

トルリシティ皮下注 0.75 mg アテオス

2.6.1 緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

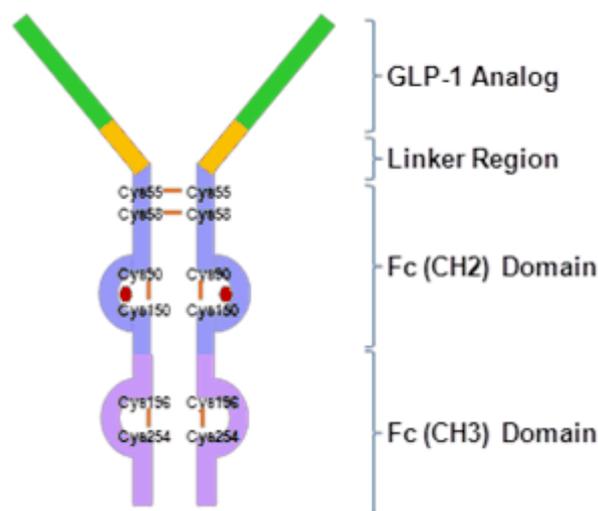
2.6.1	序論	2
2.6.1.1	参考文献	3

略語一覧

ADCC	抗体依存性細胞傷害
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
cAMP	環状アデノシンーリン酸
C_{ave}	平均血漿中濃度
CDC	補体依存性細胞傷害
C_{max}	最高血漿中濃度
Cys	システイン
dP/dt_{max}	左心室内圧最大立ち上がり速度
DPP-4	ジペプチジルペプチダーゼ-4
EC ₅₀	50%効果濃度
EFD 試験	胚・胎児発生に関する試験
ELISA	酵素結合免疫吸着測定
FDA	米国食品医薬品局
G8E22-L-IgG4	デュラグルチド類縁体
GIP	胃抑制ペプチド
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GLP-1	グルカゴン様ペプチド-1
GPCR	Gタンパク質共役受容体
HbA1c	ヘモグロビン A1c
HEK	ヒト胎児腎臓由来
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HIP	Human islet amyloid polypeptide
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
Ig	免疫グロブリン
I_{Kr}	急速活性化遅延整流カリウム電流
ISR	実試料の再分析
IVGTT	静脈内グルコース負荷
K_i	阻害定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LDH	乳酸脱水素酵素
LLOQ	定量下限濃度
NFAT	活性化 T 細胞核内因子
NOAEL	無毒性量
NOEL	無影響量
PanIN	膵上皮内腫瘍
PBMC	末梢血単核球細胞
PBS	リン酸緩衝生理食塩液
PPND	出生前及び出生後の発生
QC	Quality control
QTc	補正 QT
RE	相対誤差
RSD	相対標準偏差
SD	標準偏差
SEM	標準誤差
SGI	グルコースの段階的注入
SPA	シンチレーション近接アッセイ
SPR	表面プラズモン共鳴
TK	トキシコキネティクス
T_{max}	最高血漿中濃度到達時間
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick-end labeling
ZDF	Zucker 糖尿病肥満

2.6.1 緒言

LY2189265（以下、デュラグルチド）は、長時間作用型ヒトグルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬である。デュラグルチドはアミノ酸置換を行ったヒト GLP-1 アナログと改変ヒト免疫グロブリン（Ig） G4-Fc 領域とが小型ペプチドリンカーで共有結合し、そのサブユニット 2 分子がジスルフィド結合した融合タンパク質である（図 2.6.1-1）。ジペプチジルペプチダーゼ-4（DPP-4）による不活性化を回避し、かつ免疫原性を軽減することを目的として GLP-1 アナログ領域のアミノ酸配列が改変されており、デュラグルチドの GLP-1 アナログ領域と天然型ヒト GLP-1 (7-37) との相同性は約 90% である。また、GLP-1 アナログ領域に IgG4-Fc 領域を結合することでクリアランスを低下させており、さらに、抗体産生及び免疫学的細胞傷害の原因となる高親和性 Fc 受容体との相互作用を抑制するためにデュラグルチドの IgG4-Fc 領域に改変が加えられている（Glaesner et al. 2010）。



改変型ヒト GLP-1 アナログ領域（GLP-1 Analog）、ペプチドリンカー（Linker Region）及び改変型ヒト IgG4 の Fc 領域 [Fc (CH2) Domain 及び Fc (CH3) Domain] を示す。赤線はシステイン（Cys）残基を介したサブユニット内及びサブユニット間でのジスルフィド結合を示す。赤い記号は N-グリコシル化部位（アスパラギン残基 126）を示す。

図 2.6.1-1 デュラグルチドの構造

デュラグルチドは、グルコース濃度依存性のインスリン分泌促進に加え、GLP-1 受容体作動薬が有するグルカゴン濃度の低下、胃内容排出の遅延及び体重減少等の作用を示すと考えられる。これらの作用により、グルコース動態（胃内容排出の遅延、グルカゴン濃度の低下）とグルコース代謝（ β 細胞機能）を調節し、空腹時及び食後血漿中グルコース濃度を低下する。その結果、全体的な血糖コントロールを改善する。

これまでに得られた日本人 2 型糖尿病患者を対象としたデュラグルチド 0.75 mg の単独療法及び経口血糖降下薬との併用療法の試験成績から、期待される血糖降下作用及び安全性プロファイルが確認されたため、製造販売承認申請を行うこととした。予定している販売名等申請内容の概略を表 2.6.1-1 に示す。

表 2.6.1-1 予定販売名、効能又は効果、用法及び用量等

一般名	デュラグルチド（遺伝子組換え）（JAN）
販売名	トルリシティ皮下注 0.75 mg アテオス
成分・含量（1キット中）	デュラグルチド（遺伝子組換え） 0.75 mg／0.5 mL
効能・効果	2型糖尿病
用法・用量	通常、成人には、デュラグルチド（遺伝子組換え）として、0.75 mg を週に 1 回、皮下注射する。
剤形	注射剤
投与経路	皮下投与

なお、2015年2月時点において、外国ではデュラグルチドを1.5 mg含有する製剤が米国及び欧州において承認されている。また、本剤は注入器（シングルユースペン）の内部に1回分の薬液が充填されたプレフィルドシリンジをあらかじめ装填したキット製品である。

2.6.1.1 参考文献

Glaesner W, Vick AM, Millican R, Ellis B, Tschang SH, Tian Y, et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26:287-296.

トルリシティ皮下注 0.75 mg アテオス

2.6.2 薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.2	薬理試験の概要文	1
2.6.2.1	まとめ	1
2.6.2.2	効力を裏付ける試験	2
2.6.2.2.1	In Vitro でのデュラグルチドのヒト GLP-1 受容体に対する特異的結合	2
2.6.2.2.2	In Vitro でのデュラグルチドによるヒト GLP-1 受容体活性化	3
2.6.2.2.3	In Vitro でのラット及びカニクイザル由来膵島のグルコース依存性インスリン分泌に対するデュラグルチドの作用.....	3
2.6.2.2.4	In Vitro での抗体依存性細胞傷害 (ADCC) エフェクター機能に対するデュラグルチドの作用	5
2.6.2.2.5	デュラグルチドによる T 細胞エピトープの In Silico 評価	7
2.6.2.2.6	ラットを用いた IVGTT 試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌作用の時間推移	12
2.6.2.2.7	カニクイザルを用いた IVGTT 試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌作用についての In Vivo 評価	13
2.6.2.2.8	ラットを用いた SGI 試験におけるデュラグルチドによるインスリン分泌作用の用量依存性についての In Vivo 評価	14
2.6.2.2.9	カニクイザルを用いた SGI 試験におけるデュラグルチド単回投与による In Vivo インスリン分泌作用	16
2.6.2.2.10	カニクイザルを用いた SGI 試験におけるデュラグルチド反復投与による In Vivo インスリン分泌作用	17
2.6.2.3	副次的薬理試験	19
2.6.2.4	安全性薬理試験	19
2.6.2.4.1	心血管系に関する試験	19
2.6.2.4.1.1	In Vitro hERG 試験.....	19
2.6.2.4.1.2	サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験.....	20
2.6.2.4.1.3	サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験.....	22
2.6.2.4.1.4	サルを用いた 3 ヶ月間反復投与毒性試験及び 1 ヶ月間回復性試験.....	23
2.6.2.4.1.5	サルを用いた 9 ヶ月間反復投与毒性試験及び 2 ヶ月間回復性試験.....	23
2.6.2.4.2	呼吸器系に関する試験	24
2.6.2.4.3	中枢神経系に関する試験	24
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用	25
2.6.2.6	考察及び結論	25
2.6.2.7	図表	26
2.6.2.8	参考文献	26

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) は、プレプログルカゴンからプロセッシングを受けることで産生されるグルカゴン関連ペプチドである。GLP-1 は Gs タンパク質共役型 7 回膜貫通型受容体である GLP-1 受容体に結合し、環状アデノシンーリン酸 (cAMP) 経路を介してその作用を発揮する (Holst 2007)。GLP-1 の配列は哺乳類で同一である (Holst 2007)。また、GLP-1 受容体は動物種間で相同性が高く、ラットとヒトの相同性は 91%、サルとヒトでは 98% である (Knudsen et al. 2012)。GLP-1 が作用する主な標的組織は、膵β細胞、胃腸管系及び求心性末梢感覚神経である。GLP-1 は、β細胞からのグルコース依存性インスリン分泌を亢進させるとともに、α細胞からの食後グルカゴン分泌を抑制することでグルコース恒常性に寄与している (Holst 2007)。また、GLP-1 は食欲を抑制して摂食量を低下させること、胃内容排出を抑制することが明らかにされており (Holst 2007)、体重増加を来しにくいことが期待される。一方で、GLP-1 はジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) により速やかに不活性化された後に排泄されるため臨床使用上の制限がある。したがって、GLP-1 のアナログ及び長時間作用型アナログ製剤が開発されている (Glaesner et al. 2010)。

LY2189265 (以下、デュラグルチド) は、長時間作用型ヒト GLP-1 受容体作動薬である。デュラグルチドはアミノ酸置換を行ったヒト GLP-1 アナログと改変ヒト免疫グロブリン (Ig) G4-Fc 領域とが小型ペプチドリンカーで共有結合し、そのサブユニット 2 分子がジスルフィド結合した融合タンパク質である (図 2.4-1)。DPP-4 による不活性化を回避し、かつ免疫原性を軽減することを目的として GLP-1 アナログ領域のアミノ酸配列が改変されており、デュラグルチドの GLP-1 アナログ領域と天然型ヒト GLP-1 (7-37) との相同性は約 90% である。また、GLP-1 アナログ領域に IgG4-Fc 領域を結合することでクリアランスを低下させており、さらに、抗体産生及び免疫学的細胞傷害の原因となる高親和性 Fc 受容体との相互作用を抑制するためにデュラグルチドの IgG4-Fc 領域に改変が加えられている (Glaesner et al. 2010)。

一連の薬理的データにおいて、デュラグルチドの GLP-1 受容体に対する特異性、in vitro 及び in vivo におけるインスリン分泌作用並びに in vivo における作用持続性を検討した。すなわち、in vitro では、組換え細胞系並びにラット及びカニクイザル由来の膵島細胞を用いてデュラグルチドによるインスリン分泌作用を確認した。In vivo では、ラット及びカニクイザルを用いた静脈内グルコース負荷 (IVGTT) 試験及びグルコースの段階的注入 (SGI) 試験において、デュラグルチドのグルコース依存的インスリン分泌作用を確認した。得られた試験結果を以下に示す。

- デュラグルチドは、ラット、カニクイザル及びヒトの GLP-1 受容体を強力に活性化させた。
- ラットに一過性の高血糖を惹起したモデル (IVGTT 及び SGI) にデュラグルチドを単回皮下投与したとき、デュラグルチドの用量に依存してインスリン分泌が亢進した。
- カニクイザルに一過性の高血糖を惹起したモデル (SGI) にデュラグルチドを単回

皮下投与したとき、インスリン分泌が亢進した。

- カニクイザルに一過性の高血糖を惹起したモデル (SGI) にデュラグルチドを週 1 回反復皮下投与したとき、インスリン分泌が亢進した。
- サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験及び反復投与毒性試験において、デュラグルチド投与による散発的な心拍数の上昇及び補正 QT (QTc) 間隔の延長が認められた。心拍数の上昇は GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化と考えられた。QT/QTc 評価試験及び国内外の第 II 相/第 III 相臨床試験では、臨床的に問題となる QT/QTc 間隔の延長は認められていない。
- サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験において、呼吸器系並びに中枢神経系、行動及び体温に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In Vitro でのデュラグルチドのヒト GLP-1 受容体に対する特異的結合

(添付資料 4.2.1.1.1、bTDR225 試験)

デュラグルチドのヒト GLP-1 受容体に対する結合の特異性を検討する目的で、ヒト胃抑制ペプチド (GIP) 受容体及びヒトグルカゴン受容体に対する結合能を比較し、これら 3 種の受容体へのペプチドリガンド (GLP-1、GIP 及びグルカゴン) の結合に対するデュラグルチドの競合作用の有無をシンチレーション近接アッセイ (SPA) 法を用いた競合的リガンド/受容体結合試験により評価した (表 2.6.2-1)。それぞれの受容体を過剰発現させた組換え細胞株由来の膜画分を SPA ビーズ上に固相化した。¹²⁵I で標識したペプチドリガンド (¹²⁵I-GLP、¹²⁵I-GIP 又は ¹²⁵I-グルカゴン) を添加し、SPA ビーズ上の受容体に結合させたときの放射能をシンチレーションカウンターで定量し、count per minute で表した。予め添加したペプチドリガンドと各濃度のデュラグルチドを競合反応させ、ビーズと結合した放射線量の低下を測定することにより、阻害定数 K_i 値を得た。なお、試験系確認のために陽性対照として GLP-1 (7-36)-NH₂ を用いた。

表 2.6.2-1 組換えヒト GLP-1 受容体、グルカゴン受容体又は GIP 受容体を過剰発現させた細胞から調製した膜画分を用いた In Vitro における受容体 (bTDR225 試験)

化合物	受容体結合の阻害定数 K_i (nM)		
	ヒト GLP-1 受容体	ヒトグルカゴン受容体	ヒト GIP 受容体
デュラグルチド	4.20 (0.45, n=3)	>1360 (n=1/3)	>697 (n=1/3)
GLP-1 (7-36)-NH ₂	0.388 (0.043, n=22)	>23700 (n=1/11)	>94.5 (n=1/14)

値は幾何平均値、括弧内には標準誤差及び試験数 (n) を示す。

50%阻害に到達しなかった場合、試験に用いた最高濃度を K_i とし「>」で示した。

試験数 (n) の x/y は、一部の結果については 50%阻害に到達せず、 K_i の平均値の算出に用いることができなかったため、合計 y 回の試験のうち x 回の試験から K_i を算出したことを示す。

デュラグルチドはヒト GLP-1 受容体に 4.20 ± 0.45 nM の K_i で結合したが、ヒト GIP 受容体及びヒトグルカゴン受容体への結合は弱く (K_i はそれぞれ >697 nM 及び >1360 nM)、デュラグルチドはヒト GLP-1 受容体に特異的に結合することが確認された。

2.6.2.2.2 In Vitro でのデュラグルチドによるヒト GLP-1 受容体活性化

(添付資料 4.2.1.1.2、bTDR01 試験)

GLP-1 及びそのアナログは、クラス B の G タンパク質共役受容体 (GPCR) であるヒト GLP-1 受容体を介して細胞内の cAMP 濃度を増加させることにより、膵臓β細胞のグルコース誘発性インスリン分泌を亢進させる。デュラグルチドがヒト GLP-1 受容体に作用して細胞内 cAMP 濃度を増加させることを確認するために、組換え細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイによりデュラグルチドのヒト GLP-1 受容体活性化作用について評価した (表 2.6.2-2)。本法では、ヒト GLP-1 受容体及び細胞内レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ) を安定的にトランスフェクトしたヒト胎児腎臓由来 (HEK) 293 細胞を用いた。このルシフェラーゼレポーター遺伝子の転写は、cAMP 応答配列の制御下にあり、ルシフェラーゼ産生は GLP-1 受容体活性化による cAMP 産生を反映する。各濃度のデュラグルチドとインキュベートし、GLP-1 受容体刺激から生じる発光を測定した。濃度範囲 0.0003 ~ 3 nM のデュラグルチドを用いた 19 試験 (段階希釈した重複する 12 濃度を含む) の各用量反応曲線から 50%効果濃度 (EC₅₀) を得た。これらの試験では、天然型 GLP-1 (7-37)-OH の 8 位のアラニンを変換した合成ペプチド LY307161 を対照とした。統計学的有意差を Student の t 検定を用いて評価した。

表 2.6.2-2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにおけるデュラグルチドのヒト GLP-1 受容体活性化作用 (bTDR01 試験)

	デュラグルチド	LY307161
EC ₅₀ (pM)	12.6	26.5
標準誤差 (pM)	2.5	1.6
試験数 (n)	19	19

略号: EC₅₀ = 50%効果濃度

デュラグルチドの各濃度での試験は triplicate で、LY307161 の各濃度での試験は duplicate で実施した。

デュラグルチドはヒト GLP-1 受容体に対してアゴニスト作用を示し、EC₅₀ は 12.6 ± 2.5 pM であった。また、デュラグルチドの効力は LY307161 と比較して約 2 倍強かった (p < 0.0001)。本試験では天然 GLP-1 (7-37)-OH と比較していないが、別試験で LY307161 の効力は天然 GLP-1 (7-37)-OH と比較して約 60%低かった (██████ 20██) ことから、デュラグルチドの効力は天然 GLP-1 (7-37)-OH と同程度であることが示唆される。

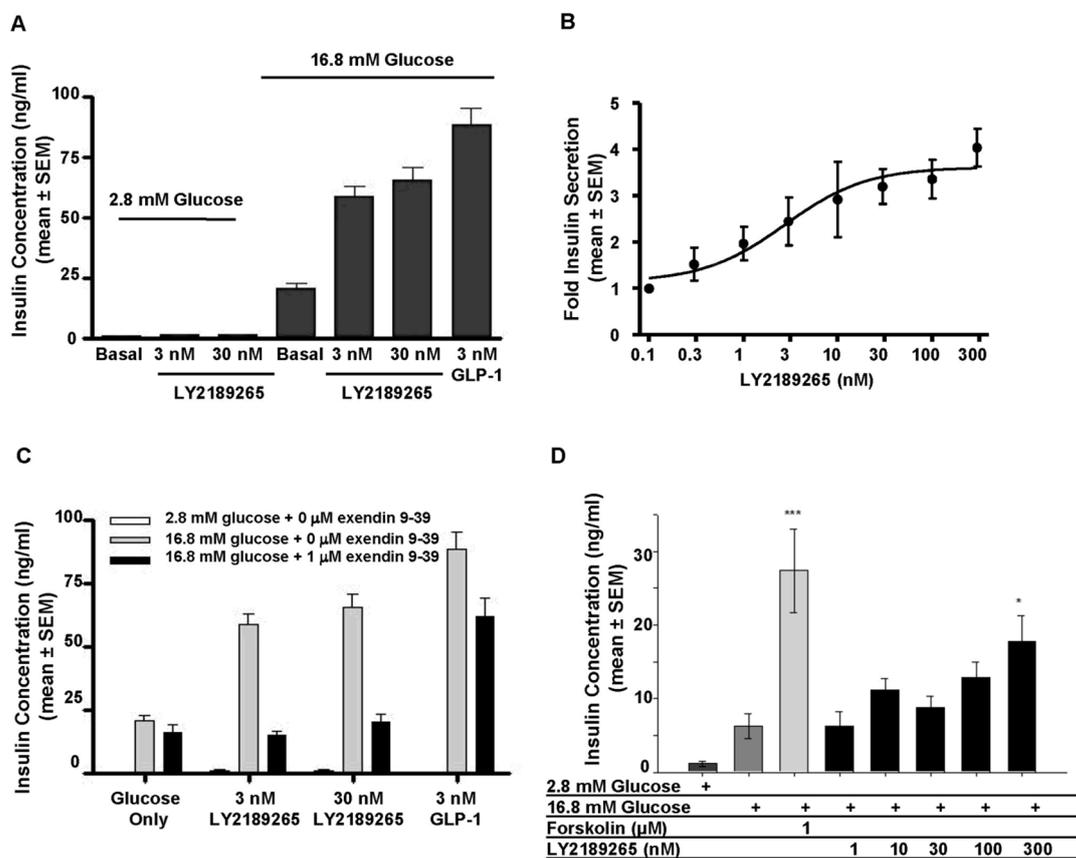
2.6.2.2.3 In Vitro でのラット及びカニクイザル由来膵島のグルコース依存性インスリン分泌に対するデュラグルチドの作用

(添付資料 4.2.1.1.3、DBT56 試験)

GLP-1 の主な標的として膵島のβ細胞が挙げられる。GLP-1 による膵臓 GLP-1 受容体の活性化により、グルコース依存的にインスリン分泌が亢進する。デュラグルチドの作用機序を確認するために、ラット膵島細胞腺腫細胞株 INS-1 832/3、Sprague Dawley ラット由来の膵島細胞及びカニクイザル由来の膵島細胞をデュラグルチドで刺激したときのインスリン分泌を測定した (図 2.6.2-1)。ラット膵島細胞では、GLP-1 受容体阻害薬

exendin-4 (9-39) を用いてデュラグルチドのインスリン分泌作用の特異性についても検討した。

INS-1 832/3 細胞を酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) プレートに加え、高濃度 (16.8 mM) 又は低濃度 (2.8 mM) のグルコース存在下で各濃度のデュラグルチドとインキュベートした。Sprague Dawley ラット又はカニクイザルの膵臓から調製した新鮮な膵島細胞を ELISA プレートに加え、高濃度 (16.8 mM) 又は低濃度 (2.8 mM) のグルコース存在下で各濃度のデュラグルチドとインキュベートした。また、ラット膵島細胞を用いて、exendin-4 (9-39) 1 μ M 存在下で同様の試験を行い、デュラグルチドのインスリン分泌作用の特異性を検討した。90 分間インキュベートした後のインスリン濃度を電気化学発光法により測定した。対照 (16.8 mM グルコース単独添加時) との統計学的有意差を Dunnett の多重比較検定を用いて評価した。



グラフ A, C, D の値は平均値 \pm 標準誤差 (n=3~6) を示す。

グラフ A : INS-1 832/3 細胞での検討で、デュラグルチドは、高濃度グルコース (16.8 mM) によるラット膵島インスリン分泌を亢進させるが、低濃度グルコース (2.8 mM) によるラット膵島インスリン分泌は亢進しなかった。図は独立して行った 2 試験のうちの 1 試験の結果。

グラフ B : 高濃度グルコース (16.8 mM) 存在下でのラット膵島インスリン分泌の亢進。値は独立した 4 試験からのデュラグルチド非添加時に対する増加倍数の平均値 \pm 標準誤差 (n=4) を示す。

グラフ C : ラット膵島細胞において、GLP-1 受容体拮抗薬 exendin-4 (9-39) は、デュラグルチドによるインスリン分泌の亢進を抑制した。図は独立して行った 2 試験のうちの 1 試験の結果。

グラフ D : カニクイザル膵島細胞において、デュラグルチドは 16.8 mM グルコース存在下でのインスリン分泌を濃度依存的に亢進させた。* p <0.05 及び*** p <0.001 Dunnett の多重比較検定を用いて 16.8 mM グルコース添加時の対照と比較した時の統計学的有意差。

図 2.6.2-1 ラット及びサル膵島細胞におけるデュラグルチドによる GLP-1 受容体活性化を介したグルコース依存性インスリン分泌の亢進 (DBT56 試験)

INS-1 832/3 細胞を用いて、独立した 2 試験を行った。デュラグルチドは高濃度グルコース (16.8 mM) 存在下でのみ濃度依存的にインスリン分泌を亢進させ、各試験における EC₅₀ はそれぞれ 8.3 及び 34 nM であった。また、ラット膵島において、デュラグルチドは高濃度グルコースによるインスリン分泌を濃度依存的に亢進させ (EC₅₀ は 4.2 nM)、この作用は exendin-4 (9-39) により阻害された。一方、カニクイザル膵島において、デュラグルチドの 300 nM で高濃度グルコースによるインスリン分泌の亢進が認められた。

低濃度グルコース存在下では、INS-1 832/3 細胞並びにラット及びサル膵島細胞のいずれにおいてもデュラグルチドはインスリン分泌亢進作用を示さず、デュラグルチドのインスリン分泌作用はグルコース濃度に依存的であることが確認された。また、ラット膵島細胞においてインスリン分泌に対するデュラグルチドの作用は exendin-4 (9-39) により阻害され、デュラグルチドによるインスリン分泌は GLP-1 受容体を介する特異的な作用であると考えられた。以上の結果から、デュラグルチドは GLP-1 受容体に対して天然 GLP-1 と同様の機序により作用することが示された。

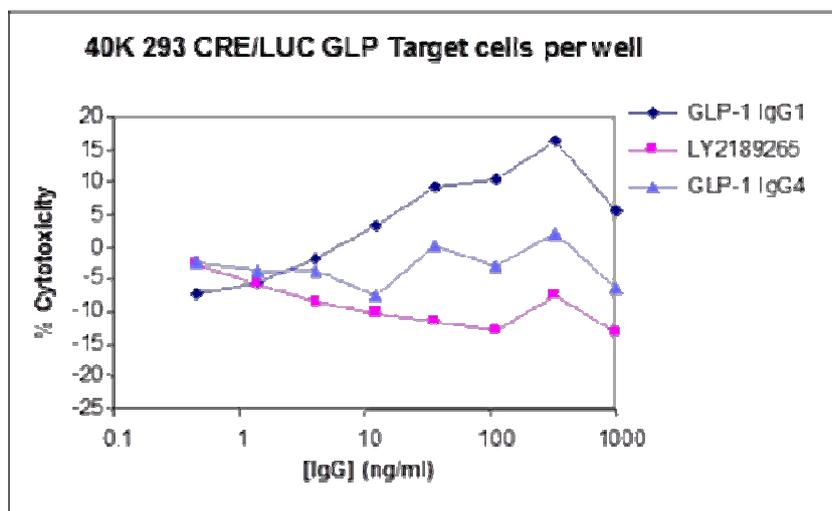
2.6.2.2.4 In Vitro での抗体依存性細胞傷害 (ADCC) エフェクター機能に対するデュラグルチドの作用

(添付資料 4.2.1.1.4、bTDR04 試験)

抗体の IgG-Fc 領域は、抗体クラス及び特定の標的抗原特性に依存して抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 及び補体依存性細胞傷害 (CDC) を発現する。デュラグルチドは、安全性の観点から抗体の IgG-Fc 領域によるこれらの細胞傷害が発現しないように設計されている。IgG4 は補体活性化作用が弱いことから (Burton and Woof 1992)、CDC 発現リスクを最小化するためにデュラグルチドにはヒト IgG4 の Fc 領域が含まれている。サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験 (P00054 試験) において、デュラグルチドの補体活性化の有無を評価した。試験 0、15 及び 32 日の C3a 及び Bb 補体分解産物の血漿中濃度にデュラグルチドに関連した変化は見られなかった。また、ラットを用いた 6 ヶ月間反復投与毒性試験、サルを用いた 9 ヶ月間反復投与毒性試験のいずれの毒性試験においても、GLP-1 受容体を発現する膵臓、胃、肺、腎臓、心臓及び中枢神経系器官などの病理組織学的検査において、エフェクター機能を介した作用を示唆する所見は見られなかった。

IgG4 抗体は in vitro で ADCC 活性を誘発しないことが知られており (Brüggemann et al. 1987)、in vivo においても ADCC 活性を示す可能性が低いことから、デュラグルチドには IgG4-Fc 領域がキャリア分子として含まれている。加えて、Fcγ 受容体に対する結合親和性をさらに低下させるために (Xu et al. 2000)、Fcγ 受容体結合部位に改変を加えている。デュラグルチドが ADCC を誘発する可能性について in vitro 試験で評価し、他の GLP-1/Fc 融合タンパク、すなわち、ヒト IgG1 の非改変 Fc 領域に融合させた GLP-1 アナログ (非改変 IgG1 アナログ) 及びヒト IgG4 の非改変 Fc 領域に融合させた GLP-1 アナログ (非改変 IgG4 アナログ) と比較した。標的細胞としてヒト GLP-1 受容体を安定的にトランスフェクトした HEK293 細胞株、エフェクター細胞としてヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) を用い、放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定することによりこれらのタンパク質の ADCC 活性を定量した。第 2.6.2.2.2 項で得られた GLP-1 受容体を活性化

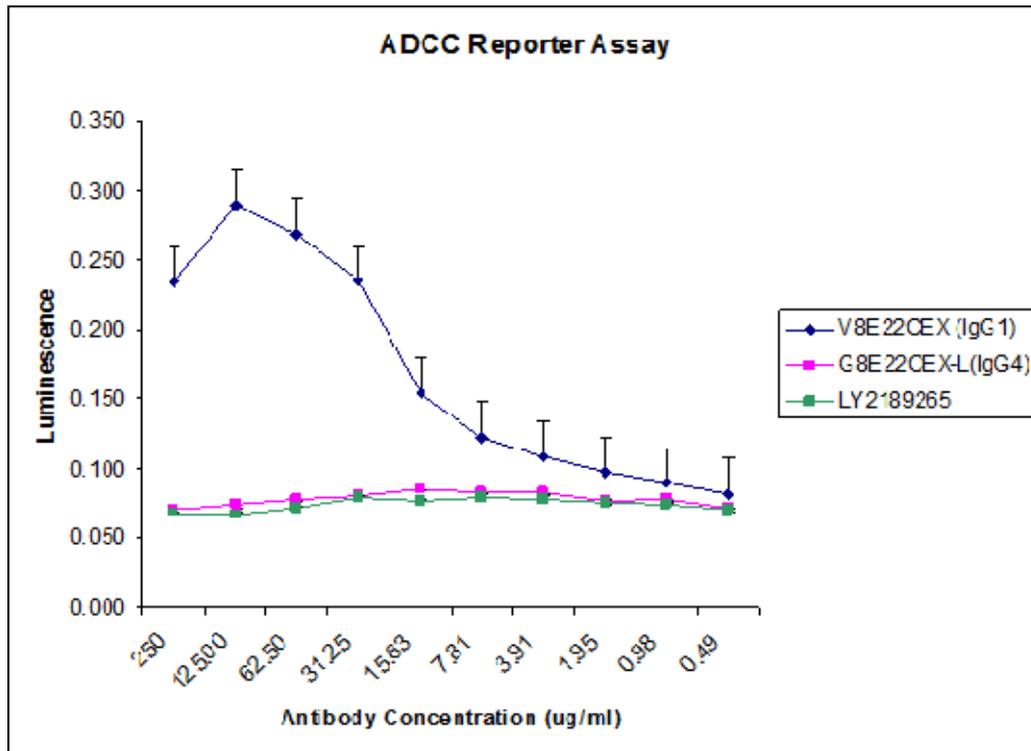
するデュラグルチドの EC₅₀ 値の約 1000 倍までの濃度で検討した。PBMC を用い、標的細胞数、標的細胞に対するエフェクター細胞の比及びタンパク濃度を変化させた条件で検討した。非改変 IgG1 アナログは細胞毒性を誘発したが、デュラグルチドには ADCC 活性は見られなかった (図 2.6.2-2)。



略号：K = 1000、各種標的細胞数を用いた一連の試験の代表的データ (1 試験) を示す。標的細胞としてヒト GLP-1 受容体を安定的にトランスフェクトした HEK293 細胞及び cAMP 応答性 CRE4-ルシフェラーゼシステムを用いた。GLP-1 IgG1 は非改変 IgG1 アナログを、GLP-1 IgG4 は非改変 IgG4 アナログを示す。

図 2.6.2-2 3 種の GLP-IgG-Fc 融合タンパク質の ADCC 活性 (bTDR04 試験)

次に、デュラグルチドが ADCC 活性を誘発する可能性について、細胞を用いた ADCC レポーター遺伝子アッセイで評価した。ADCC レポーター遺伝子アッセイは、PBMC を用いた ADCC アッセイの代替手法として開発された方法である (Parekh et al. 2012)。本アッセイでは、CD16a 受容体及び活性化 T 細胞核内因子 (NFAT) 誘導性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定発現させた Jurkat T 細胞株を用いた。Jurkat-NFAT レポーター細胞株及び GLP-1 受容体遺伝子を安定発現させた HEK293 細胞を用いてデュラグルチドの ADCC 活性を評価した。その結果、非改変 IgG1 アナログは顕著な ADCC 活性化を引き起こしたが、デュラグルチド及び非改変 IgG4 アナログは ADCC 活性を示さなかった (図 2.6.2-3、Glaesner et al. 2010)。



標的細胞としてヒト GLP-1 受容体を安定的にトランスフェクトした HEK293 細胞、エフェクター細胞として遺伝子操作した Jurkat-NFAT ルシフェラーゼ細胞株を用いた。Duplicate で実施した試験を 3 回行った。値は平均値+標準誤差を示す。

図 2.6.2-3 3 種の GLP-IgG-Fc 融合タンパク質の ADCC 活性 (Glaesner et al. 2010)

上記 in vitro 試験及び第 2.6.6.3.5 項に記載したサルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験の結果から、デュラグルチドはエフェクター機能を示さないことが確認された。

2.6.2.2.5 デュラグルチドによる T 細胞エピトープの In Silico 評価

(添付資料 4.2.1.1.5、bTDR224 試験)

デュラグルチドは、哺乳類培養細胞で産生される融合タンパク質である。バイオテクノロジー応用医薬品を患者に投与するときには、異種エピトープに対する抗薬物抗体の形成が懸念される。EpiMatrix アルゴリズム (EpiVax 社) を用いた in silico ツールにより T 細胞エピトープを同定・予測することが可能である (De Groot et al. 2001)。この in silico ツールを用いて、デュラグルチド、天然ヒト GLP-1 及びデュラグルチド類縁体 (G8E22-L-IgG4) の T 細胞エピトープを解析した。G8E22-L-IgG4 はデュラグルチドの構造最適化の過程で設計された仮想のタンパク質であり、天然型 GLP-1 の 8 位のアラニン及び 22 位のグリシンをそれぞれグリシン及びグルタミン酸に置換した GLP-1 アナログを、16 アミノ酸から成るペプチドリンカーを介して非改変 IgG4 Fc 領域に結合した構造を有する (図 2.6.2-4)。

G8E22-L-IgG4 の N 末端配列 (GLP-1 本体、ペプチドリンカー、ヒンジ、IgG4 CH₂ ドメインの最初の 18 アミノ酸配列) が T 細胞エピトープとなる可能性があるため、EpiMatrix アルゴリズムを用いて解析した。天然分子には特に懸念されるエピトープは存在しないが、天然分子のアミノ酸置換やアミノ酸置換を行った GLP-1 アナログと改変ヒ

ト IgG4 のサブユニット 2 分子の結合によりエピトープが生じる可能性が考えられる。天然ヒト GLP-1 のアミノ酸配列、G8E22-L-IgG4 及びデュラグルチドの N 末端 74 アミノ酸配列を図 2.6.2-4 に示す。デュラグルチドの C 末端側のアミノ酸残基（ヒト IgG4 の CH₂ 及び CH₃ ドメイン）は、天然分子と同一であり、新たな T 細胞エピトープを生じないことから解析対象としなかった。天然ヒト GLP-1、G8E22-L-IgG4 及びデュラグルチドの解析結果をそれぞれ表 2.6.2-3、表 2.6.2-4 及び表 2.6.2-5 に示す。表中に陰影をつけた領域は T 細胞エピトープとなる可能性のある部位（エピトープ 1、2、3 及び 4 とする）を表す。

天然ヒト GLP-1 にはエピトープ 1（表 2.6.2-3：9 及び 11 行目）が認められ、G8E22-L-IgG4 のヒト IgG4 抗体部分にはエピトープ 3（表 2.6.2-4：44 行目）及びエピトープ 4（表 2.6.2-4：56～58 行目）が認められたが、これらエピトープ 1、3、4 は天然ヒト GLP-1 及び G8E22-L-IgG4 のヒト IgG4 抗体部分において確認されているため特に懸念にはならないと考えられた。一方、エピトープ 2（表 2.6.2-4：25 行目）は GLP-1 の C 末端と可動性ペプチドリンカーとの結合部で形成されたが、天然ヒト GLP-1 及び G8E22-L-IgG4 のヒト IgG4 抗体部分にエピトープ 2 は認められなかった。デュラグルチドでは、天然ヒト GLP-1 アミノ酸配列の 36 位のアルギニンがグリシンに置換されており、このアミノ酸置換によりエピトープ 2 が消失した。さらに、デュラグルチドのヒト IgG4-Fc 領域に改変が加えられたことでエピトープ 3 及びエピトープ 4 が消失し、新たな T 細胞エピトープも認められないことが確認された（表 2.6.2-5）。

```

GLP-1 (7-37)
  7 HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EPIAWLVKGR G

G8E22-L-IgG4
  1 HGEGTFTSDV SSYLEEQAAK EPIAWLVKGR GGGGGSGGGG SGGGGSAESK YGPPCPPCPA
 61 PEFLGGPSVF LFPP

LY2189265
  1 HGEGTFTSDV SSYLEEQAAK EPIAWLVKG GGGGGSGGGG SGGGGSAESK YGPPCPPCPA
 61 PEAAGGPSVF LFPP
  
```

ペプチドリンカー配列は斜体で示す。IgG4 ヒンジには下線を施している。IgG4 の CH₂ ドメインの N 末端は灰色で示す。天然ヒト GLP-1 配列と異なるアミノ酸は黒色太字、ヒト IgG4 配列と異なるアミノ酸は灰色斜体太字で示す。

図 2.6.2-4 天然ヒト GLP-1 (7-37)、G8E22-L-IgG4（デュラグルチド類縁体）の N 末端 74 アミノ酸及びデュラグルチドの N 末端 74 アミノ酸の配列 (bTDR224 試験)

表 2.6.2-3 EpiMatrixによる天然ヒト GLP-1 の T細胞エピトープ候補の同定
(bTDR224 試験)

#	Sequence	DRB 0101	DRB 0301	DRB 0401	DRB 0701	DRB 0801	DRB 1101	DRB 1301	DRB 1501
1	HAEGTFTSD	-1.81	-1.64	-2.07	-1.79	-2.19	-3	-2.95	-2.01
2	AEGTFTSDV	0.2	0.11	1.36	1.34	-0.59	-0.21	-0.39	-0.2
3	EGTFTSDVS	-0.06	-0.19	0.91	-0.48	-0.21	-0.07	0.33	1.15
4	GTFTSDVSS	-0.15	-0.84	0.99	0.06	-1.25	-0.5	-0.95	-0.46
5	TFTSDVSSY	0.05	1.51	1.05	1.29	0.08	0.03	0.33	-0.46
6	FTSDVSSYL	-0.15	0.63	1.09	0.91	-0.87	-1.37	-1.74	-0.13
7	TSDVSSYLE	-0.73	-1.24	-1.49	0.19	-0.4	-1.13	-1.67	-1.35
8	SDVSSYLEG	-0.9	-0.62	-0.33	0.19	-1.34	-0.65	-1.11	0.01
9	DVSSYLEGQ	-0.2	1.36	1.67	0.87	0.36	0.99	0.28	-0.29
10	VSSYLEGQA	-1.76	-1.43	-2.38	-2.25	-0.21	-1.22	-1.41	-1.01
11	SSYLEGQAA	1.76	-0.3	0.38	-0.27	-0.16	0.41	-0.18	0.43
12	SYLEGQAAK	0.1	0.08	1.18	-1.07	-0.02	0.31	0.07	-0.9
13	YLEGQAAKE	-0.3	-0.68	-1.09	-1.03	0.22	-1.22	-1.62	-1.96
14	LEGQAAKEF	0.5	0.02	-0.07	-0.19	-1.06	0.41	0.84	-0.9
15	EGQAAKEFI	0.4	1.04	-0.42	1.2	-0.16	0.31	0.64	-0.13
16	GQAAKEFIA	0.65	0.02	-0.51	-0.02	-0.35	-1.22	0.12	0.65
17	QAAKEFIAW	-0.141	-1.75	-1.19	0.11	0.17	-0.5	-1.16	-0.74
18	AAKEFIAWL	0.2	-0.32	0.65	0.28	0.03	-0.45	-0.31	-0.26
19	AKEFIAWLV	1.2	-0.89	-0.91	1.12	-0.4	0.12	0.64	1.54
20	KEFIAWLVK	-0.1	-0.14	0.96	0.57	-0.54	1.27	-0.54	0.49
21	EFIAWLVKG	1.2	1.52	0.59	0.65	0.97	0.94	1.35	0.87
22	FIAWLVKGR	-0.4	-0.19	0.25	-0.44	0.41	0.99	1.2	-1.24
23	IAWLVKGRG	-0.9	0.83	-1.71	-1.83	0.55	0.51	0.23	-0.57

DRB 0101-DRB 1501 はヒトで代表的な 8 つの主要組織適合遺伝子複合体クラス II 分子で、#1-23 はこれら分子に結合する天然ヒト GLP-1 を構成する 9 アミノ酸長のペプチド配列を示す。

濃灰色で陰影をつけた領域：スコア 1.64 以上は“hit”、スコア 2.32 以上は主要組織適合遺伝子複合体に結合する可能性が高いことを示す。

表 2.6.2-4 EpiMatrix による G8E22-L-IgG4 の T 細胞エピトープ候補の同定
(bTDR224 試験)

#	Sequence	DRB 0101	DRB 0301	DRB 0401	DRB 0701	DRB 0801	DRB 1101	DRB 1301	DRB 1501
1	HGEGTFTSD	-1.56	-1.37	-1.85	-1.58	-1.95	-2.76	-2.7	-1.73
2	GEGTFTSDV	0.2	0.11	1.36	1.34	-0.59	-0.21	-0.39	-0.2
3	EGTFTSDVSV	-0.06	-0.19	0.91	-0.48	-0.21	-0.07	0.33	1.15
4	GTFTSDVSS	-0.15	-0.84	0.99	0.06	-1.25	-0.5	-0.95	-0.46
5	TFTSDVSSY	0.05	1.51	1.05	1.29	0.08	0.03	0.33	-0.46
6	FTSDVSSYL	-0.15	0.63	1.09	0.91	-0.87	-1.37	-1.74	-0.13
7	TSDVSSYLE	-0.73	-1.24	-1.49	0.19	-0.4	-1.13	-1.67	-1.35
8	SDVSSYLEE	-0.146	-1	-0.64	0.32	-0.87	-0.98	-1.47	-0.62
9	DVSSYLEEQ	-0.2	1.36	1.67	0.87	0.36	0	0.28	-0.29
10	VSSYLEEQA	-0.151	-1.59	-1.71	-1.87	-1.1	-0.166	-1.16	-1.4
11	SSYLEEQAA	0.7	-0.68	-0.2	-1.07	-0.49	0.07	-0.54	-0.4
12	SYLEEQAAK	0.1	0.08	1.18	-1.07	-0.02	0.31	0.07	-0.9
13	YLEEQAAKE	-0.15	-1.48	0.29	-1.16	0.22	-1.22	-1.41	-2.29
14	LEEQAAKEF	-0.2	-0.73	-0.69	-0.78	-1.72	-1.27	0.12	-1.68
15	EEQAAKEFI	0.2	0.83	-0.6	1.03	-0.35	0.41	0.43	-0.35
16	EQAAKEFIA	0.65	0.02	-0.51	-0.02	-0.35	0.22	0.12	0.65
17	QAAKEFIAW	-0.141	-1.75	-1.19	0.11	0.17	-0.5	-1.16	-0.74
18	AAKEFIAWL	0.2	-0.32	0.65	0.28	0.03	-0.45	-0.31	-0.26
19	AKEFIAWLV	1.2	-0.89	-0.91	1.12	-0.4	0.12	0.64	1.54
20	KEFIAWLVK	-0.1	-0.14	0.96	0.57	-0.54	1.27	-0.54	0.49
21	EFIAWLVKG	1.2	1.52	0.59	0.65	0.97	0.94	1.35	0.87
22	FIAWLVKGR	-0.4	-0.19	0.25	-0.44	0.41	0.99	1.2	-1.24
23	IAWLVKGRG	-0.9	0.83	-1.71	-1.83	0.55	0.51	0.23	-0.57
24	AWLVKGRGG	1.02	0.3	-1.18	0.19	0.26	0.12	0.38	-0.07
25	WLVKGRGGG	-1.05	0.4	-1.71	-0.99	2.34	0.79	0.53	-0.24
26	LVKGRGGGG	0.2	1.15	-1.45	-0.86	-0.21	-0.79	-0.7	0.76
27	VKGRGGGGG	-0.9	-0.09	-1.93	-1.2	0.97	-0.69	-0.24	0.43
28	KGRGGGGGS	0.5	1.04	-0.64	-0.69	0.03	0.07	-0.8	0.54
29	GRGGGGGSG	0.85	1.31	-0.87	-0.31	0.41	-0.17	-0.54	0.93
30	RGGGGGSGG	0.45	0.38	-1.13	-0.86	-0.77	-1.42	-1.11	0.15
31	GGGGGSGGG	-0.15	0.72	-0.51	-0.53	-0.11	-0.69	-1.11	0.04
32	GGGGSGGGG	0	0.4	-1.62	-1.03	-0.4	-0.98	-1.41	-0.01
33	GGSGGGGGS	0.25	0.88	0.2	0.19	-0.21	0.31	-0.59	0.1
34	GGSGGGGSA	0.4	0.18	-1.18	-0.78	-0.54	-0.5	-1.62	0.43
35	GSGGGGSAE	-0.5	-0.42	-1.8	-1.07	-0.68	-2.14	-0.188	-0.9
36	SGGGGSAES	0.65	1.04	0.82	-0.4	0.31	0.31	0.02	0.32
37	GGGGSAESK	-0.05	0.29	0.02	-0.61	-1.58	-0.74	-1.11	-1.18
38	GGGSAESKY	-0.65	0.06	-0.47	0.15	-1.2	-1.27	-1.06	-0.9
39	GSAESKYG	0.65	-0.09	0.65	0.15	0.22	0.22	0.43	-0.13
40	GSAESKYGP	-0.55	-0.33	-1.18	-1.07	-0.77	-0.65	-0.39	-1.12
41	SAESKYGPP	-1.96	-1.27	-1.53	-0.9	-2.19	-1.9	-0.264	-1.46
42	AESKYGPPC	0.08	-0.52	-1.13	-1.12	0.5	0.05	-0.13	-0.01
43	ESKYGPPCP	-0.22	-0.35	-1.27	-1.41	0.31	-0.38	-0.18	-1.12
44	SKYGPPCPS	1.46	2.01	0.91	-0.36	1.16	1.19	0.94	0.54
45	KYGPPCPSC	0.74	0.29	-0.07	-0.48	-0.35	0.19	-0.54	0.37
46	YGPPCPSCP	-0.2	-0.64	-0.56	-0.82	-0.73	-0.94	-1.31	-1.07
47	GPPCPSCPA	0.7	-0.3	0.82	-0.19	0.03	0.36	-0.24	-0.01
48	PPCPSCPAP	-0.62	-0.73	-1.36	-1.41	-1.53	-0.2	-1.52	-1.12
49	PCPSCPAP	-0.15	0.5	0.2	0.06	0.69	-0.26	-0.13	-1.4
50	CPSCPAP	0.79	0.56	-0.42	0.32	-0.59	-0.14	-0.03	-0.46
51	PSCPAP	-0.15	-0.7	-0.73	0.61	-1.34	-1.32	-1.28	-0.79
52	SCPAP	-0.2	-0.25	-1.36	-0.65	-0.63	-0.69	-0.13	-0.29
53	CPAP	-1.41	-1.37	-1.09	-0.74	-1.2	-0.98	-1.41	-0.24
54	PAPEFLGGP	-1.05	-0.52	-0.38	-1.45	-0.73	-0.89	-1.31	-0.9
55	APPEFLGGPS	-0.56	-1.32	-1.62	-1.37	-0.63	-0.31	-1.11	0.26
56	PEFLGGPSV	2.04	0.5	-0.07	0.19	-0.16	0.77	0.12	1.15
57	EFLGGPSVF	1.25	1.88	0.02	0.78	0.12	-0.31	0.33	0.6
58	FLGGPSVFL	1.66	0.27	0.33	2.05	-0.3	-0.55	-0.87	0.65
59	LGGPSVFL	-0.6	1.09	-0.87	0.82	-0.35	-0.55	0.89	0.37
60	GGPSVFLFP	-0.3	-0.14	0.42	0.95	-1.15	-0.02	-0.65	0.32
61	GPSVFLFPP	-0.48	-0.09	-1.58	0.15	-0.59	-0.17	-0.44	-0.01

DRB 0101-DRB 1501 はヒトで代表的な 8 つの主要組織適合遺伝子複合体クラス II 分子で、#1-61 はこれら分子に結合する G8E22-L-IgG4 を構成する 9 アミノ酸長のペプチド配列を示す。

濃灰色で陰影をつけた領域：スコア 1.64 以上は”hit”、スコア 2.32 以上は主要組織適合遺伝子複合体に結合する可能性が高いことを示す。

太字は天然ヒト GLP-1 配列と異なるアミノ酸を示す。

表 2.6.2-5 EpiMatrix によるデュラグルチドの T 細胞エピトープ候補の同定
(bTDR224 試験)

#	Sequence	DRB 0101	DRB 0301	DRB 0401	DRB 0701	DRB 0801	DRB 1101	DRB 1301	DRB 1501
1	HGEGTFTSD	-1.56	-1.37	-1.85	-1.58	-1.95	-2.76	-2.7	-1.73
2	GEFTFTSDV	0.2	0.11	1.36	1.34	-0.59	-0.21	-0.39	-0.2
3	EGTFTSDVVS	-0.06	-0.19	0.91	-0.48	-0.21	-0.07	0.33	1.15
4	GTFTSDVSS	-0.15	-0.84	0.99	0.06	-1.25	-0.5	-0.95	-0.46
5	TFTSDVSSY	0.05	1.51	1.05	1.29	0.08	0.03	0.33	-0.46
6	FTSDVSSYL	-0.15	0.63	1.09	0.91	-0.87	-1.37	-1.74	-0.13
7	TSDVSSYLE	-0.73	-1.24	-1.49	0.19	-0.4	-1.13	-1.67	-1.35
8	SDVSSYLEE	-0.146	-1	-0.64	0.32	-0.87	-0.98	-1.47	-0.62
9	DVSSYLEEQ	-0.2	1.36	1.67	0.87	0.36	0	0.28	-0.29
10	VSSYLEEQA	-0.151	-1.59	-1.71	-1.87	-1.1	-0.166	-1.16	-1.4
11	SSYLEEQAA	0.7	-0.68	-0.2	-1.07	-0.49	0.07	-0.54	-0.4
12	SYLEEQAAK	0.1	0.08	1.18	-1.07	-0.02	0.31	0.07	-0.9
13	YLEEQAAKE	-0.15	-1.48	0.29	-1.16	0.22	-1.22	-1.41	-2.29
14	LEEQAAKEF	-0.2	-0.73	-0.69	-0.78	-1.72	-1.27	0.12	-1.68
15	EEQAAKEFI	0.2	0.83	-0.6	1.03	-0.35	0.41	0.43	-0.35
16	EQAAKEFIA	0.65	0.02	-0.51	-0.02	-0.35	0.22	0.12	0.65
17	QAAKEFIAW	-0.141	-1.75	-1.19	0.11	0.17	-0.5	-1.16	-0.74
18	AAKEFIAWL	0.2	-0.32	0.65	0.28	0.03	-0.45	-0.31	-0.26
19	AKEFIAWLV	1.2	-0.89	-0.91	1.12	-0.4	0.12	0.64	1.54
20	KEFIAWLVK	-0.1	-0.14	0.96	0.57	-0.54	1.27	-0.54	0.49
21	EFIAWLVKG	1.2	1.52	0.59	0.65	0.97	0.94	1.35	0.87
22	FIAWLVKGG	-0.3	-0.25	0.25	-0.36	1.02	0.99	1.15	-1.12
23	IAWLVKGGG	-0.9	0.83	-1.71	-1.83	0.55	0.51	0.23	-0.57
24	AWLVKGGGG	0.43	0.24	-1.22	-0.1	0.31	0.12	-1	0.21
25	WLVKGGGGG	-0.3	-0.52	-1.31	-0.78	1.54	-0.02	-0.34	-0.51
26	LVKGGGGGG	0.2	1.15	-1.45	-0.86	-0.21	-0.79	-0.7	0.76
27	VKGGGGGGG	-0.2	0.72	-1.8	-1.2	-0.59	-1.18	-1.11	0.32
28	KGGGGGGGS	0.25	0.77	-0.87	-0.9	-0.21	-0.17	-1.06	0.26
29	GGGGGGGSG	0	0.4	-1.62	-1.03	-0.4	-0.98	-1.41	-0.01
30	GGGGGGSGG	0.45	0.38	-1.13	-0.86	-0.77	-1.42	-1.11	0.15
31	GGGGGSGGG	-0.15	0.72	-0.51	-0.53	-0.11	-0.69	-1.11	0.04
32	GGGSGGGGG	0	0.4	-1.62	-1.03	-0.4	-0.98	-1.41	-0.01
33	GGSGGGGGS	0.25	0.88	0.2	0.19	-0.21	0.31	-0.59	0.1
34	GGSGGGGSA	0.4	0.18	-1.18	-0.78	-0.54	-0.5	-1.62	0.43
35	GSGGGGSAE	-0.5	-0.42	-1.8	-1.07	-0.68	-2.14	-0.188	-0.9
36	SGGGGSAES	0.65	1.04	0.82	-0.4	0.31	0.31	0.02	0.32
37	GGGGSAESK	-0.05	0.29	0.02	-0.61	-1.58	-0.74	-1.11	-1.18
38	GGGSAESKY	-0.65	0.06	-0.47	0.15	-1.2	-1.27	-1.06	-0.9
39	GGSAESKYG	0.65	-0.09	0.65	0.15	0.22	0.22	0.43	-0.13
40	GSAESKYGP	-0.55	-0.33	-1.18	-1.07	-0.77	-0.65	-0.39	-1.12
41	SAESKYGPP	-1.96	-1.27	-1.53	-0.9	-2.19	-1.9	-0.264	-1.46
42	AESKYGPPC	0.08	-0.52	-1.13	-1.12	0.5	0.05	-0.13	-0.01
43	ESKYGPPCP	-0.22	-0.35	-1.27	-1.41	0.31	-0.38	-0.18	-1.12
44	SKYGPPCPP	1.05	1.26	0.02	-0.48	0.41	0.22	0.23	0.1
45	KYGPPCPPC	0.74	0.29	-0.07	-0.48	-0.35	0.19	-0.54	0.37
46	YGPPCPPCP	-0.07	-0.3	-0.78	-1.07	-0.68	-0.33	-1.11	-1.07
47	GPPCPPCPA	0.9	0.02	0.38	-0.65	0.31	0.65	0.07	-0.46
48	PPCPPCPAP	-0.62	-0.73	-1.36	-1.41	-1.53	-1.2	-1.52	-1.12
49	PCPPCPAPE	-0.75	-0.41	-0.87	-1.07	0.69	-0.74	-0.59	-1.4
50	CPPCPAPEA	1.04	0.13	0.07	-0.53	-0.49	0.39	-0.44	-0.18
51	PPCPAPEAA	-0.5	-0.78	-0.38	-0.9	-1.44	-0.94	-1.36	-1.18
52	PCPAPEAAG	-0.35	-0.52	-0.91	-1.54	-0.21	-0.5	-0.44	-1.07
53	CPAPEAAGG	-0.5	-0.73	-0.91	-1.33	-0.4	-1.03	-0.9	-1.12
54	PAPEAAGGP	-0.05	-0.62	0.11	-1.07	-0.82	-0.98	-1.41	-1.01
55	APEAAGGPS	-0.6	-0.78	-1.22	-1.45	-0.87	-0.5	-1.52	-1.07
56	PEAAGGPSV	1.19	0.08	-0.78	0.19	-0.87	-0.14	-0.49	0.43
57	EAGGPSVVF	0.35	0.92	-0.78	0.02	-0.73	-1.18	-0.59	-0.4
58	AAGGPSVFL	1.15	0.27	-0.12	1.62	-0.77	-1.03	-0.87	0.65
59	AGGPSVFLF	-0.1	1.09	-0.42	1.24	0.12	-0.07	0.89	0.37
60	GGPSVFLFP	-0.3	-0.14	0.42	0.95	-1.15	-0.02	-0.65	0.32
61	GPSVFLFPP	-0.48	-0.09	-1.58	0.15	-0.59	-0.17	-0.44	-0.01

DRB 0101-DRB 1501 はヒトで代表的な 8 つの主要組織適合遺伝子複合体クラス II 分子で、#1-61 はこれら分子に結合するデュラグルチドを構成する 9 アミノ酸長のペプチド配列を示す。

濃灰色で陰影をつけた領域：スコア 1.64 以上は“hit”、スコア 2.32 以上は主要組織適合遺伝子複合体に結合する可能性が高いことを示す。太字は天然ヒト GLP-1 配列及びヒト IgG4 抗体部分と異なるアミノ酸を示す。

2.6.2.2.6 ラットを用いた IVGTT 試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌作用の時間推移

(添付資料 4.2.1.1.6、bTDR02 試験)

GLP-1 及びそのアナログは、クラス B の GPCR であるヒト GLP-1 受容体を介して細胞内 cAMP 濃度を増加させ、膵臓β細胞のグルコース誘発性インスリン分泌を亢進させる。デュラグルチドはラット及びサル膵島の GLP-1 受容体をグルコース依存的に活性化することが確認されている (第 2.6.2.2.3 項)。デュラグルチドは、この作用機序により 2 型糖尿病患者において血糖調節の改善が期待される。本作用機序を *in vivo* で確認し、また、デュラグルチドのインスリン分泌作用の時間推移を評価することを目的として、雄 Sprague Dawley ラットを用いて IVGTT 試験を実施した。GLP-1 はグルコース濃度依存的に活性を示すが、絶食した動物では一般的に GLP-1 に対する反応が軽微であることから、デュラグルチド 0.179 及び 1.79 mg/kg (それぞれ 3 及び 30 nmol/kg) を皮下投与し、24 及び 72 時間後にグルコース 0.5 g/kg を静脈内投与した。各群には 5 匹を割り当て、計 20 匹のラットを試験に供した。対照群として計 9 匹の動物を用い、溶媒 (生理食塩液) を投与した。GLP-1 によるインスリン分泌作用のバイオマーカーとして、血漿中インスリン濃度を測定した (表 2.6.2-6)。

表 2.6.2-6 ラットにデュラグルチドを皮下投与 24 及び 72 時間後の血糖動態及びインスリン分泌

化合物	グルコース AUC (0-10 min) (mg·min/dL)	グルコース AUC (0-30 min) (mg·min/dL)	インスリン AUC (0-10 min) (ng·min/mL)	インスリン AUC (0-30 min) (ng·min/mL)
溶媒 24 時間	1448.4 ± 37.5 n=5	2073.4 ± 109.8 n=5	31.2 ± 5.2 n=5	40.5 ± 4.9 n=5
デュラグルチド 3 nmol/kg 24 時間	1475 ± 36 n=5	1600 ± 57* n=5	71.1 ± 8.0* n=5	82.1 ± 8.0* n=5
デュラグルチド 30 nmol/kg 24 時間	1407 ± 40* n=5	1536 ± 130* n=5	43.6 ± 3.8 n=5	45.1 ± 4.9 n=5
溶媒 72 時間	1588 ± 55 n=4	2295 ± 222 n=4	32 ± 5 n=4	44 ± 5 n=4
デュラグルチド 3 nmol/kg 72 時間	1422 ± 63 n=5	1722 ± 113* n=5	31 ± 4 n=5	41 ± 6 n=5
デュラグルチド 30 nmol/kg 72 時間	1457 ± 161 n=5	1374 ± 161* n=5	46 ± 4* n=5	58 ± 8 n=5

略号：AUC = 血漿中濃度-時間曲線下面積、n = 試験動物数、グルコースはオートアナライザー、インスリンはラジオイムノアッセイで測定。

*：p<0.05 (対応のある Student の t 検定で溶媒と比較したときの統計学的有意差)
値は平均値±標準誤差を示す。

デュラグルチド 3 又は 30 nmol/kg の投与 24 時間後及び 30 nmol/kg の投与 72 時間後にグルコース誘発性インスリン分泌が亢進した。以上のように、*in vivo* においてデュラグルチドの投与 72 時間後でも有意なインスリン分泌作用が見られたことから、ヒトで低頻度投与が可能であると考えられた。

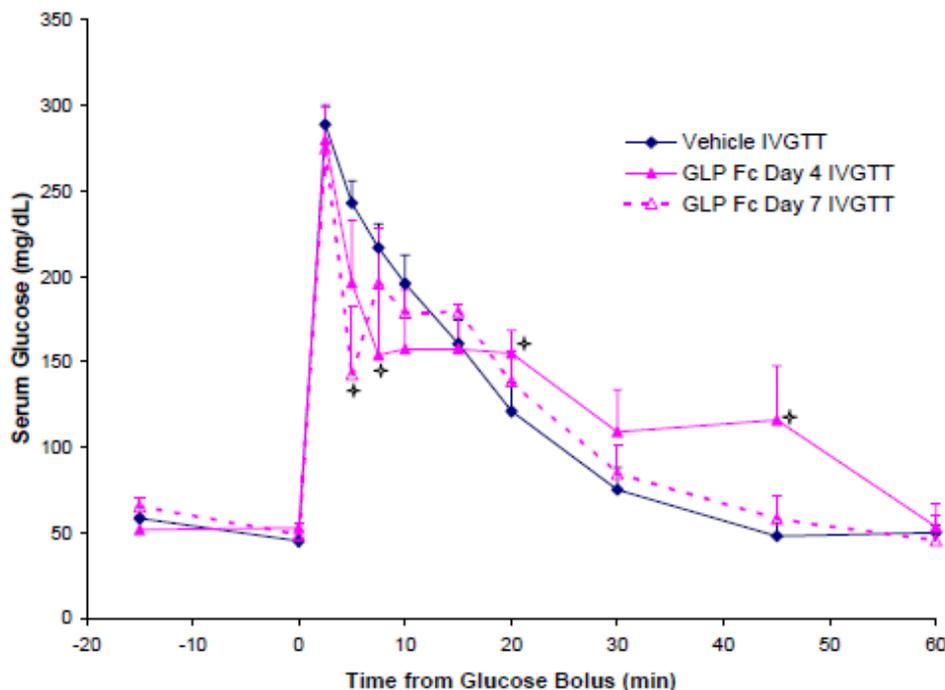
2.6.2.2.7 カニクイザルを用いた IVGTT 試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌作用についての In Vivo 評価

(添付資料 4.2.1.1.7、OAX03 試験)

ラット及びサル膵島を用いた *in vitro* 試験 (第 2.6.2.2.3 項) 並びにラットを用いた IVGTT 試験 (第 2.6.2.2.6 項) で、デュラグルチドはグルコース依存的に GLP-1 受容体を活性化させることが確認された。本項ではサルにおけるデュラグルチドの薬理作用を確認するため、雄カニクイザル (6 匹/群) を用い、IVGTT 試験を実施した。

リン酸緩衝生理食塩液 (PBS、溶媒対照) を試験 1 日に皮下投与し、直後にグルコース負荷を行った。次に、デュラグルチド (0.1 mg/kg) を試験 3 日に皮下投与し、デュラグルチドの投与 4 日後 (試験 7 日) 及び 7 日後 (試験 10 日) にグルコースを負荷した。動物を一晩 (16 時間) 絶食させた後、麻酔薬 telazol (約 9 mg/kg) を筋肉内投与し、両側の伏在静脈にカテーテルを挿入した。一侧のカテーテルを介してグルコース (0.5 g/kg) を低速投与 (約 30 秒間) することにより一過性の高血糖状態とした。グルコース負荷 15 分前、直前 (0 分、predose) 並びに負荷 2.5、5、7.5、10、15、20、30、45 及び 60 分後に対側の採血用カテーテル又は大腿静脈から血液を採取し、グルコース、インスリン、C ペプチド、グルカゴン及び GLP-1 の測定に供した。動物には必要に応じて、前述の半量の telazol を追加投与した。グルコースはヘキソキナーゼ比色法で測定した。インスリン、C ペプチド、グルカゴン及び GLP-1 は Multiplex assay kit を用いて免疫測定法により定量した。結果は平均値±標準誤差で示し、各時点の測定値について、溶媒投与時の値との統計学的有意差を対応のある Student の t 検定で評価した。

グルコースの投与 60 分後まで、個体ごとに血清中グルコース濃度の変動を見ると、血清中グルコース濃度が一過性に低下した後に再度上昇する傾向がデュラグルチド投与後 4 及び 7 日にそれぞれ 5/6 例、4/6 例の動物で認められたが (図 2.6.2-5)、デュラグルチドの投与に関連した一般状態の異常は見られなかった。血清中インスリン濃度は、グルコース負荷初期において、上述の血清中グルコース濃度の一過性変動に対応してわずかな増加を示した。一方、血清中 C ペプチド濃度がデュラグルチド投与 4 及び 7 日後にわずかに増加したが、溶媒投与時と比較して統計学的有意差は認められなかった。血清中グルカゴン及び GLP-1 濃度には、デュラグルチド投与による明らかな作用は見られなかった。



GLP Fc = デュラグルチド

溶媒を試験 1 日に皮下投与し、グルコースを負荷した。GLP Fc を試験 3 日に皮下投与し、投与 4 及び 7 日後にグルコースを負荷した。

+ : $p < 0.05$ (対応のある Student の t 検定で各時点の測定値について、溶媒投与時の値と比較したときの統計学的有意差)

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す。

図 2.6.2-5 カニクイザルにデュラグルチドを 0.1 mg/kg の用量で皮下投与して 4 及び 7 日後に実施した IVGTT におけるデュラグルチドのグルコース濃度に対する作用

ラットを用いた IVGTT 試験 (第 2.6.2.2.6 項) 並びに後述するラット及びサルを用いた SGI 試験では、血清中グルコース濃度の一過性変動は見られなかった。本試験で認められたこのようなグルコース濃度の変動が、ヒトにおいて見られるかは不明であり、デュラグルチドを投与した患者に IVGTT を実施する場合には綿密なモニタリングを実施して安全性を確保する必要があると考えられる。

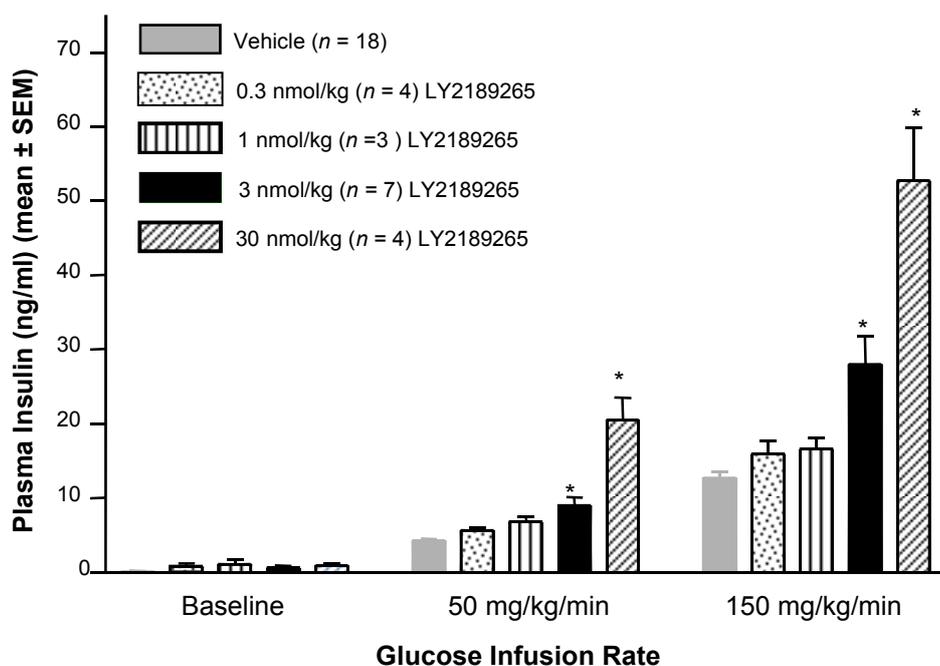
以上のように、本試験では GLP-1 の明らかな薬理作用は示されなかったが、デュラグルチド (0.1 mg/kg) 皮下投与により、溶媒投与時と比較して血清中グルコース濃度の変化を含む生物活性が認められた。

2.6.2.2.8 ラットを用いた SGI 試験におけるデュラグルチドによるインスリン分泌作用の用量依存性についての In Vivo 評価

(添付資料 4.2.1.1.8、bTDR03 試験)

デュラグルチドは、ラット及びサル膵島を用いた *in vitro* 試験並びにラットを用いた IVGTT で GLP-1 受容体を活性化させ、グルコース依存的にインスリン分泌を亢進させることが示されている。このインスリン分泌作用はデュラグルチドの主な作用機序であり、

デュラグルチドはこの機序により 2 型糖尿病患者において糖調節活性を示すと考えられる。デュラグルチドがグルコース依存的にインスリン分泌亢進作用を示すことを新たな *in vivo* モデルで確認し、その作用時間推移を評価するため、雄 Sprague Dawley ラット (36 匹) を用いた SGI 試験を実施した (図 2.6.2-6)。試験 1 日にデュラグルチド 17.9、60、179 及び 1790 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0.3、1、3 及び 30 nmol/kg) 及び溶媒 (生理食塩液) を皮下投与した。16 時間の絶食後、試験 2 日に、生理食塩液を 20 分間、グルコースを 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{分}$ の速度で 30 分間、その後、150 $\text{mg}/\text{kg}/\text{分}$ の速度で 30 分間静脈内に注入した。採血は、グルコース注入の 20 及び 10 分前、0 分 (50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{分}$ 負荷直前)、10、20、30 (150 $\text{mg}/\text{kg}/\text{分}$ 負荷直前)、40、50 及び 60 分後に行った。デュラグルチドによるインスリン分泌作用のバイオマーカーとして、血漿中インスリン濃度を測定した。次の 3 つの採血時点からの各血液試料中のインスリン濃度の平均値を評価した。すなわち、グルコース注入の 20 及び 10 分前、0 分の平均値を対照群 (ベースライン)、10、20 及び 30 分後の平均値をグルコース 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{分}$ 処置群、40、50 及び 60 分後の平均値をグルコース 150 $\text{mg}/\text{kg}/\text{分}$ 処置群とした。



*: $p < 0.05$ (対応のある Student の t 検定で溶媒と比較したときの統計学的有意差)

図 2.6.2-6 ラットにデュラグルチドを皮下投与して 24 時間後にグルコースの段階的注入を行ったときのインスリン濃度に対する作用

ラットにグルコースを投与することにより誘発した高血糖条件下で、デュラグルチドは、投与 24 時間後に用量依存的かつ持続的なインスリン分泌亢進作用を示し、3 及び 30 nmol/kg では統計学的有意差が見られた。以上の結果から、ラット SGI モデルにおけるデュラグルチドのインスリン分泌亢進作用が示された。

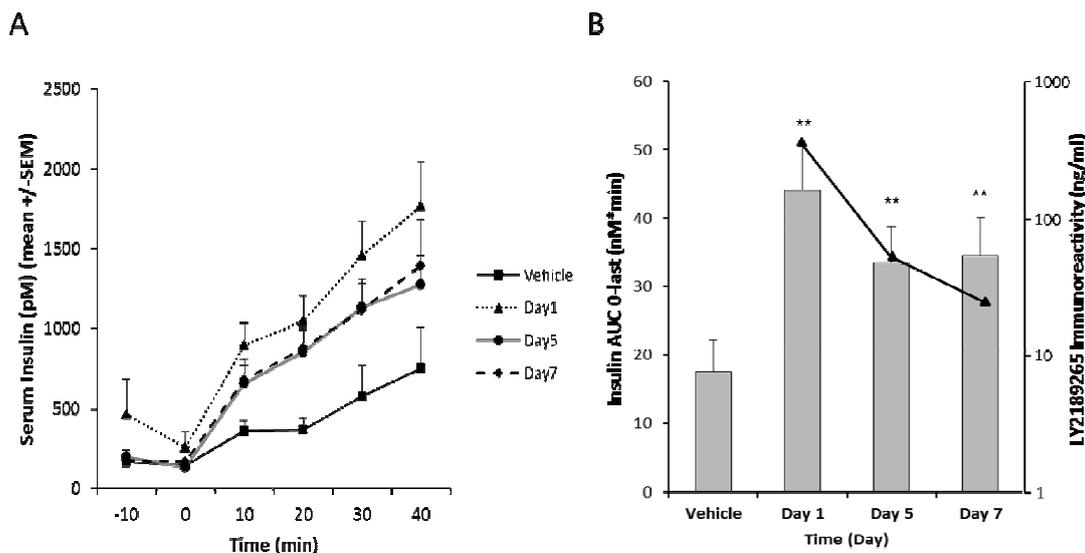
2.6.2.2.9 カニクイザルを用いた SGI 試験におけるデュラグルチド単回投与による In Vivo インスリン分泌作用

(添付資料 4.2.1.1.9、6180-702 試験)

デュラグルチドの作用機序及び作用時間推移を評価することを目的として、カニクイザル (6 匹) を用いた SGI 試験を実施した。試験 1 日に、溶媒 (PBS) を皮下投与し、その 1~2 時間後にグルコースを 10 及び 25 mg/kg/分 の速度で各 20 分間 (計 40 分間) 注入した。グルコース注入により、血清中グルコース濃度の上昇が確認された。試験 3 日に、デュラグルチド 0.1 mg/kg を皮下投与し、投与 1、5 及び 7 日後 (試験 4、8 及び 10 日) に試験 1 日と同様にグルコースの注入を行った。採血は、グルコース注入の 10 分前、0 分 (10 mg/kg/分負荷直前)、10、20 (25 mg/kg/分負荷直前)、30 及び 40 分後に行った。デュラグルチドのインスリン分泌作用のバイオマーカーとして血清中インスリン、C ペプチド、グルコース、トリグリセリド、グルカゴン及び GLP-1 濃度を評価した。血清中のデュラグルチド免疫反応物を N 末端特異的抗 GLP-1 抗体で捕捉し、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたマウス抗ヒト IgG4 特異的抗体で検出した。溶媒対照との統計学的有意差の検定には一元配置分散分析及び Dunnett 法を用いた。

試験期間中に嘔吐及び摂餌量減少が認められた。これらの所見は溶媒及びデュラグルチド投与後のいずれでも見られ、嘔吐が認められた時期は SGI 処置及び麻酔薬の telazol 投与の時期と一致していた。これらの理由から、観察された一般状態の変化は、デュラグルチドの投与に関連しないと考えられた。デュラグルチド 0.1 mg/kg の単回皮下投与後、有意なインスリン分泌作用がデュラグルチド投与 7 日後まで認められた ($p < 0.0001$)

(図 2.6.2-7)。血清中 C ペプチド濃度の上昇が投与 1、5 及び 7 日後に ($p < 0.05$)、血清中グルコース濃度の低下が投与 1 日後のみに認められた ($p < 0.05$)。一方、血清中のグルコース (投与 5 及び 7 日後)、トリグリセリド、GLP-1 及びグルカゴン濃度には、デュラグルチド投与による明らかな作用は見られなかった ($p > 0.05$)。デュラグルチドの投与 1 日後の平均血清中濃度は 324.7 ng/mL で、投与 7 日後まで血清中に定量可能なレベルのデュラグルチドが確認された。以上の結果から、サル SGI 試験におけるデュラグルチドのインスリン分泌亢進作用が確認され、その効果は投与 7 日後まで持続することが示された。



溶媒を試験 1 日に皮下投与し、グルコースを負荷した。デュラグルチドを試験 3 日に皮下投与し、投与 1、5 及び 7 日後にグルコースを負荷した。

** : $p < 0.0001$ (一元配置分散分析後に Dunnett の検定で溶媒対照と比較した時の統計学的有意差)

A : 血清中インスリン濃度は、デュラグルチド単回投与 1、5 及び 7 日後に溶媒 (PBS) と比較して有意に上昇した。

B : インスリン分泌作用 (カラム) 及びデュラグルチド免疫反応物 (実線) は、デュラグルチド単回投与 7 日後まで認められた。

図 2.6.2-7 カニクイザルを用いたグルコースの段階的注入におけるデュラグルチド単回投与によるインスリン分泌作用 (6180-702 試験報告書より作成)

2.6.2.2.10 カニクイザルを用いた SGI 試験におけるデュラグルチド反復投与による In Vivo インスリン分泌作用

(添付資料 4.2.1.1.10、6180-773 試験)

天然 GLP-1 を 6 週間にわたって皮下に持続投与した 2 型糖尿病患者において、有意かつ持続的なグルコースの低下が認められている (Zander et al. 2002)。デュラグルチドが 2 型糖尿病患者に有効な治療薬となり得ることを確認するために、カニクイザル (6 匹) を用い、SGI に対するデュラグルチド反復投与時の作用持続性を評価した。

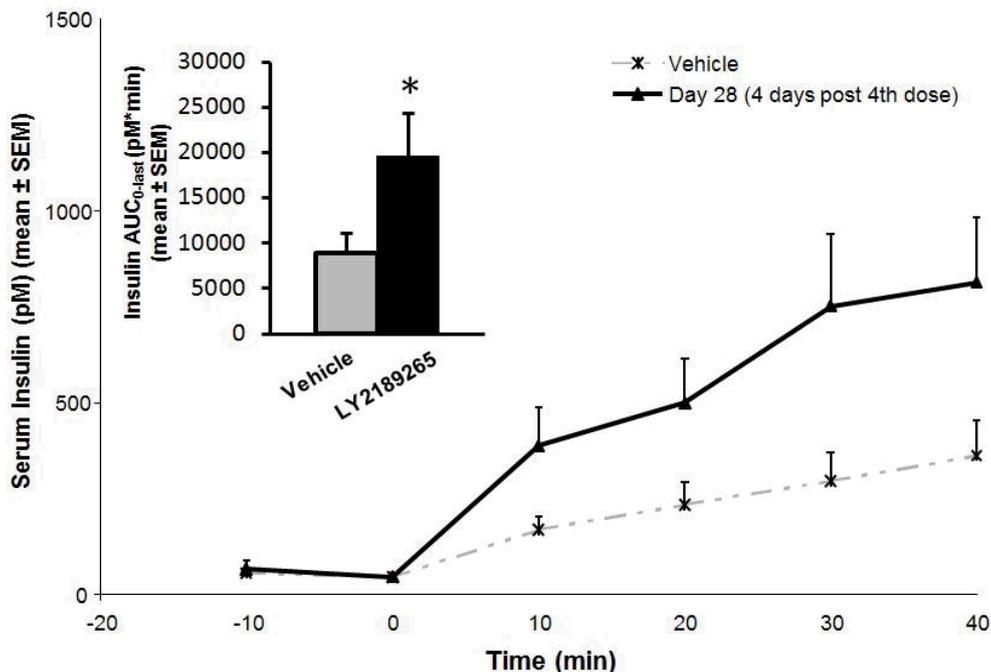
試験 1 日に溶媒 (PBS) を皮下投与し、直後に伏在静脈に留置したカテーテルを介してグルコースを注入した。試験 3、10、17 及び 24 日に計 4 回、デュラグルチド 0.1 mg/kg を反復皮下投与し、試験 28 日 (デュラグルチド最終投与 4 日後) にグルコースを再度注入した。グルコースの注入は 10 mg/kg/分の速度で 20 分間、その後 25 mg/kg/分の速度で 20 分間、計 40 分間行った。採血は、グルコース注入の 10 分前、0 分 (10 mg/kg/分負荷直前)、10、20 (25 mg/kg/分負荷直前)、30 及び 40 分後に行った。試験 1 日には、血清中インスリン、C ペプチド、グルコース、トリグリセリド、グルカゴン及び GLP-1 濃度をグルコース注入による作用のバイオマーカーとして評価し、試験のベースライン値として用いた。試験 28 日には、血清中インスリン、C ペプチド、グルコース、トリグリセリド、グルカゴン及び GLP-1 濃度を、デュラグルチドのインスリン分泌作用のバイオマーカーとして評価した。デュラグルチド免疫反応物を N 末端特異的抗 GLP-1 抗体で捕捉し、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたマウス抗ヒト IgG4

特異的抗体で検出した。溶媒投与時とデュラグルチド投与時における各バイオマーカーの変動を AUC で表し、溶媒投与時との統計学的有意差の検定には Student の t 検定を用いた。

デュラグルチドを 0.1 mg/kg の用量で反復皮下投与したとき、有意なインスリン分泌亢進作用が投与 4 日後に認められた ($p < 0.0001$) (図 2.6.2-8)。また、デュラグルチドを 0.1 mg/kg の用量で週 1 回、4 週間反復皮下投与して 4 日後に測定した血清中 C ペプチド濃度は有意な上昇 ($p < 0.0008$) を示した。溶媒投与時と比較して、血清中トリグリセリド濃度が統計学的有意に低下し ($p < 0.002$)、GLP-1 濃度が統計学的有意に上昇した ($p < 0.02$)。血清中グルコース濃度は統計学的有意に上昇した ($p < 0.02$)。また、デュラグルチドは血清中グルカゴン濃度に明らかな作用を示さなかった ($p > 0.05$)。

血清中トリグリセリド及び GLP-1 濃度の変化は、体重及び摂餌量の低下に関連した二次的な影響である可能性が考えられる。一方、血清中グルコース濃度の上昇は、1) デュラグルチド単回投与において同様の変化が認められなかったこと (CTD 第 2.6.2.2.9 項)、2) グルコース負荷 10 及び 30 分後の 2 時点においてのみ溶媒投与時と比較してデュラグルチド投与時に血清中グルコース濃度が上昇したことから、生物学的に意味のある変化ではなく、アーティファクトである可能性が考えられた。なお、デュラグルチド 0.1 mg/kg を週 1 回、4 週間反復皮下投与して 4 日後のデュラグルチドの血清中濃度は平均 53 ng/mL であった。

以上、サルにデュラグルチドを週 1 回、4 週間反復皮下投与後においてもインスリン分泌亢進作用の減弱は認められなかったことから、糖尿病患者への慢性投与が可能と考えられた。



溶媒を試験 1 日に皮下投与し、グルコースを負荷した。試験 3、10、17 及び 24 日に計 4 回、デュラグルチド 0.1 mg/kg を反復皮下投与し、試験 28 日（デュラグルチド最終投与 4 日後）にグルコースを負荷した。
* : $p < 0.0001$ (Student の t 検定で溶媒と比較した時の統計学的有意差)
値は平均値 ± 標準誤差を示す。

図 2.6.2-8 カニクイザルを用いたグルコースの段階的注入におけるデュラグルチド反復投与によるインスリン分泌作用 (6180-773 試験報告書より作成)

2.6.2.3 副次的薬理試験

該当なし。

2.6.2.4 安全性薬理試験

In vitro hERG (ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子) 試験、サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験並びに安全性薬理評価 (心血管系、呼吸器系及び中枢神経系) を組み込んだ反復投与毒性試験を実施した。In vitro hERG 試験を除く試験は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) S7A ガイドラインに準拠し、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準 (GLP) を遵守して実施した。試験実施当時、ペプチドやタンパク質の in vitro hERG 試験を実施した経験を有する施設は限られていたことから、GLP 試験施設ではないが [REDACTED] 社 (米国) を試験実施施設として選択した。

2.6.2.4.1 心血管系に関する試験

2.6.2.4.1.1 In Vitro hERG 試験

(添付資料 4.2.1.3.1、LLY05_07 試験)

サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験 ([REDACTED] 010.08 試験) 及び 1 ヶ月間反復投与毒性試験 (P00054 試験) において QTc 間隔の延長が認められたことから、hERG

チャンネルを安定的に発現させたヒト HEK293 細胞株を用いて急速活性化遅延整流カリウム電流 (I_{Kr}) に対するデュラグルチドの影響を評価した。

0.51、1.52、5.1 及び 15.2 $\mu\text{g/mL}$ において、デュラグルチドは I_{Kr} をそれぞれ 6.9%、9.5%、18.8%及び 33.4%阻害した (細胞数: $n=5\sim6$)。15.2 $\mu\text{g/mL}$ では 3/6 個の細胞で顕著なリーク電流が認められて細胞の破裂が示唆されたため、より高濃度での評価は実施しなかった。デュラグルチド評価後の細胞において、陽性対照化合物 (E-4031、選択的かつ強力な hERG チャンネル阻害剤) は 0.1 μM において I_{Kr} をほぼ完全に阻害した。

心室筋細胞の I_{Kr} は酸性の細胞外溶液によって阻害されることが報告されている (Verecke and Carmeliet 2000)。また、別の高分子開発候補品の hERG 試験においては、0.5%クエン酸を溶媒として用いた場合に hERG チャンネル電流が 43.1%阻害され、薬剤による影響を正確に評価できなかった。デュラグルチドの hERG 試験では溶媒の影響は評価していないものの、原薬のストック溶液の調製に 0.02%ポリソルベート 80 を含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) が用いられたことから、同様に I_{Kr} に対する溶媒の影響があったと考えられた (原薬ロットはサルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験及び 1 ヶ月間反復投与毒性試験と同じ)。したがって、当試験成績からはデュラグルチドの I_{Kr} に対する影響を正確に評価することはできないと判断した。

2.6.2.4.1.2 サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験

(添付資料 4.2.1.3.2、XXXXXXXXXX 010.08 試験)

テレメトリーを装着した雌雄カニクイザル (6 例/群) に 0、1 及び 10 mg/kg の用量でデュラグルチド又は溶媒 (0.02%ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液、pH 6.5) を単回皮下投与し、無麻酔下で心血管系 [心拍数、左心室内圧最大立ち上がり速度 (dP/dt_{max})、全身血圧及び心電図] に対するデュラグルチド投与の影響を評価した。

用量設定は、カニクイザルを用いた用量漸増予備試験 (P00028 試験、表 2.6.7.6) の成績に基づく。この予備試験では 2 群を設定し、各群 (1 例/性/群) に 0.3 又は 1 mg/kg のデュラグルチドを 4 日間隔で 2 回皮下投与した後、10 日間の休薬期間を設け、3 又は 10 mg/kg に漸増して 4 日間隔で 2 回皮下投与した。その結果、薬理作用に関連した摂餌量及び糞排泄量の減少のみが認められ、用量制限毒性は認められなかった。この予備試験成績に基づき、単回投与心血管系安全性薬理試験では 1 及び 10 mg/kg を選択した。サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験の試験 1 日におけるトキシコキネティクス (TK) 成績から、1 及び 10 mg/kg 群の曝露量は AUC に基づくと臨床用量の 45.8 及び 408 倍、最高血漿中濃度 (C_{max}) に基づくと臨床用量の 77.8 及び 782 倍と推定された。

本試験では、心血管系の安全性薬理評価のため左心室圧、大動脈圧及び心電図波形を投与約 2 時間前から 8 時間後まで連続的に記録した後、投与約 74 時間後まで 1 時間毎に 10 分間以上記録した。

すべての個体が試験終了時まで生存した。1 及び 10 mg/kg 群において、GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した嘔吐及び顕著な摂餌量減少が試験期間を通して認められた。

摂餌量減少は 1 mg/kg 群では投与 3 日後に回復したが、10 mg/kg 群では投与 3 日後にも認められた。

デュラグルチド投与により、用量依存的な心拍数の上昇が認められた。投与 3～5 時間後において、1 及び 10 mg/kg 群の心拍数は溶媒対照群と比較して 21%～26%上昇した。心拍数の高値は試験期間を通して持続し、暗期で通常認められる心拍数の低下が認められなかった（図 2.6.2-9）。 dp/dt_{max} は暗期に低下せず、各暗期サイクルでの dp/dt_{max} が溶媒対照群と比較して上昇した（図 2.6.2-10）。QTc 間隔（Bazett 法で補正）は 10 mg/kg 群で投与 24 時間後に溶媒対照群と比較して 11%延長したが、その他の測定時点では統計学的に有意な QTc 間隔の延長は認められなかった（表 2.6.2-7）。血圧の評価において、生理学的に意味のある変化は認められなかった。

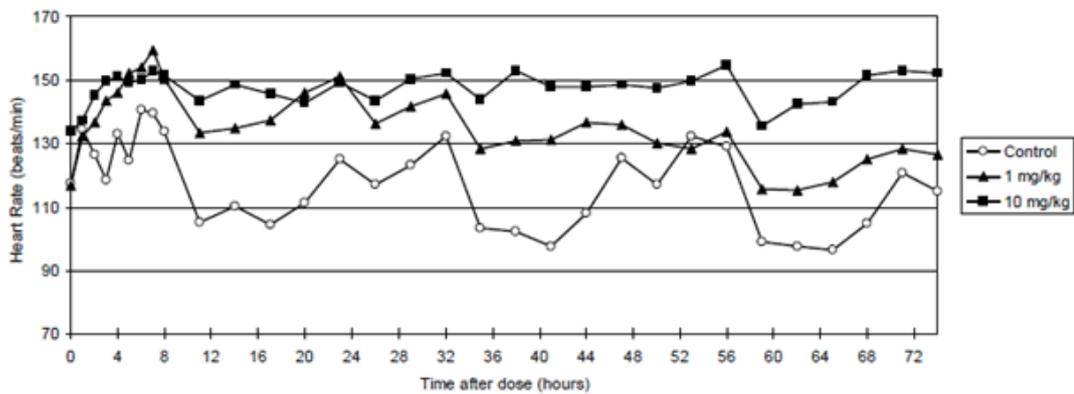


図 2.6.2-9 サル単回投与心血管系安全性薬理試験における心拍数の経時的変化

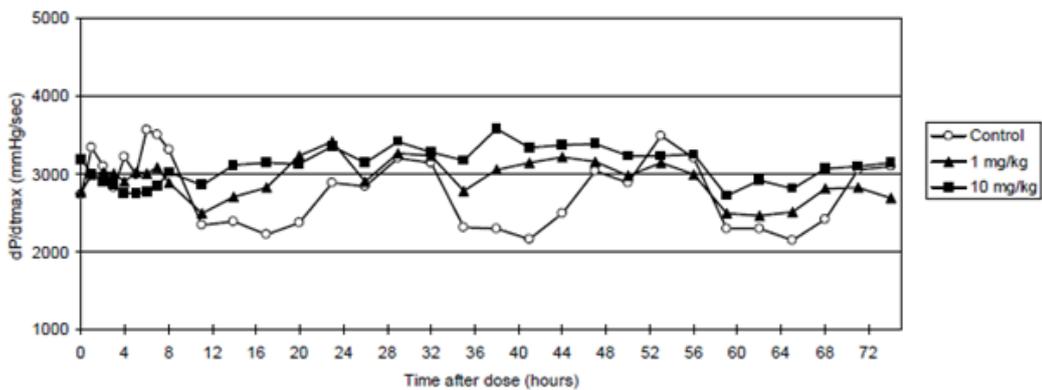


図 2.6.2-10 サル単回投与心血管系安全性薬理試験における左室内圧最大立ち上がり速度の経時的変化

表 2.6.2-7 サル単回投与心血管系安全性薬理試験における補正 QT 間隔の変化

パラメータ	用量 (mg/kg)	溶媒対照群との差 (% ; 雌雄合算)	
		1	10
QTc 間隔 ^a	6 時間	↑ 2	↑ 5
	12 時間	↓ 2	0
	24 時間	↑ 5	↑ 11*
	36 時間	↓ 2	↑ 4
	72 時間	↓ 1	↑ 4

略号：↑ = 延長、↓ = 短縮

^a Bazett 法で補正した QT 間隔

* p<0.05 (統計学的有意差は実測値に基づく)

以上、デュラグルチドをカニクイザルに単回皮下投与したとき、心拍数及び dP/dt_{max} の用量依存的な上昇が認められた。心拍数の上昇は GLP-1 受容体を介した薬理作用による変化と考えられた (Barragán et al. 1994)。心拍数及び dP/dt_{max} の上昇は持続的で、暗期における生理的な低下が認められなかった。また、10 mg/kg 群の投与 24 時間後にのみ QTc 間隔の延長が認められ、心室再分極の遅延の可能性が示唆された。1 mg/kg 群で心拍数及び dP/dt_{max} の持続的な上昇が認められたため、無影響量 (NOEL) は決定できなかった。

2.6.2.4.1.3 サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験

(添付資料 4.2.3.2.5、P00054 試験)

雌雄カニクイザル (3 例/性/群) に 0、1、3 及び 10 mg/kg の用量でデュラグルチドを週 2 回、4 週間 (計 9 回) 反復皮下投与し、無麻酔下で心拍数及び心電図に対する影響を評価した。溶媒対照群 (3 例/性) には 0.02% ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) を投与した。用量設定根拠及び毒性学的評価項目は第 2.6.6.3.5 項に示す。心電図は試験開始前並びに試験 4 及び 28 日の投与前及び投与約 2 時間後に測定した。補正式： $QTc = QT / (60 / \text{心拍数})^{0.617}$ を用いて QT 間隔を心拍数で補正し、QTc 間隔を算出した。

1、3 及び 10 mg/kg 群における曝露量は、AUC に基づくと臨床用量の 73.5、219 及び 801 倍、 C_{max} に基づくと臨床用量の 125、351 及び 1291 倍であった。デュラグルチド投与群では QTc 間隔の延長が認められた (表 2.6.2-8)。10 mg/kg 群では、試験 4 日の投与前 (0 時間) 及び 28 日の投与前 (0 及び 2 時間) に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な QTc 間隔の延長が認められた (未補正 QT 間隔は、試験 28 日の投与 2 時間後に統計学的に有意に延長)。統計学的に有意な QTc 間隔の延長は、3 mg/kg 群では 10 mg/kg 群と同じ測定時点に、1 mg/kg 群では試験 4 日の投与前 (0 時間) に認められた。単回投与心血管系安全性薬理試験 (第 2.6.2.4.1.2 項) と異なり、溶媒投与群と比較して統計学的に有意な心拍数の上昇は認められなかった。全用量群で QTc 間隔の延長が認められたため、NOEL は決定できなかった。

表 2.6.2-8 サル 1 ヶ月間毒性試験における補正 QT 間隔の変化

パラメータ	用量 (mg/kg)	溶媒対照群との差 (% ; 雌雄合算)			
		1	3	10	
QTc 間隔 ^a	試験 4 日	0 時間	↑ 10*	↑ 9*	↑ 9*
		2 時間	↑ 6	↑ 4	↑ 4
	試験 28 日	0 時間	↑ 3	↑ 11*	↑ 7*
		2 時間	↑ 4	↑ 10*	↑ 12*

略号：↑ = 延長

^a 補正式：QTc = QT / (60 / 心拍数)^{0.617} を用いて心拍数で補正した QT 間隔

* p ≤ 0.05 (統計学的有意差は実測値に基づく)

2.6.2.4.1.4 サルを用いた 3 ヶ月間反復投与毒性試験及び 1 ヶ月間回復性試験

(添付資料 4.2.3.2.6、7608-192 試験)

雌雄カニクイザル (6 例/性/群) に 0、0.41、1.63 又は 8.15 mg/kg の用量でデュラグルチドを週 2 回、13 週間 (計 27 回) 反復皮下投与し、無麻酔下で心拍数及び心電図に対する影響を評価した。溶媒対照群 (6 例/性) には 0.02% ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) を投与した。用量設定根拠及び毒性学的評価項目は第 2.6.6.3.6 項に示す。心電図は試験開始前並びに試験 5、29 及び 89 日の投与前及び投与約 22 時間後に測定した。QT 間隔は Bazett 法を用いて補正した。

0.41、1.63 及び 8.15 mg/kg 群における曝露量は、AUC に基づくと臨床用量の 31.7、139 及び 620 倍、C_{max} に基づくと臨床用量の 41.7、163 及び 762 倍であった。いずれの用量においても、心電図波形の異常や不整脈は認められなかった。デュラグルチド投与群の一部の測定時点において、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な QT 間隔及び QTc 間隔の変化が認められたが、正常範囲内の変化であったことから毒性学的な意義は低く、投与との関連はないと判断した。8.15 mg/kg 群では、試験 29 及び 89 日の投与前 (0 時間) 並びに試験 89 日の投与 22 時間後に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な心拍数の上昇が認められたが、正常範囲内の変化であり毒性と判断しなかった (表 2.6.7.7F)。心拍数の上昇は投与前にも認められたが、デュラグルチドの消失半減期は長いことから投与に関連した変化である可能性が考えられた。

以上、当試験ではデュラグルチド投与による心拍数の上昇傾向が認められたが、毒性と判断しなかった。その他の心電図の異常は認められず、心血管系に関する無毒性量 (NOAEL) は 8.15 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.1.5 サルを用いた 9 ヶ月間反復投与毒性試験及び 2 ヶ月間回復性試験

(添付資料 4.2.3.2.7、7608-235 試験)

雌雄カニクイザル (4 又は 6 例/性/群) に 0、0.41、1.63 又は 8.15 mg/kg の用量でデュラグルチドを週 2 回、約 9 ヶ月間 (計 79 回) 反復皮下投与し、ケタミン麻酔下で心拍数及び心電図に対する影響を評価した。0 及び 8.15 mg/kg 群の雌雄各 2 例には、投与終了後 2 ヶ月間の回復期間を設けた。溶媒対照群 (6 例/性) には 0.02% ポリソルベート 80 及び 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.5) を投与した。用量

設定根拠及び毒性学的評価項目は第 2.6.6.3.7 項に示す。心電図は試験開始前並びに試験 5、29、92、180 及び 274 日の投与前及び投与約 24 時間後に測定したほか、回復期間の最終週（投与前値の測定時点とほぼ同じ時間）に測定した。QT 間隔は Bazett 法を用いて補正した。

0.41、1.63 及び 8.15 mg/kg 群における曝露量は、AUC に基づくと臨床用量の 42.0、147 及び 774 倍、 C_{max} に基づくと臨床用量の 56.2、183 及び 1085 倍であった。いずれの用量においても、心電図波形の異常や不整脈は認められなかった。8.15 mg/kg 群の雌雄で、試験 274 日の投与前に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な心拍数の上昇が認められたが、同日の投与後には心拍数の変化は認められなかった。心拍数の上昇はデュラグルチド投与によると考えられたが、わずかな変化であり毒性と判断しなかった。1.63 mg/kg 群の雌雄で、試験 29 日の投与前に溶媒対照群と比較して統計学的に有意な QTc 間隔の延長が認められたが、同日の投与後には QTc 間隔の変化は認められなかった。QTc 間隔の延長はわずかであり毒性と判断せず、また投与との関連はないと判断した。

以上、当試験ではデュラグルチド投与による心拍数の上昇が認められたが、わずかな変化であり毒性と判断しなかった。その他の心電図の異常は認められず、心血管系に関する NOAEL は 8.15 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.2 呼吸器系に関する試験

(添付資料 4.2.3.2.5、P00054 試験)

デュラグルチドの独立した呼吸器系安全性薬理試験は実施していないが、サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験 (P00054 試験) において呼吸深度の質的評価及び呼吸数の定量的評価を行った。当試験の用量は 0、1、3 及び 10 mg/kg とした。用量設定根拠及び毒性学的評価項目は第 2.6.6.3.5 項に示す。呼吸機能の評価は、投与前並びに試験 0、11 及び 28 日の複数時点で実施した。試験 0 日の測定時点は、TK の測定時点と一致させた。

その結果、1、3 及び 10 mg/kg 群における曝露量は、AUC に基づくと臨床用量の 73.5、219 及び 801 倍、 C_{max} に基づくと臨床用量の 125、351 及び 1291 倍であった。呼吸器系に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

2.6.2.4.3 中枢神経系に関する試験

(添付資料 4.2.3.2.5、P00054 試験)

デュラグルチドの独立した中枢神経系安全性薬理試験は実施していないが、サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験 (P00054 試験) において中枢神経系、行動及び体温に対する影響を評価した。当試験の用量は 0、1、3 及び 10 mg/kg とした。用量設定根拠及び毒性学的評価項目は第 2.6.6.3.5 項に示す。中枢神経系機能の評価は、投与前並びに試験 0、11 及び 28 日の複数時点で実施した。試験 0 日の測定時点は、TK の測定時点と一致させた。

その結果、1、3 及び 10 mg/kg 群における曝露量は、AUC に基づくと臨床用量の 73.5、219 及び 801 倍、 C_{max} に基づくと臨床用量の 125、351 及び 1291 倍であった。中枢神経系、行動及び体温に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

該当なし。

2.6.2.6 考察及び結論

デュラグルチドは GLP-1 受容体に選択的に結合し、*in vitro* 試験においてグルコース濃度に依存的なインスリン分泌亢進作用を示した。また、ラット及びサルを用いたグルコース負荷試験において、デュラグルチド投与によりグルコース濃度依存的なインスリン分泌亢進作用が認められた。デュラグルチドの薬力学的作用はラットでは投与後 72 時間、サルでは投与後 7 日まで持続し、長時間作用型の特性が確認された。

ラットを用いた IVGTT 試験及び SGI 試験 (bTDR02 試験及び bTDR03 試験) において、0.179 及び 1.79 mg/kg の単回投与によりインスリン AUC 又は血漿中インスリン濃度の統計学的に有意な増加が見られ、デュラグルチドの薬効評価の指標の一つであるインスリン分泌亢進作用が確認された。ラットの 6 ヶ月間反復投与毒性試験 (7608-236 試験) における 1.63 mg/kg 群 (雄) の投与初日の曝露量は日本人 2 型糖尿病患者にデュラグルチドの臨床推奨用量 0.75 mg を週 1 回投与したときの定常状態の曝露量より 17.6 倍高い値であった。このことから、ラットを用いた bTDR02 試験及び bTDR03 試験でインスリン分泌亢進作用を示した最小用量の 0.179 mg/kg における曝露量比は 1.76 と算出され、日本人 2 型糖尿病患者とほぼ同程度と考えられた。

サルを用いた SGI 試験においても同様に、デュラグルチド 0.1 mg/kg の単回及び反復投与により、インスリン AUC 又は血清中インスリン濃度の有意な増加が見られ、インスリン分泌亢進作用が確認された。これらのサルを用いた薬理試験において、デュラグルチド 0.1 mg/kg を単回皮下投与した 1、5 及び 7 日後の平均血清中濃度はそれぞれ 324.7、47.1 及び 23.8 ng/mL であり (6180-702 試験)、デュラグルチド 0.1 mg/kg を週 1 回 4 週間 (計 4 回) 反復皮下投与した最終投与の 4 日後に測定したデュラグルチドの血清中濃度は 53.2 ng/mL であった (6180-773 試験)。この濃度はデュラグルチド 0.75 mg を日本人の 2 型糖尿病患者に週 1 回皮下投与したときの定常状態における平均血漿中濃度 (51 ng/mL) と同程度であり、これらラット及びサルで検討した薬理試験で用いた用量の妥当性が確認された (表 2.4-3)。

サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験及び反復投与毒性試験において、デュラグルチド投与による散発的な心拍数の上昇及び QTc 間隔の延長が認められた。心拍数の上昇は GLP-1 受容体を介した薬理作用に関連した変化と考えられた (Barragán et al. 1994)。サルを用いた単回投与心血管系安全性薬理試験では、1 及び 10 mg/kg 群で心拍数及び dp/dt_{max} の持続的な上昇が認められ、また 10 mg/kg 群の投与 24 時間後にのみ QTc 間隔の延長が認められた。サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験では、1、3 及び 10 mg/kg 群で QTc 間隔の延長が認められたが、心拍数の上昇は認められなかった。サルを用いた 3 ヶ月間及び 9 ヶ月間反復投与毒性試験では、1 ヶ月間反復投与毒性試験と類似した用量において毒性学的に重要な心拍数及び QTc 間隔の変化は認められなかった。QT/QTc 評価試験 (第 2.7.4.5.9.7 項) 及び国内外の第 II 相/第 III 相臨床試験 (第 2.7.4.4.2 項) では、臨床的に問題となる QT/QTc 間隔の延長は認められていない。これらの試験

成績を踏まえると、サルにデュラグルチドを投与したときに認められた散発的な QTc 間隔の延長はヒトにおけるリスクを示唆するものではないと考えられた。サルを用いた 1 ヶ月間反復投与毒性試験において、呼吸器系並びに中枢神経系、行動及び体温に対するデュラグルチド投与の影響は認められなかった。

2.6.2.7 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.2.8 参考文献

- Barragán JM, Rodriguez RE, Blázquez E. Changes in arterial blood pressure and heart rate induced by glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in rats. *Am J Physiol.* 1994;266:E459-466.
- Brüggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med.* 1987;166:1351-1361.
- Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. *Adv Immunol.* 1992;51:1-84.
- De Groot AS, Bosma A, Chinai N, Frost J, Jesdale BM, Gonzalez MA, et al. From genome to vaccine: in silico predictions, ex vivo verification. *Vaccine.* 2001;19:4385-4395.
- In vitro Activity of LY2119402. Internal Report: BTDR07. ■■■■■ 20■■■
- Glaesner W, Vick AM, Millican R, Ellis B, Tschang SH, Tian Y, et al. Engineering and characterization of the long-acting glucagon-like peptide-1 analogue LY2189265, an Fc fusion protein. *Diabetes Metab Res Rev.* 2010;26:287-296.
- Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007;87:1409-1439.
- Knudsen LB, Hastrup S, Underwood CR, Wulff BS, Fleckner J. Functional importance of GLP-1 receptor species and expression levels in cell lines. *Regul Pept.* 2012;175:21-29.
- Parekh BS, Berger E, Sibley S, Cahya S, Xiao L, La Certe MA, et al. Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay. *mAbs.* 2012;4:310-318.
- Vereecke J, Carmeliet E. The effect of external pH on the delayed rectifying K⁺ current in cardiac ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 2000;439:739-751.
- Xu D, Alegre ML, Varga SS, Rothermel AL, Collins AM, Pulito VL, et al. *In vitro* characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell Immunol.* 2000;200:16-26.
- Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and β -cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet.* 2002;359:824-830.

トルリシティ皮下注 0.75 mg アテオス

2.6.3 薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3	薬理試験概要表	1
2.6.3.1	薬理試験：一覧表	1
2.6.3.2	効力を裏付ける試験	3
2.6.3.3	副次的薬理試験	5
2.6.3.4	安全性薬理試験	6
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験	7

2.6.3 藥理試驗概要表

2.6.3.1 藥理試驗：一覽表

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
Cell-Based In Vitro Binding	HEK293 or CHO cells transfected with GLP-1, GIP, or glucagon receptor	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN, USA and San Diego, CA, USA	bTDR225	4.2.1.1.1
Cell-Based In Vitro Activity	HEK293 cells, transfected with human GLP-1 receptor and reporter gene	In vitro	Eli Lilly and Company Indianapolis, IN, USA	bTDR01	4.2.1.1.2
Insulinotropic Activity	INS-1 832/3 rat insulinoma cells Rodent and Primate pancreatic islet cells	In vitro		DBT56	4.2.1.1.3
Cell-Based ADCC Activity	Purified human PBMC, HEK cells	In vitro		bTDR04	4.2.1.1.4
Intravenous Glucose Tolerance Test	Rat, Sprague Dawley	SC		bTDR02	4.2.1.1.6
Intravenous Glucose Tolerance Test	Monkey, Cynomolgus	SC		OAX03	4.2.1.1.7
Stepped Glucose Infusion	Rat, Sprague Dawley	SC		bTDR03	4.2.1.1.8
Stepped Glucose Infusion	Monkey, Cynomolgus	SC		6180-702	4.2.1.1.9
Stepped Glucose Infusion	Monkey, Cynomolgus	SC		6180-773	4.2.1.1.10
Analysis of T-Cell Epitopes	In silico	In silico	Eli Lilly and Company San Diego, CA, USA	bTDR224	4.2.1.1.5
Secondary Pharmacodynamics – Not Applicable					

(Continued)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Type of Study	Test System	Route	Testing Facility	Document ID	Location in CTD
Safety Pharmacology					
hERG Ion Channel	HEK 293 cells transfected with hERG clone	In vitro	[REDACTED]	LLY05_07	4.2.1.3.1
Cardiovascular ^a	Monkey, Cynomolgus	SC	[REDACTED]	[REDACTED].010.08	4.2.1.3.2
Cardiovascular, CNS and respiratory ^a	Monkey, Cynomolgus	SC	Eli Lilly and Company Greenfield, IN, USA	P00054	4.2.3.2.5
Cardiovascular ^a	Monkey, Cynomolgus	SC	[REDACTED]	7608-192	4.2.3.2.6
Cardiovascular ^a				7608-235	4.2.3.2.7
Pharmacodynamic Drug Interactions – Not Applicable					

Abbreviations: ADCC = antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; CHO = Chinese hamster ovary; CNS = Central Nervous System; GIP = gastric inhibitory peptide; GLP-1 = glucagon-like peptide 1; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; SC = subcutaneous.

^a Contains a GLP (Good Laboratory Practice) compliance statement.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses ^a	Number of replicates	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Cell-Based In Vitro Binding	HEK293 or CHO cells transfected with GLP-1, GIP, or glucagon receptor	In vitro	10 µmol/L to 200 pmol/L	n=3	LY2189265 binds specifically to the human GLP-1 receptor with a K_i of 4.20 nM, compared to the GLP-1 (7-36)-NH ₂ peptide with a K_i of 0.388 nM. Binding to the human GIP and human glucagon receptors was very weak with K_i 's of >697 nM and >1360 nM, respectively.	N	bTDR225 4.2.1.1.1
Cell-Based In Vitro Activity	HEK293 cells, transfected with human GLP-1 receptor and reporter gene	In vitro	0.3 pmol/L to 3 nmol/L	n=19	LY2189265 has full agonist activity with a mean EC ₅₀ of 12.6 ± 2.5 pM at the human GLP-1 receptor.	N	bTDR01 4.2.1.1.2
Insulinotropic Activity	INS-1 832/3 rat insulinoma cells	In vitro	1 pmol/L to 0.1 µmol/L	n=3-6	LY2189265 dose-dependently stimulated insulin secretion stimulated by 16.8 mM glucose from INS-1 832/3 cells with EC ₅₀ 's of 8.3 nM or 34 nM in two individual experiments.	N	DBT56 4.2.1.1.3
	Rodent pancreatic islet cells		0.3 nmol/L to 0.3 µmol/L	n=3-6	LY2189265 dose-dependently stimulated insulin secretion under high glucose with an EC ₅₀ of 4.2 nM.		
	Primate pancreatic islet cells		1 nmol/L to 0.3 µmol/L	n=3-6	LY2189265 stimulated insulin secretion under high glucose at 300 nM concentration.		
Cell-Based ADCC Activity	Purified human PBMC, HEK cells	In vitro	0.4 ng/mL to 50 µg/mL	n=8	LY2189265 does not demonstrate ADCC activity.	N	bTDR04 4.2.1.1.4

(Continued)

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（続き）

Type of Study	Test System	Route	Test article Doses ^a	Sex #/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Intravenous Glucose Tolerance Test	Rat, Sprague Dawley	In vivo	3 and 30 nmol/kg	M/n=5	LY2189265 augments glucose mediated insulin secretion 24 hours after subcutaneous injection of doses of 3 (0.179 mg/kg) or 30 nmol (1.79 mg/kg) and 72 hours after subcutaneous injection of 30 nmol/kg.	N	bTDR02 4.2.1.1.6
Intravenous Glucose Tolerance Test	Monkey, Cynomolgus	In vivo	0.1 mg/kg	M/n=6	LY2189265 did not demonstrate insulinotropic activity in this study.	N	OAX03 4.2.1.1.7
Stepped Glucose Infusion	Rat, Sprague Dawley	In vivo	0.0179 to 1.79 mg/kg	M/n=3-7	LY2189265 demonstrated dose-dependent insulinotropic activity.	N	bTDR03 4.2.1.1.8
Stepped Glucose Infusion	Monkey, Cynomolgus	In vivo	0.1 mg/kg	M/n=6	LY2189265 demonstrated significant insulinotropic activity for at least 7 days following a single SC injection.	N	6180-702 4.2.1.1.9
Stepped Glucose Infusion	Monkey, Cynomolgus	In vivo	0.1 mg/kg	M/n=6	LY2189265 demonstrated significant insulinotropic activity for at least 4 days following four weekly SC injections of 0.1 mg/kg.	N	6180-773 4.2.1.1.10
Analysis of T-Cell Epitopes	In silico	In silico	NA	NA	A potential T-cell epitope was eliminated from a precursor of LY2189265 to reduce potential immunogenicity in humans. LY2189265 does not contain any non-native potential T-cell epitopes.	N	bTDR224 4.2.1.1.5

Abbreviations: # = number; ADCC = antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; CHO = Chinese hamster ovary; EC₅₀ = half-maximal effect concentration; GIP = gastric inhibitory peptide; GLP = Good Laboratory Practice; GLP-1 = glucagon-like peptide 1; HEK = human embryonic kidney; K_i = inhibitory constant; M = male; NA = not applicable; PBMC = peripheral blood mononuclear cell; SC = subcutaneous.

^a Single doses unless specified otherwise.

LY2189265
dulaglutide

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.3 副次的薬理試験

該当なし。

2.6.3.4 安全性藥理試驗

Organ Systems Evaluated	Species, Strain	Route	Test article Doses ^a	Sex #/Group	Noteworthy Findings	GLP	Document ID Location in CTD
Cardiovascular Effects (Ion Channel)	HEK293 cells transfected with hERG clone, Cardiac I _{Kr} ion channel blockade	In vitro	0.51, 1.52, 5.1, 15.2 µg/mL	5-6 cells/group	Concentration dependent reduction in hERG current amplitude with a 33.4% (± 4.3%) reduction at 15.2 µg/mL	N	LLY05_07 4.2.1.3.1
Cardiovascular Effects (in vivo)	Monkey, Cynomolgus	Subcutaneous	0 mg/kg ^b 1 mg/kg 10 mg/kg	3M, 3F 3M, 3F 2M, 4F	≥1 mg/kg: ↑ left ventricular inotropic state, ↑ heart rate 10 mg/kg: ↑ QTc	Y	██████████.010.08 4.2.1.3.2

Effects of dulaglutide on cardiovascular function, CNS/behavioral function, body temperatures, respiratory rates, or qualitative evaluations of respiratory functioning were also assessed in repeat-dose toxicity studies in monkeys (P00054 [4.2.3.2.5], 7608-192 [4.2.3.2.6], and 7608-235 [4.2.3.2.7]). See Toxicology Tabulated Summary Section 2.6.7.7.

Abbreviations: # = number; ↑ = increased; CNS = Central Nervous System; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-à-go-go-related gene; QTc = corrected QT interval.

^a Single doses unless specified otherwise.

^b 10 mM citrate buffer pH 6.5, 0.02% polysorbate 80, and 150 mM sodium chloride.

LY2189265
dulaglutide

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。