インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.6.1 緒言

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 2
略語一覧 3
2.6.1 緒言 5
2.6.1.1 特性及び名称 5
2.6.1.2 臨床試験に使用した製剤の詳細 5
2.6.1.3 効能又は効果、用法及び用量案 6
2.6.1.4 非臨床試験計画 6
参考文献 8

図目次

ページ

図 2.6.1-1 インスリン イコデクの分子構造 5

略語一覧

本略語一覧は、薬理試験の概要文（Module 2.6.2）以外の非臨床の概要文で使用されている共通の略語一覧である。したがって、本概要文に関連しない略語も含まれる場合がある。

ADME	:	absorption, distribution, metabolism, and excretion（吸収、分布、代謝及び排泄）
Ado	:	8-amino-3,6-dioxaoctanic acid（8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸）
AUC	:	area under the plasma drug concentration-time curve（血漿中濃度 - 時間曲線下面積）
B/T	:	bound over total（結合率）
BDC	:	bile duct cannulated（胆管カニューレ挿入）
BHK	:	baby hamster kidney（仔ハムスター腎）
CAS	:	Chemical Abstract Service
CHO	:	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CHMP	:	committee for medicinal products for human use（欧州医薬品委員会）
CI	:	confidence interval（信頼区間）
CL	:	body clearance（全身クリアランス）
C_{max}	:	maximum drug concentration observed in plasma（最高血漿中濃度）
cmp	:	counts per minute（カウント毎分）
CNS	:	central nervous system（中枢神経系）
COLO-205	:	human colon adenocarcinoma cell line（ヒト結腸腺癌細胞株）
C_{ss}	:	concentration at steady-state（定常状態濃度）
CV	:	cardiovascular（心血管）
CYP	:	cytochrome P-450（チトクローム P450）
DNA	:	deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DRF	:	dose range finding（用量範囲設定）
EC_{50}	:	half maximal effective concentration（50%有効濃度）
ECG	:	electrocardiogram（心電図）
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid（エチレンジアミン四酢酸）
Eic	:	C_{20} fatty diacid（C_{20} 脂肪二酸）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EU	:	European Union（欧州連合）
F	:	absolute bioavailability or female（絶対的バイオアベイラビリティ又は雌）
F0	:	the mother generation〔親世代（母動物）〕
F1	:	the off-spring generation（仔世代）
FDA	:	U.S. Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
GABA	:	γ-aminobutyric acid（γ-アミノ酪酸）
GIR	:	glucose infusion rates（グルコース注入速度）
GLP	:	good laboratory practice（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）
Glu	:	glutamic acid（グルタミン酸）
h	:	hours（時間）
HbA_{1c}	:	haemoglobin A_{1c}（ヘモグロビン A1c）
HEK-293	:	human embryonic kidney 293 cells（ヒト胎児腎細胞 293）
hERG	:	human *ether-a-go-go* related gene coding for the inward rectifying K^+ ion channel associated with QT prolongation（QT 延長と関連する内向き整流カリウムチャネルをコードするヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子）
HI	:	human insulin（ヒトインスリン）
His	:	histidine（ヒスチジン）
HMEC	:	human mammary epithelial cells（ヒト乳腺上皮細胞）
HMWP	:	high-molecular-weight proteins（高分子量タンパク質）
HPLC	:	high-performance liquid chromatography（高速液体クロマトグラフィー）
HPLC-RAD	:	HPLC coupled with radio-detection（放射能検出器付高速液体クロマトグラフィー）
HSA	:	human serum albumin（ヒト血清アルブミン）
i.v.	:	intravenous（静脈内）
IC_{50}	:	concentration of a drug that is required for 50% inhibition（50%阻害濃度）
ICH	:	International Council for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）

IGF-1	:	insulin-like growth factor-1（インスリン様成長因子‐1）
INN	:	international nonproprietary name（国際一般名）
insulin 287	:	insulin icodec（インスリン イコデク）
insulin icodec	:	INN for NNC0148-0000-0287（NNC0148-0000-0287 の国際一般名）
insulin X10	:	Asp^{B10}-human insulin（Asp^{B10}-ヒトインスリン）
IR	:	insulin receptor（インスリン受容体）
IR-A	:	insulin receptor A isoform（インスリン受容体 A アイソフォーム）
IR-B	:	insulin receptor B isoform（インスリン受容体 B アイソフォーム）
ISR	:	incurred sample reproducibility（実試料の再現性）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
JPE	:	Japanese Pharmaceutical Excipients（医薬品添加物規格）
K_d	:	dissociation constant（解離定数）
L6-hIR cell	:	rat L6 myoblasts overexpressing the human insulin receptor（ヒトインスリン受容体過剰発現ラット L6 筋芽細胞）
LC-MS	:	liquid chromatography combined with mass spectrometry（液体クロマトグラフィー質量分析法）
LLOQ	:	lower limit of quantification（定量下限値）
LOCI	:	luminescent oxygen channelling immunoassay（蛍光酸素チャネリング免疫測定法）
LYD	:	Landrace, Yorkshire, Duroc (pigs)〔ランドレース・ヨークシャー・デュロック種（ブタ）〕
Lys	:	lysine（リジン）
M	:	male（雄）
MCF-7	:	human mammary adenocarcinoma cell line（ヒト乳腺腺癌細胞株）
MTD	:	maximum tolerated dose（最大耐量）
NOAEL	:	no observed adverse effect level（無毒性量）
NOEL	:	no observed effect level（無影響量）
NPH insulin	:	Neutral Protamine Hagedorn insulin (human insulin with prolonged action)〔Neutral Protamine Hagedorn インスリン（作用が長時間持続するヒトインスリン）〕
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
PD	:	pharmacodynamic(-s)（薬力学的作用）
PEG		polyethylenglycol（ポリエチレングリコール）
PK	:	pharmacokinetic(-s)（薬物動態）
PKB	:	protein kinase B（プロテインキナーゼ B）
PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（医薬品医療機器総合機構）
QC	:	quality control（品質管理）
(Q)SAR	:	(quantitative) structure-activity relationship〔（定量的）構造活性相関〕
QT interval	:	distance in an electrocardiogram（心電図における間隔）
Rac_{Obs}		observed ratio of accumulation（蓄積係数）
RIA	:	radioimmunoassay（ラジオイムノアッセイ）
RT		room temperature（室温）
s.c.	:	subcutaneous（皮下）
SD		standard deviation（標準偏差）
SEM		standard error of the mean（標準誤差）
SGBS	:	human adipocyte cell line derived from a patient with Simpson-Golabi-Behmel disease（Simpson-Golabi-Behmel 症候群患者由来ヒト脂肪細胞株）
SPR		surface plasmon resonance（表面プラズモン共鳴）
$t_{1/2}$	:	terminal plasma half-life（終末相半減期）
tau	:	dosing interval（投与間隔）
Thr	:	threonine（スレオニン）
TK		toxicokinetic(-s)（トキシコキネティクス）
t_{max}	:	time at which the highest drug concentration of drug in plasma occurs（最高血漿中濃度到達時間）
V_z	:	volume of distribution（分布容積）
ZDF	:	Zucker Diabetic Fatty (rats)〔Zucker Diabetic Fatty（ラット）〕

2.6.1 緒言

インスリン イコデクはヒトインスリン（HI）のアミノ酸配列のうち、B 鎖 30 位のストレオニン（Thr^{B30}）を欠落させ、A 鎖 14 位のチロシン（Tyr^{A14}）がグルタミン酸（Glu）に、B 鎖 16 位のチロシン（Tyr^{B16}）及び 25 位のフェニルアラニン（Phe^{B25}）がヒスチジン（His）に置換された HI アナログである。また、C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体が B 鎖 29 位のリジン（Lys^{B29}）側鎖のアミノ基を介してペプチド骨格に付加されている（図 2.6.1-1）。

インスリン イコデクは、これらの分子修飾によりアルブミンに強力に結合し、インスリン受容体（IR）に対する親和性は低いことから、遅いクリアランスと高い循環血中濃度によって、緩徐かつ持続的な薬力学（PD）反応を獲得した持効性製剤として作用する。

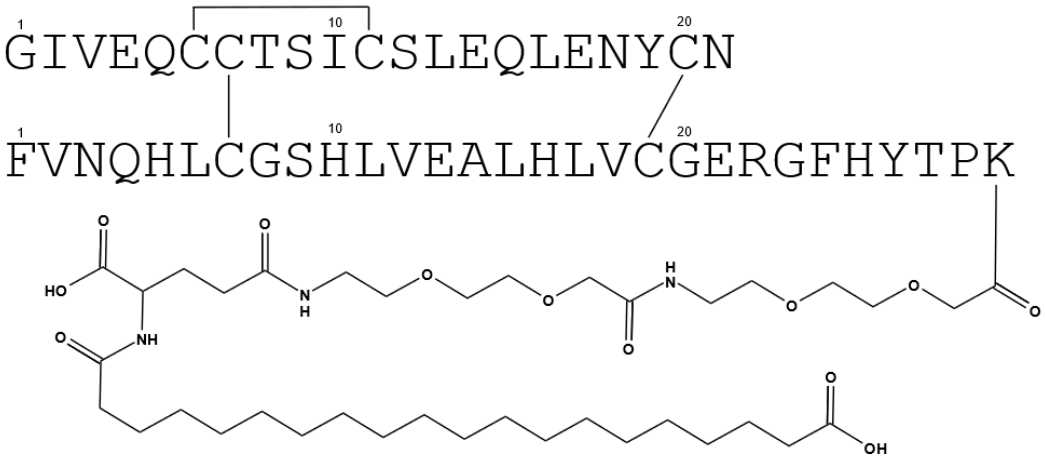
作用が長時間持続するため、糖尿病の治療には週 1 回皮下投与が適切と考える。

2.6.1.1 特性及び名称

インスリン イコデクは国際一般名（INN）である。医薬品一般的名称（JAN）はインスリン イコデク（遺伝子組換え）である。非臨床文書ではインスリン イコデク、insulin 287、NNC0148-0000-0287 及び NNC0148-0287 を同義語として使用している。

インスリン イコデクの CAS 番号は 1188379-43-2 である。分子式は $C_{280}H_{435}N_{71}O_{87}S_6$、分子量は 6380.26 Da である。

図 2.6.1-1 インスリン イコデクの分子構造



2.6.1.2 臨床試験に使用した製剤の詳細

インスリン イコデクの臨床試験に用いた製剤は週 1 回皮下投与用の無色澄明な液である。1 mL あたり 700 単位（4,200 nmol）のインスリン イコデクを含有する。さらに、安定化剤として亜鉛（酢酸亜鉛）、安定化剤及び防腐剤としてフェノール、防腐剤としてメタクレゾールが添加されている。また、等張化剤としてグリセロール及び塩化ナトリウムが添加されている。

非臨床試験では、インスリン投与量は一般に nmol 単位、臨床用量は単位（U）で表記する。1 単位はインスリン イコデク 6 nmol に相当する。

2.6.1.3　効能又は効果、用法及び用量案

＜効能又は効果＞

インスリン療法が適応となる糖尿病

＜用法及び用量＞

通常、成人では、1 週間に 1 回皮下注射する。初期は通常 1 回 30～140 単位とし、患者の状態に応じて適宜増減する。他のインスリン製剤を併用することがあるが、他のインスリン製剤の投与量を含めた維持量は、通常 1 週間あたり 30～560 単位である。但し、必要により上記用量を超えて使用することがある。

2.6.1.4　非臨床試験計画

非臨床試験では、インスリン イコデクが長い薬物動態（PK）及び PD プロファイルを示し、ヒトインスリンと同じ生物学的及び安全性プロファイルを有することを明らかにすることに焦点を当てている。このため、ほとんどの *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験では HI を対照薬として含め、また、*in vivo* がん原性試験評価を含む 52 週間のラット毒性試験では、HI を参照物質として使用した。

非臨床安全性プログラムは ICH M3(R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」（2009 年 6 月）[1]、ICH S6(R1)「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」（2011 年 6 月）[2]、ICH S5(R3)「医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン」（2020 年 2 月）[3]、ICH S7A「安全性薬理試験ガイドライン」（2000 年 11 月）[4]、ICH S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」（2005 年 5 月）[5]及び欧州医薬品庁（EMA）ガイダンス「Point to Consider Document on the Non-Clinical Assessment of the Carcinogenic Potential of Insulin Analogues」（2001 年 11 月）[6]に準拠して計画された。

インスリン イコデクの開発期間中を通じ、EMA の欧州医薬品委員会（CHMP）、米国食品医薬品局（FDA）、Health Canada、医薬品医療機器総合機構（PMDA）及び欧州各国の規制当局との間で定期的な協議を行い、助言を求めた。得られた助言を開発戦略の中で検討した。

すべての重要な非臨床安全性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）の原則に準拠し、経済協力開発機構（OECD）加盟国又は OECD のデータ相互受け入れ制度（Mutual Acceptance of Data）参加国において実施された。個々の試験の GLP 適用状況を非臨床試験の概要表に示す。

In vivo 安全性試験はラット、ウサギ、イヌ及びブタを用いて実施した。ラット及びイヌは、これらの動物種の薬理学的な反応性と皮下投与用インスリンアナログの評価に用いるげっ歯類及び非げっ歯類として推奨されてきた過去の経緯に基づき、一般毒性試験に最適な種として選択した。

インスリン イコデクの非臨床プログラムは、効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験（Module 2.6.2）、薬物動態試験（Module 2.6.4）、局所刺激性試験、一般毒性試験、生殖毒性試験及びがん原性評価（Module 2.6.6）で構成される。

参考文献

[1] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2), Current step 4 version. 11 Jun 2009.

[2] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1), Current step 4 version. Parent guideline dated 16 July 1997. Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June 2011. 16 Jul 1997.

[3] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals S5(R3), Current Step 4 version. Parent Guideline dated 24 June 1993 (Addendum dated 9 November 2000 incorporated in November 2005). 18 Feb 2020.

[4] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7A, Step 4 version. 08 Nov 2000.

[5] ICH Harmonised Tripartite Guideline. The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals S7B, Current Step 4 version. 12 May 2005.

[6] European Medicines Agency. Points to consider document on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of human insulin analogues (CPMP/SWP/372/01). 15 Nov 2001.

インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.6.2 薬理試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 3
表目次 4
略語一覧 6
2.6.2 薬理試験の概要文 8
2.6.2.1 まとめ 8
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験（1）：受容体との結合 9
2.6.2.2.1.1 ヒト IR-A 及び IR-B との結合（[redacted] 12-11-2010 試験） 10
2.6.2.2.1.2 動物の IR-A 及び IR-B との結合（[redacted]120424 試験） 13
2.6.2.2.1.3 動物の肝臓の IR との結合（[redacted]120425 試験） 14
2.6.2.2.1.4 IGF-1R との結合（[redacted]110524 及び[redacted]120426 試験） 15
2.6.2.2.1.5 IR に対する結合動態（[redacted]120429 試験） 17
2.6.2.2.1.6 インスリン受容体シグナル伝達（323020 及び[redacted]111101 試験） 19
2.6.2.2.1.7 受容体との結合に関する結論 21
2.6.2.2.2 *In vitro* 薬理試験（2）：代謝促進作用 21
2.6.2.2.2.1 ヒト脂肪細胞系におけるグルコース取り込み（[redacted]20110524.1 及び[redacted]20110524.2 試験） 22
2.6.2.2.2.2 ラット肝細胞におけるグリコーゲン蓄積（[redacted]HEPGLY 25-MAY-2011 試験） 24
2.6.2.2.2.3 ラット骨格筋由来 L6-hIR 細胞及びヒト MCF-7 細胞におけるグリコーゲン合成（[redacted]110510 及び[redacted]110406 試験） 26
2.6.2.2.2.4 *In vitro* 代謝促進作用に関する結論 29
2.6.2.2.3 *In vitro* 薬理試験（3）：細胞増殖促進作用 29
2.6.2.2.3.1 HMEC、COLO-205 細胞、MCF-7 細胞及び L6-hIR 細胞における細胞増殖促進作用（215074、211431、211021 及び 301435 試験） 30
2.6.2.2.4 *In vivo* 薬理試験 33
2.6.2.2.4.1 ラットを用いた血漿中 HbA1c に対する作用（[redacted]110404 試験） 34
2.6.2.2.4.2 イヌを用いた血漿中グルコースに対する作用（[redacted]110405 試験） 36
2.6.2.2.4.3 イヌを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験（[redacted]110307 試験） 37
2.6.2.2.4.4 ブタを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験（[redacted]101002 及び[redacted]111103 試験） 40
2.6.2.2.4.5 ブタを用いた血漿中グルコースに対する作用（[redacted]160103 試験） 43
2.6.2.3 副次的薬理試験 44
2.6.2.3.1 *In vitro* 試験 44
2.6.2.3.1.1 受容体結合アッセイ（212064 及び 212175 試験） 44
2.6.2.4 安全性薬理試験 45
2.6.2.4.1 *In vitro* 安全性薬理試験 45

2.6.2.4.1.1 hERG チャネル電流に及ぼす影響の *in vitro* 評価（211478 試験）.....45
2.6.2.4.1.2 分離ウサギプルキンエ線維の活動電位パラメータに及ぼす影響の *in vitro* 評価（211479 試験）.....45
2.6.2.4.2 *In vivo* 安全性薬理試験.....45
2.6.2.4.2.1 中枢神経系に及ぼす影響（211472 試験）.....45
2.6.2.4.2.2 呼吸器系に及ぼす影響（211471 試験）.....45
2.6.2.4.2.3 心血管系に及ぼす影響.....46
2.6.2.4.2.3.1 ビーグル犬に単回投与したときの心血管系に及ぼす影響の評価（211468 試験）.....46
2.6.2.4.2.3.2 ビーグル犬を用いた反復投与毒性試験における ECG の評価（211240 及び 213222 試験）.....46
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....47
2.6.2.6 考察及び結論.....48
参考文献.....50

図目次

ページ

図 2.6.2-1 HSA 非存在下又は存在下での可溶化ヒト IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデク及び HI の競合的結合.....12
図 2.6.2-2 HSA 非存在下での可溶化ヒト IGF-1R に対するインスリン イコデク、HI 及びヒト IGF-1 の競合的結合.....16
図 2.6.2-3 HSA 存在下での膜画分内ヒト IGF-1R に対するインスリン イコデク、HI 及びヒト IGF-1 の競合的結合.....17
図 2.6.2-4 ヒト IR-A に対するインスリン イコデクの結合動態.....18
図 2.6.2-5 インスリン イコデク及び HI 誘発による CHO 細胞に発現させた IR-A 及び IR-B の自己リン酸化.....20
図 2.6.2-6 インスリン イコデク及び HI 誘発による下流の PKB リン酸化.....21
図 2.6.2-7 インスリン イコデク及び HI に応答したラット初代培養脂肪細胞のグルコース取り込み.....23
図 2.6.2-8 インスリン イコデク及び HI に応答したヒト SGBS 脂肪細胞のグルコース取り込み.....24
図 2.6.2-9 HSA 非存在下でのインスリン イコデク及び HI に応答したラット肝細胞のグリコーゲン蓄積.....25
図 2.6.2-10 0.1% HSA 添加時のインスリン イコデク及び HI に応答したラット肝細胞のグリコーゲン蓄積.....26
図 2.6.2-11 インスリン イコデク及び HI に応答したラット骨格筋由来 L6-hIR 細胞のグリコーゲン合成.....28
図 2.6.2-12 インスリン イコデク及び HI に応答したヒト MCF-7 細胞のグリコーゲン合成.....28
図 2.6.2-13 インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答した HMEC の DNA 合成.....31

図 2.6.2-14　インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答したヒト COLO-205 細胞の DNA 合成.....31
図 2.6.2-15　インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答した MCF-7 細胞の DNA 合成.....32
図 2.6.2-16　インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答したラット骨格筋由来 L6-hIR 細胞の DNA 合成.....32
図 2.6.2-17　インスリン イコデクを反復投与した ZDF ラットにおける血漿中 HbA1c の変化.....35
図 2.6.2-18　インスリン イコデクを単回投与したビーグル犬における血漿中グルコース濃度及び血漿中インスリン イコデク曝露量の変化.....37
図 2.6.2-19　ビーグル犬におけるインスリン イコデク及びインスリン グラルギン投与後の高インスリン正常血糖クランプでの正常血糖維持に必要な GIR の変化.....39
図 2.6.2-20　ブタにおけるインスリン イコデク及びインスリン グラルギン投与後の高インスリン正常血糖クランプでの正常血糖維持に必要な GIR の変化（実験 1）.....41
図 2.6.2-21　ブタにおけるインスリン イコデク及びインスリン グラルギン投与後の高インスリン正常血糖クランプでの正常血糖維持に必要な GIR の変化（実験 2）.....42
図 2.6.2-22　インスリン イコデクの異なる製剤処方を単回投与した LYD ブタにおける血漿中グルコース濃度及び血漿中インスリン イコデク曝露量の変化.....44

表目次

ページ

表 2.6.2-1　*In vitro* 薬理試験（1）：受容体との結合.....10
表 2.6.2-2　可溶化ヒト IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデクの相対的結合親和性.....12
表 2.6.2-3　ラット、ブタ及びヒト由来の膜画分内 IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデクの相対的結合親和性.....14
表 2.6.2-4　ラット、イヌ、ブタ及びヒトの肝臓の内因性 IR に対するインスリン イコデクの相対的結合親和性.....15
表 2.6.2-5　IR 及び PKB のリン酸化に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）.....21
表 2.6.2-6　*In vitro* 薬理試験（2）：代謝促進作用の効力.....22
表 2.6.2-7　脂肪細胞のグルコース取り込みに対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）.....24
表 2.6.2-8　ラット肝細胞のグリコーゲン蓄積に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）.....26
表 2.6.2-9　L6-hIR 細胞及び MCF-7 細胞でのグリコーゲン合成に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）.....29
表 2.6.2-10　*In vitro* 薬理試験（3）：細胞増殖促進作用の効力.....29
表 2.6.2-11　インスリン イコデクの細胞増殖促進作用の相対的 EC_{50}（対 HI 比）.....33
表 2.6.2-12　*In vivo* 薬理試験.....33

表 2.6.2-13　イヌにおける高インスリン正常血糖クランプでのグルコース総注入量（GIR AUC）.....39
表 2.6.2-14　ブタにおける高インスリン正常血糖クランプでのグルコース総注入量（GIR AUC）.....42

略語一覧

AUC	:	area under the curve（曲線下面積）
BHK	:	baby hamster kidney（仔ハムスター腎）
BID	:	twice daily（1 日 2 回）
CHO	:	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CI	:	confidence interval（信頼区間）
C_{max}	:	maximum drug concentration observed in plasma（最高血漿中濃度）
CNS	:	central nervous system（中枢神経系）
COLO-205	:	human colon adenocarcinoma cell line（ヒト結腸腺癌細胞株）
CPM (cpm)	:	counts per minute（カウント毎分）
CV	:	cardiovascular（心血管系）
DNA	:	deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DPM (dpm)	:	disintegration per minute（壊変毎分）
EC_{50}	:	half maximal effective concentration（50%効果濃度）
ECG	:	electrocardiogram（心電図）
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid（エチレンジアミン四酢酸）
FCS	:	fetal calf serum（ウシ胎児血清）
FBS	:	fetal bovine serum（ウシ胎児血清）
G-6-PDH	:	glucose-6-phosphate dehydrogenase / hexokinase（グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ／ヘキソキナーゼ）
GABA	:	γ-aminobutyric acid（γ-アミノ酪酸）
GIR	:	glucose infusion rate（グルコース注入速度）
GIR AUC	:	area under the glucose infusion rate-time curve（グルコース注入速度－時間曲線下面積）
Glu	:	glutamic acid（グルタミン酸）
h	:	hour(s)（時間）
HbA1c	:	haemoglobin A1c（ヘモグロビン A1c）
HEK-293	:	human embryonic kidney cell 293（ヒト胎児腎細胞 293）
HEPES	:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid［4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸］
hERG	:	human *ether-a-go-go* related gene（ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子）
HI	:	human insulin（ヒトインスリン）
His	:	histidine（ヒスチジン）
HMEC	:	human mammary epithelial cell（ヒト乳腺上皮細胞）
HSA	:	human serum albumin（ヒト血清アルブミン）
IC_{50}	:	half maximal inhibitory concentration（50%阻害濃度）
ICH	:	International Council for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）
IGF-1	:	insulin-like growth factor-1（インスリン様成長因子-1）
IGF-1R	:	insulin-like growth factor-1 receptor（インスリン様成長因子-1 受容体）
insulin icodec	:	international nonproprietary name for NNC0148-0000-0287（NNC0148-0000-0287 の国際一般名）
insulin X10	:	Asp^{B10}-human insulin（Asp^{B10}-ヒトインスリン）
IR	:	insulin receptor（インスリン受容体）

IR-A	:	insulin receptor A isoform（インスリン受容体 A アイソフォーム）
IR-B	:	insulin receptor B isoform（インスリン受容体 B アイソフォーム）
K'on	:	provisional association rate constant（暫定的結合速度定数）
K'off	:	provisional dissociation constant（暫定的解離定数）
L6-hIR	:	(a proper name of a rat skeletal muscle derived recombinant L6 cells overexpressing the human insulin receptor)［（ヒトインスリン受容体過剰発現ラット骨格筋由来遺伝子組換え L6 細胞の固有名）］
LOCI	:	luminescent oxygen channeling immunoassay（蛍光酸素チャネリング免疫測定法）
LYD	:	Landrace Yorkshire Duroc（ランドレース・ヨークシャー・デュロック）
Lys	:	lysine（リジン）
mAb	:	monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
MCF-7	:	(a proper name of a human mammary adenocarcinoma cell line)［（ヒト乳腺がん細胞株の固有名）］
NaCl		sodium chloride（塩化ナトリウム）
NaOH		sodium hydroxide（水酸化ナトリウム）
NPH	:	neutral protamine Hagedorn
PBS	:	phosphate buffered saline（リン酸緩衝生理食塩液）
PD	:	pharmacodynamic(-s)（薬力学）
PK	:	pharmacokinetic(-s)（薬物動態）
PKB	:	protein kinase B（プロテインキナーゼ B）
Phe	:	phenylalanine（フェニルアラニン）
PVT	:	polyvinyltoluene（ポリビニルトルエン）
Q4D	:	once daily every 4 days（4 日に 1 回）
QT 間隔	:	(distance in an electrocardiogram)［（心電図間隔）］
SD	:	standard deviation（標準偏差）
SEM	:	standard error of the mean（平均値の標準誤差）
SGBS	:	Simpson-Golabi Behmel-syndrome（Simpson-Golabi-Behmel 症候群患者由来ヒト脂肪細胞株）
SPA	:	scintillation proximity assay（シンチレーション近接アッセイ）
Thr	:	threonine（スレオニン）
t_{max}	:	time at which the highest drug concentration of drug in plasma occurs（最高血漿中薬物濃度到達時間）
Tris	:	tris(hydroxymethyl)aminomethane［トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン］
Tyr	:	tyrosine（チロシン）
WGA	:	wheat germ agglutinin（小麦胚芽凝集素）
ZDF	:	Zucker diabetic fatty (rats)［Zucker Diabetic Fatty（ラット）］

2.6.2 薬理試験の概要文

インスリン イコデクは、ヒトインスリン（HI）のアミノ酸配列のうち、B 鎖 30 位のスレオニン（Thr^{B30}）を欠落させ、A 鎖 14 位のチロシン（Tyr^{A14}）がグルタミン酸（Glu）に、B 鎖 16 位のチロシン（Tyr^{B16}）及び 25 位のフェニルアラニン（Phe^{B25}）がヒスチジン（His）に置換された HI アナログである。また、C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体が B 鎖 29 位のリジン（Lys^{B29}）側鎖のアミノ基を介してペプチド骨格に付加されている。インスリン イコデクは、これらの分子修飾によりアルブミンに強力に結合し、インスリン受容体（IR）に対する親和性は低いことから、遅いクリアランスと高い循環血中濃度によって、緩徐かつ持続的な薬力学（PD）反応を獲得した持効性製剤として作用する。作用が持続的であるため、糖尿病の治療には週 1 回皮下投与が適切と考える。

2.6.2.1 まとめ

インスリン イコデクの効力を裏付ける試験として以下の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。一連の *in vitro* 試験から、インスリン イコデクは IR に特異的な完全アゴニストであり、その作用機序（受容体下流のシグナル伝達）は、HI 及びその他のインスリンアナログと同じであることが示された。ラット、イヌ及びブタを用いた *in vivo* 薬理試験では、インスリン イコデクの単回及び反復投与において血糖降下作用が示された。

***In vitro* 薬効薬理試験**

ラット、イヌ、ブタ及びヒト IR との結合
ラット、イヌ及びヒトインスリン様成長因子-1 受容体（IGF-1R）との結合
IR に対する結合動態
IR 結合後のシグナル伝達に対する作用
細胞内代謝（グルコース取り込み、グリコーゲン蓄積及びグリコーゲン合成）に対する作用
細胞増殖に対する作用

***In vivo* 薬効薬理試験**

ラットの血漿中ヘモグロビン A1c（HbA1c）に対する作用
イヌの血漿中グルコースに対する作用
イヌ及びブタを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験でのグルコース注入に対する作用
ブタの血漿中グルコースに対する作用

インスリン イコデクは、HI と同様に、検討した様々な動物種（ラット、イヌ、ブタ及びヒト）由来の IR（2 つのアイソフォーム IR-A 及び IR-B を含む）に特異的に結合した。これら IR に対するインスリン イコデクの親和性は HI よりも低く、アルブミンの添加で更に低下した。IR と構造的に類似する IGF-1R に対しては、インスリン イコデクは極めて低い親和性しか示さなかった。インスリン イコデクは、HI と同様に濃度依存的に IR をリン酸化し、受容体下流のシグナル伝達経路を刺激した。したがってインスリン イコデクは HI と同じ作用機序により IR を活性化することが示された。

インスリンの主要な標的器官（脂肪、肝臓及び筋肉）に由来する細胞を用いて実施した機能アッセイにおいて、インスリン イコデクは、HI と同様に濃度依存的に細胞内代謝（脂肪細胞でのグルコース取り込み及び脂質生成ならびに肝細胞及び筋細胞でのグリコーゲン合成）を促進した。HI は増殖促進作用を有することが知られているため、HMEC、COLO-205 細胞、L6-hIR 細胞、及び MCF-7 細胞（それぞれ初代培養ヒト乳腺上皮細胞、ヒト結腸がん細胞、ヒト IR 過剰発現ラット骨格筋由来遺伝子組換え細胞及びヒト乳腺細胞）において、インスリン イコデクの *in vitro* 細胞増殖に及ぼす作用を検討したところ、HI と同じ濃度依存的な様式で細胞増殖を促進した。ただし、細胞増殖促進作用、代謝促進作用ともに 50%効果濃度（EC_{50}）で評価したインスリン イコデクの効力は HI と比較して低く、これはインスリン イコデクの IR への親和性が HI よりも低いことと一致していた。細胞増殖促進／代謝促進作用の効力比は HI と同程度であったことから、インスリン イコデクの代謝促進作用と増殖促進作用のバランスは HI と同様であることが示された。

In vivo PD 試験は、動物モデルにおいて、臨床で使用されている代表的なインスリン製剤とインスリン イコデク（いずれも皮下投与）との薬効を比較することを主な目的とした。インスリン抵抗性／糖尿病を呈する Zucker Diabetic Fatty（ZDF）ラット、非糖尿病ビーグル犬及びランドレース・ヨークシャー・デュロック（LYD）ブタを用いて実施した効力を裏付ける試験において、インスリン イコデクは HI の薬理作用を保持していることが示された。ビーグル犬及び LYD ブタへのインスリン イコデクの単回投与で血糖降下作用が認められた。ZDF ラットへのインスリン イコデクの反復投与では、HbA1c 値が用量依存的に低下し、その効力は neutral protamine Hagedorn（NPH）インスリン（中間型 HI 製剤）の約半分であった。一方、ビーグル犬及び LYD ブタを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験において、グルコース注入速度（GIR）に基づくインスリン イコデクの効力は、インスリン グラルギン（HI を改変した持効型製剤）の約 2 倍であった。

In vivo 安全性薬理試験で中枢神経系（CNS）、心血管系（CV）及び呼吸系に対するインスリン イコデクの影響を検討したところ、ラットでは 150 nmol/kg まで、イヌでは 21 nmol/kg までの用量で良好な忍容性が認められ、毒性所見は認められなかった。

心臓不整脈誘発リスクを評価する *in vitro* 評価として、ヒト *ether-a-go-go* 関連遺伝子（hERG）を導入したヒト胎児腎（HEK-293）細胞を用いたパッチクランプ試験及びウサギ心臓プルキンエ線維を用いた試験を実施した。インスリン イコデクは 10 µmol/L で hERG テール電流に対して弱い阻害作用（7%阻害）しか示さず、ヒトの心電図（ECG）間隔（QT 間隔）に及ぼす影響はないと考えられた。同用量でプルキンエ線維の活動電位に及ぼす影響も認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験（1）：受容体との結合

IR 及び構造的に類似する IGF-1R に対するインスリン イコデクの結合を検討するため、以下の *in vitro* 試験を実施した（表 2.6.2-1）。結合親和性は競合的受容体結合試験の 50%阻害濃度（IC_{50}）として示し、対照化合物の HI と比較した相対的 IC_{50} をインスリン イコデクの *in vitro* 効力として評価した。

インスリン イコデクには、アルブミンに結合するよう C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体が付加されているため、個々の *in vitro* 試験でアルブミン濃度がインスリン イコデクの相対的 IC_{50} あるいは EC_{50} 影響を及ぼすことから、表にはアルブミン濃度も記載した。

表 2.6.2-1　　*In vitro* 薬理試験（1）：受容体との結合

Parameter	Target molecule	Albumin	Reference compound	Study ID
IR binding	Solubilised human IR-A and IR-B (cell free assay)	(–)	HI	[redacted]_12-11-2010
		+ 0.1% HSA		
	Membrane-associated IR-As and IR-Bs from rat, porcine, and human origins (cell free assay)	+ 0.1% HSA*		[redacted]120424
	Membrane-associated liver IRs from rat, canine, porcine, and human origins (cell free assay)			[redacted]120425
IGF-1R binding	Solubilised human IGF-1R (cell free assay)	(–)	HI, IGF-1	[redacted]110524
	Membrane-associated IGF-1Rs from rat, canine, and human origins (cell free assay)	+ 0.1% HSA		[redacted]120426
IR binding kinetics	Membrane-associated human IR-A (cell free assay)	(–)	HI	[redacted]120429
Intracellular IR signalling	Human IR expressed on CHO cells (cell-based assay)	+ 0.01% ovalbumin, or + 0.1% HSA		323020 [redacted]111101

* For human IR-A, experiments were also conducted in the presence of 0.02% and 0.5% HSA.
CHO = Chinese hamster ovary, HI = human insulin, HSA = human serum albumin, IGF-1R = insulin-like growth factor-1 receptor, IR = insulin receptor, IR-A = insulin receptor A, IR-B = insulin receptor B.

2.6.2.2.1.1　ヒト IR-A 及び IR-B との結合（[redacted]_12-11-2010 試験）

目的

IR には 2 種のアイソフォーム（IR-A 及び IR-B）が存在し、その違いは同一 IR 遺伝子のエクソン 11 にコードされる 12 個のアミノ酸の欠損（IR-A）又は保持（IR-B）である。競合的受容体結合試験において、可溶化ヒト IR-A 及び IR-B に同程度の親和性で結合する HI との比較による、インスリン イコデクのそれぞれの相対的結合親和性を評価した。インスリン イコデクはアルブミンに結合することから、結合アッセイは所定濃度のヒト血清アルブミン（HSA）の非存在下ならびに存在下のそれぞれの条件で実施した。

方法

可溶化ヒト IR-A 及び IR-B は、IR-A 又は IR-B を過剰発現している遺伝子組換え仔ハムスター腎（BHK）細胞から部分精製した。これらの可溶化 IR に対するインスリン イコデクの結合親和性を、シンチレーション近接アッセイ（SPA）法を用いた[^{125}I]-HI 結合に対する競合的結合アッセイで測定した。溶媒又は段階希釈したインスリン イコデク（約 10^5～10^0 pmol/L、4 回繰り返し測定）もしくは非標識 HI（約 10^4～10^0 pmol/L、4 回繰り返し測定）を 96 ウェルプレートに調製し、可溶化 IR-A 又は IR-B を、[^{125}I]-HI、抗マウスポリビニルトルエン（PVT）SPA Beads（GE Healthcare）及び Ab83.7（マウス抗ヒト IR 抗体）を含む 1.5% HSA 不含又は含有 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）緩衝液とともに添加した。プレートを緩やかに振とうしながら 22°C で 24 時間インキュ

ベートし、2000 rpm で 2 分間遠心分離した。ビーズからの発光を TopCount NXT で測定し、抗体－抗体－ビーズ複合体に結合した IR に対する[^{125}I]-HI の特異的結合をモニタリングした。

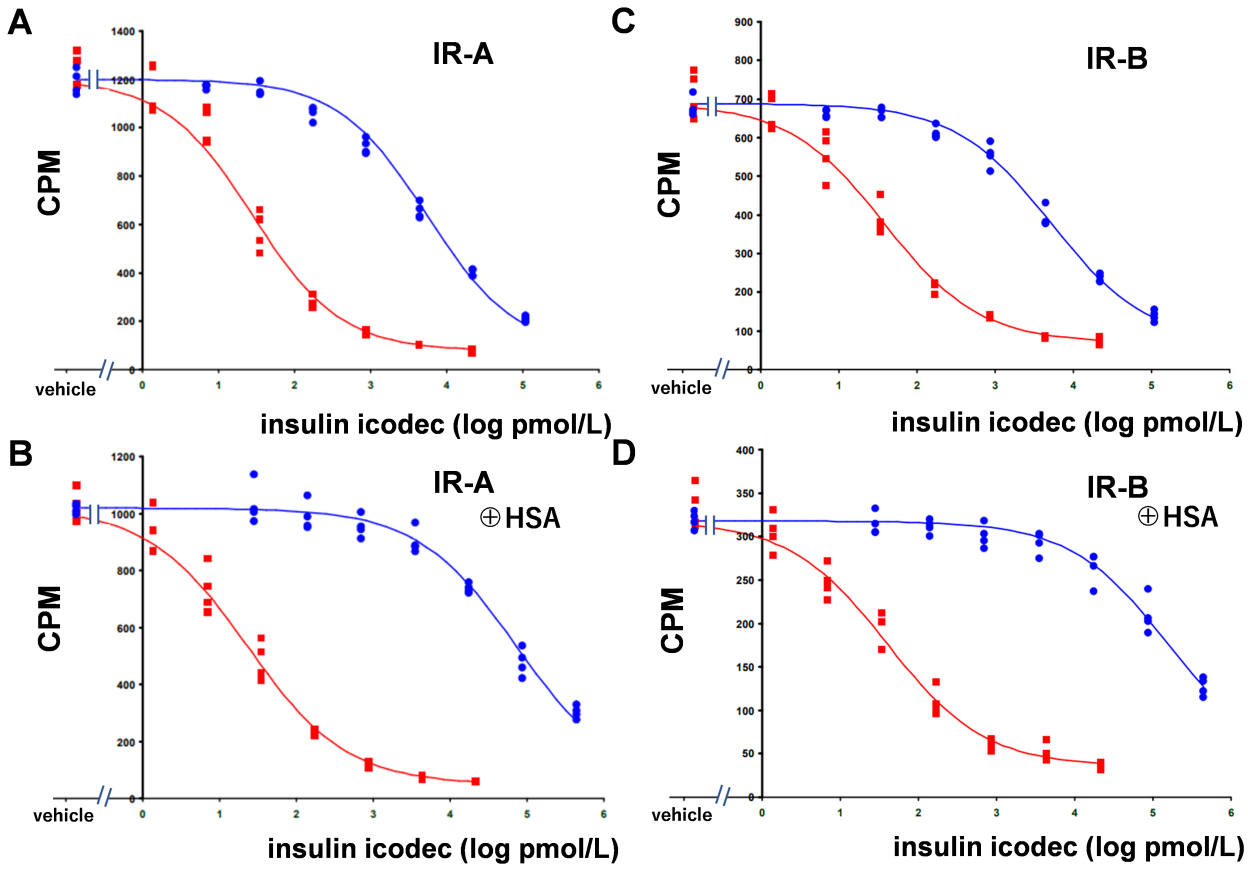
インスリン イコデク及び HI の IC_{50} は、同一プレートでの測定で得られた対数濃度－反応曲線から 4 パラメータロジスティック法（GraphPad Prism V5）（濃度－反応曲線を、傾き、ベース反応値及び最大反応値が同一との仮定のもとにフィットさせる）を用いて算出した。インスリン イコデクの相対的結合親和性は、「HI の IC_{50} /インスリン イコデクの IC_{50} × 100」で定義される相対的 IC_{50}（対 HI 比）で表した。

結果

1.5% HSA 存在下又は非存在下でのヒト IR-A 及び IR-B の競合的結合アッセイの代表例を図 2.6.2-1 に示す。インスリン イコデクは IR-A 及び IR-B の両方に競合的に結合し、HI と平行な濃度－反応曲線を示したが、結合は HI と比較して非常に弱かった。HI の IR-A 及び IR-B に対する濃度－反応曲線は、1.5% HSA の有無に関わらず同様であった。一方、インスリン イコデクの濃度－反応曲線は、1.5% HSA の存在下では IR-A 及び IR-B の両方について明らかに右方移動したことから、HSA がインスリン イコデクの IR-A 及び IR-B との結合を抑制したことが示された。

表 2.6.2-2 にインスリン イコデクの相対的結合親和性を相対的 IC_{50}（対 HI 比）で示す。HSA 非存在下での IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデクの相対的 IC_{50} はそれぞれ 0.50%［95%信頼区間（CI）：0.43～0.57%、3 回の実験］及び 0.78%（95%CI：0.68～0.89%、3 回の実験）であった。HSA 存在下での IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデクの相対的 IC_{50} はそれぞれ 0.03%（95%CI：0.03～0.04%、3 回の実験）及び 0.03%（95%CI：0.02～0.03%、3 回の実験）であった。

図 2.6.2-1　　HSA 非存在下又は存在下での可溶化ヒト IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデク及び HI の競合的結合



A　Competitive binding to IR-A without HSA
B　Competitive binding to IR-A with 1.5% HSA
C　Competitive binding to IR-B without HSA
D　Competitive binding to IR-B with 1.5% HSA

Each graph is a representable result among 3 independent experiments. Each symbol elicits individual value (n=4) of [^{125}I]-insulin binding to IR-A (A, B) or IR-B (C, D) in the presence of increasing concentrations of insulin icodec (● blue) or HI (■ red) with (B, D) or without (A, C) 1.5% HSA.

CPM = counts per minute, HSA = human serum albumin, HI = human insulin, IR-A = insulin receptor A, IR-B = insulin receptor B.
Source: Study [redacted]_12-11-2010

表 2.6.2-2　　可溶化ヒト IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデクの相対的結合親和性

Albumin	**Relative IC_{50} (% of HI) for IR-A**		**Relative IC_{50} (% of HI) for IR-B**	
	Individual values of three independent experiments	Mean (95%CI)	Individual values of three independent experiments	Mean (95%CI)
(–)	0.51	0.50 (0.43 – 0.57)	0.73	0.78 (0.68 – 0.89)
	0.54		0.89	
	0.46		0.69	
1.5% HSA	0.04	0.03 (0.03 – 0.04)	0.02	0.03 (0.02 – 0.03)
	0.03		0.03	
	0.03		0.03	

Relative binding affinities were evaluated as relative IC_{50} (% of HI), defined as (IC_{50} of HI) / (IC_{50} of insulin icodec) ×100, and shown as mean of 3 independent experiments. CI = confidence interval, HI = human insulin, HSA = human serum albumin, IC_{50} = half maximal inhibitory concentration, IR-A = insulin receptor A, IR-B = insulin receptor B. Source: Study [redacted]_12-11-2010

結論

可溶化ヒト IR-A 及び IR-B に対する競合的結合アッセイにおいて、インスリン イコデクは IR の両アイソフォームに結合することが示された。HI と比較した相対的結合親和性を相対的 IC_{50}（対 HI 比）で表したところ、HSA 非存在下では IR-A 及び IR-B に対して 0.50%及び 0.78%であった。1.5% HSA 存在下ではインスリン イコデクの親和性が低下し、相対的 IC_{50} は IR-A 及び IR-B のいずれに対しても 0.03%であった。HSA の存在による見かけの親和性の低下は、インスリン イコデクのアルブミン結合能を反映した。

2.6.2.2.1.2　動物の IR-A 及び IR-B との結合（[redacted]120424 試験）

目的

ラット、ブタ及びヒト由来 IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデクの結合親和性を、遺伝子組換え BHK 細胞の膜画分を用いて評価した。

方法

ラット、ブタ及びヒト由来遺伝子組換え IR-A 又は IR-B を BHK 細胞に発現させ、細胞ホモジネートから形質膜をショ糖密度勾配超遠心法で単離した。これらの膜画分内の IR（membrane-associated IR）に対するインスリン イコデクの結合親和性を、SPA 法を用いた[^{125}I]-HI 結合に対する競合的結合アッセイで測定した。膜画分（総タンパク質として約 1 µg）を 96 ウェルプレートに入れ、段階希釈したインスリン イコデク（約 10^7～10^2 pmol/L、2 回繰り返し測定）又は HI（約 10^6～10^0 pmol/L、2 回繰り返し測定）を、[^{125}I]-HI、小麦胚芽凝集素（WGA）コート PVT SPA Beads（GE Healthcare）及び 0.1% HSA を含む cOmplete™エチレンジアミン四酢酸（EDTA）フリープロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche）含有 HEPES 緩衝液とともに添加した。ヒト IR-A については、0.1% HSA 以外に 0.02%及び 0.5%の HSA 存在下でも SPA アッセイを実施した。プレートを緩やかに振とうしながら 25°C で 150 分間インキュベートし、2000 rpm で 2 分間遠心分離した。ビーズからの発光を TopCount NXT で測定し、膜－WGA ビーズ複合体に結合した IR に対する[^{125}I]-HI の特異的結合をモニタリングした。インスリン イコデクの IC_{50} 及び相対的結合親和性を既述の方法により算出した。

結果

参考として、0.1% HSA 存在下での膜画分内 IR に対する HI の IC_{50} は、ラット IR-A 及び IR-B に対してそれぞれ 0.68 及び 0.70 nmol/L、ブタ IR-A 及び IR-B に対してそれぞれ 0.41 及び 0.49 nmol/L、ヒト IR-A 及び IR-B に対してそれぞれ 1.2 及び 0.74 nmol/L であった。HI のこれらの IC_{50} に基づくと、0.1% HSA 存在下での膜画分内 IR に対するインスリン イコデクの相対的 IC_{50}（対 HI 比）は、ラット IR-A 及び IR-B に対してそれぞれ 0.05%及び 0.06%、ブタ IR-A 及び IR-B に対してそれぞれ 0.07%及び 0.06%、ヒト IR-A 及び IR-B に対してそれぞれ 0.05%及び 0.06%であった（表 2.6.2-3）。3 つの動物種のいずれにおいても、IR の短型アイソフォームと長型アイソフォームとの間で、HI と比較したインスリン イコデクの親和性に有意差は認められず、HI 及びインスリン イコデクのいずれについても明らかな種差は認められなかった。HSA 濃度を上昇させて（0.02%、0.1%及び 0.5%）ヒト IR-A に対するインスリン イコデクの結合親和性を評価したところ、相対的 IC_{50} は 0.16%から 0.05%及び 0.02%にそれぞれ低下した。

表 2.6.2-3　　ラット、ブタ及びヒト由来の膜画分内 IR-A 及び IR-B に対するインスリン イコデクの相対的結合親和性

Species	Albumin	Relative IC_{50} (% of HI) for IR-A mean (95%CI)	Relative IC_{50} (% of HI) for IR-B mean (95%CI)	Number of experiments
Rat	0.1% HSA	0.05 (0.04 – 0.05)	0.06 (0.05 – 0.07)	3
Pig		0.07 (0.06 – 0.08)	0.06 (0.04 – 0.08)	3
Human		0.05 (0.04 – 0.07)	0.06 (0.04 – 0.10)	3

Relative binding affinities were evaluated as relative IC_{50} (% of HI), defined as (IC_{50} of HI) / (IC_{50} of insulin icodec) × 100. Results are shown as mean of 3 independent experiments. CI = confidence interval, HI =human insulin, HSA = human serum albumin, IC_{50} = half maximal inhibitory concentration, IR-A = insulin receptor A, IR-B = insulin receptor B. Source: Study [redacted]120424

結論

ラット、ブタ及びヒト由来の膜画分内の IR-A 及び IR-B に対する競合的結合アッセイにおいて、インスリン イコデクは検討したいずれの動物種の IR に対しても同程度の親和性で結合することが示され、0.1% HSA 存在下での相対的 IC_{50}（対 HI 比）は 0.05～0.07%であった。HSA はヒト IR-A に対するインスリン イコデクの相対的 IC_{50} を濃度依存的に低下させた。HSA の存在による見かけの親和性の低下は、インスリン イコデクのアルブミン結合能を反映した。

2.6.2.2.1.3　動物の肝臓の IR との結合（[redacted]120425 試験）

目的

ラット、イヌ、ブタ及びヒトの肝臓の内因性 IR に対するインスリン イコデクの相対的結合親和性を、肝ホモジネートの膜画分を用いて評価した。

方法

ラット、イヌ、ブタ及びヒト（匿名の死亡女性）の肝ホモジネートから形質膜をショ糖密度勾配超遠心法で調製した。これらの膜画分内 IR に対するインスリン イコデクの結合親和性を、SPA 法を用いた[^{125}I]-HI 結合に対する競合的結合アッセイで測定した。

膜画分［総タンパク質として 25 µg（ラット及びイヌ）あるいは 50 µg（ブタ）］を 96 ウェルプレートに入れ、段階希釈したインスリン イコデク（約 10^{7}～10^{2} pmol/L、2 回繰り返し測定）又は HI（約 10^{6}～10^{0} pmol/L、2 回繰り返し測定）を、0.1% HSA を含む cOmplete™ EDTA フリープロテアーゼ阻害剤カクテル含有 HEPES 緩衝液とともに添加した。プレートを緩やかに振とうしながら 25°C で 150 分間インキュベートした。WGA コート PVT SPA Beads を添加し、混合液を更に 5 分間インキュベートした後、2000 rpm で 6 分間遠心分離した。ビーズからの発光を TopCount NXT で測定した。インスリン イコデクの IC_{50} 及び相対的結合親和性を既述の方法により算出した。

結果

ラット、イヌ、ブタ及びヒトの肝臓の IR に対するインスリン イコデクの相対的 IC_{50}（対 HI 比）は、それぞれ 0.04%、0.05%、0.04%及び 0.06%であった（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4　　ラット、イヌ、ブタ及びヒトの肝臓の内因性 IR に対するインスリン イコデクの相対的結合親和性

Species	Albumin	Relative IC_{50} (% of HI) mean (95%CI)	Number of experiments
Rat	0.1% HSA	0.04 (0.02 – 0.05)	3
Dog		0.05 (0.03 – 0.09)	3
Pig		0.04 (0.03 – 0.05)	3
Human		0.06*	1

* 95%CI was not calculated due to n=1.

Relative binding affinities were evaluated as relative IC_{50} (% of HI), defined as (IC_{50} of HI) / (IC_{50} of insulin icodec) × 100. Results are shown as mean of 3 independent experiments, except humans (n=1) due to lack of biological material. CI = confidence interval, HI =human insulin, HSA = human serum albumin, IC_{50} = half maximal inhibitory concentration, IR = insulin receptor. Source: Study [redacted]120425

結論

ラット、イヌ、ブタ及びヒトの肝臓の内因性画分内 IR に対する競合的結合アッセイにおいて、インスリン イコデクは検討したいずれの動物種の IR に対しても同程度の親和性で結合することが示され、0.1% HSA 存在下での相対的 IC_{50}（対 HI 比）は 0.04～0.06%であった。

2.6.2.2.1.4　IGF-1R との結合（[redacted]110524 及び[redacted]120426 試験）

目的

IR との結合に加えて、インスリンは IR と構造的に類似する IGF-1R にも結合するが、その親和性は非常に低い（本来のリガンドである IGF-1 のおよそ 1000 分の 1）。したがって、インスリンの生理学的濃度において IGF-1R に対する結合は重要な意味を持たないはずである。しかしながら、インスリンアナログのなかには IGF-1R との親和性が IR との親和性を超えるほどに増加しているものもあり、それらは HI よりも高い細胞増殖促進能を有する傾向があることから、一般的に、インスリンアナログの特性評価において IGF-1R との親和性は重要なパラメータであるとみなされている。

可溶化 IGF-1R 及び膜画分内 IGF-1R を用いて、ヒト IGF-1R に対するインスリン イコデクの結合親和性を 2 つの試験で評価した（[redacted]110524 及び[redacted]120426 試験）。ラット及びブタ由来の膜画分内 IGF-1R に対するインスリン イコデクの結合親和性も測定した（[redacted]120426 試験）。IGF-1 及び HI を対照化合物として使用した。

方法

（可溶化ヒト IGF-1R との結合）ヒト IGF-1R を過剰発現している BHK 細胞から可溶化ヒト IGF-1R を精製した。可溶化 IGF-1R に対するインスリン イコデクの結合親和性を、SPA 法を用いた[^{125}I]-IGF-1 結合に対する競合的結合アッセイで測定した。溶媒又は段階希釈したインスリン イコデク（約 10^7～10^2 pmol/L、4 回繰り返し測定）、HI（約 10^6～10^1 pmol/L、4 回繰り返し測定）、もしくはヒト IGF-1（約 10^4～10^0 pmol/L、4 回繰り返し測定）を 96 ウェルプレートに調製した。可溶化 IGF-1R を、[^{125}I]-ヒト IGF-1、抗マウス PVT SPA Beads 及び 24-31（マウス抗ヒト IGF-1R 抗体）を含む HSA 不含 HEPES 緩衝液とともに添加した。プレートを緩やかに振とうしながら 22°C で 24 時間インキュベートし、850 g で 2 分間遠心分離した（[redacted]110524 試験）。

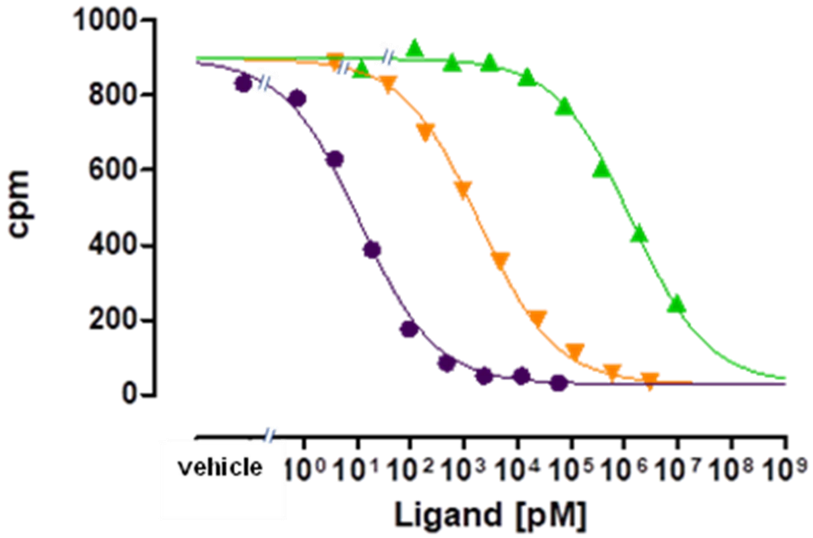
（膜画分内 IGF-1R との結合）ヒト、ラット及びイヌ由来遺伝子組換え IGF-1R を BHK 細胞に発現させ、細胞ホモジネートから形質膜をショ糖密度勾配超遠心法で単離した。これらの膜画分内 IGF-1R に対するインスリン イコデクの結合親和性を、SPA 法を用いた[^{125}I]-IGF-1 結合に対する競合的結合アッセイで測定した。膜画分（総タンパク質として 0.5 µg）を 96 ウェルプレートに入れ、段階希釈したインスリン イコデク（約 10^7～10^2 pmol/L、2 回繰り返し測定）、HI（約 10^7～10^2 pmol/L、2 回繰り返し測定）、又はヒト IGF-1（約 10^6～10^0 pmol/L、2 回繰り返し測定）を、[^{125}I]-ヒト IGF-1、WGA コート PVT SPA Beads 及び 0.1% HSA を含む cOmplete™ EDTA フリープロテアーゼ阻害剤カクテル含有 HEPES 緩衝液とともに添加した。プレートを緩やかに振とうしながら 25°C で 150 分間インキュベートし、1500 rpm で 6 分間遠心分離した（[redacted]120426 試験）。

ビーズからの発光を TopCount NXT で測定した。インスリン イコデクの IC_{50} 及び相対的結合親和性を既述の方法により算出した。

結果

HSA 非存在下での可溶化ヒト IGF-1R に対する競合的結合アッセイにおいて、インスリン イコデクはヒト IGF-1R にも結合したが、相対的 IC_{50}（対 HI 比）は 0.14%（95%CI：0.13～0.15%、3 回の実験）であった。陽性対照であるヒト IGF-1 の相対的 IC_{50}（対 HI 比）は 17837%であった。競合的結合アッセイの代表的な結果を図 2.6.2-2 に示す。

図 2.6.2-2　HSA 非存在下での可溶化ヒト IGF-1R に対するインスリン イコデク、HI 及びヒト IGF-1 の競合的結合

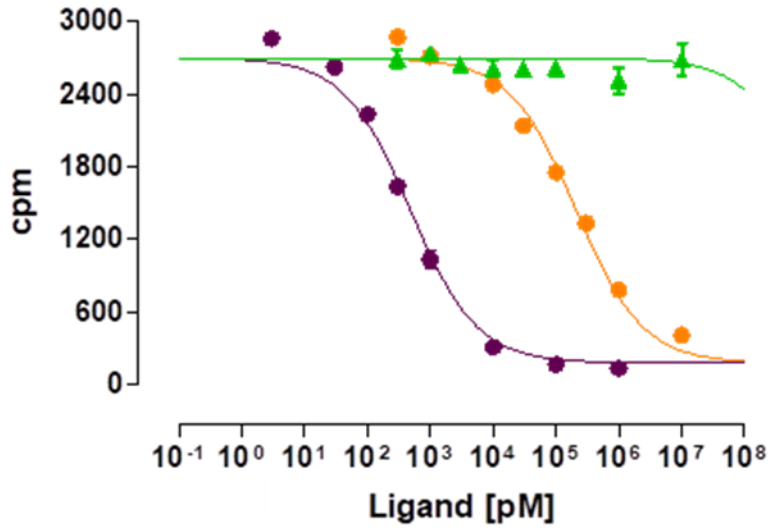


A representable result among 3 independent experiments performed in the absence of HSA. Each point elicits mean ± SEM (n=4) of [^{125}I]-IGF-1 binding to IGF-1R in the presence of increasing concentrations of Insulin icodec (▲green), HI (▼orange), or human IGF-1 (● maroon). CPM = counts per minute, HSA = human serum albumin, IGF-1 = insulin like-growth factor-1, IGF-1R = insulin-like growth factor-1 receptor. Source: Study [redacted]110524

0.1% HSA 存在下では、ヒト、イヌ及びラット由来の膜画分内 IGF-1R に対する競合的結合アッセイにおいて、インスリン イコデクは最高濃度（50,000 nmol/L）でも[^{125}I]-IGF-1 と IGF-R1 との結合を阻害

しなかったため、インスリン イコデクの相対的 IC_{50}（対 HI 比）は算出できなかった。陽性対照であるヒト IGF-1 のヒト、イヌ及びラット IGF-1R に対する相対的 IC_{50}（対 HI 比）は、それぞれ 61852%、71875%及び 74762%であった。競合的結合アッセイの代表的な結果を図 2.6.2-3 に示す。

図 2.6.2-3　　HSA 存在下での膜画分内ヒト IGF-1R に対するインスリン イコデク、HI 及びヒト IGF-1 の競合的結合



A representable result among 3 independent experiments performed in the presence of 0.1% HSA. Each point elicits mean ± SEM (n=2) of [^{125}I]-IGF-1 binding to membrane-associated human IGF-1R in the presence of increasing concentrations of Insulin icodec (▲green), HI (● orange), or human IGF-1 (● maroon). CPM = counts per minute, HSA = human serum albumin, IGF-1 = insulin-like growth factor-1, IGF-1R = insulin-like growth factor-1 receptor. Source: Study [redacted]110426

結論

可溶化又は膜画分内 IGF-1R に対する競合的結合アッセイ（0.1% HSA 存在下）において、インスリン イコデクのヒト IGF-1R に対する結合親和性は非常に低く、HI と比較した相対的効力は算出できなかった。

2.6.2.2.1.5　IR に対する結合動態（[redacted]120429 試験）

目的

インスリン X10 などの一部のインスリンアナログでは、緩やかな解離速度と高い細胞増殖促進能との間に正の相関が認められる[1]。本試験では、Hansen らの方法 [1] に従ってインスリン イコデクの結合動態を検討し、HI と比較した。

方法

（結合）ヒト IR-A 発現遺伝子組換え BHK 細胞を 24 ウェルプレートで、0.1% γ-グロブリン及び cOmplete™プロテアーゼ阻害剤カクテルを加えた培地中で培養し、単層細胞とした。15°C でインキュベートし、様々な時点（0～150 分）で[^{3}H]-インスリン イコデク（5.4 ± 0.72 nmol/L）又は[^{3}H]-HI（8.4 ± 0.69 nmol/L）を添加した。非特異的結合を推定するため、過剰量（1 µmol/L）の非標識 HI が入った

ウェルも同時に作製した。アッセイ緩衝液を吸引することにより、インキュベーションを終了させた。

（解離）24 ウェルプレートに入れた単層細胞に[^{3}H]-インスリン イコデク（5.4 ± 0.72 nmol/L）又は[^{3}H]-HI（8.4 ± 0.69 nmol/L）を添加し、15°C で 150 分間インキュベートした後、すべてのウェルに過剰量（1 µmol/L）の非標識 HI を添加した。0～150 分の様々な時点で、アッセイ緩衝液を吸引することにより、インキュベーションを終了させた。

4°C の培地で洗浄した後、0.1 N 水酸化ナトリウム（NaOH）で細胞を溶解し、[^{3}H]-インスリン イコデク又は[^{3}H]-HI の量を Tri-Carb 液体シンチレーションカウンターで測定した。この方法では技術的な限界により真の結合及び解離速度定数を決定することはできないが、暫定的な結合速度定数（K'on）及び解離定数（K'off）を以下の式で算出した。

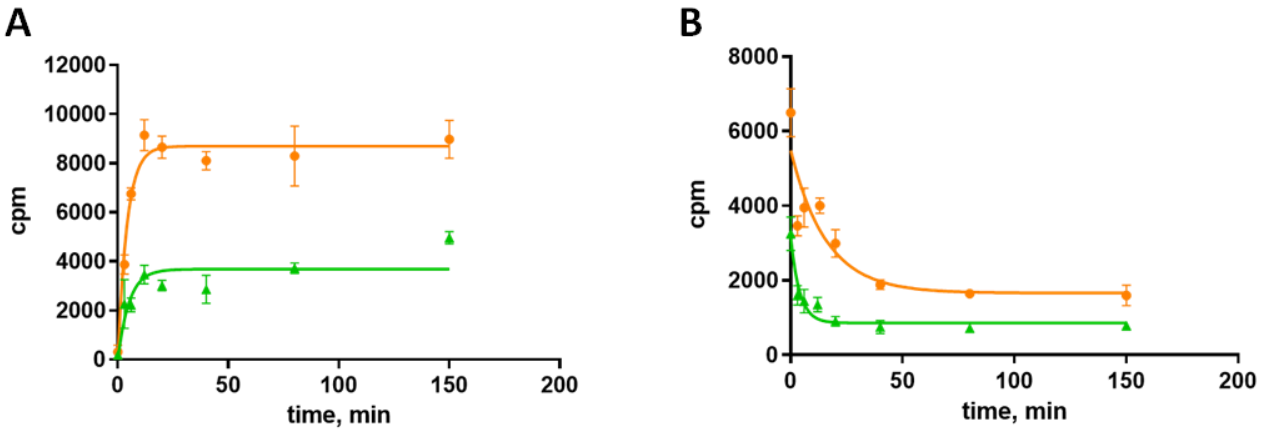
$$B_T = B_{eq} \times (1 - e^{-K'onT})$$
$$B_T = B_0 \times e^{-K'offT}$$

ここで、B_T、B_0 及び B_{eq} は、それぞれ T 時間、0 時間、及び平衡時におけるトレーサー結合量である。K'on 及び K'off は、GraphPad Prism v. 5.04 で非線形回帰分析を用いてフィットさせた。

結果

結合及び解離プロファイルの代表例を図 2.6.2-4 に示す。インスリン イコデク及び HI の K'on はそれぞれ 0.198 ± 0.016 及び 0.246 ± 0.004［mean ± standard error of the mean（SEM）、独立した 4 回の実験］であった。インスリン イコデク及び HI の K'off はそれぞれ 0.226 ± 0.044 及び 0.071 ± 0.010［mean ± SEM、独立した 4 回の実験］であり、インスリン イコデクの解離は HI の解離よりも速いことが示唆された。

図 2.6.2-4　　ヒト IR-A に対するインスリン イコデクの結合動態



A: Association to IR　B: Dissociation form IR
A representative example among 4 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM (n=3) of [^{125}I]-insulin icodec binding (▲green) or [^{125}I]-HI binding (● orange) to human IR-A. cpm = counts per minute, IR-A = insulin receptor A. Source: Study [redacted]120429

結論

遺伝子組換え BHK 細胞に発現させたヒト IR-A に対するインスリン イコデクの結合動態の解析から、インスリン イコデクの解離は HI の解離よりも速いことが示唆された。解離速度の低下が認められなかったことから、IR からの解離速度に関してその低下が潜在的に細胞増殖促進作用の増加をもたらすというメカニズムはインスリン イコデクでは当てはまらないと考えられる。HI との比較において、インスリン イコデクの解離速度がより速かったことは、IR との親和性が全般的に低下していたことと合致している。

2.6.2.2.1.6　インスリン受容体シグナル伝達（323020 及び[redacted]111101 試験）

目的

インスリンとその受容体との特異的な結合に続くシグナル伝達カスケードの最初のステップは、IR の特定のチロシン残基の自己リン酸化であり、引き続き IR 基質との結合及びプロテインキナーゼ B（PKB）を含む下流のキナーゼのリン酸化が惹起される。インスリン イコデクによる IR 及び PKB リン酸化の促進を、ヒト IR を過剰発現させたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（CHO hIR 細胞）で評価した。

方法

（IR-A 及び IR-B 自己リン酸化）ヒト IR-A 又は IR-B を過剰発現させた遺伝子組換え CHO 細胞を 96 ウェルプレートに入れ、0.01%オボアルブミン（ニワトリ卵白由来タンパク質）含有培地中 37°C で溶媒又は段階希釈したインスリン イコデク（約 10^7～10^2 pmol/L、2 回繰り返し測定）もしくは HI（約 10^6～10^1 pmol/L、2 回繰り返し測定）により刺激した。10 分間刺激後にプレートを反転させて液体を除去し、ウェルに液体窒素を注いで急速凍結した（323020 試験）。

（PKB リン酸化）ヒト IR を過剰発現させた遺伝子組換え CHO 細胞を 12 ウェルプレートに入れ、0.1% HSA 含有培地中 37°C で溶媒又は段階希釈したインスリン イコデク（10^7～10^0 pmol/L、10^6～10^2 pmol/L は 4 回繰り返し測定）もしくは HI（10^6～10^0 pmol/L、4 回繰り返し測定）により刺激した。30 分間刺激後に細胞を氷冷リン酸緩衝生理食塩液（PBS）で 3 回洗浄し、ウェルに液体窒素を注いで急速凍結した（[redacted]111101 試験）。

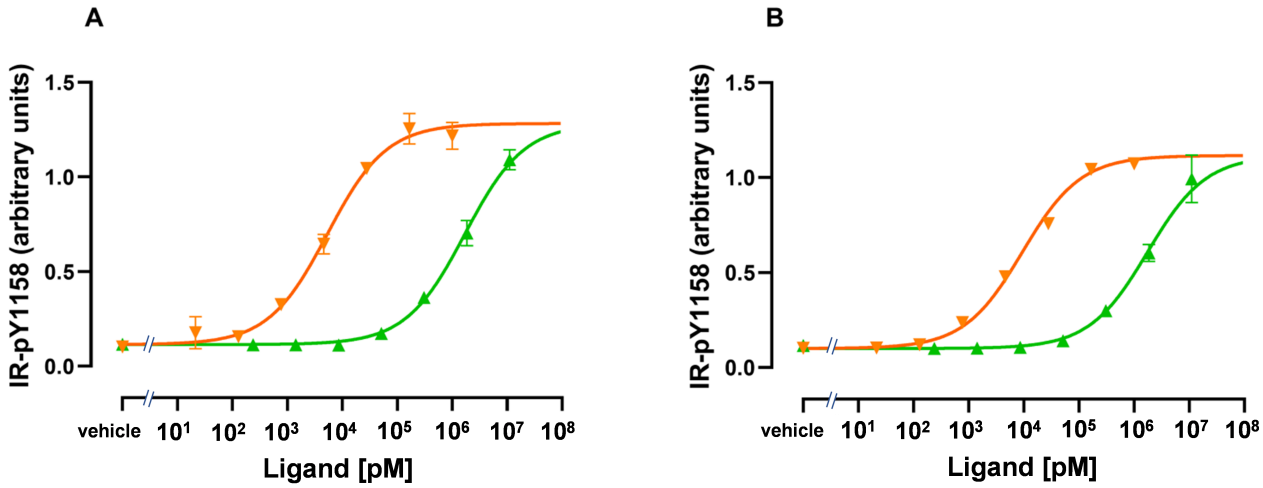
細胞を溶解緩衝液で可溶化し、溶解物の IR 及び内因性 PKB のリン酸化を Phospho-ELISA キット（カタログ番号 KHR9125、KHR9121 及び KHO0115、Invitrogen）で測定した。

インスリン イコデク及び HI の EC_{50} は、同一プレートでの測定で得られた対数濃度－反応曲線から 4 パラメータロジスティック法（GraphPad Prism V5）（濃度－反応曲線を、傾き、ベース反応値及び最大反応値が同一との仮定のもとにフィットさせる）を用いて算出した。インスリン イコデクの相対的効力は、「HI の EC_{50} /インスリン イコデクの EC_{50} × 100」で定義される相対的 EC_{50}（対 HI 比）で表した。

結果

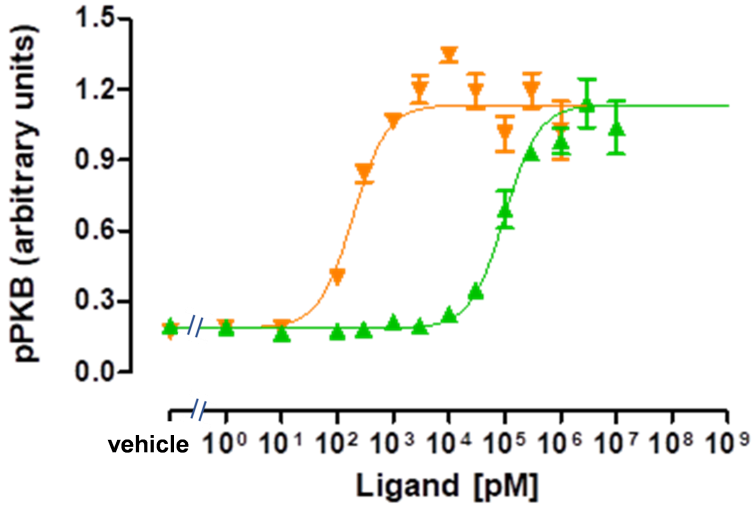
インスリン イコデクは IR（図 2.6.2-5）及び PKB（図 2.6.2-6）のリン酸化を促進し、HI と平行な濃度－反応曲線を示した。特に PKB について、インスリン イコデクと HI で得られた最大反応は同程度であった。0.01%オボアルブミン存在下での IR-A 及び IR-B リン酸化に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）はそれぞれ 0.25%（95%CI：0.20～0.33%）及び 0.31%（95%CI：0.23～0.40%）であった。これらの値に有意差は認められなかった（Student の t 検定、P>0.05）。0.1% HSA 存在下での PKB リン酸化に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）は 0.19%（範囲：0.10～0.29%）であった（表 2.6.2-5）。これらの結果は、インスリン イコデクは天然型 HI と同じシグナル伝達を促進するが、その効力は弱いことを示している。

図 2.6.2-5　　インスリン イコデク及び HI 誘発による CHO 細胞に発現させた IR-A 及び IR-B の自己リン酸化



A　Autophosphorylation of IR-A
B　Autophosphorylation of IR-B
A representable result among 4 independent experiments. Each point elicits mean ± SD (n=2) of phosphorylated Tyr 1158 of IR-A (A) or IR-B (B)-expressing CHO cells induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). CHO = Chinese hamster ovary, HI = human insulin, IR-A = insulin receptor A, IR-B = insulin receptor B. pIR1158 = phosphorylated IR 1158. Source: Study 323020

図 2.6.2-6　　インスリン イコデク及び HI 誘発による下流の PKB リン酸化



Each point represents mean ± SEM (n=4) of phosphorylated PKB in IR-expressing CHO cells induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). Study performed in the presence of 0.1% HSA. CHO = Chinese hamster ovary, HI = human insulin, IR = insulin receptor, pPKB = phosphorylated protein kinase B. Source: Study [redacted]111101

表 2.6.2-5　　IR 及び PKB のリン酸化に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）

Target molecules	Albumin	Relative EC_{50} (% of HI) mean	Number of experiments
Human IR-A	0.01% ovalbumin	0.25 (95%CI: 0.20 – 0.33)	4
Human IR-B		0.31 (95%CI: 0.23 – 0.40)	4
Human PKB	0.1% HSA	0.19 (range: 0.10 – 0.29)	1

Relative potency was evaluated as relative EC_{50} (% of HI), defined as (EC_{50} of insulin icodec) / (EC_{50} of HI) × 100. Results are shown as mean of 4 independent experiments or one experiment performed in quadruplicate. CI = confidence interval, HI =human insulin, HSA = human serum albumin, EC_{50} = half maximal effective concentration. Studies performed in the presence of 0.1% HSA. Source: Studies 323020 and [redacted]111101

結論

インスリン イコデクは遺伝子組換え CHO 細胞における IR 及び PKB のリン酸化を促進し、HI と平行な濃度－反応曲線を示したことから、インスリン イコデクは HI と同じ細胞内 IR シグナル伝達を促進するが、その効力は弱いことが示唆された。

2.6.2.2.1.7　受容体との結合に関する結論

受容体結合の選択性及び動態、受容体活性化、ならびに下流シグナル伝達において、インスリン イコデクは HI と同じ経路を活性化することが示され、これらの結果を総合すると、インスリン イコデクがその生物学的反応を惹起する分子メカニズムは HI と同じであると考えられた。

2.6.2.2.2　　*In vitro* 薬理試験（2）：代謝促進作用

インスリンは、一連の器官に作用して生理学的反応を促進することにより糖代謝及び脂質代謝全般に作用する多機能ホルモンであることから、インスリン イコデクの生物学的特性解析では多くの細胞種及び細胞反応を網羅するよう計画した（表 2.6.2-6）。

表 2.6.2-6　　*In vitro* 薬理試験（2）：代謝促進作用の効力

Cells	Albumin	Parameter	Reference compound	Study ID
Rat adipocytes	0.1, 1% HSA	Glucose uptake	HI	[redacted]20110524.1
Human SGBS adipocytes	1% HSA			[redacted]20110524.2
Rat hepatocytes	(–)	Glycogen accumulation		[redacted]HEPGLY 25-MAY-2011
	0.1% HSA			
Rat skeletal muscle derived recombinant L6-hIR cells	0.1% HSA	Glycogen synthesis		[redacted]110510
Human MCF-7 (mammary adenocarcinoma cell line) cells	0.1% FBS			[redacted] 110406

FBS = fetal bovine serum, HI = human insulin, HSA = human serum albumin, SGBS = Simpson-Golabi Behmel-syndrome.

2.6.2.2.2.1　ヒト脂肪細胞系におけるグルコース取り込み（[redacted]20110524.1 及び [redacted]20110524.2 試験）

目的

インスリンの主要な標的器官の一つが脂肪組織であり、インスリンは脂肪細胞でのグルコース取り込みを促進すると同時に脂質生成を促進しつつ、一方で脂肪分解、すなわち脂質の遊離脂肪酸及びその他の代謝物への分解を速やかに抑制する。2 つの試験において、ラット脂肪細胞（[redacted]20110524.1 試験）及び Simpson-Golabi-Behmel 症候群（SGBS）患者由来細胞を用いたヒト脂肪細胞系（[redacted]20110524.2 試験）でのグルコース取り込みに対するインスリン イコデクの作用を検討した。

方法

（ラット脂肪細胞）雄性 Sprague Dawley 系ラットの精巣上体脂肪体から初代培養脂肪細胞を単離した。段階希釈したインスリン イコデク（約 10^{6}～10^{-1} pmol/L、2 回繰り返し測定）又は HI（約 10^{3}～10^{-1} pmol/L、2 回繰り返し測定）とともに、脂肪細胞を[^{3}H]-グルコース及び 0.1%又は 1% HSA 含有 Krebs 緩衝液中で緩やかに振とうしながら 2 時間インキュベートした。グルコースはインスリン刺激によって脂肪細胞で産生されるトリグリセリドに組み込まれる。MicroScint E（Perkin Elmer）を添加することによりインキュベーションを停止させ、細胞から単離した脂質画分の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した（[redacted]20110524.1 試験）。

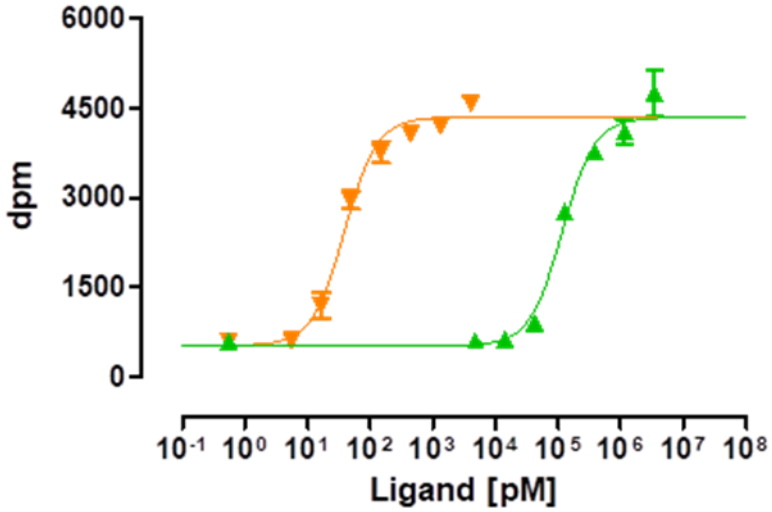
（ヒト脂肪細胞モデル）SGBS 細胞は、SGBS を有する乳児の皮下脂肪組織の間質細胞画分に由来する、脂肪への分化能が高いヒト細胞株である。細胞を 96 ウェルプレートに入れ、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）γ アゴニスト（ロシグリタゾン）に 4 日間曝露させる方法により脂肪細胞に分化、成熟させた。段階希釈した HI（約 10^{3}～10^{0} pmol/L、4 回繰り返し測定）又はインスリン イコデク（約 10^{6}～10^{2} pmol/L、4 回繰り返し測定）を添加し、細胞を[^{3}H]-グルコース及び 1% HSA 含有培地中で 37°C で 4 時間インキュベートした。標識グルコースはインスリン刺激により細胞に取り込まれる。MicroScint-40（Perkin Elmer）を添加し、細胞への[^{3}H]の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した（[redacted]20110524.2 試験）。

インスリン イコデクの EC_{50} 及び相対的効力は既述の方法により算出した。

結果

インスリン イコデクは初代培養ラット脂肪細胞のグルコース取り込みを促進し、その作用には典型的な濃度反応性が認められ、最大反応は HI と同程度であった（図 2.6.2-7）。インスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）は、0.1% HSA 存在下では 0.03%（95%CI：0.03～0.03%、4 回の実験）、1% HSA 存在下では 0.02%（95%CI：0.02～0.02%、4 回の実験）であった（表 2.6.2-7）。

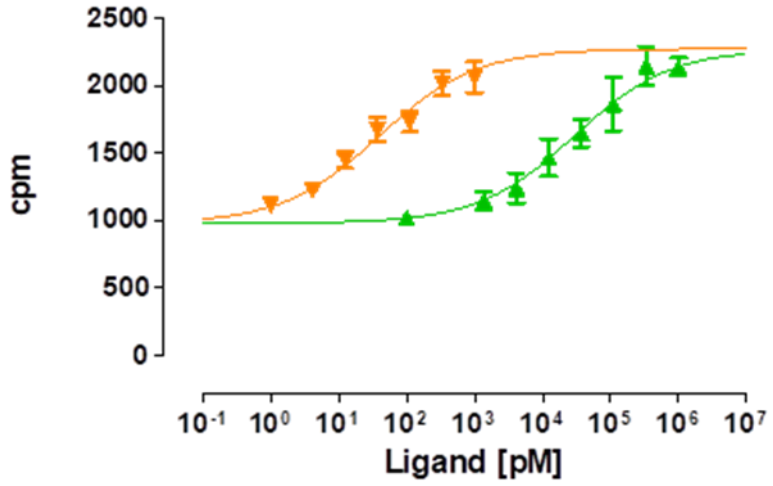
図 2.6.2-7　　インスリン イコデク及び HI に応答したラット初代培養脂肪細胞のグルコース取り込み



A representative result among 4 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM (n=2) of [^{3}H]-glucose uptake in primary adipocytes induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). dpm = disintegration per minute, HI = human insulin. Source: Study [redacted]20110524.1

インスリン イコデクはヒト SGBS 脂肪細胞のグルコース取り込みを活性化し、EC_{50} は HI の 0.049 nmol/L に対し 86 nmol/L であり、1% HSA 存在下でのインスリン イコデクの生物学的効力の相対値は 0.06%（95%CI：0.04～0.08%）であった（表 2.6.2-7）。インスリン イコデクによる最大反応は HI と同程度と考えられた（図 2.6.2-8）。

図 2.6.2-8　　インスリン イコデク及び HI に応答したヒト SGBS 脂肪細胞のグルコース取り込み



Each point elicits mean ± SEM (n=2) of [^{3}H]-glucose uptake in human SGBS adipocytes induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). cpm = counts per minute, HI = human insulin, SGBS = Simpson-Golabi Behmel-syndrome. Source: Study [redacted]20110524.2

表 2.6.2-7　　脂肪細胞のグルコース取り込みに対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）

Cells	Albumin	Relative EC_{50} (% of HI) mean (95%CI)	Number of experiments
Rat primary adipocytes	0.1% HSA	0.03 (0.03 - 0.03)	4
	1% HSA	0.02 (0.02 - 0.02)	4
Human SGBS adipocytes	1% HSA	0.06 (0.04 - 0.08)	3

Relative potency was evaluated as relative EC_{50} (% of HI), defined as (EC_{50} of HI) / (EC_{50} of insulin icodec) × 100. Results are shown as mean of 4 or 3 independent experiments. CI = confidence interval, HI =human insulin, HSA = human serum albumin, EC_{50} = half maximal effective concentration. Source: Studies [redacted]20110524.1 and [redacted]20110524.2

結論

インスリン イコデク及び HI はラット及びヒト両方の脂肪細胞系でグルコース取り込みを促進し、その作用には HI と同様に典型的な濃度依存性が認められたことから、インスリン イコデクはラット及びヒト両方の脂肪細胞において HI と同じ生物学的作用を保持しており、HI と同程度にグルコース取り込み及び脂質生成を促進することが示された。HSA 濃度を 0.1%から 1%に変更したときの相対的 EC_{50}（対 HI 比）の低下は、インスリン イコデクのアルブミン結合能を反映した。

2.6.2.2.2.2　ラット肝細胞におけるグリコーゲン蓄積（[redacted]HEPGLY 25-MAY-2011 試験）

目的

肝臓はグルコースホメオスタシスの維持に中心的な役割を果たしており、インスリンはグリコーゲン貯蔵促進とグルコース産生抑制により肝臓のグルコース代謝を調節する重要な因子である。本試験において、ラット肝細胞でのグリコーゲン蓄積に対するインスリン イコデクの作用を検討した。

方法

非絶食の雄性 Sprague Dawley 系ラットから肝細胞を 2 段階コラゲナーゼ灌流法で単離し、24 ウェルプレートに播種した。段階希釈したインスリン イコデク（10^6～10^1 pmol/L、3 回繰り返し測定）又は

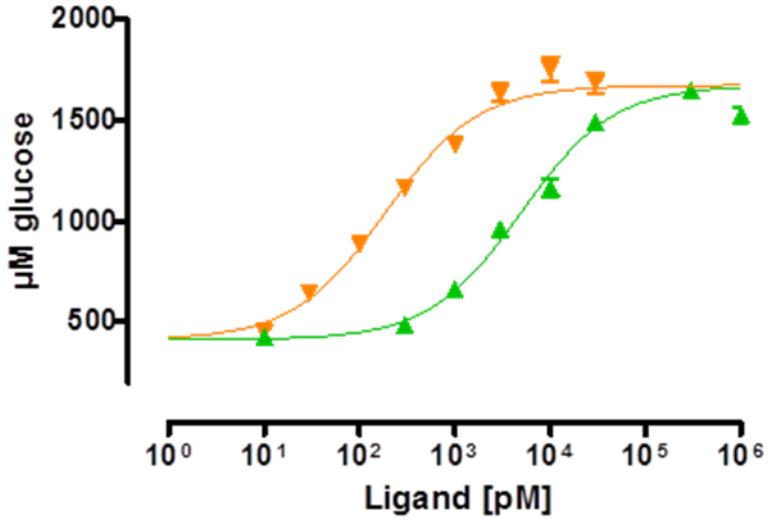
HI（約 10^4～10^1 pmol/L、3 回繰り返し測定）を添加し、細胞を 0.1% HSA 含有又は不含の 20 mmol/L グルコース含有基礎培地中で 18～24 時間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄した後、液体窒素で凍結し、細胞のタンパク質及びグリコーゲン含量を測定した。タンパク質含量は、0.1 N NaOH で溶解した後、Bio-Rad プロテインアッセイで測定した。細胞内グリコーゲン含量の測定では、細胞を溶解した後、グリコーゲンからグルコースを遊離させるためにアミログルコシダーゼ（Sigma）を添加し、40°C で 2 時間インキュベートした。遊離したグルコースを、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ／ヘキソキナーゼ（G-6-PDH）法により、標準物質として外因性グルコースを用いて測定した。

インスリン イコデクの EC_{50} 及び相対的 EC_{50} を既述の方法により算出した。濃度－反応曲線の平行性を平行線モデルで確認した。

結果

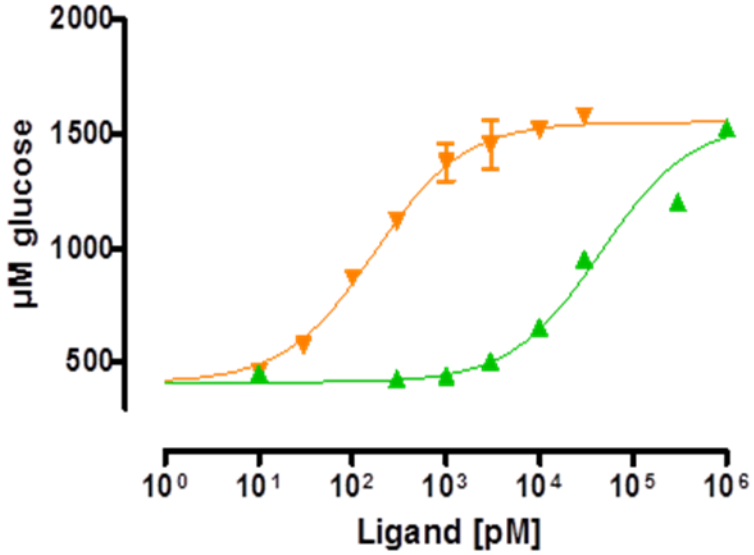
インスリン イコデクはラット肝細胞でのグリコーゲン蓄積を促進し、その作用には典型的な濃度反応性が認められ、最大反応が HI と同程度であった（図 2.6.2-9）。このことよりインスリン イコデクは肝細胞において HI と同じ効果を有する IR の完全アゴニストであることが示された。アルブミン非添加時のインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）は 4.42%（範囲：2.9～5.9%、7 回の実験）であった。インスリン イコデクの高いアルブミン結合能を反映して、0.1% HSA 添加時の濃度反応曲線（図 2.6.2-10）はアルブミン非添加時（図 2.6.2-9）と比較して右方移動し、0.1%HSA 添加時の相対的 EC_{50}（対 HI 比）は 0.34%（範囲：0.07～1.07%、8 回の実験）に低下した（表 2.6.2-8）。

図 2.6.2-9　HSA 非存在下でのインスリン イコデク及び HI に応答したラット肝細胞のグリコーゲン蓄積



A representative result among 7 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM (n=3) of cellular glucose content (derived from accumulated glycogen) in rat hepatocytes induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). Studies performed in the absence of HSA. HI = human insulin. Source: Study [redacted] HEPGLY 25-MAY-2011

図 2.6.2-10　0.1% HSA 添加時のインスリン イコデク及び HI に応答したラット肝細胞のグリコーゲン蓄積



A representative result among 8 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM (n=3) of cellular glucose content (derived from accumulated glycogen) in rat hepatocytes induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). Studies performed in the presence of 0.1% HSA. HI = human insulin. Source: Study [redacted] HEPGLY 25-MAY-2011

表 2.6.2-8　ラット肝細胞のグリコーゲン蓄積に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）

Cells	Albumin	Relative EC_{50} (% of HI) mean (range)	Number of experiments
Rat hepatocytes	(–)	4.42 (2.9 – 5.9)	7
	0.1% HSA	0.34 (0.07 – 1.07)	8

Relative potency was evaluated as relative EC_{50} (% of HI), defined as (EC_{50} of HI) / (EC_{50} of insulin icodec) × 100. Results are shown as mean of 7 or 8 independent experiments. HI =human insulin, HSA = human serum albumin, EC_{50} = half maximal effective concentration. Source: Study [redacted] HEPGLY 25-MAY-2011

結論

インスリン イコデクは初代培養ラット肝細胞でのグリコーゲン蓄積を濃度依存的に促進し、最大反応が HI と同程度であったことから、インスリン イコデクは肝細胞においてグリコーゲン蓄積を指標としたとき HI と同じ効果を有する完全 IR アゴニストであることが示された。インスリン イコデクの効力は HSA により低下し、0.1% HSA 存在下では相対的 EC_{50}（対 HI 比）が 4.42%から 0.34%に低下した。これはインスリン イコデクのアルブミン結合能を反映した。

2.6.2.2.2.3　ラット骨格筋由来 L6-hIR 細胞及びヒト MCF-7 細胞におけるグリコーゲン合成（[redacted]110510 及び [redacted] 110406 試験）

目的

グリコーゲン合成促進はインスリンの作用として古くから知られていることから、インスリンアナログの代謝促進作用の効力測定によく用いられている。本試験では、ラット骨格筋由来遺伝子組換え L6-hIR 細胞及びヒト乳腺がん MCF-7 細胞を用いて、インスリン イコデクのグリコーゲン合成促進作用

を評価した。いずれの細胞もヒト IR を発現しており、インスリンの細胞増殖促進及び代謝促進作用の両方に応答性を示す。

方法

L6-hIR 細胞株は、ラット骨格筋から単離された筋芽細胞株 L6（ATCC、番号 CRL-1458）に、ヒト IR-A をコード化するプラスミドベクターを安定的に導入し、IR-A を細胞表面に過剰発現させたものである。この細胞を 12 ウェルプレートに播種し、0.1% HSA 含有培地で 3 時間飢餓培養を行った。溶媒又は段階希釈したインスリン イコデク（約 10^6～10^2 pmol/L）もしくは HI（約 10^5～10^1 pmol/L）を[^{14}C]-グルコースとともに添加した。取り込みを 1 時間行い、氷冷 PBS で洗浄することにより停止させた。その後、1 N NaOH（1 mL/ウェル）を添加して 4°C で 30 分間放置することにより、細胞を溶解した（[redacted]110510 試験）。

MCF-7 細胞（ATCC から入手）を 12 ウェルプレートに播種し、0.1%ウシ胎児血清（FBS）含有培地で 24 時間血清飢餓培養を行った後、0.1% FBS 及び 500 µM グルコース含有培地で 3 時間グルコース飢餓培養を行った。溶媒又は段階希釈したインスリン イコデク（約 10^7～10^2 pmol/L）もしくは HI（約 10^6～10^2 pmol/L）を[^{14}C]-グルコースとともに添加した。取り込みを 3 時間行い、氷冷 PBS で洗浄することにより停止させた。その後、1 N NaOH（1 mL/ウェル）を添加して 4°C で 30 分間放置することにより、細胞を溶解した。試験条件下では HSA を使用しなかったが、アッセイは 0.1% FBS 存在下で実施した（[redacted]110406 試験）。

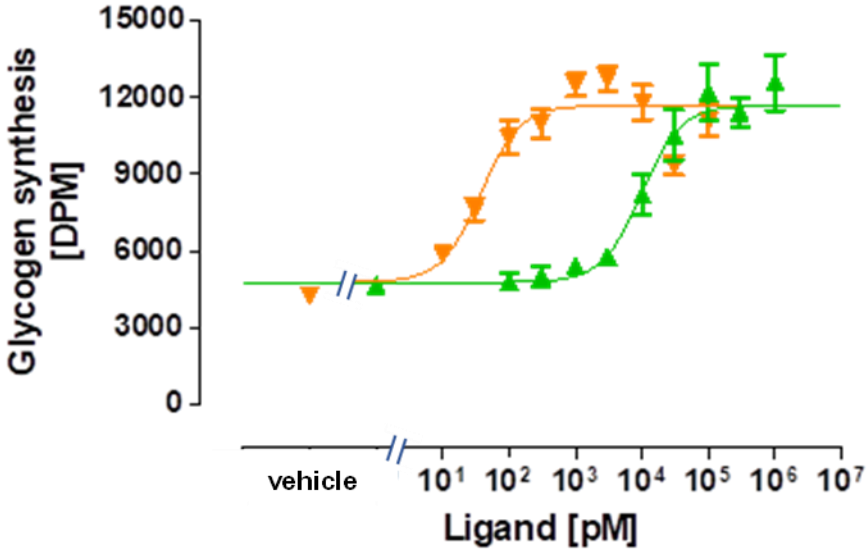
いずれの試験においても溶解物を 30 分間加熱後、96%エタノール及び外因性グリコーゲンを添加して-20°C で一晩インキュベートすることにより、試料中のグリコーゲンを沈殿させた。得られたグリコーゲンペレットを氷冷エタノールで洗浄し、水に溶解した。シンチレーション液を添加し、グリコーゲンへの[^{14}C]の取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。インスリン イコデクの EC_{50} 及び相対的 EC_{50} を既述の方法により算出した。濃度－反応曲線の平行性を平行線モデルで確認した。

結果

インスリン イコデク及び HI は L6-hIR 細胞及び MCF-7 細胞のグリコーゲン合成を促進し、その作用には典型的な濃度反応性が認められ、最大反応は同程度であった（図 2.6.2-11、図 2.6.2-12）。

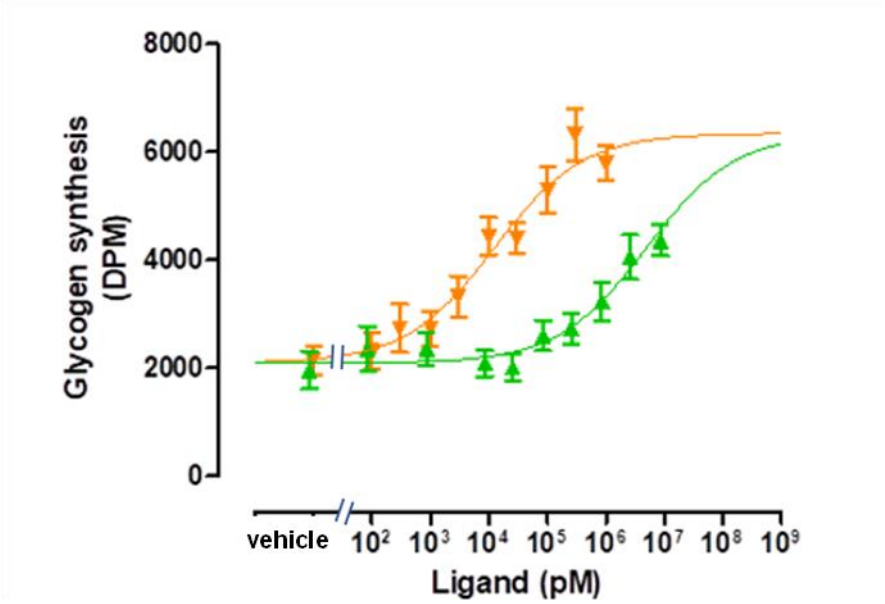
インスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）は、L6-hIR 細胞の 0.1% HSA 存在下では 0.52%（95%CI：0.35～0.79%）、MCF-7 細胞の 0.1% FBS 存在下では 0.26%（95%CI：0.11～0.62%）であった（表 2.6.2-9）。FBS の主成分はウシ血清アルブミンであることから、0.1% HSA と 0.1% FBS はインスリン イコデクの活性に同程度の阻害作用を示すと考えられる。

図 2.6.2-11　　インスリン イコデク及び HI に応答したラット骨格筋由来 L6-hIR 細胞のグリコーゲン合成



Each point represents mean ± SEM (n=5) of glucose incorporation in rL6-hIR cells induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). Assay medium with 0.1% HSA. DPM = disintegration per minute, HI = human insulin. Source: Study [redacted]110510

図 2.6.2-12　　インスリン イコデク及び HI に応答したヒト MCF-7 細胞のグリコーゲン合成



Each point represents mean ± SEM (n=5) of glucose incorporation in MCF-7 cells induced by insulin icodec (▲green) and HI (▼orange). Assay medium with 0.1% FBS. DPM = disintegration per minute, FBS = fetal bovine serum, HI = human insulin. Source: Study [redacted]110406

表 2.6.2-9　　L6-hIR 細胞及び MCF-7 細胞でのグリコーゲン合成に対するインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）

Cells	Albumin	Relative EC_{50} (% of HI) mean (95%CI)	Number of experiments
Rat muscle-derived recombinant L6-hIR	0.1% HSA	0.52 (0.35 – 0.79)	4
Human MCF-7 (mammary adenocarcinoma cell line)	0.1% FBS	0.26 (0.11 – 0.62)	5

Relative potency was evaluated as relative EC_{50} (% of HI), defined as (EC_{50} of HI) / (EC_{50} of insulin icodec) × 100. Results are shown as mean of 4 or 5 independent experiments. CI = confidence interval, FBS = fetal bovine serum, HI = human insulin, hIR = human insulin receptor, HSA = human serum albumin, EC_{50} = half maximal effective concentration. Source: Studies [redacted]110510 and [redacted]110406

結論

インスリン イコデク及び HI はラット骨格筋由来遺伝子組換え L6-hIR 細胞及びヒト乳腺がん MCF-7 細胞の両方でグリコーゲン合成を濃度依存的に促進し、最大反応が同程度であったことから、これらの試験でインスリン イコデクは HI と同様の完全 IR アゴニスト作用を示した。インスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）は、L6-hIR 細胞の 0.1% HSA 存在下では 0.52%、MCF-7 細胞の 0.1% FBS 存在下では 0.26%であった。

2.6.2.2.2.4　*In vitro* 代謝促進作用に関する結論

ラット脂肪細胞、ヒト脂肪細胞（分化させたヒト SGBS 細胞）、ラット肝細胞、ラット骨格筋由来 L6-hIR 細胞及びヒト MCF-7 細胞において、インスリン イコデクは HI と同じ生物学的作用（グルコース取り込み、グリコーゲン蓄積及びグリコーゲン合成促進能）を示した。すべての試験系で、インスリン イコデクの濃度－反応曲線は HI と平行であり、最大反応も HI と同程度であったことから、インスリン作用の主要な標的器官である脂肪組織、肝臓及び筋肉での代謝促進作用を HI と比較したとき、インスリン イコデクは完全 IR アゴニストであることが示された。

HI と比較して細胞での効力が低かったのは、インスリン イコデクの方が IR との親和性が低いためと考えられ、細胞での効力は、IR との結合親和性と同様にアルブミンの存在により低下した。

2.6.2.2.3　　*In vitro* 薬理試験（3）：細胞増殖促進作用

インスリンは増殖促進作用を有することが知られているため、インスリン イコデクの細胞増殖促進作用を検討しており（表 2.6.2-10）、その個々の要約を 2.6.2.3 項ではなく本項（2.6.2.2.3 項）に示す。

表 2.6.2-10　　*In vitro* 薬理試験（3）：細胞増殖促進作用の効力

Cells	Parameter	Reference compound	Study ID
Human mammary epithelial cells (HMECs)	DNA synthesis ([^{3}H]-thymidine update)	HI, insulin X10, IGF-1	215074
Human COLO-205 (colon adenocarcinoma cell line)			211431
Human MCF-7 (mammary adenocarcinoma cell line)			211021
Rat skeletal muscle-derived recombinant L6-hIR			301435

DNA = deoxyribonucleic acid, HI = human insulin, hIR = human insulin receptor, IGF-1 = insulin-kike growth factor 1.

2.6.2.2.3.1　HMEC、COLO-205 細胞、MCF-7 細胞及び L6-hIR 細胞における細胞増殖促進作用（215074、211431、211021 及び 301435 試験）

目的

HMEC、ヒト結腸腺がん COLO-205 細胞、ヒト乳腺がん MCF-7 細胞及びラット骨格筋由来遺伝子組換え L6-hIR 細胞は、高レベルの IR 及び IGF-1R を発現しており、HI 及び IGF-1 の増殖促進作用によく反応することが確認されている。したがって、これらの細胞はインスリンアナログの細胞増殖促進作用を評価するのに適した *in vitro* 試験系と考えられる。4 つの試験において、HMEC、MCF-7 細胞、COLO-205 細胞、及び L6-hIR 細胞に対するインスリン イコデクの細胞増殖促進作用を HI と比較評価した。陽性対照として、インスリン X10（AspB10、強力な細胞増殖促進活性を有するインスリンアナログ）及びヒト IGF-1 も評価した。

方法

HMEC、COLO-205 細胞、MCF-7 細胞、及び L6-hIR 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、L6-hIR 細胞以外の細胞については無血清培地中 37°C で培養した。溶媒又は段階希釈（10^{8}～10^{-1} pmol/L の範囲内、3 回繰り返し測定）したインスリン イコデク、HI、インスリン X10、もしくは IGF-1 を添加し、HMEC は無血清培地で約 72 時間、COLO-205 細胞は 0.1%ウシ胎児血清（FCS）含有培地で約 24 時間、MCF-7 細胞及び L6-hIR 細胞は 0.1% FBS 含有培地でそれぞれ約 24 時間及び 6～8 時間インキュベートした。[^{3}H]-チミジンを添加して更にインキュベートした後、[^{3}H]-チミジンの細胞への取込みを TopCount NXT で測定した。

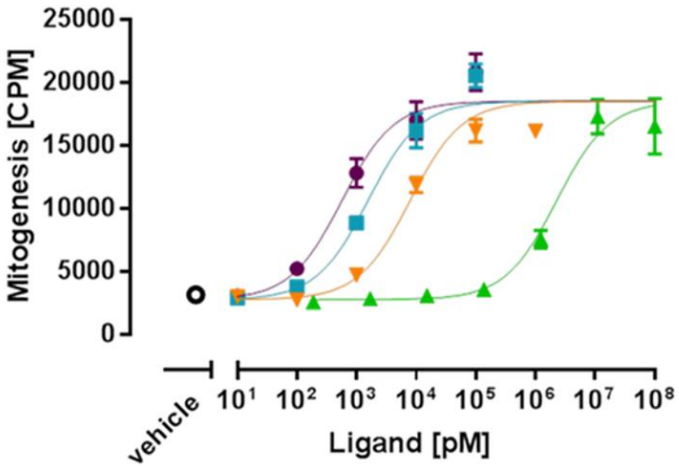
インスリン イコデクの EC_{50} 及び相対的 EC_{50} を既述の方法により算出した。濃度－反応曲線の平行性を平行線モデルで確認した。

結果

インスリン イコデクならびに対照とした HI、インスリン X10 及び IGF-1 は、HMEC、COLO-205 細胞、MCF-7 細胞及び L6-hIR 細胞のデオキシリボ核酸（DNA）合成を促進し、それらの濃度－反応曲線は互いに平行であった（図 2.6.2-13、図 2.6.2-14、図 2.6.2-15、図 2.6.2-16）。

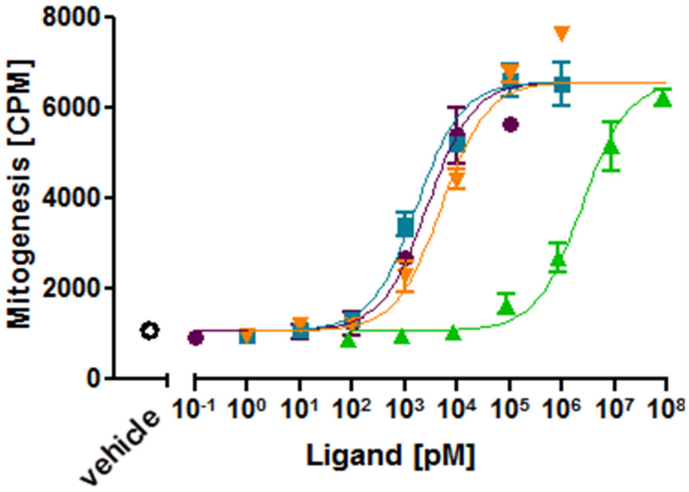
表 2.6.2-11 に示すように、HMEC、COLO-205 細胞、MCF-7 細胞及び L6-hIR 細胞におけるインスリン イコデクの相対的 EC_{50}（対 HI 比）は、それぞれ 0.2%（範囲：0.1～0.3%）、2.0%（範囲：0.8～3.0%）、0.5%（範囲：0.2～2.1%）及び 0.6%（範囲：0.3～1.0%）であった。

図 2.6.2-13　　インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答した HMEC の DNA 合成



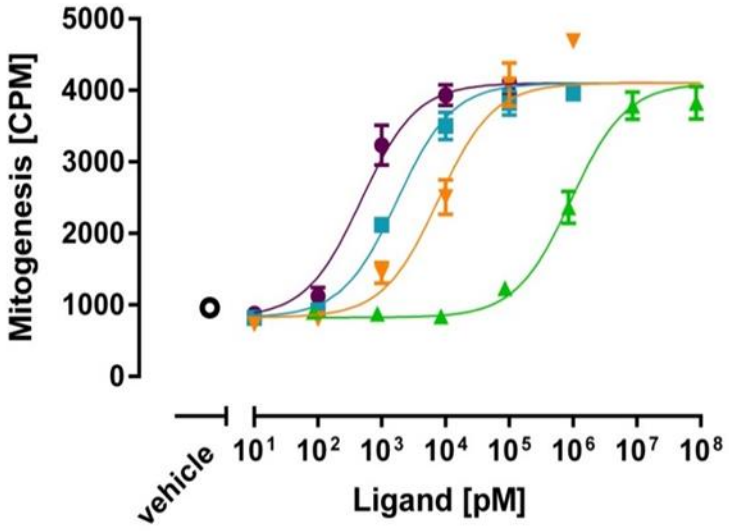
A representative result among 7 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM (n=3) of [^{3}H]-thymidine incorporation in HMECs induced by insulin icodec (▲green), HI (▼orange), insulin X10 (■ cyan) and IGF-1 (● maroon). CPM = counts per minute, HI = human insulin, HMEC = human mammary epithelial cells, IGF-1 = insulin-like growth factor 1. Source: Study 215074

図 2.6.2-14　　インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答したヒト COLO-205 細胞の DNA 合成



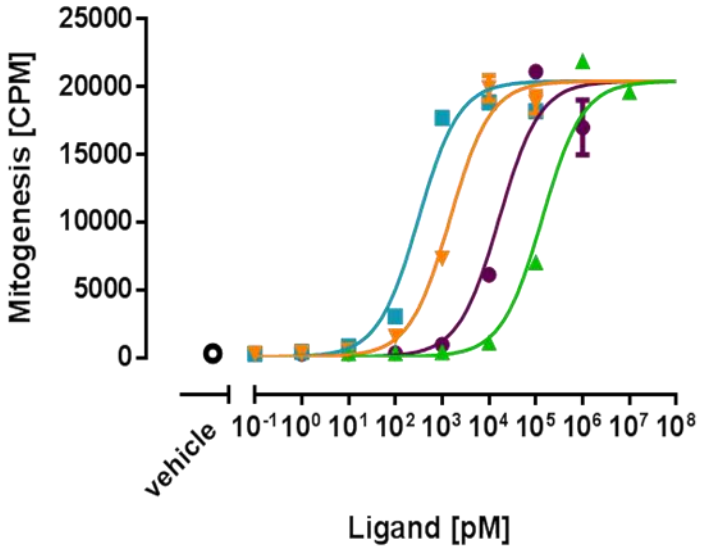
A representative result among 3 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM (n=3) of [^{3}H]-thymidine incorporation in COLO-205 cells induced by insulin icodec (▲green), HI (▼orange), insulin X10 (■ cyan), and IGF-1 (● maroon). CPM = counts per minute, HI = human insulin, IGF-1 = insulin-like growth factor 1. Source: Study 211431

図 2.6.2-15　　インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答した MCF-7 細胞の DNA 合成



A representative result among 4 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM, (n=3) of [^{3}H]-thymidine incorporation in MCF-7 cells induced by insulin icodec (▲green), HI (▼orange), insulin X10 (■ cyan), and IGF-1 (● maroon). CPM = counts per minute, HI = human insulin, IGF-1 = insulin-like growth factor 1. Source: Study 211021

図 2.6.2-16　　インスリン イコデク、HI、インスリン X10 及び IGF-1 に応答したラット骨格筋由来 L6-hIR 細胞の DNA 合成



A representative result among 5 independent experiments. Each point elicits mean ± SEM (n=3) of [^{3}H]-thymidine incorporation in IL6-hIR cells induced by insulin icodec (▲green), HI (▼orange), insulin X10 (■ cyan), and IGF-1 (● maroon). CPM = counts per minute, HI = human insulin, IGF-1 = insulin-like growth factor 1. Source: Study 301435

表 2.6.2-11　　インスリン イコデクの細胞増殖促進作用の相対的 EC_{50}（対 HI 比）

Cells	Relative EC_{50} to HI (% of HI) mean (range)	Number of experiments
Human mammary epithelial cells (HMECs)	0.2 (0.1 – 0.3)	7
Human COLO-205 (colon adenocarcinoma cell line)	2.0 (0.8 – 3.0)	3
Human MCF-7 (mammary adenocarcinoma cell line)	0.5 (0.1 – 2.1)	4
Rat myoblast-derived recombinant L6-hIR	0.6 (0.3 – 1.0)	5

Relative potency was evaluated as relative EC_{50} (% of HI), defined as (EC_{50} of HI) / (EC_{50} of insulin icodec) × 100. Results are shown as mean of 3 to 7 independent experiments. HI = human insulin, hIR = human insulin receptor, EC_{50} = half maximal effective concentration. Source: Studies 215074, 211431, 211021, and 301435

結論

インスリン イコデクは HMEC、COLO-205 細胞、MCF-7 細胞及び L6-hIR 細胞の DNA 合成を促進し、その濃度－反応曲線は HI、インスリン X10 及び IGF-1 と平行であり、最大反応も同程度であったことから、インスリン イコデクの細胞増殖促進効果は HI と同程度であることが示された。

HI と比較して細胞での効力が低かったのは、インスリン イコデクの方が IR との親和性が低いためと考えられる。インスリン イコデクの細胞増殖促進作用の相対的効力を表す相対的 EC_{50}（対 HI 比）は 0.2～2.0%であり（表 2.6.2-11）、これらの値は上記の代謝促進作用の効力（表 2.6.2-7、表 2.6.2-8 及び表 2.6.2-9）とほぼ類似していたことから、インスリン イコデクの代謝促進作用と細胞増殖促進作用の効力のバランスは HI と同様に保持されていることが示された。

2.6.2.2.4　　*In vivo* 薬理試験

In vitro 試験でインスリン イコデクはラット、イヌ及びブタの IR に対して HI と類似した親和性／活性を示すことが明らかになったため、*in vivo* 薬理試験では、ラット、イヌ及びブタを用いた動物モデルを選択した。6 種類の薬理試験でインスリン イコデクを皮下投与したときの PD 効力として、血漿中 HbA1c 値（糖尿病ラットモデル）、血漿中グルコース濃度（イヌ及びブタモデル）及び高インスリン正常血糖クランプに必要なグルコース総注入量（イヌ及びブタモデル）に対する作用を評価した（表 2.6.2-12）。ZDF ラット試験及び高インスリン正常血糖クランプ試験では対照化合物としてそれぞれ NPH インスリン（中間型 HI 製剤）及びインスリン グラルギン（持効型インスリンアナログ製剤）を使用した。

表 2.6.2-12　　*In vivo* 薬理試験

Animal	Parameter	Reference compound	Study ID
ZDF rat (diabetic)	Plasma HbA1c	HI (NPH, an intermediate-acting insulin preparation)	[redacted]110404
Beagle dog	Plasma glucose	(Insulin icodec only)	[redacted]110405
Pig	Total amount of glucose infusion required to maintain euglycaemia during hyper-insulinemic euglycaemic clamp	Insulin glargine (a long-acting modified insulin)	[redacted]110307 [redacted]101002 [redacted]111103
Pig	Plasma glucose	(Insulin icodec only)	[redacted]160103

HI = human insulin, NPH = neutral protamine Hagedorn, ZDF = Zucker diabetic fatty.

2.6.2.2.4.1　ラットを用いた血漿中 HbA1c に対する作用（[redacted]110404 試験）

目的

本試験では、ZDF 糖尿病ラットにインスリン イコデクを反復投与したときの薬理活性を、主に血漿中 HbA1c を指標として測定した。対照化合物として NPH インスリン（中間型 HI 製剤）を使用した。

方法

インスリン 6 分子あたり亜鉛 3.5 個、1.6%グリセロール、30 mmol/L フェノール及び 7 mmol/L トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Tris）で調製したインスリン イコデクを評価した。雄性 ZDF ラットは Charles River Laboratories（ドイツ）から入手した。

（24 日間投与）12 週齢の雄性 ZDF ラット（6～7 匹/群）に溶媒（7 mmol/L Tris、30 mmol/L フェノール、1.6%グリセロール）、インスリン イコデク（用量：122 又は 245 nmol/匹）、又は HI（NPH インスリン、用量：18 nmol/匹）を皮下投与した（試験 0 日と定義）。溶媒又は HI は 1 日 2 回（BID）24 日間（計 48 回）、インスリン イコデクは 4 日に 1 回（Q4D）24 日間（試験 0、4、8、12、16 及び 20 日、計 6 回）投与した。

（8 日間投与）12 週齢の雄性 ZDF ラット（5 匹/群）に溶媒、インスリン イコデク（15、31 及び 122 nmol/匹）、又は HI（18 nmol/匹）を皮下投与した（試験 0 日）。溶媒又は HI は BID で 8 日間（計 16 回）、インスリン イコデクの 15 及び 31 nmol/匹の用量は BID で 8 日間（計 16 回）、インスリン イコデクの 122 nmol/匹の用量は Q4D で 8 日間（試験 0 及び 4 日、計 2 回）投与した。

インスリンの作用は主として 24 日間投与では試験-5、-1、8、16 及び 24 日の、8 日間投与では試験 0、4 及び 8 日の血漿中 HbA1c を、アッセイキット HBA1C II Tina-quant Hemoglobin A1c II 及び Hitachi912 マルチアナライザーを用いて測定した。試験開始時の HbA1c 値は 24 日間投与群で 6.8～6.9%、8 日間投与群で 6.9～7.0%であり、ZDF ラットが糖尿病であることが裏付けられた。体重は 24 日間投与群で試験-5、-1、8、16 及び 24 日に、8 日間投与群で試験 0、4 及び 8 日に測定した。

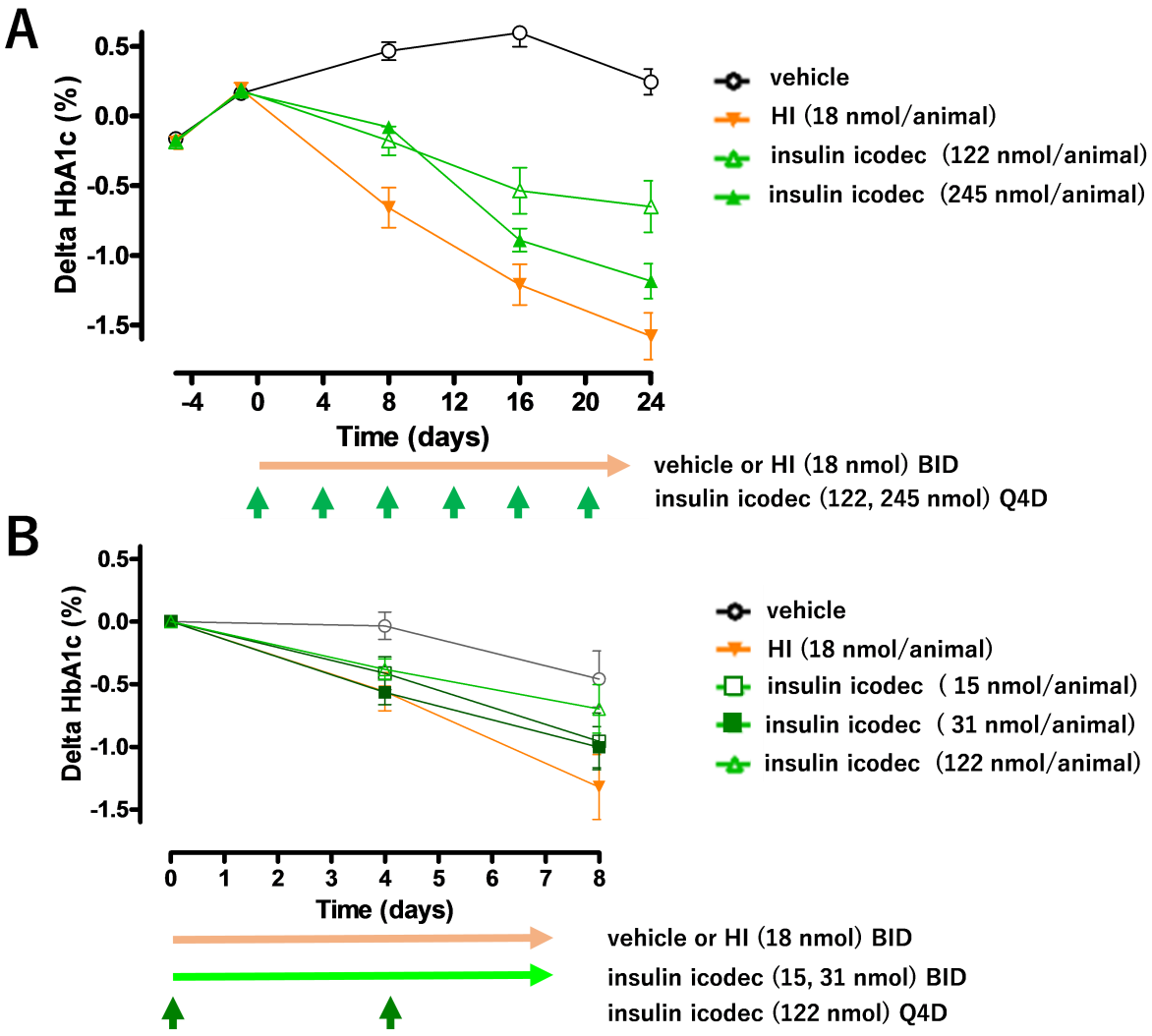
結果

（24 日間投与）図 2.6.2-17A に示すように、すべての投与群で溶媒対照群と比較して血漿中 HbA1c 値が低下した。低下の大きかった順に並べると、HI（18 nmol BID）＞インスリン イコデク（245 nmol Q4D）＞インスリン イコデク（122 nmol Q4D）であり、体重及び体脂肪量の増加と完全に対応していた。

（8 日間投与）図 2.6.2-17B に示すように、すべての投与群で溶媒対照群と比較して血漿中 HbA1c 値が低下した。低下の大きかった順に並べると、HI（18 nmol BID）＞インスリン イコデク（31 nmol BID）、インスリン イコデク（15 nmol BID）＞インスリン イコデク（122 nmol Q4D）であり、体重及び体脂肪量の増加と完全に対応していた。

24 日間投与群における HI（18 nmol BID）及びインスリン イコデク（245 nmol Q4D）ならびに 8 日間投与群の HI（18 nmol BID）及びインスリン イコデク（31 nmol BID）の総量を考慮すると、本モデルにおけるインスリン イコデクの *in vivo* 効力は HI の約半分と考えられた。

図 2.6.2-17　　インスリン イコデクを反復投与した ZDF ラットにおける血漿中 HbA1c の変化



A: 24-days regimen. Insulin icodec (△ green 122 nmol, ▲ green 245 nmol), and HI (▼orange)
B: 8-days regimen. Insulin icodec (□ green 15 nmol, ■ dark green 31 nmol, △green 122 nmol), and HI (▼orange)
Each point represents mean ± SEM of the change of plasma HbA1c. n=6 for groups in A (except for 122 nmol group, n=7), n=5 for groups in B. BID = twice daily, HbA1c = haemoglobin A1c, Q4D = once daily every 4 days, HI = human insulin, ZDF = Zucker Diabetic Fatty. Source: Study [redacted]110404

結論

ZDF 糖尿病ラットモデルにインスリン イコデク（122 及び 245 nmol/匹を Q4D で 24 日間ならびに 15 及び 31 nmol/匹を BID で 8 日間）を反復皮下投与したとき、血漿中 HbA1c 値が用量依存的に低下した。本モデルにおけるインスリン イコデクの *in vivo* 効力は HI の約半分と考えられた。

2.6.2.2.4.2　イヌを用いた血漿中グルコースに対する作用（[redacted]110405 試験）

目的

本試験では、非糖尿病ビーグル犬にインスリン イコデクを単回皮下投与したときの PD 及び薬物動態（PK）プロファイルを検討した。

方法

インスリン 6 分子あたり亜鉛 4.8 個、1.6%グリセロール、25 mmol/L フェノール、20 mmol/L クレゾールで調製したインスリン イコデクを評価した。雄性ビーグル犬（HsdRcc:DOBE）は Harlan（ドイツ）から入手した。

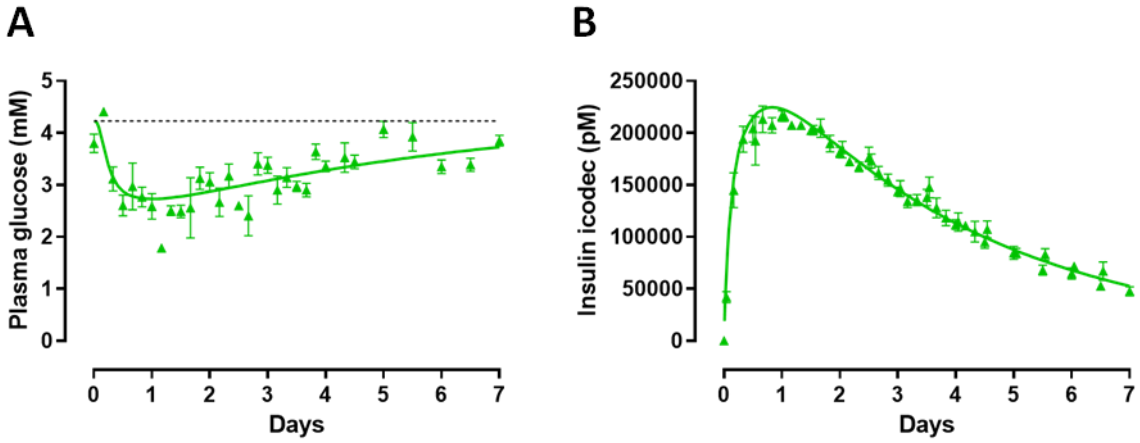
雄性ビーグル犬（約 2 歳～2 歳半）にインスリン イコデクを試験 0 日の給餌の直前（0 時間、n=5）又は給餌 12 時間後（12 時間、n=5）に 30 nmol/kg の用量で単回皮下投与した。最初の 4 日間は 4 時間ごとに、その後の 3 日間は 12 時間ごとに、血液試料を頸静脈から採取した。

血漿中グルコースは固定化グルコースオキシダーゼ法で分析した。血糖値に対するインスリン イコデクの PD 作用を、各給餌後 4 時間までの血糖値を除外し、2 種類の投与レジメン（それぞれ給餌の 0 及び 12 時間後に開始）で得られた 2 つの曲線を重ねることにより評価した。インスリン イコデクの血漿中濃度は、HI の A 鎖の中央部分を認識するモノクローナル抗体（mAb）の HUI-018 及びインスリン イコデクの B25H 置換を認識する mAb の M-GIIone-2F4A80 を用いた均一系ビーズベースサンドイッチ イムノアッセイである蛍光酸素チャネリング免疫測定法（LOCI）により分析した。

結果

インスリン イコデクの単回皮下投与により血漿中グルコース濃度が低下し、最大の低下は投与の約 24 時間後に認められた（図 2.6.2-18A）。これはインスリン イコデクの PK プロファイルにおいて最高血漿中濃度がほぼ同じ時間に認められたこと（図 2.6.2-18B）と対応していた。ビーグル犬の最高血漿中濃度は約 222,000 pmol/L に達したが、低血糖症の徴候は認められなかった。

図 2.6.2-18　　インスリン イコデクを単回投与したビーグル犬における血漿中グルコース濃度及び血漿中インスリン イコデク曝露量の変化



A: Change of plasma glucose　B: Change of plasma concentration of insulin icodec
Each point represents mean ± SEM (n=5/group × 2)
Solid lines (in A and B) are simulated curves, and the dashed line (in A) shows initial glucose level before dosing.
Source: Study [redacted]110405

結論

ビーグル犬モデルへのインスリン イコデク（30 nmol/kg）の単回皮下投与は、血漿中グルコース濃度の低下をもたらし、最大の低下は投与の約 24 時間後に認められた。このインスリン イコデクの PD プロファイルは PK プロファイルと一致していた。

2.6.2.2.4.3　イヌを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験（[redacted]110307 試験）

目的

インスリン イコデクの血糖降下作用を、ビーグル犬を用いた高インスリン正常血糖クランプ法により評価した。この方法はインスリンの *in vivo* 作用を評価する際に最も標準的な方法と広く考えられている。対照化合物としてインスリン グラルギン（持効型インスリン）も投与した。

方法

インスリン 6 分子あたり亜鉛 4 個、1.6%グリセロール、16 mmol/L フェノール、16 mmol/L メタクレゾール及び 20 mmol/L NaCl で調製したインスリン イコデクを評価した。雄性ビーグル犬（HsdRcc:DOBE、約 1～2 歳）は Harlan（ドイツ）から入手した。

ビーグル犬（3 匹/群）にインスリン イコデク又はインスリン グラルギンを 2.1 nmol/kg/日の用量で 1 日 1 回、7 日間（試験 0～6 日）皮下投与した後、1.05 nmol/kg の用量で 1 日 2 回、4.5 日間（試験 7 日から試験 11 日の午前まで）皮下投与した。試験 11 日の最終投与直後から 12 時間にわたりクランプを行った。試験 14～20 日に、この群に同じ化合物を 4.2 nmol/kg/日の用量で 1 日 1 回、7 日間皮下投与した後、2.1 nmol/kg の用量で 1 日 2 回、4.5 日間（試験 21 日から試験 25 日の午前まで）皮下投与した。試験 25 日の最終投与直後から 12 時間にわたり再度クランプを行った。3 週間休薬した後、2 つの群をクロスオーバーさせ、試験を繰り返した。各用量の最終投与日に、インスリン イコデク及びインスリン グラルギンの血漿中濃度を LOCI で測定し、これらの濃度が定常状態に達していることを確認し

た。インスリン イコデクの LOCI は、それぞれ HI の A 鎖の中央部分及びインスリン イコデクの B25H 置換を認識する mAb である HUI-018 及び M-GIIone-2F4A80 を用いて実施した。インスリン グラルギンの LOCI は、それぞれ天然型インスリン及びインスリン グラルギンを認識する mAb である HUI-001 及び STAB7 を用いて実施した。

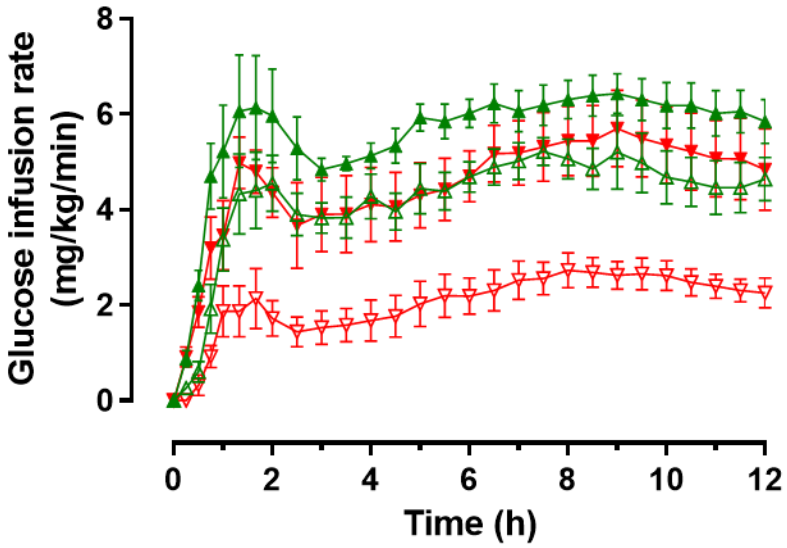
試験 11 日及び 25 日の高インスリン正常血糖クランプにより、インスリン イコデクの血糖降下作用をインスリン グラルギンと比較評価した。それぞれの群でのインスリン イコデク又はインスリン グラルギンの最終投与後（試験 11 日及び 25 日の午前中）に、頸静脈のカテーテルから 20%グルコース溶液を、正常血糖が維持されるように注入速度を制御しながら 12 時間注入した。血液試料を頻繁に採取し、その後直ちに血漿中グルコース濃度をグルコースオキシダーゼ法で測定した。インスリン作用の *in vivo* 効力に対応する、クランプ試験に必要なグルコース総注入量として、GIR の 0～12 時間の曲線下面積（AUC）［GIR $AUC_{0\text{-}12h}$（mg/kg）］を算出した。

結果

インスリン イコデク又はインスリン グラルギンの 1 日 2 回、4.5 日間皮下投与の最終.投与（試験 11 日の 2.1 nmol/kg 及び試験 25 日の 4.2 nmol/kg）後の高インスリン正常血糖クランプにおいて、正常血糖（5.8 mmol/L）を維持するために調節された GIR の変化を図 2.6.2-19 に示す。

インスリン イコデク（2.1 及び 4.2 nmol/kg）の GIR $AUC_{0\text{-}12h}$ はそれぞれ 3060 ± 693 及び 4043 ± 647 mg/kg［mean ± standard deviation (SD)、n=6］であり、これに対応するインスリン グラルギン（2.1 及び 4.2 nmol/kg）の GIR $AUC_{0\text{-}12h}$ はそれぞれ 1477 ± 508 及び 3272 ± 1039 mg/kg（mean ± SD、n=6）であった。インスリンの用量及びこれに対応する個々の GIR $AUC_{0\text{-}12h}$ を線形回帰モデルにフィットさせたときのインスリン イコデクの *in vivo* 効力比（インスリン グラルギンに対する比率）は 190%（95%CI：124～291%）と推定された（表 2.6.2-13）。

図 2.6.2-19　　ビーグル犬におけるインスリン イコデク及びインスリン グラルギン投与後の高インスリン正常血糖クランプでの正常血糖維持に必要な GIR の変化



Each point represents mean ± SD (n=6) of GIR to maintain euglycaemia (5.8 mmol/L) in Beagle dogs 0-12 h after the last injection (Days 11 and 25) of insulin icodec (△ green 2.1 nmol/kg/day, ▲ green 4.2 nmol/kg/day) or insulin glargine (▽ red 2.1 nmol/kg/day, ▼ red 4.2 nmol/kg/day). GIR = glucose infusion rate. Source: Study [redacted]110307

表 2.6.2-13　　イヌにおける高インスリン正常血糖クランプでのグルコース総注入量（GIR AUC）

Compound	**Dose (mmol/kg)**	**GIR $AUC_{0\text{-}12h}$ (mg/kg) (mean ± SD)**	**Approximate potency ratio (% of insulin glargine) (95%CI)**
Insulin icodec	2.1	3060 ± 693	190 (124 – 291)
	4.2	4043 ± 647	
Insulin glargine	2.1	1477 ± 508	
	4.2	3272 ± 1039	

Results are shown as mean ± SD of n=6 (3 animals, crossed over). Potency ratio (%) was calculated based on individual GIR $AUC_{0\text{-}12h}$ values and doses for insulin icodec compared to those for insulin glargine using a linear regression model. GIR AUC = area under the glucose infusion rate-time curve, CI = confidence interval. Source: Study [redacted]110307

結論

ビーグル犬において高インスリン正常血糖クランプ法によりインスリン イコデクの血糖降下作用を評価し、インスリン グラルギンと比較した。インスリン イコデクの *in vivo* 効力は、インスリン グラルギンの 190%と推定された。

2.6.2.2.4.4　ブタを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験（[redacted]101002 及び[redacted]111103 試験）

目的

LYD ブタを用いた試験を 2 回実施し、インスリン イコデクの血糖降下作用を高インスリン正常血糖クランプ法により評価し、インスリン グラルギンと比較した。

方法

インスリン 6 分子あたり亜鉛 4 個、1.6%グリセロール、16 mmol/L フェノール、20 mmol/L メタクレゾール及び 20 mmol/L NaCl で調製したインスリン イコデクを評価した。雌性 LYD ブタ（Gundsøgård、デンマーク、体重 60～100 kg、約 3.5～5 ヵ月齢に相当）を用いた同じ試験手順の実験を 2 回続けて実施し、高インスリン正常血糖クランプを実施した。

（実験 1）LYD ブタ（6 匹/群）にインスリン イコデク（97 及び 128 nmol/匹、約 1.0 及び 1.3 nmol/kg）又はインスリン グラルギン（ランタス®、114 及び 150 nmol/匹、約 1.1 及び 1.5 nmol/kg）を 1 日 1 回、11 日間（試験 0 日～10 日）皮下投与した（[redacted]101002 試験）。

（実験 2）LYD ブタ（6 匹/群）にインスリン イコデク（114 及び 150 nmol/匹）又は同じ用量のインスリン グラルギン（114 及び 150 nmol/匹）を 1 日 1 回、11 日間（試験 0～10 日）皮下投与した（[redacted]111103 試験）。

試験 10 日にインスリン イコデク及びインスリン グラルギンの血漿中濃度を LOCI で測定し、これらの濃度が定常状態に達していることを確認した。インスリン イコデクの LOCI は、それぞれ HI の A 鎖の中央部分及びインスリン イコデクの B25H 置換を認識する mAb である HUI-018 及び M-GIIone-2F4A80 を用いて実施した。インスリン グラルギンの LOCI は、それぞれ天然型インスリン及びインスリン グラルギンを認識する mAb である HUI-001 及び STAB7 を用いて実施した。同日に高インスリン正常血糖クランプを行い、インスリン イコデクの血糖降下作用をインスリン グラルギンと比較評価した。それぞれの群へのインスリン イコデク又はインスリン グラルギンの最終投与直後（0 時間）から 24 時間にわたり、前項で述べたように正常血糖が維持されるように 20%グルコース溶液を注入した。GIR の 0～24 時間の AUC（GIR $AUC_{0\text{-}24h}$）及び 2～24 時間の AUC（GIR $AUC_{2\text{-}24h}$）を算出し、インスリン イコデクとインスリン グラルギンの効力の比較に使用した。

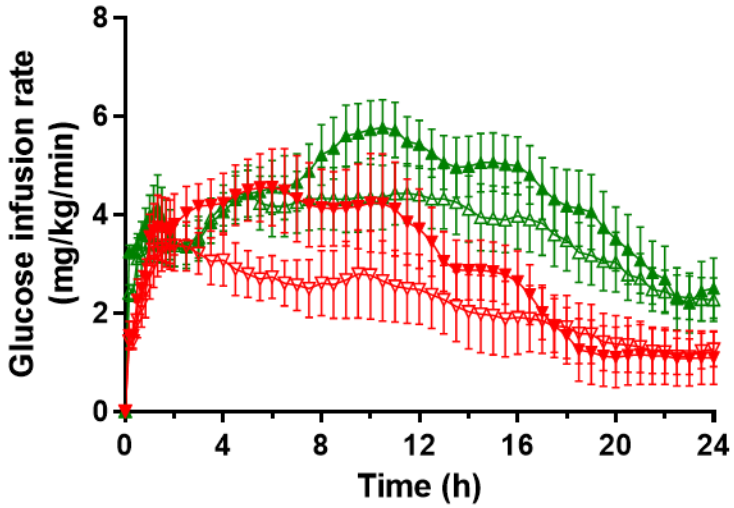
結果

（実験 1）図 2.6.2-20 に、インスリン イコデク（97 及び 128 nmol/匹、約 1.0 及び 1.3 nmol/kg）又はインスリン グラルギン（114 及び 150 nmol/匹、約 1.1 及び 1.5 nmol/kg）の最終投与後に正常血糖（4.4 mmol/L）を維持するために調節された GIR の変化を示す。表 2.6.2-14 に示すように、インスリン イコデクの 2 つの用量における GIR $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 5293 ± 1796 及び 6180 ± 1590 mg/kg

（mean ± SD）であり、これに対応するインスリン グラルギンの GIR $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 3152 ± 1822 及び 4229 ± 1887 mg/kg であった。インスリン イコデク及びインスリン グラルギンの同じモル用量（114 及び 150 nmol/匹）ならびにこれに対応する個々の GIR $AUC_{0\text{-}24h}$ を線形回帰モデルにフィットさせたときのインスリン イコデクの *in vivo* 効力比（インスリン グラルギンに対する比率）は 188%（95%CI：48～729%）と算出された。実験終了後にこの推定効力に 0.85（97/114 及び 128/150 から算出）を乗じて補正すると約 221%（188/0.85 から算出）となった（表 2.6.2-14）。

クランプの早期（0～2 時間）には血漿中グルコース濃度を維持することが難しかったため、効力の算出には GIR $AUC_{2\text{-}24h}$ も使用した。それによると、インスリン イコデクの *in vivo* 効力比（インスリン グラルギンに対する比率）は 191%（95%CI：57～645%）と算出された。実験終了後にこの推定効力に 0.85（97/114 及び 128/150 から算出）を乗じて補正すると約 225%（191/0.85 から算出）となった（表 2.6.2-14）。

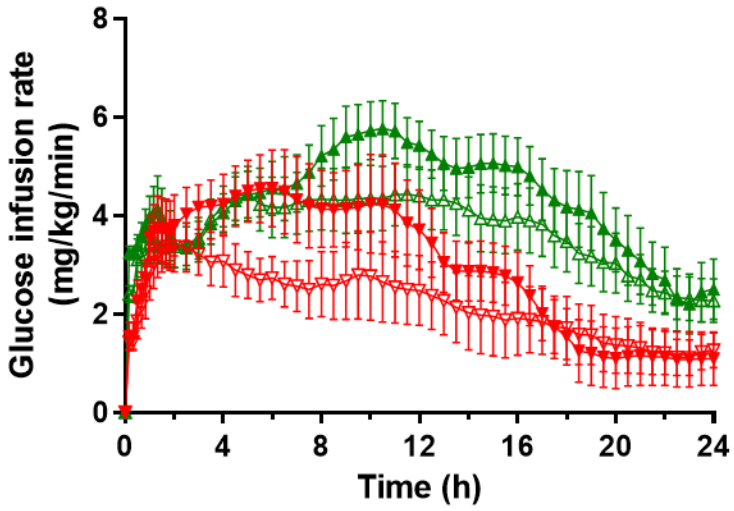
図 2.6.2-20　ブタにおけるインスリン イコデク及びインスリン グラルギン投与後の高インスリン正常血糖クランプでの正常血糖維持に必要な GIR の変化（実験 1）



Each point represents mean ± SD (representative experiment, mean ± SEM, n=6) of GIR to maintain euglycaemia (4.4 mmol/L) in pigs 0 – 24 h after the last injection (days 11) of insulin icodec (Δ green 97 nmol/day, ▲ green 128 nmol/day) or insulin glargine (▽ red 114 nmol/day, ▼ red 150 nmol/day). GIR = glucose infusion rate. Source: Study [redacted]101002

（実験 2）図 2.6.2-21 に、インスリン イコデク又はインスリン グラルギンの同じモル用量（114 及び 150 nmol/匹、約 1.1 及び 1.5 nmol/kg）での最終投与後に正常血糖（4.4 mmol/L）を維持するために調節された GIR の変化を示す。表 2.6.2-14 に示すように、インスリン イコデクの 2 つの用量における GIR $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 5041 ± 1032 及び 6494 ± 1895 mg/kg（mean ± SD）であり、これに対応するインスリン グラルギンの GIR $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ 2883 ± 961 及び 3729 ± 744 mg/kg であり、インスリン イコデクの *in vivo* 効力比（インスリン グラルギンに対する比率）は 177%（95%CI：106～295%）と算出された。その後、GIR $AUC_{2\text{-}24h}$ に基づくと、*in vivo* 効力比は 181%（95%CI：113～291%）と算出された。

図 2.6.2-21　　ブタにおけるインスリン イコデク及びインスリン グラルギン投与後の高インスリン正常血糖クランプでの正常血糖維持に必要な GIR の変化（実験 2）



Each point represents mean ± SD (n=6) of GIR to maintain euglycaemia (4.4 mmol/L) in pigs 0 – 24 h after the last injection (days 11) of insulin icodec (△ green 114 nmol/day, ▲ green 150 nmol/day), or insulin glargine (▽ red 114 nmol/day, ▼ red 150 nmol/day). GIR = glucose infusion rate. Source: Study [redacted]101003

表 2.6.2-14　　ブタにおける高インスリン正常血糖クランプでのグルコース総注入量（GIR AUC）

	Compound	**Dose (nmol/animal)**	**GIR AUC$_{0\text{-}24h}$ (mg/kg) (mean ± SD)**	**GIR AUC$_{2\text{-}24h}$ (mg/kg) (mean ± SD)**	**Approximate potency ratio (% of insulin glargine) (95%CI)**	
					Based on AUC$_{0\text{-}24h}$	**Based on AUC$_{2\text{-}24h}$**
Exp.1	Insulin icodec	97	5293 ± 1796	4884 ± 1717	188 (48 – 729) 221[a]	191 (57 – 645) 225[a]
		128	6180 ± 1590	5719 ± 1510		
	Insulin glargine	114	3152 ± 1822	2792 ± 1761		
		150	4229 ± 1887	3753 ± 1811		
Exp.2	Insulin icodec	114	5041 ± 1032	4573 ± 981	177 (106 – 295)	181 (113 – 291)
		150	6494 ± 1895	6006 ± 1878		
	Insulin glargine	114	2883 ± 961	2494 ± 855		
		150	3729 ± 744	3264 ± 686		

Results are shown as mean ± SD of n=6. Potency ratio (%) was calculated based on individual GIR AUC$_{0\text{-}24h}$ or GIR AUC$_{2\text{-}24h}$ values for insulin icodec compared to those for insulin glargine using a linear regression model.

[a] Corrected value with a factor (0.85 = 97/114, 128/150).

GIR AUC = area under the glucose infusion rate-time curve, CI = confidence interval. Source: Studies [redacted]101002 and [redacted]101003

結論

高インスリン正常血糖クランプ試験におけるインスリン グラルギンと比較したインスリン イコデクの *in vivo* 効力は、実験 1 では 225%、実験 2 では 181%と推定された。

2.6.2.2.4.5　ブタを用いた血漿中グルコースに対する作用（[redacted]160103 試験）

目的

本試験では、LYD ブタに 3 種類のインスリン イコデク製剤処方（インスリン 6 分子あたり亜鉛[redacted]個又は[redacted]個）を単回皮下投与したときの PK/PD プロファイルを比較検討した。

方法

インスリン イコデクについて、1）インスリン 6 分子あたり亜鉛[redacted]個、1.6%グリセロール、25 mmol/L フェノール、25 mmol/L メタクレゾール及び 20 mmol/L NaCl（以下、[redacted]Zn 25/25）、2）インスリン 6 分子あたり亜鉛[redacted]個、1.7%グリセロール、60 mmol/L フェノール、10 mmol/L メタクレゾール（以下、[redacted]Zn 60/10）、又は 3）インスリン 6 分子あたり亜鉛[redacted]個、1.6%グリセロール、25 mmol/L フェノール、25 mmol/L メタクレゾール及び 20 mmol/L NaCl（以下、[redacted]Zn）で調製した 3 種類の製剤処方を評価した。臨床開発に使用された製剤処方は 2.3 Zn 60/10 である。

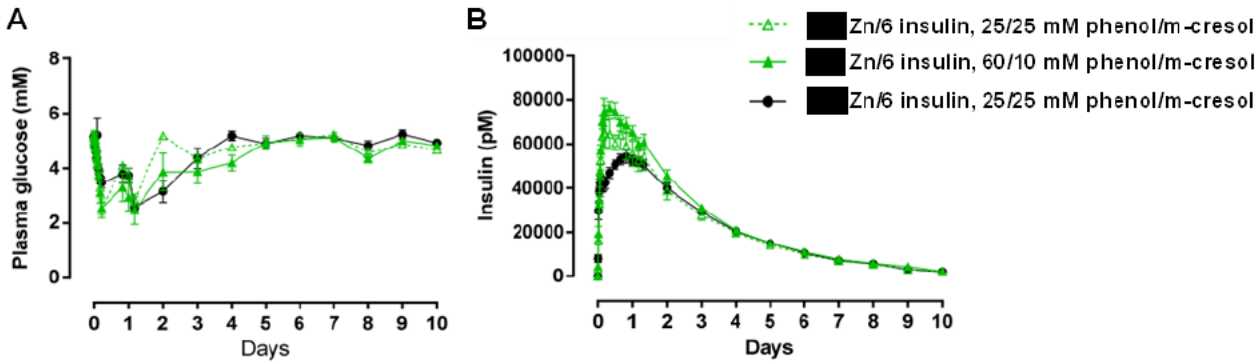
雌性 LYD ブタ（体重 53.5～72 kg、約 3～4 ヵ月齢に相当、5～7 匹/群）にインスリン イコデクの 3 種類の製剤処方を 10 nmol/kg の用量で単回皮下投与した（試験 0 日）。投与直前及び投与 10 日後まで中心静脈カテーテルから血液試料を採取した。血漿中グルコース濃度を固定化グルコースオキシダーゼ法で測定することにより PD プロファイルを解析した。HI を認識する mAb の HUI-0018 及びインスリン イコデクの B25H 置換を認識する mAb の M-GIIone-2F4A80 を用いた LOCI でインスリン イコデクの血漿中濃度を測定することにより PK プロファイルを解析した。

結果

インスリン イコデクの[redacted]Zn 25/25 及び[redacted]Zn 60/10 の PD プロファイルは同様であり、投与直前に比べ投与 5 時間後（給餌直前）の血漿中グルコースをそれぞれ 2.4 及び 2.6 mmol/L 低下させた。[redacted]Zn は同時点において血漿中グルコースを約 1.7 mmol/L 低下させた（図 2.6.2-22A）。

血糖降下作用は PK データと一致していた。2 種類の[redacted]Zn では[redacted]Zn よりも早期かつ高いインスリンのピークが認められたが、PK プロファイルの終末相は 3 種類の製剤処方とも同様であった（図 2.6.2-22B）。

図 2.6.2-22　　インスリン イコデクの異なる製剤処方を単回投与した LYD ブタにおける血漿中グルコース濃度及び血漿中インスリン イコデク曝露量の変化



A: Change of plasma glucose　　B: Change of plasma concentration of insulin icodec
Each point represents mean ± SEM (n=5-7)
Formulations with [redacted]Zn/6 insulin and 25/25 mM phenol/metacresol (Δ green), [redacted]Zn/6 insulin and 60/10 mM phenol/metacresol (▲ green) and [redacted]Zn/6 insulin and 25/25 mM phenol/metacresol (● black).
Source: Study [redacted]160103

結論

LYD ブタに 3 種類のインスリン イコデク製剤処方（[redacted]Zn 及び[redacted]Zn）を 10 nmol/kg の用量で単回皮下投与したとき、いずれの投与群においても血漿中グルコース濃度が低下し、PD プロファイルは同様であった。これらの PD プロファイルは各製剤処方の PK プロファイルとも一致した。

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　*In vitro* 試験

2.6.2.3.1.1　受容体結合アッセイ（212064 及び 212175 試験）

67 種類の標的分子に対するインスリン イコデクの潜在的オフターゲット結合を、*in vitro* での放射性リガンド結合の置換により検討した。インスリン イコデクは 10 µmol/L の濃度［臨床試験における日本人患者の最高血漿中濃度（C_{max}）の平均値の 49 倍］で、2 種類の標的分子に対して、対照の放射性リガンド結合を有意（50%以上）に阻害した。

γ-アミノ酪酸（GABA）$_A$受容体（ムシモール結合部位）に対して、対照の放射性リガンド結合を 79%阻害した。$GABA_A$受容体の別の結合部位（フルニトラゼパム結合部位）及び $GABA_{B1A}$ への結合は認められなかった。モルモット回腸を用いた機能試験によるフォローアップ（212175 試験）において、$GABA_A$受容体の阻害又は刺激を示唆する徴候は 30 µmol/L の濃度で認められず、ラットを用いた CNS の安全性薬理試験（2.6.2.4.2 項）において、GABA 作動性の影響を示すエビデンスは認められなかった。

甲状腺ホルモン受容体に対して、インスリン イコデクは対照の放射性リガンド結合を有意に（67%）阻害した。ラット又はイヌを用いた反復投与毒性試験では、甲状腺の受容体への影響を示すエビデンスは認められなかった（M 2.6.7.7）。

2.6.2.4　安全性薬理試験

インスリン イコデクの安全性薬理試験は、医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A 及び S7B の安全性薬理試験ガイドライン[2, 3]に準拠して実施し、生命維持に重要な機能を司る器官系（CNS、CV 及び呼吸器系）に及ぼすインスリン イコデクの影響を評価した。また、この試験は現行の GLP 規制に従って実施した。偶発的と結論付けられた所見については記載していない。

2.6.2.4.1　*In vitro* 安全性薬理試験

2.6.2.4.1.1　hERG チャネル電流に及ぼす影響の *in vitro* 評価（211478 試験）

hERG カリウムチャネルを安定的に発現している HEK-293 細胞の急速活性化遅延整流電流に及ぼすインスリン イコデクの影響を、標準的な全細胞パッチクランプ法を用いて室温で検討し、溶媒による影響と比較した（n=4/群）。

インスリン イコデクは 10 µmol/L（平均臨床 C_{max} の 49 倍）で hERG テール電流振幅を軽度であるが統計学的に有意に 7%（溶媒による補正値）減少させた。

2.6.2.4.1.2　分離ウサギプルキンエ線維の活動電位パラメータに及ぼす影響の *in vitro* 評価（211479 試験）

分離したウサギ心臓プルキンエ線維の活動電位に及ぼすインスリン イコデクの影響を検討し、溶媒による影響と比較した（n=6/群）。1、3 及び 10 µmol/L の漸増濃度において、静止電位、活動電位持続時間、活動電位振幅及び最大脱分極速度に及ぼす影響は認められず、自発的な automatism（反射運動）ならびに早期及び遅延後脱分極も認められなかった。検討した最高濃度（10 µmol/L）は臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} の 49 倍に相当する。

2.6.2.4.2　*In vivo* 安全性薬理試験

2.6.2.4.2.1　中枢神経系に及ぼす影響（211472 試験）

中枢及び末梢神経系機能に及ぼすインスリン イコデクの影響を雄性ラットの Irwin 試験で検討した（並行群デザイン、n=6/群）。インスリン イコデクは 25、75 及び 150 nmol/kg の用量で単回皮下投与した（C_{max} はそれぞれ 92、333 及び 662 nmol/L、最高血漿中薬物濃度到達時間［t_{max}］は投与後 24 時間）。ベースライン時ならびに投与後 0.5、1、2、6、24 及び 48 時間に観察を行った。

生死、一般状態、体重、直腸温及び神経行動パラメータに及ぼす影響は認められなかった。検討した最高曝露量（662 nmol/L）は臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} の 3.2 倍に相当する。

2.6.2.4.2.2　呼吸器系に及ぼす影響（211471 試験）

覚醒非拘束の雄性ラットの呼吸機能パラメータに及ぼすインスリン イコデクの影響を、全身プレチスモグラフィーチャンバーを用いて検討した（並行群デザイン、n=8/群）。インスリン イコデクは 25、75 及び 150 nmol/kg の用量で単回皮下投与した（C_{max} はそれぞれ 92、333 及び 662 nmol/L、t_{max} は

投与後 24 時間； 211472 試験のデータ、前項参照）。ベースライン時に 30 分間、投与後 0 時間から 6 時間まで、及び投与後 24 時間に 5 分間測定を行った。

インスリン イコデクは呼吸数、吸気時間、呼気時間及び緩和時間、一回換気量及び毎分呼吸量、ピーク吸気及び呼気フロー、ならびに enhanced pause（Penh、気流制限を表す）に影響を及ぼさなかった。検討した最高曝露量（662 nmol/L）は臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} の 3.2 倍に相当する。

2.6.2.4.2.3　心血管系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.3.1　ビーグル犬に単回投与したときの心血管系に及ぼす影響の評価（211468 試験）

覚醒非拘束の雄性ビーグル犬にインスリン イコデクを単回皮下投与したときの動脈血圧、心拍数、ECG 及び体温に及ぼす影響をテレメトリーで検討した（用量漸増デザイン、n=6）。インスリン イコデクは 7、14 及び 21 nmol/kg の用量で単回皮下投与した（C_{max} はそれぞれ 34、75 及び 116 nmol/L、平均 t_{max} はそれぞれ投与後 30、26 及び 17 時間）。試験 0 日に溶媒を、試験 7、14 及び 21 日に漸増用量のインスリン イコデクを投与した。テレメトリー測定は、試験 1 及び 5 日の各投与後に約 22 時間行い、試験 8 日及び 12 日の高用量投与後にも実施した。定性的及び定量的な ECG 評価を実施した。

いずれの用量においても、投与による生死、一般状態、体重増加量、心拍数、QTc を含む ECG パラメータ、血圧及び体温に及ぼす影響は認められなかった。高用量では低血糖症が認められるため、検討した最高用量は 21 nmol/kg であった。最高用量での曝露量（116 nmol/L）は臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} よりも低かった。

2.6.2.4.2.3.2　ビーグル犬を用いた反復投与毒性試験における ECG の評価（211240 及び 213222 試験）

覚醒ビーグル犬（1 投与群あたり雌雄各 3 匹）にインスリン イコデクを反復皮下投与したときの ECG に及ぼす影響を、8 及び 26 週間反復投与毒性試験の一部として検討した。ECG は横臥位で測定し、定量的評価を実施した。

8 週間試験では、インスリン イコデクを 7、14 及び 21 nmol/kg の用量で皮下投与した（なお、試験途中に最高用量は 21 nmol/kg から 18 nmol/kg に変更した。試験 53 日の C_{max} の平均値はそれぞれ 74、174 及び 209 nmol/L）。ECG 測定は投与前、試験終了時、及び休薬期間終了時に実施した（211240 試験）。

26 週間試験では、インスリン イコデクを 6、12 及び 18 nmol/kg の用量で皮下投与した（なお、試験途中に中間用量及び最高用量を 12 nmol/kg から 9 nmol/kg に、18 nmol/kg から 12 nmol/kg にそれぞれ変更した。試験 88 日の C_{max} の平均値はそれぞれ 73、116 及び 168 nmol/L）。ECG 測定は投与前、試験中、試験終了時及び休薬期間終了時に実施した（213222 試験）。

2 つの試験で投与による ECG パラメータに及ぼす影響は認められなかった。高用量では低血糖症が認められるため、検討した最高用量は 18 nmol/kg であった。8 及び 26 週間試験の最高用量での曝露量（それぞれ 209 及び 168 nmol/L）は臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} よりも低かった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

インスリン イコデクの非臨床薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。インスリン製剤については薬力学的相互作用が十分に説明されていることから、インスリン イコデクの非臨床試験は必要ないと判断した。

2.6.2.6　考察及び結論

インスリン イコデクは、HI のアミノ酸配列のうち、Thr^{B30} を欠落させ、Tyr^{A14} が Glu に、Tyr^{B16} 及び Phe^{B25} が His に置換された HI アナログである。また、C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体が Lys^{B29} 側鎖のアミノ基を介してペプチド骨格に付加されている。インスリン イコデクは、これらの分子修飾によりアルブミンに強力に結合し、IR に対する親和性は低いことから、遅いクリアランスと高い循環血中濃度によって、緩徐かつ持続的な PD 反応を獲得した持効性製剤として作用する。作用が持続的であるため、糖尿病の治療には週 1 回皮下投与が適切と考える。

In vivo 薬効薬理試験では、インスリン抵抗性／糖尿病を呈する ZDF ラット、非糖尿病ビーグル犬、及び LYD ブタにインスリン イコデクを皮下投与したときの効力を測定し、臨床で使用されている代表的なインスリン製剤の皮下投与と比較した。ビーグル犬及び LYD ブタへのインスリン イコデクの単回投与では、血糖降下作用が認められ、その PD プロファイルは PK プロファイルに一致していた。ZDF ラットへのインスリン イコデクの反復投与では、血漿中 HbA1c 値が用量依存的に低下し、その効力は NPH インスリン（中間型 HI）の約半分であった。一方、ビーグル犬及び LYD ブタを用いた高インスリン正常血糖クランプ試験で定常状態になるまで投与したところ、GIR に基づくインスリン イコデクの効力は、インスリン グラルギン（持効型 HI）の約 2 倍であった。この差が生じた理由については明らかになっていない。なお、ヒトの有効性及び安全性を評価する第 3 相臨床試験のデータでは、ヒトにおけるインスリン イコデクの効力は 1 日の基礎インスリンと同程度であることが示されており、臨床薬理試験のモデリングで裏付けられている（Module 2.5）。

In vitro 薬効薬理試験では、殆どの試験は血清アルブミン存在下で実施された。インスリン イコデクは、HI と同様に、検討した様々な動物種（ラット、イヌ、ブタ及びヒト）由来の IR（2 つのアイソフォーム IR-A 及び IR-B を含む）に特異的に結合した。これら IR に対するインスリン イコデクの親和性は HI よりも低く、アルブミンの添加で更に低下した。IR と構造的に類似する IGF-1R に対するインスリン イコデクの親和性は極めて低く、0.1% HSA 存在下、50,000 nmol/L までの濃度で殆ど結合しなかった。インスリン イコデクは、HI と同じ濃度依存的な様式で IR をリン酸化し、受容体下流のシグナル伝達経路を刺激した。したがって、インスリン イコデクは HI と同じ作用機序により IR を活性化することが示された。

インスリンの主要な標的器官（脂肪、肝臓、及び筋肉）を代表する細胞を用いて実施した機能アッセイにおいて、インスリン イコデクは、HI と同様、細胞内代謝（脂肪細胞でのグルコース取り込み及び脂質生成ならびに肝細胞及び筋細胞でのグリコーゲン合成）を促進した。脂肪細胞を用いたアッセイにおいてアルブミンの濃度を変化させたところ、アルブミン濃度に依存した効力低下が認められた。また、インスリン イコデクは、初代培養ヒト乳腺上皮細胞、ヒト結腸がん細胞、ヒト IR 過剰発現ラット骨格筋由来遺伝子組換え細胞及びヒト乳腺細胞において、HI と同様、細胞増殖促進作用を示した。代謝促進作用、増殖促進作用ともに、インスリン イコデクの効力は HI と比較して低く、この結果及びその効力がアルブミンにより低下することは、インスリン イコデクの IR への親和性が HI よりも低く、アルブミン存在下では更に低下することと一致していた。細胞増殖促進／代謝促進作用の効力比は HI と同程度であったことから、インスリン イコデクの代謝促進作用と増殖促進作用のバランスは

HI と同様であることが示された。これらの試験で得られたすべての濃度－反応曲線において、インスリン イコデクと HI の曲線は平行で、同程度の最大反応を示した。このことより、インスリン イコデクはヒト IR に対する完全アゴニストであることが示された。

副次的薬理試験及び安全性薬理試験において、*in vitro* でのオフターゲットスクリーニングを行ったところ、インスリン イコデクは 10 µmol/L（臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} の 49 倍）の濃度で $GABA_A$ 及び甲状腺ホルモン受容体に結合することが明らかになった。しかし、機能試験によるフォローアップにおいて $GABA_A$ 受容体の機能への影響は認められず、*in vivo* 安全性薬理試験及び毒性試験において、GABA 作動性の影響及び甲状腺ホルモンに関連する影響を示すエビデンスは認められなかったことから、臨床的に意義のあるものではないと考えられた。hERG チャネル電流に対しては、10 µmol/L（臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} の 49 倍）で弱い阻害作用しか認められなかった。また、ウサギプルキンエ線維の活動電位パラメータへの影響ならびにイヌを用いた単回及び反復投与試験における *in vivo* QT 間隔への影響も認められなかったことから、全体として、hERG チャネル阻害による二次的なヒト QT 延長のリスクは特定されなかった。*In vivo* 安全性薬理試験において、生命維持に重要な機能を司る器官系（CNS、CV 及び呼吸器系）に及ぼす影響は認められなかった。

結論として、インスリン イコデクはヒト IR に対する特異的かつ完全なアゴニストであり、HI と同じ作用機序（受容体下流のシグナル伝達）を有し、期待された血糖降下作用を *in vivo* で発揮することが示された。安全性薬理試験では、ヒトで懸念されるいかなる所見も認められなかった。

参考文献

[1] Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sorensen AR, Wiberg FC, Klein HH, et al. Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. Biochem J. 1996;315 (Pt 1):271-9.

[2] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals S7A, Step 4 version. 08 Nov 2000.

[3] ICH Harmonised Tripartite Guideline. The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals S7B, Current Step 4 version. 12 May 2005.

インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.6.3 薬理試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 15
2.6.3.4 安全性薬理試験 16
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用 16

薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Test article: insulin icodec

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Primary pharmacodynamics					
Binding to solubilized human insulin receptors	Solubilized cloned insulin receptors	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted] 12-11-2010	4.2.1.1-1
Binding to membrane-associated recombinant human porcine and rat insulin receptors	Membranes expressing cloned insulin receptors from various species	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]120424	4.2.1.1-2
Binding to endogenous human porcine rat and canine insulin receptors from liver	Liver membranes from various species	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]120425	4.2.1.1-3
Binding to solubilized human IGF-1 receptors	Solubilized cloned IGF-1 receptors	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]110524	4.2.1.1-4
Binding to membrane-associated recombinant human IGF-1 receptors	Membranes expressing cloned IGF-1 receptors	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]120426	4.2.1.1-5
Insulin receptor binding kinetics	Intact baby hamster kidney (BHK) cells expressing human insulin receptors	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]120429	4.2.1.1-6
Phosphorylation of hIR-A and hIR-B	Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing human insulin receptor A or B form	*In vitro*	Novo Nordisk	323020	4.2.1.1-7
PKB phosphorylation	Chinese hamster ovary (CHO) cells expressing human insulin receptor A	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]111101	4.2.1.1-8
Lipogenesis in isolated rat adipocytes	Isolated adipocytes	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]20110524.1	4.2.1.1-9
Glucose uptake in SGBS human fat cells	Human SGBS adipocytes	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]20110524.2	4.2.1.1-10
Glycogen accumulation in rat hepatocytes	Primary rat hepatocytes	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]HEPGLY 25-MAY-2011	4.2.1.1-11
Glycogen synthesis in L6-hIR cells	L6 myoblasts expressing human insulin receptors	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]110510	4.2.1.1-12

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Glycogen synthesis in MCF-7 cells	MCF-7 human breast cancer cell line	*In vitro*	Novo Nordisk	[redacted]110406	4.2.1.1-13
Mitogenic potency in primary human mammary epithelial cells (HMEC)	Primary human mammary epithelial cells	*In vitro*	Novo Nordisk	215074	4.2.1.1-14
Mitogenic potency in human mammary adenocarcinoma (MCF-7)	Human breast cancer cell line	*In vitro*	Novo Nordisk	211021	4.2.1.1-15
Mitogenic potency in human colon adenocarcinoma cells (COLO-205)	Human colon cancer cell line	*In vitro*	Novo Nordisk	211431	4.2.1.1-16
Mitogenic potency in rat L6 myoblasts transfected with the human insulin receptor (L6-hIR)	L6 myoblasts expressing human insulin receptors	*In vitro*	Novo Nordisk	301435	4.2.1.1-17
Effect on HbA1c in rat	ZDF rat	s.c.	Novo Nordisk	[redacted]110404	4.2.1.1-18
PK/PD relationship in dog	Beagle dog	s.c.	Novo Nordisk	[redacted]110405	4.2.1.1-19
Hyperinsulinaemic euglycaemic clamp in dog	Beagle dog	s.c.	Novo Nordisk	[redacted]110307	4.2.1.1-20
Hyperinsulinaemic euglycaemic clamp in pig I	LYD pig	s.c.	Novo Nordisk	[redacted]101002	4.2.1.1-21
Hyperinsulinaemic euglycaemic clamp in pig II	LYD pig	s.c.	Novo Nordisk	[redacted]111103	4.2.1.1-22
PK/PD relationship in pigs	LYD pig	s.c.	Novo Nordisk	[redacted]160103	4.2.1.1-23
Secondary pharmacodynamics					
Receptor profiling	Cells and *in vitro* isolated tissues	*In vitro*	[redacted]	212064	4.2.1.2-1
Insulin icodec activity in functional tissue assays	Guinea pig ileum	*In vitro*	[redacted]	212175	4.2.1.2-2

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Safety pharmacology					
***Central nervous system*:**					
Effects in the Irwin test in the rat	SD rat	s.c.	[redacted]	211472	4.2.1.3-1
Respiratory system:					
Effects on respiratory parameters in conscious unrestrained rats by whole body plethysmography	SD rat	s.c.	[redacted]	211471	4.2.1.3-2
Cardiovascular system:					
Effect on hERG tail current recorded from stably transfected HEK293 cells	HEK-293 cells	Perfusion *in vitro*	[redacted]	211478	4.2.1.3-3
Effects on action potential parameters in rabbit isolated cardiac Purkinje fibres	Rabbit NZW	Perfusion *in vitro*	[redacted]	211479	4.2.1.3-4
Cardiovascular effects in conscious telemetered Beagle dogs	Beagle dog	s.c.	[redacted]	211468	4.2.1.3-5
Pharmacodynamic drug interactions					
No studies performed.					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test article: insulin icodec

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Binding to solubilized human insulin receptors	Recombinant human insulin receptors	*In vitro*	N/A	N/A	Relative affinities (compared to human insulin) for insulin receptor isoforms A and B of insulin icodec without HSA present during assay conditions were 0.50% (95% confidence interval (CI) 0.43-0.57%, n=3) and 0.78% (95%CI 0.68-0.89%, n=3), respectively Affinities for insulin receptor isoforms A and B in the presence of 1.5% HSA was 0.03% (95%CI 0.03-0.04%, n=3) and 0.03% (95%CI 0.02-0.03%, n=3), respectively The reduction in the apparent affinity in the presence of HSA reflects the ability of insulin icodec to bind albumin.	No	[redacted]_12-11-2010
Binding to membrane-associated recombinant insulin receptors	Rat, pig and human	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec has identical affinities for the short (A) and long (B) isoform of insulin receptors of rat, pig and human origin Assessment of the binding of insulin icodec to the human insulin receptor isoform A at three concentrations of HSA (0.02 – 0.1 – 0.5%) reduced the relative affinity from 0.16% to 0.05% and 0.02%, respectively, reflecting the albumin binding of insulin icodec.	No	[redacted]120424
Binding to endogenous receptors from liver	Rat, dog, pig and human	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec was found to bind with the same affinity to insulin receptors from rat, dog, pig and human livers.	No	[redacted]120425

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Binding to recombinant solubilized IGF-1 receptors	Human	*In vitro*	N/A	N/A	The affinity of insulin icodec for the IGF-I receptors in the absence of HSA was determined to be 0.14% (95%CI 0.13-0.15%, n=3) relative to human insulin.	No	[redacted]110524
Binding to membrane-associated recombinant IGF-1 receptors	Human, rat and canine	*In vitro*	N/A	N/A	Concentrations giving half-maximal inhibition of binding (IC_{50}) were estimated to 0.27 nmol/L (95%CI 0.10-0.75 nmol/L) for human IGF-I and 167 nmol/L (95%CI 139-211 nmol/L) for HI At the highest concentration of insulin icodec (50,000 nmol/L), ^{125}I-IGF-I was hardly displaced Insulin icodec appears to have a very low affinity for human IGF-1 receptors relative to human insulin in experiments performed in the presence of 0.1% human serum albumin and a relative potency compared to HI could not be determined	No	[redacted]120426
Insulin receptor binding kinetics (recombinant receptors)	Human	*In vitro*	N/A	N/A	The observed association rate constant of insulin icodec for the human insulin receptor is similar to that of human insulin The dissociation rate of insulin icodec from the human insulin receptor is faster than that of human insulin	No	[redacted]120429

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Insulin receptor phosphorylation in CHO-hIR cells (recombinant receptors, A and B form)	Human	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec induced autophosphorylation of the human insulin receptor isoforms (hIR-A and hIR-B) in a concentration-dependent manner The relative *in vitro* potencies of insulin icodec in the absence of albumin for IR-A and IR-B phosphorylation was estimated to 0.25% (95%CI 0.20-0.33%) and 0.31% (95%CI 0.23-0.40%), respectively. The potencies relative to human insulin were not different (Student's t-test $p > 0.05$)	No	323020
Insulin receptor and PKB phosphorylation in CHO-hIR cells (recombinant receptors, A form)	Human	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec stimulated phosphorylation of the IR-A and PKB in a typical dose-response fashion, similar to that of human insulin The relative *in vitro* potencies of insulin icodec for IR-A and PKB phosphorylation was estimated to 0.08% (range 0.05 – 0.11%) and 0.19% (range 0.10 – 0.29), respectively The results demonstrate that insulin icodec stimulates the same signalling events as native human insulin albeit with a lower potency	No	[redacted]111101

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Lipogenesis in isolated adipocytes	Rat / Sprague Dawley	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec stimulated lipogenesis in primary rat adipocytes in a typical dose-response fashion, similarly to human insulin. Insulin icodec elicited the same metabolic response as human insulin and is a full agonist in fat cells, in that it gives the same maximal response as human insulin albeit with a lower *in vitro* potency The relative *in vitro* potency of insulin icodec in fat cells depends on the HSA concentration, such that at 0.1% HSA the relative potency of insulin icodec compared to HI was found to be 0.03% (95%CI 0.03-0.03, n=4) while at higher HSA concentrations (1%) the relative potency decreases to 0.02% (r95%CI 0.02-0.02, n=4) The dependency on the HSA concentration reflects insulin icodec's ability to bind to albumin	No	[redacted] 20110524.1

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Glucose uptake in SGBS fat cells	Human	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec activates glucose uptake in human SGBS adipocytes with an EC_{50} value of 86 nmol/L compared to an EC_{50} of 0.049 nmol/L for human insulin The relative biological potency of insulin icodec is 0.06% insulin icodec in the presence of 1% HSA The maximal effect that insulin icodec can produce is not significantly different from the maximal effect produced by human insulin Insulin icodec has reduced relative biological potency in human derived SGBS adipocytes but acts as a full insulin receptor agonist.	No	[redacted] 20110524.2
Glycogen accumulation in hepatocytes	Rat / Sprague Dawley	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec has the same biological effect as human insulin in primary rat liver cells as determined by glycogen accumulation. Insulin icodec stimulates glycogen storage to the same extent as human insulin, indicating that it is a full agonist in rat hepatocytes. The relative *in vitro* potency of insulin icodec in stimulating glycogen accumulation was 4.42% (range 2.9-5.9%, n=7) compared to human insulin determined in the absence of any added albumin and 0.34% (range 0.07-1.07, n=8) in the presence of 0.1% HSA The decrease in relative potency observed with increased HSA reflects the high albumin binding capacity of insulin icodec	No	[redacted] HEPGLY 25-MAY-2011

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Glycogen synthesis in L6-hIR cells	Recombinant human insulin receptors in rat myoblast cell line	*In vitro*	N/A	N/A	Insulin icodec stimulated glycogen synthesis in a typical dose-response fashion, similarly to human insulin Insulin icodec is a full agonist as it stimulates glycogen synthesis to the same maximum response as native human insulin The relative *in vitro* potency of insulin icodec compared to human insulin was found to be 0.52% (95%CI 0.35-0.79%) in the presence of 0.1% HSA.	No	[redacted]110510
Glycogen synthesis in MCF-7 human breast cancer cell line	Human mammary cell line	*In vitro*	N/A	N/A	The *in vitro* metabolic potency of insulin icodec was determined to be 0.26% (95%CI 0.11-0.62%) relative to human insulin	No	[redacted] 110406
In vitro mitogenic potency in primary human mammary epithelial cells (HMEC)	^{3}H-thymidine incorporation in HMEC cells	*In vitro*	N/A	N/A	The *in vitro* mitogenic potency of insulin icodec compared to human insulin was 0.2%	Yes	215074
In vitro mitogenic potency in human mammary adenocarcinoma (MCF-7)	^{3}H-thymidine incorporation in MCF-7 cells	*In vitro*	N/A	N/A	The *in vitro* mitogenic potency of insulin icodec compared to human insulin was 0.5%	No	211021
In vitro mitogenic potency in human colon adenocarcinoma (COLO-205)	^{3}H-thymidine incorporation in COLO-205 cells	*In vitro*	N/A	N/A	The *in vitro* mitogenic potency of insulin icodec compared to human insulin was 2.0%	Yes	211431

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
In vitro mitogenic potency in rat L6 myoblasts transfected with the human insulin receptor (L6-hIR)	^{3}H-thymidine incorporation in L6-hIR cells	*In vitro*	N/A	N/A	The *in vitro* mitogenic potency of insulin icodec compared to human insulin was 0.6%	Yes	301435
Effect on HbA1c (two studies)	Rat / Zucker Diabetic Fatty	s.c. – repeated dosing	I: 122 & 145 nmol/rat q4d for 24 days II: 15 & 31 nmol/rat BID or 122 nmol/rat q4d for 8 days	Male I: n = 6-7 per group II: n = 5 per group	In both studies, human insulin (NPH insulin) 18 nmol/rat was included as reference. Insulin icodec lowered blood glucose and HbA1c levels in a dose-dependent manner. Based on decrease in HbA1C levels, the estimated potency of insulin icodec was 40-50% compared to twice-daily dosed human insulin	No	[redacted]110404
PK/PD relationship	Dog / Beagle	s.c. – single dosing	30	Male n = 5 per group	All dogs were fed once a day at 12 noon. One group was dosed at 12 noon (before feeding) at the group at 12 midnight. After eliminating the plasma glucose values up to four hours after feeding for each group, the data were pooled to give a full PD profile. The maximum glucose lowering effect coincided with the maximum insulin concentration approximately 24 hours after dosing. Duration of action was approximately 7 days.	No	[redacted]110405

In vitro or *in vivo* model	Species/ Strain	Method of Administration	Doses (nmol/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study ID
Hyperinsulinaemic euglycaemic clamp	Dog / Beagle	s.c. – repeated dosing	2.1 & 4.2 nmol/kg/day for 11 days	Male n = 6 per group	12-Hour hyper-insulinemic euglycemic clamp at steady state: Insulin glargine administered at equimolar doses was included as reference. The GIR-AUC data from 0-12 hours were used for calculation of potency, and the potency of insulin icodec was estimated to 1.9 times or 190% relative to insulin glargine.	No	[redacted]110307
Hyperinsulinaemic euglycaemic clamp (I)	Pig / LYD	s.c. – repeated dosing	97 & 128 nmol/pig/ day for 11 days	Female n = 6 per group	24-Hour clamp hyper-insulinemic euglycemic at steady state: Insulin glargine administered at 114 and 150 nmol/pig/day was included as reference. The insulin icodec treated groups were below glucose clamp target for the first two hours, and GIR-AUC data from 2-24 hours were used for calculation of the potency. The potency of insulin icodec was estimated to 2.25 times or 225% relative to insulin glargine (corrected for the slightly lower dose of insulin icodec).	No	[redacted]101002
Hyperinsulinaemic euglycaemic clamp (II)	Pig / LYD	s.c. – repeated dosing	114 & 150 nmol/pig/ day for 11 days	Female n = 6 per group	24-Hour hyper-insulinemic euglycemic clamp at steady state: Insulin glargine administered at equimolar doses was included as reference. The insulin icodec treated groups were below glucose clamp target for the first two hours, and GIR-AUC data from 2-24 hours were used for calculation of the potency. The potency of insulin icodec was estimated to 1.81 or 181% relative to insulin glargine.	No	[redacted]111103

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
PK/PD relationship	Pig / LYD	s.c.	10	Female n = 5-7 per group	Two [redacted]Zn/6 insulin formulations lowered plasma glucose by approximately 2.5 mmol/L compared to 1.5 mmol/L for the [redacted]Zn/6 insulin formulation 5 hours post dosing, i.e. just prior to feeding. The duration of action was around 5 days and comparable for all formulations. The blood glucose lowering effect was consistent with the pharmacokinetic data.	No	[redacted]160103

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test article: insulin icodec

Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Off-target receptor profiling (*in vitro*)	NA	Superfusion	10 µmol/L	NA, n=2	79% inhibition of radioligand binding at the $GABA_A$ receptor 67% inhibition of radioligand binding at the thyroid hormone receptor	No	212064
$GABA_A$ functional tissue assay (*in vitro*, ileum)	Guinea pig, Dunkin Hartley	Superfusion	30 µmol/L	Male, n=2	Follow-up assay to off target receptor profiling (Study ID 212064). No signs of inhibition or stimulation of the $GABA_A$ receptor in guinea pig ileum were detected	No	212175

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test article: insulin icodec

Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Cardiovascular system (*in vitro*, hERG cDNA transfection)	HEK293 cells	Superfusion	10 µmol/L	NA, n=4	7% inhibition of the vehicle corrected hERG tail current	Yes	211478
Cardiovascular system (*in vitro*, Purkinje fibers)	Rabbit / New Zealand White	Superfusion	1, 3, 10 µmol/L	Female, n=6 (ascending dose design)	No effect on any action potential parameters up to and including 10 µmol/L	Yes	211479
Central nervous system (*in vivo*)	Rat / Sprague Dawley	s.c.	0, 25, 75, 150 nmol/kg	Male, n=6 (parallel dose design)	No effects on animal behaviour or physiological functions up to and including 150 nmol/kg	Yes	211472
Respiratory system (*in vivo*)	Rat / Sprague Dawley	s.c.	0, 25, 75, 150 nmol/kg	Male, n=8 (parallel dose design)	No effects on tidal volume, respiratory rate or minute volume up to and including 150 nmol/kg	Yes	211471
Cardiovascular system (*in vivo*)	Dog / Beagle	s.c.	0, 7, 14, 21 nmol/kg	Male, n=6 (ascending dose design)	No effect on arterial blood pressure, heart rate or ECG (including ECG time intervals, PR-, QRS-, QT-, QT_c-intervals) up to and including 21 nmol/kg	Yes	211468

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用

Test article: insulin icodec

No studies performed.