サノフィ株式会社

HOE901/AVE0010

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Total number of pages: 14

目　　次

略号と用語の定義 3

1　非臨床試験計画概略 4

2　薬理試験 6

2.1　インスリン グラルギン 6

2.2　リキシセナチド 6

2.3　インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤 7

3　薬物動態試験 9

3.1　インスリン グラルギン 9

3.2　リキシセナチド 9

3.3　インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤 9

4　毒性試験 10

4.1　インスリン グラルギン 10

4.2　リキシセナチド 10

4.3　インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤 11

5　総括及び結論 12

6　参考文献一覧 14

略号と用語の定義

$AUC_{0\text{-}8h}$：	0時間から8時間までの薬物濃度－時間曲線下面積（Area under the concentration-time curve calculated from time 0 h to 8 h）
cAMP：	環状アデノシン一リン酸（cyclic adenosine monophosphate）
ECG：	心電図（Electrocardiogram）
GLP-1R：	グルカゴン様ペプチド-1 受容体（Glucagon-like peptide-1 receptor）
IGF-1：	インスリン様成長因子-1（Insulin-like growth factor-1）
IGF-1R：	インスリン様成長因子-1 受容体（Insulin-like growth factor-1 receptor）
IR：	インスリン受容体（Insulin receptor）
OGTT：	経口糖負荷試験（Oral glucose tolerance test）
PK：	薬物動態（Pharmacokinetics）
T2DM：	2 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus）

1　非臨床試験計画概略

インスリン グラルギン 100 単位/mL 製剤（以下、インスリン グラルギン）とリキシセナチド製剤（以下、リキシセナチド）との固定比配合剤（インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤、HOE901/AVE0010）は、1 日 1 回皮下投与用として開発された。インスリン グラルギンは、日本、米国、EU 及び世界の他の地域において、15 年以上にわたり販売されている。リキシセナチドは日本、EU 及びその他の数ヵ国で 2013 年以降に承認され、米国では 2016 年に承認されている。

インスリン グラルギン（［Gly^{A21}、Arg^{B31}、Arg^{B32}］ インスリン、HOE901）は長時間作用型ヒトインスリンアナログであり、内因性基礎インスリン分泌の生理学的プロファイルと類似の、ほぼピークのない活性プロファイルを有する。インスリン グラルギンがヒトインスリンと異なる点は、A 鎖の 21 位のアスパラギンがグリシンに置換されていること及び B 鎖のカルボキシ末端に 2 つのアルギニン残基が付加されていることである。

インスリン グラルギンについては薬理試験、安全性薬理試験（一般薬理）、薬物動態（PK）試験及び毒性試験の完全な非臨床プログラムが実施されており、初回承認申請時（並びにインスリン グラルギン 300 単位/mL 製剤の毒性はランタス XR 注ソロスター承認申請時）に審査された（[Module 1.13.1-2]及び[Module 1.13.1-5]）。

リキシセナチドは 44 個のアミノ酸を含むペプチドであり、C 末端アミノ酸においてアミド化されている。化学構造は、
H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH_2 である。本薬は GLP-1 受容体（GLP-1R）のペプチドアゴニストである。

リキシセナチドについても薬理試験、安全性薬理試験、PK 試験及び毒性試験の完全な非臨床プログラムが実施されており、初回承認申請時に審査された（[Module 1.13.1-4]）。

両化合物の薬理作用については、すでに個々の申請のために広範な試験が実施されていることから、配合剤については、細胞レベルでの *in vitro* 相互作用の有無の評価に重点をおいた。このため、*in vitro* において、各受容体、受容体下流シグナル伝達、細胞アポトーシス及び増殖に対する両成分の併用による作用と個々の作用との比較を行った（[Module2.6.2.2.1]）。また、インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与について、db/db マウス及びビーグル犬を用いた 2 つの *in vivo* 薬理試験を実施した （[Module2.6.2.2.2]）。

心血管系評価項目に対するインスリン グラルギンとリキシセナチドの静脈内併用投与との影響の有無を、ビーグル犬を用いた安全性薬理試験で検討した（[Module2.6.2.4]）。

両化合物の PK については、すでに個々の申請のために広範な試験が実施されている。配合剤投与後の PK については、ビーグル犬を用いた 1 試験において評価し、この結果を[Module 2.6.4]で詳述した。

個々の化合物の毒性については、それぞれの化合物を用いて実施した広範なプログラムにおいて十分に検討されていることから、配合剤を用いた更なる毒性作用の検討は必要ないと判断した。

なお、本配合剤[redacted]に FDA 及び EMA に相談した結果、いずれも、本配合剤は両方の化合物について[redacted]試験により特徴づけられ、[redacted]試験を除いて、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤の申請を支持するための[redacted]試験は必要ないとの当社の説明に同意した (1)、(2)。

インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤について 2 つの局所刺激性試験を実施した。ウサギを用いたこれらの局所刺激性試験の詳細を [Module 2.6.6] に示す。

2 薬理試験

2.1 インスリン グラルギン

インスリン グラルギンのインスリン受容体（IR）の結合動態、受容体自己リン酸化及びインスリンシグナル伝達系の活性化は、ヒトインスリンと類似している。ヒトインスリンに比べ、インスリン グラルギンの IR に対する親和性はわずかに低く、IGF-1 受容体（IGF-1R）に対する親和性は中等度に増加している。インスリン グラルギンの細胞増殖促進活性は、IR が過剰発現しているラット線維芽細胞株 Rat-1 及びヒト骨格筋細胞株において、ヒトインスリンと同程度である。

In vivo においてインスリン グラルギンは速やかに代謝され、可溶性代謝物になることが、ヒト、ラット及びイヌにおける PK 試験で示された（3.1項参照）。主要循環血漿中物質は代謝物 M1 である。薬物動態及び薬力学の所見によると、インスリン グラルギンの皮下注射による作用は、主として M1 に基づくものである。代謝物 M1 及び M2 は、いずれもヒトインスリンと比較して IGF-1R に対する親和性が明らかに低いため、自己リン酸化を指標とする IGF-1R 刺激作用、及び細胞増殖促進活性は低かった (3)。

インスリン グラルギンの *in vivo* 作用は、イヌを用いて評価した。インスリン グラルギンのイヌにおける作用（薬効量及び作用持続性）は、ヒトにおける作用と類似であったことから、ヒトへの外挿性の点ではイヌが最適な動物種であると考えられた。*In vivo* 効力を評価するため、血糖低下作用をヒトインスリンと比較した。静脈内投与においては、インスリン グラルギンの総血糖低下作用は、ヒトインスリンの作用と比較して差が認められなかった。しかしながら、皮下投与においては、インスリン グラルギンのより持続性の血糖値低下プロファイルが認められた。また、血糖値低下の最低値は、NPH インスリンと比較して顕著には低くなかった。これは、インスリン グラルギンは等電点がより高く、pH 4 の注射製剤中では溶解しているが、中性の pH（皮下投与部位）では沈殿して微細な沈殿物を形成し、それが持続的に再溶解して循環血中に移行することによると考えられた。これらの特性により、インスリン グラルギンは、血糖低下作用が持続性であり、かつ低血糖のリスクが低いと考えられる。

2.2 リキシセナチド

ヒト GLP-1R に対するリキシセナチドの親和性及びアゴニスト活性を評価するため、薬効薬理試験を実施した。ヒト GLP-1R に対する本薬の選択性を評価するため、90 種の異なる放射性リガンドアッセイ及び 2 種の細胞機能アッセイにおけるリキシセナチドの作用を *in vitro* で検討した。種々の 2 型糖尿病（T2DM）動物モデルを用いて、リキシセナチドの *in vivo* 活性を評価した。

In vitro において、リキシセナチドは強力かつ選択的な GLP-1R アゴニストである。摘出灌流膵臓において、リキシセナチドによるインスリン分泌の改善は厳密にグルコース依存的であり、低血糖のリスクが低いことが示された。

T2DM のげっ歯類モデルにおいて、リキシセナチドは上昇した血糖値を用量依存的に低下させ、HbA1c 及び経口耐糖能を改善した。作用発現は速やかで、効果は持続的であった。これらの実験における作用の程度は血糖値に厳密に依存しており、血糖値が高いときにはインスリン分泌が刺激されたが、血糖値が正常若しくは低い期間中は刺激されなかった。この特徴により、リキシセナチドによる低血糖のリスクが最小化される。正常血糖のビーグル犬において、リキシセナチドは低血糖を誘発することなく経口耐糖能を改善し、この効果の少なくとも一部は、胃内容排出及びその後の腸グルコース吸収の遅延によるものであることが示された。さらに、このモデルにおけるリキシセナチドの経口耐糖能改善効果は、リラグルチドの効果より優れていることが示された（薬効量の比較では最大 100 倍）。さらに、リキシセナチドは、動物において、インスリン生合成亢進及びβ細胞増殖刺激を含むインスリン分泌活性化傾向を示した。低血糖のエピソード及び耐性の発現は認められなかった。血糖に対する作用に加えて、動物における薬理データにより、リキシセナチドには膵β細胞の形態及び機能を維持する作用が示唆された。β細胞に対するこれらの保護作用によってヒト T2DM の疾患進行が予防又は抑制されるか否かについては、今後の解明が待たれる。

心血管系に関しては、リキシセナチドの心臓保護作用が摘出ランゲンドルフ心臓モデルで示され、ラットを用いた心筋虚血／再灌流誘発性傷害モデルでも長期投与による心臓保護作用が認められた。ApoE ノックアウトマウスにおいて、リキシセナチドの抗アテローム硬化作用が示された。

2.3　インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤

インスリン グラルギンとリキシセナチドとの配合による相互作用の有無を細胞レベルで評価するため、一連の *in vitro* 試験を実施した。インスリン グラルギン／リキシセナチド併用作用と両成分の個々の作用との比較を各化合物の特異的受容体、受容体下流シグナル伝達、細胞アポトーシス及び増殖のレベルで実施した。

ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 はインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用作用の評価に適していたが、ヒト甲状腺細胞 TT は GLP-1R の発現がわずかであり、評価に適していなかった。ゲノムデータベースの探索、遺伝子発現解析及び機能的特性検討により、ヒト膵臓β細胞株 1.1B4 は、リキシセナチドとインスリン グラルギンの同時作用時の検討には適切な細胞株であることが確認された。ヒト膵臓β細胞株 1.1B4 において、GLP-1R を介したシグナル伝達がリキシセナチドにより誘導されたのに対し、インスリン グラルギンは IR におけるそれぞれの受容体下流反応を活性化した。しかし、リキシセナチドによる GLP-1R の cAMP シグナル伝達経路活性化又はインスリン グラルギンによる IR の AKT シグナル伝達経路活性化に関して、リキシセナチドとインスリン グラルギンの間で相互作用は示唆されなかった。リキシセナチド及びインスリン グラルギンの単独処理による抗アポトーシス作用及び細胞増殖促進作用は、併用処理により変化しなかった。これらの *in vitro* 試験において、GLP-1R

経路と IR 経路には直接の相互作用はないことが示された。それぞれの特異的経路に対する両化合物の作用は変化しなかったことから、IR 特異的又は GLP-1R 特異的リガンドにリキシセナチド又はインスリン グラルギンを付加しても、IR 経路又は GLP-1R 経路の過剰刺激又は阻害は生じないことが示唆された。したがって、低血糖の誘導又は細胞増殖などに関しては、インスリン グラルギン又はリキシセナチドの単独投与と比較した場合、インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与によるリスクの増加はないと考えられる。

In vivo 試験の目的は、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤投与により、いずれかの化合物の単独投与を上回る有益な代謝への影響がみられるか否かを評価することであった。T2DM の 2 つの動物モデルにおいて、インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与により、いずれかの単独投与と比較して、血糖コントロールの改善が認められた。インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与により、糖尿病マウスの血糖コントロール及び経口耐糖能が改善され、正常血糖イヌを用いた OGTT において血糖値上昇が抑制された。既に証明されている空腹時血糖に対するインスリン グラルギンの効果に加えて、リキシセナチドは食後血糖に対する強力な効果が示されたことから、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤の補完的な作用が示唆された。

インスリン グラルギンとリキシセナチドとの静脈内併用投与による心血管系安全性試験を麻酔下イヌを用いて実施した。両化合物を併用投与したところ、インスリン グラルギン単独投与でみられた影響には変化がみられなかった。すなわち、最大の血糖低下作用は同程度であり、QT 間隔延長及び T 波形態の変化に関連する血漿中カリウムの変化は同程度であった。したがって、両化合物を併用投与した場合、単独投与と比較して、リスクの増加は認められなかった。

3　薬物動態試験

3.1　インスリン グラルギン

ラット及びイヌにインスリン グラルギン（100 単位/mL）を単回静脈内投与したとき、インスリン グラルギンの血漿中消失半減期は 3～12 分であった。また、イヌに単回皮下投与したとき、血漿中インスリン グラルギン濃度は投与後 2～4 時間で最高値に達し、血漿中消失半減期は 4～6 時間であった。ラットにおけるインスリン グラルギン及びヒトインスリンの組織分布は類似していた。

ラット及びイヌにおいて、インスリン グラルギンの代謝物として、M1（21^{A}-Gly-インスリン）及び M2（21^{A}-Gly-des-30^{B}-Thr-インスリン）の 2 つの代謝物が同定された。これらの代謝物はヒトにおいても確認された。

3.2　リキシセナチド

リキシセナチドの非臨床単回投与薬物動態試験では、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ミニブタ及びブタにリキシセナチドを静脈内、皮下又は腹腔内投与した。また、3 ヵ月間反復投与試験では、マウス、ラット及びイヌにリキシセナチドを皮下投与した。いずれの動物種においても、皮下又は腹腔内投与されたリキシセナチドは速やかに吸収され、血漿中濃度は投与後 0.25～3.75 時間で最高値に達した。皮下投与後の絶対的バイオアベイラビリティは、イヌで約 90%、ブタで約 70%、マウスで 36～50%、ウサギで 30%以上、ラットで約 3%であった。マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ミニブタ及びブタにリキシセナチドを静脈内投与したとき、終末相消失半減期は 0.5～6.5 時間であった。

リキシセナチドをヒト、イヌ及びウサギ由来の肝臓及び腎臓の S9 画分とともにインキュベートしたとき、1 時間で大部分が代謝された。ヒト由来 S9 画分中では 28 種類の代謝物が検出され、いずれもリキシセナチドから分解したペプチドであった。

酵素結合免疫吸着測定法を用いて、リキシセナチドの脳内移行性、胎盤通過性及び乳汁排泄を検討したところ、脳内移行は認められず（脳内血漿量から予想される部分を除く）、胎盤通過性は極めて低く（ラットで 0.1%、ウサギで 0.01%未満～0.3%）、また乳汁排泄も極めて少なかった。

3.3　インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤

イヌにおいて、インスリン グラルギンとリキシセナチドを併用（混合したものを投与）した時の PK と、各製剤単独での PK を比較したとき、リキシセナチドの曝露量（最高血漿中薬物濃度及び投与後 0 時間から 8 時間までの薬物濃度－時間曲線下面積［$AUC_{0\text{-}8h}$］）には、インスリン グラルギンとの併用投与による有意な影響は認められなかった。また、インスリン グラルギン代謝物 M1 の曝露量（$AUC_{0\text{-}8h}$）についても、リキシセナチドと併用投与による影響は認められなかった。

4　毒性試験

4.1　インスリン グラルギン

インスリン グラルギンの非臨床毒性試験として、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験、局所刺激性試験及び免疫原性試験を実施した。

In vivo 動物試験でみられたインスリン グラルギンの作用は、その薬理作用に関連するものであり、所見としては、低血糖、低血糖ショック並びに昏睡及びそれによる死亡が認められた。これらは健康な非糖尿病動物にインスリン グラルギンを過剰投与したことに起因するものであった。インスリン グラルギンのがん原性及び変異原性は示唆されなかった。ラットを用いた生殖発生毒性試験において、受胎能及び胚・胎児発生への影響は検討した最高用量（それぞれ 10 又は 20 単位/kg/日）まで認められなかったが、10 単位/kg/日の用量で、低血糖に起因する F1 動物の哺育率低下がみられた。ウサギにおいては、1 単位/kg/日以上の用量で、用量依存的な低血糖による母動物毒性（低血糖ショック、全胚・胎児死亡）及び胚・胎児毒性（単発的な異常を含む）が認められた。同様の変化は、対照物質のヒト NPH インスリンでもみられた。免疫原性試験において、インスリン グラルギンは、ヒト、ブタ及びウシのインスリンと同程度又はそれよりやや低い免疫原性を示した。

4.2　リキシセナチド

非臨床データにおいて、特記すべきヒトへの危険性は認められなかった。2 年間皮下投与がん原性試験において、マウスではいずれの用量においても C 細胞癌はみられず、ラットでの C 細胞癌に関する無影響量は 40 µg/kg の 1 日 2 回投与であった。甲状腺 C 細胞増殖性変化がラット及びマウスでみられたが、治療用量でのヒト曝露量と比較した曝露量比は極めて高かった（それぞれ 913 倍以上及び 272 倍以上）。これらの所見は、特にげっ歯類の感受性が高い GLP-1 受容体を介したメカニズムにより誘発されたと考えられる。動物試験では、ラットにおける雌雄の受胎能に関して、直接の有害作用は示唆されなかった。ラット及びウサギを用いたリキシセナチドの生殖発生毒性試験では、高用量で成長遅滞、骨化遅滞及び骨格変化といった胎児の変化が誘発された。妊娠後期及び授乳期にリキシセナチドの高用量に曝露された雄ラットの新生児成長が抑制され、出生児死亡率がわずかに増加した。マウス及びラットでは最長 2 年間、イヌでは最長 1 年間にわたって実施したリキシセナチドの毒性試験において、膵臓の増殖性又は炎症性の変化は誘発されなかった。

イヌを用いたリキシセナチドの試験では、精巣／精巣上体が全身性の標的器官と判明した。イヌにおける精巣及び精巣上体の変化に関する無毒性量における曝露量は、平均臨床曝露量（20 µg の用量）と比較して 17 倍以上であった。

4.3　インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤

臨床試験で使用予定であるインスリン グラルギン／リキシセナチドプレミックス製剤をウサギに皮下投与したときの忍容性は良好であった。筋肉内又は静脈内など、誤って投与する可能性がある注射経路での忍容性も良好であったが、静脈周囲投与での忍容性は良好ないし中等度であった。インスリン グラルギン／リキシセナチドプレミックス製剤を用いた 1 試験において、筋肉内投与したウサギのうち 1/4 例が、注射後の夜間に死亡した。観察された一般状態の変化に基づくと、この死亡はインスリン グラルギン関連の低血糖に起因するものと考えられた。

これらの局所刺激性試験の結果において、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤をヒトに使用したときのリスクは示唆されなかった。

5　総括及び結論

ヒト膵臓細胞株 1.1B4 を用いた *in vitro* 試験において、リキシセナチドによる GLP-1R の cAMP シグナル伝達経路活性化又はインスリン グラルギンによる IR の AKT シグナル伝達経路活性化に関して、リキシセナチドとインスリン グラルギンの間で相互作用はないことが示唆された。リキシセナチド及びインスリン グラルギンで単独処理したときの抗アポトーシス作用及び細胞増殖促進作用には、併用処理による変化は認められなかった。これらの *in vitro* 試験により、GLP-1R 経路と IR 経路の間での直接の相互作用はないことが示された。それぞれの経路に対する両化合物の作用には変化はみられないことから、IR 又は GLP-1R に特異的なリガンドにリキシセナチド又はインスリン グラルギンを追加しても、IR 経路及び GLP-1R 経路のいずれにおいても過剰刺激又は阻害はなかったと考えられる。したがって、低血糖又は細胞増殖の誘発などに関しては、インスリン グラルギン又はリキシセナチドの単独投与と比較して、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤投与によるリスクの増加はないと考えられる。

2 つの T2DM 動物モデルにおいて、インスリン グラルギン／リキシセナチド併用は、いずれかの化合物の単独投与と比較して、血糖コントロール改善を示した。インスリン グラルギン／リキシセナチド併用により、糖尿病マウスの血糖値及び経口耐糖能が改善し、正常血糖イヌを用いた OGTT において血糖値上昇が低下した。空腹時血糖値に対するインスリン グラルギンの十分に確認された作用に加えて、リキシセナチドは食後血糖値に対する強力な作用を示すことから、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤により相補的な作用が得られると考えられる。

インスリン グラルギン（0.1 単位/kg の用量での静脈内ボーラス投与）とリキシセナチド（10 µg/kg の用量での 30 分間点滴静注）を併用投与したところ、インスリン グラルギン単独投与でみられた作用には変化が認められなかった。たとえば、最低血糖値は同程度であり、（補正又は非補正）QT 間隔延長及び T 波形態の変化に関連する血漿カリウムへの影響も同程度であった。インスリン グラルギン投与後にみられた ECG の変化は、配合剤投与により変化しなかった。ECG の変化は、恐らく低い血清中カリウム濃度に関連したものであった。

イヌを用いた PK 評価において、インスリン グラルギンとリキシセナチドの併用は、いずれの化合物の曝露量にも影響を与えないことが示された。

リキシセナチド／インスリン グラルギン配合剤を予定臨床投与経路の皮下投与したときの忍容性は良好であった。同様に、筋肉内及び静脈内投与においても良好な局所忍容性が認められた。リキシセナチド／インスリン グラルギンをウサギに静脈周囲に投与したときの局所忍容性は中等度であった。

インスリン グラルギンあるいはリキシセナチド単剤の製造販売承認申請時に提出・審査された非臨床試験データに基づき、本承認申請 Module 2.6 に記述した試験以外にはインスリングラルギン／リキシセナチド配合剤による非臨床試験は実施しなかった。

以上、各成分単独投与時及び配合剤投与時の非臨床試験結果から、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤のヒトへの使用は妥当なものと考えられる。

6 参考文献一覧

1. FDA - CDER, IND 105157 and IND 062724, Meeting Minutes, June 25, 2010
2. EMA, Scientific Advice Lixisenatide/Insulin Glargine, response given by CHMP, March 18, 2010
3. Sommerfeld MR, Müller G, Tschank G, Seipke G, Habermann P, Kurrle R, et al. In Vitro Metabolic and Mitogenic Signaling of Insulin Glargine and Its Metabolites. PLoS One. 2010;5(3) e9540