現在、NASH の治療薬としてのセマグルチド 2.4 mg の臨床開発プログラム（NN9931）を世界各国で実施している。本申請は、ピボタル試験である 4553 試験における 72 週の中間評価、すなわち 4553 試験の Part 1 のデータに基づく。この他、もう 1 つのピボタル試験である第 2 相用量設定試験（4296 試験）及び 2 つの補助的試験のデータも用いている。

第 3 相試験（4553 試験）では、セマグルチド（0.25、0.5、1.0、1.7 及び 2.4 mg/週）の投与に DV3396 ペン型注入器又は PDS290 ペン型注入器を使用している。両ペン型注入器に充填されたセマグルチド溶液の組成は、それぞれ、肥満症／体重管理において承認されたセマグルチド製剤の組成と同じである。4553 試験の母集団薬物動態解析により、両ペン型注入器で投与した際の曝露量が同程度であることが確認された〔Phase 3 (4553) modelling report（Module 5.3.3.5）Appendix F、Figure 10-11〕。

4553 試験ではセマグルチド 0.5 mg/週の投与に 1.34 mg/mL の濃度のセマグルチド溶液を充填した 1.5 mL カートリッジを組み込んだ PDS290 ペン型注入器を使用している。EU などの一部の地域では、肥満症／体重管理の治療薬としてセマグルチド 0.5 mg/週の投与用に、セマグルチド 1.34 mg/mL 溶液を充

填した 1.5 mL カートリッジを組み込んだ PDS290 ペン型注入器に加えて、セマグルチド 0.68 mg/mL 溶液を充填した 3 mL カートリッジを組み込んだ PDS290 ペン型注入器が承認されている。

4553 試験では、*Saccharomyces cerevisiae* 酵母株（[redacted]）を用いて製造したセマグルチド原薬を使用している。4553 試験に用いたセマグルチド原薬の製造工程は、セマグルチド 2.4 mg（販売名：ウゴービ）の原薬の製造方法と同じである。

本概要には、4553 試験に用いたセマグルチド製剤、ならびに NASH 臨床開発プログラム（NN9931）におけるセマグルチド濃度及び抗セマグルチド抗体の測定に用いた方法について記載する。

2.7.1.1.2　組成

セマグルチド製剤は無色又はほぼ無色で、濁りはなく、基本的に微粒子を認めない皮下注射用の液体である。溶液は pH 7.4 の等張液として提供され、そのまま注射ができる。

DV3396 ペン型注入器は、単回使用を目的としており、防腐剤を含有しないセマグルチド溶液を充填したプレフィルドシリンジが組み込まれている。一方、PDS290 ペン型注入器は、複数回使用を目的としており、防腐剤を含有するセマグルチド溶液を充填したカートリッジが組み込まれている。

4553 試験に用いた DV3396 ペン型注入器及び PDS290 ペン型注入器の製剤の組成を表 2.7.1.1-1 に示す。

表 2.7.1.1-1　　4553 試験に用いた製剤の組成及び注入器

	Drug product formulation for DV3396 single dose device (Semaglutide D formulation)	**Drug product formulation for PDS290 pen-injector (Semaglutide B formulation)**
Active substance (strength)		
Semaglutide dose		
0.25 mg	0.5 mg/mL	0.68 mg/mL[a]
0.5 mg	1.0 mg/mL	1.34 mg/mL[a]
1.0 mg	2.0 mg/mL	1.34 mg/mL[b]
1.7 mg	2.27 mg/mL	2.27 mg/mL[b]
2.4 mg	3.2 mg/mL	3.2 mg/mL [b]
Excipients (quantity per mL)		
Disodium phosphate dihydrate	1.42 mg	1.42 mg
Propylene glycol	-	14.0 mg
Sodium chloride	8.25 mg	-
Phenol	-	5.50 mg[c]
Hydrochloric acid	q.s.[d]	q.s.[d]
Sodium hydroxide	q.s.[d]	q.s.[d]
Water for injections	To make 1.00 ml	To make 1.00 ml

q.s.: quantum satis
a In 1.5 mL cartridge
b In 3 mL cartridge
c An overage of 2% phenol is added to compensate for loss during manufacturing
d To reach pH 7.4

2.7.1.1.3　測定法

セマグルチド濃度の測定－生体試料分析法

血漿中セマグルチド濃度は、血漿中タンパク質を沈殿させた後に液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS 法）により測定した。この測定法は米国食品医薬品局（FDA）及び欧州医薬

品庁（EMA）のガイドライン[10,11]に準拠して[redacted]が開発及びバリデーションを行った〔ウゴービ皮下注 SD 申請資料（肥満症、2023 年 3 月 27 日承認）、Module 2.7.1〕。さらに、NN9931 臨床開発プログラムを支持するため、[redacted]にて肝機能障害を有する被験者の血漿における選択性及びマトリックス効果を検討した。その結果、測定に影響を与える干渉は確認されなかった〔CA44043 試験（Module 5.3.1.4）〕。

4553 試験における中国人被験者から採取した血漿検体中のセマグルチド濃度は、[redacted]で測定した。本測定のために、中国以外の国の血漿中セマグルチド濃度の測定に用いた LC-MS/MS 法を[redacted]から[redacted]へ移管した。中国以外の国の血漿中セマグルチド濃度の測定に用いられた LC-MS/MS 法の測定範囲は 0.729～60.8 nmol/L である〔[redacted] AA95860 試験及び CA11388 試験（Module 5.3.1.4）、ウゴービ皮下注 SD 申請資料（肥満症、2023 年 3 月 27 日承認）、Module 2.7.1.1.4〕。[redacted]への移管時、FDA 及び EMA のガイドライン[10,11]に準拠してバリデーションを行った〔8406-773 試験（Module 5.3.1.4）〕。また、[redacted]での測定と[redacted]での測定のクロスバリデーションも行った〔[redacted] CA32190 試験及び[redacted] 8450135 試験（Module 5.3.1.4）：付録 2.7.1.4.2〕。

NN9931 臨床開発プログラムの各臨床試験の生体試料分析報告書に記載された測定法の概要は、付録 2.7.1.4.1 に要約する。

抗セマグルチド抗体の測定－抗体測定法

抗セマグルチド抗体の産生は、4296 試験（第 2 相）及び 4553 試験（第 3a 相）の中間評価時に検討した。抗セマグルチド抗体の産生の分析は、段階的なアプローチ〔1 段階目がスクリーニング分析、2 段階目が確認分析、3 段階目が内因性グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）との交叉反応分析〕を用いて実施した。4553 試験の 3 段階目では、抗セマグルチド抗体が陽性である検体の抗体価の測定も行った。

In vitro における抗セマグルチド抗体の中和作用の評価は、薬剤をウォッシュアウトした後の事後調査期間に採取された抗セマグルチド抗体が陽性である検体を用いて行う。したがって、*in vitro* における抗セマグルチド抗体の中和作用に関するデータは 4296 試験（第 2 相）からのみ得られている。4553 試験（第 3a 相）は進行中であるため、事後調査来院を完了した被験者はおらず、*in vitro* における抗セマグルチド抗体の中和作用の評価はまだ実施されていない。

抗セマグルチド抗体の放射免疫測定法

抗セマグルチド抗体の産生及び内因性 GLP-1 との交叉反応の分析にあたり、マトリックス及び薬剤の干渉を減らすための検体の前処理を含む抗体放射免疫測定法のバリデーションは、[redacted]及び[redacted]が行った。詳細は Integrated summary of immunogenicity（Module 5.3.5.3）Section 3 及びウゴービ皮下注 SD 申請資料（肥満症、2023 年 3 月 27 日承認）、Integrated summary of immunogenicity（Module 5.3.5.3）Section 3 に提示したとおりである。

抗体の測定パラメータ、Quality Control（QC）試料及びバリデーション結果の詳細はウゴービ皮下注 SD 申請資料（肥満症、2023 年 3 月 27 日承認）、Integrated summary of immunogenicity（Module 5.3.5.3）Section 3 に提示したとおりである。

中和抗体測定法

In vitro における抗セマグルチド抗体の中和作用の評価は、細胞を用いた抗セマグルチド中和抗体測定法を用いて、4296 試験（第 2 相）の事後調査期間に採取したすべての抗体陽性検体を対象に行った。また、GLP-1 と交叉反応する抗セマグルチド抗体の *in vitro* 中和作用は、細胞を用いた抗 GLP-1 中和抗体測定法により評価した。詳細は Integrated summary of immunogenicity（Module 5.3.5.3）Section 3 に示す。

マトリックス干渉を抑制するためにポリエチレングリコールによる前処理を行った検体を用いて *in vitro* における抗セマグルチド抗体及び抗 GLP-1 抗体の中和作用の評価を行った。この評価は、ヒト GLP-1 受容体及びルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したベビーハムスター腎臓細胞を利用した中和抗体測定法により行われた。この測定法では、セマグルチド又は GLP-1 による細胞刺激を阻害する抗セマグルチド抗体の作用を相対発光量として測定した。詳細は Integrated summary of immunogenicity（Module 5.3.5.3）Section 3 に示す。

2.7.1.4 付録

本概要に対する付録は、付録 2.7.1.4.1 及び付録 2.7.1.4.2 として添付した。

参考文献

1. International Conference on Harmonisation. ICH Harmonised Tripartite Guideline E6(R1): Guideline for Good Clinical Practice. 1996.
2. Food and Drug Administration (FDA). Code of Federal Regulations (21 CFR 312.120). Foreign clinical studies not conducted under an IND. 2022.
3. Novo Nordisk A/S. Wegovy® (semaglutide), US Prescribing Information (PI). 2024.
4. Novo Nordisk A/S. Ozempic® (semaglutide), US Prescribing Information (PI). label; 2024.
5. Novo Nordisk A/S. Ozempic® (semaglutide), EU Summary of Product Characteristics (SmPC). 2024.
6. Novo Nordisk A/S. Ozempic ® (semaglutide), JP package insert, version 3. 2024.
7. Novo Nordisk A/S. Rybelsus® (oral semaglutide), US Prescribing Information (PI). 2024.
8. Novo Nordisk A/S. Rybelsus® (semaglutide), EU Summary of Product Characteristics (SmPC),. August 2024.
9. Novo Nordisk A/S. Rybelsus ® (semaglutide), JP package insert, version 4. 2024.
10. Food and Drug Administration, CDER and CVM. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. 2018.
11. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 rev. 1 Corr. 2**). 2011.

ウゴービ皮下注
非アルコール性脂肪肝炎（NASH）

2.7.1.4 付録
1. NN9931 臨床開発プログラムに含まれる臨床試験のバイオアナリティカルレポートにおける測定法の概要

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

List of abbreviations and definitions of terms

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
LC-MS/MS	liquid chromatography and tandem mass spectrometry detection
QC	quality control

Method performance in study #4296 **Determination of Semaglutide in Human Plasma (K3EDTA) samples from the Clinical Trial "Investigation of efficacy and safety of three dose levels of subcutaneous semaglutide once daily versus placebo in subjects with non-alcoholic steatohepatitis" by LC-MS/MS, NN9931-4296 (Trial NN9536-4296 [M 5.3.5.1], Appendix 16.2.9, Bioanalytical report- CA20109-01)**		
Assay passing rate	A total of 27 runs out of 31 (87%) were accepted according to the run acceptance criteria.	Report CA20109-01, Table 1
Standard curve performance (accepted runs)	• Cumulative bias range: -1.0 to 1.4% • Cumulative precision: ≤6.9%	Report CA20109-01, Table 2
QC performance (accepted runs)	• Cumulative bias range: -0.4 to 1.9% • Cumulative precision: ≤7.0%	Report CA20109-01, Table 4
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was performed in 7.3% (164 of 2243) of study samples, and 94.5% of the samples met the pre-specified criteria	Report CA20109-01, Table 10
Study sample analysis/stability	All study samples were analysed within validated stability of 1021 days of collection at -20°C	Report CA20109-01, Section 3.7.4
Standard calibration curve	0.729, 1.46, 2.92, 7.29, 14.6, 29.2, 58.4 and 60.8 nmol/L	

Method performance in study #4381 **Determination of Semaglutide in Human Plasma (EDTA) samples from the Clinical Trial "A trial investigating the effect of subcuataneous semaglutide on liver fibrosis assessed by magnetic resonance elastography in subjects with non-alcoholic fatty liver disease" by LC-MS/MS, NN9931-4381 (Trial NN9536-4381 [M 5.3.5.1], Appendix 16.2.9, Bioanalytical report- CA23753-01)**		
Assay passing rate	A total of 7 runs out of 7 (100%) were accepted according to the run acceptance criteria.	Report CA23753-01, Table 1
Standard curve performance	• Cumulative bias range: -1.7 to 1.4% • Cumulative precision: ≤7.4%	Report CA23753-01, Table 2
QC performance	• Cumulative bias range: -3.3 to 4.1% • Cumulative precision: ≤6.7%	Report CA23753-01, Table 4
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was performed in 11.8% (30 of 254) of study samples, and 96.7% of the samples met the pre-specified criteria	Report CA23753-01, Table 7
Study sample analysis/stability	All study samples were analysed within validated stability of 1021 days of collection at -20°C	Report CA23753-01, Section 3.7.4
Standard calibration curve	0.729, 1.46, 2.92, 7.29, 14.6, 29.2, 58.4 and 60.8 nmol/L	

Method performance in study #4492 **Determination of semaglutide in human plasma (EDTA) samples from the clinical trial "Investigation of efficacy and safety of semaglutide s .c. once-weekly versus placebo in subjects with non-alcoholic steatohepatitis and compensated liver cirrhosis" by LC-MS /MS, NN9931-4492 (Trial NN9536-4492 [M 5.3.5.1], Appendix 16.2.9, Bioanalytical report- CA27138)**		
Assay passing rate	A total of 4 runs out of 4 (100%) were accepted according to the run acceptance criteria.	Report CA27138, Table 1
Standard curve performance	• Cumulative bias range: -3.8 to 2.6% • Cumulative precision: ≤10.1%	Report CA27138, Table 2
QC performance	• Cumulative bias range: -0.4 to 3.8% • Cumulative precision: ≤11.9%	Report CA27138, Table 4

Method performance in study #4492 **Determination of semaglutide in human plasma (EDTA) samples from the clinical trial "Investigation of efficacy and safety of semaglutide s .c. once-weekly versus placebo in subjects with non-alcoholic steatohepatitis and compensated liver cirrhosis" by LC-MS /MS, NN9931-4492 (Trial NN9536-4492 [M 5.3.5.1], Appendix 16.2.9, Bioanalytical report- CA27138)**		
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was performed in 19% (25 of 130) of study samples, and 88.0% of the samples met the pre-specified criteria	Report CA27138, Table 7
Study sample analysis/stability	All study samples were analysed within validated stability of 1021 days of collection at -20°C	Report CA27138, Section 3.7.4
Standard calibration curve	0.729, 1.46, 2.92, 7.29, 14.6, 29.2, 58.4 and 60.8 nmol/L	

Method performance in study #4553 (Interim, Rest of the world) **Determination of semaglutide in human plasma (EDTA) samples from "The effect of semaglutide in subjects with non-cirrhotic non-alcoholic steatohepatitis" by LC-MS/MS, NN9931-4553 (Trial 4553 [M 5.3.5.1] Appendix 9.2.9, Bioanalytical report- CA31966-01)**		
Assay passing rate	A total of 68 runs out of 76 (89.5%) were accepted according to the run acceptance criteria.	Report CA31966-01, Table 1
Standard curve performance	• Cumulative bias range: -0.7 to 1.0% • Cumulative precision: ≤8.0%	Report CA31966-01, Table 2
QC performance	• Cumulative bias range: -1.4 to 2.1% • Cumulative precision: ≤16.8% after exclusion of an outlier: • Cumulative bias range: -1.4 to 2.1% • Cumulative precision: ≤10.1%	Report CA31966-01, Table 4
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was performed in 7% (428 of 6117) of study samples, and 96% of the samples met the pre-specified acceptance criteria	Report CA31966-01, Table 8
Study sample analysis/stability	All study samples were analysed within validated stability of 1021 days of collection at -20°C	Report CA31966-01, Section 4.7.4
Standard calibration curve	0.729, 1.46, 2.92, 7.29, 14.6, 29.2, 58.4 and 60.8 nmol/L	

Method performance in study #4553 (Interim, China) **Determination of semaglutide in human plasma (EDTA) samples from "The effect of semaglutide in subjects with non-cirrhotic non-alcoholic steatohepatitis" by LC-MS/MS, NN9931-4553 (Trial 4553 [M 5.3.5.1] Appendix 9.2.9, Bioanalytical report-8448-303)**		
Assay passing rate	A total of 5 runs out of 5 (100%) were accepted according to the run acceptance criteria.	Report 8448-303, Table 1
Standard curve performance	• Cumulative bias range: -1.8 to 3.1% • Cumulative precision: ≤7.2%	Report 8448-303, Table 2
QC performance	• Cumulative bias range: -7.4 to 1.2% • Cumulative precision: ≤14.9%	Report 8448-303, Table 4
Method reproducibility	Incurred sample re-analysis was performed in 10.9% (24 of 220) of study samples, and 87.5% of the samples met the pre-specified criteria	Report 8448-303, Table 7
Study sample analysis/stability	All study samples were analysed within validated stability of 1021 days of collection at -20°C	Report 8448-303, Section 4.3
Standard calibration curve	0.729, 1.46, 2.92, 7.29, 14.6, 29.2, 58.3 and 60.8 nmol/L	

ウゴービ皮下注
非アルコール性脂肪肝炎（NASH）

2.7.1.4 付録
2. 中国におけるセマグルチドの測定法のバリデーション

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

Table of contents

Page

Table of contents 2

List of abbreviations and definitions of terms 3

1 Introduction 4

1.1 Method 4

1.1.1 Determination of semaglutide - LC-MS/MS assays 4

2 Conclusion 6

List of abbreviations and definitions of terms

ISR	incurred sample reanalysis
NDA	new drug application
PK	pharmacokinetic(s)
T2D	type 2 diabetes

Definition of terms

The clinical trials within the development programme for semaglutide s.c. 2.4 mg once weekly for NASH are identified by the project name NN9931 followed by a unique 4-digit number (e.g., NN9931-4553). In general, when referring to trials in the programme, NN9931 is omitted (e.g., trial 4553).

1 Introduction

1.1 Method

1.1.1 Determination of semaglutide - LC-MS/MS assays

The samples from Chinese subjects obtained from trial 4553 were analysed at Labcorp, Shanghai. The LC-MS/MS assay conducted to analyse semaglutide in plasma, described in Summary 2.7.1 (Wegovy®), with the assay range of 0.729 – 60.8 nmol/L (Celerion, Switzerland Study AA95860 and CA11388 [M 5.3.1.4]) was transferred to Labcorp, Shanghai. The assay was validated at Labcorp (Study 8406-773 [M 5.3.1.4]) and the assays at Celerion, Switzerland and Labcorp, Shanghai were cross-validated (Celerion, Switzerland Study No. CA32190 and Labcorp, Shanghai (Study 8450-135 [M 5.3.1.4], see Table 1). The validation results are summarised in Table 2.

Table 1 China Assay Validations - History

Laboratory	Assay	Matrix	Validation Study ID	Content	Report Date
[redacted]	LC-MS/MS	EDTA Plasma	**8406-773**	Full validation	25-May-2021
	LC-MS/MS	EDTA Plasma	**8406-773**	Full validation, Add. 1	08-Jul-2021
	LC-MS/MS	EDTA Plasma	**8450-135**	Cross-validation	09-Jun-2021
	LC-MS/MS	EDTA Plasma	**CA32190**	Cross-validation	19-Nov-2020

Table 2 China Assay Validations – Summary

Platform	Matrix	Parameter	Result	Reference
LC-MS/MS	K_3EDTAPlasma	Range	0.729 – 60.8 nmol/L	8406-773
		Regression	Linear weighted $1/x^2$	8406-773
		Accuracy	Intra Assay: -7.1% to 5.0% Inter Assay: -0.4% to 2.7%	8406-773
		Precision	Intra Assay: 0.8% to 6.2% Inter Assay: 2.5% to 6.6%	8406-773
		Dilution	Dilution 1:5 within acceptance criteria	8406-773
		Sensitivity	LLOQ = 0.729 nmol/L	8406-773
		Recovery		
		Semaglutide	85.1% – 93.5%	8406-773
		IS (NNC0113-0000-4196)	135.2%	8406-773
		Plasma Stability	24 hours at room temperature	8406-773
			159 days at -20°C (-10°C to -30°C)	8406-773
			594 days at -20°C (-10°C to -30°C)	8406-773 Add. 1
			159 days at -70°C (-60°C to -80°C)	8406-773
			594 days at -70°C (-60°C to -80°C)	8406-773 Add. 1
		Freeze/thaw plasma stability	4 cycles at -20°C (-10°C to -30°C)	8406-773
			4 cycles at -70°C (-60°C to -80°C)	8406-773
		Whole blood stability	2 hours at room temperature and on wet ice	8406-773
		Interference:		
		Matrix	No impact, assay valid	8406-773
		Chinese population	No impact, assay valid	8406-773
		Haemolytic plasma	No impact, assay valid	8406-773
		Hyperlipaemic plasma	No impact, assay valid	8406-773
		Cross-validation	Within acceptance	8450-135 and CA32190
			Labcorp, Shanghai: Mean RSD% Accuracy% QC Low: 2.36 4.1% 107.8% QC Mid: 10.3 4.7% 105.9% QC High: 51.3 5.0% 105.6% QC Dil: 264 3.0% 108.6%	
			Celerion Switzerland: Mean RSD% Accuracy% QC Low: 2.26 7.4% 103.2% QC Mid: 9.84 4.0% 101.1% QC High: 49.8 3.2% 102.5% QC Dil: 248 3.2% 102.1%	
		ISR	Within acceptance in all trials	

2 Conclusion

Samples from Chinese subjects in trial 4553 were analysed with a validated method comparable to the method used for samples from the other global subjects in trial 4553 and trials included in Summary 2.7.1 (Wegovy®).