ゾルトファイ配合注フレックスタッチ

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
表目次 4
略語一覧 5
2.6.6.1 まとめ 7
2.6.6.1.1 単回投与毒性 9
2.6.6.1.2 反復投与毒性 9
2.6.6.1.3 遺伝毒性 11
2.6.6.1.4 がん原性 11
2.6.6.1.5 生殖発生毒性 11
2.6.6.1.6 幼若動物を用いた試験 11
2.6.6.1.7 局所刺激性 11
2.6.6.1.8 不純物及び添加物 11
2.6.6.1.9 結論 12
2.6.6.2 単回投与毒性試験 12
2.6.6.3 反復投与毒性試験 12
2.6.6.3.1 ラットにおける 4 週間皮下投与毒性試験（表 2.6.7.7.A、208142） 13
2.6.6.3.2 Wistar 系ラットを用いた 13 週間皮下投与毒性試験（表 2.6.7.7.B、209212） 18
2.6.6.4 遺伝毒性試験 21
2.6.6.5 がん原性試験 21
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 22
2.6.6.7 幼若動物を用いた試験 22
2.6.6.8 局所刺激性試験 22
2.6.6.8.1 ウサギへの皮下、筋肉内及び静脈内注射による単回投与局所刺激性試験（表 2.6.7.15、210203） 23
2.6.6.8.2 ブタにおける単回投与局所刺激性試験（表 2.6.7.15、207451） 25
2.6.6.9 その他の毒性試験 26
2.6.6.9.1 不純物 26
2.6.6.9.1.1 製剤中不純物の評価 26
2.6.6.9.2 その他の毒性に関する事項 28
2.6.6.9.2.1 添加物の評価 28
2.6.6.10 考察及び結論 29
2.6.6.10.1 IDegLira 配合剤の反復投与毒性プロファイル 29

2.6.6.10.2　日本人患者を用いた動物／ヒトの曝露量比.....30
2.6.6.10.3　免疫原性.....31
2.6.6.10.4　がん原性.....31
2.6.6.10.5　生殖発生毒性.....31
2.6.6.10.6　局所刺激性.....31
2.6.6.10.7　製剤中の不純物及び溶出物の評価.....32
2.6.6.10.8　添加物の評価.....32
2.6.6.10.9　総括.....32
参考文献　.....33

表目次

ページ

表 2.6.6-1　重要な毒性試験の概略 7
表 2.6.6-2　重要な反復投与毒性試験の概要表 13
表 2.6.6-3　投与計画 14
表 2.6.6-4　重要な局所刺激性試験の概要表 23
表 2.6.6-5　投与法の要約 24
表 2.6.6-6　*E1　不純物の安全性確認 27
表 2.6.6-7　溶出物の最大臨床曝露量 27
表 2.6.6-8　NOAEL 投与時の動物の曝露量と IDegLira の MRHD 投与時の定常状態でのヒト曝露量との関連性 30

*新薬承認情報提供時に置き換え

略語一覧

略語一覧は Module 2.6 を通して用いられる。したがって、略語の中には本 Module には関連しないものも含まれる可能性がある。

ADA	:	Anti-drug antibody（抗薬物抗体）
AUC	:	area under the concentration-time curve（濃度－時間推移曲線下面積）
AUC/D	:	Dose normalised AUC（用量正規化 AUC）
BG	:	Blood glucose（血糖）
cAMP	:	Cyclic adenosine monophosphate（環状アデノシン一リン酸）
C_{max}	:	Maximum observed concentration in plasma/serum（最高血中濃度）
DRF	:	Dose range finding（用量範囲設定）
EDTA	:	Ethylene diamine tetra-acetic acid（エチレンジアミン四酢酸）
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay（酵素免疫測定法）
FHD	:	First human dose（ヒト初回投与）
GIC	:	Previous name for IDegLira（IDegLira の旧名）
GLP	:	Good laboratory practice（医薬品の非臨床安全性試験の実施基準）
GLP-1	:	Glucagon-like peptide-1（グルカゴン様ペプチド-1）
h	:	Hours（時間）
hERG	:	Human ether-à-go-go related gene（ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子）
IDegLira	:	insulin degludec / liraglutide（インスリン デグルデク／リラグルチド）
ICH	:	International Conference on Harmonisation（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
i.m.	:	Intramuscular（筋肉内）
i.v.	:	Intravenous（静脈内）
LLOQ	:	Lower limit of quantification（定量下限）
LOCI	:	Luminescence oxygen channelling immunoassay（蛍光酸素チャネリング免疫測定法）
LYD	:	Crossbred of Duroc, Yorkshire and Danish Landrace（デュロック・ヨークシャー・デンマークランドレース交雑種）
M	:	Module（モジュール）
MRHD	:	Maximum recommended human dose（ヒトにおける最大推奨臨床用量）
MTD	:	Maximum tolerated dose（最大耐用量）
NOAEL	:	No observed adverse effect level（無毒性量）
PDE	:	Permitted daily exposure（許容一日曝露量）
PEG	:	Polyethylene glycol（ポリエチレングリコール）
PK	:	Pharmacokinetic（薬物動態）
PKB	:	Protein kinase B（プロテインキナーゼ B）
QC	:	Quality controlled（品質管理）
RIA	:	Radioimmunoassay（放射免疫測定）
SD	:	Standard deviation（標準偏差）
s.c.	:	Subcutaneous（皮下）
TK	:	Toxicokinetic（トキシコキネティクス）
T2DM	:	Type 2 diabetes mellitus（2 型糖尿病）

$t_{½}$: terminal half-life（消失半減期）
t_{max} : Time to reach C_{max}（最高血中濃度到達時間）

2.6.6.1 まとめ

インスリン デグルデク／リラグルチド（IDegLira）は、Basal インスリンアナログであるインスリン デグルデク（IDeg）と GLP-1 アナログであるリラグルチドの固定比率配合剤である。IDegLira の毒性学的プログラムは、ヒトの臨床試験及び医薬品の製造販売承認を支持するために、ICH M3 (R2)ガイドラインに従ってデザインした。重要な試験はすべて OECD の GLP（医薬品の非臨床安全性試験の実施基準）の原則に準拠して実施した。表 2.6.6-1 に重要な試験を記載した。

表 2.6.6-1　　重要な毒性試験の概略

Study type and duration	**Route of administration**	**Species/Strain**	**Ratio of IDegLira**
Repeat-dose toxicity			
4 weeks	Subcutaneous	Rat/Wistar	600/1600 nmol/ml
13 weeks	Subcutaneous	Rat/Wistar	600/960 nmol/ml[a]
Local tolerance			
Single dose	Subcutaneous	Pig/Danish country-Yorkshire cross breed	600/1600 nmol/ml
Single dose	Subcutaneous, intramuscular and intravenous	Rabbit/New Zealand White	600/960 nmol/ml[a]

[a] Ratio used in phase 3 trials and in product intended for the market

ICH M3 (R2)ガイドラインでは、配合剤の臨床試験及び製造販売承認を支持するための非臨床試験は、一般的に適切な動物種 1 種に限定されるべきであるとしている。ラットは、IDeg 及びリラグルチドのいずれに対しても薬理学的感受性を有していること、及び各成分での開発プログラムにおいて使用されていたことに基づき、最も適した動物種として選択された。

すべての毒性試験において、投与経路は臨床適用経路である皮下（s.c.）とした。動物には、フェノール、グリセロール及び[redacted]を含有する IDegLira 溶液を投与した。対照群には、[redacted]を含有しない同一溶媒を投与した。

IDeg／リラグルチドの配合比率は、臨床用製剤の配合比率を変更したために、非臨床開発プログラムでも進捗中に変更した。すなわち、ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験及びブタにおける局所刺激性試験は、IDeg 600 nmol/mL とリラグルチド 1600 nmol/mL の固定配合比率で検討されたが、その後実施したラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験及びウサギを用いた局所刺激性試験では、固定配合比率が IDeg 600 nmol/mL とリラグルチド 960 nmol/mL に変更された。この配合比率は、第 3 相臨床試験プログラムで使用されたものである。

すべての非臨床試験で使用された添加物の組成は同じであったが、ウサギを用いた局所刺激性試験ではフェノール濃度が 6.2 mg/mL であり、ラットを用いた反復投与毒性試験及びブタを用いた局所刺激性試験で使用されたフェノール濃度 4.7 mg/mL よりもわずかに高かった。なお、販売予定の IDegLira 製剤のフェノール濃度は 5.7 mg/mL である。

非臨床試験における IDegLira の用量は nmol/kg で表記しているが、それによって、2 つの有効成分で同一の単位が用いられ、また、IDeg の非臨床プログラムとの整合性が図られる。したがって、IDegLira の 20/54 nmol/kg/日は IDeg の 20 nmol/kg/日及びリラグルチドの 54 nmol/kg/日と同等である。また、このことはリラグルチドの非臨床開発プログラムで mg/kg が使用されていたこととは異なる。用量を比較する場合、IDeg の 60 nmol は 10 単位、リラグルチドの 100 nmol は 0.375 mg に相当することから、IDegLira のヒトにおける最大推奨臨床用量（MRHD）である 50 単位/1.8 mg は IDeg の 300 nmol 及びリラグルチドの 480 nmol に相当する。

AUC 及び C_{max} に基づく動物/ヒトの曝露量比を、各試験のトキシコキネティクス（TK）データと MRHD である IDeg 50 単位/リラグルチド 1.8 mg の臨床試験から得られたヒトにおける定常状態の薬物動態（PK）データから算出した。IDeg 及びリラグルチドに対する抗体産生は、重要な毒性試験 2 試験で評価した。

健常な正常血糖ラットへのインスリン投与は、既知の一般状態変化パターン及び低血糖症に関係した死亡の発現に関連する。同様な結果は IDegLira の 4 週間試験でも認められた。すなわち、IDegLira のラット 4 週間試験では、低血糖症様の一般状態変化及び血中グルコースの低値（< 2 mmol/L）は、IDeg の単剤投与時と比較してより低用量で認められた。これは、リラグルチドの薬理作用である摂餌量の減少に関連し、結果としてラットの血中グルコースレベルの低下への対応能が低減しているものと考えられた。死亡は、動物が低血糖症様の一般状態変化を呈した後に安楽死処置された／死亡が確認された場合、又は死亡前に血中グルコース濃度の低値が測定された場合のいずれかでみられており、低血糖症によって引き起こされたものと考えられた。低血糖症及び低血糖症に関連した組織学的変化はインスリン特有の薬理作用の結果であり、したがって、予期される過剰な薬理作用を示すものと考えられる。この解釈は、IDeg を含む他のインスリンアナログの評価とも一致する。同様に、4 週間試験で認められた摂餌量減少及び体重増加抑制に起因すると考えられる変化は、予期されたリラグルチドの薬理作用によるものであり、毒性ではないと考えられた。以上の理由から、無毒性量（NOAEL）は、過剰な薬理作用によると考えられる変化以外に有害影響が確認されない用量であると考えられる。

提出したすべての試験では、投与による影響を受けた又は影響を受けた可能性のある測定項目のみを取上げて考察し、一方、測定項目の中で投与による影響を受けなかったものについては言及しなかった。

2.6.6.1.1　　単回投与毒性

ICH M3 (R2)に従い、IDeg及びリラグルチドの各成分での単回投与毒性が評価されていることから、IDegLiraの単回投与毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.2　　反復投与毒性

ラットを用いた4週間及び13週間反復投与毒性試験を実施した。13週間試験には4週間の回復性検討期間も組み入れた。4週間試験では、IDegLiraの初期の設定用量は0/0、10/27、30/80及び60/160 nmol/kg/日であった。低血糖症の一般状態変化及び低血糖症に関連した死亡がみられたことから、IDegLiraの60/160 nmol/kg/日投与群を試験第11日に中止し、以降は、中用量群を20/54 nmol/kg/日に減じた。13週間試験のIDegLiraの用量は、0/0、2/3.2、7/11.2及び20/32 nmol/kg/日であった。

4週間試験において、低血糖症様の一般状態変化及び低血糖症に関連した死亡が認められた。血中グルコースレベルは全投与群で低下した。13週間試験では、血中グルコースレベルの低下が20/32 nmol/kg/日群でより顕著であったものの、2/3.2及び7/11.2 nmol/kg/日群では血中グルコースレベルに対する影響は軽微であった。体重増加抑制が4週間及び13週間試験で認められたが、摂餌量の減少は4週間試験でのみ認められた。

4週間及び13週間試験において、血液学的検査及び血液生化学的検査項目にわずかな変化が認められたが、これらの変化は病理組織学的変化を伴っていなかったことから、毒性学的関連性はないものと考えられた。

尿検査パラメータの変化が13週間試験で認められたが、同様の変化はIDegを単剤で投与した時にも認められた。

IDegLiraを投与されたすべての動物に全身曝露が確認された。AUC及びC_{max}を基にした曝露は用量比例的に増大し、性差は認められなかった。13週間までの投与において、全身性の蓄積は全くないか限定的（<2倍）であった。一部のラットでは、IDegに対する抗体が産生されたが、リラグルチドに対する抗体を産生したラットは認められなかった。抗IDeg抗体は、IDegに関して血中グルコース低下作用が確認されたこと及び付随する薬物曝露データから示されたように、中和作用は全く認められなかった。したがって、抗IDeg抗体は試験結果に影響を及ぼさないと考えられた。

4週間及び13週間試験において器官重量の変化が認められた。4週間試験では、対照群と比較して、前立腺の絶対及び相対重量ならびに心臓の絶対重量の減少が認められた。これらの変化は、著しい摂餌量及び体重の変化に関連すると考えられた。13週間試験において、腎臓及び卵巣の相対重量が増加し、副腎の絶対重量及び脳比重量が減少した。腎臓及び卵巣重量の変化は体重増加抑制に関連すると

考えられた。副腎重量の変化は、IDegLira 7/11.2 nmol/kg/日投与群の雌のみにみられたことから、偶発的な変化であると考えられた。

4 週間試験における肉眼的及び顕微鏡的検査から、以下のことが明らかとなった：副腎における皮質細胞の空胞形成がみられた。この変化は、本試験でみられた摂餌量減少により血中グルコースレベルの低下が増悪したことに対する適応反応として、糖質コルチコイドの産生増大を反映していると考えられた。肝臓では、グリコーゲン蓄積の増大を示唆すると考えられる、軽微から軽度までの細胞質の染色希薄化が認められた。この変化は過剰な糖質コルチコステロイド、すなわち、副腎の空胞形成に関連する反応としてよく知られている現象である[1,2]。IDegLira 20/54 nmol/kg/日投与ラットを剖検したところ、2/10 例に前立腺及び精嚢の小型化が認められた。この所見と一致して、同投与群では前立腺重量の減少がみられた。なお、前立腺及び精嚢に病理組織学的変化は認められなかった。精細管では VII/VIII ステージの精母細胞に軽微なアポトーシスが認められた。これらの前立腺と精嚢の変化ならびに VII/VIII ステージ特異的な精母細胞のアポトーシスは、本試験でみられた摂餌量／体重増加抑制に関連すると考えられる。同様に、前立腺、精嚢及び精巣の変化は食事制限ラットでも報告されている[3]。摂餌量の減少はリラグルチドの既知の薬理作用であることから、前立腺ならびに精嚢の変化及び精母細胞のアポトーシスはリラグルチドの薬理作用に関連したものと考えられた。ステージ特異的な精母細胞のアポトーシスに加え、精巣では精細管の変性の発生頻度の増加が認められた。この変化は、低血糖症に関連すると考えられ、他のインスリンの試験でも認められている[4,5,6,7,8]。注射部位では、用量に関連した潰瘍の発生頻度の増加が 4 週間試験で認められたが、組織学的検査では試験物質投与群と溶媒投与群との間に差異は認められなかった。注射部位の顕微鏡的検査において、炎症細胞浸潤、壊死及び線維化／肉芽組織を特徴とする軽度から中等度の反応が対照群を含む全群でみられたが、群間差は認められなかった。

13 週間試験では、毒性学的関連性のある肉眼的又は顕微鏡的な変化は認められなかった。とりわけ、副腎、肝臓、前立腺、精嚢又は精巣に関して、投与に関連した所見は認められなかった。IDegLira 投与群における注射部位反応は溶媒投与群と同様であった。以上の結果から、NOAEL は IDegLira の 20/32 nmol/kg/日と考えられた。

反復投与毒性試験の結果から、有効成分に関わる過剰な薬理作用に関連した変化を除いて、安全性上の懸念がないことが明らかになったことから、非臨床開発プログラムを通して IDegLira の反復投与毒性プロファイルは十分に評価されていると考えられる。

2.6.6.1.3　遺伝毒性

IDeg 及びリラグルチドの遺伝毒性に関する評価は、現行の基準（ICH S6 (R1)、ICH M3 (R2)及び ICH S2 (R1)）に準拠して実施されている。したがって、固定比率配合剤である IDegLira の遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.4　がん原性

IDeg 及びリラグルチドともに現行の基準（(ICH S1A-S1C、ICH M3 (R2)及び ICH S6 (R1)）に準拠してがん原性の評価が行われていることから、固定比率配合剤である IDegLira のがん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.5　生殖発生毒性

IDeg 及びリラグルチドとも、適切なガイドライン（ICH M3 (R2)、ICH S5 (R2)）に準拠して生殖発生毒性が検討されている。IDeg 及びリラグルチド単剤の生殖発生毒性プロファイルが詳細に検討されていることから、ICH M3 (R2)に準拠して、IDegLira の生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.1.6　幼若動物を用いた試験

小児及び成人集団におけるインスリンの生理学及び薬理学は周知であること、さらに単剤のデータが得られていることを考慮すると、幼若動物を用いた毒性試験が新たな情報を提供することにはならないと考えられた。したがって、IDegLira の幼若動物を用いた試験は実施しなかった。

2.6.6.1.7　局所刺激性

局所刺激性はウサギ及びブタを用いて検討した。さらに、IDegLira の重要な反復投与毒性試験に局所刺激性を組み入れて評価した。

局所での組織反応は軽度かつ溶媒投与で認められた変化と同程度であり、適用経路である皮下投与時、又は、意図しない静脈内もしくは筋肉内投与時においても、局所刺激性の懸念はないものと考えられた。

2.6.6.1.8　不純物及び添加物

すべての不純物の安全が確認されていることから、提示した IDegLira に関する有効期間規格及び製品使用時の評価基準は受け入れ可能であると考えられた。容器施栓系からの溶出物のレベルが決定された。溶出物に対して予測されるヒト曝露レベルが評価され、安全性上の懸念はないことが確認された。IDegLira で使用される添加物は現在市販のインスリン製剤でも使用されている一般的なものであり、ヒトの使用において安全であると考えられる。

2.6.6.1.9　　結論

反復投与毒性及び局所刺激性を評価した試験に基づき、IDegLira の非臨床プログラムからヒトに関して安全性上の懸念はないことが明らかとなった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

単回投与毒性は IDeg 及びリラグルチドのそれぞれに関して単剤で評価されている。ICH M3 (R2)に従い、IDegLira では単回投与毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

毎日反復投与後に続く毒性は、Wistar 系ラットにおける 4 週間及び 13 週間試験で評価され、13 週間試験では 4 週間の回復性検討期間も設定された（表 2.6.6-2）。げっ歯類は IDeg 及びリラグルチドに薬理学的感受性を示しており、両化合物の開発プログラムでも用いられてきたことから、ICH M3 (R2)に基づき、IDegLira の反復投与毒性試験に最適な動物種としてラットが選択された。両試験において、血液学的検査、血液生化化学的検査及び尿検査を含む臨床病理学的検査用に血液及び尿試料を採取した。主試験の全動物を詳細に剖検し、選抜した器官の重量測定又は組織学的検査を行った。

表 2.6.6-2　　重要な反復投与毒性試験の概要表

Study number	**208142**	**209212**
Study duration	4 weeks	13 weeks, 4 week recovery
Species/strain	Wistar rats	Wistar rats
Test article	600 nmol IDeg/1600 nmol liraglutide per ml	600 nmol IDeg/960 nmol liraglutide per. ml.
Conversion of nmol to mg of liraglutide[a]	1600 nmol liraglutide = 6 mg liraglutide 100 nmol liraglutide = 0.375 mg liraglutide	960 nmol lirglutide = 3.6 mg liraglutide 100 nmol liraglutide = 0.375 mg liraglutide
Composition of Drug Products	Per ml IDegLira: 4.7 mg phenol, 19.7 mg glycerol, [redacted], q.s. sodium hydroxide, q.s. hydrochloric acid, ad 1 ml milliQ water, pH=8.2. Dosing volume 1ml/kg	Per ml IDegLira: 4.7 mg phenol, 19.7 mg glycerol, [redacted], q.s. sodium hydroxide, q.s. hydrochloric acid, ad 1 ml milliQ water, pH=7.8. Dosing volume 0.5 ml/kg
Route of administration	Subcutaneous	Subcutaneous
Animals/gender/group	Main study: 4 groups of 10 males and 10 females TK Satellite study:4 groups of 12 males and 12 females	Main study: 4 groups of 10 males and 10 females TK Satellite study: 4 groups of 14 males and 14 females Recovery groups: 2 groups of 5 males and 5 females
Dose levels of IDegLira	0/0 nmol/kg/day 10/27 nmol/kg/day 30/80 on Day 12 reduced to 20/54 nmol/kg/day[c] 60/160[b] nmol/kg/day. Reduced on Day 9 to 45/120 nmol/kg/day.	0/0 nmol/kg/day 2/3.2 nmol/kg/day 7/11.2 nmol/kg/day 20/32 nmol/kg/day
NOAEL	20/54 nmol/kg/day IDegLira	20/32 nmol/kg/day IDegLira

a: Doses of liraglutide were listed as mg/kg in the liraglutide development programme. To facilitate comparison between studies, the conversion between nmol and mg of liraglutide is provided.
b: The group dosed with 60/160 was terminated on Day 11 due to clinical signs consistent with hypoglycaemia and hypoglycaemia related mortality.
c: The dose was reduced due to hypoglycaemia and clinical signs consistent with hypoglycaemia

2.6.6.3.1　　ラットにおける 4 週間皮下投与毒性試験（表 2.6.7.7.A、208142）

本試験では、IDeg 600 nmol/mL とリラグルチド 1600 nmol/mL を含む固定配合比率の IDegLira が検討された。本試験で検討した配合比率は、市販予定の製剤（IDeg 600 nmol/mL とリラグルチド 960 nmol/mL）と比較して、リラグルチドが多く含まれている。

ラットを用いた重要でない 2 週間用量範囲設定試験において（表 2.6.7.6、208068）、IDegLira の 60/160 及び 90/240 nmol/kg/日で血中グルコースレベル及び体重に及ぼす予期された薬理作用ならびに低血糖症に関連した死亡が認められたことに基づき、用量を選択した。

4 週間毒性試験の主試験では、雌雄各 10 例の 4 群編成とし、加えて、TK 測定、グルコースプロファイリング及び抗体分析用に雌雄各 12 例のサテライト試験群も編成した。被験物質投与群には、当初、IDegLira の 0/0〔IDegLira の溶媒：4.7 mg/mL フェノール、19.7 mg/mL グリセロール、塩酸（適量）及び水酸化ナトリウム（適量）、pH 8.2〕、10/27、30/80、60/160 nmol/kg/日を投与した。

低血糖症に一致した一般状態変化が、IDegLira の 30/80 及び 60/160 nmol/kg 日投与群で投与第 1 日から 9 日まで認められた。さらに、低血糖症に関連した死亡及び瀕死動物が、60/160 nmol/kg 日の 第 3 日から 9 日までに認められた。第 9 日に、60/160 nmol/kg/日の用量を 45/120 nmol/kg/日に減じた。動物に低血糖症に一致した一般状態変化が引き続きみられたことから、第 11 日目に投与を中止した。投与中止群の動物を剖検したが、対応する対照群がいないことからそれ以上検討しなかった。中用量群では、第 10 及び 11 日に投与を行わず、第 12 日に IDegLira の用量を 30/80 nmol/kg/日から 20/54 nmol/kg/日に減じた。投与計画の変更時期を表 2.6.6-3 に示す。投与開始から第 9 日までは IDegLira 30/80 nmol/kg/日が投与されているが、読みやすくするため、第 10 日以降は、20/54 nmol/kg/日とする。

表 2.6.6-3　　投与計画

Group (nmol/kg/day IDegLira)	**Day 1-7**	**Day 8**	**Day 9**	**Day 10-11**	**Day 12-28**
Control	0/0				
Low	10/27				
Mid	30/80			0/0	20/54
High	60/160	0/0	45/120	Not dosed on Day 10 and euthanised on Day 11	

試験中、1 日 2 回、一般状態観察を行った。体重及び摂餌量は週 2 回記録した。眼科学的検査は投与開始前及び第 22 日に行った。血中グルコースプロファイリング及び TK 分析のため、第 1 日及び最終日に血液試料を以下の時点で収集した：投与前、投与後 1、2、4、6、8、12 及び 24 時間。低血糖症を確認するため、血中グルコース測定用に追加選択した血液試料を第 1、2、4 及び 9 日に採取した。IDeg 及びリラグルチドに対する抗体確認用の血液試料を主試験動物では投与開始前ならびに剖検時、及びサテライト試験群では最終投与後第 7 日に採取した。血液学的検査、血液凝固検査及び血液生化学的検査用の血液試料は、計画最終堵殺時に採取し、尿試料は投与最終週に主試験群から採取した。投与第 1 群（対照群）～第 3 群（中用量群）の主試験の全動物について剖検を詳細に行い、選抜した器官の重量測定又は組織学的検査を行った。

IDegLira 60/160 nmol/kg/日投与群では、雌 5 例及び雄 1 例が投与第 3～9 日に死亡し、瀕死期状態の雌 2 例を第 9 日に安楽死処置した。死因は、鎮静、立毛及び円背位などの低血糖症様の一般状態変化ならびに IDegLira 30/80 及び 60/180 nmol/kg/日投与群で認められた、第 4 及び 9 日の血中グルコース濃

度の低値（< 2 mmol/L）に基づき、低血糖症であると考えられた。この他、注射部位の潰瘍（サテライト試験群の雄 2 例）又は血液試料採取中に発生した眼部の損傷（サテライト試験群の雌 3 匹）が認められた動物を安楽死処置した。

試験期間中、注射部位において無毛域、発赤及び表層部の潰瘍がみられた。これらの反応は IDegLira 投与群でより顕著であり、用量関連性が認められた。

用量依存的な体重増加抑制が投与群の雌雄全例に認められた。体重に対する影響は第 14 日で最も顕著であった。

眼科学的検査では投与に関連した変化は認められなかった。

血清中グルコースレベルは、IDegLira.投与群の雌雄で用量依存的な低値を示した。平均血中グルコースレベルの最低値は第 1 日の投与後 4～6 時間及び第 28 日の投与後 2～6 時間に認められた。その影響は第 28 日で最も顕著であった。第 1、2、4 及び 9 日に採取した血液試料は、IDegLira 20/54 及び 60/160 nmol/kg/日投与群で、主として第 4 及び 9 日に血中グルコースレベルの低値を示し、血液を採取したラットの 15/16 例で血中グルコースレベルが 2 mmol/L 付近又はそれ未満であった。なお、第 1 日の対照群の血中グルコースレベルは 6. 1～8.0 mmol/L であった。

投与群の全例で IDeg 及びリラグルチドの全身曝露が確認され、対照群動物では曝露は認められなかった。C_{max} 及び AUC に基づく曝露は、概して用量比例性であり、性差は認められなかった。第 1 日と比較して第 28 日では軽微な曝露量の増大が認められたが、2 倍未満であった。投与後の IDeg 及びリラグルチドの t_{max} はそれぞれ投与後 1～4 時間及び 4～12 時間であった。

血液学的検査項目の変化は概して軽微であった。統計学的に有意な変化が総白血球数、白血球百分率、赤血球数及び平均血小板容積で認められた。白血球数は全投与群で高値を示し、IDegLira 20/54 nmol/kg/日投与群のみならず 10/27 nmol/kg/日投与群の雌雄でも統計学的に有意差が認められた。リンパ球及び非染色性大型細胞の絶対及び相対数は全投与群の雌雄で高値を示し、ほとんどの群で統計学的に有意差が認められた。さらに、好中球及び好酸球の相対数は、IDegLira 20/54 nmol/kg/日投与の雄における好酸球の相対数を除いて、全投与群の雌雄で低値を示した。赤血球数及び平均血小板容積は IDegLira 10/27 nmol/kg/日及び 20/54 nmol/kg/日投与群の雄で統計学的に有意な低値が認められた。対応する病理組織学的変化は認められなかったことから、これらの変化は毒性学的に重要でないと考えられた。

アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、クレアチニンキナーゼ及び尿素の軽微な高値が、IDegLira の 10/27 nmol/kg/日投与の雄及び 20/54 nmol/kg/日投与の雌雄

で認められた。ほとんどの群で統計学的に有意差が認められた。全項目において同程度の高値がリラグルチドの 4 週間試験でも認められている[9]。統計学的に有意かつ軽微なアルブミン及び総タンパク質の低値が IDegLira の全投与群の雌で、また、統計学的に有意なカリウムの高値が IDegLira 20/54 nmol/kg/日投与群の雄で認められた。臨床病理学的検査項目の多様な変化が IDeg の単剤での検討時にもみられている。さらに、統計学的に有意かつ軽微な変化が以下の項目で認められた：IDegLira 10/27 nmol/kg/日投与群の雌を除く全投与群で乳酸脱水素酵素の高値、IDegLira 全投与群の雄でカルシウムの高値、IDegLira 20/54 nmol/kg/日投与群の雌でリン酸の低値。乳酸脱水素酵素及びカルシウムレベルの高値はリラグルチドの単剤での検討時にも認められている[9]。血液生化学的検査項目に軽微な変化が認められたものの、関連する病理組織学的変化はみられなかったことから、認められた変化は IDeg 及びリラグルチドの代謝変化に関連するものであり、毒性学的に重要でないと考えられた。

血液凝固検査及び尿検査項目には、IDegLira 20/54 nmol/kg/日投与群の最終週の雌で認められた統計学的に有意な尿量の高値を除き、投与に関連した影響は認められなかった。

リラグルチドに対する抗体は検出されなかった。83 例を検討した結果、IDegLira 10/27 nmol/kg/日投与群の 3 例及び 20/54 nmol/kg/日投与群の 7 例は、IDeg に対する抗体陽性であることが判明した。本試験で抗体陽性を示した割合は、IDeg 単剤の毒性試験で認められた割合と同様であった。産生された抗体の中和作用は測定しなかったが、抗体陽性を示したラットの 2/10 例から TK 解析及びグルコースプロファイリング用に血液試料を採取しており、2 例の IDeg 曝露量はいずれも、IDeg を投与されたものの抗体陰性を示したラットと同等であった。これらのことから、抗体は中和作用を有さないと考えられた。

剖検時、前立腺及び精嚢の小型化が IDegLira 20/54 nmol/kg/日投与群の 2 例で認められた。本試験では精嚢重量は記録しなかったが、これらの所見はリラグルチド単剤での検討時にも報告されている[10]。したがって、精嚢に及ぼす影響は摂餌量に及ぼすリラグルチドの薬理作用に関連するものと考えられる。前立腺の絶対及び相対重量は IDegLira の投与全群の雄で統計学的有意に減少した。本所見は、リラグルチドの薬理作用に起因する摂餌量の減少及びその結果としての体重増加抑制に関連するものと考えられる。なお、リラグルチド単剤の検討試験においても前立腺重量の減少が認められている[9,11]。IDegLira 10/27 ならびに 20/54 nmol/kg/日投与群の雄及び 10/27 nmol/kg/日投与群の雌で、対照群と比較して心臓の絶対重量が統計学的有意に減少した。心臓の相対重量の差は 10%未満であり、統計学的に有意差は認められなかったことから、全投与群でみられた体重減少に関連するものと考えられた。さらに、前立腺、精嚢又は心臓に病理組織学的変化がみられないことから、本所見の毒性学的意義はないと考えられた。

副腎では、軽微な皮質細胞の空胞化の用量依存的な発生頻度の増加が認められた。本変化は、血中グルコースレベルの低値、摂餌量の減少及び体重増加抑制に対する適応反応としての糖質コルチコイド合成の増大を意味するものと考えられた。肝臓では肝細胞の細胞質の染色希薄化の用量依存的な増加が認められ、所見の程度は軽微から軽度であった。形態学的様相に基づくと、本変化はグリコーゲン蓄積の増大を示すものと考えられた。

精巣では、軽微な精細管変性の発生頻度の用量依存的増加が、対照群の 1 例、IDegLira 10/27 nmol/kg/日投与群の 1 例及び 20/54 nmol/kg/日投与群の 4 例に認められた。本変化は、本試験における血中グルコース低値による二次的な変化であると考えられた。低血糖症ラットにおいて同様な精巣の変化がすでに報告されている [4,5,6,7,8]。また、VII/VIII ステージの精細管における精母細胞のアポトーシスが、IDegLira 10/27 nmol/kg/日投与群の 1 例及び 20/54 nmol/kg/日投与群の 5 例に認められた。本所見は、摂餌量の減少／体重増加抑制に関係するものと考えられた。同様な変化は食餌制限ラットでも報告されている [3]。摂餌量の減少はリラグルチドの既知の薬理作用であり、したがって、ステージ特異的な精母細胞のアポトーシスはリラグルチドの薬理作用による二次的な変化であると考えられた。すべての精巣の変化は、病理組織学的には最も程度の低い軽微な変化と判定された。病理組織学的検査では、精母細胞又は胚細胞数の減少を示す兆候は認められなかった。

注射部位である皮下では、炎症細胞浸潤、壊死及び線維化／肉芽組織形成が認められた。変化は対照群を含む全群で同等であり、変化の程度は軽度から中等度であった。このことから、この変化は投与手技又は媒体に関係していると考えられた。注射部位の病理組織学的験所見と試験中に認められた注射部位の反応とは相関しなかった。

体重増加量、摂餌量、血中グルコースレベル、精嚢、前立腺重量及び臨床化学的検査に及ぼす影響は IDeg 又はリラグルチド単剤での試験でも認められていたが、IDegLira で認められた所見の一部、すなわち、副腎、肝臓及び精巣の組織学的変化は、これまで IDeg 又はリラグルチド単剤の投与後では報告されていなかった。これらの変化は、IDeg の薬理作用である血中グルコースレベルの低下と、リラグルチドの薬理作用である体重／摂餌量の減少が組み合わさって生じたものと考えられる。これらの変化については、2.6.6.10 でより詳細に考察する。

結論として、IDegLira 0/0、10/27、20/54 及び 60/160（当該用量は投与第 11 日に中止） nmol/kg/日を 4 週間皮下投与した結果、低血糖症、低血糖症様の一般状態変化及び低血糖症に関連した死亡、投与終了時体重及び摂餌量の減少、血液学的及び血液生化学的変化、前立腺の重量変化ならびに肝臓、精巣及び副腎の組織学的変化が認められた。この影響は、IDeg とリラグルチドの組み合わさった薬理作用又は過剰な薬理作用に関連するものと考えられ、毒性影響とは考えられなかった。以上のことから、NOAEL は IDegLira 20/54 nmol/kg/日であると考えられた。

2.6.6.3.2　Wistar 系ラットを用いた 13 週間皮下投与毒性試験（表 2.6.7.7.B、209212）

本試験では IDeg 600 nmol/mL とリラグルチド 960 nmol/mL の固定比率配合剤について検討した。IDeg とリラグルチドの比率は、前述の 4 週間毒性試験で検討した比率とは異なるが、第 3 相臨床試験で検討した配合比率及び市販予定製剤の配合比率と同等であった。

主試験では、雌雄各 10 例の 4 群編成とし、さらに、回復試験群として雌雄各 5 例の 2 群編成とした。抗体分析は主試験群及び回復試験群の両群で実施した。また、TK 解析及び血漿中グルコースプロファイリングのために、雌雄各 14 例の 4 群編成からなるサテライト群も組み入れた。主試験群及びサテライト群には、IDegLira 0/0〔IDegLira の溶媒：4.7 mg/mL フェノール、19.7 mg/mL グリセロール、塩酸（適量）及び水酸化ナトリウム（適量）、pH 7.8〕、2/3.2、7/11.2、20/32 nmol/kg/日を 13 週間投与した。回復試験群には、IDegLira の 0/0〔IDegLira の溶媒：4.7 mg/mL フェノール、19.7 mg/mL グリセロール、塩酸（適量）及び水酸化ナトリウム（適量）、pH 7.8〕及び 20/32 nmol/kg/日を 13 週間投与後、4 週間の回復性検討期間を設けた。先に実施した 4 週間毒性試験において、摂餌量及び血中グルコースに対する IDeg 及びリラグルチドの過剰な薬理作用により IDegLira の 30/80 nmol/kg/日は MTD を超えていたことに基づき、投与量を選択した。結果的に、本試験の投与量はより低く設定された。

試験中、全例について 1 日 1 回、投与後 3、5 及び 8 時間に一般状態を観察した。全例について体重及び摂餌量を 1 週間に 1 回記録した。IDegLira 0/0 及び 20/32 nmol/kg/日を投与した主試験群及び回復試験群の全例について、投与開始前及び終了時に眼科学的検査を実施した。投与第 1 日及び最終投与日の投与前、投与後 1、2、4、6、8、12 及び 24 時間に、TK 解析及び血漿中グルコースプロファイリング用に、主試験群及びサテライト試験群から血液試料を採取した。IDeg 及びリラグルチドに対する抗体測定用に、投与第 1 日の投与前、投与終了時及び回復試験終了時（回復性試験群のみ）、主試験及び回復性試験群から血液試料を採取した。

血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査測定用に、第 6 週、投与終了時及び回復試験終了時（回復試験群のみ）に主試験群及び回復試験群から血液及び尿試料を採取した。

主試験の全例について、剖検を詳細に実施した。選択された器官重量を測定した。重要な反復投与毒性試験に関する標準的な操作手順に準拠し、溶媒投与群及び IDegLira 20/32 nmol/kg/日投与群から選択した器官について病理組織学的検査を行った。

試験を通して、死亡及び投与に関連した一般状態変化は認められなかった。

IDegLira 20/32 nmol/kg/日の主試験群及び回復性試験群の雄で、対照群と比較して統計学的に有意な体重増加抑制が投与期間中及び終了時に認められた。 IDegLira 7/11.2 及び 20/32 nmol/kg/日の主試験群及び回復性試験群の雌では、対照群と比較して統計学的に有意な体重増加抑制が第 42 日から投与終了

時まで認められた。しかしながら、雌では対照群と比較して投与終了時の体重差は軽微であった。回復期間終了時、投与群と対照群の雄の体重増加量差は、13 週間投与後と比較して縮小していた。雌では、投与群と対照群との体重増加量差は 13 週間投与後と比較して増大していた。

いずれの投与群においても摂餌量に及ぼす影響は認められなかった。

眼科学的検査では投与に関連した変化は認められなかった。

血漿中グルコースレベルは IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雌雄とも第 1 日に低下した。この低下は、雄では投与後 1 及び 2 時間で、雌では投与後 1～4 時間で最も顕著であった。同様に、投与最終日に、血漿中グルコースレベルの低下が IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雌雄で、雄では 1～4 時間で、雌では 1～6 時間で認められた。さらに、血漿中グルコースの低下は IDegLira 2/3.2 及び 7/11.2 nmol/kg/日群の雌でも投与後 1～4 時間で認められた。

IDeg 及びリラグルチドの全身曝露が全例で確認された一方、対照群では曝露は認められなかった。C_{max} 及び AUC を基にした曝露は、概して用量比例性であり、性差は認められず、雌雄とも全身の蓄積性は限定的であった。IDeg 及びリラグルチドで確認された t_{max} はそれぞれ投与 1～4 時間及び 4～8 時間であった。

第 6 週において、軽微であるが統計学的に有意な白血球数の高値が IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雄で、また、リンパ球の相対数の高値が IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雌で認められた。また、第 6 週では、IDegLira 7/11.2 及び 20/32 nmol/kg/日群の雌で好中球の絶対及び相対数に軽微な低値が認められた。これらの所見は雌雄のどちらかのみに認められたこと及び投与終了時の血液試料では同様の所見は認められなかったことから、これらの変化に毒性学的に重要でないものと考えられる。

第 6 週及び 13 週の最終血液試料採取時及び回復期間終了時に、尿素の高値が全投与群で認められた。なお、統計学的有意差は高用量群を含む一部の投与群で認められた。IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雌雄で、第 6 週及び 13 週の最終血液試料採取時及び回復期間終了時に総タンパク質及びグロブリンの低値が認められた。グロブリンが低値であったことから、アルブミン／グロブリン比は全試料採取時に雌雄ともわずかに高かったが、雄のみで統計学的有意差が認められた。総タンパク質及びグロブリンの低値は IDeg 及びリラグルチド単剤を投与したラットでも認められており [10]、尿素の高値もリラグルチド単剤を投与したラットで認められている [10]。これらの軽微な変化は薬理学的な代謝作用に関連するものであり、毒性学的に重要でないと考えられた。第 13 週の最終血液試料採取時において、IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雌雄及び 7/11.2 nmol/kg/日群の雌で、統計学的に有意なクロールの高値が認められた。回復性試験では、対照群と投与群でクロール濃度に差異は認められなかった。第 6 週において、IDegLira の 20/32 nmol/kg/日群の雄で、統計学的に有意なアラニンアミノトランスフェラーゼ、

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの高値が認められた。しかしながら、値は軽微であり（1.5倍未満）、第 6 週の雌及び第 13 週の雌雄では高値は認められなかった。雌雄のどちらかで認められたこれらの一過性の変化は、毒性学的に重要でないものと考えられる。

尿検査では、以下に示す統計学的に有意な変化が明らかとなった：第 13 週時の全投与群の雌における暗色調の尿、第 13 週時の IDegLira 7/11.2 及び 20/32 nmol/kg/日群の雌におけるタンパク質の増加、第 6 週時の IDegLira 2/3.2 nmol/kg/日群の雄ならびに第 13 週時の IDegLira 7/11.2 及び 20/32 nmol/kg/日群の雌におけるケトン体の増加。同様な変化は IDeg 及びヒトインスリン単剤での検討でも認められている。これらの変化はインスリンの薬理作用に関連するものであり、毒性学的に重要でないと考えられる。

試験期間中、リラグルチドに対する抗体は検出されなかった。しかしながら、主試験群及び回復試験群において投与された 8/70 例で、IDeg 抗体陽性と判定された。すなわち、IDegLira 2/3.2 nmol/kg/日群で 1 例、7/11.2 nmol/kg/日群で 3 例、及び 20/32 nmol/kg/日群で 4 例であった。本試験で認められた抗体陽性試料の割合は IDeg 単剤を 4 週間又は 26 週間投与時に認められた抗体陽性ラットの割合とほぼ同程度であった。産生された抗体の中和作用は測定しなかったが、抗体陽性ラットの 6/8 例から TK 解析及びグルコースプロファイリング用に血液試料が採取されており、これらの動物における血中グルコースレベル及び IDeg の曝露量は、IDeg を投与されたものの抗体陰性を示したラットとほぼ同等であった。以上の結果から、産生された抗体は中和作用を有さないと考えられた。

IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雄で、腎臓の体重比重量が統計学的有意に増加した。腎臓に病理組織学的な所見は認められなかった。腎臓重量に関して、絶対重量では同様の影響はみられず、雌では相対重量の増加は認められなかったことから、対照群と比較して体重増加抑制に関連するものと考えられる。回復試験期間終了時には変化は全く認められなかった。IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雌では、投与期間終了時及び回復性検討試験期間終了時のいずれにおいても卵巣の相対重量に統計学的に有意な増加が認められた。本変化は体重増加抑制に関連するものと考えられ、病理組織学的変化は認められなかったことから、毒性学的に関連性はないものと考えられる。

IDegLira 7/11.2 nmol/kg/日群の雌で、副腎の絶対及び脳比重量が統計学的有意に減少した。このことに関して、IDegLira の 20/32 nmol/kg/日投与ラットでは変化が認められなかったこと及び病理組織学的変化が認められなかったことから、偶発的な変化であると考えられた。

この他に、一部の器官で統計学的有意な重量の変化が回復試験期間終了時に認められた。IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雄では、肝臓ならびに脾臓の体重比重量の増加及び胸腺の体重比重量の減少が認められた。IDegLira 20/32 nmol/kg/日群の雌では、肝臓の絶対重量及び脳比重量、心臓の絶対及び体重比重量の減少が認められた。回復試験で認められたすべての器官重量変化は、片性で認められたこと、

13 週間の投与終了時には認められなかったこと、ならびに 13 週間投与後の肉眼的及び顕微鏡的な変化とは関連性が認められなかったことから、偶発的な変化と考えられた。

注射部位の肉眼的検査で赤色化が認められたが、発生頻度及び重症度に関して対照群との差異は認められなかった。注射部位の顕微鏡的検査では、軽度の炎症及び変性／再生性の反応が認められた。本変化は、種類及び重症度が対照群と IDegLira 20/32 nmol/kg/日群とで同様と考えられたことから、溶媒の注射及び皮下への注射操作に関連するものと考えられた。

結論として、IDegLira 0/0、2/3.2、7/11.2 及び 20/32 nmol/kg/日を 13 週間にわたり 1 日 1 回皮下投与した結果、体重増加抑制、血中グルコースレベルの低下及び臨床病理学的検査項目の変化が認められた。これらの変化は、IDegLira の薬理作用に関連するものと考えられ、毒性影響ではないと考えられた。さらに、ほとんどの臨床化学的な変化は回復性を示した。以上の結果から、NOAEL は IDegLira 20/32 nmol/kg/日であると考えられた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

IDeg 及びリラグルチドの遺伝毒性に関する評価は、現行の基準〔ICH S6 (R1)、ICH M3 (R2)及び ICH S2 (R1)〕に準拠して実施されている。リラグルチドは、Module 2.4.4.3 で記述したように、げっ歯類に対してがん原性を有するものの、標準的な組み合わせの *in vitro* 及び *in vivo* 試験において、リラグルチドは遺伝毒性を有さないことが証明された。IDeg は変異原性を有さないバイオテクノロジー応用医薬品であると考えられることから、遺伝毒性試験は実施しなかった。以上より、ICH M3 (R2)に従い、IDegLira の遺伝毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

IDeg の細胞増殖及び新生物形成に関する *in vitro* 及び *in vivo* の非臨床試験の結果、有害所見は認められず、IDeg のがん原性はヒトインスリンを超えるものではないと結論された[12]。リラグルチドのがん原性は、マウス及びラットにおける 104 週間試験で評価した。リラグルチドは非遺伝毒性による、GLP-1 受容体を介した特異的メカニズムによりげっ歯類の甲状腺の C-細胞腫瘍を誘発した。IDeg 及びリラグルチドの薬理学的特性は、異なる細胞受容体及びシグナル伝達介して発現し、分子薬理学的相互作用を示すことはない。

IDeg 及びリラグルチドともに現行の基準〔ICH S1A-S1C、ICH M3 (R2)、ICH S6 (R1)〕に準拠してがん原性の評価が行われていることから、固定比率配合剤である IDegLira のがん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

IDeg 及びリラグルチドともに、現行の適用ガイドライン〔ICH M3 (R2)、ICH S5 (R2)〕に準拠して生殖発生毒性が検討されている。

IDeg の生殖毒性試験では、母動物の血中グルコース低下による二次的な変化と考えられる、胎仔及び乳仔に及ぼす軽微な影響のみがみられ、胚毒性及び催奇性に関して IDeg とヒトインスリンとの差異は全く認められなかった。

リラグルチドでは、ラットにおいて早期胚死亡増加、ウサギにおいて母動物摂餌量減少に起因するものと推測される軽度の胎仔骨格異常が認められている。

有効成分である IDeg 及びリラグルチドの生殖発生毒性プロファイルが詳細に解明されていることから、ICH M3 (R2)に準拠して、IDegLira の生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.7 幼若動物を用いた試験

小児及び成人集団におけるインスリンの生理学及び薬理学は周知であること、さらに各成分のデータが得られていることを考慮すると、幼若動物を用いた毒性試験が新たな情報を提供することにはならないと考えられた。したがって、IDegLira の幼若動物を用いた試験は実施しなかった。

2.6.6.8 局所刺激性試験

単回皮下投与による局所刺激性はウサギ及びブタを用いて、さらに、反復皮下投与による局所刺激性は、IDegLira の重要な反復投与毒性試験に組み入れて評価されている。単回投与試験の概要を表 2.6.6-4 に示す。

表 2.6.6-4　　重要な局所刺激性試験の概要表

Study number	**210203**	**207451**
Species/strain	Rabbit/New Zealand White	Pig/Danish country/Yorkshire cross breed
Test article	600 nmol IDeg/960 nmol liraglutide per. ml. 6.2 mg/ml Phenol 19.7 mg/ml Glycerol [redacted] pH 7.8	600 nmol IDeg/1600 nmol liraglutide per. ml. 4.7 mg/ml Phenol 19.7 mg/ml Glycerol [redacted] pH 8.2
Duration (days)	5	5
Route of administration	Subcutaneous, intramuscular, intravenous	Subcutaneous
Animals/gender/group	3 groups of 5 females. One group per route of administration. Test article and vehicle administered to the same animal on the contralateral side.	4 females in total. Each animal received the test article, the vehicle and saline (injection control) on Day 0 at separate injection sites on one side of the back and on Day 3 on the contralateral side of the back.
Dose levels (nmol) of IDegLira per injection site	30/48	120/320
Conclusion	NOAEL: 30/48 nmol per injection site	NOAEL: 120/320 nmol per injection site

2.6.6.8.1　　ウサギへの皮下、筋肉内及び静脈内注射による単回投与局所刺激性試験（表 2.6.7.15、210203）

本試験では、IDeg の 600 nmol/mL 及びリラグルチドの 960 nmol/mL を含有する IDegLira の固定比率配合剤について検討した。

本試験の目的は、IDegLira を皮下、筋肉内（i.m.）及び静脈内（i.v.）へ注射した後の注射部位における局所刺激性を評価することであった。対照は IDegLira の溶媒〔6.2 mg/mL フェノール、19.7 mg/mL グリセロール、水酸化ナトリウム（q.s.）及び塩酸（q.s.）、pH 7.8〕を使用した。最初に実施したブタを用いた局所刺激性試験以降に処方が変更されたことから、皮下投与経路を組み入れた。また、筋肉内及び静脈内投与経路は、臨床現場でこれらの経路から IDegLira 製剤が誤って投与される可能性があることも想定して組み入れた。

15 例のニュージーランド白色種ウサギを 1 群 5 例、計 3 群に分けた。以下のように、IDegLira をウサギの頸背部、耳部又は大腿部の右側に、溶媒は頸背部、耳部又は大腿部の左側に、1 回ずつ注射した：

表 2.6.6-5　　投与法の要約

Group	Number of animals per route	Route of treatment	Dose volume (ml/injection site)	Dose concentration IDegLira (nmol/ml)	Dose IDegLira (nmol/injection site)
1	5	Subcutaneous	0.05 ml	0	0
		Subcutaneous	0.05 ml	600/960	30/48
2	5	Intramuscular	0.05 ml	0	0
		Intramuscular	0.05 ml	600/960	30/48
3	5	Intravenous	0.05 ml	0	0
		Intravenous	0.05 ml	600/960	30/48

注射部位は投与日に数回、その後は 1 日 1 回観察した。全般的な一般状態も毎日記録した。

投与後 5 日に動物を安楽死処置し、注射部位の剖検を行った。注射部位を固定液中で保存した。注射部位から組織切片を作製し、誘発された変化を顕微鏡で検査した。

本試験期間中、いずれの動物にも全般的な一般状態変化は観察されなかった。静脈内投与部位の一般状態観察から、IDegLira 及び溶媒投与後、軽微な局所反応として主に発赤が認められた。この反応は投与経路に関係したものであり、IDegLira 及び溶媒に関連したものではないと考えられた。

IDegLira 又は溶媒の静脈内注射部位の病理組織学的変化は軽度であり、軽微から軽度の血管及び血管周囲の壊死、浮腫及び線維芽細胞を含む軽微から中等度の炎症性細胞蓄積、局所性の血栓及び軽度の局所性出血が認められた。溶媒又は IDegLira の投与部位に組織反応の差異は認められなかった。

IDegLira 又は溶媒の皮下注射後、病理組織学的に変化がみられ、軽微な筋線維の変性／再生、軽微な炎症巣及び軽微から中等度の出血が認められた。溶媒又は IDegLira の投与部位の間で組織反応の差異はなかった。

IDegLira 又は溶媒の筋肉内注射後、軽度の出血巣、少量の炎症細胞／線維芽細胞を伴った軽微な筋線維の変性／再生が記録された。溶媒又は IDegLira の投与部位に組織反応の差異は認められなかった。

2.6.6.8.2　　ブタにおける単回投与局所刺激性試験（表 2.6.7.15、207451）

本試験では、IDeg の 600 nmol/mL 及びリラグルチドの 1600 nmol/mL を含有する IDegLira の固定比率配合剤について検討した。

本試験の目的は、IDegLira 製剤を皮下注射後 2 日及び 5 日での、注射部位の皮下組織における局所組織反応を評価し、溶媒及び無菌等張生理食塩液の注射後の反応と比較することであった。

4 例のデンマーク産ヨークシャー種交雑種雌性ブタに、IDeg 600 nmol/リラグルチド 1600 nmol 処方製剤、溶媒〔4.7 mg/mL フェノール、19.7 mg/mL グリセロール、水酸化ナトリウム（q.s.）及び塩酸（q.s.）、pH 8.2〕及び無菌等張生理食塩液を投与 0 日と 3 日に 3 箇所（各投与日に各被験物質を 1 箇所ずつ、合計 3 箇所）注射する方法で、背部の左側（投与 0 日）及び右側（投与 3 日）に皮下投与した。注射部位当たりの投与容量は 200 µL であった。一般状態及び注射部位反応を毎日記録した。注射後 2 日及び 5 日に相当する第 5 日に剖検を行った。注射部位である皮膚とその下層の皮下組織をまとめて摘出し、組織標本作製処理を施し、誘発された変化を顕微鏡で検査した。

被験物質を投与されたブタでは、注射後 1 日に食欲が減退したが、予想される薬理作用によるものと考えられた。試験中、その他に一般状態変化はみられなかった。

剖検時、IDeg 600 nmol/リラグルチド 1600 nmol 処方製剤が投与された注射部位において、注射後 5 日に浮腫状変化が認められた。その他、剖検時注射部位には変化はみられなかった。

IDeg 600 nmol/リラグルチド 1600 nmol 処方製剤及び溶媒に関して、注射後 2 日の顕微鏡的評価では、軽微から軽度の炎症細胞浸潤が認められたが、生理食塩液では軽微な炎症反応が誘発されるのみであった。

IDeg の 600 nmol/リラグルチドの 1600 nmol 処方製剤及び溶媒に関して、注射後 5 日の顕微鏡的評価では、軽微から軽度の炎症細胞浸潤が認められたが、生理食塩液では全く反応がないか軽微な炎症反応が誘発されるかのどちらかであった。注射後 5 日の剖検では、一部の注射部位に軽微な浮腫が認められたが、対応する病理組織学的変化は認められなかった。

結論として、IDeg 600 nmol/リラグルチド 1600 nmol 処方製剤又は溶媒を単回皮下注射した結果、注射後 2 日及び 5 日の注射部位で軽度の炎症反応が認められ、その程度は生理食塩液で誘発された反応よりもわずかに高かった。

2 種類の局所刺激性試験から、溶媒又は IDegLira の皮下、筋肉内及び静脈内注射後に認められた一般状態変化ならびに肉眼的及び顕微鏡的な変化は軽度であり、また、溶媒及び IDegLira の注射後にみら

れた変化の重症度及び発生頻度は同程度であることから、注射に直接関連した影響ではなく、注射操作／注射針による誘発又は溶媒の注射に関係しているものと結論可能であった。

2.6.6.9 その他の毒性試験

2.6.6.9.1 不純物

2.6.6.9.1.1 製剤中不純物の評価

すべてのリラグルチド関連不純物に関して提示した有効期間規格及び製品使用時の評価基準は、リラグルチド 6.0 mg/mL（ビクトーザ®）と同等か又はその許容限度値の範囲内にある。

*E1 不純物を除くすべての IDeg 関連不純物に関して提示した有効期間規格及び製品使用時の評価基準は、インスリン デグルデク 100 単位/mL（トレシーバ®）と同等か又は許容限界の範囲内にある。しかしながら、*E1 不純物レベルに関しては、IDeg の非臨床プログラムの一環で実施されたラットにおける 4 週間毒性試験でその安全性が確認されている [12]。IDegLira の MRHD である 50 単位/1.8 mg を基にして、当該ラット試験で検討された*E1 不純物のレベルは、IDegLira に関して提示した有効期間規格でのインスリン デグルグ関連*E1 不純物のヒトにおける最大投与量を 41 倍上回ることが明らかとなった。また、IDegLira に関して提示した製品使用時の評価基準でのインスリン デグルグ関連*E1 不純物のヒトにおける最大投与量を 35 倍上回った（表 2.6.6-6）。その結果、不純物の安全性は確認されたものと考えられ、提示した IDegLira の規格限度値は適合していると考えられる（IDegLira の規格は Module 3.2.P.5.6 を参照）。

表 2.6.6-6　　*E1　不純物の安全性確認

Impurity	Proposed limits (%)	Tested nonclinical[a] (%)	IDeg max dose[b] (nmol/kg)	IDeg clinical dose[c] (nmol/kg)	Impurity NOAEL (nmol/kg)[d]	Impurity clinical dose (nmol/kg)[e]	Nonclinical tested vs proposed limits (fold)[f]	Animal to human exposure ratio (fold)[g]
			150	5.0				
*E1 impurities	[redacted]	[redacted]	-	-	3.9	[redacted]	1.2	35
*E1 impurities	[redacted]	[redacted]	-	-	3.9	[redacted]	1.0	30

[a] 4-week study in rats comparing the toxicity of an aged batch of IDeg with an non-aged batch (210227) as part of the IDeg nonclinical programme
[b] a NOAEL was not established in the nonclinical study (210227), however no significant toxicological findings were observed at a dose level of 150 nmol/kg
[c] Assuming an IDeg dose (as part of IDegLira) of 50 U in a 60 kg Japanese person (50 Ux6 nmol/U/60 kg = 5.0 nmol/kg)
[d] Tested nonclinical (%)/100 x IDeg max dose (nmol/kg)
[e] Proposed limits (%)/100 x IDeg clinical dose (nmol/kg)
[f] Tested nonclinical (%)/Proposed limits (%)
[g] Impurity NOAEL (nmol/kg)/Impurity clinical dose (nmol/kg)
[h] Proposed shelf life specification limits for IDegLira
[i] Proposed in-use acceptance criteria for IDegLira

IDegLira は[redacted]ゴム製プランジャーと[redacted]ゴムディスクで密閉した容器に入れて供給される。この容器施栓系はインスリン デグルデク製剤（トレシーバ®）及びリラグルチド製剤（ビクトーザ®）で使用されているものと同様である（Module 3.2.P.2.4）。

IDegLira の長期溶出試験では、5 種類の溶出物（*F　　異性体 3 種及び*G　　異性体 2 種）が検出・確認された（Module 3.2.P.2.4）。

表 2.6.6-7　　溶出物の最大臨床曝露量

Compound	CAS number	Maximal concentration (µg/mL)	Max. clinical s.c. exposure (µg/person/day)[a]
*F1異性体 *F2異性体 *F3異性体	[redacted]	1.4[b]	0.7
*G1異性体 *G2異性体	[redacted]	2.7[b]	1.4

[a] Based on a the maximum recommended daily clinical dose of 50 U IDeg and 1.8 mg liraglutide (i.e. volume of 0.5 ml/person/day)
[b] The sum of all isomers

IDegLira の 1 日最大推奨臨床用量を 50 単位/1.8mg とした計算に基づき、5 種の物質の最大 1 日曝露量を算出し（表 2.6.6-7）、以下のように評価した：

3 種類の*F　　異性体を合わせた最大臨床曝露量は、残存溶媒に関する ICH Q3C ガイドライン（2011）で規定された 1 日許容曝露量（PDE：21.7 mg/ヒト/日）の少なくとも 31000 分の 1 よりも低い。したがって、このレベルは患者に対する安全性リスクに関連しないと考えられる。

*物質G　　の PDE は設定されていない。科学文献を検索したが、ICH Q3C の別表 3 に示されている方法に基づいた、PDE を推定する十分なデータは得られなかった。

*G1異性体　　及び*G2異性体　　は、*in vivo* マウス骨髄小核試験で遺伝毒性を有さないことが示されている[13,14]。これらの*G　　異性体の最大臨床曝露量のいずれも、Product Quality Research Institute がすべての非がん原性の毒性作用を考慮して設定した、非常に保守的な安全性確認が必要な閾値[15]の少なくとも 3 分の 1 よりも低い。したがって、これらの化合物の最大臨床曝露量の計算値は、患者に対する安全性リスクに関連しないものと考えられる。

結論として、容器施栓系は検出される溶出物レベルに安全性上の懸念がなく、インスリン デグルデク 100 単位/mL 及びリラグルチド 3.6 mg/mL 製剤（IDegLira 100 単位/3.6 mg/mL）に適していると考えられる。

2.6.6.9.2　その他の毒性に関する事項

2.6.6.9.2.1　添加物の評価

市販を予定している IDegLira 製剤は、等張剤としてグリセロール（19.7 mg/mL）、インスリンの*物質E　　[redacted]として[redacted]及び防腐剤としてフェノール（5.7 mg/mL）を含む溶媒から構成される。

すべての添加物は医薬品添加物として使用実績があり、日本薬局方にも収載されており、処方中の各含有量は日本における既承認製剤の最大使用量の範囲内である。

2.6.6.10　考察及び結論

2.6.6.10.1　IDegLira 配合剤の反復投与毒性プロファイル

健常な正常血糖ラットに IDegLira を投与した結果、一連の既知の影響が認められ、それらは IDeg 又はリラグルチド単剤でラットへ投与した時に認められたものと同様であった。低血糖症及び低血糖症様の一般状態変化は IDegLira 30/80 nmol/kg/日の用量で認められた。低血糖症様の一般状態変化は、IDeg の開発プログラムにおいて IDeg の同様の用量レベルでは認められなかった。ラットを用いた IDegLira の 4 週間毒性試験で認められたインスリンに対する忍容性の低下は、摂餌量の減少により血中グルコースレベルが代償できなくなったことに起因するものであった。体重増加抑制及び摂餌量の減少は、リラグルチドでは既知の薬理作用である。

投与に関連すると考えられるものの重要性の低い変化が、白血球、赤血球及び平均血小板容積など種々の血液学的検査項目に認められた。また、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、尿素、総タンパク質、グロブリン、アルブミン、カリウム、乳酸脱水素酵素、カルシウム及びリン酸塩などの血液生化学的検査項目にも同様の変化が認められた。これらの変化の大多数は、IDeg 及びリラグルチド単剤の検討時にも認められており、その意義の裏付けとなる病理組織学的変化は認められなかった。したがって、これらの軽微な変化に毒性学的な重要性はないと考えられた。

4 週間試験では MTD を超えていた。低血糖症と一致した一般状態変化及び低血糖症に関連した死亡が認められ、その結果、試験中に用量を減じた。IDeg 及びリラグルチドの薬理作用に起因する所見が副腎、肝臓、前立腺、精嚢及び精巣で認められた。

副腎では、皮質細胞の空胞形成が全投与群で認められた。副腎における皮質細胞の空胞形成は血中グルコース低下に対する適応反応としての糖質コルチコステロイド形成の増大を反映している。したがって、副腎の空胞形成は血中グルコースレベルに対するインスリンの薬理作用により引き起こされ、リラグルチドの摂餌量に対する薬理作用で悪化したと考えられた。副腎皮質の所見は、4 週間試験で認められた肝臓のグリコーゲン蓄積の増大に一致する、軽度な肝細胞の細胞質の染色希薄化の増大と相関していた。肝細胞のグリコーゲン合成及び蓄積の増大は、過剰な糖質コルチコステロイドに対する反応としてよく知られている現象である[1,2]。

4 週間試験では、IDegLira の全投与与群の雄で前立腺の絶対及び相対重量に統計学的有意な減少が認められ、剖検では、前立腺及び精嚢の小型化が IDegLira 20/54 nmol/kg/日群の雄 2 例でみられた。さらに、VII/VIII ステージの精細管における精母細胞のアポトーシスが全投与群の雄で認められた。精巣における変化は軽微であったが、IDeg 及びリラグルチド単剤の検討時には認められなかった。4 週間試験で認められた変化と同様の体重増加量となるよう食餌制限したラットでも、精母細胞のアポトーシス

ならびに前立腺及び精嚢重量の減少が認められている [3]。さらに、リラグルチド単剤の検討においても、統計学的に有意な前立腺及び精嚢重量の低値が認められている [10,11,16]。また、前立腺重量の低値は他の GLP-1 アナログでも認められている[17]。以上のことから、MTD を超える用量で認められた精母細胞のアポトーシス及び副生殖器の小型化は、リラグルチドの薬理作用によって引き起こされた摂餌量の減少／体重増加抑制に関連すると考えられ、毒性学的な重要性はないと考えられた。IDegLira の 13 週間試験では、MTD を超えなかったことから、雄の生殖器に病理組織学的所見は認められなかった。

精巣では精母細胞のアポトーシスの他に精細管の変性の発現頻度増加が認められた。この変化は軽微であったが、同様な所見は IDeg 又はリラグルチド単剤の検討時には認められなかった。しかしながら、この変化はヒトインスリンの非臨床試験でも認められており [5,6,7,8]、低血糖症を誘発する他の化合物の投与後でも報告されている [4]。したがって、軽微な精細管の変性は毒性的な影響ではなく、正常血糖ラットにおいてインスリンの過剰な薬理学的作用によって引き起こされた持続性の低血糖症による影響であると考えられた。2 型糖尿病患者において IDegLira 使用時に持続性の低血糖症が起こる可能性は低いことから、この変化はヒトのリスクにはならないと考えられる。

結論として、反復投与毒性試験の結果、ヒトインスリン、IDeg 及びリラグルチドの既知の薬理作用に起因する所見のみが明らかとなった。低血糖症を除き、ヒトにおける安全性上の懸念を示唆する所見は認められなかった。

2.6.6.10.2　日本人患者を用いた動物／ヒトの曝露量比

最長期間（13 週間）の動物試験における NOAEL 投与時の定常状態の $AUC_{0\text{-}24hr}$ 及び C_{max} で測定した曝露量を、日本人患者における検証的試験（NN9068-4183）の最高用量（IDegLira の 50 単位/1.8 mg）投与時の曝露量と比較した。

表 2.6.6-8　NOAEL 投与時の動物の曝露量と IDegLira の MRHD 投与時の定常状態でのヒト曝露量との関連性

	IDeg		Liraglutide	
Type of nonclinical study	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (h*nmol/l)	C_{max} (nmol/l)	$AUC_{0\text{-}24hr}$ (h*nmol/l)	C_{max} (nmol/l)
Rat: 13-week repeat-dose toxicity study[a] **NOAEL: 20/32** **Exposure ratio: rat/human (max dose)**	 229.5 **1.6**	 38.3 **5.7**	 1027 **2.2**	 91.5 **4.2**
Human clinical exposure[b]				
NN9068-4183(exposure in steady state) **Max dose: 50 U/1.8 mg**	142	6.76	468	21.95

a Study no: 209212
b Based on population pharmacokinetics (NN9068-4183)

NOAELは、薬理作用又は過剰な薬理作用に起因する影響を除いて、その他の有害影響が認められない用量であると考えられた。したがって、最長期間の試験に基づき、IDegLiraのNOAELはラット13週間毒性試験の最高用量である20/32 nmol/kg/日と考えられた。このNOAELを動物／ヒトの曝露量比の算出に用いられた。

2.6.6.10.3　免疫原性

IDeg及びリラグルチドに対する抗体を2種のラットにおける反復投与毒性試験で測定した（表2.6.7.7.A、208142及び表2.6.7.7.B、209212）。抗体分析用試料中に薬物が存在すると、測定系に干渉し弱い抗体反応が確認できない可能性がある。しかしながら、両試験の生体試料分析データの結果、投与後24時間の循環血中の薬物残存レベルがIDeg及びリラグルチドの両者に対する抗体分析に干渉しないレベルであることが示された。さらに、13週間試験では、2種の抗体測定に干渉しないレベルの薬剤濃度となるように4週間の投薬休止期間を組み入れていた。

一部のラットにのみIDegに対する抗体産生が認められ、リラグルチドに対する抗体産生は認められなかった。IDegの血中グルコース低下作用が認められたこと及び対応する薬物の曝露データから示されるように、抗IDeg抗体は中和作用を示さなかった。したがって、IDeg抗体は試験結果に影響を及ぼさないものと考えられた。

2種の反復投与毒性試験で認められた抗体産生について、各成分の検討時の結果と差異は認められなかった。

2.6.6.10.4　がん原性

IDeg及びリラグルチドともに現行の基準に準拠して、各成分のがん原性が検討されていることから、ICH M3 (R2)及びICH S6 (R1)に準拠し、固定比率配合剤であるIDegLiraのがん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.10.5　生殖発生毒性

IDeg及びリラグルチドともに、現行の適用ガイドラインに準拠して生殖発生毒性が検討されている。IDeg及びリラグルチドは単剤での生殖発生毒性プロファイルが詳細に解明されていることから、ICH M3 (R2)に準拠して、IDegLiraの生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.10.6　局所刺激性

局所刺激性はウサギ及びブタで検討した。さらに、IDegLiraに関する重要な反復投与毒性試験に局所刺激性を組み入れて評価した。IDegLiraが筋肉内又は静脈内投与後の局所組織反応（潜在的な投与ミスを想定）についてもウサギで評価した。局所での組織反応は軽度かつ溶媒と同様であり、ヒトの適用

経路である皮下投与又は偶発的に筋肉内もしくは静脈内経路を介した投与のいずれの場合でも、全身性の低血糖症以外に懸念はないものと考えられた。

2.6.6.10.7　製剤中の不純物及び溶出物の評価

全ての不純物の安全性が確認されていることから、提案した IDegLira に関する有効期間規格及び製品使用時の評価基準は受け入れ可能であると考えられた。容器施栓系構成物からの溶出物のレベルが決定された。溶出物に対して予測されるヒト曝露レベルが評価され、安全性上の懸念はないことが確認された。

2.6.6.10.8　添加物の評価

すべての添加物は医薬品添加物として使用実績があり、日本薬局方にも収載されており、処方中の各含有量は日本における既承認製剤の最大使用量の範囲内である。

2.6.6.10.9　総括

ICH M3 (R2)ガイドラインに準拠し、IDegLira に関して最長 13 週間の反復投与毒性試験ならびにウサギ及びブタを用いた局所刺激性試験を実施した。非臨床プログラムから、インスリン及び GLP-1 アナログによる既知の薬理作用及び過剰な薬理作用に起因する予期された所見が明らかになった。IDegLira の非臨床試験プログラムから、ヒトへの長期間の皮下投与に関して安全性上の懸念がないことが明らかになった。

参考文献

[1] Leakey J, Seng J, Allaben W. Influence of body weight, diet, and stress on aging, survival and pathological endpoints in rodents: implications for toxicity testing and risk assessment. Regulatory Research Perspective. 2004;4(1):1-28

[2] Margolis RN, Curnow RT. Effects of dexametasone administration on hepatic glycogen synthesis and accumulation in adrenalectomized fasted rats. Endocrinology. 1984;115:625-629

[3] Rehm S, White, TE, Zahalka, EA, Stanislaus DJ, Boyce RW, Wier PJ. Effect of food restriction on testis and accessory sex glands in maturing rats. Toxicol Pathol. 2008;36:687-694

[4] Mancine RE, Penhos JA, Izquierdo IA, Heinrich JJ. Effect of acute hypoglycemia on rat testis. Proc Soc Exp Bio Med. 1960;104:699-702

[5] 940301 Study report: X14 – Toxicity to rats by repeated (twice daily) subcutaneous injection for 52 weeks – Volume 1

[6] 940303 Study report: X14 – A study of fertility and embryofoetal development in the rat by twice daily subcutaneous injection

[7] 950460 Study report: NN304 – A range finding study of effects on fertility and embryofoetal development in the rat by subcutaneous injection

[8] 960122 Study report: NN304 – A study of effect on fertility and embryofoetal development in the rat by subcutaneous injection

[9] 980183 Study report: NNC 0090-0000-1170 – 28 Day Subcutaneous Toxicity Study in Rats

[10] 980189 Study report: NNC 0090-0000-1170 – 13 Week Subcutaneous Toxicity Study in Rats with Recovery Period

[11] 990284 Study report: NNC 0090-0000-1170 – Main Segment I/II Subcutaneous Reproduction Study in Rats

[12] Non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin degludec210227 Study report: NNC 0100-0000-0454 (Aged and Non-Aged) – 1-Month Subcutaneous Toxicity Study in Rats (Bridging study)

[13] 210060 Study report: 2-Bromophenol – Induction of micronuclei in the bone marrow of treated mice

[14] 210064 Study report: 4-Bromophenol – Induction of micronuclei in the bone marrow of treated mice

[15] Ball D, Blanchard J, Jacobson-Kram D, McClellan RO, McGovern T, Norwood DL, et al. Development of Safety Qualification Thresholds and Their Use in Orally Inhaled and Nasal Drug Product Evaluation. Toxicol. Sci. 2007;97(2):226-236

[16] 980186 Study report: NNC 0090-0000-1170 – Preliminary Segment I/II Subcutaneous Reproduction Study in Rats

[17] Summary basis of approval Byetta FDA approval package, Pharmacology review, NDA application number 21-773, 2005

ゾルトファイ配合注フレックスタッチ

2.6.7 毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.7.1 毒性試験の一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 6
2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧 9
2.6.7.5 単回投与毒性試験 10
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 11
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 12
2.6.7.7.A ラットを用いた 4 週間反復皮下投与毒性試験（208142） 12
2.6.7.7.B ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験及び回復性試験（209212） 19
2.6.7.8 遺伝毒性試験：*In-Vitro* 26
2.6.7.9 遺伝毒性試験：*In-Vivo* 26
2.6.7.10 がん原性試験 26
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 26
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 26
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験 26
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 27
2.6.7.15 局所刺激性 28
2.6.7.16 その他の毒性試験 28

2.6.7.1 毒性試験の一覧表

Test Article: IDegLira

Type of Study	Species and Strain	Method of Administra-tion	Duration of Dosing	Doses IDegLira (nmol/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
3.1 Single-Dose Toxicity No studies were conducted for IDegLira.								
3.2 Repeat-Dose Toxicity								
Non-pivotal studies 2-Week dose range finding study	Rat - Wistar	Subcutaneous	2 weeks	0/0, 30/80, 60/160, 90/240	No	Novo Nordisk	208068	4.2.3.2-1
Pivotal studies 4–week study	Rat - Wistar	Subcutaneous	4 weeks	0/0, 10/27, 20/54 (after reduction of dose levels), 60/160[#]	Yes	Novo Nordisk	208142	4.2.3.2-2
13-week study with a 4-week recovery period	Rat - Wistar	Subcutaneous	13 weeks	0/0, 2/3.2, 7/11.2, 20/32	Yes	LAB Research	209212	4.2.3.2-3
3.3 Genotoxicity. No studies were conducted for IDegLira.								
3.4 Carcinogenicity No studies were conducted for IDegLira.								
3.5 Reproductive and Developmental Toxicity No studies were conducted for IDegLira. .								

Type of Study	Species and Strain	Method of Administra-tion	Duration of Dosing	Doses IDegLira (nmol/kg/day)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
3.6 Local Tolerance								
Local tolerance 5 days after injection	New Zealand White rabbits	Subcutaneous Intramuscular Intravenous	Single dose	0.05 ml of the 600 nmol/ml IDeg/960 nmol/ml liraglutide formulation	Yes	LAB Research	210203	4.2.3.6-1
Local tolerance 2 and 5 days after injection	White LYD slaughter Pigs	Subcutaneous	Single dose	0.2 ml of 600 nmol/mL IDeg/1600 nmol/mL liraglutide) formulation	Yes	BioAdvice A/S	207451	4.2.3.6-2
3.7 Other Toxicity Studies No studies were conducted for IDegLira.								

The doses where changed during the study:

Group 3: Day: 1-9 30/80 nmol/kg/day IDegLira; Day 10-11: Off-dose; Day 12-28: 20/54 nmol/kg IDegLira,

Group 4: Day 1-7: 60/160 nmol/kg/day IDegLira; Day 8: Off-dose; Day 9: 45/120 nmol/kg/day IDegLira; Day 10:Off- dose; Group 4 terminated on Day 11

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: IDegLira

Type of Study	Test System	Method of Administration	IDegLira Doses (nmol/kg/day)	GLP Compliance	Study Number	Location in CTD
Repeat dose toxicity						
2-week dose range finder study	Rat – Wistar	Subcutaneous	0/0, 30/80, 60/160, 90/240	No	208068	4.2.3.2-1
4-week toxicology study	Rat – Wistar	Subcutaneous	0/0, 10/27, 20/54 (after reduction of dose levels), 60/160 #	Yes	208142	4.2.3.2-2
13-week toxicology study	Rat – Wistar	Subcutaneous	0/0, 2/3.2, 7/11.2, 20/32	Yes	209212	4.2.3.2-3

The doses where changed during the study:

Group 3: Day: 1-9 30/80 nmol/kg/day IDegLira; Day 10-11: Off-dose; Day 12-28: 20/54 nmol/kg IDegLira,

Group 4: Day 1-7: 60/160 nmol/kg/day IDegLira; Day 8: Off-dose; Day 9: 45/120 nmol/kg/day IDegLira; Day 10:Off- dose; Group 4 terminated on Day 11

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: IDegLira

Type of Study	**Test System**	**Method of Admini-stration**	**Sex & n /sample time**	**Study No.**	**Doses nmol/kg**	**C_{max} (pM)**				**AUC_{tau} (h x pM)**			
						Day 1		**Day 14**		**Day 1**		**Day 14**	
					IDeg	F	M	F	M	F	M	F	M
2-week DRF study	Wistar Rats	subcutaneous	5M+5F (n=1)	208068	30 (group 2)	29900	7040	43500	59800	162000[a]	95500	260000	347000
					60 (group 3)	34300	20200	74500	52700	172000[a]	271000	385000[a]	430000
					90 (group 4)	35600	60400	79600	237000	269000	548000	573000	1760000

Additional information:

[a]$AUC_{0\text{-}9hr}$

Type of Study	**Test System**	**Method of Admini-stration**	**Sex & n /sample time**	**Study No.**	**Doses nmol/kg**	**C_{max} (pM)**				**AUC_{tau} (h x pM)**			
						Day 1		**Day 14**		**Day 1**		**Day 14**	
					liraglutide	F	M	F	M	F	M	F	M
2-week DRF study	Wistar Rats	subcutaneous	5M+5F (n=1)	208068	80 (group 2)	135000	68000	251000	244000	716000[a]	676000	1340000	2000000
					160 (group 3)	211000	164000	373000	336000	1340000[a]	1600000	2340000[a]	3340000
					240 (group 4)	96300	219000	423000	440000	1160000	1950000	2730000	2660000

Additional information:

[a]$AUC_{0\text{-}9hr}$

Type of Study	Test System	Method of Admini-stration	Sex & n /sample time	Study No.	Doses# nmol/kg	C_{max} (pM)				AUC (h x pM)			
						Day 1		Day 28		Day 1		Day 28	
					IDeg	F	M	F	M	F	M	F	M
4-week toxicology study	Wistar Rats	subcutaneous	12M+12F (n=3)	208142	10 (group 2)	15400	17600	24500	25800	86300	106000	109000	136000
					20 (group 3#)	-	-	61300	56700	-	-	275000	301000
					30 (group 3#)	42800	48800	-	-	306000	354000	-	-
					60 (group 4#)	69300	74100	-	-	475000	629000	-	-

Additional information:
The doses where changed during the study:
Group 3: Day: 1-9 30/80 nmol/kg/day IDegLira; Day 10-11: Off-dose; Day 12-28: 20/54 nmol/kg IDegLira,
Group 4: Day 1-7: 60/160 nmol/kg/day IDegLira; Day 8: Off-dose; Day 9: 45/120 nmol/kg/day IDegLira; Day 10:Off- dose; Group 4 terminated on Day 11

Type of Study	Test System	Method of Admini-stration	Sex & n /sample time	Study No.	Doses# nmol/kg	C_{max} (pM)				AUC (h x pM)			
						Day 1		Day 28		Day 1		Day 28	
					liraglutide	F	M	F	M	F	M	F	M
4-week toxicology study	Wistar Rats	subcutaneous	12M+12F (n=3)	208142	27 (group 2)	47700	46600	52400	54300	540000	515000	550000	647000
					54 (group 3#)	-	-	114000	114000	-	-	1330000	1430000
					80 (group 3#)	138000	216000	-	-	1540000	3100000	-	-
					160 (group 4#)	198000	241000	-	-	2620000	3150000	-	-

Additional information:
The doses where changed during the study:
Group 3: Day: 1-9 30/80 nmol/kg/day IDegLira; Day 10-11: Off-dose; Day 12-28: 20/54 nmol/kg IDegLira,
Group 4: Day 1-7: 60/160 nmol/kg/day IDegLira; Day 8: Off-dose; Day 9: 45/120 nmol/kg/day IDegLira; Day 10:Off- dose; Group 4 terminated on Day 11

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study No.	Doses nmol/kg	C_{max} (pM)				AUC (h x pM)			
						Day 1		Week 13		Day 1		Week 13	
					IDeg	F	M	F	M	F	M	F	M
13-week toxicology study	Wistar Rats	subcutaneous	24M+24F (n=3)	209212	2	3610	4250	5380	5170	16600	15700	22700 [a]	26700
					7	14600	13500	21100	12100	60700	53300	86300	94500
					20	43000	35400	46400	30200	178000	179000	232000	233000

Additional information:
[a] AUC_{0-8h}

Type of Study	Test System	Method of Administration	Sex & n /sample time	Study No.	Doses nmol/kg	C_{max} (pM)				AUC (h x pM)			
						Day 1		Week 13		Day 1		Week 13	
					liraglutide	F	M	F	M	F	M	F	M
13-week toxicology study	Wistar Rats	subcutaneous	24M+24F (n=3)	209212	3.2	6060	5250	7120	4560	35500 [a]	40200 [b]	76300	64600
					11.2	27200	27300	25800	22700	268000	228000	229000	277000
					32	79200	80500	99300	83600	832000	848000	1100000	1040000

Additional information:
[a] AUC_{0-8h} , [b] AUC_{0-12h}

2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: IDegLira

Batch No.	IDeg/Liraglutide ratio nmol/ml	Purity: IDegLira (%)	Study Number	Type of Study
[redacted]	600/1600	[redacted]	208068	2-week dose range study
	600/1600		208142	4-week repeated dose toxicity study
	600/960		209212	13-week repeated dose toxicity study
	600/960		210203	Local tolerance study in rabbits (s.c., i.m., i.v.)
	600/1600		207451	Local tolerance study in pigs

2.6.7.5 単回投与毒性試験

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: IDegLira

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation	Duration of Dosing	Doses: IDegLira (nmol/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL IDegLira (nmol/kg/day)	Noteworthy Findings	Study Number
Rat/ Wistar	Subcutaneous (vehicle: phenol, glycerol, [redacted], and water for injection pH 7.4)	14 days	Group 1: 0/0 Group 2: 30/80 Group 3: 60/160 Group 4: 90/240	5M/5F 5M/5F 5M/5F 5M/5F	Not Applicable	After 13 days of dosing, 3 animals were found dead (group 3: 1 female; group 4: 1 male and 1 female). Based upon clinical signs the cause of death was considered to be hypoglycaemia. Lowered blood glucose, reduced body weight gain and reduced food consumption was observed in all dosed groups.	**208068**

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Test Article: IDegLira

2.6.7.7.A ラットを用いた 4 週間反復皮下投与毒性試験（208142）

Species/Strain: Rat/Wistar	**Duration of Dosing: 4 weeks**	**Location in CTD: 4.2.3.2-2**
Initial Age: 8 weeks	**Duration of Postdose:** N/A	
Date of First Dose: 22 April 2008	**Method of Administration:** subcutaneous injection	**GLP Compliance:** Yes
	Vehicle: Per ml IDegLira: 4.7 mg phenol, 19.7 mg glycerol, q.s. sodium hydroxide, q.s. hydrochloric acid, 1 ml milliQ water, pH=8.2. **Formulation:** Per ml IDegLira: 4.7 mg phenol, 19.7 mg glycerol, [redacted], q.s. sodium hydroxide, q.s. hydrochloric acid, 1 ml milliQ water, pH=8.2. Dosing volume 1ml/kg	

Parameters collected:
Body Weight (%), Food Consumption (%), Clinical Signs, Ophthalmoscopy, Glucose Profiling, Haematology, Serum Chemistry, Urinalysis, Antibody Analysis, Organ Weights (%),Gross Pathology, Histopathology

Special Features: After last blood sampling, satellite animals were one week off dose and then sampled for antibody analysis

No Observed Adverse-Effect Level: 20/54 (IDegLira) nmol/kg/day

Brief conclusion:
Rats were dosed subcutaneous with IDegLira 600/1600 nmol/ml once daily for up to 4 weeks at the following initial doses: 0/0 [vehicle for IDegLira; 4.7 mg/ml phenol, 19.7 mg/ml glycerol, sodium hydroxide (q.s.) and hydrochloric acid (q.s.), pH 8.2], 10/27 nmol/kg, 30/80 nmol/kg, and 60/160 nmol/kg IDegLira. In the group receiving 30/80 nmol/kg, treatment was suspended Day 10 and 11due to adverse clinical signs consistent with hypoglycaemia and from Day 12 and onwards, the dose level of the mid-dose group was reduced to 20/54 nmol/kg IDegLira. In the group receiving 60/160 nmol/kg IDegLira, dosing was suspended on Day 8 due to adverse clinical signs consistent with hypoglycaemia. From Day 9, the dose level was reduced to 45/120 nmol/kg IDegLira, on Day 10, dosing was again suspended due to adverse clinical signs consistent with hypoglycaemia, and consequently the animals were euthanised Day 11. In total 13 animals were found dead or were euthanised during the dosing period. Six mortalities occurred from Day 3 to 9, and 2 animals were euthanised moribund on Day 9 in the group dosed with 60/160 nmol/kg IDegLira. The deaths were considered related to hypoglycaemia based upon clinical signs and blood glucose values (<2mmol/L). Clinical signs consistent with hypoglycaemia and low blood glucose values (<2mmol/L) were also seen in animals dosed 30/80-on Day 12 reduced to 20/54 nmol/kg IDegLira. Two males were terminated due to ulcers at the injection site and 3 animals were terminated due to soft tissue injuries after blood sampling. At the injection site hairless areas, redness and superficial ulcers were observed and appeared dose related. Dose dependent weight reduction and reduced food consumption were observed in all treated groups. Changes in haematology and clinical chemistry were considered of no or uncertain toxicological relevance. Plasma exposure increased in a dose proportional manner, with no clear difference between genders for both IDeg and liraglutide. A minor accumulation (<2-fold) was observed on Day 28 compared to Day 1 for IDeg. IDeg antibodies were found in 10 samples taken after treatment out of 83 dosed animals sampled. No liraglutide antibodies were detected. A dose related reduction in organ weight of the prostate (absolute and relative) and a decrease in the absolute but not the relative heart weight was observed in both genders.

In the adrenal gland, a dose dependent increase in cortical cell vacuolation was observed in all dosed groups of both genders. In the testes, a dose dependent increase in apoptotic spermatocytes was observed in 1 out of 10 males dosed with 10/27 and 5 out of 10 males dosed with 30/80- on Day 12 reduced to 20/54 nmol/kg IDegLira. Tubular cell degeneration in the testes was also observed in 1 out of 10 vehicle dosed rats, 1 out of 10 rats dosed with 10/27 nmol/kg, and 4 out of 10 rats dosed with 30/80- on Day 12 reduced to 20/54 nmol/kg IDegLira. All testes changes were minimal. Histopathological changes at the injection site were mild. The effects observed were considered related to the pharmacological effect or exaggerated pharmacology of IDeg and liraglutide and not considered toxicological effects. Consequently, a NOAEL was established at 20/54 nmol/kg/day IDegLira.

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**10/27**		**Day 1-9: 30/80 Day 10-11: 0/0 Day 12-28: 20/54**		**Day 1-7: 60/160 Day 8: Off-dose Day 9: 45/120 Day 10: Off-dose Day 11: Terminated**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (toxicokinetic study)**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**
Toxicokinetics: AUC (h*pM)								
Day 1 AUC– IDeg			106000	86300	354000	306000	629000	475000
Day 1 AUC- Liraglutide			515000	540000	3100000	1540000	3150000	2620000
Day 28 AUC – IDeg			136000	109000	301000	275000	N/A	N/A
Day 28 AUC – Liraglutide			647000	550000	1430000	1330000	N/A	N/A
Day 1 C_{max} – IDeg			17600	15400	48800	42800	74100	69300
Day 1 C_{max} – liraglutide			46600	47700	216000	138000	241000	198000
Day 28 C_{max} – IDeg			25800	24500	56700	61300	N/A	N/A
Day 28 C_{max} - liraglutide			54300	52400	114000	114000	N/A	N/A
Day 1 t_{max} – IDeg			2	2	2	2	4	4
Day 1 t_{max} – liraglutide			6	8	12	6	8	4
Day 28 t_{max} – IDeg			2	1	2	2	N/A	N/A
Day 28 t_{max} - liraglutide			8	8	6	6	N/A	N/A
Noteworthy Findings								

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**10/27**		**Day 1-9: 30/80 Day 10-11: 0/0 Day 12-28: 20/54**		**Day 1-7: 60/160 Day 8: Off-dose Day 9: 45/120 Day 10: Off-dose Day 11: Terminated**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (toxicokinetic study)**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**
Died or euthanised Moribund due to suspected hypoglycaemia Day 3-9	0	0	0	0	0	0	1	7
Day 3	0	0	0	0	0	0	0	2
Day 6	0	0	0	0	0	0	0	1
Day 7	0	0	0	0	0	0	1	1
Day 9	0	0	0	0	0	0	0	3
Euthanised due to ulcers at injection site	0	0	0	0	2	0	0	0
Euthanised due to soft tissue injury	0	0	0	2	0	1	0	0
Clinical observations of hypoglycaemia								
Hunched posture (main study)	0	0	0	0	0	0	4	0
Piloerection (main study)	0	0	0	0	10	10	10	10
Subdued behaviour (main study)	0	0	0	0	10	10	10	10
Injection site reactions (number of affected main study animals)								
Hairless area	1	1	2	1	5	3	0	0
Redness	1	0	0	0	5	0	0	0
Superficial ulcer	9	2	6	5	23	6	6	1
Body weight gain[b] (main study, Day -1-28)	47.4 g	18.4 g	-25	-50	-81.3***	-83.3**	N/A	N/A
Average body weight[b] (main study)								
Day -1	279.9 g	201.9 g	-0.2	2.5	6.9*	3.5	2.1	0.3
Day 7	295.0 g	210.3 g	-4.5	-2.8	-4.4	-4.3	-10	-7.8
Day 14	306.8 g	217.3 g	-4.8	-3.4	-8.3**	-7.1**	N/A	N/A
Day 21	317.1 g	219.6 g	-3.9	-3.5	-7.3*	-5.1	N/A	N/A
Day 28	327.3 g	220.3 g	-3.7	-2.0	-5.6	-4.4	N/A	N/A
Food consumption[b] (total/rat/day,main)	16.6 g	12.0 g	-7.5	-12	-19.9	-18.3	N/A	N/A
Day -1-3	13.3 g	9.15 g	-36.1	-39.9	-42.8	-36.1	-43.6	-42.6

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**10/27**		**Day 1-9: 30/80 Day 10-11: 0/0 Day 12-28: 20/54**		**Day 1-7: 60/160 Day 8: Off-dose Day 9: 45/120 Day 10: Off-dose Day 11: Terminated**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (toxicokinetic study)**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**
Day 3-7	20.5 g	15.1 g	-15.8	-21.8	-35.8	-27.5	-28.8	-37.0
Day 7-9	16.4 g	11.35 g	-2.7	4.4	-15.5	-5.2	-26.8	-38.7
Day 11-14	19.4 g	13.85 g	-11.8	-7.5	-21.4	-11.5	N/A	N/A
Day 14-17	14.75 g	11.35 g	-2.0	-14.1	-24.0	-20.7	N/A	N/A
Day 17-21	17.6 g	12.1 g	-1.4	-4.5	-14.8	-11.1	N/A	N/A
Day 21-24	15.65	10.4 g	-6.3	-1.4	-14.4	-11.5	N/A	N/A
Day 24-28	15.85	11.15 g	1.1	-5.8	3.5	-18.8	N/A	N/A
Ophthalmoscopy (main study)	-	-	N/A	N/A	-	-	N/A	N/A
Plasma glucose (mmol/l)								
Selected sampling[c] (individual values):								
Day 1	-	-	-	-	-	-	3.4	-
Day 2	-	-	-	-	-	-	2.9	-
Day 4	-	5.9	5.8	-	2.0	-	1.8, 1.1, 1.3	1.7, 1.3, 1.2 0.9,1.5,2.5,0.9,1.5
Day 9	5.6	-	-	-	1.1, 1.8	1.2, 1.7	-	-
24 hour profile – Day 1								
Pre-dosing	6.19	6.07	6.22	6.49	6.66	6.82	6.51	6.47
1 hour after dosing	6.67	7.24	5.89	6.34	5.43	6.57	6.01	7.18
2 hours after dosing	6.65	7.19	6.35	5.95	6.19	5.54	6.10	6.57
4 hours after dosing	7.13	6.28	7.66	7.40*	5.07**	6.17	5.44	5.09
6 hours after dosing	7.99	6.77	8.14	7.10	6.97	5.61	6.5	4.62
8 hours after dosing	6.95	6.21	7.42	7.05	6.26	6.23	5.94	5.77
12 hours after dosing	7.14	7.85	7.33	6.47*	7.26	6.33*	6.24	6.41
24 hours after dosing	6.85	6.64	6.92	6.48	6.93	6.55	6.97	6.38
24 hour profile – Day 28								
Pre-dosing	6.37	5.82	6.17	5.43	6.05	6.78	N/A	N/A
1 hour after dosing	6.08	6.84	5.93	4.98*	5.91	5.36*	N/A	N/A

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**10/27**		**Day 1-9: 30/80 Day 10-11: 0/0 Day 12-28: 20/54**		**Day 1-7: 60/160 Day 8: Off-dose Day 9: 45/120 Day 10: Off-dose Day 11: Terminated**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (toxicokinetic study)**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**
2 hours after dosing	5.85	6.70	4.44	4.28**	3.6	3.48***	N/A	N/A
4 hours after dosing	5.88	5.71	5.09	5.31	3.32**	2.96**	N/A	N/A
6 hours after dosing	6.83	6.37	6.32	5.92	4.74	3.45**	N/A	N/A
8 hours after dosing	7.10	6.44	6.52	5.96	5.36	4.79*	N/A	N/A
12 hours after dosing	6.54	7.71	6.45	6.51	6.17	5.52	N/A	N/A
24 hours after dosing	5.98	6.29	7.24	8.59	6.43	7.91*	N/A	N/A
Haematology (main study)								
White blood cell count (10^9/L)	4.58	2.46	6.18*	3.34	6.31*	4.23**	N/A	N/A
Neutrophils (%)	12.6	12.0	8.4**	8.5**	10.6	9.3*	N/A	N/A
Lymphocytes (10^9/L)	3.84	2.08	5.47*	2.96	5.46*	3.71**	N/A	N/A
Lymphocytes (%)	83.8	83.9	88.3**	88.1*	85.7	87.5*	N/A	N/A
Eosinophils (%)	1.11	1.40	0.86	0.90*	1.12	0.82**	N/A	N/A
Large unstained cells (10^9/L)	0.041	0.024	0.070***	0.031	0.072***	0.044	N/A	N/A
Red blood cell count (10^{12}/L)	7.92	7.05	7.52*	7.08	7.55*	7.13	N/A	N/A
Mean platelet volume (fL)	6.58	6.49	6.17*	6.38	6.16*	6.21	N/A	N/A
Clinical Chemistry (main study)								
Alanine aminotransferase (U/L)	60.4	57.3	67.7	48.6	74.8*	69*	N/A	N/A
Aspartate aminotransferase (U/L)	75.4	80.5	88.4**	73.9	94.5***	86.5	N/A	N/A
Urea (mmol/L)	7.55	8.20	9.27**	7.89	9.46***	8.71	N/A	N/A
Creatine kinase (U/L)	151	162	227***	184	227***	235***	N/A	N/A
Lactate dehydrogenase (U/L)	222	247	342*	218	394**	364**	N/A	N/A
Albumin (g/L)	29.07	33.51	29.76	30.51**	29.77	30.75**	N/A	N/A
Total protein (g/L)	57.89	62.61	58.25	57.60*	57.45	57.96*	N/A	N/A
Potassium (Mmol/L)	4.03	4.00	4.28	3.68	4.52*	4.12	N/A	N/A
Calcium (Mmol/L)	2.67	2.74	2.83***	2.75	2.80**	2.76	N/A	N/A
Inorganic phosphate (Mmol/L)	1.86	1.52	2.01	1.80	1.57*	1.68	N/A	N/A
Urine volume (mL)	1.6	0.7	1.5	1.3	2.3	2.2*	N/A	N/A

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**10/27**		**Day 1-9: 30/80 Day 10-11: 0/0 Day 12-28: 20/54**		**Day 1-7: 60/160 Day 8: Off-dose Day 9: 45/120 Day 10: Off-dose Day 11: Terminated**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (toxicokinetic study)**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**	**M: 10** **M: 12**	**F: 10** **F: 12**
Antibody determination								
No. of positive/number animals sampled – Males and females combined								
Insulin degludec	0/44		3/42		7/41		N/A	
Liraglutide	0/44		0/42		0/41		N/A	
Organ weight[b] (main study)								
Prostate (absolute)	932 mg	N/A	-20.6*	N/A	-32.3***	N/A	N/A	N/A
Prostate (relative to body weight)	0.285	N/A	-17.9*	N/A	-29.1**	N/A	N/A	N/A
Heart (absolute)	898 mg	666 mg	-9.4*	-7.8*	-13.3***	-9.8	N/A	N/A
Heart (relative to body weight)	0.277	0.303	-7.2	-6.9	-9.4	-7.3	N/A	N/A
Macroscopic pathology: animals examined	10	N/A	10	N/A	10	N/A	N/A	N/A
Prostate - small	0	N/A	0	N/A	2	N/A	N/A	N/A
Seminal vesicles - small	0	N/A	0	N/A	2	N/A	N/A	N/A
Histopathology (main study)								
Adrenals: animals examined	10	10	10	10	10	10	N/A	N/A
Cortical vacuolation Minimal changes	0	0	2	2	7	5	N/A	N/A
Liver: animals examined	10	10	10	10	10	10	N/A	N/A
Increased hepatocellular rarefaction								
Minimal changes	3	0	4	3	6	8	N/A	N/A
Slight changes	0	0	2	0	3	0	N/A	N/A

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**10/27**		**Day 1-9: 30/80 Day 10-11: 0/0 Day 12-28: 20/54**		**Day 1-7: 60/160 Day 8: Off-dose Day 9: 45/120 Day 10: Off-dose Day 11: Terminated**	
Number of Animals (main study) Number of Animals (toxicokinetic study)	**M: 10 M: 12**	**F: 10 F: 12**	**M: 10 M: 12**	**F: 10 F: 12**	**M: 10 M: 12**	**F: 10 F: 12**	**M: 10 M: 12**	**F: 10 F: 12**
Testis: animals examined	10	N/A	10	N/A	10	N/A	N/A	N/A
Degeneration of seminiferous tubules (main study) Minimal changes	1	N/A	1	N/A	4	N/A	N/A	N/A
Apoptosis of spermatocytes (main study) Minimal changes	0	N/A	1	N/A	5	N/A	N/A	N/A
Injection site: animals examined	10	10	10	10	10	10	N/A	N/A
Inflammation, mononuclear cells	9	10	7	7	9	7	N/A	N/A
Minimal	6	10	5	7	5	6	N/A	N/A
Slight	3	0	1	0	4	1	N/A	N/A
Moderate	0	0	1	0	0	0	N/A	N/A
Inflammation, neutrophils, minimal	0	0	0	1	0	0	N/A	N/A
Necrosis	7	7	7	1	3	1	N/A	N/A
Minimal	3	5	6	1	2	1	N/A	N/A
Slight	3	2	1	0	1	0	N/A	N/A
Moderate	1	0	0	0	0	0	N/A	N/A
Fibrosis/granulation tissue	10	9	9	5	8	5	N/A	N/A
Minimal	8	5	5	5	7	4	N/A	N/A
Slight	2	4	4	0	1	1	N/A	N/A

N/A Not applicable

- no noteworthy findings

a: In addition one sample taken at pre-dose (animal 14, group 2) was recorded as positive. The %B/T values for this sample is just above cut-off and is probably categorised as positive by statistical coincidence, as the criteria for the confirmation test has been designed to ensure detection of low positives.

b: Figures indicate %- deviation from control. Negative figures indicate a decrease compared to control

c: scattered sampling were performed to confirm hypoglycaemia

*: $p<0.05$, versus control group, **: $p<0.01$, versus control group, ***: $p<0.001$, versus control group

2.6.7.7.B ラットを用いた 13 週間反復皮下投与毒性試験及び回復性試験（209212）

Species/Strain: Rat/Wistar	**Duration of Dosing: 13 weeks**	**Location in CTD: 4.2.3.2-3**
Initial Age: 5 weeks	**Duration of recovery period:** 4 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 08 September 2009	**Method of Administration:** subcutaneous injection	
	Vehicle: Per ml IDegLira: 4.7 mg phenol, 19.7 mg glycerol, q.s. sodium hydroxide, q.s. hydrochloric acid, 1 ml milliQ water, pH=7.8. **Formulation** Per ml IDegLira: 4.7 mg phenol, 19.7 mg glycerol, [redacted], q.s. sodium hydroxide, q.s. hydrochloric acid, 1 ml milliQ water, pH=7.8. Dosing volume 0.5 ml/kg	

Parameters collected:
Body Weight gain (%), Food Consumption(%), Clinical Observations, Ophthalmoscopy, Glucose profiling, Haematology, Serum Chemistry, Urinalysis, Antibody Analysis, Organ Weights (%),Gross Pathology, Histopathology

Special Features: After last blood sampling, recovery animals were 4 weeks off dose and then sampled for antibody analysis

No Observed Adverse-Effect Level: 20/32 (IDegLira) nmol/kg/day

Brief conclusion:
Rats were dosed once daily for 13 weeks with a fixed combination of 600 nmol IDeg and 960 nmol liraglutide at the following doses: 0/0 [vehicle for IDegLira; 4.7 mg/ml phenol, 19.7 mg/ml glycerol, sodium hydroxide (q.s.) and hydrochloric acid (q.s.), pH 7.8], 2/3.2 nmol/kg, 7/11.2 nmol/kg, 20/32 nmol/kg of IDegLira. Satellite groups were included for toxicokinetic analysis and blood glucose profiling. Recovery groups were included at the 0/0 and 20/32 nmol/kg dose levels and dosed for 13 weeks prior to a 4-week treatment-free period. No mortalities occurred and no clinical signs were observed. Reduced body weight gain was observed in males dosed with 20/32 nmol/kg/day IDegLira and a minor reduction in body weight gain was observed in females dosed with 7/11.2 and 20/32 nmol/kg/day IDegLira. Changes in haematology and clinical chemistry were considered of no toxicological relevance. Systemic exposure increased in a dose proportional manner with no difference between genders for both IDeg and liraglutide. IDeg antibodies were detected in 8 out of 70 dosed animals. No antibodies towards liraglutide were found. Changes in organ weight at termination after 13 weeks dosing were observed for the kidney, ovaries and adrenal glands. Changes in organ weight at the end of the recovery period were observed for the ovaries, liver, spleen, thymus, and heart. All organ weight changes were considered a result of the pharmacological action of IDegLira and thus, of no toxicological concern. No histopathological changes considered related to treatment with IDegLira were observed. The histopathological changes observed at the injection site were mild and considered to be of a similar nature and severity between dosed and control animals. All changes observed were considered related to the pharmacological effect of IDeg and liraglutide. Consequently, a NOAEL was established at 20/32 nmol/kg/day IDegLira.

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**2/3.2**		**7/11.2**		**20/32**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (satellite study)** **Number of Animals (recovery group)**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**
Toxicokinetics: AUC (h*pM)								
Day 1 AUC– IDeg			15700	16600	53300	60700	179000	178000
Day 1 AUC- liraglutide			40200[b]	35500[a]	228000	268000	848000	832000
Week 13 AUC– IDeg			26700	22700[a]	94500	86300	233000	232000
Week 13 AUC- liraglutide			64600	76300	277000	229000	1040000	1100000
Day 1 C_{max} – IDeg			4250	3610	13500	14600	35400	43000
Day 1 C_{max} – liraglutide			5250	6060	27300	27200	80500	79200
Week 13 C_{max} – IDeg			5170	5380	12100	21100	30200	46400
Week 13 C_{max} – liraglutide			4560	7120	22700	25800	83600	99300
Day 1 t_{max} – IDeg			2	2	2	2	2	2
Day 1 t_{max} – liraglutide			6	6	4	4	6	6
Week 13 t_{max} – IDeg			2	1	2	2	4	2
Week 13 t_{max} – liraglutide			6	4	4	4	8	6
<u>Noteworthy Findings</u>								
Died or Euthanised Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Clinical observations	0	0	0	0	0	0	0	0
Terminal body weight	436.9g	257.0g	445.7	262.4	443.9	252.6	401.8*	251.1
Body weight gain[b] – Day 1-91 (main study+recovery)	223.1g	97.9g	+4	+4	+2	-5	-16**	-7
Body weight gain[b] – Day 1-119 (recovery)	250.8g	107.4g	N/A	N/A	N/A	N/A	-8	-18
Food consumption (g/animal) (main study+recovery)b	2246.1g	1632.2g	0	-4	+1	-5	-1	-1
Ophthalmoscopy	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	-	-
Plasma glucose – main study and satellite groups (mmol/l)								
Day 1								
Pre-dosing	8.83	7.10	7.63	7.97	7.83	6.63	7.77	6.73
1 hour after dosing	7.40	5.17	7.33	6.73	6.87	6.30	6.00**	5.73
2 hours after dosing	7.87	7.53	7.60	6.93*	7.03	7.03	5.97**	5.90***

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**2/3.2**		**7/11.2**		**20/32**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (satellite study)** **Number of Animals (recovery group)**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**
4 hours after dosing	7.97	7.47	7.80	7.33	7.90	7.53	9.03	6.13
6 hours after dosing	8.40	7.20	7.50	6.80	8.27	7.40	8.23	7.67
8 hours after dosing	7.50	7.33	7.70	7.57	7.90	8.40	9.73*	7.43
12 hours after dosing	8.27	7.83	7.17	6.77	7.87	6.33	6.40*	6.13
24 hours after dosing	7.23	7.00	7.83	7.45	7.27	7.53	7.50	7.10
Day 91								
Pre-dosing	6.87	5.63	6.03	6.17	6.00	5.57	6.40	6.90
1 hour after dosing	5.90	5.63	5.97	5.40	6.87	4.67	4.20	4.77
2 hours after dosing	6.17	6.63	5.77	5.23*	6.87	4.40***	4.43	2.90***
4 hours after dosing	5.90	6.27	6.70	5.53	5.80	5.07*	3.93	2.47***
6 hours after dosing	7.07	5.80	6.87	6.03	6.27	5.73	6.37	3.47**
8 hours after dosing	6.63	6.20	6.13	5.80	6.40	6.23	6.23	5.80
12 hours after dosing	6.40	6.37	6.47	6.60	6.20	5.87	6.20	6.70
24 hours after dosing	6.40	5.43	5.87	5.87	6.23	5.47	6.67	7.17*
Haematology (main study animals)								
White blood cells								
Week 6	8.55	9.82	8.77	9.65	9.06	8.88	10.98**	10.43
Week 13	8.98	7.85	9.13	7.91	9.92	7.95	9.87	7.51
Week 17	7.80	6.56	N/A	N/A	N/A	N/A	7.30	5.16
Lymphocytes								
Week 6	7.90	8.85	7.97	8.72	8.40	8.21	10.15**	9.76
Week 13	7.79	6.63	7.65	6.48	8.60	6.65	8.49	6.47
Week 17	6.94	5.62	N/A	N/A	N/A	N/A	6.32	4.34
Lymphocytes (%)								
Week 6	92.1	90.2	91.2	90.5	92.9	92.4	92.4	93.5**
Week 13	86.7	83.9	83.9	81.8	86.8	83.6	85.7	85.7
Week 17	89.0	86.2	N/A	N/A	N/A	N/A	86.0	84.6
Neutrophils								
Week 6	0.55	0.75	0.57	0.70	0.49	0.50*	0.61	0.50*

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**2/3.2**		**7/11.2**		**20/32**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (satellite study)** **Number of Animals (recovery group)**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**
Week 13	1.03	1.06	1.27	1.24	1.15	1.13	1.13	0.88
Week 17	0.70	0.82	N/A	N/A	N/A	N/A	0.88	0.76
Neutrophils (%)								
Week 6	6.3	7.9	6.2	7.1	5.2	5.6*	5.5	4.8***
Week 13	11.5	14.0	14.0	15.9	11.6	14.4	11.8	11.9
Week 17	9.0	12.0	N/A	N/A	N/A	N/A	12.2	14.0
Clinical chemistry (main study)								
Alanine aminotransferase (µkat/l)								
Week 6	0.72	0.82	0.77	0.79	0.76	0.71	0.99***	0.74
Week 13	0.94	0.92	0.92	1.12*	0.94	0.81	1.00	0.90
Week 17	0.85	1.18	N/A	N/A	N/A	N/A	0.92	0.78*
Aspartate aminotransferase (µkat/l)								
Week 6	1.23	1.41	1.45	1.32	1.34	1.33	1.53**	1.27
Week 13	1.34	1.36	1.41	1.65*	1.41	1.29	1.56	1.32
Week 17	1.26	1.63	N/A	N/A	N/A	N/A	1.36	1.17**
Globulin (g/l)								
Week 6	20.3	18.1	19.7	18.3	20.5	17.8	18.3	16.9
Week 13	19.1	17.3	18.4	17.1	19.2	17.0	16.8**	15.7*
Week 17	21.3	17.0	N/A	N/A	N/A	N/A	18.0***	15.9
Total protein (g/l)								
Week 6	65.2	69.9	65	68.2	64.3	68.8	62.6	66.9
Week 13	64.2	70.1	62.9	69.1	63.3	68.6	60.9*	65.7***
Week 17	67.7	72.4	N/A	N/A	N/A	N/A	64.2**	70.5
Albumin								
Week 6	44.9	51.9	45.3	49.9	43.8	51.0	44.3	50.0
Week 13	45.1	52.9	44.5	52.0	44.1	51.6	44.1	50.0
Week 17	46.4	55.4	N/A	N/A	N/A	N/A	46.2	54.6
Albumin/globulin								
Week 6	2.22	2.91	2.32	2.76	2.16	2.90	2.45*	2.98
Week 13	2.38	3.09	2.43	3.08	2.32	3.07	2.66*	3.22

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**2/3.2**		**7/11.2**		**20/32**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (satellite study)** **Number of Animals (recovery group)**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**
Week 17	2.18	3.31	N/A	N/A	N/A	N/A	2.57**	3.43
Urea (mmol/l)								
Week 6	7.47	7.77	8.53*	7.95	8.80**	8.34	7.90	8.17
Week 13	7.48	7.19	8.12	8.14	8.38	8.03	8.85**	8.01
Week 17	7.36	7.92	N/A	N/A	N/A	N/A	8.54*	8.23
Chloride (mmol/l)								
Week 6	98.4	100.1	98.6	100.0	99.0	99.6	98.5	99.1
Week 13	100.3	101.8	100.8	102.9	101.3	103.8**	101.8**	103.3*
Week 17	100.7	101.0	N/A	N/A	N/A	N/A	100.8	101.1
Urinanlysis (main study)								
Colour – week 13								
Light yellow	10	6	5	1	4	1	8	2
Yellow	3	8	3	4	4	3	7	3
Dark Yellow	2	1	2	5	1	6	0	10
Brown	0	0	0	0	1	0	0	0
Statistical significance compared to control	-	-	-	*	-	*	-	**
Protein – week 13								
No trace	5	8	0	1	1	1	4	5
Trace	3	4	6	5	3	2	6	3
0.3 g/L	4	3	1	2	3	5	4	3
1.0 g/L	3	0	3	2	3	2	1	4
Statistical significance compared to control	-	-	-	*	-	**	-	-
Ketones – week 6								
No trace	6	15	0	9	3	7	9	14
Trace	7	0	7	1	3	3	5	1
1.5 mmol/L	2	0	3	0	3	0	1	0
Statistical significance compared to control	-	-	*	-	-	-	-	-
Ketones – week 13								
No trace	8	15	4	9	5	5	10	9
Trace	5	0	4	1	3	4	4	6

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**2/3.2**		**7/11.2**		**20/32**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (satellite study)** **Number of Animals (recovery group)**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**
1.5 mmol/L	2	0	2	0	2	1	1	0
Statistical significance compared to control	-	-	-	-	-	**	-	*
Urine microscopy (main study)	-	-	-	-	-	-	-	-
Antibody determination								
No. of positive/number animals sampled – male and females combined								
IDeg	0/30		1/20		3/20		4/30	
Liraglutide	0/30		0/20		0/20		0/30	
Organ weight[b]								
At termination								
Kidney (relative to body weight)	0.629	0.687	+4	-2	+3	+8	+12***	+4
Kidney (absolute)	2700	1765	2902	1763	2856	1842	2763	1813
Ovary (absolute)	N/A	105.9	N/A	-5	N/A	-7	N/A	+15
Ovary (relative to body weight)	N/A	0.0411	N/A	-6	N/A	-3	N/A	+17*
Ovary (relative to brain weight)	N/A	5.26	N/A	-3	N/A	-7	N/A	+16
Adrenal gland (absolute)	54.2	75.6	0	-5	0	-16*	+2	-5
Adrenal gland (relative to brain weight)	2.45	3.75	+2	-4	0	-16**	+4	-5
At recovery								
Kidney (relative to body weight) Ovary (relative to body weight)	0.6 N/A	0.669 0.0334	N/A N/A	N/A N/A	N/A N/A	N/A N/A	-4 N/A	+5 +16*
Liver (absolute)	14324	9289	N/A	N/A	N/A	N/A	-1	-12*
Liver (relative to brain weight)	648.2	457.6	N/A	N/A	N/A	N/A	0	-11*
Liver (relative to body weight)	3.09	3.5	N/A	N/A	N/A	N/A	+4*	-6
Spleen (relative to body weight)	0.143	0.185	N/A	N/A	N/A	N/A	+19*	+11
Thymus (relative to body weight)	0.0878	0.1170	N/A	N/A	N/A	N/A	-25*	+6
Heart (absolute)	1165	866	N/A	N/A	N/A	N/A	-5	-13*
Heart (relative to body weight)	0.253	0.326	N/A	N/A	N/A	N/A	-2	-7*
Macroscopy								
Injection site reaction: animals examined Discoloration – Red	10 0	10 1	10 3	10 1	10 3	10 2	10 2	10 2

Daily Dose IDegLira (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**2/3.2**		**7/11.2**		**20/32**	
Number of Animals (main study) **Number of Animals (satellite study)** **Number of Animals (recovery group)**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14**	**F: 10** **F: 14**	**M: 10** **M: 14** **M: 5**	**F: 10** **F: 14** **F: 5**
Histopathology								
Injection site reaction: animals examined	10	10	3	1	3	2	10	10
Necrosis, s.c.	3	6	2	0	2	2	6	4
Grade 1	3	5	1	0	2	2	4	4
Grade 2	0	1	1	0	0	0	2	0
Imflammatory cells, s.c.	8	10	3	1	3	2	10	9
Grade 1	4	7	1	1	1	1	4	6
Grade 2	4	3	2	0	2	1	5	3
Grade 3	0	0	0	0	0	0	1	0
Incr fibr/coll s.c.	9	6	3	1	3	2	9	8
Grade 1	3	2	0	0	0	0	3	2
Grade 2	4	3	2	1	2	1	4	6
Grade 3	2	1	1	0	1	1	2	0

a: AUC 0-8h, b: AUC 0-12h

N/A Not applicable - no noteworthy findings

b: Figures indicate %- deviation from control. Negative figures indicate a decrease compared to control

*: $p<0.05$, versus control group

**: $p<0.01$, versus control group

***: $p<0.001$, versus control group

2.6.7.8 遺伝毒性試験：*In-Vitro*

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.9 遺伝毒性試験：*In-Vivo*

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.10 がん原性試験

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験

No studies were conducted for IDegLira.

2.6.7.15 局所刺激性

Test Article: IDegLira

Species/ Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
New Zealand White rabbits	Subcutaneous Intramuscular Intravenous	0.05 ml of the 600/960 nmol/ml IDegLira and vehicle [6.2 mg/ml phenol, 19.7 mg/ml glycerol, sodium hydroxide (q.s.) and hydrochloric acid (q.s.), pH 7.8]	5 female rabbits per group	After administration by subcutaneous, intramuscular and intravenous routes, mild inflammatory and degenerative/regenerative reactions were seen at the injection sites with an incidence and severity that were comparable between vehicle and IDegLira.	210203
White LYD slaughter pigs	Subcutaneous injection	0.2 ml of 600/1600 nmol/ml IDegLira, vehicle [4.7 mg/ml phenol, 19.7 mg/ml glycerol, sodium hydroxide (q.s.) and hydrochloric acid (q.s.), pH 8.2] and sterile isotonic saline	4 female pigs Groups: N/A 4 injections per time point and formulation	Two and five days after subcutaneous injection, IDegLira did not cause local tissue reactions beyond the range recorded in the vehicle group. The tissue reactions were minimal-slight inflammatory changes.	207451

2.6.7.16 その他の毒性試験

No studies were conducted for IDegLira.