インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.4 非臨床試験の概括評価

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 3
略語一覧 4
2.4.1 緒言 6
2.4.1.1 インスリン イコデクの分子設計 6
2.4.1.2 非臨床試験計画及び規制当局との協議 7
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 インスリンの薬理学 8
2.4.2.2 効力を裏付ける試験 9
2.4.2.2.1 *In vitro* 薬理試験 10
2.4.2.2.2 *In vivo* 薬理試験 12
2.4.2.3 副次的薬理試験 12
2.4.2.4 安全性薬理試験 13
2.4.3 薬物動態試験 13
2.4.3.1 分析法 15
2.4.3.2 吸収 15
2.4.3.3 分布 16
2.4.3.4 代謝 16
2.4.3.5 排泄 19
2.4.3.6 薬物相互作用 19
2.4.4 毒性試験 19
2.4.4.1 一般毒性 21
2.4.4.2 遺伝毒性 22
2.4.4.3 がん原性 22
2.4.4.4 生殖毒性 23
2.4.4.4.1 受胎能及び胚・胎児発生 24
2.4.4.4.2 出生前及び出生後の発生 24
2.4.4.5 局所刺激性 25
2.4.4.6 その他の毒性試験 26
2.4.4.6.1 免疫原性 26
2.4.4.6.2 添加物の評価 26
2.4.4.6.3 不純物及び溶出物の評価 26
2.4.4.6.4 動物とヒトにおける曝露量の比較 27
2.4.5 総括及び結論 28
2.4.5.1 概要 28

2.4.5.2 結論 29
参考文献 31

図目次

ページ

図 2.4-1 インスリン イコデクの化学構造 6
図 2.4-2 ラット、イヌ及びヒトにおけるインスリン イコデクの代謝経路 18

表目次

ページ

表 2.4-1 薬理試験の概要 8
表 2.4-2 ラット、イヌ、ブタ及びヒトのクローン化 IR アイソフォームに対するインスリン イコデクの HI との相対的な結合親和性 10
表 2.4-3 インスリン イコデクの代謝及び細胞増殖誘発の効力 12
表 2.4-4 薬物動態試験の概要 14
表 2.4-5 インスリン イコデクの反復皮下投与時又は単回静脈内投与時における用量補正（1 nmol/kg）後の平均薬物動態パラメータの種間比較 15
表 2.4-6 ラット及びイヌにおける[^{3}H]標識インスリン イコデク関連放射能の蓄積排泄率 19
表 2.4-7 毒性試験の概要 20
表 2.4-8 ラットを用いた 52 週間の試験における雌の乳腺腫瘍の発現率 23
表 2.4-9 重要な毒性試験における動物／ヒト曝露量比 27

略語一覧

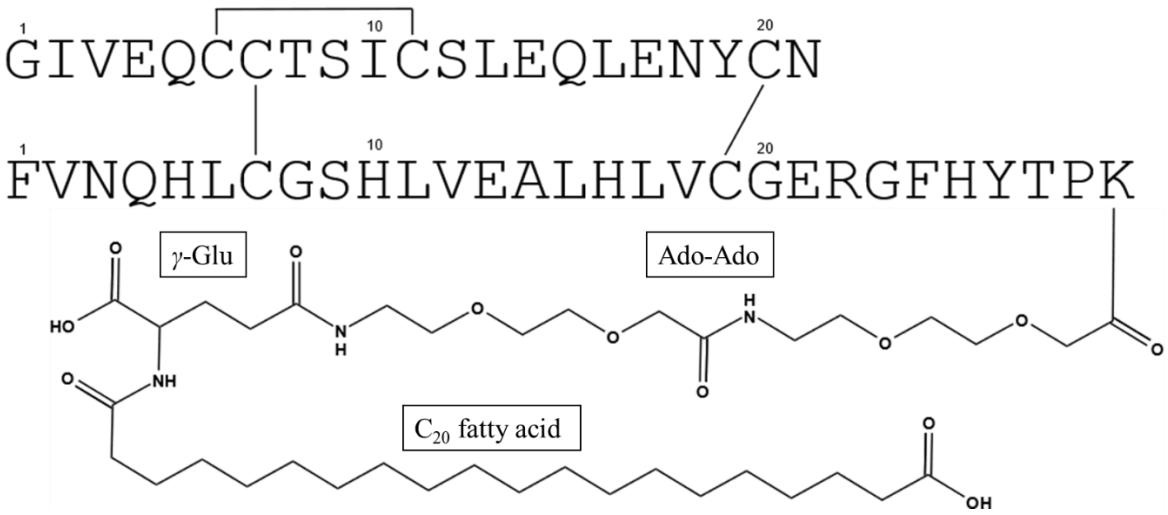
ADME	:	absorption, distribution, metabolism, and excretion（吸収、分布、代謝及び排泄）
Ado	:	8-amino-3,6-dioxaoctanic acid（8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸）
AUC	:	area under the plasma drug concentration-time curve（血漿中濃度 - 時間曲線下面積）
BDC	:	bile duct cannulated（胆管カニューレ挿入）
CHMP	:	committee for medicinal products for human use（欧州医薬品委員会）
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）
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）
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）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
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）
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 icodec	:	INN for NNC0148-0000-0287（NNC0148-0000-0287 の国際一般名）
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）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
JPE	:	Japanese Pharmaceutical Excipients（医薬品添加物規格）
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）
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）

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）
Ph.Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
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）
(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）
RIA	:	radioimmunoassay（ラジオイムノアッセイ）
s.c.	:	subcutaneous（皮下）
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）
$t_{1/2}$	:	terminal plasma half-life（終末相半減期）
tau	:	dosing interval（投与間隔）
Thr	:	threonine（スレオニン）
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）
USP	:	US Pharmacopoeia（米国薬局方）
V_z	:	volume of distribution（分布容積）
ZDF	:	Zucker Diabetic Fatty (rats)〔Zucker Diabetic Fatty（ラット）〕

2.4.1　緒言

インスリン イコデクは、単回皮下投与後の薬力学的作用が長時間持続するように設計されたインスリンアナログであり、糖尿病治療における週 1 回投与に適している。分子式は $C_{280}H_{435}N_{71}O_{87}S_6$ であり、分子量は 6,380.26 Da である（図 2.4-1）。

図 2.4-1　　インスリン イコデクの化学構造



2.4.1.1　インスリン イコデクの分子設計

週 1 回投与に適したインスリン分子の設計では、極めて長い半減期が必要なだけでなく、週全体にわたりほぼ均一に分布する血糖降下作用を確保する機序も重要である。これを達成するため、インスリン イコデクは 4 つの重要な特性、すなわち（1）アルブミンに対する高い親和性、（2）インスリン受容体（IR）に対する低い結合親和性、（3）高い安定性、（4）高い可溶性を考慮して設計されている[1]。

強力かつ可逆的なアルブミン結合は、C_{20} 脂肪酸側鎖が B 鎖 C 末端に導入されたことにより達成されている（図 2.4-1）。この脂肪酸は、γ-グルタミン酸（γ-Glu）及び小さなリンカー〔8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（Ado）-Ado〕を介して B 鎖 29 位のリジン（Lys^{B29}）との間でインスリン骨格と結合している。インスリン イコデクの脂肪酸は、アルブミンの脂肪酸結合部位に強力に結合するが、強力なアルブミン結合だけでは、週 1 回投与に必要な半減期を延長させるには不十分であった。このため、ヒトインスリン（HI）のアミノ酸配列のうち 3 箇所〔A 鎖 14 位のグルタミン酸（Glu^{A14}）、B 鎖 16 位のヒスチジン（His^{B16}）及び B 鎖 25 位のヒスチジン（His^{B25}）〕を置換することにより、インスリン受容体（IR）結合と IR 介在性クリアランスを低下させ、さらに半減期を延長した。重要な点として、受容体への親和性が低い場合には、消失前の各インスリン分子による受容体活性化の開始に長い時間を要するため、低い IR 親和性により *in vivo* での効力が低下するのではなく、インスリン活性の速度が遅くなる。したがって、インスリン イコデクは効力を十分に維持する一方で、天然型 HI と比較すると、極めて緩徐で長時間持続する作用をもつ。さらに、アミノ酸修飾により、酵素的分解が最小限に抑えられ、分子の安定性が得られている[2,3]。最後に、HI の B 鎖 30 位のスレオニン（Thr^{B30}）が欠落しているが、Thr^{B30} は IR 親和性に影響しない。以上の点から、これらの分子の変更により、インスリ

ン イコデクの臨床薬物動態プロファイルで認められた長い半減期に至ることが実証されている〔Module (M) 2.7.2〕。

長い半減期への寄与に加え、His^{B25} と Glu^{A14} の置換の組み合わせにより、インスリン イコデクの可溶性が向上し[2]、標準的な 100 U/mL のインスリン製剤の 7 倍量にあたる、700 U/mL のインスリン イコデク製剤が可能となった。これにより、インスリン イコデク週 1 回投与の投与容量は 1 日 1 回投与の Basal インスリンと同様になる。

インスリン イコデクは、安定かつ可溶性のヘキサマーが形成されるように設計／製剤化しており、皮下組織に注入後、解離して緩徐に循環血中へ吸収され、アルブミンと強力かつ可逆的に結合する。作用時間延長の主な機序は、循環血中のアルブミンと結合した貯蔵体によるものである。この点は、インスリン デグルデク、インスリン デテミル及びインスリン グラルギンといった他の Basal インスリンアナログとは対照的であり、これらはいずれも皮下組織内に貯蔵体が形成され、インスリンアナログが緩徐に吸収される。

2.4.1.2 非臨床試験計画及び規制当局との協議

HI と比較すると、インスリン イコデク分子には多くの分子修飾が導入されている。このため、非臨床試験の主眼は、インスリン イコデクが望ましい長期の薬物動態及び薬力学的作用を示しながら、HI と同じ生物学的プロファイル及び安全性プロファイルを維持することを実証することであった。したがって、インスリン イコデクがヒト IR の特異的かつ十分なアゴニストであること、また、インスリン イコデクにより同じ受容体後シグナル伝達経路が活性化されることを実証するため、一連の *in vitro* 試験を実施した。インスリン イコデクが血糖降下作用をもつことを実証するため、ラット、イヌ及びブタを用いた *in vivo* 薬理試験を実施した。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* がん原性評価を含む 52 週間のラット毒性試験では、HI〔Neutral Protamine Hagedorn（NPH）インスリンとして投与〕を参照物質として使用した。

非臨床安全性試験プログラムは、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実施についてのガイダンス（2009 年 6 月）[4]、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ガイドライン（2011 年 6 月）[5]、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）[6]、ICH S7A 安全性薬理試験ガイドライン（2000 年 11 月）[7]、及び 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ガイドライン（2005 年 5 月）[8]ならびに欧州医薬品庁（EMA）の Point to Consider Document on the Non-Clinical Assessment of the Carcinogenic Potential of Insulin Analogues（2001 年 11 月）[9]に準拠して設計された。

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。

2.4.2 薬理試験

インスリン イコデクの薬理作用を評価するため、広範な試験を実施した（表 2.4-1）。

表 2.4-1 薬理試験の概要

Study type	Administration	Species
Primary pharmacodynamics		
Insulin receptor binding	*in vitro*	rat, dog, pig, human
IGF-1 receptor binding	*in vitro*	rat, dog, human
Insulin receptor signalling and kinetics	*in vitro*	human
Metabolic effect (adipocyte, hepatocyte, L6-hIR, MCF-7 cells)	*in vitro*	rat, human
Mitogenic effect (HMEC, MCF-7, L6-hIR, COLO205 cells)	*in vitro*	human
Pharmacodynamic glucose lowering effect	*in vivo*	rat, dog, pig
Secondary pharmacodynamics		
Receptor selectivity	*in vitro*	various
Safety pharmacology		
Effect on CNS and respiration	s.c.	rat
Effect on cardiovascular system	s.c.	dog
Effect on hERG channel	*in vitro*	human
Effect on action potential	*in vitro*	rabbit

2.4.2.1 インスリンの薬理学

HI の生理学及び薬理学は十分に確立されており、広範に検討されている[10]。簡潔に述べると、インスリンは多機能性ホルモンであり[11]、炭水化物、脂質及びタンパク質の代謝、また、食欲の調節及び細胞増殖において中心的な役割を担う。インスリンは、特異的な IR への結合及び活性化を通じ、これらの作用に介在する。IR はそれ自体がチロシンキナーゼであり、自己リン酸化し、受容体後シグナル伝達経路を活性化するが、これについては、プロテインキナーゼ B（PKB）といった重要な細胞内分子のリン酸化を含め、十分に説明されている。

IR は、エクソン 11 の欠損（IR-A）又は保持（IR-B）により、2 種類のアイソフォームとして存在し、これらはホモ又はヘテロダイマーのいずれか〔インスリン受容体 A（IR-A）/IR-A、インスリン受容体 B（IR-B）/IR-B 又は IR-A/IR-B〕を形成する。また、両 IR アイソフォームは、構造的に類似するインスリン様成長因子（IGF）受容体とハイブリッド受容体を形成するが、これらの受容体は IGF-1 及

び IGF-2 受容体として基本的に機能し、インスリンとの結合親和性は非常に低いことが実証されている[12]。

IR はインスリンの生理作用及び薬理作用に介在することに加え、インスリンのクリアランスに中心的役割を果たす[13]。インスリンが IR に結合すると、細胞内シグナル伝達カスケードが活性化され、最終的には IR 複合体の細胞内への内在化が起こり、インスリン分子の分解及びクリアランスに至る。

半減期の延長及び急速な血糖降下作用に対する緩衝作用を目的としたインスリンの薬理学的原則の応用

インスリン イコデク分子に導入した修飾の結果、基本的に不活性であるアルブミン結合貯蔵体が循環血中に形成され、インスリン イコデクは緩徐かつ持続的に IR を活性化する。こうした作用は、（i）アルブミン結合を通じた腎クリアランスの最小化、（ii）細胞内への内在化による受容体介在性クリアランスを低下させるための IR 親和性の低下、及び（iii）ペプチド分解を抑制するためのインスリン骨格の安定化により、全体的にインスリンのクリアランスを低下させることで達成される。脂肪酸の配置及び特徴ならびにインスリン イコデクに導入したアミノ酸修飾は、いずれもインスリン イコデクの IR 結合親和性の低下に寄与する。これらのインスリン イコデクの特徴は、週 1 回投与に適した長い半減期をもたらすだけでなく、1 回の注射で 1 週間分の Basal インスリンを投与した場合の急激な血糖低下に対し、緩衝作用をもたらす機序となる。最適なインスリン療法には、実用量及び投与タイミングの点でいずれも非常に正確な投与が必要であり、これを考慮すると、1 週間全体の分量に相当する Basal インスリンを低血糖のリスクを生じることなく 1 回の注射で安全に投与することは、概念的には難しいと考えられるが、インスリン イコデク分子の設計ではこの懸念に対処している。その最も重要な機序として、投与用量が基本的に不活性な貯蔵体（アルブミン結合体）を形成し、緩徐かつ安定的な血糖降下作用が発揮されるよう設計することで、点滴のように血糖降下作用を減速させている。IR 結合親和性が低いと、インスリン作用の発現速度が低下する。その理由として、受容体への親和性が低い場合には、消失前の各インスリン分子による受容体活性化の開始に長い時間を要することとなり、これにより、低血糖につながりうる急速な血糖降下作用が避けられ、1 回の皮下注射で 1 週間分のインスリンが安全に投与できる。

2.4.2.2 効力を裏付ける試験

以下の項において、「効力」の用語は、平行性を示す用量反応曲線から求めた各種生物学的パラメータの 50%阻害濃度（IC_{50}）又は 50%有効濃度（EC_{50}）を反映するものであり、「HI に対する相対効力」の値は IC_{50} 又は EC_{50} のインスリン イコデク／HI 比を求めたものである。

また、インスリン イコデクはアルブミン結合を可能とする脂肪酸部分を含むことから、個々の *in vitro* 生物学的アッセイでは、細胞のアルブミンへの感受性に応じてアルブミン濃度が異なり、*in vitro* の効力の報告値に影響が及んでいることを認識する必要がある。*In vitro* 及び *in vivo* の効力を直接関連付けることはできないことに留意することが重要である。

2.4.2.2.1 *In vitro* 薬理試験

IR 結合

インスリン イコデクは、ラット、イヌ、ブタ及びヒトなど、検討した様々な動物種由来の IR と特異的に結合する（表 2.4-2）。インスリン イコデクは IR-A（短いアイソフォーム）及び IR-B（長いアイソフォーム）に対して同等かつ良好に結合する。インスリン イコデク分子に施された修飾により、インスリン イコデクの IR 結合親和性は HI よりも低く、競合的結合曲線は右側へ移動した。試験系のアルブミン濃度を増加させると、インスリン イコデクの血清アルブミンへの結合能を反映して右側への移動の程度が大きくなった。

表 2.4-2　ラット、イヌ、ブタ及びヒトのクローン化 IR アイソフォームに対するインスリン イコデクの HI との相対的な結合親和性

Species	Receptor type	Albumin (%)	Affinity (%)[a]
Rat	Membrane IR-A and IR-B	0.1	0.05 and 0.06
	Liver membrane IR	0.1	0.04
Dog	Liver membrane IR	0.1	0.05
Pig	Membrane IR-A and IR-B	0.1	0.07 and 0.06
	Liver membrane IR	0.1	0.04
Human	Solubilised IR-A and IR-B	0	0.50 and 0.78
	Membrane IR-A and IR-B	0.1	0.05 and 0.06
	Liver membrane IR	0.1	0.06

a – relative to human insulin

インスリン イコデクは、HI と同じ用量依存性の下、受容体をリン酸化し、受容体下流の細胞内シグナル伝達経路を刺激することが実証されており、IR を活性化することが示された。したがって、インスリン イコデクの作用機序は、HI 及び他の既知のインスリンアナログと同じであることが明らかとなった。

IGF-1 受容体との結合

インスリンは、IR との結合に加え、構造的に類似する IGF-1 受容体（IGF-1R）とも結合するが、親和性は極めて低い（IGF-1 の親和性の約 1000 分の 1）。したがって、IGF-1R に対するインスリンの結合は生理的インスリン濃度において意味をもたない。しかし一方で、IGF-1R への親和性が IR への親和性よりも不均衡に増大しているアナログは、細胞増殖能が HI よりも高い傾向を示す可能性があるため、インスリンアナログの特性評価において IGF-1R への親和性は有用なパラメータであると一般にみなされている。

可溶化ヒト IGF-1R を用いた検討では、アルブミン非存在下における IGF-1R に対するインスリン イコデクの相対的な親和性は 0.14%であり、インスリン イコデクの IGF-1R に対する親和性は、IR への結合親和性（0.50%及び 0.78%）と比較して相対的に低いことが示された。0.1%アルブミン存在下におけ

るインスリン イコデクの膜結合型 IGF-1R からの IGF-1 置換能は極めて低く、ラット、イヌ及びヒトの IGF-1R で検討した場合、IC_{50} は決定できなかった。

IR シグナル伝達

インスリンが IR に特異的に結合すると、シグナル伝達カスケードの第一段階として、特定のチロシン残基における IR の自己リン酸化が起こり、次に IR 基質のドッキングと、プロテインキナーゼ B（PKB）を含む下流キナーゼのさらなるリン酸化に至る。インスリン イコデクは、典型的な用量依存性を示しながら、IR 及び PKB のリン酸化を刺激することが明らかにされており、インスリン イコデクが、*in vitro* の効力は弱いものの、天然型 HI と同じシグナル伝達イベントを刺激することが示されている。インスリン イコデクは、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のシグナル伝達に関し、HI と同じ経路を活性化することが認められており、これらの知見から、インスリン イコデクが生物学的反応を誘発する分子機序は HI と同じであることが示されている。

***In vitro* 代謝及び細胞増殖誘発作用**

インスリンは多様な器官に作用する多機能性ホルモンであり、糖代謝及び脂質代謝に全体的な影響を及ぼす一連の生理学的反応を刺激する。このことから、同様にインスリン イコデクの生物学的特性も、多くの様々な細胞種類及び反応に関与する。さらに、インスリンは増殖促進作用をもつことが知られていることから、インスリン イコデクの細胞増殖誘発反応を検討し、結果を本項に報告する。このように、インスリン イコデクの代謝及び細胞増殖誘発反応は比較的容易に HI と比較可能であった。

全般的にインスリン イコデクは HI と同じ生物学的反応を示すが、*in vitro* の効力は相対的に弱い（表 2.4-3）。この点は、代謝及び細胞増殖誘発への効力を検討する両アッセイで認められ、インスリン イコデクの低い IR 親和性と合致する。絶対値は、個々のアッセイで用いられる細胞の種類及びアルブミン量により異なる。一般に、代謝に対する効力の範囲は、細胞増殖誘発に対する効力の範囲とほぼ同様であり、インスリン イコデクの代謝作用と細胞増殖誘発作用のバランスは維持され、HI と変わらないことが示されている。

表 2.4-3　　インスリン イコデクの代謝及び細胞増殖誘発の効力

Assay	Albumin (%)	Endpoint	Potency relative to HI (%)	Range (%)
Metabolic potency				
Rat adipocytes	0.1	Lipogenesis	0.03	0.03 – 4.4
Human adipocytes	1	Glucose uptake	0.06	
Rat hepatocytes	0	Glycogen accumulation	4.4	
Rat hepatocytes	0.1	Glycogen accumulation	0.34	
L6-hIR	0.1	Glycogen synthesis	0.52	
MCF-7	0.1	Glycogen synthesis	0.26	
Mitogenic potency				
HMEC	0	DNA synthesis	0.2	0.2 – 2.0
COLO-205*	0	DNA synthesis	2.0	
L6-hIR*	0	DNA synthesis	0.6	
MCF-7*	0	DNA synthesis	0.5	

* HSA is not included but 0.1% Foetal Calf Serum/Foetal Bovine Serum in the culture medium of L6-hIR, MCF-7 and COLO-205 cells in the studies on mitogenic potency.

2.4.2.2.2　*In vivo* 薬理試験

In vivo 薬理試験では、インスリン イコデクにより引き起こされる代謝反応を動物で実証することが主な目的であった。インスリン抵抗性ラットを用いた効力を裏付ける試験ならびに正常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から、インスリン イコデクの血糖降下作用が実証され、インスリン イコデクは HI の薬理作用を維持していることが示されている。インスリン イコデク皮下投与後の *in vivo* の効力は、糖尿病ラットならびに正常血糖のイヌ及びブタで検討された。Zucker Diabetic Fatty（ZDF）ラットでは、ヘモグロビン A1c（HbA1c）降下作用に基づき、インスリン イコデクの効力は HI（NPH インスリンとして投与）と比較して 40～50%であった。しかし、ビーグル犬及びランドレース・ヨークシャー・デュロック種（LYD）のブタでは、高インスリン正常血糖クランプ試験のグルコース注入速度に基づき、インスリン イコデクの効力はインスリン グラルギンと比較して約 2 倍であった。一方で、有効性及び安全性に関する第 3 相検証的試験のデータ（臨床薬理試験におけるモデリングで裏付けられている）では、ヒトにおけるインスリン イコデクの効力は 1 日 1 回投与の Basal インスリンと同等であることが実証されている（M 2.5）。

2.4.2.3　副次的薬理試験

広範囲の受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを含む 67 種類の標的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平均最高血漿中濃度（C_{max}）の 49 倍）で、2 種類の標的分子〔γ-アミノ酪酸（GABA）$_A$ 受容体（ムシモール結合部位）及び甲状腺ホルモン受容体〕に対して、対照の放射性リガンド結合を有意に（50%以上）阻害した。しかし、機能試験によるフォローアップで $GABA_A$ 受容体に関する作用は認められず、*in vivo* 安全性薬理試験又は毒性

試験でも GABA 作動性又は甲状腺ホルモン関連の作用のエビデンスはなく、上記の 2 種類の標的分子で観察された *in vitro* 阻害作用に機能的な影響はなく、臨床的意義はないと考えられる。

2.4.2.4　安全性薬理試験

中枢神経系（CNS）、心血管（CV）系及び呼吸器系への潜在的な影響に関する *in vivo* 安全性薬理試験において、インスリン イコデクの忍容性は良好であり、ラットでは検討した最高用量 150 nmol/kg（臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} の 3.2 倍）、イヌでは最高用量 21 nmol/kg（臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} 未満）まで、毒性所見は観察されなかった。これらを超える用量での試験は低血糖が発現するため実施できなかった。

心臓の催不整脈リスクを評価する *in vitro* 試験として、HEK-293 細胞の hERG 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。10 µmol/L の濃度（臨床試験における日本人患者の平均 C_{max} の 49 倍）では、IKr（hERG チャネル）電流の弱い阻害が認められた。しかし、ウサギプルキンエ線維の活動電位パラメータならびにイヌの単回及び反復投与試験からは、*in vivo* QT 間隔に対する影響は認められず、全体として、hERG チャネル遮断に伴い生じるヒトの QT 間隔延長リスクは特定されなかった。

2.4.3　薬物動態試験

インスリン イコデクの薬物動態を評価するために各種試験を実施した（表 2.4-4）。一部の ADME 試験では、C_{20} 脂肪酸部分又はリンカーの Ado-Ado 部位（図 2.4-1）をトリチウム（^{3}H）で放射能標識したインスリン イコデクを使用した。

表 2.4-4　　薬物動態試験の概要

Study type	Administration	Species
Pharmacokinetic		
Single dose	s.c. and i.v.	rat, dog, pig
Toxicokinetic		
DRF/MTD, 8- , 26- and 52-week[a]	s.c.	rat, dog
Combined fertility and embryo-foetal development	s.c.	rat
Pre-and post-natal development	s.c.	rat
Embryo-foetal development	s.c.	rabbit
Distribution		
QWBA	s.c.	rat
Protein binding	*in vitro*	mouse, rat, rabbit, dog, pig, human
Metabolism		
Hepatocytes	*in vitro*	mouse, rat, rabbit, dog, human
Insulin degrading enzyme	*in vitro*	human
Metabolite identification (plasma, urine[b])	s.c.	rat, dog, human
Excretion		
Urine, bile[a], faeces	s.c.	rat, dog

a: rat only, b: dog only

これらの試験から、皮下投与後すべての動物種でインスリン イコデクの望ましい長い血漿中半減期が確認された。インスリン イコデクの皮下投与後のバイオアベイラビリティは高く、すべての動物種で血漿アルブミン結合率が高かったことから（99%超）、アルブミン結合が長い半減期への重要な寄与因子であることが裏付けられた。インスリン イコデクは、ペプチド骨格のタンパク質分解による切断及び脂肪酸側鎖の一連のβ酸化により代謝される。試験は、非臨床安全性プログラムで用いた動物種で実施した。薬物動態パラメータの概要を表 2.4-5 に示す。すべての非臨床の動物種及びヒトにおいて薬物動態の線形性が示されたことから、表中の全身曝露データは用量補正時のものを示している。

表 2.4-5　　インスリン イコデクの反復皮下投与時又は単回静脈内投与時における用量補正（1 nmol/kg）後の平均薬物動態パラメータの種間比較

Species	s.c. administration (steady-state)					i.v. administration (single dose)		
	C_{max} (nmol/L)	t_{max} (h)	AUC_{0-168h} (h×nmol/L)	F (%)	$t_{½}$ (h)	$t_{½}$ (h)	CL (L/h/kg)	V_z (L/kg)
Rat[a]	14.4	2-8	1,949	>100	28	26	0.0043	0.16
Rabbit[b]	20.2	4-8	3,013	-	25	-	-	-
Dog[c]	12.6	3-24	1,608	64	61	60	0.00089	0.078
Pig[d]	-	-	-	56-104	45	43	0.0017	0.10
Human[e]	17.5	16	2,061	-	173	-	-	-

Data given as “Mean” (t_{max} range) of male and female.
a – Study ID: s.c.: 210458 (DRF 4-week), 211239 (8-week), 213297 (26-week*), 319122 (52-week*), AUC_{0-168h} = 7×AUC_{0-24h}, [redacted]100301**, i.v.: [redacted]100102**. The general t_{max} was in the 2-8 h range, leaving out a few t_{max} = 0 h and 24 h observations
b – Study ID: s.c.: 213152 (Single Dose), 213337 (2-week), 213525 (Prelim. Repro), 214091(Main Repro), AUC_{0-168h} = 7×AUC_{0-24h}.
c – Study ID: s.c.: 211240 (8-week, For each individual dog AUC_{0-168h} = 7×AUC_{0-24h}), 213222 (26-week, *For each individual dog AUC_{0-168h} = 7/4×AUC_{0-96h}), [redacted]091001**, i.v.:[redacted]090506**
d – Study ID: s.c.:[redacted]100201**,[redacted]110501**,[redacted]100902,[redacted]101101**,[redacted]160103, i.v.: [redacted]100201**,[redacted]110501**
e – Trial NN1436-4314 and Clinical Pharmacology Summary (M 2.7.2)
* – Only AUC’s from the last week in the study was used for calculation of the mean. **- Single dose.

2.4.3.1　分析法

開発期間中、動物及びヒトから採取した検体における血漿中又は血清中インスリン イコデク濃度は、バリデーション済みの蛍光酸素チャネリング免疫測定法（LOCI 法；AlphaLISA®法とも呼ばれる）により測定した。この測定法では 2 種類の抗体、すなわち、HI の A 鎖の中央部分を認識する抗体及びインスリン イコデクの His^{B25} 置換を認識する抗体を用い、血漿中／血清中の総インスリン イコデク（すなわち、非結合型インスリン イコデク及びアルブミン結合型インスリン イコデクの両者）を測定する。

抗インスリン イコデク抗体の産生については、動物を用いた 8 週間及び 26 週間毒性試験ならびにヒトを対象とした様々な臨床試験において、[^{125}I]標識インスリン イコデクを用い、バリデーション済みのラジオイムノアッセイ（RIA）でモニターした。動物試験の結果は 2.4.4.6.1 項に記載し、ヒトにおける結果は個々の治験総括報告書に報告する。

2.4.3.2　吸収

インスリン イコデクの薬物動態は、ラット、ウサギ（皮下投与のみ）、イヌ及びブタに皮下投与後及び静脈内投与後に評価した。反復投与後、終末相半減期（$t_{1/2}$）及び使用した投与間隔と合致する蓄積が観察された。ラット、ウサギ及びイヌにおいて、C_{max} 及び血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC）

は雌雄の両者で概ね用量に比例して増加し、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）及び $t_{1/2}$ は用量、投与期間及び投与頻度に無関係であった。

静脈内投与後及び皮下投与後の薬物動態プロファイル及びパラメータ推定値を比較したところ、薬物動態にみられる持続化の主要な機序は、血漿コンパートメントからの緩徐なクリアランスと考えられる。この点は、インスリン デグルデク、インスリン デテミル及びインスリン グラルギンといった他の Basal インスリンアナログとは対照的であり、これらはいずれも皮下組織内に貯蔵体を形成し、そこからインスリンアナログが緩徐に吸収される[14]。静脈内投与後の $t_{1/2}$ の平均値は、ラット、イヌ及びブタで 26～60 時間であった。この値は、ラット、イヌ及びブタにおける HI の静脈内投与後の $t_{1/2}$ が 15 分未満[15]であることと比較すると著しく延長されており、インスリン イコデクを創出するために施された HI 骨格の修飾が、期待通りに薬物動態を根本的に変化させたことを示している。

2.4.3.3 分布

[^{3}H]標識インスリン イコデクの皮下投与後の分布をラットで検討した。放射能は血中の血漿コンパートメントへと分布し、これよりも低い割合で他の組織にも分布した。CNS 組織（脳及び脊髄）の曝露レベルは最も低く、血中曝露量の約 1～2%に相当し、血液脳関門の透過はないか又は少ないことが示唆される。腎皮質のような血管の多い組織でのみ、血中と同様の曝露レベルが認められた。この知見は、検討したすべての種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）で観察された高い血漿中タンパク質結合率（99%超）、また、アルブミンが血漿中の主な結合タンパク質であることと合致している。

2.4.3.4 代謝

ラット、イヌ及びヒトに皮下投与後のインスリン イコデクの代謝は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）と放射能検出器（HPLC-RAD）又は質量分析法（LC-MS）を組み合わせて検討した。

インスリン イコデクの未変化体がラット、イヌ及びヒトの循環血中における主たる成分であった。イヌ及びヒトの循環血中ではインスリン イコデク由来代謝物 4 種類が特定され、このうち量の多い 3 種類はラット血漿中でも認められた。これらの代謝物を定量し、ラット及びイヌの毒性試験でヒト代謝物の全身曝露を確認した。血漿中代謝物の特徴として、ジスルフィド結合の還元後に B 鎖がタンパク質分解により切断されており、未変化の脂肪酸側鎖がみられた（図 2.4-2）。ヒト循環血中の主代謝物である $B^{1\text{-}29}$-(C_{20})は、インスリン イコデク関連物質の総曝露量の 11%であった。

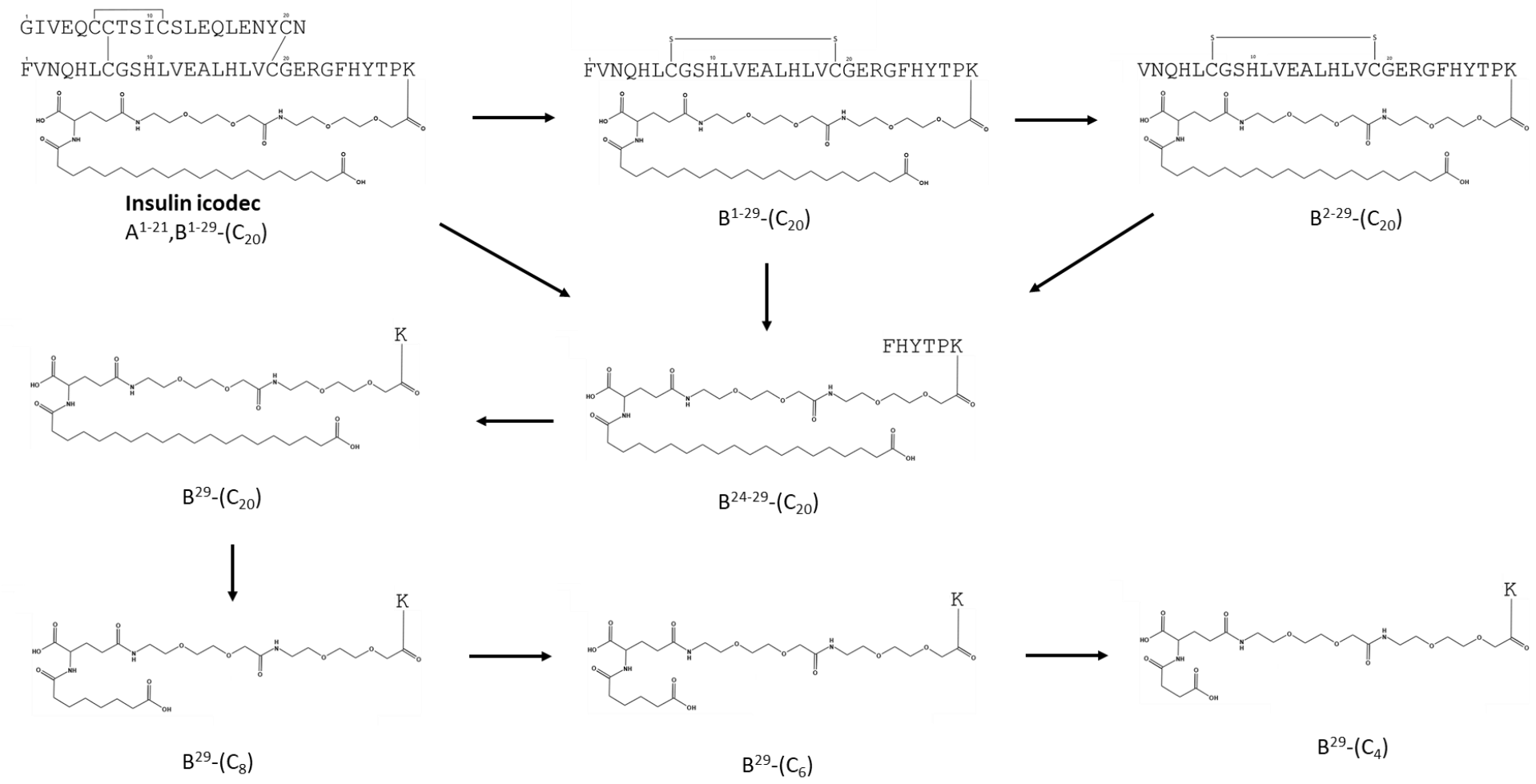
A 鎖が切断された代謝物の構造に基づくと、インスリンの A 鎖及びそのジスルフィド架橋が IR 結合に重要な役割を果たすことから、循環血中の代謝物は IR に結合しない[16,17]。これらの代謝物は薬理学的に不活性であり、また、インスリン イコデクの安全性試験における有害作用は過剰な薬理作用を主な原因としているため、これらの代謝物による有害作用のリスクは極めて低い。

ラットでは、尿中、糞中及び胆汁中にそれぞれ 11、9 及び 13 種類の代謝物ピークが検出され、最大ピークは投与量の 7%であり、一方、イヌの尿中では 15 種類、糞中では 17 種類の代謝物が検出された。

イヌ尿中における量の多い 3 種類の代謝物の特徴として、完全なタンパク質分解による切断及び C_{20} 脂肪酸部分の広範な β 酸化による生成物であり、脂肪酸部分の残留炭素原子がそれぞれ 8、6 及び 4 個の B^{29}-(C^8)、B^{29}-(C^6)及び B^{29}-(C^4)として構造的に特定された（図 2.4-2）。ヒトにおいて、脂肪酸側鎖誘導体（Ado-Ado-γGlu をリンカーとした Lys^{B29} に結合する C_{20} 脂肪酸）の同じ代謝及び排泄経路が確認されており、この経路がイヌ及びヒトにおける脂肪酸側鎖誘導体の共通の代謝及び排泄経路であることが裏付けられている[18]。イヌの尿中では、投与量のうち少量がインスリン イコデク未変化体として排泄され、ヒトの尿中では、検出可能レベルのインスリン イコデクが認められたのはごく一部の被験者のみであった。

排泄物中の代謝物の数が多いこと及び同定された尿中の主要代謝物の構造から、インスリン イコデクがタンパク質分解及びこれに続く脂肪酸部分の β 酸化を介して広範に分解され、その後、残る代謝物フラグメントが排泄されることが確認された。

図 2.4-2　　ラット、イヌ及びヒトにおけるインスリン イコデクの代謝経路



In addition to the principal metabolites shown above, isomers of insulin icodec and deamidation products were detected and characterised in plasma as minor metabolites.
The metabolites were named by their amino acid sequence and length of fatty acid moiety. Plasma metabolites: B^{1-29}-(C_{20}) identified in rat, dog, human, B^{2-29}-(C_{20}) in dog, human, B^{24-29}-(C_{20}) in rat, dog, human, B^{29}-(C_{20}) in rat, dog, human. Urine metabolites: B^{29}-(C_8), B^{29}-(C_6) and B^{29}-(C_4) in dog (only urine from dogs was analysed

2.4.3.5 排泄

ラット及びイヌにおいて尿中、胆汁中（ラットのみ）及び糞中への放射能の排泄を検討したところ（表 2.4-6）、薬物関連物質は尿及び胆汁／糞の経路を介してほぼ均等に排泄されることが示された。

表 2.4-6　　ラット及びイヌにおける[^{3}H]標識インスリン イコデク関連放射能の蓄積排泄率

Species	Sampling	Cumulative excretion (% of administered dose)					
		Urine	Faeces	Expired air	Carcass	Bile	Total
Rat	0 – 168 h	21.7	31.0	<1.0[a]	39.0	-	95.1
Rat (BDC)	0 – 48 h	9.7	4.0	-	79.5	10.0	105
Dog	0 – 336 h	44.0	26.7	-	6.7	-	80.8

BDC: Bile duct cannulated. a - collected 0-24 h

2.4.3.6 薬物相互作用

非臨床試験においてインスリン イコデクによる薬物相互作用の可能性は低いことが示された。

ラットに対するインスリン イコデク投与後、チトクローム P450（CYP）の各酵素の発現に対する影響はないかわずか（2 倍以下の誘導）であった。

血漿タンパク結合試験では、検討したすべての種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）においてインスリン イコデクは 99%超の高い結合率でタンパク結合することが示された。血清中アルブミン濃度（約 0.6 mmol/L 又は 600,000 nmol/L）はヒト血清中インスリン イコデク濃度（C_{max} 205 nmol/L）と比較して高く、アルブミンに結合したインスリン イコデクが他の薬物により競合的に置換されることは極めて考えにくい。すなわち、アルブミン濃度はインスリン イコデク濃度より 2,000 倍超高いこととなる。これに加え、各アルブミン分子には脂肪酸結合部位が複数（7 箇所）存在し、これによりアルブミンの結合能はさらに高まっている[19]。

2.4.4　毒性試験

インスリン イコデクの毒性試験プログラムは、ICH M3(R2)、ICH S6(R1)、ICH S5(R3)の各ガイドライン及び EMA ガイダンス「Points to consider document on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin analogues」に従って計画された[4,5,6,9]。毒性試験の概要を表 2.4-7 に示す。

すべての重要な毒性試験は、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、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。

表 2.4-7　　毒性試験の概要

Study type and duration	Route of administration	Species
Repeat-dose toxicity		
DRF/MTD	s.c.	Rat and dog
8 weeks with 6 weeks recovery	s.c.	Rat and dog
26 weeks with 12 weeks recovery	s.c.	Rat and dog
52 week including carcinogenicity assessment	s.c.	Rat
Reproductive and developmental toxicity studies		
Combined fertility and embryo-foetal development	s.c.	Rat
Embryo-foetal development	s.c.	Rabbit
Pre- and post-natal development	s.c.	Rat
Local tolerance		
Single dose	i.v.	Rabbit
Single and repeat dosing	s.c.	Pig/Minipig

Sprague-Dawley 系ラット及びビーグル犬は、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、安全性試験に最適な種であると考えられた。受胎能及び出生前・出生後の発生に関する試験には Sprague-Dawley 系ラット、胚・胎児発生に関する試験には Sprague-Dawley 系ラット及びニュージーランド白色種ウサギを用いて評価した。静脈内投与後又は皮下投与後の局所刺激性はニュージーランド白色種ウサギ、LYD ブタ及びゲッチンゲンミニブタを用いて評価した。すべての毒性試験において、投与経路は臨床での予定投与経路である皮下投与とした。血漿中半減期の違いを反映し、ラット及びウサギには 1 日 1 回投与、イヌには週 2 回投与を行った（表 2.4-5）。

すべての重要な反復投与毒性試験及び生殖毒性試験においてトキシコキネティクスの評価を行い、ヒト曝露量に対する曝露量比を推定した。

正常血糖値を有する正常動物にインスリンを投与すると、血糖値は正常な生理学的範囲を下回るレベルまで低下する。血糖降下作用の程度及び持続時間に応じて、低血糖様の一般状態変化やその後の影響（摂餌量増加、臨床化学における代謝の変化、器官の変化、さらには低血糖関連の死亡等）がみられる可能性がある。正常血糖を有する動物に投与した場合のこれらの影響は、インスリン特有の薬理作用による結果であり、毒性ではなく目的とする薬理作用又は過剰な薬理作用に起因する所見と考えられる。したがって、無毒性量（NOAEL）は、目的とする薬理作用又は過剰な薬理作用に起因するもの又はこれに関連する作用以外の有害作用が認められなかった用量を無毒性量（NOAEL）とみなす。この考え方は、動物に対する有害作用がみられない用量を NOAEL とみなし、本来の血糖降下作用を考慮しない、一部の試験報告書で用いられているアプローチとは対照的である。

2.4.4.1 一般毒性

反復投与毒性試験では、正常血糖値を有する正常ラット及び正常イヌに投与した場合、投与に関連した変化は、いずれもインスリン イコデクの目的とする薬理作用によるものであるか、又は薬理作用により正常範囲を下回る低血糖が生じたことによるものであった。

ラットでは、低血糖に関連した死亡が 60 nmol/kg/日以上の雄及び 40 nmol/kg/日以上の雌で認められた。この所見と合致して、反復投与後の血糖降下作用は雄よりも雌でより顕著であった。この差は、HI の持続注入時にも観察されており[20]、肝糖放出といった代償性適応反応の性差に関連すると考えられる[21,22]。ラットを用いた 52 週間の試験では、HI が参照物質として用いられ、低血糖に関連した一般状態変化及び死亡が 40 nmol/kg/日の雄及び雌で認められた。

体重増加量、摂餌量、血漿中の尿素及びナトリウム濃度の高値とトリグリセリド濃度の低値が、30 nmol/kg/日以上の雌及び 60 nmol/kg/日以上の雄で認められた。52 週間投与後、クレアチニン濃度の高値が 30 nmol/kg/日以上の雌で認められ、リン及びマグネシウム濃度の高値が 40 nmol/kg/日以上の雄で認められた。これらの変化は、インスリンの血糖降下作用に対する代償性作用と合致すると考えられ[23,24,25,26]、完全な可逆性を示した。これに相当する変化が HI 持続注入後[20]及び／又はラットの 52 週間試験の投与後に観察された。

インスリン イコデクの目的とする血糖降下作用又はそれに続く作用に関連すると考えられる病理組織学的変化が、膵臓、座骨神経／脛骨神経及び／又は骨格筋、副腎、肝臓、褐色脂肪、骨髄、心筋、精巣で認められた。これに相当する変化が HI の 8 週間の持続投与後又は HI の 52 週間の反復投与後に認められた。

膵臓では、ラットを用いたすべての試験で膵島の萎縮が観察された。この変化は、低血糖の結果としての内因性インスリン産生の分泌低下に起因すると考えられ、HI の持続注入後にも観察されている[20,24,26,27]。この所見と一致して、投与中は C-ペプチド産生が減少した。

座骨／脛骨神経では、神経病変（脱神経）自体によるものと考えられる骨格筋の変性／壊死又は委縮を伴う軸索変性が認められた。これらの変化は HI 持続注入後及び HI 反復投与後にも認められ、他の論文で報告されているように、誘発された持続性低血糖に関連すると考えられる[20,28,29,30,31]。

肝臓では、40 nmol/kg/日以上を投与した雌で投与後 26 週間まで染色希薄化の減少が認められた。これはグリコーゲン量の減少、すなわち、インスリンの血糖降下作用に対するグリコーゲン分解の亢進を反映しているものと考えられ、肝臓重量の減少はこれにより説明される[32,33]。

褐色脂肪では、26 週間までの投与期間におけるインスリン イコデクの全用量群と、40 nmol/kg/日以上を 52 週間投与された雄において、空胞化の増加とこれによる細胞サイズの肥大が観察された。この所見は、脂肪細胞によるブドウ糖取り込み及び脂肪貯蔵を増加させるインスリンの脂肪細胞に対する代謝作用に起因すると考えられ[34,35,36]、これに一致して、この変化は HI 持続注入後にも認められた[20]。

上記の変化はいずれも、投与の中止により完全又は部分的な可逆性を示した。

心臓では、雌雄において 20 nmol/kg/日以上を 52 週間投与後、心筋線維症が観察された。この所見は、HI を投与した雌でも認められ、他の論文で報告されているように、インスリンの血糖降下作用に関連すると考えられる[37]。

精巣では、60 nmol/kg/日を 52 週間投与した雄で精細管変性／委縮がみられた。同様の変化は、HI を投与した雄でみられた。ラットでは精巣の変化は低血糖との関連が示されており[38,39]、したがって、インスリンの血糖降下作用に関連すると考えられる。

イヌを用いた試験でも、変化はいずれもインスリン イコデクの目的とする血糖降下作用又はそれに続く作用に関連すると考えられた。これらの変化として、8 週間投与後には低血糖の一般状態変化、血糖値及び内因性インスリン濃度の低下、体重増加及び食餌残量の減少、26 週間投与後には肝臓の絶対重量及び相対重量の減少がみられた。これらの変化は 12/9 nmol/kg 以上の週 2 回投与で認められ、完全な回復がみられた。インスリン イコデク投与と関連する病理組織学的変化は特定されなかった。

結論として、正常血糖値を有する正常ラット及び正常イヌを用いた反復投与試験から、インスリン イコデクの薬理作用又はそれに続く作用による、正常な生理学的範囲を下回る血糖値低下に起因する変化が明らかとなった。これに相当する変化は、HI の持続注入又は反復投与により誘発可能であり、文献でも報告されている。したがって、非臨床試験プログラムではインスリン イコデクに関連する特有の変化は特定されなかった。

2.4.4.2 遺伝毒性

ICH S6(R1)ガイドライン[5]に従うと、インスリン イコデクはバイオテクノロジー応用医薬品であり、一般に遺伝毒性試験の適用対象とはみなされない。これにより、標準的な遺伝毒性試験は実施していない。しかし、インスリン イコデクは天然のアミノ酸に加え、Lys^{B29} 部位に結合した C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体をもつことから（図 2.4-1）、この部分について *in silico* で知識ベース（DEREK Nexus®）及び統計ベース（Leadscope®）の（定量的）構造活性相関〔（Q）SAR〕解析を実施して評価した。その結果、がん原性、染色体損傷、遺伝毒性又は変異原性のアラートは特定されなかった。さらに、Ames 試験によるスクリーニングにおいて、インスリン イコデクはラット肝代謝活性化系（S9）の非存在下及び存在下で 5 種類の *Salmonella typhimurium* 株に変異を誘発しなかった。全体として、インスリン イコデクの遺伝毒性は認められなかった。

2.4.4.3 がん原性

インスリン イコデクのようなバイオテクノロジー応用医薬品は、標準的な 2 年間のがん原性試験は一般に不適当と考えられる〔ICH S6(R1)〕[5]。インスリンはグルコース、タンパク質及び脂質の代謝調節に主に関与する、複数のよく知られた作用をもつホルモンであるが、既知の細胞増殖誘発能も伴う。このことから、「Points to Consider Document on Assessment of the Carcinogenic Potential of Insulin Analogues」[9]で推奨されているように、インスリン イコデクと HI の作用を比較する包括的な *in vitro* 試験を実施した。インスリン イコデクの *in vivo* のがん原性は、ラット及びイヌを用いたすべての重要な

反復投与毒性試験において、過形成変化の評価結果に基づいて判定し、Sprague-Dawley 系ラットを用いた 52 週間の毒性試験では、がん原性に焦点を当てて詳細な検討を行った。

インスリン イコデクの *in vitro* の特性評価では、IR 及び IGF-1R の両者への結合、下流シグナル伝達、主要なインスリン標的組織での代謝作用、腫瘍性及び非腫瘍性細胞種における細胞増殖誘発作用を検討している（2.4.2.2.1）。この評価において、インスリン イコデクの分子薬理学的プロファイルは HI と同様であり、懸念は生じなかった。さらに、インスリン イコデクの細胞増殖誘発能／代謝能の効力比は HI と同様であり（表 2.4-3）、細胞増殖誘発リスクの上昇はみられず、インスリン イコデクの主な生物学的作用間のバランスは HI と変わらないことが示唆される。

Sprague-Dawley 系ラットを用いた 52 週間の毒性試験において、全動物を対象とした完全な病理組織学的評価に基づき、インスリン イコデクはがん原性を示さなかった。細胞増殖誘発リスクの上昇に関する *in vivo* マーカーとして、雌の乳腺腫瘍の発現率の変化に特に注目した。52 週間の試験において、インスリン イコデク投与動物を HI 投与動物又は対照動物と比較した場合、乳腺腫瘍の発現率に変化はみられなかった（表 2.4-8）。

表 2.4-8　　ラットを用いた 52 週間の試験における雌の乳腺腫瘍の発現率

Treatment	**Control**		**Insulin icodec**		**Human insulin**
Dose (nmol/kg/day)	0	20	30	40	40
Number of animals examined	48	40	40	48	48
Animal affected (%)					
- Adenocarcinoma	27	30	25	25	29
- Carcinoma, Adenosquamous	2.1	0	0	0	0
- Adenoma	6.3	2.5	15	0	2.1
- Fibroadenoma	15	15	13	19	17
Tumour bearing animals (%)	44	43	43	42	44

また、非臨床 *in vivo* 試験プログラム全体の評価から、最長 52 週間投与したラット及び最長 26 週間投与したイヌにおいて、過形成性病変又は腫瘍性病変の発現にインスリン イコデク投与関連の変化は認められなかった。

結論として、インスリン イコデクのがん原性に関する広範な *in vitro* 及び *in vivo* 試験のいずれにおいても、インスリン イコデクのがん原性は HI と同様であることが示された。

2.4.4.4　生殖毒性

インスリン イコデクの生殖発生毒性は、ICH S5(R3)ガイドライン[6]に従い、ラットを用いた受胎能、胚・胎児発生、出生前及び出生後の発生に関する試験及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験で検討した。

2.4.4.4.1　受胎能及び胚・胎児発生

ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験では、インスリン イコデクの投与により、目的とする薬理作用又はそれに続く作用と合致すると考えられる、血糖値の低下、体重増加促進及び摂餌量の増加等の所見が交配前の雌雄で認められた。母動物に毒性の徴候は認められず、受胎能、着床前又は着床後の胚損失、胎盤重量、胎児体重及び性比に対する影響もみられなかった。また、インスリン イコデク投与と関連する内臓又は骨格の高度及び軽度の異常も認められなかった。

ウサギを用いた胚・胎児発生試験では、インスリン イコデクの投与により、低血糖の一般状態変化及び血糖値低下（これにより数匹を安楽死処置した）、摂餌量の増加など、インスリン イコデクの目的とする薬理作用又はそれに続く作用と合致すると考えられる所見が認められた。

妊娠 21 日目及び 22 日目に動物 2 匹で流産がみられた。流産の前には、両動物で摂餌量が減少し、1 匹では血糖値も低下した。これらの流産は投与による母動物の代謝変化に関連すると考えられるが、母体の代謝ストレスの増加に加えて胎児が急速に成長する妊娠時点では、投与を中止した場合にも生じる[40]。この裏付けとして、他のインスリン製剤〔例えば、インスリン アスパルト、インスリン デテミル及び HI（NPH インスリン）〕をウサギに投与した場合にも、同じ妊娠時点で高用量投与時に流産がみられている[41,42]。

体重増加量、妊娠子宮重量、平均黄体数、着床、着床前及び着床後の胚損失、吸収胚、生存児、性比、胎盤重量及び胎児重量に、インスリン イコデク投与の影響はみられなかった。対照群と比較して、18 及び 12 nmol/kg/日（高用量及び中用量）では、20 本胸腰椎体ならびに複数の胸椎及び肋骨の異常がわずかに高い頻度で認められ、18 nmol/kg/日では、片側後肢帯の尾方移動がわずかに高い頻度で認められた。これらの所見は過去の背景データの範囲内であり、偶発的な所見と考えられる。6 nmol/kg/日（低用量）では、胎児 1 匹に髄膜瘤がみられた。インスリン イコデク投与群にその他の頭部異常は認められず、偶発的な所見と考えられた。全体として、インスリン イコデクの投与に関連した重大／軽微な胎児の内臓異常又は骨格異常は認められなかった。

結論として、これらの試験では、インスリン イコデクの投与に関連した重大／軽微な胎児の内臓異常又は骨格異常は特定されなかった。

2.4.4.4.2　出生前及び出生後の発生

出生前及び出生後の発生に関する試験はラットを用いて実施した。低用量及び中用量（20 及び 35 nmol/kg/日）において、インスリン イコデクの投与と関連すると考えられる変化は、対照群と比較した血糖値の低値及び授乳期間中のわずかな体重増加抑制のみであった。変化は限定的で、F0 の雌又は出生ラットの毒性徴候と関連しなかったことから、いずれの影響も毒性ではないと考えられた。高用量（50 nmol/kg/日）では F0 の雌 4 匹が死亡した。2 匹は分娩中又は授乳開始時に死亡し、これらは過去の背景データの範囲内と考えられる。残りの 2 匹は授乳期間後期に安楽死処置が行われ、1 匹は全出生児死亡、もう 1 匹は重度の低血糖様の一般状態変化を原因としたが、いずれのエピソードも通常

みられるものではなく、インスリン イコデクの投与と関連すると考えられた。血糖値は全投与群で低かったが、最も顕著であったのは 50 nmol/kg/日であった。

授乳 14 日目までの生存出生児数、性比及び同腹児数には、インスリン イコデクの投与による影響はみられなかった。しかし、授乳 15～18 日目の 50 nmol/kg/日群において出生ラット 25 匹に動物福祉を理由とした安楽死処置が行われ、また 4 匹の死亡が認められた。安楽死処置されたラットの大部分には、活動性低下、振戦、筋緊張低下、部分的閉瞼、失調性歩行異常など、低血糖様の一般状態変化がみられ、いずれも、授乳期間後期に対照動物と比較して有意な体重減少がみられた F0 雌ラットからの出生児であった。

乳汁を介したインスリン イコデクの曝露が、低血糖様の一般状態変化を発現させる可能性は極めて低いと考えられ、これは、曝露が確認された出生ラットが 2 匹のみ（母動物の用量が 35 nmol/kg/日及び 50 nmol/kg/日の各 1 匹で軽度の曝露が認められた）であったことからも裏付けられる。一方、影響が認められた出生ラットを出産した F0 雌ラットの体重減少により栄養不良に至ったと考えられ、これは、出生ラットの体重増加抑制、胃内の乳汁不足及び血糖値の低値からも裏付けられている。この授乳不良が、出生ラットで観察された一般状態変化及び死亡を引き起こしたものと推測される。

全用量において、任意抽出した出生ラットの離乳前の反射及び肉眼所見に、インスリン イコデク投与による影響は認められず、生存、発育、身体的及び反射学的発達、行動、生殖行動を含む F1 の発生に対し、母動物への以前の投与は影響しなかった。

結論として、35 nmol/kg/日以下の用量では、F0 又は F1 に投与関連の有害な変化はみられなかった。50 nmol/kg/日の用量では、F0 の雌 6 匹において授乳期間後期に有意な体重減少がみられ、これにより出生ラットへの授乳が不足し、結果として一般状態変化及び死亡が認められた。さらに 50 nmol/kg/日を投与した F0 の雌 1 匹が低血糖様の一般状態変化を示し、安楽死処置に至った。インスリン療法では全般的に、また妊娠期間中及び授乳期間中は特に、血糖値／低血糖には幅広い注意が向けられることから、正常血糖を有する動物で観察されたこれらの所見の臨床的な意義は限定的であると考えられる。

2.4.4.5 局所刺激性

ラット及びイヌへの反復投与後、皮下注射部位にみられた局所反応は、対照群とインスリン イコデク投与時で同様であった。ミニブタでは、局所刺激性の検討を目的とした試験で、上市予定の臨床製剤を評価した。組織反応の特徴として、軽度かつ許容可能な炎症性変化がみられ、インスリン イコデク投与と溶媒投与を比較した場合に反応の差はなく、滅菌等張食塩液の投与との比較でわずかな反応の差のみが認められた。

2.4.4.6 その他の毒性試験

2.4.4.6.1 免疫原性

インスリン イコデクに対する抗体の産生について、ラット及びイヌを用いた 8 週間及び 26 週間の反復投与試験で測定した。8 週間の試験では投与終了時に 67～77%の動物がインスリン イコデクに対する抗体を保有し、26 週間の試験では 8～22%の動物がインスリン イコデクに対する抗体を保有した。投与終了時及び回復期間中の抗体陽性動物の発現率は同様であり、抗体の測定結果から検体中のインスリン イコデクの存在が影響しなかったことが示された。インスリン イコデクの血糖降下作用及び曝露の程度に関する評価に基づくと、数匹の動物による検討において、中和作用の可能性を完全には否定できなかった。しかし、大多数の動物では予期された血糖降下作用が認められたことから、抗体産生は試験成績に影響しなかったと考えられた。

2.4.4.6.2 添加物の評価

上市予定のインスリン イコデク製剤は安定化剤として亜鉛（酢酸亜鉛中の亜鉛含有量として）、防腐剤としてフェノール（安定化剤及び防腐剤として）及びメタクレゾールを含有し、等張化剤としてグリセロール／グリセリン及び塩化ナトリウムが添加される（M 3.2.P.2.1）。

これらの添加物は、長期皮下投与を目的とした他の既承認医薬品でよく知られており、日本薬局方及び医薬品添加物規格に収載されている。インスリン イコデクの予定されている臨床投与レジメンにおいて、添加剤の量は酢酸亜鉛を除き、これまでに市販されている製剤投与しても添加物の量が超えることはない。酢酸亜鉛は皮下投与製剤において使用前例を超える含量であったが、インスリン イコデクの目的とする血糖降下作用に関連する変化以外には、インスリン イコデクの製剤処方に起因する全身毒性の徴候は認められなかった。したがって、添加物に毒性のリスクはないと結論する。

2.4.4.6.3 不純物及び溶出物の評価

不純物

ラットを用いた 26 週間毒性試験（213297 試験）で確認した不純物レベルに基づいて、非臨床試験で検討された目的物質関連物質及び目的物質由来不純物のレベルと申請する製剤規格を比較した。ラットへの NOAEL 投与時における 4 つの不純物、すなわち（i）親水性不純物、（ii）親水性関連物質、（iii）疎水性関連物質、（iv）疎水性不純物及び高分子量タンパク質（HMWP）のレベルを、申請する規格限度値におけるヒトでの潜在的な不純物量と比較した（M 3.2.P.5.1）。

4 つの不純物群は、申請する限度値として臨床曝露量の 10～34 倍で検討し、一方、HMWP は申請する限度値の 11 倍のレベルで検討した（M 2.6.7.17.B）。ラットを用いた 26 週間毒性試験に使用された非臨床試験用ロットと実生産の製造工程由来ロットの同等性／同質性に基づき、4 つの不純物群の申請する規格限度は非臨床で安全性が確認されたと結論付けられる。

非臨床試験から臨床における免疫原性を予測することはできない。これについては、臨床開発プログラムで検討されている。

溶出物

容器／施栓系（M 3.2.P.2.4）からの溶出物のレベルは極めて低く、患者への安全性の懸念は認められない。

2.4.4.6.4　動物とヒトにおける曝露量の比較

重要な毒性試験における NOAEL 投与時の曝露量を、日本人患者における平均臨床用量である 150 U/週投与時のヒトでの曝露量と比較した。

糖尿病の被験者における平均ヒト曝露量は、第 2 相及び第 3 相試験のデータに基づく〔モデリング報告書（M 5.3.3.5）〕。異なる動物種で異なる投与頻度が用いられた場合の全身曝露量の正確な比較方法と考えられることから、曝露量（表 2.4-9）は定常状態の $C_{average}$（AUC_{tau}/tau）として示す。

大部分の試験の NOAEL は検討した最高用量であり、低血糖に関連する忍容性により制限された。正常血糖値を有する正常動物にインスリンを投与することで生じる、低血糖に関連した一般状態変化がみられるが、本所見は十分に知られており、実臨床では血糖値がモニターされるため、本所見の臨床的意義は限定的と考えられる。したがって、観察された動物／ヒト曝露量比（表 2.4-9）は容認できるものと考えられる。

表 2.4-9　　重要な毒性試験における動物／ヒト曝露量比

Species, study type and dose	C_{max} (pmol/L)	$AUC_{tau,ss}$ (pmol×h/L)	$C_{average}$[a] (pmol/L)	Exposure ratio[b]
Human (Japanese subjects with diabetes mellitus, 150 U/week)[c]	204,520		157,356	
Repeat-dose toxicity and Carcinogenicity				
Rat, 26-week (Study ID 213297)				
60 nmol/kg/day	577,000	12,450,000	518,750	3.3
80 nmol/kg/day (males only)	897,000	18,600,000	775,000	4.9
Rat, 52-week (Study ID 319122)				
40 nmol/kg/day	459,000	9,810,000	408,750	2.6
60 nmol/kg/day (males only)	1,520,000	18,000,000	750,000	4.8
Dog, 26-week (Study ID 213222)				
12 nmol/kg/twice weekly	162,500	11,200,000	116,667	0.7
Reproductive and development toxicity				
Rat, fertility (Study ID 214143)				
100 mg/kg/day (male only)	1,050,000	21,200,000	883,333	5.6
Rat, embryo-foetal development (Study ID 214143)				
60 nmol/kg/day (females only)[d]	416,000	7,240,000	301,667	1.9
Rabbit, embryo-foetal development (Study ID 214091)				
18 nmol/kg/day (females only)	409,000	8,370,000	348,750	2.2
Rat, pre-and post-natal development (Study ID 321450)				
35 mg/kg/day (female only)[e]	232,000	4,370,000	182,083	1.2

a – $C_{average}$ = AUC_{tau}/tau e.g. “$AUC_{0\text{-}24h}$/24” in rats
b – Exposure multiples calculated as: $C_{average}$ in animals/$C_{average}$ in human
c – Modelling report (M 5.3.3.5)
d – Gestation day 17
e – Lactation day 11

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1 概要

インスリン イコデクは IR と特異的に結合するが、親和性は HI よりも低い。インスリン イコデクは、HI と同じ用量依存性の下、受容体をリン酸化し、受容体後の下流細胞内シグナル伝達経路を刺激することが実証されており、IR を活性化する。したがって、インスリン イコデクの作用機序は、HI 及び他の既知のインスリンアナログと同じであることが明らかとなった。関連する IGF-1R に対するインスリン イコデクの親和性は、IR に対する結合親和性よりも相対的に低かった。また、インスリンの主要標的器官（脂肪、肝臓及び筋肉）を代表する細胞で実施した機能上のアッセイから、脂肪細胞でのグルコース取り込み及び脂質生成、肝細胞及び筋細胞でのグリコーゲン合成の刺激等、インスリン イコデクは HI と同じパターンの代謝作用を示すことが実証された。

インスリン イコデクの *in vivo* の薬理作用は、様々な動物種で血糖降下作用により実証された。

インスリン イコデクの薬物動態プロファイルには持続化が認められ、血漿中半減期は検討した動物種において 25～61 時間であり、ヒトでは 173 時間であった。薬物動態にみられる持続化の主な機序は、IR への低い親和性及び高い血漿タンパク結合率に起因する、血漿コンパートメントからの緩徐なクリアランスと考えられる。インスリン イコデクは主に血中の血漿コンパートメントに分布し、これよりも低い割合で他の組織にも分布する。この知見は、検討したすべての動物種（ヒトを含む）で観察された高い血漿タンパク結合率（99%超）及び血漿中の主要結合タンパク質がアルブミンであることと一致する。

インスリン イコデクの未変化体がラット、イヌ及びヒトにおける循環血中の主要な成分であった。イヌ及びヒトの循環血中ではインスリン イコデク由来代謝物 4 種類が同定され、このうち量の多い 3 種類はラット血漿中でも認められた。これらの代謝物を定量し、ラット及びイヌの毒性試験でヒト代謝物の全身曝露を確認した。ヒト循環血中の主要代謝物である B^{1-29}-(C_{20})は、インスリン イコデク関連物質の総曝露量の 11%であった。代謝物はいずれも薬理学的に不活性であった。

イヌの尿中では、投与量のうち少量がインスリン イコデク未変化体として排泄され、ヒトの尿中では、低い割合の被験者でのみ検出可能レベルのインスリン イコデクが認められた。多くの代謝物が尿中（ラット、イヌ）、糞中（ラット、イヌ）及び胆汁中（ラット）において検出された。イヌ尿中における量の多い 3 種類の代謝物の特徴として、インスリン イコデクの B 鎖ペプチドの完全なタンパク質分解による切断及び C_{20} 脂肪酸部分の広範な β 酸化による生成物であり、インスリン イコデクが広範に分解され、その後、残る代謝物フラグメントが排泄されることが実証されている。

インスリン イコデクの非臨床毒性プロファイルについては、薬理学的反応を示す 2 種類の動物種、すなわちラット及びイヌで十分に特徴が明らかにされている。反復投与毒性試験では、正常血糖を有する正常ラット及び正常イヌに投与した場合、投与関連の変化は、インスリン イコデクの目的とする薬理作用又はそれに関連する作用による、正常範囲を下回る血糖値低下に起因すると考えられた。

HI は既知の増殖促進作用をもつことから、インスリン イコデクの *in vitro* の細胞増殖誘発反応をヒト乳腺上皮細胞（HMEC）、ヒト乳腺腺癌細胞株（MCF-7）、ヒト結腸腺癌細胞株（COLO-205）及びヒトインスリン受容体過剰発現ラット L6 筋芽細胞（L6-hIR）でモニターした。細胞増殖誘発能は HI よりも低いことが明らかになり、これは、IR に対する低い親和性及び様々な細胞種で評価された *in vitro* の代謝の効力と合致した。全体として、細胞増殖誘発能／代謝能の効力比は HI と同様であることが実証され、インスリン イコデクの代謝作用と増殖作用とのバランスは HI と変わらないことが示された。Sprague-Dawley 系ラットを用いた 52 週間の毒性試験において、全動物の完全な病理組織学的評価に基づき、インスリン イコデクはがん原性を示さなかった。特に、雌における乳腺腫瘍の発現率は、対照群及び参照用の HI 投与群を含むすべての投与群間で同様であった。

ラット及びウサギでは、インスリン イコデク投与後、受胎能（ラット）又は胚・胎児発生に対する影響は認められず、インスリン イコデク投与と関連する胎児の内臓又は骨格における高度及び軽度の異常はみられなかった。2 匹のウサギでみられた流産は、同様の所見が他のインスリンアナログ及び HI でも観察されていることから、インスリン イコデク自体の影響というよりも、正常血糖を有する動物にインスリンを投与したことによる影響であると考えられた。

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、最高用量において、一部の F0 の雌で授乳期間中に顕著な体重減少がみられ、出生ラットの授乳不足、低血糖様の一般状態変化及び死亡に至った。最高用量で認められたこの所見は、正常血糖を有する妊娠動物における血糖降下作用に関連すると考えられ、これ以外に、有害な投与関連の変化は F0 又は F1 に認められなかった。インスリン療法では全般的に、また妊娠期間中及び授乳期間中は特に、血糖値／低血糖は注意深くモニターされることから、正常血糖を有する動物への投与後に観察されたこれらの所見の臨床的な意義は限定的と考えられる。

局所刺激性の評価では、インスリン イコデク製剤投与と溶媒投与を比較した場合に軽度かつ許容可能な炎症性変化がみられ、滅菌等張食塩液の投与との比較ではわずかな反応の差のみが認められた。

インスリン イコデク製剤の不純物を非臨床試験で検討したが、十分に安全性に関して妥当性が確認されたと考えられる。インスリン イコデク製剤中の添加物は十分に知られたものであり、その量は、他の市販されている既承認の長期皮下投与用製剤投与時の量を超えるものではない。

2.4.5.2 結論

インスリン イコデクはヒト IR の特異的かつ完全なアゴニストであるが、受容体に対する結合親和性は HI よりも低いことが実証されている。非臨床試験プログラムから、反復投与毒性、生殖発生毒性、局所刺激性及びがん原性を評価した試験に基づき、ヒトにおけるインスリン イコデクの長期皮下投与に関して安全性の懸念は認められなかった。

非臨床開発プログラムから、インスリンの既知の薬理作用に起因する所見が明らかとなり、インスリンの過剰な薬理作用（低血糖）に関連するもの以外の有害作用は認められなかった。出生前及び出生後の発生に関する毒性試験では、最高用量において、一部の授乳中の雌に顕著な体重減少がみら

れ、出生動物の授乳不足、低血糖様の一般状態変化及び死亡に至った。インスリン療法では全般的に、また妊娠期間中及び授乳期間中は特に、血糖値／低血糖は注意深くモニターされることから、正常血糖を有する動物への投与後に観察されたこれらの所見の臨床的な意義は限定的と考えられる。

非臨床試験から、インスリン イコデクが HI と同様の代謝作用プロファイル及び安全性プロファイルをもつことが実証された。非臨床プログラムから、ヒトへの長期皮下投与が支持される。

参考文献

[1] Nishimura E, Pridal L, Glendorf T, Hansen BF, Hubálek F, Kjeldsen T, et al. Molecular and pharmacological characterization of insulin icodec: a new basal insulin analog designed for once-weekly dosing. BMJ Open Diabetes Res Care. 2021;9(1).

[2] Hubalek F, Refsgaard HHF, Gram-Nielsen S, Madsen P, Nishimura E, Munzel M, et al. Molecular engineering of safe and efficacious oral basal insulin. Nat Commun. 2020;11(1):3746.

[3] Kjeldsen TB, Hubalek F, Tagmose TM, Pridal L, Refsgaard HHF, Porsgaard T, et al. Engineering of Orally Available, Ultralong-Acting Insulin Analogues: Discovery of OI338 and OI320. J Med Chem. 2021;64(1):616-28.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

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

[8] 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.

[9] 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.

[10] Kahn CR , Weir GC, King GL, Moses AC, Smith RJ, Jacobson AM, editors. Joslin's Diabetes Mellitus. 14th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

[11] Rhodes CJ, White MF. Molecular insights into insulin action and secretion. Eur J Clin Invest. 2002;32 Suppl 3:3-13.

[12] Slaaby R, Schaffer L, Lautrup-Larsen I, Andersen AS, Shaw AC, Mathiasen IS, et al. Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. J Biol Chem. 2006;281(36):25869-74.

[13] Meijer RI, Barrett EJ. The Insulin Receptor Mediates Insulin's Early Plasma Clearance by Liver, Muscle, and Kidney. Biomedicines. 2021;9(1).

[14] Heise T, Mathieu C. Impact of the mode of protraction of basal insulin therapies on their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and resulting clinical outcomes. Diabetes Obes Metab. 2017;19(1):3-12.

[15] Plum A, Agerso H, Andersen L. Pharmacokinetics of the rapid-acting insulin analog, insulin aspart, in rats, dogs, and pigs, and pharmacodynamics of insulin aspart in pigs. Drug Metab Dispos. 2000;28(2):155-60.

[16] Chang SG, Choi KD, Jang SH, Shin HC. Role of disulfide bonds in the structure and activity of human insulin. Mol Cells. 2003;16(3):323-30.

[17] Guo ZY, Feng YM. Effects of cysteine to serine substitutions in the two inter-chain disulfide bonds of insulin. Biol Chem. 2001;382(3):443-8.

[18] Jensen L, Helleberg H, Roffel A, van Lier JJ, Bjornsdottir I, Pedersen PJ, et al. Absorption, metabolism and excretion of the GLP-1 analogue semaglutide in humans and nonclinical species. Eur J Pharm Sci. 2017;104:31-41.

[19] Fujiwara S, Amisaki T. Identification of high affinity fatty acid binding sites on human serum albumin by MM-PBSA method. Biophys J. 2008;94(1):95-103.

[20] Jensen VFH, Mølck AM, Berthelsen LO, Alifrangis L, Andersen L, Chapman M, et al. Toxicological Effects during and following Persistent Insulin-Induced Hypoglycaemia in Healthy Euglycaemic Rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2017;121(1):53-66.

[21] Gustavsson C, Yassin K, Wahlstrom E, Cheung L, Lindberg J, Brismar K, et al. Sex-different hepaticglycogen content and glucose output in rats. BMC Biochem. 2010;11:38.

[22] Cortright RN, Chandler MP, Lemon PW, DiCarlo SE. Daily exercise reduces fat, protein and body mass in male but not female rats. Physiol Behav. 1997;62(1):105-11.

[23] May KK, Beaton JR. Hyperphagia in the insulin-treated rat. Proc Soc Exp Biol Med. 1968;127(4):1201-4.

[24] Kruszynska YT, Villa-Komaroff L, Halban PA. Islet B-cell dysfunction and the time course of recovery following chronic overinsulinisation of normal rats. Diabetologia. 1988;31(8):621-6.

[25] Amacher DE. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. Regul Toxicol Pharmacol. 1998;27(2):119-30.

[26] Ramaiah SK. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. Clin Lab Med. 2011;31(1):161-72.

[27] Logothetopoulos M, Kaneko M, Wrenshall GA, Best CH. Zinc, granulation and extractable insulin of islet cells following hyperglycemia or prolonged treatment with insulin. In: The structure and metabolism of the pancreatic islets. Brolin SE, Hellman B, Knutson H, editors. 1964;333-350.

[28] Ozaki K, Sano T, Tsuji N, Matsuura T, Narama I. Insulin-induced hypoglycemic peripheral motor neuropathy in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. Comp Med. 2010;60(4):282-7.

[29] Ikegami H, Tabata H, Matsuzawa T, Suzuki H. The exacerbating effect of insulin-induced hypoglycemia on spontaneous peripheral neuropathy in aged B6C3F1 mice. J Toxicol Sci. 2000;25(2):137-42.

[30] Bergman P, Bruyette D, Coyne B, Shelton G, Ogilvie G, Munana K, et al. Canine Clinical Peripheral Neuropathy Associated With Pancreatic Islet Cell Carcinoma. Progress In Veterinary Neurology. 1994;5(2):57-62.

[31] Adissu HA, Turner PV. Insulinoma and squamous cell carcinoma with peripheral polyneuropathy in an aged Sprague-Dawley rat. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2010;49(6):856-9.

[32] Cohen N, Rossetti L, Shlimovich P, Halberstam M, Hu M, Shamoon H. Counterregulation of hypoglycemia. Skeletal muscle glycogen metabolism during three hours of physiological hyperinsulinemia in humans. Diabetes. 1995;44(4):423-30.

[33] Bady I, Zitoun C, Guignot L, Mithieux G. Activation of liver G-6-Pase in response to insulin-induced hypoglycemia or epinephrine infusion in the rat. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;282(4):E905-10.

[34] Hardman MJ, Hull D. The action of insulin on brown adipose tissue in vivo. J Physiol. 1972;221(1):85-92.

[35] Ball EG. Some considerations of the multiplicity of insulin action on adipose tissue. Horm Metab Res. 1970;2:Suppl 2:102-7.

[36] Jacobsson B, Smith U. Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells. J Lipid Res. 1972;13(5):651-6.

[37] Ying C, Liu T, Ling H, Cheng M, Zhou X, Wang S, et al. Glucose variability aggravates cardiac fibrosis by altering AKT signalling path. Diab Vasc Dis Res. 2017;14(4):327-35.

[38] Bartels T, Wäse K, Heinrichs M, Stolte M, Roome N, Scherer P, et al. Regulatory Forum Opinion Piece: Review-Toxicological Pathology Profile and Regulatory Expectations for Nonclinical Development of Insulins and Insulin Analogues. Toxicol Pathol. 2016;44(7):931-46.

[39] Mancine RE, Penhos JC, Izquierdo IA, Heinrich JJ. Effects of acute hypoglycemia on rat testis. Proc Soc Exp Biol Med. 1960;104:699-702.

[40] Nafeaa A, Ahmed SA, Fat Hallah S. Effect of Feed Restriction during Pregnancy on Performance and Productivity of New Zealand White Rabbit Does. Vet Med Int. 2011;2011:839737.

[41] Insulin Detemir - FDA Approval Package, Pharmacology and Toxicology Review, NDA 21-536, 16-Jul-2005.

[42] Insulin Aspart - FDA Approval Package, Pharmacology and Toxicology Review, NDA 20-986, 06-Mar-2000.