サノフィ株式会社

HOE901/AVE0010

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 9

目　　次

目　　次 2

略号と用語の定義 3

参 考 文 献 8

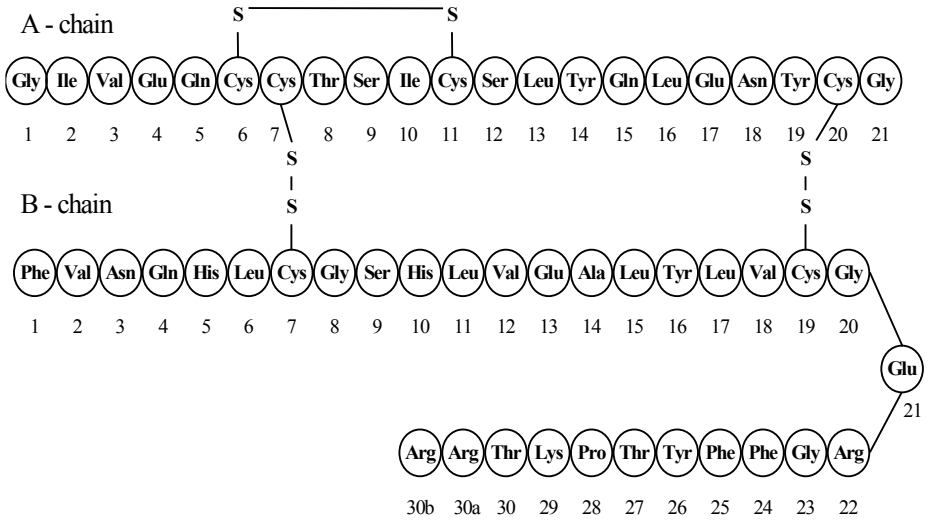
略号と用語の定義

cAMP：	環状アデノシン一リン酸（cyclic adenosine monophosphate）
DPP-4：	ジペプチジルペプチダーゼ IV（Dipeptidyl peptidase IV）
GLP-1：	グルカゴン様ペプチド-1（Glucagon-like peptide-1）
GLP-1R：	グルカゴン様ペプチド-1 受容体（Glucagon-like peptide-1 receptor）
GSIS：	グルコース刺激性インスリン分泌（Glucose-stimulated insulin secretion）
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）
T2DM：	2 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus）

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）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）は、1 日 1 回皮下投与用で血糖コントロールを目的とした新規治療薬として開発されている。基礎インスリンとグルカゴン様ペプチド-1 受容体（GLP-1R）アゴニストの併用による利点は、現在の治療で十分な血糖コントロールが得られない患者において、1 回の投与で治療効果の増強が可能となることである。本剤には HbA1c 低下作用（補完的に、空腹時及び食後血糖の両方に作用する）があり、体重を増加させず（むしろ体重を減少させ）、低血糖のリスクは限定的と考えられる。インスリン グラルギン及びリキシセナチドは、日本、米国、EU を含む多くの国で承認されている。

インスリン グラルギンは、ヒトインスリンアナログの 21^{A}-Gly-30^{B}a -30^{B}b-Di-Arg ヒトインスリンであり、B30 位に 2 つのアルギニンを保持し、さらに A21 位のアスパラギンがグリシンに置換されている。インスリン グラルギンの等電点（pI）は 6.7 であるため、生理的 pH における溶解度が低下している。この溶解度低下により、注射部位からのインスリン グラルギンの吸収が遅延及び延長する。

構造式：



分子式：　$C_{267}H_{404}N_{72}O_{78}S_6$

相対分子量：　6063

他の既知の化合物との構造類似性：　インスリン グラルギンはヒトインスリンとの構造類似性を示す。

ラット及びイヌを用いた試験において、インスリン グラルギンの 2 つの代謝物［21^{A}-Gly-インスリン（M1）及び 21^{A}-Gly-des-30^{B}-Thr-インスリン（M2）］が同定された。これら 2 つの代謝物は、ヒトの代謝試験においても確認された。

インスリン グラルギン及びその代謝物の代謝シグナル伝達及び細胞増殖シグナル伝達を特徴づけるため、*in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験を実施した。*In vitro* データにより、インスリン グラルギンはヒトインスリンと類似したインスリン受容体（IR）シグナル伝達及び代謝プロファイルを有し、インスリン様成長因子-1 受容体（IGF-1R）に対する親和性がより高く、一部の細胞株においては、若干で

はあるが、より高い細胞増殖促進活性を示すことが明らかになった。*In vivo* 活性代謝物の M1 及び M2 はヒトインスリンと類似した *in vitro* 代謝プロファイルを有し、ヒトインスリンと同程度又はそれより低い細胞増殖促進活性を示した。

In vitro 及び *in vivo* 非臨床薬理試験により、以下の結論が得られた。①インスリン グラルギンは、その等電点により、皮下注射後に沈殿してマルチヘキサマーとなる。これが皮下組織内に局所的で微細な沈殿物を形成し、徐々に溶解して二量体となった後、生物学的活性を発揮する単量体となることで、独特の長時間作用型のプロファイルが得られる。②微細な沈殿物から放出されたインスリン グラルギンは、動物及びヒトにおいて効果的に代謝される。③インスリン グラルギン代謝物は、*in vitro* 及び *in vivo* においてヒトインスリンと類似した代謝活性を示し、細胞増殖促進活性はヒトインスリンと同程度又はそれより低い。④インスリン グラルギン代謝物 M1 は、インスリン グラルギンの薬力学効果を誘導する主要な物質である(1)、(2)。

グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）は、下部腸管の腸管内分泌 L 細胞によりプログルカゴンの翻訳後プロセシングを介して産生されるインクレチンホルモンである (3)。このペプチド自体は哺乳類の動物種において同一であり、GLP-1R も動物種を通して高度に保存され、ラットとヒトの間で 90%のアミノ酸配列同等性がみられる (4)、(5)。GLP-1R は全身を通して種々の組織に広く分布する。その組織には、膵島の α、β 及び δ 細胞、肺、心臓、腎臓、胃、腸、皮膚、迷走神経の節状神経節及び中枢神経系のいくつかの領域（主に視床下部及び脳幹）が含まれる (6)。

正常ヒト組織を用いたリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応検査に基づくと、GLP-1R は多くの末梢組織において低レベルないし極めて低レベルで検出されたが、大動脈、骨格筋及び輸精管には検出されなかった。末梢において最も高い発現がみられたのは心臓及び膵臓であり、これらの器官における GLP-1R の発現レベルは中程度と評価された。脳において、GLP-1R は視床には検出されず、尾状核、脳梁、基底核、視床下部、側座核、淡蒼球及び被核では低く、他のすべての領域では極めて低かった。肺、結腸、膵臓、腎臓及び甲状腺を含む種々の器官から採取した腫瘍組織においては、GLP-1R の全般的な発現増加は認められなかった。

炭水化物又は脂肪を含む食事を摂取すると、GLP-1 は L 細胞から GLP-1（7-37）として循環血中に分泌され、そこで GLP-1（7-37）又はその主要代謝物 GLP-1（7-36）アミドが栄養摂取及び代謝を調節する (7)、(8)、(9)。GLP-1 は高いグルコース濃度に反応して膵臓のインスリン放出を増加させ、同時にグルカゴン分泌を抑制するが､生理的グルコース濃度ではこのような作用を示さないことにより、低血糖誘発のリスクが最小化される (9)、(10)、(11)、(12)。2 型糖尿病（T2DM）を有するヒト被験者に GLP-1 を 6 週間連続で皮下注入したところ、空腹時及び食後血糖値の著しい低下、HbA1c の改善、胃内容排出遅延及び体重減少が認められた (13)。以上より、GLP-1 は生理的状態の方向に代謝コントロールを補正し T2DM 患者における有望な治療の選択肢となると結論することができる。循環血中の GLP-1 は、一般的な内在性プロテアーゼのジペプチジルペプチダーゼ IV（DPP-4）により N 末端が速やかに切断されて不活性化する。いったん循環血中に入った後の GLP-1 未変化体の血漿中半減期は約 2 分間にすぎないため、ヒト T2DM の治療における価値は極めて限定的である。一方、血漿中半減期の長い数種類の GLP-1R アゴニストが合成されており、種々の動物モデルを用いたこれらのアゴニス

トの非臨床試験により、T2DM 患者の天然 GLP-1 について報告されたすべての特徴が示されている。これらの動物モデルでは、ヒト試験の所見に加えて、GLP-1R アゴニストが糖尿病動物における膵β細胞の機能を保護し，その細胞量を維持することも示された (14)。

リキシセナチド（AVE0010）は、GLP-1R アゴニストであり、天然リガンド GLP-1 と比較してより安定で、その受容体に対してより高い親和性及び高度の選択性を示す。

リキシセナチドは 44 個のアミノ酸を含有するペプチドであり、その C 末端アミノ酸はアミド化されている。

その化学構造は
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。

糖尿病動物モデルにおいて、リキシセナチドの抗糖尿病特性が示された。リキシセナチドによるグルコース刺激性インスリン分泌（GSIS）促進作用には厳密なグルコース依存性がみられたことから、望ましくない低血糖を回避できる可能性がある。リキシセナチドによる経口耐糖能、血糖値及び HbA1c の改善は、その発現が速やかで作用持続時間が長く、経時的な膵臓反応性低下及びグルコース恒常性悪化が抑制された。リキシセナチドは胃内容排出遅延作用及び摂餌量減少作用も示した。これらの作用は血糖低下作用及び体重減少の誘導のいずれにおいても重要と考えられる。さらに、リキシセナチドは、ラット膵臓β細胞由来細胞株において、脂質及びサイトカイン誘発性のアポトーシスを抑制した。また、本薬はヒト膵島において、脂肪毒性誘発性の膵島インスリン枯渇を抑制し、インスリンの産生及び貯蔵並びに膵β細胞機能を維持した (15)。

また、動物試験において、心血管系に対するリキシセナチドの有益な作用が示されている。リキシセナチド投与により、冠動脈閉塞により誘発されたラットの心臓虚血が改善され、ApoE ノックアウトマウスにおけるアテローム硬化性病変が減少した (16)、(17)。

長時間作用型インスリンアナログと GLP-1R アゴニストは異なる受容体を介して作用するため、これらの薬剤を併用投与すると、補完的な抗糖尿病効果を発揮する可能性があると予想される。インスリン グラルギンが IR を介して作用し、受容体下流の酵素（IRS-1/2、PIRK、AKT など）を誘導するのに対し、リキシセナチドによる GLP-1R 活性化の結果として、細胞内の cAMP、カルシウムなどが増加する。したがって、このような併用投与を行うことで、1 つの経路内での過剰な刺激作用又は阻害作用のリスクが低くなる。さらに、両方の経路はそれぞれのリガンドの刺激により別々に作用するため、その結果として効果が増幅する可能性がある。すなわち、インスリン グラルギンは基礎インスリンを補給して、顕著な空腹時血糖低下作用を示すことが確立されており、リキシセナチドは食後血糖値低下、食欲低下、体重減少及びβ細胞機能保存を含む既知のインクレチン作用を付加する可能性がある。一方、両経路間で直接の相互作用はないことから、これらの薬剤を併用投与した場合に、低血糖、抗アポトーシス及び細胞増殖促進活性といった 1 つの薬剤の潜在的かつ特異的なリスクが、他の薬剤により増加することはないと予想される。

以上、インスリン グラルギンとリキシセナチドの併用投与により、いずれかの薬剤の単独投与と比較して血糖コントロールが改善されると予想される一方で、更なるリスクが誘発される可能性は低いと考えられる。

なお、本申請において予定している「効能又は効果」及び「用法及び用量」を以下に示す。

効能又は効果
2 型糖尿病（インスリン グラルギン及びリキシセナチドの併用治療が適応となる患者）

用法及び用量
通常、成人には、インスリン グラルギン／リキシセナチドとして 5～20 単位/5～20 μg を 1 日 1 回朝食前に皮下注射する。ただし、1 日 1 回 5～10 単位/5～10 μg から開始し、患者の症状及び検査所見に応じて適宜増減するが、1 日 20 単位/20 μg を超えないこと。

参 考 文 献

1. Tennagels N, Werner U. The metabolic and mitogenic properties of basal insulin analogues. Arch Physiol Biochem. 2013; 119(1):1-14.
2. Tennagels N, Welte S, Hofmann M, Brenk P, Schmidt R, Werner U. Differences in metabolic and mitogenic signalling of insulin glargine and insulin aspart B10 in rats. Diabetologia 2013; 56:1826-34.
3. Mojsow S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. J Biol Chem 1986;261:11880-9.
4. Thorens B. Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. Proc Natl Acad Sci. 1992;89:8641-5.
5. Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng SP, Morel P, Widmann C. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. Diabetes 1993;42:1678-82.
6. Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 2006;3:153-65.
7. Drucker DJ. Glucagon-like peptides. Diabetes 1998;47:159-69.
8. Nauck MA, Homberger E Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. J Clin Endocrinol Metab. 1986;63:492-8.
9. Gutniak M, Ørskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendic S. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. N Engl J Med. 1992;326:1316-22.
10. Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S, Habener JF. Insulinotropic action of glucagonlike peptide-1 (7-37) in diabetic and nondiabetic subjects. Diabetes Care 1992; 15, 270-6.
11. Nauck MA, Wollschlager D, Werner J, Holst JJ, Ørskov C, Creutzfeldt W, et al. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-[7-36 amide]) in patients with NIDDM. Diabetologia 1996;39:1546-53.
12. Ørskov C, Rabenhoj L, Wettergren A, Kofod H, Holst JJ. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide 1 in humans. Diabetes 1994;43:535-9.
13. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. Lancet 2002;359:824-30.
14. Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. Reg Pep 2004;117:77-88.
15. Werner U, Haschke G, Herling AW, Kramer W. Pharmacological profile of lixisenatide: A new GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. Regulatory Peptides 2010;164:58-64.

16. Wohlfart P, Linz W, Hübschle T, Linz D, Huber J, Hess S, et al. Cardioprotective effects of lixisenatide in rat myocardial ischemia-reperfusion injury studies. Journal of Translational Medicine. 2013;11:84,1-12.
17. Schäfer HL, Hübschle T, Juretschke HP, Werner U. Anti-Atherosclerotic Activity of Lixisenatide in ApoE Knockout Mice. Diabetes. 2012;61 Suppl 1, A254-5.

サノフィ株式会社

HOE901/AVE0010

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 25

目　　次

目　　次 **2**

表　目　次 **3**

図　目　次 **4**

略号と用語の定義 **4**

1　　まとめ **6**

2　　効力を裏付ける試験 **7**

2.1　　*In vitro* 活性 7

2.1.1　　GLP-1R 及びインスリン受容体 mRNA を発現する細胞株の探索 7

2.1.2　　GLP-1R に対する結合 7

2.1.3　　IR に対する結合 8

2.1.4　　GLP-1R における機能的活性 8

2.1.5　　IR 及び IGF-1R における機能的活性 11

2.1.5.1　　IR リン酸化に対する作用 11

2.1.5.2　　IGF-1R リン酸化に対する作用 12

2.1.5.3　　IR の下流シグナル伝達に対する作用 12

2.1.6　　*In vitro* での細胞アポトーシスに対する作用 13

2.1.6.1　　ラット細胞株のアポトーシスに対する *in vitro* 活性 13

2.1.6.2　　ヒト細胞株におけるアポトーシスに対する *in vitro* 活性 14

2.1.7　　*In vitro* 細胞増殖に対する作用 15

2.2　　*In vivo* 活性 16

2.2.1　　雌 db/db マウスを用いたインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用皮下投与による急性血糖低下作用 16

2.2.2 雄イヌの経口耐糖能に対するインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用皮下投与の急性作用 17

3 副次的薬理試験 19

4 安全性薬理試験 20

4.1 心血管系 20

4.1.1 インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与ー麻酔下イヌの心血管系機能に対する単回静脈内投与の影響 20

5 薬力学的薬物相互作用試験 23

6 考察及び結論 24

参 考 文 献 25

表 目 次

表 1 - CHO 細胞に発現させたヒト GLP-1 受容体に対する［^{125}I］GLP-1$_{(7-36)}$アミドの結合のリキシセナチドによる置換 8

表 2 - ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 における GLP-1(7-36)アミド、リキシセナチド、exendin-4 及びリラグルチドの *in vitro* 機能試験 9

表 3 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1 B4 におけるインスリン グラルギン、リキシセナチド及び各濃度のインスリン グラルギン存在下でのリキシセナチドの *in vitro* 機能試験（4 試験）の概要 10

表 4 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1 B4 におけるインスリン グラルギン存在下のリキシセナチドとリキシセナチド単独との *in vitro* 機能試験での EC_{50} 幾何平均値の比 11

表 5 - ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 における TNFα によるアポトーシス誘導倍率へのインスリン グラルギン及びリキシセナチドによる変化の概要 14

表 6 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 におけるリキシセナチド単独又は各濃度のインスリン グラルギンの存在下でのリキシセナチドのアポトーシス抑制作用の幾何平均 IC_{50} 値及び 95%信頼区間 15

表 7 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 における各濃度のインスリン グラルギンの存在下でのリキシセナチドとリキシセナチド単独とのアポトーシス抑制作用の比及び 90%信頼区間 15

表 8 -麻酔イヌの心血管系機能に及ぼすインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用単回静脈内投与の影響：試験概要 20

表 9 -麻酔イヌの心血管系機能に及ぼすインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用単回静脈内投与の影響：結果の要約 21

図　目　次

図 1 - 雄イヌの経口耐糖能に対するリキシセナチド（0.15 µg/kg SC）とインスリン グラルギン（0.3 U/kg SC）の 2 製剤（U100 及び U300）の併用投与による作用 18

略号と用語の定義

cAMP：	環状アデノシン一リン酸（cyclic adenosine monophosphate）
CHO：	チャイニーズハムスター卵巣（Chinese hamster ovary）
Ct：	サイクル時間（Cycle time）
EC_{50} rel：	50%リガンド有効活性化濃度（Emin%と Emax%の中間）［effective concentration where activation by a ligand is half-maximal (mid-way between Emin% and Emax%)］
ECG：	心電図（Electrocardiogram）
Emax%：	アルゴリズムによる最大効果の推定値（value estimated by the algorithm for the maximal effect）
EmaxC：	検討した最高濃度（maximum concentration tested）
Emin%：	アルゴリズムによる最小効果の推定値（value estimated by the algorithm for the minimal effect）
EminC：	検討した最小濃度（minimum concentration tested）
GLP-1：	グルカゴン様ペプチド-1（Glucagon-like peptide-1）
GLP-1R：	グルカゴン様ペプチド-1 受容体（Glucagon-like peptide-1 receptor）
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）
IR-B：	インスリン受容体サブタイプ B（Insulin receptor subtype B）
IV：	静脈内（Intravenous）
OGTT：	経口糖負荷試験（Oral glucose tolerance test）
PCR：	ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase chain reaction）
SC：	皮下（Subcutaneous）
T2DM：	2 型糖尿病（Type 2 diabetes mellitus）

1　まとめ

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）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）は、1 日 1 回皮下（SC）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 年に承認された。

インスリン グラルギンはヒトインスリンの遺伝子組換え（大腸菌）長時間作用型アナログであり、A21-Asn がグリシンに置換され、B 鎖の C 末端の B30-Thr 位に 2 つのアルギニンが付加されている（B30-Thr-Arg-Arg）。ランタス注はインスリン グラルギンを含有するインスリン製剤であり、単回 SC 投与により基礎インスリンが 24 時間にわたって供給される。インスリン グラルギンの非臨床薬理試験は、日本での初回承認申請時に審査された（[Module1.13.1-2]）。

リキシセナチドはグルカゴン様ペプチド-1 受容体（GLP-1R）アゴニストであり、天然リガンド GLP-1 より安定であり、受容体に対してより高い親和性及び選択性を示す。リキシセナチドは 44 個のアミノ酸を含有するペプチドであり、その C 末端アミノ酸はアミド化されている（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）。リキシセナチドの非臨床薬理試験では、リキシセナチドのヒト GLP-1R に対する親和性、糖尿病動物モデルにおける抗糖尿病作用、低い低血糖誘発リスク、胃内容排出遅延作用、膵 β 細胞保護作用の可能性等が検討され、日本での初回承認申請時に審査された（ [Module 1.13.1-4]）。

本承認申請では、各種 *in vitro* 試験において、リキシセナチドとインスリン グラルギンの相互作用、2 型糖尿病（T2DM）動物モデルを用いた *in vivo* 試験において、インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用効果を評価した。また、麻酔イヌの心血管系機能に対するインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用による影響を検討した。

2　効力を裏付ける試験

2.1　*In vitro* 活性

2.1.1　GLP-1R 及びインスリン受容体 mRNA を発現する細胞株の探索

GLP-1R、インスリン受容体（IR）及びインスリン様成長因子-1 受容体（IGF-1R）を共発現する細胞株を特定するために、種々のげっ歯類及びヒト由来細胞株における mRNA 発現を検索した。Affimetrix® データを含めた社内データベース及び、約 360 種類の細胞株を含む公的データベース（GlaxoSmithKline 及び Ascenta）を用いて、スクリーニングを実施した。

データベース探索による初期スクリーニング及び数種の細胞株のリアルタイム PCR 解析により、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4、ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 及びヒト甲状腺 C 細胞株 TT のみ GLP-1R mRNA を発現することが明らかになった。さらに、これら 3 細胞株について、リアルタイム PCR による詳細な遺伝子発現解析を実施した。3 細胞株におけるハウスキーピング遺伝子 GAPDH の発現に関する Ct 値は、10.9～15.4 の範囲であったことから、総 RNA 調製及び cDNA 合成に成功したことが示唆された。GLP-1R、IGF-1R 及び IR 遺伝子の発現に関して得られた Ct 値は 17.1～35.4 の範囲であり、ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 の IGF-1R 遺伝子のみ認められなかった（背景値からの差異が認められなかった）。すなわち、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 及びヒト甲状腺 C 細胞株 TT では GLP-1R、IGF-1R 及び IR の mRNA 発現が、ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 では GLP-1R 及び IR の mRNA 発現が認められた（[Module 4.2.1.1-3: DIVT0063] [Module 2.6.3.2.2C] ）。

ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 は、機能的に活性な GLP-1R 及び IR の共発現が既に確認されていたため、試験に用いた（[Module 4.2.1.1-1: DIVT0064] [Module 2.6.3.2.2A] 及び[Module 4.2.1.1-2: DIVT0056] [Module 2.6.3.2.2B]）。

これらの細胞株を用い、リキシセナチドの GLP-1R 刺激作用及びインスリン グラルギンの IR 又は IGF-1R 刺激作用の受容体活性化並びにその下流シグナル伝達経路における相互作用の有無を評価した。

2.1.2　GLP-1R に対する結合

ヒト GLP-1R を遺伝子導入したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において、GLP-1R アゴニストのリキシセナチドは、天然ヒト GLP-1 より約 4 倍高い結合親和性を示した。リキシセナチドの IC_{50} が 1.43 nmol/L であるのに対し、GLP-1 の IC_{50} は 5.48 nmol/L であり、これに対応する K_i 値はそれぞれ 1.33 及び 5.09 nmol/L であった（表 1）（[Module 4.2.1.1-4: MVT0010] [Module 4.2.1.1-4a: MVT0010EXT] [Module 2.6.3.2.2D]）。

表 1 - CHO 細胞に発現させたヒト GLP-1 受容体に対する［^{125}I］GLP-1$_{(7-36)}$アミドの結合のリキシセナチドによる置換

化合物	IC_{50} (nmol/L)	K_i (nmol/L)
リキシセナチド	1.43 ± 0.24	1.33 ± 0.22
GLP-1	5.48 ± 1.28	5.09 ± 1.19

3 回のアッセイで得られた平均値±SEM

GLP-1R に対するインスリン グラルギンの親和性を、マウス膵臓 β 細胞株 βTC6 を用いて *in vitro* で評価した。インスリン グラルギンは、100 nmol/L の濃度において、GLP-1R に対する 25 pmol/L［^{125}I］GLP-1$_{(7-36)}$ の特異的放射性リガンド結合を阻害しなかった（-3%）。この細胞株において、対照物質の exendin-4 は特異的放射性リガンド結合を阻害し、IC_{50} は 0.16 nmol/L（K_i = 0.13 nmol/L）であった。したがって、インスリン グラルギンは 100 nmol/L の濃度で GLP-1R に対する親和性を示さないのに対し、exendin-4 はマウス GLP-1 の強力なリガンドであると結論された（[Module 4.2.1.1-5: DIVT0068-abbr] [Module 4.2.1.1-5a: DIVT0068] [Module 2.6.3.2.2E]）。

2.1.3 IR に対する結合

IR サブタイプ B（IR-B）に対するリキシセナチド及びインスリン グラルギンの親和性を、CHO 細胞を用いて *in vitro* で評価した。ヒト IR-B に対する A14［^{125}I］-標識インスリンの結合に対するリキシセナチドの阻害作用とともに、IR-B に対するインスリン グラルギンの結合親和性への高濃度リキシセナチド（1 µmol/L）の影響を検討した。インスリン グラルギンを対照物質として使用した。リキシセナチド単独では、ヒト IR-B に対する A14［^{125}I］-標識インスリンの結合を阻害しなかった。すなわち、リキシセナチドは、使用した最高濃度の 1 µmol/L においても、IR-B に対する結合親和性を示さなかった。一方、インスリン グラルギンのヒト IR-B に対する IC_{50} は 1.116 nmol/L［0.940 ; 1.324（95%信頼区間）］であった。高濃度リキシセナチド（1 µmol/L）の存在によっても、インスリン グラルギンの濃度－反応曲線に明らかな影響は認められず、インスリン グラルギンのヒト IR-B に対する IC_{50} は 1.176 nmol/L［0.991 ; 1.395］であった。インスリン グラルギン単独と 1 µmol/L リキシセナチド存在下のインスリン グラルギンとの平均 IC_{50} の比は 1.0538 であり、この比の 90%信頼区間は［0.870 ; 1.277］であった。したがって、この差異には生物学的意義はないと考えられる。以上、リキシセナチドには IR-B に対する結合親和性はなく、IR-B に対するインスリン グラルギンの親和性にも影響を及ぼさないことが示唆された（[Module 4.2.1.1-6: DIVT0057][Module 2.6.3.2.2F]）。

2.1.4 GLP-1R における機能的活性

特異的アゴニストにより GLP-1R を活性化すると、セカンドメッセンジャーの環状アデノシン 1 リン酸（cAMP）が細胞内で増加することから、GLP-1R の機能的活性の指標として cAMP を使用した。GLP-1R アゴニストである GLP-1$_{(7-36)}$アミド、リキシセナチド、exendin-4 及びリラグルチドの細胞内 cAMP に対する作用を、ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 を用いて検討した。いずれのリガンドも機能的ア

ゴニスト活性を示し、EC_{50}値はそれぞれ 6.88、8.31、4.49 及び 715 pmol/L であった（表 2）。したがって、リキシセナチドは、このラット細胞株において強力な GLP-1R アゴニストであることが示された。しかし、ヒト甲状腺 C 細胞株 TT を用いた検討においては、リキシセナチド及び exendin-4 の EC_{50}値は算出できなかった。最高濃度におけるアルゴリズムによる最大作用の推定値（Emax%）は約 25%にすぎなかった。GLP-$1_{(7-36)}$アミド及びリラグルチドについての EC_{50}値及び 95%信頼区間は、それぞれ 56 pmol/L［4 ；830 ］及び 38600 pmol/L［1090 ；1370000］ と算出されたが、Emax%はいずれも約 15%及び 26%にすぎなかったことから、これらの EC_{50}値の信頼性は低いと考えられる。以上より、4 つの GLP-1R アゴニストによる GLP-1R を介したシグナル伝達は、ラット C 細胞株においてのみ強力で、ヒト C 細胞株では弱かったことから、ラット及びヒトに由来する甲状腺組織の間には、受容体反応性における機能的な相違があることが示唆された([Module 4.2.1.1-7: DIVT0007][Module 2.6.3.2.2G])。

表 2 - ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 における GLP-1(7-36)アミド、リキシセナチド、exendin-4 及びリラグルチドの *in vitro* 機能試験

化合物	Emin%	Emax%	EminC (pmol/L)	EmaxC (pmol/L)	勾配	EC_{50} rel (pmol/L)	EC_{50} rel (LCB95%) (pmol/L)	EC_{50} rel (UCB95%) (pmol/L)	EC_{50} rel (CV)
GLP-1(7-36)	6.974	105.827	0.1	1000000	1.33	**6.88**	6.29	7.52	4.4%
リキシセナチド	1.25	106.756	0.1	1000000	1.10	**8.31**	7.44	9.28	5.4%
exendin-4	-2.56	114.606	0.1	1000000	1.09	**4.49**	4.01	5.03	5.6%
リラグルチド	0.561	113.927	0.1	1000000	1.15	**715**	621	824	6.9%

GLP-1R アゴニストのリキシセナチド及びインスリンアナログのインスリン グラルギン並びにそれらの併用による *in vitro* 活性を、ラット甲状腺 C 細胞株 RTC6-23（クローン 6）及びヒト膵臓 β 細胞株 1.1 B4 を用いて評価した。この細胞アッセイ系でも、cAMP 生成を GLP-1R 下流シグナル伝達の機能的指標として測定した。

ラット甲状腺C細胞株6-23において、インスリン グラルギン単独では、検討した濃度範囲（61.2 amol/L～6.12 µmol/L）を通して、GLP-1R における機能的活性を示さなかった。対照的に、GLP-1R アゴニストのリキシセナチドは、同じアッセイ条件で高い活性を示し、EC_{50}値並びに 95%信頼区間は 2.12 pmol/L［1.96 ; 2.30］であった。インスリン グラルギンとリキシセナチドとの cAMP シグナル伝達における相互作用の有無を評価するため、固定濃度（1 µmol/L、1 nmol/L、1 pmol/L、1 fmol/L 又は 1 amol/L）のインスリン グラルギンの存在下で、リキシセナチドの用量－反応関係を測定した。リキシセナチド単独での EC_{50}幾何平均値及び 95%信頼区間が 2.12 pmol/L［1.96 ; 2.30］であったのに対し、固定濃度のインスリン グラルギンの存在下では、それぞれ 1.59 pmol/L［1.47 ; 1.72］、2.05 pmol/L［1.89 ; 2.22］、1.98 pmol/L［1.82 ; 2.14］、2.03 pmol/L［1.88 ; 2.20］及び 1.88 pmol/L［1.73 ; 2.03］であった。インスリン グラルギンの存在下又は非存在下でのリキシセナチドのEC_{50}値はほとんど同程度であったが、インスリン グラルギンの最高濃度では、EC_{50}のわずかな低下（約 25%）が認められた。固定濃度のイ

ンスリン グラルギン存在下でのリキシセナチドの EC_{50} 値とインスリン グラルギン非存在下のリキシセナチドの EC_{50} 値との比は、それぞれ 0.75［0.69；0.81］、0.97［0.90；1.04］、0.93［0.86；1.00］、0.96［0.89；1.03］及び 0.88［0.82；0.95］であった。インスリン グラルギンの最高濃度（1 µmol/L）でわずかな変化がみられたが、この濃度は治療用量投与時を上回る濃度であることから、*in vivo* では到達しないと考えられた。インスリン グラルギン 1 nmol/L 以下での比は 1 に近く、90%信頼区間が重複していたことから、生物学的意義のある差異はなく、相互作用はないことが示唆された。以上より、今回のアッセイで測定された cAMP の濃度では、リキシセナチドとインスリン グラルギンの間で、細胞シグナル伝達における相互作用が生じる可能性は低いと考えられた（[Module 4.2.1.1-1: DIVT0064][Module 2.6.3.2.2A]）。

表 3 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1 B4 におけるインスリン グラルギン、リキシセナチド及び各濃度のインスリン グラルギン存在下でのリキシセナチドの *in vitro* 機能試験（4 試験）の概要

化合物/併用	EC_{50} - 個々の実験 (pmol/L)				EC_{50} - 幾何平均値 (pmol/L)	95%信頼区間 (pmol/L)
	1	2	3	4		
インスリン グラルギン	-	-	-	-	-	- (n=4)
リキシセナチド	6.88	5.27	7.58	9.77	7.20	[5.34; 9.70] (n=4)
リキシセナチド + 1 µmol/L fc インスリン グラルギン	6.69	5.75	8.69	6.26	6.76	[5.02; 9.11] (n=4)
リキシセナチド + 1 nmol/L fc インスリン グラルギン	6.08	6.30	7.31	11.0	7.45	[5.53; 10.0] (n=4)
リキシセナチド + 1 pmol/L fc インスリン グラルギン	6.89	4.94	9.51	8.02	7.14	[5.30; 9.62] (n=4)
リキシセナチド + 1 fmol/L fc インスリン グラルギン	6.30	5.46	12.1	11.0	8.23	[6.10; 11.1] (n=4)
リキシセナチド + 1 amol/L fc インスリン グラルギン	6.41	6.24	6.18	10.4	7.12	[5.28; 9.59] (n=4)

対数変換 EC_{50} についての混合モデルであり、実験をランダム効果とみなした（濃度は pmol/L）。fc: 最終濃度

ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 をインスリン グラルギン単独で処理したところ、広範囲の濃度（1 amol/L～1 µmol/L）を通して cAMP 反応は検出されなかったことから、cAMP を介した GLP-1R 下流シグナル伝達に対してインスリン グラルギンは不活性と考えられた。対照的に、リキシセナチドは、同アッセイにおいて単独で高い活性を示した。種々の濃度（1 µmol/L、1 nmol/L、1 pmol/L、1 fmol/L 又は 1 amol/L）のインスリン グラルギンの存在下でのリキシセナチドの EC_{50} 幾何平均値は、それぞれ 6.76 pmol/L［5.02；9.11］、7.45 pmol/L［5.53；10.0］、7.14 pmol/L［5.30；9.62］、8.23 pmol/L［6.10；11.1］及び 7.12 pmol/L［5.28；9.59］であり、リキシセナチド単独で得られた EC_{50} 値（7.20 pmol/L［5.34；9.70］）と同程度であった（表 3）。インスリン グラルギン存在下のリキシセナチド EC_{50} 値と、非存在下でのリキシセ

ナチドの EC_{50} 値の比を算出したところ、それぞれ 0.94［0.75 ; 1.18］、1.04［0.83 ; 1.30］、0.99［0.79 ; 1.24］、1.14［0.91 ; 1.43］及び 0.99［0.79; 1.24］（表 4）と 1 に近く、90%信頼区間が重複していたことから、生物学的意義のある差異はなく、相互作用はないことが示唆された。以上、今回のアッセイで測定された cAMP の濃度では、リキシセナチドとインスリン グラルギンの間で細胞シグナル伝達における相互作用が生じる可能性は低いと考えられた（[Module 4.2.1.1-8: DIVT0067][Module 2.6.3.2.2H]）。

表 4 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1 B4 におけるインスリン グラルギン存在下のリキシセナチドとリキシセナチド単独との *in vitro* 機能試験での EC_{50} 幾何平均値の比

併用	対照	EC_{50} 値の比（併用対対照）	
		推定値	90%信頼区間
リキシセナチド + 1 µmol/L fc インスリン グラルギン	リキシセナチド	0.940	[0.750; 1.177]
リキシセナチド + 1 nmol/L fc インスリン グラルギン	リキシセナチド	1.035	[0.826; 1.296]
リキシセナチド + 1 pmol/L fc インスリン グラルギン	リキシセナチド	0.992	[0.792; 1.242]
リキシセナチド + 1 fmol/L fc インスリン グラルギン	リキシセナチド	1.143	[0.912; 1.431]
リキシセナチド + 1 amol/L fc インスリン グラルギン	リキシセナチド	0.989	[0.790; 1.239]

対数変換 EC_{50} についての混合モデルであり、実験をランダム効果とみなした。fc: 最終濃度

2.1.5 IR 及び IGF-1R における機能的活性

IR リン酸化及び下流シグナル伝達に対するインスリン グラルギンの作用並びにこれらの作用に対するリキシセナチドの影響の有無を評価するため、種々の試験を実施した。IR 及び IGF-1R リン酸化の検討を、いずれかの受容体を発現させた種々の細胞株を用いて実施した。ヒト IR アイソフォーム B を発現する CHO（CHO-hIR-B）細胞を用いて、INSR における機能的活性を測定した。ヒト IGF-1R を発現させたマウス胚線維芽細胞の 3T3 細胞を用いて、IGF-1R における機能的活性を測定した。受容体下流への影響を評価するため、In-Cell Western 技法を用いてヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 を採取した (1)。

2.1.5.1 IR リン酸化に対する作用

100 nmol/L リキシセナチドの存在下でのインスリン グラルギンの IR 自己リン酸化活性を、CHO-IR-B 細胞を用いて測定した。インスリン グラルギン単独で得られた EC_{50} 値及び 95%信頼区間は 8.741 nmol/L［4.755 ; 16.067］であった。これは 100 nmol/L リキシセナチドの存在下でインスリン グラルギンについて得られた値（9.041 nmol/L［4.889 ; 16.718］）と同程度であった。両者の平均 EC_{50} 値の比及びその 90%信頼区間より、両者に生物学的意義のある差異はないと考えられた。リキシセナチドは、IR 自己リン酸化活性を示さなかった。以上より、リキシセナチドには IR に対する活性はなく、IR に対するインスリン グラルギンの活性にも影響を及ぼさないと結論された（[Module 4.2.1.1-9: DIVT0049][Module 2.6.3.2.2I]）。

2.1.5.2 IGF-1R リン酸化に対する作用

100 nmol/L リキシセナチドの存在下でのインスリン グラルギンの IGF-1R 自己リン酸化活性を、MEF-IGF1R 細胞を用いて測定した。インスリン グラルギン単独で得られた EC_{50} 値及び 95%信頼区間は 166.3 nmol/L［109.7；252.1］であった。これは 100 nmol/L リキシセナチドの存在下でのインスリン グラルギンの EC_{50} 値及び 95%信頼区間（138.7 nmol/L［91.5；210.2］）と同程度であった。インスリン グラルギン単独とインスリン グラルギン+100 nmol/L リキシセナチドとの 90%信頼区間を含む平均 EC_{50} 値の比から、両者に生物学的意義のある差異はないと考えられた。天然リガンド IGF-1 のヒト IGF-1R に対する EC_{50} 値は 9.15 nmol/L［7.423；11.28］であり、同じ細胞株でのインスリン グラルギンの値の約 1/15 であった。リキシセナチドは IGF-1R の自己リン酸化活性を示さなかった。以上、リキシセナチドには IGF-1R に対する活性はなく、IGF-1R に対するインスリン グラルギンの活性にも影響を及ぼさないと結論された（[Module 4.2.1.1-10: DIVT0044][Module 2.6.3.2.2J]）。

2.1.5.3 IR の下流シグナル伝達に対する作用

機能的に活性な IR 及び GLP-1R の両方を発現するラット甲状腺 C 細胞株 6-23 及びヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 を用いて、リキシセナチドの存在下及び非存在下でのインスリン グラルギンの活性を測定した。IR 下流酵素 AKT（pS473）のリン酸化を、それぞれのリガンドによる受容体活性化の指標とした。ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 においては 100 pmol/L リキシセナチドの存在下及び非存在下で、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 においては 10 nmol/L リキシセナチドの存在下及び非存在下で、インスリン グラルギンによる AKT リン酸化を測定した。ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 におけるリキシセナチドの濃度は、本細胞株で最大の GLP-1R 活性化が得られていた 10 nmol/L を用いた（[Module 4.2.1.1-8: DIVT0067][Module 2.6.3.2.2H]）。リキシセナチド単独での AKT リン酸化に対する作用も、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 を用いて検討した。

2.1.5.3.1 ラット細胞株における *in vitro* 活性

100 pmol/L リキシセナチドの存在下又は非存在下でのインスリン グラルギン刺激による AKT リン酸化を、ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 を用いて測定した。インスリン グラルギン単独での EC_{50} 値は 1.035 nmol/L、95%信頼区間は［0.874；1.224］であり、これは 100 pmol/L リキシセナチド存在下での値（1.184 nmol/L［1.001；1.401］）と同程度であった。インスリン グラルギン及びリキシセナチドと対照であるインスリン グラルギン単独の間での 90%信頼区間を含む平均 EC_{50} 値の比には、生物学的意義のある差異はないと考えられた。リキシセナチドは、単独では AKT リン酸化活性を示さなかった。したがって、リキシセナチドにはラット甲状腺 C 細胞株 6-23 において AKT 刺激活性はなく、インスリン グラルギンの活性に対しても影響を及ぼさないと結論された（[Module 4.2.1.1-2: DIVT0056][Module 2.6.3.2.2B]）。

2.1.5.3.2 ヒト細胞株における *in vitro* 活性

ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 において、インスリン グラルギン単独で得られた AKT リン酸化についての EC_{50} 値は、10 nmol/L リキシセナチドの存在下で得られた値と同程度であった。インスリン グラルギンによる AKT リン酸化の EC_{50} 値及び 95%信頼区間は 13.33 nmol/L［11.24；15.80］であったのに対し、10 nmol/L リキシセナチド存在下でのインスリン グラルギンの EC_{50} 値及び 95%信頼区間は 14.79 nmol/L［11.59；18.88］であった。インスリン グラルギン及びリキシセナチドと対照であるインスリン グラルギン単独の間での 90%信頼区間を含む平均 EC_{50} 値の比から、両者に生物学的意義のある差異はないと考えられた。リキシセナチドは、単独では AKT 刺激活性を示さなかった。したがって、リキシセナチドにはヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 における AKT 刺激活性はなく、この酵素に対するインスリン及びインスリンアナログの活性に対しても影響を及ぼさないと結論された（[Module 4.2.1.1-11: DIVT0070][Module 2.6.3.2.2K]）。

2.1.6 *In vitro* での細胞アポトーシスに対する作用

In vitro での催炎症性サイトカイン誘発性アポトーシスに対して、インスリン グラルギンとリキシセナチドの併用が影響を及ぼすか否かをラット甲状腺 C 細胞株 6-23 及びヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 を用いて検討した。リキシセナチド及びインスリン グラルギンの存在下又は非存在下で、それぞれの細胞をサイトカイン（ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 については TNFα、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 細胞の場合には TNFα、IL-β 及び INF-γ の組み合わせ）と共にインキュベートした後、アポトーシスの指標であるカスパーゼ 3/7 活性化を測定した。

2.1.6.1 ラット細胞株のアポトーシスに対する *in vitro* 活性

リキシセナチド、インスリン グラルギン又は両剤の存在下において、ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 を TNFα で処理したときのカスパーゼ 3/7 活性化を評価した。検討した濃度範囲においてリキシセナチド単独で算出された誘導倍率値には、対照値からの用量依存的な変化はないことが明確に示されたことから、GLP-1R がこれらの細胞に発現し（[Module 4.2.1.1-3: DIVT0063][TS 2.6.3.2.2.C]）、cAMP 経路を介してシグナル伝達を行う（[Module 4.2.1.1-7: DIVT0007][TS 2.6.3.2.2.G]）という事実にもかかわらず、本実験条件下では、TNFα を介したアポトーシスシグナル伝達経路の明らかな調節作用は検出されないことが示唆された。インスリン グラルギン単独処理では、1 nmol/L 及び 1 µmol/L の濃度で、カスパーゼ 3/7 シグナルの減少が認められた（表 5）。インスリン グラルギンのこの抗アポトーシス特性は、*in vitro* でみられた本薬の既知の細胞増殖促進作用と一致する。さらに、インスリンのような成長因子を付加すると、種々のアポトーシス経路／刺激が阻害されることが報告されている(2)、(3)、(4)。併用処理においてインスリン グラルギンの 1 nmol/L 及び 1 µmol/L の濃度でみられた弱い抗アポトーシス特性は、インスリン グラルギンの単独処理及びインスリン グラルギンの存在下又は非存在下でのリキシセナチド最低濃度（0.206 fmol/L）処理群で得られた値と同程度であった。したがって、ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 では、催炎症サイトカイン TNFα 処理後において、インスリン グラルギ

ン／リキシセナチド併用による相乗的及び／又は相加的な抗アポトーシス作用は検出されないと結論される（[Module 4.2.1.1-12: DIVT0065][TS 2.6.3.2.2L]）。

表 5 - ラット甲状腺 C 細胞株 6-23 における TNFα によるアポトーシス誘導倍率へのインスリン グラルギン及びリキシセナチドによる変化の概要

誘導倍率（平均値 ± SEM）、n = 10/群					
リキシセナチド	インスリン グラルギン				
	0	1 pmol/L	1 nmol/L	1 µmol/L	0～1 µmol/L (n=40)
0.206 fmol/L	2.149 ± 0.067	2.109 ± 0.098	2.009 ± 0.101	1.898 ±0.110	2.041 ± 0.048
2.06 fmol/L	2.277 ± 0.108	2.274 ± 0.084	2.192 ± 0.089	1.959 ± 0.086	2.175 ± 0.049
20.6 fmol/L	2.340 ± 0.089	2.400 ± 0.095	2.116 ± 0.069	1.978 ± 0.095	2.209 ± 0.050 **
206 fmol/L	2.276 ± 0.102	2.313 ± 0.101	2.153 ± 0.041	1.898 ± 0.049	2.160 ± 0.046
2.06 pmol/L	2.342 ± 0.093	2.351 ± 0.066	2.106 ± 0.050	1.958 ± 0.055	2.189 ± 0.042 *
20.6 pmol/L	2.381 ± 0.080	2.293 ± 0.048	2.220 ± 0.053	2.021 ± 0.055	2.229 ± 0.036 **
206 pmol/L	2.234 ± 0.062	2.215 ± 0.036	2.085 ± 0.057	1.890 ± 0.051	2.106 ± 0.033
2.06 nmol/L	2.169 ± 0.082	2.249 ± 0.061	2.088 ± 0.058	1.835 ± 0.051	2.085 ± 0.040
20.6 nmol/L	2.149 ± 0.038	2.256 ± 0.041	1.993 ± 0.055	1.901 ± 0.069	2.075 ± 0.033
206 nmol/L	1.937 ± 0.054	1.898 ± 0.038	1.807 ± 0.017	1.629 ± 0.039	1.818 ± 0.027 ***
0.206 fmol/L～206 nmol/L (n=100)	2.226 ± 0.027	2.236 ± 0.025	2.077 ± 0.022 ***	1.897 ± 0.023 ***	

* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001：インスリン グラルギン濃度及びリキシセナチド濃度を因子とする 2 元配置 ANOVA をパラメータ誘導倍率に適用し、その後、インスリン グラルギン処理群と対照群（インスリン グラルギン非存在下）の間での Dunnett 検定及びリキシセナチド濃度群と対照群（リキシセナチドの最低濃度 0.206 fmol/L）の間での Dunnett 検定を実施した。

注：本表の点線で区切られた最後の行及び最後の列は、グラルギン及びリキシセナチドそれぞれについての主効果の差を示している。それはグラルギンとリキシセナチドの間の相互作用が有意でないためである（p=0.9979）。

2.1.6.2 ヒト細胞株におけるアポトーシスに対する *in vitro* 活性

TNFα/IL-β 及び INF-γ によるヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 のアポトーシス誘導に対するリキシセナチド及びインスリン グラルギンの単独及び併用による作用を検討した。カスパーゼ 3/7 を測定した後、プレート内対照の生データ値に基づいて阻害率（%I）を求め、IC_{50} 値を算出した。インスリン グラルギンでは、検討したいずれの濃度においても、明らかなカスパーゼ 3/7 活性調節作用は検出されなかったのに対し、リキシセナチドでは、アポトーシス性カスパーゼ経路に対する阻害作用が検出された。インスリン グラルギンの非存在下及び存在下でのリキシセナチドによる作用の IC_{50} 値は測定できなかった。インスリン グラルギンとリキシセナチドの併用では、単独と比較して明らかな違いは認められなかった（表 6）。さらに、リキシセナチド単独での IC_{50} 値をリキシセナチドとインスリン グラルギンの併用での IC_{50} 値で除した比は 1.0 に近く、90%信頼区間は狭かったことから、1.1B4 細胞において、

リキシセナチドの存在下でインスリン グラルギンによるカスパーゼ活性の更なる調節作用（増強又は抑制）はないことが示唆された（表 7）。

表 6 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 におけるリキシセナチド単独又は各濃度のインスリン グラルギンの存在下でのリキシセナチドのアポトーシス抑制作用の幾何平均 IC_{50} 値及び 95%信頼区間

化合物	IC_{50} 幾何平均値 pmol/L	95%信頼区間 pmol/L
リキシセナチド	2.64	［1.84；3.81］ (n=10)
リキシセナチド + 1 pmol/L インスリン グラルギン	2.97	［2.06；4.28］ (n=10)
リキシセナチド + 1 nmol/L インスリン グラルギン	2.89	［2.01；4.16］ (n=10)
リキシセナチド + 1 µmol/L インスリン グラルギン	2.40	［1.66；3.45］ (n=10)

プレートをランダム効果とみなす対数変換 IC_{50} についての混合モデル

表 7 - ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 における各濃度のインスリン グラルギンの存在下でのリキシセナチドとリキシセナチド単独とのアポトーシス抑制作用の比及び 90%信頼区間

併用：	対照：	IC_{50} 値の比（併用対対照）	
		比	90%信頼区間
リキシセナチド + 1 pmol/L インスリン グラルギン	リキシセナチド	1.124	［0.871；1.451］
リキシセナチド + 1 nmol/L インスリン グラルギン	リキシセナチド	1.093	［0.847；1.411］
リキシセナチド + 1 µmol/L インスリン グラルギン	リキシセナチド	0.906	［0.702；1.170］

プレートをランダム効果とみなす対数変換 IC_{50} についての混合モデル

以上のように、リキシセナチドにより、用量依存的なカスパーゼ 3/7 シグナル阻害作用が認められた。リキシセナチドのこの抗アポトーシス特性は、特定の細胞型に GLP-1R を付加すると種々のアポトーシス経路又は刺激が阻害されることを示した過去のいくつかの報告 (5)、(6)、(7)と十分に一致するものであった。リキシセナチド単独での抗アポトーシス活性はインスリン グラルギンと併用処理した場合と同程度であったことから、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 において、リキシセナチドとインスリン グラルギンの併用による相乗的又は相加的な抗アポトーシス作用は検出されないと結論された（[Module 4.2.1.1-13: DIVT0071] [Module 2.6.3.2.2M]）。

2.1.7 *In vitro* 細胞増殖に対する作用

リキシセナチド単独処理又はインスリン グラルギンとの併用処理による細胞増殖活性を、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 を用いて評価した。本細胞は、GLP-1R 及び IR が高発現しているため選択した。細胞

増殖に対する作用は、細胞への ^{14}C-チミジン取込みに対する作用により測定した。遺伝子組換えヒトインスリン及び遺伝子組換えヒト IGF-1 を対照として検討した。

本試験において、リキシセナチド単独では、ヒト膵臓 β 細胞株 1.1B4 における ^{14}C-チミジン取込みを示さなかったため、EC_{50} 値は算出できなかった。対照的に、遺伝子組換えヒト IGF-1 は強力かつ用量依存的な ^{14}C-チミジン取込みを示し、幾何平均 EC_{50} 値 及び 95%信頼区間 は 0.192 nmol/L［0.175；2.12］であった。ヒトインスリン及びインスリン グラルギンも、用量依存的な ^{14}C-チミジン取込みを示し、幾何平均 EC_{50} 値はそれぞれ 9.41 nmol/L［6.38；13.9］及び 0.996 nmol/L［0.808；1.23］であった。同様に、インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用により、インスリン グラルギンと同程度の ^{14}C-チミジン取込みがみられ、幾何平均 EC_{50} 値及び 95%信頼区間は 0.775 nmol/L［0.630；0.953］であった。インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用とインスリン グラルギン単独の間での平均 EC_{50} 値の比及び 90%信頼区間は 0.778［0.611；0.990］であった。インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用とインスリン グラルギン単独との差は生物学的意義がないと考えられた。したがって、インスリン グラルギン単独と比較して、併用により生物学的意義のある細胞増殖促進もしくは抑制効果は示されなかったと結論された（[Module 4.2.1.1-14: DIVT0072] [Module 2.6.3.2.2N]）。

2.2 *In vivo* 活性

インスリン グラルギンとリキシセナチドの併用による抗糖尿病作用を、糖尿病 db/db マウス及び健康で正常血糖値を示すイヌを用いて評価した。

2.2.1 雌 db/db マウスを用いたインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用皮下投与による急性血糖低下作用

夜間に自由摂食させた糖尿病 db/db マウスを用いて、基礎血糖値に対する作用を検討した。2 時間絶食後の試験開始時における基礎血糖値は 20～25 mmol/L の範囲であった。マウスにリキシセナチドを 10 µg/kg の用量で SC 投与若しくはインスリン グラルギンを 5 U/kg の用量で SC 投与、又は両薬剤を併用投与した。いずれにおいても、基礎血糖値は著しく低下した。しかし、インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与はインスリン グラルギン単独より効果的であり、血糖値を正常な生理的レベル近くまで効果的に低下させた。

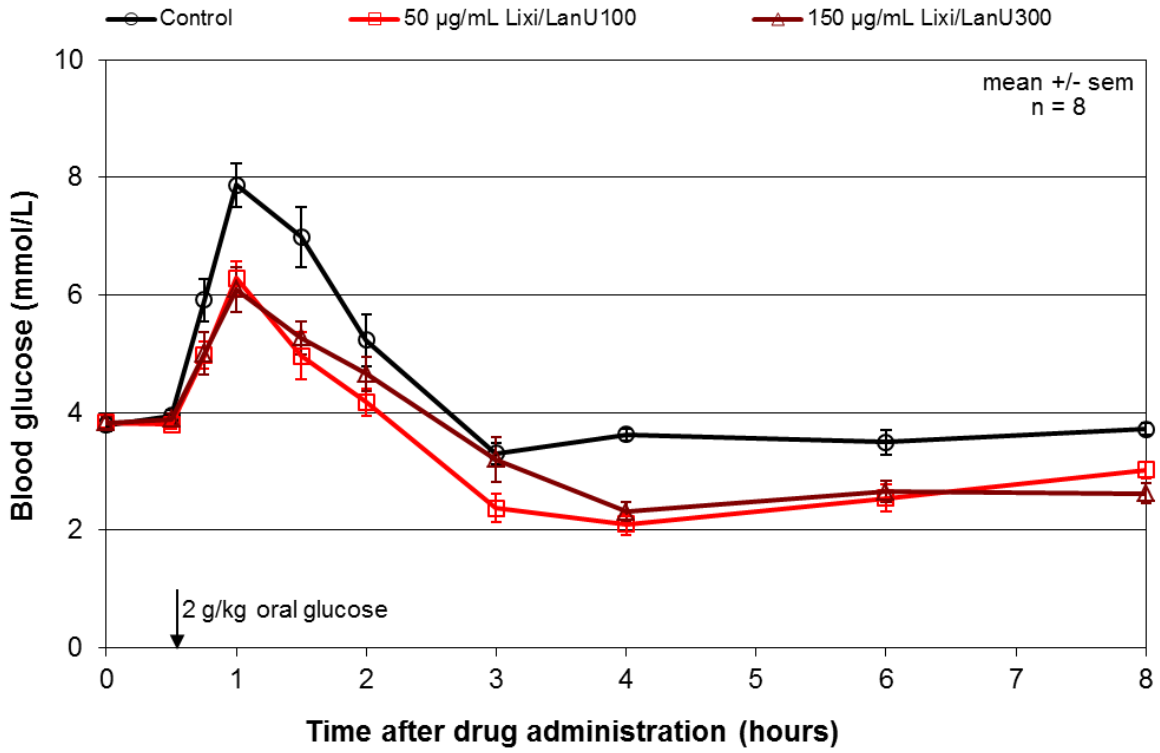
同じ動物モデルを用いて、経口糖負荷試験（OGTT）におけるリキシセナチド、インスリン グラルギン又は両薬剤の併用による有効性を評価した。これらのインスリン耐性の糖尿病マウスにおいて、リキシセナチド（10 µg/kg SC）及びインスリン グラルギン（5 U/kg SC）は、単独投与又は併用投与のいずれにおいても、経口糖負荷誘発性血糖値上昇に対して明らかな効果を示した。インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与は、リキシセナチド及びインスリン グラルギンの単独投与と比較すると、吸収相において明らかにより有効であり（統計学的有意差が最長で 90 分間及び 150 分間みられた）、吸収後相においても、プラセボ対照群よりも低い血糖値を示した。（[Module 4.2.1.1-15: MVV0025] [Module 2.6.3.2.3A]）。

2.2.2 雄イヌの経口耐糖能に対するインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用皮下投与の急性作用

健康で正常血糖値を示すイヌに 2 g/kg のグルコースを経口投与すると、速やかな血糖値上昇がみられ、強制経口投与の 0.5～1 時間後に最高値に到達した（吸収相）後、約 2 時間後にベースライン値に戻る。リキシセナチドを 0.5 µg/kg 以上の用量で単回 SC 投与された動物では、吸収相における血糖値上昇が有意に抑制されたが、下降後もベースラインを下回る値にまでは低下しなかった。対照的に、インスリン グラルギンをイヌに投与したところ、OGTT の吸収相では血糖値上昇に対する明らかな影響はみられなかったが、吸収後相の血糖値は対照群を明らかに下回った。リキシセナチドとインスリン グラルギンの併用投与では、血糖値低下が OGTT の吸収相及び吸収後相の両方でみられ、同用量のリキシセナチド及びインスリン グラルギンで得られた効果と比較すると、それぞれ最長 6.5 時間及び最長 4.5 時間にわたって統計学的有意差が認められた。しかし、吸収後相後期にはインスリン グラルギンの効果のみが認められ、リキシセナチドの存在下と非存在下でインスリン グラルギン投与後の血糖値に差はみられなかった。したがって、両薬剤を 1 つの製剤として投与したとき、それぞれの薬剤の力価は維持されたことから、インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤の効果は、少なくともリキシセナチド及びインスリン グラルギン単独投与の効果を補完するものと結論される。併用投与により、リキシセナチドの最も顕著な効果がみられた OGTT の吸収相では、両薬剤の単独投与の相加よりも強力な効果がみられ、吸収後相においては、低血糖誘発のリスク増加を伴わないインスリン グラルギンの持続的な血糖低下作用が維持された（[Module 4.2.1.1-16: MVV0026] [Module 2.6.3.2.3B]）。

イヌを用いた別の OGTT 試験において、低用量（0.15 µg/kg SC）のリキシセナチドを、異なる 2 つの濃度（100 U/mL 及び 300 U/mL）のインスリン グラルギン（0.3 U/kg SC）と併用投与した。比較のため、等用量のリキシセナチド及びインスリン グラルギン（100 U/mL）を、いずれも単独投与した。対照群では、グルコース強制経口投与の 0.5 時間後に速やかな血糖値上昇がみられ、1 時間でピークに達した（吸収相）後、約 3 時間で緩やかにベースラインに戻った。対照群におけるその後の吸収後相では、正常血糖値が実験終了（8 時間）まで持続した。0.15 µg/kg のリキシセナチドを投与したところ、1 時間後の血糖値上昇が明らかに抑制されたが、1.5～8 時間後には、対照値との間に有意差は認められなかった。対照的に、0.3 U/kg インスリン グラルギン（100 U/mL）の単独投与では、吸収後相（4～8 時間）において対照群と比較した有意な血糖値低下がみられ、3 時間の時点で既に有意差の閾値に近かった。リキシセナチドとインスリン グラルギンを併用すると、血糖値に対する併用効果がみられ、吸収相にはリキシセナチドと類似した効果が、吸収後相にはインスリン グラルギンと類似した効果が、それぞれ認められた。インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与では、吸収後相におけるインスリン グラルギンの血糖値に対する効果は増強されなかったことから、低血糖のリスクは増加しない。2 つの濃度のインスリン グラルギンを併用投与に使用したところ、特異的な違いがみられたが、これはU100と比較したU300における持続時間の改善を反映したものである（図 1）（[Module 4.2.1.1-17: DIVV0050] [Module 2.6.3.2.3C]）。

図 1 - 雄イヌの経口耐糖能に対するリキシセナチド（0.15 µg/kg SC）とインスリン グラルギン（0.3 U/kg SC）の 2 製剤（U100 及び U300）の併用投与による作用



3　副次的薬理試験

インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤については、副次的薬理試験は実施しなかった。

4 安全性薬理試験

個々の化合物（リキシセナチド又はインスリン グラルギン）についてフルパッケージの安全性薬理試験（若しくは一般薬理試験）プログラムが実施されている（[Module1.13.1-2] [Module1.13.1-4]）。これらの安全性薬理試験のコアバッテリー試験においては、非臨床データにおいてヒトへの特段のハザードは認められなかった。配合剤については、フルパッケージの試験は実施せず、リキシセナチドとインスリン グラルギンの併用静脈内（IV）投与による ECG パラメータ（特に QT 間隔持続時間）並びに血糖及び血中カリウムへの影響の有無を、麻酔イヌを用いて評価した。

4.1 心血管系

4.1.1 インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与－麻酔下イヌの心血管系機能に対する単回静脈内投与の影響

リキシセナチドとインスリン グラルギンとを併用したときの影響を検討するために、麻酔した雄イヌに、リキシセナチドを単独又はインスリン グラルギンとの併用で30分間点滴静脈内投与した（[Module 4.2.1.3-1: CRV0345] [Module 2.6.3.4.2]）。インスリン グラルギンは急速静脈内投与した。試験の概要を下の表 8に示す。

表 8 -麻酔イヌの心血管系機能に及ぼすインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用単回静脈内投与の影響：試験概要

投与群コード	動物数／群	初回投与：リキシセナチド又は溶媒	2 回目投与：インスリン グラルギン又は溶媒	リキシセナチドの用量 (µg/kg)	インスリン グラルギンの用量 (U/kg)
G1	8	溶媒	溶媒	0	0
G2	8	リキシセナチド	溶媒	10	0
G3	8	溶媒	インスリン グラルギン	0	0.1
G4	8	リキシセナチド	インスリン グラルギン	10	0.1

心拍数（HR）、心電図（ECG）パラメータ［PQ 及び QT 間隔、QRS 時間並びに Fridericia 及び Van de Water の式により HR 変動で補正した QT 間隔（QTcF 及び QTcW）］、血清中グルコース及びカリウム濃度並びに体温を測定した。ECG については、調律及び波形の異常を検討した。リキシセナチド及びインスリン グラルギンの曝露量を評価するために血液検体を採取した。

リキシセナチド及びインスリン グラルギンのそれぞれの溶媒には作用は認められなかった。本試験において死亡例や一般状態の変化は認められなかった。溶媒対照群を含むすべての実験群で、実験を通して規則的な体温上昇が認められた。

試験結果の要約を表 9に示す。リキシセナチドの 10 µg/kg を投与すると、中等度ながら統計学的に有意な血清グルコース濃度の低下、点滴中及び点滴終了時の軽度ながら有意な心拍数の増加、点滴中における心拍数増加に関連した軽微ながら有意な PQ 間隔短縮が認められた。カリウム濃度、体温、QRS 時間及び QT 間隔（補正の有無に関わらず）には影響は認められなかった。

インスリン グラルギンの 0.1 U/kg を投与すると、血清グルコース及び血清カリウム濃度の有意な減少、心拍数の有意な増加及び QT 間隔（補正に関わらず）の有意な延長が認められた。投与後 15～90 分及び 15～60 分において、それぞれ QTcF 及び QTcW への有意な影響が持続的に認められ、可逆性の ECG の変化（ST 分節の軽微な上昇、T 波の形態及び振幅の変化）は投与後 60 分まで認められた。PQ 間隔及び QRS 時間の影響は認められなかった。

リキシセナチド投与後にインスリン グラルギンを併用することにより、血清グルコース濃度及び血清カリウム濃度の有意な低下、HR の有意な増加、投与後 60 分まで認められる可逆性の ECG の変化（ST 部分の軽微な上昇、T 波の形態及び振幅の変化）及び QT 間隔（補正の有無に関わらず）の延長が認められた。投与後の 15～90 分及び 15～60 分において、それぞれ QTcF 及び QTcW への有意な影響が持続的に認められた。PQ 間隔及び QRS 時間に影響は認められなかった。

表 9 -麻酔イヌの心血管系機能に及ぼすインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用単回静脈内投与の影響：結果の要約

パラメータ	リキシセナチド	インスリン グラルギン	併用：リキシセナチド/インスリン グラルギン
心拍数	+ 5 ± 1.6 bpm [a]	+15 ± 5.2 bpm [b]	+16 ± 5.3 bpm [b]
QT 間隔	変化なし	+15 ± 4.5 ms [c]	+ 15 ± 4.5 ms [c]
QTcF 間隔	変化なし	+ 23 ± 3.5 ms [c]	+26 ± 3.5 ms [c]
QTcW 間隔	変化なし	+17 ± 3.2 ms [c]	+ 19 ± 3.2 ms [c]
血清中グルコース濃度	-1.43 ± 0.22 mmol/L [d]	-3.69 ± 0.32 mmol/L [e]	-3.78 ± 0.32 mmol/L [e]
血清中カリウム濃度	リキシセナチド関連の変化なし	-1.0 ± 0.25 mmol/L [c]	-1.1 ± 0.25 mmol/L [c]

a-点滴中；b-急速投与 45 分後；c-急速投与 15 分後；d-点滴終了時；e-急速投与 30 分後

クロスオーバー法に従って麻酔下の雄イヌを用いて実施した本実験的条件下において、リキシセナチド 10 µg/kg（30 分間点滴静脈内投与）とインスリン グラルギン 0.1 U/kg（急速静脈内投与）との併用投与は、インスリン グラルギン単独でみられた影響に変化を与えることはなかった。すなわち、QT 間隔（補正の有無に関わらず）の延長及び T 波の形態変化を伴う最大の血清グルコース濃度及び血清カリウム濃度低下作用は同程度であった。インスリン グラルギン投与後にみられた ECG の形態変化は、併用により変化しなかった。これらの影響は血清カリウム濃度の変化に関連していると考えられた。

試験を通して、インスリン グラルギン血清中濃度及びリキシセナチド血漿中濃度を測定した。

インスリン グラルギン投与群の全例で、急速静脈内投与の 15 分後にインスリン グラルギンへの曝露が認められた。急速静脈内投与 60 分後に、インスリン グラルギン血清中濃度は LLOQ に近いレベルに減少したが、例外として第 4 群の 2 匹の動物では、投与終了の 60 分後にインスリン グラルギン濃度の高値又は増加が認められた。

リキシセナチド投与群の全例で､30 分間の点滴静注終了時にリキシセナチドへの曝露が認められた。リキシセナチド静脈内投与終了の 15 及び 60 分後においても、引き続き高い血漿中濃度がみられた。

5　薬力学的薬物相互作用試験

インスリン グラルギン／リキシセナチド配合剤については、薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。

6　考察及び結論

ヒト膵臓β細胞株 1.1B4 を用いた *in vitro* 試験の結果、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 グラルギンの間での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活性は、併用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更なるリスクはないと考えられる。

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、いずれかの薬剤の単独投与と比較しても、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、糖尿病マウスの基礎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。既に確認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、リキシセナチドにより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 グラルギンとリキシセナチドとの配合剤の補完的作用が示唆された。このようにインスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用投与は有効性がより高いにもかかわらず、低血糖傾向の徴候は認められなかった。

インスリン グラルギンとリキシセナチドとの併用静脈内投与による心血管系安全性試験を、麻酔下イヌモデルを用いて実施した。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同程度の血漿中カリウムの変化が認められた。したがって、両化合物を併用投与した場合、個々の化合物の投与と比較して、更なるリスクは認められなかった。

参 考 文 献

1. Baus D, Heermeier K, De Hoop M, Metz-Weidmann C, Gassenhuber J, Dittrich W, et al. Identification of a novel AS160 splice variant that regulates GLUT4 translocation and glucose-uptake in rat muscle cells. Cell Signal. 2008;20(12):2237-46.
2. 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.
3. Kang S, Song J, Kang H, Kim S, Lee Y, Park D. Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase- and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. Eur J Endocrinol. 2003;148(1):147-55.
4. Iida KT, Suzuki H, Sone H, Shimano H, Toyoshima H, Yatoh S, et al. Insulin Inhibits Apoptosis of Macrophage Cell Line, THP-1 Cells, via Phosphatidylinositol-3-Kinase–Dependent Pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:380-6.
5. Asmar M, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: new advances. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2010;17:57-62.
6. Park SH, Park JH, Shim HM, Na AY, Bae KC, Lim JG, et al. Protection of pancreatic β-cells against glucotoxicity by short-term treatment with GLP-1, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015;459: 561-7.
7. Li L, El-Kholy W, Rhodes CJ, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B. Diabetologia. 2005;48(7):1339-49.

サノフィ株式会社

HOE901/AVE0010

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 50

目　　次

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 10

3　　副次的薬理試験 44

4　　安全性薬理試験 45

5　　薬力学的薬物相互作用試験 50

表　目　次

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program 4
表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings 10
表 2.6.3.2.2A - Primary pharmacodynamics - in vitro 18
表 2.6.3.2.2B - Primary pharmacodynamics - in vitro 19
表 2.6.3.2.2C - Primary pharmacodynamics - in vitro 21
表 2.6.3.2.2D - Primary pharmacodynamics - in vitro 22
表 2.6.3.2.2E - Primary pharmacodynamics - in vitro 23
表 2.6.3.2.2F - Primary pharmacodynamics - in vitro 24
表 2.6.3.2.2G - Primary pharmacodynamics - in vitro 26
表 2.6.3.2.2H - Primary pharmacodynamics - in vitro 27
表 2.6.3.2.2I - Primary pharmacodynamics - in vitro 28
表 2.6.3.2.2J - Primary pharmacodynamics - in vitro 30
表 2.6.3.2.2K - Primary pharmacodynamics - in vitro 32
表 2.6.3.2.2L - Primary pharmacodynamics - in vitro 34
表 2.6.3.2.2M - Primary pharmacodynamics - in vitro 35
表 2.6.3.2.2N - Primary pharmacodynamics - in vitro 37
表 2.6.3.2.3A - Primary pharmacodynamics - in vivo 39
表 2.6.3.2.3B - Primary pharmacodynamics - in vivo 40
表 2.6.3.2.3C - Primary pharmacodynamics - in vivo 42
表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology overview – noteworthy findings 46
表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - hemodynamic, electrocardiography (dog) 47

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics					
In vitro potencies of lixisenatide and insulin glargine, as well as combinations thereof, in a cellular assay system for cAMP formation	Rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23 (clone 6)	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0064]	4.2.1.1-1
Characterization of insulin glargine and lixisenatide stimulated AKT phosphorylation in RTC6-23 cells	Rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0056]	4.2.1.1-2
Identification of human cell lines that commonly express GLP-1R, INSR and IGF-1R to use these lines for further functional tests	Cell lines 1.1B4, 6-23 and TT	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0063]	4.2.1.1-3
Evaluation of binding affinity of lixisenatide to the GLP-1 receptor	CHO-K1 cells transfected with human GLP-1 receptor	In vitro	[redacted] Taiwan	[MVT0010] [MVT0010EXT]	4.2.1.1-4 4.2.1.1-4a

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics (continued)					
Evaluation of binding affinity of insulin glargine to the GLP-1 receptor	Beta-TC6 cells of murine origin	In vitro	[redacted] France	[DIVT0068-abbr] [DIVT0068]	4.2.1.1-5 4.2.1.1-5a
Evaluation of binding affinity of lixisenatide and insulin glargine to the human insulin receptor subtype B (IR-B)	CHO-hIR-B cells	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Research and Translational Medicine Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0057]	4.2.1.1-6
Effects of the GLP-1R agonists GLP-1(7-36) amide, lixisenatide, exendin-4 and liraglutide on intracellular cAMP formation	rat thyroid C-cell line 6-23 and human cell line TT	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Candidate Identification Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0007]	4.2.1.1-7
In vitro potencies of glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) agonist lixisenatide and insulin analog insulin glargine, as well as combinations thereof	human pancreatic beta-cell line 1.1 B4	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0067]	4.2.1.1-8

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics (continued)					
Influence of lixisenatide on insulin glargine stimulated Insulin Receptor autophosphorylation	CHO-hIR-B cells	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0049]	4.2.1.1-9
IGF-1R autophosphorylation activity of insulin glargine in the presence of 100 nM lixisenatide	MEF-IGF1R cells	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0044]	4.2.1.1-10
Characterization of insulin glargine (HOE901) and lixisenatide (AVE0010) stimulated AKT-phosphorylation	human 1.1B4 cell line	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0070]	4.2.1.1-11
Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on the process of apoptosis	Rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0065]	4.2.1.1-12

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics (continued)					
Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on the process of apoptosis	Human pancreatic beta cell line 1.1 B4s	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0071]	4.2.1.1-13
Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on cell proliferation	Human pancreatic beta cell line 1.1B4	In vitro	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVT0072]	4.2.1.1-14
Antidiabetic effects of insulin glargine in combination with lixisenatide	Mouse (db/db)	Subcutaneous	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH TD Metabolism, Pharmacology Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[MVV0025]	4.2.1.1-15
Antidiabetic effects of insulin glargine in combination with lixisenatide	Dog (Beagle)	Subcutaneous	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH TD Metabolism, Pharmacology Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[MVV0026]	4.2.1.1-16

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Primary Pharmacodynamics (continued)					
Antidiabetic effects of insulin glargine in combination with lixisenatide	Dog (Beagle)	Subcutaneous	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH R&D Diabetes Division Industriepark Höchst D-65926 Frankfurt am Main Germany	[DIVV0050]	4.2.1.1-17
Secondary Pharmacodynamics					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					
Safety Pharmacology					
Central Nervous System					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					
Cardiovascular in vitro					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					
Cardiovascular in vivo					
Effect of a single intravenous dose on cardiovascular function in anesthetized dogs	Dogs (Beagle)	Intravenous	sanofi-aventis recherche & développement Groupe sanofi-aventis Drug Safety Evaluation 3 digue d'Alfortville 94140 Alfortville France	[CVR0345]	4.2.1.3-1
Respiratory system					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary - overview - study program (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Renal system					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					
Autonomic nervous system					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					
Safety Pharmacology					
Gastrointestinal system					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					
Pharmacodynamic Drug Interactions					
No studies were performed with the insulin glargine / lixisenatide combination product.					

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
In vitro potencies of lixisenatide and insulin glargine, as well as combinations thereof, in a cellular assay system for cAMP formation	Rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23 (clone 6)	In vitro	10^{-12} µM to 6.12 µM		Insulin glargine does not show functional activity at the rat GLP-1R when administered alone but did not influence the agonistic effect of lixisenatide when co-administered with lixisenatide.	[DIVT0064]	4.2.1.1-1
Characterization of insulin glargine and lixisenatide stimulated AKT phosphorylation in RTC6-23 cells	Rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23	In vitro	Varying molar concentration ranges		In rat RTC6-23 cells the EC50 value for insulin glargine stimulated AKT phosphorylation was 1.035 nM. Lixisenatide did not show functional activity at the rat IR when administered alone but did not influence the agonistic effect of insulin glargine when co-administered with insulin glargine.	[DIVT0056]	4.2.1.1-2
Identification of human cell lines that commonly express GLP-1R, INSR and IGF-1R to use these lines for further functional tests	Cell lines 1.1B4, 6-23 and TT	In vitro	None		The human pancreatic cell line 1.1B4 was identified to simultaneously express mRNA of GLP-1R, IGF1R and INSR.	[DIVT0063]	4.2.1.1-3

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Evaluation of binding affinity of lixisenatide to the GLP-1 receptor	CHO-K1 cells transfected with human GLP-1 receptor	In vitro	0.1 nM – 10 µM		Lixisenatide was proven to be a potent ligand of the human GLP-1R with an IC50 value of 1.43 nM.	[MVT0010] [MVT0010EXT]	4.2.1.1-4 4.2.1.1-4a
Evaluation of binding affinity of insulin glargine to the GLP-1 receptor	Beta-TC6 cells of murine origin	In vitro	100 nM		At the tested concentration of 100 nM insulin glargine has no affinity to the GLP-1R.	[DIVT0068-abbr] [DIVT0068]	4.2.1.1-5 4.2.1.1-5a
Evaluation of binding affinity of lixisenatide and insulin glargine to the human insulin receptor subtype B (IR-B)	CHO-hIR-B cells	In vitro	Varying molar concentration ranges		Insulin glargine has high affinity for the human IR-B (IC50= 1.116 nM) while lixisenatide neither possesses binding affinity to IR-B nor influences the affinity of insulin glargine to the IR-B.	[DIVT0057]	4.2.1.1-6
Effects of the GLP-1R agonists GLP-1(7-36) amide, lixisenatide, exendin-4 and liraglutide on intracellular cAMP formation	rat thyroid C-cell line 6-23 and human cell line TT	In vitro	0.1-1000000 pM		In the rat C-cell line 6-23 there was strong signaling through the GLP-1R by the four GLP-1R agonists GLP-1(7-36) amide, lixisenatide, exendin-4 and liraglutide while GLP-1R activation was weak in the human C-cell line TT.	[DIVT0007]	4.2.1.1-7

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
In vitro potencies of glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) agonist lixisenatide and insulin analog insulin glargine, as well as combinations thereof	human pancreatic beta-cell line 1.1 B4	In vitro	10^{-12} µM to 6.12 µM		Lixisenatide showed potent activation (EC50= 7.2 pM) of the human GLP-1R. In contrast, insulin glargine does not show functional activity at the human GLP-1R when administered alone but did not influence the agonistic effect of lixisenatide when both were co-administered.	[DIVT0067]	4.2.1.1-8
Influence of lixisenatide on insulin glargine stimulated Insulin receptor (IR) autophosphorylation	CHO-hIR-B cells	In vitro	Varying molar concentration ranges		Insulin glargine showed potent stimulation of autophosphorylation (EC50= 8.741 nM) in CHO cells expressing the human IR-B. In contrast, lixisenatide did not show functional activity at the human IR when administered alone but did not influence receptor phosphorylation by insulin glargine when both were co-administered.	[DIVT0049]	4.2.1.1-9
IGF-1R autophosphorylation activity of insulin glargine in the presence of 100 nM lixisenatide	MEF-IGF1R cells	In vitro	Varying molar concentration ranges		The EC50 value for insulin glargine alone at the IGF-1R was 166.3 nM and thereby ~15x higher than that of human IGF-1. Lixisenatide did not show stimulatory activity of the autophosphorylation of the IGF1 receptor nor it influence the activity of insulin glargine on IGF1R.	[DIVT0044]	4.2.1.1-10

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Characterization of insulin glargine (HOE901) and lixisenatide (AVE0010) stimulated AKT-phosphorylation	human 1.1B4 cell line	In vitro	Varying molar concentration ranges		In human 1.1B4 cells the EC50 value for insulin glargine stimulated AKT phosphorylation was 13.33 nM. Lixisenatide did not show functional activity at the human IR when administered alone but did not influence the agonistic effect of insulin glargine when co-administered with insulin glargine	[DIVT0070]	4.2.1.1-11
Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on the process of apoptosis	Rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23	In vitro	Insulin Glargine (1pM, 1nM, 1µM) Lixisenatide (206nM, 20.6nM, 2.06nM. 206pM, 20.6pM, 2.06pM, 206fM, 20.6fM, 2.06fM, 0.206fM)		With insulin glargine alone a reduction of caspase 3/7 could be observed at concentrations of 1 nM and 1 µM while with lixisenatide alone no relevant modulation of the TNF alpha mediated apoptotic signaling pathway could be detected in rat RTC6-23 cells. No synergistic and/or additive anti-apoptotic effect of the insulin glargine/lixisenatide combination was detectable.	[DIVT0065]	4.2.1.1-12
Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on the process of apoptosis	Human pancreatic beta cell line 1.1 B4s	In vitro	Insulin glargine (1pM, 1nM, 1µM) Lixisenatide (206nM, 20.6nM, 2.06nM, 206pM, 20.6pM, 2.06pM, 206fM, 20.6fM 2.06fM)		In human 1.1B4 cells a a dose dependent inhibition of the caspase 3/7 signal could be observed with lixisenatide (EC50=2.64 pM) but no synergistic and/or additive anti-apoptotic effect for the combination of lixisenatide and insulin glargine was detected.	[DIVT0071]	4.2.1.1-13

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on cell proliferation	Human pancreatic beta cell line 1.1B4	In vitro	Human insulin 100pM to 3000nM Insulin glargine 100pM to 3000nM. Lixisenatide 70pM to 1200nM IGF1 10pM to 300nM		IGF1 showed potent mitogenic activitiy (EC50=0.193 nM) in human 1.1B4 cells. It is low with human insulin (EC50=9.41 nM) and moderate with insulin glargine (EC50= 0.996 nM). Lixisenatde did not show 14C-thymidine incorporation in this study. The insulin glargine /lixisenatide combination does not exhibit any biologically relevant deviations in the mitogenic activity in comparison to insulin glargine alone, under the reported experimental conditions.	[DIVT0072]	4.2.1.1-14

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Antidiabetic effects of insulin glargine in combination with lixisenatide	Mouse (db/db)	Subcutaneous	10 µg/kg AVE0010, 5 U/kg insulin glargine	10 (F)	When diabetic db/db mice received either 10 µg/kg SC lixisenatide, 5 U/kg SC insulin glargine, or a combination of both, the lixisenatide/insulin glargine combination was more effective than insulin glargine alone and effectively decreased blood glucose close to normal physiological values. In an OGTT treatment with the insulin glargine/lixisenatide combination was significantly more efficacious versus lixisenatide and insulin glargine alone during the absorptive phase and further reduced blood glucose during the postabsorptive phase compared to placebo-treated control mice.	[MVV0025]	4.2.1.1-15

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Antidiabetic effects of insulin glargine in combination with lixisenatide	Dog (Beagle)	Subcutaneous	AVE0010 (0.5 and 1.0µg/kg), insulin glargine (1.0U/kg), AVE0010/insulin glargine combination (0.15 µg/kg/0.3 U/kg, 0.5 µg/kg/0.3 U/kg, 1.0 µg/kg/0.3 U/kg, 1.5 µg/kg/0.3 U/kg and 1.0 µg/kg/1.0 U/kg)	6-17 (M)	When lixisenatide and insulin glargine were injected in combination there was a decrease of blood glucose levels during both the absorptive and postabsorptive phases of the OGTT when compared to the effects obtained by same doses of lixisenatide or insulin glargine. However, during the later postabsorptive phase when only insulin glargine's effect was present there was no difference in blood glucose between glargine in the presence or absence of lixisenatide. It could therefore be concluded that the effects of an insulin glargine/ lixisenatide combination are at least complementary to the effects of lixisenatide and insulin glargine monotherapy because the strengths of both drugs were preserved when injected as one formulation. It could further be concluded that during the absorptive phase of the OGTT, when lixisenatide has its most prominent effect, there was a stronger activity of the combination compared to the added effects of both as monotherapy while thereafter, in the postabsorptive phase, the sustained blood glucose lowering effect of insulin glargine was preserved without increasing the risk of inducing hypoglycemia.	[MVV0026]	4.2.1.1-16

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test Article: insulin glargine/lixisenatide

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	Study Number	Location
Antidiabetic effects of insulin glargine in combination with lixisenatide	Dog (Beagle)	Subcutaneous	insulin glargine (0.3 U/kg SC)/ lixisenatide (0.15 µg/kg SC)	6-8 (M)	In an OGTT in dogs low dose of lixisenatide (0.15 µg/kg SC) was combined with 0.3 U/kg SC insulin glargine injected at two different strengths (100 U/mL and 300 U/mL). Treatment with 0.15 µg/kg lixisenatide significantly diminished blood glucose excursion at 1h but levels were no longer significantly different to control values from 1.5h to 8h. In contrast, treatment with 0.3 U/kg insulin glargine (100 U/mL) alone showed significant blood glucose reduction versus control only during the postabsorptive phase (4h to 8h) and being already close to significance threshold at 3h. The mixture of lixisenatide and insulin glargine showed combined effects on blood glucose which were similar to that of lixisenatide alone during the absorptive phase and as insulin glargine in the postabsorptive phase. The lixisenatide/insulin glargine combination did not increase insulin glargine's effect on blood glucose during the postabsorptive phase and thereby not increase its hypo-glycemia risk. Specific differences between the two strengths of insulin glargine in combination could be observed reflecting the improved long-term performance of the 300 U/mL compared to the 100 U/mL formulation.	[DIVV0050]	4.2.1.1-17

表 2.6.3.2.2A - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: In vitro potency of insulin glargine, lixisenatide, as well as mixtures thereof in the rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23 (clone 6)		
Test: Determination of agonist-induced cAMP formation in the rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23 (clone 6)	**Test Article (batch):** (1) Lixisenatide / AVE0010 ([redacted]) (2) Insulin Glargine / Lantus [redacted]	**Location in CTD:** 4.2.1.1-1
Test system: HTRF assay with a kit from CISBIO Corp.	**Vehicle:** Assay buffer / IBMX	**Study No.:** [DIVT0064]
No. of Preparations/Group: Every individual experiment was performed in a 96-well plate format and carried out using serial diluted concentrations of test compound in triple determination	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]20[redacted] to [redacted]20[redacted]	**Concentration:** 10^{-12} µM to 6.12 µM	**GLP Compliance:** Not required
Brief overview: A functional assay for agonist-induced intracellular cAMP formation in the rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23 (clone 6) was applied to elucidate in vitro potency of compounds insulin glargine and lixisenatide individually, as well as in combination.		
Other Protocol Information:		
Statistics: For each dose-response-curve from a 96-well plate, EC50 values were calculated using the 4- parameter logistic model according to Ratkovsky and Reedy (1986). The adjustment was obtained by non-linear regression using the Levenberg-Marquardt algorithm in SAS v9.1.3 software via the in-house software Biost@t-Speed v2.0 LTS.		
Results: Concerning insulin glargine alone, no cAMP response was detectable across a wide range of concentrations of the compound and it was therefore considered to be inactive towards cAMP signaling in this cell line. In contrast, lixisenatide alone was found to be highly potent in the same assay, yielding an EC50 value in the lower picomolar range. Measuring dose-response relationship of lixisenatide in presence of different fixed concentrations of insulin glargine indicated no relevant change in dose-response up to 1 nM of insulin glargine. At 1 µM of insulin glargine (the highest concentration applied), a slight synergism between AVE0010 and insulin glargine became apparent.		
Conclusion: There seems to be no interference between lixisenatide and insulin glargine at the level of cAMP signaling in the rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23 (clone 6) up to a concentration of 1 nM of insulin glargine. At higher insulin concentrations, a synergism in intracellular signaling might however occur in this in vitro cellular model.		

Abbreviations: cAMP: cyclic adenosine monophosphate

表 2.6.3.2.2B - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Characterization of Insulin Glargine and LIXISENATIDE stimulated AKT-phosphorylation in RTC6-23 cells		
Test: Analysis of the serine phosphorylation (pS473) of AKT using in-cell western technology	**Test Article (batch):** Insulin (batch [redacted]) Insulin Glargine (batch [redacted]) Insulin Glargine-M1 (batch [redacted]) Lixisenatide (batch [redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-2
Test system: cell-based assay	**Vehicle:** PBS buffer	**Study No.:** [DIVT0056]
No. of Preparations/Group: In every individual experiment performed in a 96-well plate 8 wells / plate served as a blank and a low control respectively. Every individual experiment performed in a 96-well plate was carried out using 10 concentrations of a test compound alone or in combination (if indicated) in duplicate to sextuplicate determination. One to three plates were used on each experimental day.	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Varying molar concentration ranges	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: For each experiment, EC50 values were obtained using the 4-parameter logistic model according to Ratkowsky and Reedy without constraints. The adjustment was obtained by non linear regression using the Levenberg Marquardt algorithm in SAS release 9.1.3 under HP-UX via Biost@t-Speed V2.0 LTS internal application. Separate mixed models were applied for each mono treatment and the corresponding combination with 100 pM LIXISENATIDE on log-transformed EC50 values with plate considered as random effect using SAS v9.2 on Windows 7. Geometric means of the EC50 values and their respective 95% confidence intervals were calculated via the anti-log transformation. To quantify the difference of the in vitro activities between insulin + lixisenatide, insulin glargine + lixisenatide and insulin glargine M1 + lixisenatide and the reference insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 alone, the difference in means of the log-transformed EC50 values with 90% confidence interval were determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation.		
Results:		
Geometric mean EC50 values [nM] with 95% confidence intervals for the activity on AKT phosphorylation of LIXISENATIDE and of mono treatments with insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 and the respective combinations with 100 pM LIXISENATIDE		

表 2.6.3.2.2B - Primary pharmacodynamics - in vitro (continued)

Title: Characterization of Insulin Glargine and LIXISENATIDE stimulated AKT-phosphorylation in RTC6-23 cells		
Compound	**EC_{50} geometric mean [nM]**	**95% confidence interval [nM]**
LIXISENATIDE (batch [redacted])	-	- (n=3)
Insulin (batch [redacted])	0.709	[0.504; 0.995] (n=11)
Insulin + 100 pM LIXISENATIDE	0.704	[0.495; 1.002] (n=8)
Insulin glargine (batch [redacted])	1.035	[0.874; 1.224] (n=8)
Insulin glargine + 100 pM LIXISENATIDE	1.184	[1.001; 1.401] (n=8)
Insulin Glargine M1 (batch [redacted])	1.120	[0.946; 1.326] (n=7)
Insulin glargine M1 + 100 pM LIXISENATIDE	1.291	[1.090; 1.528] (n=7)
Separate mixed model for each mono treatment and corresponding combination on log-transformed EC_{50} with plate considered as random effect		
Conclusion: AKT phosphorylation stimulated by insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 in absence or presence of 100 pM lixisenatide was determined using RTC6-23 cells. The EC50 values obtained for insulin (batch [redacted]), insulin glargine (batch [redacted]) and Insulin Glargine-M1 (batch [redacted]) were comparable to that observed in the presence of 100pM lixisenatide (batch [redacted]). Whereas the EC50 value for insulin could be determined with 0.709 nM [0.504 ; 0.995]] (n=11), in the presence of lixisenatide the EC50 value was 0.704 nM [0.495 ; 1.002] (n=8). The EC50 value for insulin glargine stimulated AKT phosphorylation was 1.035nM [0.874 ; 1.224] (n=8), stimulation with insulin glargine + 100 pM lixisenatide resulted in an EC50 value of 1.184nM [1.001 ; 1.401] (n=8). For insulin glargine M1 an EC50 value of 1.120nM [0.946 ; 1.326] (n=7) could be measured, which was comparable to that of insulin glargine M1 + lixisenatide ((1.291nM [1.090 ; 1.528] (n=7)). The ratio of mean EC50 values including the 90% confidence interval between insulin + lixisenatide, insulin glargine + lixisenatide and insulin glargine M1 + lixisenatide and the reference insulin, insulin glargine and insulin glargine M1, respectively, was considered to be within a range of biologically irrelevant deviations from nominal. Lixisenatide alone did not show a stimulatory activity of the AKT phosphorylation. Therefore it can be concluded that lixisenatide possesses neither an AKT stimulatory activity in RTC6-23 cells nor does it influence the activity of insulin and insulin analogs		

表 2.6.3.2.2C - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Expression of GLP1R, IGF1R and INSR mRNA in cell lines 1.1B4, 6-23 and TT		
Test: mRNA expression determination	**Test Article (batch):** None	**Location in CTD:** 4.2.1.1-3
Test system: Cell lines 1.1B4, 6-23 and TT	**Vehicle:** None	**Study No.:** [DIVT0063]
No. of Preparations/Group: 3	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** None	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information: None		
Statistics: None		
Results: From the cell lines 1.1B4, 6-23, B-CPAP, BHT-101, CAL-62, CGTH-W-1, ML-1, ONCO-DG-1, S-117 and TT only 1.1B4, 6-23 and TT were found to express the GLP1R mRNA. The Ct values obtained for the expression of the housekeeping gene GAPDH in the three cell lines 1.1B4, 6-23 and TT ranged from 10.9 to 15.4 indicating successful total RNA preparation and successful cDNA synthesis. The Ct values obtained for the expression of the GLP1R, IGF1R and INSR genes ranged from 17.1 to 35.4 and yielded no signal different from background (“undetermined”) in the case of the IGF1R gene measured in total RNA from 6-23 cells.		
Conclusion: The mRNA expression of GLP1R, IGF1R and INSR could be detected in the cell lines 1.1B4, 6-23 and TT except for the mRNA expression of IGF1R that was not detectable in 6-23 cells.		

Abbreviations: GLP1R: Glucagon-like peptide 1 receptor; IGF1R: Insulin-like growth factor 1 receptor; INSR: Insulin receptor

表 2.6.3.2.2D - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Binding affinity of AVE0010 to the GLP-1 receptor		
Test: Radioligand binding assay with human GLP-1 receptor vs. 0.03 nM ^{125}I GLP1(7-36) amide	**Test Article (batch):** AVE0010 ([redacted]) human GLP-1 ([redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-4, 4.2.1.1-4a
Test system: CHO-K1 cells transfected with human GLP-1 receptor	**Vehicle:** 0.4% DMSO	**Study No.:** [MVT0010] [MVT0010EXT] ([redacted]-034, PanLabs PT# 1004085 and 1004086)
No. of Preparations/Group: AVE0010 n=2, human GLP-1, n=2	**Administration:** in vitro in buffer medium	
Study Period: [redacted]-19[redacted] to [redacted]19[redacted]	**Concentration:** 0.1 nM – 10 µM	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information: ZS42-0010 = AVE0010, ZS42-0018 = human GLP-1		
Statistics: descriptive statistics; significance criteria: ≥ 50% of max. inhibition was regarded as significant, IC50 values were determined by a non-linear regression analysis, and inhibition constants Ki were calculated using the equation of Cheng and Prusoff.		
Results: AVE0010 (ZS42-0010) had a binding affinity for the human GLP-1 receptor with an IC_{50} of 1.43 ± 0.239 nM (K_i = 1.33 ± 0.222 nM). Human GLP-1 (ZS42-0018) had a binding affinity for the human GLP-1 receptor with an IC_{50} of 5.48 ± 1.28 nM (K_i =5.09 ± 1.19 nM).		
Conclusion: AVE0010 has a strong binding affinity to the human GLP-1 receptor that is ~4-times greater than that of human GLP-1.		

Abbreviations: GLP-1: Glucagon-like peptide-1

表 2.6.3.2.2E - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Binding of insulin glargine (SAR274136) to the GLP-1 receptor (CEREP report: Study of SAR213916 and SAR274136)		
Test: Selectivity of insulin glargine versus the GLP-1 receptor	**Test Article (batch):** SAR274136* ([redacted]) * SAR274136 = insulin glargine = HOE901	**Location in CTD:** 4.2.1.1-5, 4.2.1.1-5a
Test system: βTC6 cells (endogenous, murine)	**Vehicle:** H_2O or HBSS	**Study No.:** [DIVT0068-abbr] [DIVT0068]
No. of Preparations/Group:	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** 100 nmol/L	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information: Affinity of insulin glargine (= SAR274136) to the GLP-1 receptor was evaluated in vitro. Other in vitro tests with lixisenatide (= AVE0010 = SAR213916) were conducted in the same study but reported elsewhere (SPRAB-MVT0011).		
Statistics:		
Results: Insulin glargine (= SAR274136) at a concentration of 100 nmol/L did not inhibit (-3%) specific radioligand binding of 25 pmol/L [^{125}I]GLP-1(7-36) to the GLP-1 receptor. Reference compound exendin-4 inhibited specific radioligand binding with an IC_{50} of 160 pmol/L (K_i = 130 pmol/L).		
Conclusion: Insulin glargine at a concentration of 100 nmol/L has no affinity to the GLP-1 receptor.		

Abbreviations: GLP-1: Glucagon-like peptide-1

表 2.6.3.2.2F - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Influence of lixisenatide on binding affinity of insulin glargine to the insulin receptor B		
Test: Radioligand binding assay using human A14[^{125}I]-insulin as radioligand (in vitro SPA assay format)	**Test Article (batch):** Lixisenatide ([redacted]) Insulin glargine ([redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-6
Test system: CHO-hIR-B cells	**Vehicle:** PBS	**Study No.:** [DIVT0057]
No. of Preparations/Group: Four independent experiments were performed. Every individual experiment was carried out using 11 concentrations of a test compound in quadruple determination.	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Varying molar concentration ranges	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: The IC_{50} value for each compound was calculated with BIOST@T-BINDING V3.0 internal application using a 4-parameter logistic model with lower asymptote constrained to the nonspecific binding level. A linear model was applied on log-transformed IC_{50} values. Geometric means of the IC_{50} and their respective 95% confidence intervals were calculated via the anti-log transformation. To quantify the difference of the in vitro affinity to human IR-B between insulin glargine in presence of 1 µM lixisenatide and the reference insulin glargine alone, the difference in means of the log-transformed IC_{50} values with 90% confidence interval were determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation. The linear model analysis was performed using SAS (version 9.2) running on Windows 7.		
Results: Lixisenatide ([redacted] was analyzed for its potency to inhibit the binding of A14[^{125}I]-labeled insulin to human IR-B in vitro or to influence the binding affinity of insulin glargine [redacted] to IR-B using a high concentration of 1 µM lixisenatide. Insulin glargine was used as reference. IC_{50} values were generated. Lixisenatide alone was not able to inhibit the binding of A14[^{125}I]- labeled insulin to human IR-B, i.e. lixisenatide did not show binding affinity to IR-B up to the highest concentration of 1 µM used in the assay. Insulin glargine exhibited an IC_{50} value on the human IR-B of 1.116 nmol/L [0.940; 1.324] (n=4). Adding a high concentration of lixisenatide (1 µM) to a concentration-response measurement of insulin glargine had no relevant influence. The IC_{50} of insulin glargine in presence of 1 µM lixisenatide on the human IR-B was 1.176 nmol/L [0.991; 1.395] (n=4). The ratio of mean IC_{50} values between insulin glargine alone and insulin glargine in presence of 1 µM lixisenatide is 1.0538, and the 90% confidence interval of this ratio is [0.870; 1.277]. This is not considered a biologically relevant deviation.		

表 2.6.3.2.2F - Primary pharmacodynamics - in vitro (continued)

Title: Influence of lixisenatide on binding affinity of insulin glargine to the insulin receptor B
Conclusion: The IC_{50} values of lixisenatide ([redacted]), insulin glargine ([redacted]) in presence of 1 µM lixisenatide and the reference insulin glargine alone on the human IR-B were obtained. Lixisenatide does not exhibit binding affinity to human IR-B. Insulin glargine in presence of 1 µM lixisenatide displays almost identical affinity to human IR-B compared to the reference insulin glargine alone. This indicates that lixisenatide neither possesses binding affinity to IR-B nor influences the affinity of insulin glargine to IR-B.

Abbreviations: IR-B: insulin receptor subtype B;

表 2.6.3.2.2G - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Functional activity of lixisenatide in thyroid c-cells of rat and human origin in vitro		
Test: Determination of cAMP formation in the thyroid C-cell lines 6-23 from rat and TT from man	**Test Article (batch):** Lixisenatide ([redacted]), liraglutide ([redacted]), exendin-4 ([redacted]), GLP-1 ([redacted]), GIP ([redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-7
Test system: Cellular cAMP assay based on HTRF technology (Kit no. 62AM4PEC from Cisbio Corp.)	**Vehicle:** Assay buffer / IBMX (for formulation, see Materials Sections 2.1.1 and 2.2.1)	**Study No.:** [DIVT0007]
No. of Preparations/Group: Every individual experiment was performed in a 96-well plate and carried out using 6 concentrations of a test compound in triple determination.	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** 0.1-1000000 pM	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information: Lixisenatide = AVE0010		
Statistics: Results were obtained with internal software Biost@t-Speed v 2.0 LTS using the 4-parameter logistic model according to Ratkovsky and Reedy (1986). The adjustment was obtained by non-linear regression using the Marquardt algorithm in SAS v9.1.3 software under UNIX.		
Results: The compounds lixisenatide, GLP-1(7-36) amide, exendin-4 and liraglutide (all ligands for the GLP-1 receptor), as well as GIP (ligand for the GIP receptor), were tested in a functional cAMP assay for effects on thyroid C-cell carcinoma cell lines 6-23 from rat and TT from man. There was a strong response by all four GLP-1 receptor agonists tested in the rat cell line with Emax% values in the 100 % range but only a weak response (Emax% = 15-26%) on human thyroid TT cells. In contrast, GIP as a control for comparison, induced a strong response in both rat and human C-cell lines (Emax% = 76% in 6-23 and 102% in TT).		
Conclusion: In summary, there was a strong signaling through the GIP receptor by native GIP in thyroid C-cell lines from both species, while signaling through the GLP-1 receptor by the four GLP-1 receptor agonists was only strong in the rat C-cell line, but weak in the human C-cell line. It is therefore concluded that there are significant species differences in the GLP-1 receptor responsiveness between rats and humans. This leads to the suggestion that GLP-1 receptor-mediated C-cell proliferation in rodents after long-term exposure of high concentrations of GLP-1 receptor agonists might be a rodent-specific phenomenon and not relevant for humans.		

表 2.6.3.2.2H - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: In vitro potency of insulin glargine, lixisenatide, as well as mixtures thereof in the human pancreatic beta cell line 1.1 B4		
Test: Determination of agonist-induced cAMP formation in the human pancreatic beta cell line 1.1 B4.	**Test Article (batch):** (1) Lixisenatide / AVE0010 ([redacted]) (2) Insulin Glargine / Lantus ([redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-8
Test system: HTRF assay with a kit from CISBIO Corp.	**Vehicle:** Assay buffer / IBMX (for formulations, see Materials Section 2.2.1)	**Study No.:** [DIVT0067]
No. of Preparations/Group: Every individual experiment was performed in a 96-well plate format and carried out using serial diluted concentrations of test compound in triple determination.	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** 10^{-12} µM to 6.12 µM	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: EC50 values were calculated using the 4- parameter logistic model according to Ratkovsky and Reedy (1986). The adjustment was obtained by non-linear regression using the Levenberg-Marquardt algorithm in SAS v9.1.3 software via the in-house software Biost@t-Speed v2.0 LTS. A mixed model was applied on log-transformed EC50 values with experiment considered as random effect. Geometric means of the EC50 values and their respective 95% confidence intervals for each compound or combination were calculated via the anti-log transformation. To quantify the difference of the in vitro cAMP responses between AVE0010 in the presence of fixed concentrations of insulin glargine versus AVE0010 alone, the difference in means of the log-transformed EC50 values with 90% confidence interval was determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation. The ratio of means with 90% confidence interval between AVE0010 in the presence of fixed concentrations of insulin glargine versus AVE0010 alone was discussed regarding biological relevance.		
Results: Concerning insulin glargine alone, no cAMP response was detectable across a wide range of concentrations of the compound and it was therefore considered to be inactive towards cAMP signaling in this cell line. In contrast, lixisenatide alone was found to be highly potent in the same assay, yielding an EC50 value in the lower picomolar range. Measuring dose-response relationship of lixisenatide in presence of different fixed concentrations of insulin glargine indicated no change in dose-response for lixisenatide.		
Conclusion: There seems to be no interference between lixisenatide and insulin glargine at the level of cAMP signaling in human pancreatic beta cell line 1.1 B4.		

Abbreviations: cAMP: cyclic adenosine monophosphate

表 2.6.3.2.2I - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Influence of Lixisenatide on Insulin Glargine stimulated Insulin Receptor Autophosphorylation using CHO-IR cells		
Test: Analysis of the autophosphorylation of human IR using in-cell western technology	**Test Article (batch):** Insulin Glargine (batch [redacted]) LIXISENATIDE (batch[redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-9
Test system: Cell-based assay	**Vehicle:** PBS buffer	**Study No.:** [DIVT0049]
No. of Preparations/Group: In every individual experiment performed in a 96-well plate 8 wells / plate served as a blank and a low control respectively. Every individual experiment performed in a 96-well plate was carried out using 10 concentrations of a test compound in double to sextuple determination. Three plates were used on each experimental day.	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Varying molar concentration ranges	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: For each experiment, EC_{50} values were obtained using the 4-parameter logistic model according to Ratkowsky and Reedy without constraints. The adjustment was obtained by non- linear regression using the Levenberg Marquardt algorithm in SAS release 9.1.3 under HP-UX via Biost@t-Speed V2.0 LTS internal application. A mixed model was applied for insulin glargine and insulin glargine + lixisenatide on log-transformed EC_{50} values with plate considered as random effect using SAS v9.2 on Windows 7. Geometric means of the EC_{50} values and their respective 95% confidence intervals were calculated for insulin glargine and insulin glargine + lixisenatide via the anti-log transformation. To quantify the difference of the in vitro activities between insulin glargine + lixisenatide and the reference insulin glargine alone, the difference in means of the log-transformed EC_{50} values with 90% confidence interval were determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation.		

表 2.6.3.2.2I - Primary pharmacodynamics - in vitro (continued)

Title: Influence of Lixisenatide on Insulin Glargine stimulated Insulin Receptor Autophosphorylation using CHO-IR cells (continued)		
Results:		
Geometric mean EC_{50} values [nM] with 95% confidence intervals of LIXISENATIDE, insulin glargine and insulin glargine in the presence of 100 nM LIXISENATIDE on human IR-B.		
Compound	**EC_{50} geometric mean [nM]**	**95% confidence interval [nM]**
Insulin glargine (batch [redacted])	8.741	[4.755; 16.067] (n=9)
Lixisenatide (batch [redacted])	-	-
lixisenatide + insulin glargine	9.041	[4.889; 16.718] (n=6)
Mixed model on log-transformed EC50 with plate considered as random effect.		
Conclusion: The insulin receptor autophosphorylation activity of insulin glargine in the presence of 100 nM LIXISENATIDE was determined. CHO cells over expressing the human insulin receptor (CHO-IR) in vitro were used in this standard assay. The EC_{50} value obtained for insulin glargine (batch [redacted]) (8.741 nM [4.755; 16.067] (n=9)), was comparable to that observed for insulin glargine in the presence of 100nM LIXISENATIDE (batch [redacted]) (9.041 nM ([4.889; 16.718] (n=6)). The ratio of mean EC50 values including the 90% confidence interval between insulin glargine alone and insulin glargine + 100 nM LIXISENATIDE was considered to be within a range of biologically irrelevant deviations from nominal. LIXISENATIDE did not show a stimulatory activity of the autophosphorylation of the insulin receptor. Therefore it can be concluded that LIXISENATIDE possesses neither an activity for IR nor does it influence the activity of insulin glargine on IR.		

Abbreviations: IR: Insulin receptor

表 2.6.3.2.2J - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Influence of Lixisenatide on Insulin Glargine stimulated IGF 1 Receptor Autophosphorylation using MEF-IGFR cells		
Test: Analysis of the autophosphorylation of human IGF1R using in-cell western technology	**Test Article (batch):** IGF-1 ([redacted]) Insulin Glargine (batch [redacted]) LIXISENATIDE (batch [redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-10
Test system: Cell-based assay	**Vehicle:** PBS buffer	**Study No.:** [DIVT0044]
No. of Preparations/Group: In every individual experiment performed in a 96-well plate 8 wells / plate served as a blank and a low control respectively. Every individual experiment performed in a 96-well plate was carried out using 10 concentrations of a test compound alone or in combination (if indicated) in duplicate to sextuple determination. Three to four plates were used on each experimental day.	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Varying molar concentration ranges	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: For each experiment, EC50 values were obtained using the 4-parameter logistic model according to Ratkowsky and Reedy. The upper asymptotes for the insulin analogues were constrained to the adjusted upper asymptote of the dose response curve for IGF-1 on the same plate. The adjustment was obtained by non-linear regression using the Levenberg Marquardt algorithm in SAS release 9.1.3 under HP-UX via Biost@t-Speed V2.0 LTS internal application. A mixed model was applied for insulin glargine and insulin glargine + lixisenatide on logtransformed EC50 values with plate considered as random effect using SAS v9.2 on Windows 7. Geometric means of the EC50 values and their respective 95% confidence intervals were calculated for insulin glargine and insulin glargine + lixisenatide via the anti-log transformation and separately for IGF1. To quantify the difference of the in vitro activities between insulin glargine + lixisenatide and the reference insulin glargine alone, the difference in means of the log-transformed EC50 values with 90% confidence interval were determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation.		

表 2.6.3.2.2J - Primary pharmacodynamics - in vitro (continued)

Title: Influence of Lixisenatide on Insulin Glargine stimulated IGF 1 Receptor Autophosphorylation using MEF-IGFR cells (continued)		
Results:		
Geometric mean EC50 values [nM] of insulin glargine, insulin glargine + LIXISENATIDE, LIXISENATIDE and IGF-1 stimulated autophosphorylation of human recombinant IGF-1R.		
Compound	**EC_{50} geometric mean [nM]**	**95% confidence interval [nM]**
Human IGF-1	9.150	[7.423 ; 11.28] (n=11)
Insulin Glargine (batch [redacted])	166.3	[109.7; 252.1] (n=7)
Insulin Glargine (batch [redacted]) + 100nM LIXISENATIDE (batch [redacted])	138.7	[91.5 ; 210.2] (n=7)
LIXISENATIDE (batch [redacted])	n.a,	
Mixed model for glargine and insulin glargine + lixisenatide on log-transformed EC50 with plate considered as random effect.		
Conclusion: The IGF-1 receptor autophosphorylation activity of insulin glargine in the presence of 100 nM LIXISENATIDE was determined. MEF cells over expressing the human IGF-1 receptor (MEF-IGF1R) in vitro were used in this standard assay. The EC50 value obtained for insulin glargine (batch [redacted]) (166.3 nM [109.7; 252.1] (n=7)), was comparable to that observed for insulin glargine in the presence of 100nM LIXISENATIDE (batch [redacted](138.7 nM [91.5; 210.2] (n=7)). The ratio of mean EC50 values including the 90% confidence interval between insulin glargine alone and insulin glargine + 100 nM LIXISENATIDE was considered to be within a range of biologically irrelevant deviations from nominal. The natural ligand IGF-1 exhibited an EC50 value for human IGF-1R of 9.15 nM ([7.423; 11.28] (n=11)), LIXISENATIDE did not show a stimulatory activity of the autophosphorylation of the IGF1 receptor. Therefore it can be concluded that LIXISENATIDE possess neither an activity for IGF1R nor it influence the activity of insulin glargine on IGF1R		

Abbreviations: n.a.: not applicable

表 2.6.3.2.2K - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Characterization of Insulin Glargine (HOE901) and LIXISENATIDE (AVE0010) stimulated AKT- phosphorylation in 1.1B4 cells		
Test: Analysis of the serine phosphorylation (pS473) of AKT using in-cell western technology	**Test Article (batch):** Insulin ([redacted]); Insulin Glargine ([redacted]); Insulin Glargine-M1 ([redacted]; LIXISENATIDE ([redacted]	**Location in CTD:** 4.2.1.1-11
Test system: Cell-based assay	**Vehicle:** PBS buffer	**Study No.:** [DIVT0070]
No. of Preparations/Group: Every individual experiment performed in a 96-well plate was carried out using 10 concentrations of a test compound alone or in combination (if indicated) in duplicate to quadruplicate determination. 8 wells / plate served as a blank and a low control respectively.	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Varying molar concentration ranges	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: For each experiment, EC50 values were obtained using the 4-parameter logistic model according to Ratkowsky and Reedy. The upper asymptotes of all dose response curves were constrained to 100% as determined by the maximum response for insulin glargine at the selected highest concentrations of 800 and 2400 nM on the same plate. The adjustment was obtained by non-linear regression using the Levenberg Marquardt algorithm in SAS 9.2 under HP-UX via Biost@t-Speed V2.1 LTS internal application. A mixed model was applied on log-transformed EC50 values with plate considered as random effect. Geometric means of the EC50 values and their respective 95% confidence intervals werecalculated via the anti-log transformation. To quantify the difference of the in vitro activities on pS(473) AKT phosphorylation between insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 and insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 in the presence of lixisenatide the difference in means of the log-transformed EC50 values with 90% confidence interval were determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation. The ratio of means with 90% confidence interval between insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 and their combination with 10 nM lixisenatide was discussed regarding biological relevance. The analyses were performed using SAS (version 9.2) running on Windows 7.		

表 2.6.3.2.2K - Primary pharmacodynamics - in vitro (continued)

Title: Characterization of Insulin Glargine (HOE901) and LIXISENATIDE (AVE0010) stimulated AKT- phosphorylation in 1.1B4 cells (continued)
Results: Geometric mean EC50 values [nM] in the absence and presence of lixisenatide. Lixisenatide: no effect; insulin: 76.00 nM [58.72; 98.35] (n=6); insulin + lixisenatide: 86.95 nM [67.18; 112.5] (n=6); insulin glargine: 13.33 nM [11.24; 15.80] (n=26) [Table 4; Figure 4], insulin glargine + 10 nM lixisenatide: 14.79 nM [11.59; 18.88] (n=7); insulin glargine M1: 299.6nM [237.3; 378.2] (n=8); M1 + lixisenatide (314.3nM [249.0; 396.8] (n=6). The ratios of mean EC50 with 90% confidence interval between insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 alone or in combination with 10 nM lixisenatide are considered to be within a range of biologically irrelevant deviations from the nominal value of 1.0.
Conclusion: AKT phosphorylation stimulated by insulin, insulin glargine and insulin glargine M1 in absence or presence of 10 nM lixisenatide was determined using 1.1B4 cells. The EC50 values obtained for insulin (batch [redacted], insulin glargine (batch [redacted]) and Insulin Glargine-M1 (batch [redacted]) were comparable to that observed in the presence of 10 nM lixisenatide (batch [redacted]). Whereas the EC50 value for insulin could be determined with 76.00 nM [58.72; 98.35] (n=6), in the presence of lixisenatide the EC50 value was 86.95 nM [67.18; 112.5] (n=6). The EC50 value for insulin glargine stimulated AKT phosphorylation was 13.33 nM [11.24; 15.80] (n=26), stimulation with insulin glargine + 10 nM lixisenatide resulted in an EC50 value of 14.79 nM [11.59; 18.88] (n=7). For insulin glargine M1 an EC50 value of 299.6nM [237.3; 378.2] (n=8) could be measured, which was comparable to that of insulin glargine M1 + lixisenatide (314.3nM [249.0; 396.8] (n=6)). The ratio of mean EC50 values including the 90% confidence interval between insulin + lixisenatide, insulin glargine + lixisenatide and insulin glargine M1 + lixisenatide and the reference insulin, insulin glargine and insulin glargine M1, respectively, was considered to be within a range of biologically irrelevant deviations from the nominal value of 1.0. Lixisenatide alone did not show a stimulatory activity of the AKT phosphorylation. Therefore it can be concluded that lixisenatide possess neither an AKT stimulatory activity in 1.1B4 cells nor it influence the activity of insulin and insulin analogs.

表 2.6.3.2.2L - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on the process of apoptosis in rat thyroid carcinoma cell line RTC 6-23		
Test: cellular caspase 3/7 activation assay to measure apoptosis in cells after treatment with the pro-inflammatory cytokine TNF alpha	**Test Article (batch):** Insulin Glargine (batch [redacted]) Lixisenatide (batch [redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-12
Test system: cell based assay	**Vehicle:** D-MEM medium containing 1% (v/v) fetal calf serum , 1x NEAA and 1x Penicillin-Streptomycin	**Study No.:** [DIVT0065]
No. of Preparations/Group: Every individual experiment performed in a 96-well plate was carried out using 10 concentrations of test compound lixisenatide alone or in combination (if indicated) with 3 different concentration of insulin glargine in duplicate determination. Two to 4 plates were used on each experimental day and the experiment was performed 5 times	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]20[redacted]to[redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Insulin Glargine (1pM, 1nM, 1µM) Lixisenatide (206nM, 20.6nM, 2.06nM. 206pM, 20.6pM, 2.06pM, 206fM, 20.6fM, 2.06fM, 0.206fM)	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics:		
Results: While for all Lixisenatide no dose dependent modulation of caspase3/7 activity was detectable, a weak but significant reduction could be observed at medium (1nM) and high (1µM) insulin glargine concentration. The combination of both test compounds did not show differences to the single compound treatment.		
Conclusion: Following the obtained results, we conclude that, in RTC 6-23 cells, following treatment with 100ng/ml TNF alpha, the combination of Lixisenatide and insulin glargine do not modulate caspase 3/7 activity more than the single test compounds by its own. For the combination of both test compounds no synergistic or additive effect on the TNF alpha mediated pro-apoptotic pathway could be shown.		

表 2.6.3.2.2M - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on the process of apoptosis in the human pancreatic beta cell line 1.1 B4		
Test: cellular caspase 3/7 activation assay to measure apoptosis in cells after treatment with the pro-inflammatory cytokine mixture of TNFalpha/ILß/ INF-gamma	**Test Article (batch):** Insulin glargine (batch [redacted]) Lixisenatide (batch [redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-13
Test system: cell based assay	**Vehicle:** RPMI medium containing 1% (v/v) fetal calf serum and 1x Penicillin-Streptomycin	**Study No.:** [DIVT0071]
No. of Preparations/Group: Every individual experiment performed in a 96-well plate was carried out using 8-9 concentrations of test compound lixisenatide alone or in combination (if indicated) with 3 different concentration of insulin glargine in octuplet determination. 4 plates were used on each experimental day	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Insulin glargine (1pM, 1nM, 1µM) Lixisenatide (206nM, 20.6nM, 2.06nM, 206pM, 20.6pM, 2.06pM, 206fM, 20.6fM 2.06fM)	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: A mixed model was applied on log-transformed IC50 values with experiment considered as random effect. Geometric means of the IC50 values and their respective 95% confidence intervals for each combination or for lixisenatide alone were calculated via the anti-log transformation. To quantify the difference of inhibition of apoptosis levels between lixisenatide in presence of different doses of insulin glargine and lixisenatide alone the difference in means of the logtransformed IC50 values with 90% confidence interval was determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation. The ratio of means with 90% confidence interval between lixisenatide in presence of different doses of insulin glargine and lixisenatide alone was discussed regarding biological relevance. The analyses were performed using SAS (version 9.2) running on WINDOWS 7.		

表 2.6.3.2.2M - Primary pharmacodynamics - in vitro (continued)

Title: Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on the process of apoptosis in the human pancreatic beta cell line 1.1 B4 (continued)
Results: While for three tested concentrations of insulin glargine covering a wide concentration range no relevant modulation of caspase3/7 activity was detectable, inhibition of the apoptotic caspase pathway could be detected by lixisenatide. IC50 values for lixisenatide action in the absence and presence of insulin glargine could be measured. The combination of both test compounds did not show relevant differences to the single compound treatment.
Conclusion: Following the obtained results, we conclude that, in human 1.1B4 beta cells, following treatment with TNF alpha/IL-ß/INF-gamma, the combination of lixisenatide and insulin glargine do not modulate caspase 3/7 activity more than the single test compounds by its own. For the combination of both test compounds no synergistic or additive effect on the pro inflammatory cytokine mediated apoptotic pathway could be shown.

表 2.6.3.2.2N - Primary pharmacodynamics - in vitro

Title: Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on proliferation in human pancreatic beta cell line 1.1 B4		
Test: Stimulation of ^{14}C-thymidine uptake and incorporation into cellular DNA by test article	**Test Article (batch):** human insulin:[redacted] Insulin glargine: Batch [redacted] Lixisenatide: Batch[redacted] Recombinant Human IGF1: Batch ([redacted]) [redacted]	**Location in CTD:** 4.2.1.1-14
Test system: 1.1B4 cells grown on Cytostar T scintillation plates	**Vehicle:** MEM Eagle with Earl's Salts and Glutamax supplemented with 0.5% (w/v) BSA , 2mM L-glutamine, NEAA	**Study No.:** [DIVT0072]
No. of Preparations/Group: Test articles were tested in parallel in 4 independent experiments; in every experiment each test article was tested on a separate 96-well plate in 10 different concentrations/ using octuple determinations	**Administration:** In vitro	
Study Period: [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]	**Concentration:** Human insulin and insulin glargine were tested at concentrations ranging from 100pM to 3000nM. Lixisenatide were tested at concentrations ranging from 70pM to 1200nM. IGF1 was tested at concentrations ranging from 10pM to 300nM	**GLP Compliance:** Not required
Other Protocol Information:		
Statistics: Geometric means of the EC50 and their respective 95% confidence intervals for human insulin, IGF1, insulin glargine and insulin glargine/lixisenatide combination were calculated via the anti-log transformation. To quantify the difference of inhibition of apoptosis levels between lixisenatide in presence of different doses of insulin glargine and lixisenatide alone the difference in means of the log transformed IC50 values with 90% confidence interval was determined and converted to ratio of means with 90% confidence interval via the anti-log transformation. The ratio of means with 90% confidence interval between lixisenatide in presence of different doses of insulin glargine and lixisenatide alone was discussed regarding biological relevance. The linear model analysis was performed using SAS (version 9.2) running on Windows 7.		

表 2.6.3.2.2N - Primary pharmacodynamics - in vitro (continued)

Title: Influence of the combination treatment with lixisenatide and insulin glargine on proliferation in human pancreatic beta cell line 1.1 B4 (continued)

Results: The ratio of mean of EC_{50} values with 90% confidence interval between the insulin glargine/lixisenatide combination verses insulin glargine alone was 0.778 [0.611;0.990].

Geometric mean EC_{50} values with 95% confidence intervals for human insulin, IGF1, lixisenatide, insulin glargine, and insulin glargine /lixisenatide combination

Compound	EC50 geometric mean[nM]	95% confidence interval[nM]
Human insulin	9.41	[6.38; 13.9] (n = 4)
IGF1	0.192	[0.175; 2.12] (n = 4)
lixisenatide	Not active	- (n = 4)
Insulin glargine	0.996	[0.808; 1.23] (n = 4)
Insulin glargine + lixisenatide (10nM)	0.775	[0.630; 0.953] (n = 4)

Conclusion: Insulin glargine/lixisenatide combination does not exhibit any biologically relevant deviations in the mitogenic activity in comparison to insulin glargine alone, under the reported experimental conditions.

表 2.6.3.2.3A - Primary pharmacodynamics - in vivo

Title: Acute glycemic effects of subcutaneous AVE0010/insulin glargine combination in female db/db mice		
Test: Acute effect of sc AVE0010/insulin glargine on basal blood glucose and oral glucose tolerance (2g glucose/kg) in db/db mice	**Test Article (batch):** AVE0010 ([redacted]), Insulin glargine ([redacted]), AVE0010/insulin glargine premixed formulation ([redacted] and [redacted]	**Location in CTD:** 4.2.1.1-15
Species/Strain: db/db mouse (BKS.Cg-m +/+ Leprdb/J) (Charles River, Germany)	**Vehicle:** HOE901 placebo ([redacted]), pH 4	**Study No.:** [MVV0025]
Gender/No. per Group: female / n = 10	**Treatment Schedule:** single dose	**Study Period:** [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]
Weight/Age: 10 - 11 weeks	**Administration:** Subcutaneous	
	Doses: 10 µg/kg AVE0010, 5 U/kg insulin glargine	**GLP Compliance:** Not required
Other protocol information:		
Statistics: For both, basal blood glucose and oral glucose tolerance, a Levene test for the two factors treatment and time was performed for normalized glucose values (i.e. reduced by the corresponding pre-treatment concentrations) and the hypothesis of homogeneity of variances was rejected. As the subsequently performed rank-transformation did not improve variance homogeneity, two-way ANOVAs with the factor treatment and the repeated measures factor time were performed on normalized glucose values. Pairwise comparisons were performed using Newman-Keuls posthoc tests.		
Results: Basal blood glucose was significantly decreased versus placebo by all three treatments. On a descriptive level, blood glucose decrease by the AVE0010/insulin glargine combination was more pronounced than by equal doses of either AVE0010 (until 120 min) or insulin glargine alone. This decrease versus the combination treatment was not statistically significant for AVE0010 but for insulin glargine alone. Insulin glargine, AVE0010 and the combination reduced OGTT-induced normalized blood glucose excursion compared to placebo which was statistically significant up to 90 min, 120 min, and 210 min respectively. The AVE0010/insulin glargine combination reduced the OGTT-induced blood glucose excursion significantly compared to AVE0010 monotreatment up to 90 min and compared to insulin glargine monotreatment up to 150 min.		
Conclusion: The immediate basal blood glucose lowering effect of 10 µg/kg SC AVE0010 monotreatment was preserved by the AVE0010/insulin glargine combination and the effect of the combination was statistically significant versus insulin glargine up to 240 min. In case of the OGTT an improvement of oral glucose tolerance of the combination was statistically significant versus both AVE0010 and insulin glargine up to 90 min and 150 min respectively. It can therefore be concluded on a descriptive level that the combination of AVE0010 and insulin glargine, given as one single subcutaneous injection, was superior to single injections of either AVE0010 or insulin glargine alone in improving both, basal blood glucose and oral glucose tolerance in diabetic db/db mice.		

Abbreviations: SC: Subcutaneous; OGGT: Oral glucose tolerance test

表 2.6.3.2.3B - Primary pharmacodynamics - in vivo

Title: Acute effects of subcutaneous AVE0010/insulin glargine combination on oral glucose tolerance in male dogs		
Test: Acute effect of sc AVE0010/insulin glargine on oral glucose tolerance (2g glucose/kg) in dogs	**Test Article (batch):** AVE0010 ([redacted]), insulin glargine ([redacted] and [redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-16
Species/Strain: normoglycemic Beagle dogs (Harlan, Germany)	**Vehicle:** placebo solution ([redacted] and [redacted])	**Study No.:** [MVV0026]
Gender/No. per Group: Male / n = 6-17	**Treatment Schedule:** single dose	**Study Period:** [redacted]-20[redacted] to [redacted]20[redacted]
Weight/Age: ~13-17 kg	**Administration:** Subcutaneous	
	Doses: AVE0010 (0.5 and 1.0µg/kg), insulin glargine (1.0U/kg), AVE0010/insulin glargine combination (0.15 µg/kg/0.3 U/kg, 0.5 µg/kg/0.3 U/kg, 1.0 µg/kg/0.3 U/kg, 1.5 µg/kg/0.3 U/kg and 1.0 µg/kg/1.0 U/kg)	**GLP Compliance:** Not required
Other protocol information:		
Statistics: The Levene tests for the two factors treatment and time rejected the hypothesis of homogeneity of variances. The variances more specifically increase systematically with increasing response value. Thus two-way ANOVA with the factor treatment and the factor time were performed where the variances were modelled to consider the dependency on response level. Multiple comparison post-hoc tests versus control and Bonferroni-Holm adjustment for the factor treatment and for each level of the factor time were added. Statistical analysis was performed using EverStat V5.0 software and SAS version 9.1.3. P-values <0.05 were regarded as statistically significant.		

表 2.6.3.2.3B - Primary pharmacodynamics - in vivo (continued)

Title: Acute effects of subcutaneous AVE0010/insulin glargine combination on oral glucose tolerance in male dogs (continued)
Results: In an OGTT, 15 min after the oral glucose challenge (0.75 h) when blood glucose excursion was already present in the placebo group treatment with AVE0010 0.5 and 1.0 µg/kg SC resulted in decreased blood glucose as compared to placebo that remained statistically significant until 2 h for the higher dose (1.0 µg/kg SC). In contrast, monotreatment with insulin glargine (Lantus) 1.0 U/kg SC had no significant effect on OGTT-induced blood glucose excursion during the absorptive phase but lowered blood glucose concentrations significantly versus placebo in the postabsorptive phase from time ≥ 2.5 h. Each AVE0010/insulin glargine combination demonstrated blood glucose decrease as compared to placebo. This decrease was significant within the absorptive phase (0.75 h until 2.5 h) for the combinations with AVE0010 ≥ 0.5 µg/kg and for the postabsorptive phase (3 h until 6.5 h) for the combination with the high insulin glargine concentration 1.0 U/kg. The AVE0010/insulin glargine combination significantly decreased blood glucose levels compared to AVE0010 1.0 µg/kg SC up to 6.5 h and to insulin glargine 1.0 U/kg SC alone up to 4.5 h. Serum insulin levels in the insulin glargine group were comparable to placebo. In both groups treated with single doses of AVE0010 alone the insulin concentrations are lower than placebo during the absorptive phase of the OGTT but are returning slower back to baseline levels than in the placebo group. In animals which received AVE0010/insulin glargine combination treatment the endogenous insulin curve shapes were roughly similar to those of AVE0010 alone. Insulin glargine monotherapy had slight influence on the serum c-peptide peak but due to rising insulin levels from exogenous insulin glargine serum c-peptide returned earlier back to baseline than with placebo. By contrast, with AVE0010 alone the c-peptide return to baseline was retarded as compared to placebo. In the absorptive phase of the OGTT the AVE0010/insulin glargine group that received the lowest dose of AVE0010 (AVE/Lan 0.15+0.3) showed the lowest suppression of c-peptide while the highest dose of both compounds in combinations (AVE/Lan 1.0+1.0) showed the highest suppression. Moreover, in all AVE0010/insulin glargine combination groups c-peptide levels were lower compared to placebo.
Conclusion: Oral application of a 2g/kg glucose bolus to healthy, normoglycemic dogs results in a sharp blood glucose excursion that reaches its maximum after 0.5-1 hour and returns back to baseline levels ~2 hours after oral gavage. In animals treated with a single dose of 1.0 µg/kg SC AVE0010, these blood glucose excursions are significantly reduced until 2 h and the return to baseline is then delayed in comparison to placebo treated animals. In contrast, when dogs are treated with insulin glargine there was no significant effect on blood glucose excursion during the absorptive phase of OGTT but blood glucose decreases significantly below control levels in the postabsorptive phase. However, when AVE0010 and insulin glargine was injected in combination there was a decrease of blood glucose levels during both absorptive and postabsorptive phase of the OGTT. This blood glucose lowering effect was statistically significant versus both AVE0010 and insulin glargine during the absorptive phase and further up to 4.5 h. Thereafter the good sustained blood glucose lowering effect of insulin glargine was preserved. Compared to placebo treatment the endogenous insulin levels were nearly unchanged by monotreatment with insulin glargine and tended to be suppressed and retarded by AVE0010 alone. This effect of AVE0010 is in line with the well-known activity of GLP-1 receptor agonists to delay gastric emptying and is seen also in all groups that received AVE0010 in combination with insulin glargine. However, when looking to serum c-peptide levels it is obvious that in all groups that received insulin glargine, irrespective whether alone or in combination with AVE0010 the c-peptide levels were markedly decreased to close or even below detection level at 3.5 h and beyond. This implies that endogenous insulin was suppressed, most probably by exogenous insulin glargine. It can therefore not be ruled out that the higher insulin levels detected in the AVE/Lan 1.0+1.0 group could be due to any cross-reactivity of the human insulin assay with higher levels insulin glargine or its metabolites.

Abbreviations: SC: Subcutaneous; OGGT: Oral glucose tolerance test

表 2.6.3.2.3C - Primary pharmacodynamics - in vivo

Title: Acute effects of a subcutaneous injection of low dose lixisenatide mixed into two different concentrations of insulin glargine, U100 and U300, on oral glucose tolerance in male dogs		
Test: Oral glucose tolerance test (OGTT)	**Test Article (batch):** Placebo ([redacted]); Lixisenatide/insulin glargine U100 ([redacted]; Lixisenatide/insulin glargine U300 ([redacted]; Lixisenatide [redacted]); Insulin glargine ([redacted])	**Location in CTD:** 4.2.1.1-17
Species/Strain: Dog/Beagle (HsdRcc:DOBE)	**Vehicle:** Placebo ([redacted]	**Study No.:** [DIVV0050]
Gender/No. per Group: Male/n=6-8	**Treatment Schedule:**	**Study Period:** [redacted]-20[redacted] to [redacted]-20[redacted]
Weight/Age: 8-14 kg/22-37 m	**Administration:** SC injection	
	Doses: insulin glargine (0.3 U/kg SC)/ lixisenatide (0.15 µg/kg SC).	**GLP Compliance:** Not required
Other protocol information:		
Statistics: The Levene test was used to test the hypothesis of homogeneous variances. Due to heterogeneous variances with respect to factor time a two-way ANOVA for heterogeneous variances for factor time was applied for parameter blood glucose. This was followed by the Winer test for the comparison of treatment effects at specific time points and the Dunnett test for multiple comparisons versus the placebo treated control group. The results are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). P-values <0.05 were regarded as statistically significant. All analyses were performed using SAS (version 9.2) under HP-UX via interface software EverStat V6.0 and SAS (version 9.2) running on Windows 7.		

表 2.6.3.2.3C - Primary pharmacodynamics - in vivo (continued)

Title: Acute effects of a subcutaneous injection of low dose lixisenatide mixed into two different concentrations of insulin glargine, U100 and U300, on oral glucose tolerance in male dogs (continued)
Results: In this OGTT study in normoglycemic dogs a low dose of lixisenatide (0.15 µg/kg SC) was combined with 0.3 U/kg SC insulin glargine injected at two different strengths (100 U/mL and 300 U/mL). Equal doses of lixisenatide and insulin glargine 100 U/mL both as monotherapy were injected for comparison. Following the oral glucose gavage at 0.5h there was an immediate increase in blood glucose in the control group peaking at 1h followed by a slower return back close to baseline at around 3h (= absorptive phase). In the following postabsorptive phase blood glucose in controls stayed at normoglycemic levels until the end of the experiment at 8h. Treatment with 0.15 µg/kg lixisenatide significantly diminished blood glucose excursion at 1h but levels were no longer significantly different to control values from 1.5h to 8h. In contrast, treatment with 0.3 U/kg insulin glargine (100 U/mL) alone showed significant blood glucose reduction versus control only from 4h to 8h during the postabsorptive phase and being already close to significance threshold at 3h. Subcutaneous injections of mixtures containing the same doses of lixisenatide and insulin glargine (0.15 µg/kg and 0.3 U/kg) resulted in complementary effects with both premixes, 50 µg/mL and 100 U/mL or 150 µg/mL and 300 U/mL. Combined effects of the premixes on blood glucose were similar to that of lixisenatide alone during the absorptive phase and to that of insulin glargine in the postabsorptive phase. Specific differences between the two strengths of insulin glargine in combination could be observed at 3h and at 8h reflecting the improved time-action profile of the 300 U/mL compared to the 100 U/mL preparation.
Conclusion: In an OGTT in dogs a premixed combination of lixisenatide and insulin glargine showed complementary effects on blood glucose that were similar to that of lixisenatide alone during the absorptive phase and to insulin glargine during the postabsorptive phase. In addition specific differences between the two strengths of insulin glargine in the combination product could be observed that reflect the improved time-action profile of the 300 U/mL versus the 100 U/mL preparation of insulin glargine.

Abbreviations: SC: Subcutaneous; OGGT: Oral glucose tolerance test

3　副次的薬理試験

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）／リキシセナチド製剤（以下、リキシセナチド）配合剤の副次的薬理試験は実施していない。リキシセナチドの副次的薬理試験については、[Module 1.13.1-4]を参照のこと。

4　安全性薬理試験

インスリン グラルギン及びリキシセナチドの一般薬理もしくは安全性薬理については、[Module1.13.1-2] [Module1.13.1-4]を参照のこと。インスリン グラルギンとリキシセナチドの併用による安全性薬理試験 - 麻酔イヌの心血管系への単回静脈内投与の影響 - を以下に示す。

表 2.6.3.4.1 - Safety pharmacology overview – noteworthy findings

Test Article: Insulin glargine / lixisenatide

Organ System Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose or Concentration	No. per Group and Gender (M/F)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location
CV (in vivo)								
Cardiovascular System (in vivo)	Dog (Beagle)	Intravenous	10 µg/kg AVE0010 alone and in co-administration with insulin glargine	8 M / group	AVE0010: moderate but statistically significant decrease in serum glucose concentration, slight but significant increase in heart rate, marginal but significant decrease of PQ interval duration related to heart rate increase; Co-administration of AVE0010 and insulin glargine: Effects observed with insulin glargine alone were not modified by AVE0010	Yes	[CVR0345]	4.2.1.3-1

Abbreviations: M: male, F: female, CV: cardiovascular.

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - hemodynamic, electrocardiography (dog)

Title: Insulin glargine/AVE0010 combination - Effect of a single intravenous dose on cardiovascular function in anesthetized dogs

Species/Strain: Dog/ Beagle

Test Article (Batch): Lixisenatide ([redacted])
Insulin glargine ([redacted])

Study No.: [CVR0345]

Number per Group/Gender: 8 M

Vehicle/Formulation: ready-to-use solutions

Location: 4.2.1.3-1

4 groups: vehicle, lixisenatide, insulin glargine, lixisenatide + insulin glargine

Method of Administration: Intravenous route

Start Date: [redacted] 20[redacted]

Age: 19.5 to 29.4 months. **Body Weight:** 7.2 to 10.9 Kg

Anesthesia: intravenous administration of thiopental, followed by isoflurane inhalation (2 to 3%)

GLP Compliance: Yes

Measured or Calculated Parameters: Serum glucose, Serum potassium, Body temperature, Heart Rate (**HR**), **PQ, QRS, QT, QTcF (Fridericia), QTcW (Van de Water's)** intervals

- Before injection of the second treatment

Parameter (Unit) (Mean ± SEM)	**Vehicle**	**10 µg/kg lixisenatide**	
Glucose (mmol/L)	5.54 ± 0.154	4.11 ± 0.159**	
Potassium (mmol/L)	5.2 ± 0.08	4.9 ± 0.08*	
Body temperature (°C)	38.0 ± 0.02	38.0 ± 0.02	
HR (beats/min)	107 ± 1.1	112 ± 1.2**	
PQ interval (ms)	100 ± 0.6	99 ± 0.6*	
QRS complex (ms)	37 ± 0.2	38 ± 0.2	
QT interval (ms)	227 ± 1.1	226 ± 1.1	
QTcF interval (ms)	275 ± 1.2	278 ± 1.2*	
QTcW interval (ms)	265 ± 0.8	266 ± 0.8	

Additional Information: * p<0.05; ** p<0.001;

Conclusion: AVE0010 induced a moderate but statistically significant decrease in serum glucose concentration, reaching a maximum at the end of infusion, a slight but significant increase in heart rate at mid infusion and at the end of infusion, and a marginal but significant decrease of PQ interval duration at mid infusion related to heart rate increase. The co-administration of AVE0010 with insulin glargine did not modify the effects observed with insulin glargine alone

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - hemodynamic, electrocardiography (dog) (continued)

Title: Insulin glargine/AVE0010 combination - Effect of a single intravenous dose on cardiovascular function in anesthetized dogs (continued)

Species/Strain: Dog/ Beagle

Test Article (Batch): Lixisenatide ([redacted])
Insulin glargine ([redacted])

Study No.: [CVR0345]

Number per Group/Gender: 8 M

Vehicle/Formulation: ready-to-use solutions

Location: 4.2.1.3-1

4 groups: vehicle, lixisenatide, insulin glargine, lixisenatide + insulin glargine

Method of Administration: Intravenous route

Start Date: [redacted]20[redacted]

Age: 19.5 to 29.4 months. **Body Weight:** 7.2 to 10.9 Kg

Anesthesia: intravenous administration of thiopental, followed by isoflurane inhalation (2 to 3%)

GLP Compliance: Yes

Measured or Calculated Parameters: Serum glucose, Serum potassium, Body temperature, Heart Rate (**HR**), **PQ, QRS, QT, QTcF (Fridericia), QTcW (Van de Water's)** intervals

- During / end of infusion

Parameter (Unit)* (Mean ± SEM)	**Vehicle**	**10 µg/kg lixisenatide**	**0.1 U/kg insulin glargine**	**10 µg/kg lixisenatide + 0.1 U/kg insulin glargine**	
Glucose (mmol/L)**	5.77 ± 0.388	4.23 ± 0.483	5.46 ± 0.363	3.85 ± 0.155	
Potassium (mmol/L)**	5.3 ± 0.13	5.0 ± 0.40	5.2 ± 0.16	4.8 ± 0.16	
Body temperature (°C)	38.0 ± 0.14	38.2 ± 0.12	38.0 ± 0.18	37.9 ± 0.08	
HR (beats/min)	109 ± 4.4	115 ± 2.9	107 ± 5.0	111 ± 3.2	
PQ interval (ms)	102 ± 4.8	97 ± 4.3	99 ± 5.5	99 ± 3.8	
QRS complex (ms)	37 ± 1.0	37 ± 0.7	37 ± 0.6	38 ± 0.6	
QT interval (ms)	223 ± 6.7	222 ± 8.0	229 ± 8.7	225 ± 6.3	
QTcF interval (ms)	271 ± 6.1	275 ± 8.3	276 ± 7.4	276 ± 7.2	
QTcW interval (ms)	261 ± 5.4	263 ± 7.1	266 ± 6.9	264 ± 5.9	

Additional Information: * end of 30-minute infusion; ** mean during infusion

Conclusion: AVE0010 induced a moderate decrease in serum glucose concentration, reaching a maximum at the end of infusion, a slight increase in heart rate at mid infusion and at the end of infusion, and a marginal but significant decrease of PQ interval duration at mid infusion related to heart rate increase. The co-administration of AVE0010 with insulin glargine did not modify the effects observed with insulin glargine alone

表 2.6.3.4.2 - Safety pharmacology - cardiovascular in vivo - hemodynamic, electrocardiography (dog) (continued)

Title: Insulin glargine/AVE0010 combination - Effect of a single intravenous dose on cardiovascular function in anesthetized dogs (continued)

Species/Strain: Dog/ Beagle

Test Article (Batch): Lixisenatide ([redacted])
Insulin glargine ([redacted])

Study No.: [CVR0345]

Number per Group/Gender: 8 M

Vehicle/Formulation: ready-to-use solutions

Location: 4.2.1.3-1

4 groups: vehicle, lixisenatide, insulin glargine, lixisenatide + insulin glargine

Method of Administration: Intravenous route

Start Date: [redacted] 20[redacted]

Age: 19.5 to 29.4 months. **Body Weight:** 7.2 to 10.9 Kg

Anesthesia: intravenous administration of thiopental, followed by isoflurane inhalation (2 to 3%)

GLP Compliance: Yes

Measured or Calculated Parameters: Serum glucose, Serum potassium, Body temperature, Heart Rate (**HR**), **PQ, QRS, QT, QTcF (Fridericia), QTcW (Van de Water's)** intervals

- After infusion

Parameter (Unit)* (Mean ± SEM)	**Vehicle**	**10 µg/kg lixisenatide**	**0.1 U/kg insulin glargine**	**10 µg/kg lixicsenatide + 0.1 U/kg insulin glargine**	
Glucose (mmol/L)**	5.52 ± 0.325	4.33 ± 0.403	1.69 ± 0.143	1.52 ± 0.158	
Potassium (mmol/L)**	5.4 ± 0.10	5.2 ± 0.38	4.5 ± 0.09	4.3 ± 0.12	
Body temperature (°C)	38.0 ± 0.16	38.3 ± 0.13	38.1 ± 0.19	38.0 ± 0.07	
HR (beats/min)	112 ± 5.1	111 ± 2.5	124 ± 5.0	122 ± 3.4	
PQ interval (ms)	100 ± 5.4	97 ± 5.1	94 ± 4.5	98 ± 3.6	
QRS complex (ms)	37 ± 0.8	37 ± 0.6	38 ± 0.7	38 ± 0.8	
QT interval (ms)	219 ± 6.8	222 ± 7.7	227 ± 7.3	231 ± 6.5	
QTcF interval (ms)	268 ± 6.2	272 ± 8.4	289 ± 8.0	293 ± 8.4	
QTcW interval (ms)	258 ± 5.5	262 ± 7.1	272 ± 6.5	275 ± 6.5	

Additional Information: * 30 minutes after end of infusion; ** mean 2 to 30 minutes after infusion

Conclusion: AVE0010 induced a moderate decrease in serum glucose concentration, reaching a maximum at the end of infusion, a slight increase in heart rate at mid infusion and at the end of infusion, and a marginal but significant decrease of PQ interval duration at mid infusion related to heart rate increase. The co-administration of AVE0010 with insulin glargine did not modify the effects observed with insulin glargine alone

5　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし