インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.6.4 薬物動態試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 2
表目次 3
略語一覧 4
2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 9
2.6.4.2.1 生体試料中薬物濃度分析法 9
2.6.4.2.2 抗薬物抗体測定法 11
2.6.4.3 吸収 12
2.6.4.3.1 単回投与時の薬物動態／トキシコキネティクス 13
2.6.4.3.2 反復投与時の薬物動態／トキシコキネティクス 14
抗インスリン イコデク抗体の産生とインスリン イコデクの曝露量との関係 14
種間比較 14
2.6.4.4 分布 16
2.6.4.4.1 組織分布 16
2.6.4.4.2 血漿中タンパク質結合率 16
2.6.4.5 代謝 17
2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝 17
2.6.4.5.2 *In vivo* 代謝 17
2.6.4.6 排泄 21
2.6.4.7 薬物動態学的相互作用 21
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 22
2.6.4.9 考察及び結論 23
参考文献 25

図目次

ページ

図 2.6.4-1 放射能標識インスリン イコデクの化学構造 8
図 2.6.4-2 インスリン イコデクを 1 日 1 回皮下投与時の定常状態での全身曝露量（$AUC_{0\text{-}168h}$）と投与量の関係（対数-対数プロット） 15
図 2.6.4-3 インスリン イコデクを皮下投与時の CL/F_{ss} と体重との関係 15
図 2.6.4-4 ラット、イヌ及びヒトにおけるインスリン イコデクの推定代謝経路 20

表目次

ページ

表 2.6.4-1　インスリン イコデクの反復皮下投与時及び単回静脈内投与時の用量補正薬物動態パラメータ（1 nmol/kg）の種間比較 7
表 2.6.4-2　生体試料中薬物濃度分析法：承認申請用の試験に用いる LOCI 法のバリデーションパラメータ 10
表 2.6.4-3　非臨床試験における薬物動態解析に用いた測定法 11
表 2.6.4-4　測定法のバリデーションパラメータ 12
表 2.6.4-5　インスリン イコデク投与時の *in vivo* 代謝試験 17
表 2.6.4-6　ラット、イヌ及びヒトにおいて同定された血漿中代謝物の曝露量 18
表 2.6.4-7　イヌの尿中におけるインスリン イコデク及び生成量の多い代謝物の排泄量 19
表 2.6.4-8　ラット及びイヌにおける[^{3}H]-インスリン イコデク関連放射能の蓄積排泄率 21

略語一覧

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

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

HPLC-RAD	:	HPLC coupled with radio-detection（放射能検出器付高速液体クロマトグラフィー）
HSA	:	human serum albumin（ヒト血清アルブミン）
i.v.	:	intravenous（静脈内）
IC_{50}	:	concentration of a drug that is required for 50% inhibition（50%阻害濃度）
ICH	:	International Council for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）
IGF-1	:	insulin-like growth factor-1（インスリン様成長因子‐1）
INN	:	international nonproprietary name（国際一般名）
insulin 287	:	insulin icodec（インスリン イコデク）
insulin icodec	:	INN for NNC0148-0000-0287（NNC0148-0000-0287 の国際一般名）
insulin X10	:	Asp^{B10}-human insulin（Asp^{B10}-ヒトインスリン）
IR	:	insulin receptor（インスリン受容体）
IR-A	:	insulin receptor A isoform（インスリン受容体 A アイソフォーム）
IR-B	:	insulin receptor B isoform（インスリン受容体 B アイソフォーム）
ISR	:	incurred sample reproducibility（実試料の再現性）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
JPE	:	Japanese Pharmaceutical Excipients（医薬品添加物規格）
K_d	:	dissociation constant（解離定数）
L6-hIR cell	:	rat L6 myoblasts overexpressing the human insulin receptor（ヒトインスリン受容体過剰発現ラット L6 筋芽細胞）
LC-MS	:	liquid chromatography combined with mass spectrometry（液体クロマトグラフィー質量分析法）
LLOQ	:	lower limit of quantification（定量下限値）
LOCI	:	luminescent oxygen channelling immunoassay（蛍光酸素チャネリング免疫測定法）
LYD	:	Landrace, Yorkshire, Duroc (pigs)〔ランドレース・ヨークシャー・デュロック種（ブタ）〕
Lys	:	lysine（リジン）
M	:	male（雄）
MCF-7	:	human mammary adenocarcinoma cell line（ヒト乳腺腺癌細胞株）
MTD	:	maximum tolerated dose（最大耐量）
NOAEL	:	no observed adverse effect level（無毒性量）
NOEL	:	no observed effect level（無影響量）
NPH insulin	:	Neutral Protamine Hagedorn insulin (human insulin with prolonged action)〔Neutral Protamine Hagedorn インスリン（作用が長時間持続するヒトインスリン）〕
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
PD	:	pharmacodynamic(-s)（薬力学的作用）
PEG		polyethylenglycol（ポリエチレングリコール）
PK	:	pharmacokinetic(-s)（薬物動態）
PKB	:	protein kinase B（プロテインキナーゼ B）
PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（医薬品医療機器総合機構）
QC	:	quality control（品質管理）
(Q)SAR	:	(quantitative) structure-activity relationship〔（定量的）構造活性相関〕
QT interval	:	distance in an electrocardiogram（心電図における間隔）
Rac_{Obs}		observed ratio of accumulation（蓄積係数）
RIA	:	radioimmunoassay（ラジオイムノアッセイ）
RT		room temperature（室温）
s.c.	:	subcutaneous（皮下）
SD		standard deviation（標準偏差）
SEM		standard error of the mean（標準誤差）
SGBS	:	human adipocyte cell line derived from a patient with Simpson-Golabi-Behmel disease（Simpson-Golabi-Behmel 症候群患者由来ヒト脂肪細胞株）

SPR		surface plasmon resonance（表面プラズモン共鳴）
$t_{1/2}$	:	terminal plasma half-life（終末相半減期）
tau	:	dosing interval（投与間隔）
Thr	:	threonine（スレオニン）
TK		toxicokinetic(-s)（トキシコキネティクス）
t_{max}	:	time at which the highest drug concentration of drug in plasma occurs（最高血漿中濃度到達時間）
V_z	:	volume of distribution（分布容積）
ZDF	:	Zucker Diabetic Fatty (rats)〔Zucker Diabetic Fatty（ラット）〕

2.6.4.1　まとめ

インスリン イコデクの投与は大部分の試験で臨床投与経路である皮下（s.c.）投与により行った。さらに、薬物動態を検討するためにラット、イヌ及びブタに静脈内（i.v.）投与を行った。

非臨床試験動物種及びヒトへの静脈内及び皮下投与時のインスリン イコデクの薬物動態パラメータの概要を表 2.6.4-1 に示す。すべての動物種及びヒトで薬物動態の線形性が示されたことから、用量補正した曝露データを表中に示した。

表 2.6.4-1　　インスリン イコデクの反復皮下投与時及び単回静脈内投与時の用量補正薬物動態パラメータ（1 nmol/kg）の種間比較

Species	s.c. administration (steady-state)					i.v. administration (single dose)		
	C_{max} (nmol/L)	t_{max} (h)	$AUC_{(0\text{-}168h)}$ (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]	12.3	3-24	1,487	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	-	-	-

Mean (t_{max} range) of male and female. For further details, see 2.6.4.3
[a]Study ID: s.c.: 210458 (DRF 4-week), 211239 (8-week), 213297 (26-week*), 319122 (52-week*), $AUC_{0\text{-}168h}$ = 7×$AUC_{0\text{-}24h}$, [redacted]00301**, 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), $AUC_{0\text{-}168h}$ = 7×$AUC_{0\text{-}24h}$.
[c]Study ID: s.c.: 211240 (8-week, For each individual dog $AUC_{0\text{-}168h}$), 213222 (26-week, *For each individual dog $AUC_{0\text{-}168h}$ = 7/4×$AUC_{0\text{-}96h}$), [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.

インスリン イコデクの薬物動態は用量比例性であり、性差及び時間依存性は認められなかった。インスリン イコデクは皮下投与部位から良好に吸収され、ラット、イヌ及びブタにおける全体的なバイオアベイラビリティは 55%超であった（表 2.6.4-1）。

非臨床試験における皮下投与では、上市予定製剤である臨床製剤と同様のインスリン イコデク及び亜鉛を含む製剤処方を使用した。製剤処方中のインスリンと亜鉛の比率が薬物動態プロファイルに影響を及ぼすことが示され、亜鉛／インスリン比が低いほど吸収が速やかで、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）が早かった。非臨床試験では製剤処方中のインスリン／亜鉛比を様々に変えている。しかし、ラット及びイヌの薬物動態に対する亜鉛の影響は限定的であるため、様々な比率の製剤処方で得られたデータを併合している。ヒトの薬物動態データは上市予定製剤を投与した結果に基づくものである。

インスリン イコデクの皮下投与時、非臨床試験動物種では最高血漿中（又は血清中）濃度（C_{max}）は投与後 2～24 時間に観察された。ヒトの t_{max} は投与後約 16 時間に観察された。用量で補正した全身

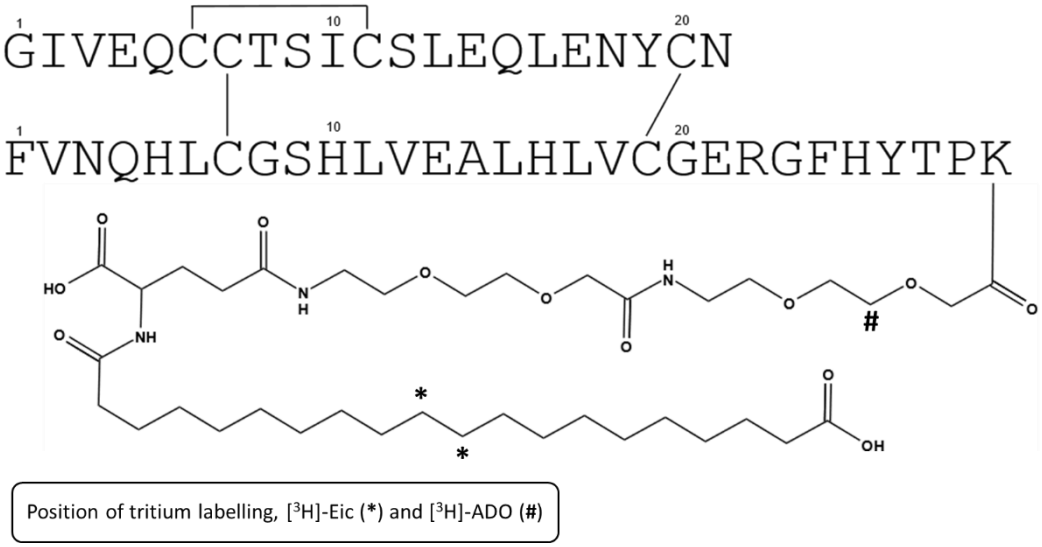
曝露量〔血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC）$_{0\text{-}168h}$〕はラット、イヌ及びヒトで同様であったのに対して、ウサギではやや大きかった。皮下投与時の循環血の平均終末相半減期（以下、$t_{1/2}$）は 26～63 時間であり、ラット＜ブタ＜イヌの順であった。また、ヒトでの $t_{1/2}$ は 173 時間であった。

ラット、ウサギ及びイヌにおける蓄積は低く（0.6～4 倍、3.3 倍及び 1.3～2 倍）、推定 $t_{1/2}$ 及び投与頻度と一致していた。

静脈内投与時の見かけの分布容積（V_z）は比較的小さく、0.1～0.2 L/kg であった。全身クリアランス（CL）は極めて小さく、ラット＜ブタ＜イヌの順であった。このことは、主にインスリン イコデクの大部分が血漿中タンパク質に結合し、インスリン受容体への親和性が低いことによるものと考えられる。ラット、イヌ及びブタへの静脈内投与時の平均 $t_{1/2}$ は 26～60 時間であった。

インスリン イコデクの消失を様々な動物種及びヒトにおける *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。この評価にはトリチウム（^{3}H）で脂肪酸〔[^{3}H]-C_{20} 脂肪二酸（Eic）〕又はリンカー〔[^{3}H]-8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（ADO）〕を放射能標識したインスリン イコデク（図 2.6.4-1）及び非標識インスリン イコデクを用いた。

図 2.6.4-1　　放射能標識インスリン イコデクの化学構造



皮下投与後の放射能標識[^{3}H]-Eic-インスリン イコデクの分布をラットにおいて検討した。放射能は血液中の血漿コンパートメントに分布し、他の組織での分布はこれよりも低いレベルであった。腎皮質のような血管が豊富な組織でのみ血液中の放射能と同様のレベルであった。これは検討したすべての動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）において血漿タンパク結合率が高かった（99%超）ことと一致しており、アルブミンが血漿中での主な結合タンパク質であった。

インスリン イコデクの *in vitro* 代謝について肝細胞を用いて検討した結果、すべての動物種で多種の代謝物が産生されることが示された。ヒト肝細胞で認められた代謝物はすべて、インスリン イコデクの毒性評価で使用した動物種（ラット、ウサギ及びイヌ）由来肝細胞でも認められており、ヒト特有の代謝物は認められなかった。インスリン分解酵素（IDE）によるインスリン イコデクの分解はヒトインスリンと比較して大幅に緩徐であったが、酵素の切断は、大部分の切断部位と同じく両インスリンで同様であった。

ラット、イヌ及びヒトではインスリン イコデク未変化体が全身循環中の主たる成分であった。イヌ及びヒトの血漿においてインスリン イコデクの 4 種類の循環血中代謝物が同定され、生成量の多い 3

種類の代謝物はラットの血漿中でも同定された。これらの代謝物を定量し、ラット及びイヌを用いた毒性試験でヒト代謝物の全身曝露を確認した。ヒトにおける主要な循環血中代謝物は B^{1-29}-(C_{20})であり、インスリン イコデク関連物質の総曝露量の 11%であった。

インスリン イコデク未変化体として尿中（イヌ）に排泄された放射能の割合は低く、多数の代謝物として尿中（ラット、イヌ）、糞中（ラット、イヌ）及び胆汁中（ラット）に排泄された放射能の割合が高かったことから、インスリン イコデクは広範に分解された後、残留代謝物断片として排泄されることが示された。ヒトの尿中へのインスリン イコデク未変化体の排泄は極めて少なかった。

以上より、インスリン イコデクの薬物動態特性ならびに吸収、分布、代謝及び排泄特性は非臨床開発プログラムにおいて十分に検討されたと考えられ、特別な懸念は認められなかった。

2.6.4.2 分析法

2.6.4.2.1 生体試料中薬物濃度分析法

非臨床試験に用いた測定法

非臨床試験では 3 種類の測定法により血漿中インスリン イコデク濃度を測定した。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用の試験に用いた測定法 I 及び II はバリデーションを行っていないが、承認申請用の GLP 適用試験に用いた測定法 III はバリデーション済みである。3 種類の測定法はいずれも蛍光酸素チャネリング免疫測定法（LOCI、AlphaLISA）法であった。LOCI 法はホモジニアスビーズを用いたアッセイである。試薬は 2 種類のラテックスビーズ試薬（ドナービーズ及びアクセプタービーズ）とビオチン化抗体とした。ドナービーズは一般試薬であり、ストレプトアビジンでコーティングし、さらに感光染料を含有する。アクセプタービーズは第 2 抗体と結合させた。この 3 種類の反応物質を血漿中でインスリン イコデクと結合させてビーズ凝集体の免疫サンドイッチを作製した。免疫複合体を励起するとドナービーズから一重項酸素が放出され、これがアクセプタービーズに到達し、化学発光反応を引き起こす。発光量（カウント/秒、cps）はインスリン イコデクの濃度に比例する。試料中のインスリン イコデク濃度は、各測定試料セットに含まれるキャリブレータによる検量線に内挿することで決定した。

測定法 I：血漿中ヒトインスリンアナログ濃度測定用の「O454 アッセイ」

本測定法（バリデーションは行っていない）では、アクセプタービーズをインスリン イコデクと交叉反応するモノクローナル抗ヒトインスリン抗体（[redacted]）と結合させた。サンドイッチ中の第 2 抗体はインスリン イコデクの「γGlu」リンカーを認識するビオチン化モノクローナル抗体（[redacted]）とした。

インスリン イコデクの定量下限値はラット、イヌ及びブタ血漿で 50 pmol/L であり、ラット、イヌ及びブタインスリンとの交叉反応率は 1%未満であった。

測定法 II：血漿中ヒトインスリンアナログ濃度測定用の[redacted]を用いたアッセイ

本測定法（バリデーションは行っていない）では、アクセプタービーズをヒトインスリン A 鎖の中央部分を認識するモノクローナル抗体（[redacted]）と結合させた。サンドイッチ中の第 2 抗体はインスリン イコデクの置換した His^{B25} に対するビオチン化モノクローナル抗体（[redacted]）とした。

インスリン イコデクの定量下限値はラット、イヌ及びブタ血漿でそれぞれ 150、200 及び 300 pmol/L であった。ラット、イヌ及びブタインスリンとの交叉反応率はそれぞれ 2%未満、4%未満及び 4%未満であった。

測定法 III：血漿中インスリン イコデク濃度測定用

承認申請用の非臨床試験に用いるため、米国食品医薬品局（FDA）[1,2]及び欧州医薬品庁（EMA）[3]のガイドラインに従い、インスリン イコデクの分析について、ラット〔211314 試験（M 4.2.2.1-1）、213155 試験（M 4.2.2.1-8）及び 321884 試験（M 4.2.2.1-12）〕、ウサギ〔213156 試験（M 4.2.2.1-9）〕及びイヌ〔211317 試験（M 4.2.2.1-2）及び 212269 試験（M 4.2.2.1-7）〕エチレンジアミン四酢酸（EDTA）血漿において本測定法のバリデーションを行った。

本測定法では、測定法 II と同じ抗体を用いた。アクセプタービーズをヒトインスリン A 鎖の中央部分を認識するモノクローナル抗体（[redacted]）と結合させ、本測定法で使用する第 2 抗体はインスリン イコデクの置換した His^{B25} に対するビオチン化モノクローナル抗体（[redacted]）とした。

バリデーションの結果、本測定法は血漿試料中インスリン イコデクの分析に関して、真度、精度、希釈線形性、選択性及び特異度の点で保証されている。本測定法のバリデーションは、まずラット〔211314 試験（M 4.2.2.1-1）〕及びイヌ〔211317 試験（M 4.2.2.1-2）〕において定量下限値（LLOQ）を 266 pmol/L として行った。次に、最適化された測定法のバリデーションをラット〔213155 試験（M 4.2.2.1-8）〕、ウサギ〔213156 試験（M 4.2.2.1-9）〕及びイヌ〔212269 試験（M 4.2.2.1-7）〕において LLOQ を 300 pmol/L として行った。EDTA 血漿中インスリン イコデクの-20℃での長期安定性をラット〔212182 試験（M 4.2.2.1-5）及び 321884 試験（M 4.2.2.1-12）〕、ウサギ〔213239 試験（M 4.2.2.1-10）〕及びイヌ〔212183 試験（M 4.2.2.1-6）〕において検討した。

バリデーションパラメータを以下に示す（表 2.6.4-2）。

表 2.6.4-2　生体試料中薬物濃度分析法：承認申請用の試験に用いる LOCI 法のバリデーションパラメータ

Validation parameter	Rat[a]	Rat[b]	Rabbit[c]	Dog[d]	Dog[e]
LLOQ	266 pmol/L	300 pmol/L	300 pmol/L	266 pmol/L	300 pmol/L
Accuracy[f]	± 20%	± 20.0%	± 20.0%	± 20%	± 20.0%
Precision[f]	≤ 20%	≤ 20.0%	≤ 20.0%	≤ 20%	≤ 20.0%
Stability at RT	24 hrs	24 hrs	24 hrs	24 hrs	24 hrs
Long-term stability (-20°C)	-	9 months	6 months	-	7 months

[a]Study 211314. [b]Studies 213155, 212182, 321884. [c]Studies 213156, 213239. [d]Study 211317. [e]Studies 212269, 212183. [f]25% at LLOQ and ULOQ.

測定法 III では、ラット〔211314 試験（M 4.2.2.1-1）及び 321884 試験（M 4.2.2.1-12）〕及びイヌ〔211317 試験（M 4.2.2.1-2）〕の内因性インスリンとインスリン イコデクとの交叉反応性は認められず、過度に溶血した試料でも分析可能であった（ラット、ウサギ及びイヌ）。

ラットを用いた 211239 試験、イヌを用いた 211240 試験及びウサギを用いた 213525 試験の試料を使用して incurred sample reanalysis（ISR）を実施し、別々に報告した〔それぞれ 211537 試験（M 4.2.2.1-4）、211536 試験（M 4.2.2.1-3）及び 214140 試験（M 4.2.2.1-11）〕。

非臨床試験及び使用した測定法の概要を以下に示す（表 2.6.4-3）。

表 2.6.4-3　　非臨床試験における薬物動態解析に用いた測定法

Species	Study	Assay I	Assay II	Assay III
Rat	[redacted]100102, [redacted]100301	X		
Rat	210458		X	
Rat	211239[a,b], 211472[a,b], 213297[a], 213427[a], 214143[a], 319122[a], 321450[a]			X
Rabbit	213152[a], 213337, 213525[a], 214091[a]			X
Dog	[redacted]090506, [redacted]091001	X		
Dog	210459		X	
Dog	211240[a,b], 211468[a,b], 213222[a]			X
Pig	[redacted]100201, [redacted]100902, [redacted]101101	X		
Pig	[redacted]110501, [redacted]160103		X	

[a]Study conducted according to GLP. [b]First version of assay III validated with a LLOQ at 266 pmol/L

臨床試験に用いた測定法

非臨床試験の測定法 III と同じ抗体を用いて、ヒト血清中インスリン イコデク濃度を測定するためのイムノアッセイ（LOCI）を開発した。本測定法のバリデーションはガイドラインに従って実施した。ヒトにおける測定法の詳細は M 2.7.1 を参照のこと。

2.6.4.2.2　　抗薬物抗体測定法

ラット及びイヌにおける抗インスリン イコデク抗体の産生を[^{125}I]標識インスリン イコデクを用いてバリデーション済みのラジオイムノアッセイ（RIA）により測定した〔211321 試験（M 4.2.2.1-13）〕。バリデーション及び抗体の評価は関連するガイドライン[4,5,6]に従って実施した。簡潔に述べると、試料を酸とインキュベートして抗体と原薬との結合を破壊した。次に、中和用 Tris 緩衝液に PEG6000 を添加し、血清試料中の抗体を沈殿させた。インスリン イコデクは沈殿しなかったため、残存原薬による干渉は最小限に抑えられた。遠心分離後、沈殿物を緩衝液に溶解し、放射能標識インスリン イコデクとインキュベートした。一晩インキュベートした後、PEG 及び免疫グロブリンと結合している可能性のある抗原で免疫グロブリンを沈殿させた。沈殿物をガンマカウンターで計測し、沈殿物中の放射能の総放射能に対する割合（%B/T）として示した。投与前試料の結果に基づいてカットオフ値を算出した。本測定法に特異的なカットオフ値を算出できるよう陰性対照血清プールの結果を用いた。カットオフ値は、約 1%の偽陽性試料を発見するために統計解析により設定した[5]。%B/T 値がカットオフ値を超える試料については、真陽性試料を特定するための確認試験を実施した。確認試験は、過剰量の非標識インスリン イコデク非存在下（A 試料）及び存在下（B 試料）で試料を再分析することにより実施した。結果は%B/T で示し、抗インスリン イコデク抗体陽性又は陰性に分類した。薬物動態パラメータと薬力学的作用パラメータ（薬物動態プロファイルと血糖値など）との相関を検討することにより、抗インスリン イコデク抗体の中和作用を評価した。

本測定法の感度はラット血清で抗インスリン イコデクポリクローナル抗体約 21 ng/mL、イヌ血清で約 64 ng/mL であった。インスリン イコデク 3,000 nmol/L はラット血清中特異的抗インスリン イコデク抗体 1,000 ng/mL の検出に影響を及ぼさなかった。イヌ血清中の濃度は 750 nmol/L であった。これらの測定法及び他の測定法のバリデーションパラメータを表 2.6.4-4 に要約する。

表 2.6.4-4　　測定法のバリデーションパラメータ

Parameters	**Level**	**Rat**	**Dog**
Normalisation factor		1.2	1.4
Specificity cut point	100×(A-B)/A	34%	50%
Confirmation of specificity cut point	At least 90 ng/ml antibodies specific for insulin icodec can be confirmed as positive, as determined using the QC low samples in both rat and dog serum.		
Sensitivity	Polyclonal antibodies specific for insulin icodec (control antibody)	21 ng/ml	64 ng/ml
Drug interference	Maximum tolerable drug concentration at assay sensitivity < 1000 ng/ml	3000 nmol/L	750 nmol/L
Recovery	5 out of 5 individual serum samples were positive when spiked with 90 ng/ml specific anti-insulin icodec antibody		
QC sample range	QC neg:	≤2.7%B/T	≤3.9%B/T
	QC low:	2.5-10.8%B/T	4.9-10.1%B/T
	QC high:	30.8-62%B/T	35.6-56.1%B/T
Intra assay precision	QC neg:	13.1%	10.1%
	QC low:	17.7%	10.8%
	QC high:	10.5%	6.9%
Inter assay precision	QC neg:	20.8%	23.7%
	QC low:	21.8%	12.3%
	QC high:	11.3%	7.5%
Drift		No drift	No drift
Haemolysis	Grade 1-4	No effect from haemolysis	No effect from haemolysis

毒性試験における抗体分析の結果は M 2.6.7.7 に示す。

臨床試験に用いた測定法

ヒト血清中抗インスリン イコデク抗体を測定するための RIA を開発し、バリデーションを実施した。本測定法のバリデーションはガイドラインに従って実施した。ヒトにおける測定法の詳細は M 2.7.1 を参照のこと。

2.6.4.3　吸収

インスリン イコデクの薬物動態は、臨床投与経路であり、非臨床毒性試験における投与経路である皮下投与において評価した。さらに、静脈内投与時の薬物動態をラット、イヌ及びブタにおいて評価した（表 2.6.4-1）。

非臨床試験における皮下投与では、インスリン イコデク及び亜鉛を含有する製剤処方を使用した。LYD ブタを用いた非臨床試験に使用した製剤処方中の亜鉛の割合は、インスリン 6 分子あたり亜鉛原子 2.3～7.1 であった。概して、亜鉛の含量が多いほど血漿中濃度-時間推移は平坦で（ピークが低く、C_{max} が低い）、AUC が変化しなかったため作用の持続時間が長かった。低い亜鉛濃度を選択した場合には吸収が速やかで $t_{1/2}$ が長くなったことから、血漿タンパク質に結合するインスリン イコデクの割合

が高く、インスリン受容体に対する親和性が低いため全身におけるインスリン イコデクの作用の持続時間が長くなることが示唆される。しかしながら、亜鉛の含量の影響はラット及びイヌでは限定的であるため、様々な亜鉛含量の製剤処方で得られた薬物動態データを併合している。

インスリン イコデクの毒性試験には Sprague-Dawley 系ラット及び Wistar 系ラットを用いた。しかしながら、インスリン イコデクの全身曝露に大きな差がみられなかったことから、薬物動態データの要約にあたっては系統を考慮しないこととした。

ラット、イヌ及びブタにおけるインスリン イコデクの全身への吸収を検討した結果、皮下投与時のバイオアベイラビリティはすべての動物種で高く、55%超であった。検討したすべての動物種において、インスリン イコデクの皮下投与時の血漿中 C_{max} は投与後 2～8 時間に認められた。インスリン イコデクの薬物動態は、検討した動物種では用量比例性であり、性差及び時間依存性は認められなかった。

[^{3}H]-ADO-インスリン イコデクを皮下投与時のラット血漿中（M 2.6.5.3.K, 309776）及びイヌ血漿中（M 2.6.5.3.L, 214108）の総放射能の t_{max} は、インスリン イコデクの t_{max} と同様であった。総放射能の終末相 $t_{1/2}$ は、インスリン イコデクの $t_{1/2}$（イヌで 61 時間）と比較して、ラットで同様で、イヌでやや長かった（77 時間）ことから、循環血中代謝物（2.6.4.5.2 項参照）の $t_{1/2}$ はインスリン イコデクに比べやや長いことが示唆された。ラット及びイヌ血漿の凍結乾燥後に揮発性トリチウム（トリチウム水のマーカー）の消失が認められなかったことから、ADO 成分中のトリチウム結合が影響を受けず、代謝的に安定であることが示唆された。

2.6.4.3.1　単回投与時の薬物動態／トキシコキネティクス

ラット

ラットに皮下投与時の t_{max} は概して投与後 2～8 時間であった（M 2.6.5.4.A, 210458、M 2.6.5.3.M, 211472、M 2.6.5.4.B, 211239、M 2.6.5.4.C, 213297 及び M 2.6.5.4.D, 319122）。全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量比例的に増大した。単回皮下投与時の $t_{1/2}$ は 16～40 時間であり、静脈内投与時は $t_{1/2}$ は 22～29 時間であった（M 2.6.5.4.A, 210458、M 2.6.5.4.B, 211239、M 2.6.5.4.C, 213297 及び M 2.6.5.3.A, [redacted]100102）。CL は約 0.0040～0.0046 L/h/kg であり、Vz は 0.14～0.18 L/kg であった。Wistar 系ラットを用いた低用量の静脈内投与時と Sprague-Dawley 系ラットを用いた極めて高用量の皮下投与時を比較したとき、バイオアベイラビリティは 100%を超えたため、この数値の解釈には注意が必要である（M 2.6.5.3.B, [redacted]100301）。

ウサギ

未交配及び交配雌性ウサギでは、t_{max} は投与後 8～24 時間であり、$t_{1/2}$ は 23～28 時間であった（M 2.6.5.3.O, 213152、M 2.6.5.4.H, 213337、M 2.6.5.4.I, 213525 及び M 2.6.5.4.J, 214091）。全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量比例的に増大した。

イヌ

イヌに皮下投与時の t_{max} は投与後 16～30 時間であった（M 2.6.5.4.K, 210459、M 2.6.5.3.N, 211468、M 2.6.5.4.L, 211240 及び M 2.6.5.4.M, 213222）。全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量比例的に増大した。単回皮下投与時の $t_{1/2}$ は 47～57 時間であり、 静脈内投与時は 59～61 時間であった（M 2.6.5.3.C, [redacted]090506、M 2.6.5.3.D, [redacted]091001、M 2.6.5.4.K, 210459、M 2.6.5.3.N, 211468、M 2.6.5.4.L, 211240 及び M 2.6.5.4.M, 213222）。CL は 0.00078～0.0011 L/h/kg であり、Vz は 0.07～0.1 L/kg であった。皮下投与時のバイオアベイラビリティは 64%超であった。

ブタ

ブタに皮下投与時の t_{max} は投与後 6～52 時間であった（M 2.6.5.3.G, [redacted]100201、M 2.6.5.3.H, [redacted]110501、M 2.6.5.3.I, [redacted]100902 及び M 2.6.5.3.J, [redacted]160103）。全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量比例的に増大した（M 2.6.5.3.G, [redacted]100201、M 2.6.5.3.H, [redacted]110501、M 2.6.5.3.I, [redacted]100902 及び M 2.6.5.3.J, [redacted]160103）。ブタにおいてインスリン 6 量体あたり亜鉛原子 2.3～7.1 個の比率で含有する製剤処方を評価した。亜鉛の含量が多いほど血漿中濃度-時間推移は平坦で（ピークが低く、t_{max} が遅く、C_{max} が低い）、AUC が変化しなかったため作用の持続時間が長かった。

単回皮下投与時の終末相 $t_{1/2}$ は約 37～54 時間であり、静脈内投与時は 42～44 時間であった（M 2.6.5.3.E, [redacted]100201 及び M 2.6.5.3.F, [redacted]110501）。CL は 0.0014～0.0019 L/h/kg であり、Vz は 0.084～0.121 L/kg であった。皮下投与時のバイオアベイラビリティは 56～104%であった。

2.6.4.3.2 反復投与時の薬物動態／トキシコキネティクス

動物におけるインスリン イコデク反復皮下投与時の薬物動態の検討は、ラットを用いた 7 試験、ウサギを用いた 3 試験、イヌを用いた 3 試験からなる反復投与毒性試験の一部として実施した（M 2.6.5.4）。蓄積は小さく（ラットで 0.6～4 倍、イヌで 1.3～2 倍）、推定 $t_{1/2}$ 及び投与頻度と一致していた。雌性ウサギにおける蓄積は平均 3.3 倍であった。1 日 1 回投与後の定常状態での曝露量は、妊娠 6～19 日以降さらに変化することはなかった。ウサギの生殖毒性試験には雌のみを用いたため、雄は検討しなかった。

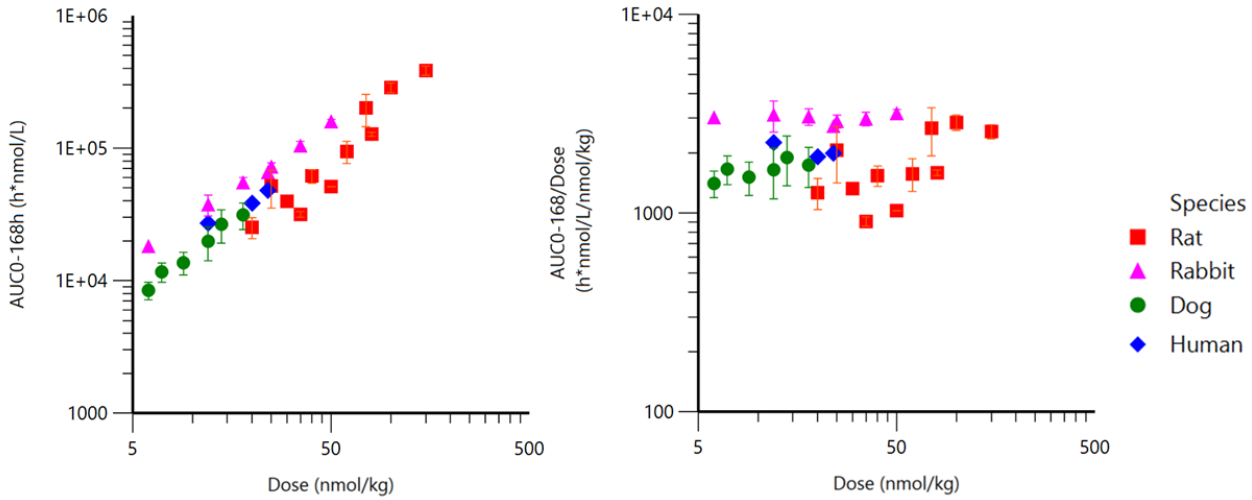
抗インスリン イコデク抗体の産生とインスリン イコデクの曝露量との関係

ラット及びイヌを用いた 8 週間及び 26 週間反復投与毒性試験では、抗インスリン イコデク抗体の産生が認められた。ラット及びイヌの 8 週間試験では、投与終了後に 67～77%の動物で抗インスリン イコデク抗体が認められ、ラット及びイヌの 26 週間試験では、8～22%の動物で抗インスリン イコデク抗体が認められた。抗体陽性率は投与終了時と回復期間中で同様であったことから、抗体の測定は試料中のインスリン イコデクの影響を受けないことが示された。インスリン イコデクの血糖降下作用及び曝露量の評価から、ラットの 8 週間試験及びイヌの 26 週間試験では中和作用を完全に否定することはできなかった。しかしながら、大部分の動物で期待される血糖降下作用が認められ、抗体の産生は試験結果に影響を及ぼさなかったと考えられる。

種間比較

すべての非臨床試験動物種で線形の薬物動態が認められ、全身曝露量（C_{max} 及び AUC）は用量比例的に増大した。用量で補正した曝露量はラット、イヌ及びヒトでは同様であったが、ウサギではやや大きかった（図 2.6.4-2）。

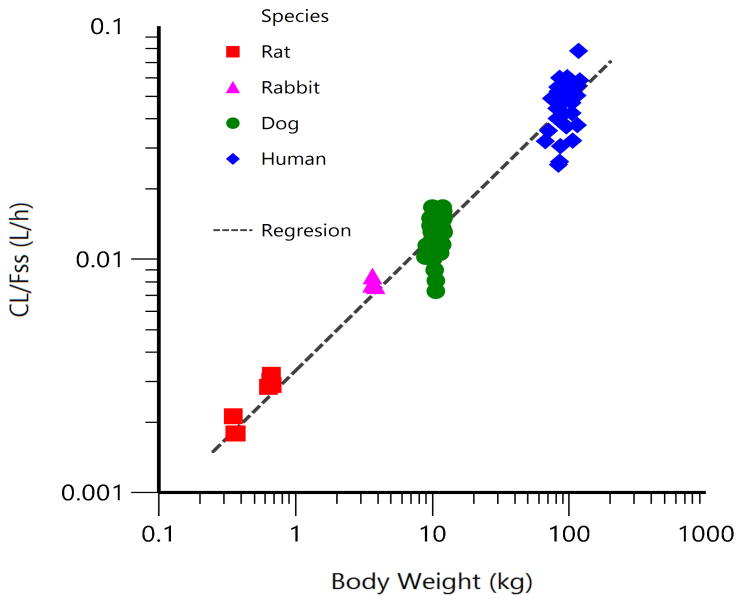
図 2.6.4-2　　インスリン イコデクを１日１回皮下投与時の定常状態での全身曝露量（$AUC_{0\text{-}168h}$）と投与量の関係（対数-対数プロット）



Left: AUC vs. dose; **Right**: AUC/dose vs. dose (dose normalized to 1 nmol/kg).
$AUC_{0\text{-}168h}$ shown as mean ± SD. Studies included: Rat: 210458 (DRF 4-week), 211239 (8-week), 213297 (26-week), 319122 (52-week); Rabbit: 213337 (2-week), 213525 (Prelim-Repro), 214091(Main Repro); Dog: 211240 (8-week), 213222 (26-week); Human: NN1436-4314 (5-week)

用量で補正した曝露量がウサギを除くすべての動物種間でほぼ同様であることから、予測通り定常状態でのクリアランス（CL/F_{ss}）と体重の間にほぼ線形の相関が認められた（図 2.6.4-3）。バイオアベイラビリティは、ラット、イヌ及びブタを用いた試験で示されたように、すべての動物種で高くかつ同様であった（55%超）。

図 2.6.4-3　　インスリン イコデクを皮下投与時の CL/F_{ss} と体重との関係



CL/F_{ss} shown as individual values. Studies included: Rat: 213297 (26-week), Rabbit: 214091(Main Repro), Dog 213222 (26-week); Human: NN1436-4314 (5-week)

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　　組織分布

ラットにおける組織分布（M 2.6.5.5, 212436）

雄性 Sprague Dawley 系ラットに[^{3}H]-Eic-インスリン イコデク 75 nmol/kg（50 MBq/kg）を単回皮下投与時の組織分布を定量的全身オートラジオグラフィーにより検討した。放射能は水晶体を除く検討した約 50 組織すべてに広く分布した。大部分の組織で放射能の最高濃度は投与後 12 時間及び 24 時間に認められた。組織曝露量は歯髄、腎皮質、胆管及び血液で最も大きかった。中枢神経系の組織（脳及び脊髄）では曝露量が最も小さく、血液中曝露量の約 1～2%であったことから、血液-脳関門を通過しないか、通過してもわずかであることが示唆された。放射能は投与後 120 時間まで大部分の組織に認められ、投与後 168 時間には検討した組織の約 20%に定量可能な放射能が認められた。後期測定時点では血漿試料に揮発性の放射能（トリチウム水の可能性が高い）が認められ、投与後 168 時間には血漿中の放射能の約 96%を占め、トリチウム標識脂肪酸側鎖の代謝分解により生成されたものと考えられた。

血漿中濃度が全血中濃度よりも高かったことから、インスリン イコデク及び代謝物と赤血球との関連性はほとんど又は全くないことが示唆された（M 2.6.5.3.K, 309776）。これはイヌでも同じであり（M 2.6.5.3.L. 214108）、赤血球へのインスリン イコデク関連放射能の取り込みは認められなかった。

2.6.4.4.2　　血漿中タンパク質結合率

インスリン イコデクの血漿タンパク結合率及びアルブミンとの結合率を表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサー技術及び平衡結合アッセイにより評価した。いずれの方法でも同様の結果が得られ、インスリン イコデクの血漿タンパク結合率はすべての動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）で 99%を超え、アルブミンが主要な結合タンパク質であった。タンパク結合率が 99%を超えるデータは精度が低く、種間比較には不十分であると考えられるため、血漿タンパク結合率の種間比較は行わなかった。

血漿タンパク結合の種間比較（M 2.6.5.6.C, 212035）

インスリン イコデクの血漿タンパク質に対する解離定数（K_d）を SPR バイオセンサー技術によりマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿において測定した。K_dは 0.028～0.128 µmol/L であり、インスリン イコデクの血漿タンパク結合率がすべての動物種で 99%超であることと一致している。

血清アルブミン結合の種間比較（M 2.6.5.6.B, [redacted]120428）

平衡結合アッセイにおいて ^{125}I-インスリン イコデクとラット、イヌ、ブタ及びヒト血清アルブミンとの結合を観察することによりインスリン イコデクとアルブミンとの結合を検討した。4 種の動物における K_dは 0.070～0.337 µmol/L であり、血漿タンパク質の K_dと同程度であった（M 2.6.5.6.C, 212035）。

ヒト血清アルブミンとの結合（M 2.6.5.6.D, 212036）

インスリン イコデクの結合をヒト血清アルブミン（HSA）において SPR により測定した。結合の測定には 2 ロットの HSA（純度 96%超及び純度 99%超）を用いた。インスリン イコデクの HSA との結合率はいずれのロットにおいても 99%超であった。さらに、インスリン イコデクの HSA との結合率はヒト血漿におけるタンパク結合率と非常によく相関していることから（M 2.6.5.6.C, 212035）、インスリン イコデクが主にヒト血漿中アルブミンと結合することが示唆される。

2.6.4.5 代謝

インスリン イコデクの代謝を様々な動物種及びヒトを対象とする *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験において検討した。この評価にはトリチウム（^{3}H）で脂肪酸（[^{3}H]-Eic）又はリンカー（[^{3}H]-ADO）を放射能標識したインスリン イコデク（図 2.6.4-1）及び非標識インスリン イコデクを用いた。

2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝

肝細胞を用いた種間比較（M 2.6.5.10.A, 211508）

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト由来肝細胞を 10 及び 1,000 nmol/L の[^{3}H]-Eic-インスリン イコデクと 4 時間インキュベートした後、代謝物プロファイルを分析した。14 種類の代謝物及びインスリン イコデクが認められた。このうち 9 種類の代謝物がヒト肝細胞で認められた。ラットの培養肝細胞では、9 種類すべてのヒト代謝物が認められたが、ウサギ及びイヌの培養肝細胞ではそれぞれ 8 種類及び 7 種類のヒト代謝物が認められた。このことから、ヒト肝細胞における *in vitro* 代謝物はすべて毒性試験に用いた動物種で認められ、ヒト特有の代謝物は認められないことが明らかにされた。

インスリン分解酵素による代謝（M 2.6.5.10.B, 214386）

分解速度及び切断部位を比較するため、インスリン イコデク及びヒトインスリンを IDE とインキュベートした。IDE はヒトインスリンの代謝クリアランスにおいて重要な役割を担っていると報告されている。インキュベーション試料を経時的に観察し、液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC-MS）により分析してタンパク質分解産物の分子量データを収集し、各インスリンの生成量の多い 15 種の代謝物を評価した。インスリン イコデクの *in vitro* での半減期はヒトインスリンの 180 倍長かった（6 時間 vs 2 分）。切断特異性を比較すると、同定された 11 箇所のうち 9 箇所が両インスリンに共通していた。インスリン イコデクの代謝物は主に B 鎖の複数の切断による産物であったが、ヒトインスリンの代謝物は主に A 鎖及び B 鎖の切断による産物であった。

2.6.4.5.2 *In vivo* 代謝

ラット、イヌ及びヒトに皮下投与時のインスリン イコデクの *in vivo* 代謝を放射能検出器付高速液体クロマトグラフィー（HPLC-RAD）又は LC-MS により検討した。*In vivo* 代謝試験の概要を表 2.6.4-5 に示す。

表 2.6.4-5　インスリン イコデク投与時の *in vivo* 代謝試験

Species	Sex	Dose (nmol/kg)	Dosing	Radioactivity dose (MBq/kg)	Position of radiolabel	Metabolism analysis[a]	Study ID
Rat	M	75	Single dose	50	Eic	plasma, urine, faeces, bile	213016
Rat	M	75	Single dose	50	ADO	Plasma	314926
Rat	M+F	100	Repeat dosing (once daily)	-	-	Plasma	212065
Dog	M	18	Single dose	20	ADO	plasma, urine, faeces	317011
Human[b]	M	24	Repeat dosing (once weekly)	-	-	Serum	316976

[a]Analysis with HPLC-RAD or LC-MS. [b]Subjects with type 2 diabetes (Trial NN1436-4314)
- = not applicable

ラット

Sprague Dawley 系ラットに[^{3}H]-ADO-インスリン イコデク 75 nmol/kg を単回皮下投与時の代謝物プロファイルを検討し、血漿中代謝物の構造を同定した（M 2.6.5.9.D, 314926）。インスリン イコデク及び 1 種類の代謝物ピークが認められ、その相対的曝露量を表 2.6.4-6 に示す。投与後 168 時間まで採取したすべての試料においてインスリン イコデクが血漿中の主たる成分であった。血漿中代謝物はインスリン イコデクの遊離 B 鎖である B^{1-29}-(C_{20})であった（図 2.6.4-4）。

雄性 Sprague Dawley 系ラットに[^{3}H]-Eic-インスリン イコデク 75 nmol/kg を単回皮下投与時の血漿中（M 2.6.5.9.A, 213016）、尿、糞及び胆汁中（M 2.6.5.9.B, 213016）の代謝物プロファイルも検討した。血漿中ではインスリン イコデク及び 2 種類の代謝物ピークが認められ、それぞれ AUC_{0-96h} の 72.6%、3.0%及び 2.0%であった。尿、糞及び胆汁中ではそれぞれ 11 種類、9 種類及び 13 種類の代謝物ピークが認められた。投与後 168 時間まで採取した尿及び糞中の個々の代謝物は、それぞれ投与量の 0.04～0.23%及び 0.24～7.49%であった。投与後 48 時間まで採取した胆汁中の個々の代謝物は投与量の 0.06～2.52%であった。排泄物中の多数の代謝物から、インスリン イコデクがより小さく、極性の高い代謝物に広範に分解されてから排泄されることが示される。トリチウム水が血漿中の総 AUC_{0-96h} の 21%であり、尿、糞及び胆汁中では投与量のそれぞれ 20%、13%及び 4.0%であった。トリチウム水はトリチウム標識 C_{20} 脂肪酸側鎖の β 酸化による代謝分解の結果生成されたもので、代謝物ではないと判断された。

最後に、ラットを用いた 8 週間毒性試験で採取した雌雄ラットの血漿試料を用いて代謝物の構造を同定した（M 2.6.5.9.C, 212065）。投与 1 及び 49 日の t_{max} に採取した血漿を LC-MS により分析した。ラットの血漿中代謝物はジスルフィド結合の還元、タンパク質切断及び脱アミドによる産物と同定された。代謝物の構造は B^{1-29}-(C_{20})、B^{24-29}-(C_{20})及び B^{29}-(C_{20})であった（図 2.6.4-4）。また、血漿中でインスリン イコデクの異性体及び脱アミド体が認められ、特徴付けられた。

表 2.6.4-6　　ラット、イヌ及びヒトにおいて同定された血漿中代謝物の曝露量

Matrix	Test substance / Metabolites	Relative plasma exposure			
		Rat	Dog	Human	Human
			Single dose (% of total AUC_{last})		Repeated dose[c] (% of total AUC_{tau})
Plasma or serum	Insulin icodec	97.7	80.7	92.1	85.3
	B^{1-29}-(C_{20})	2.29	9.49	5.60	11.3
	B^{2-29}-(C_{20})	<LLOD	3.20	NQ	NQ[b]
	B^{24-29}-(C_{20})	<LLOD[a]	1.90	<LLOD	0.74
	B^{29}-(C_{20})	<LLOD[a]	4.75	2.33	2.64

[a]These metabolites were detected in rat plasma after repeated dosing, but not quantified (study ID 212065)
[b]Not quantified, but estimated relative exposure of ca 1% of based on the B^{2-29}-(C_{20}) ion intensity in LC-MS analysis.
[c]AUC_{tau} after the 5th weekly dose of insulin icodec
NQ: Not quantified, LLOD = lower limit of detection, AUC_{tau} = area under the curve over a once weekly dosing interval, AUC_{last} = area under the curve from the first to the last time point (168 h in rat and human, and 336 h in dog)

イヌ

雄性ビーグル犬に[^{3}H]-ADO-インスリン イコデク 18 nmol/kg を単回皮下投与時の血漿中（M 2.6.5.9.E, 317011）、尿及び糞中（M 2.6.5.9.F, 317011）の代謝物プロファイルを検討し、血漿中（M 2.6.5.9.G, 319052）及び尿中（M 2.6.5.9.H, 321418）代謝物の構造を同定した。

血漿中ではインスリン イコデク及び 8 種類の代謝物が認められ、定量した。すべての試料においてインスリン イコデクが血漿中の主たる成分であった。生成量の多い 4 種類の血漿中代謝物はジスルフィド結合の還元及びタンパク質切断による産物であった。これらの代謝物の構造は $B^{1\text{-}29}$-(C_{20})、$B^{2\text{-}29}$-(C_{20})、$B^{24\text{-}29}$-(C_{20})及び B^{29}-(C_{20})であった（図 2.6.4-4）。投与後 336 時間にわたり採取したすべての試料においてインスリン イコデクが血漿中の主たる成分であった。インスリン イコデク及び同定された 4 種類の代謝物は総 AUC の 93%であった（表 2.6.4-6）。

尿中ではインスリン イコデク及び 15 種類の代謝物ピークが認められ、糞中では 17 種類の代謝物ピークが認められた。投与後 336 時間まで採取した尿及び糞中の個々の代謝物は、それぞれ投与量の 0.13～12.5%及び 0.11～3.52%であった。生成量の多い 3 種類の尿中代謝物（表 2.6.4-7）はタンパク質の完全な切断及び C_{20} 脂肪酸側鎖の広範な β 酸化による産物で、代謝物の構造はそれぞれ炭素原子 8 個、6 個及び 4 個が残存する B^{29}-(C_8)、B^{29}-(C_6)及び B^{29}-(C_4)であった（図 2.6.4-4）。排泄物中の多数の代謝物及び同定された主たる尿中代謝物の構造から、インスリン イコデクがより小さく、極性の高い代謝物に広範に分解されてから排泄されることが確認された。

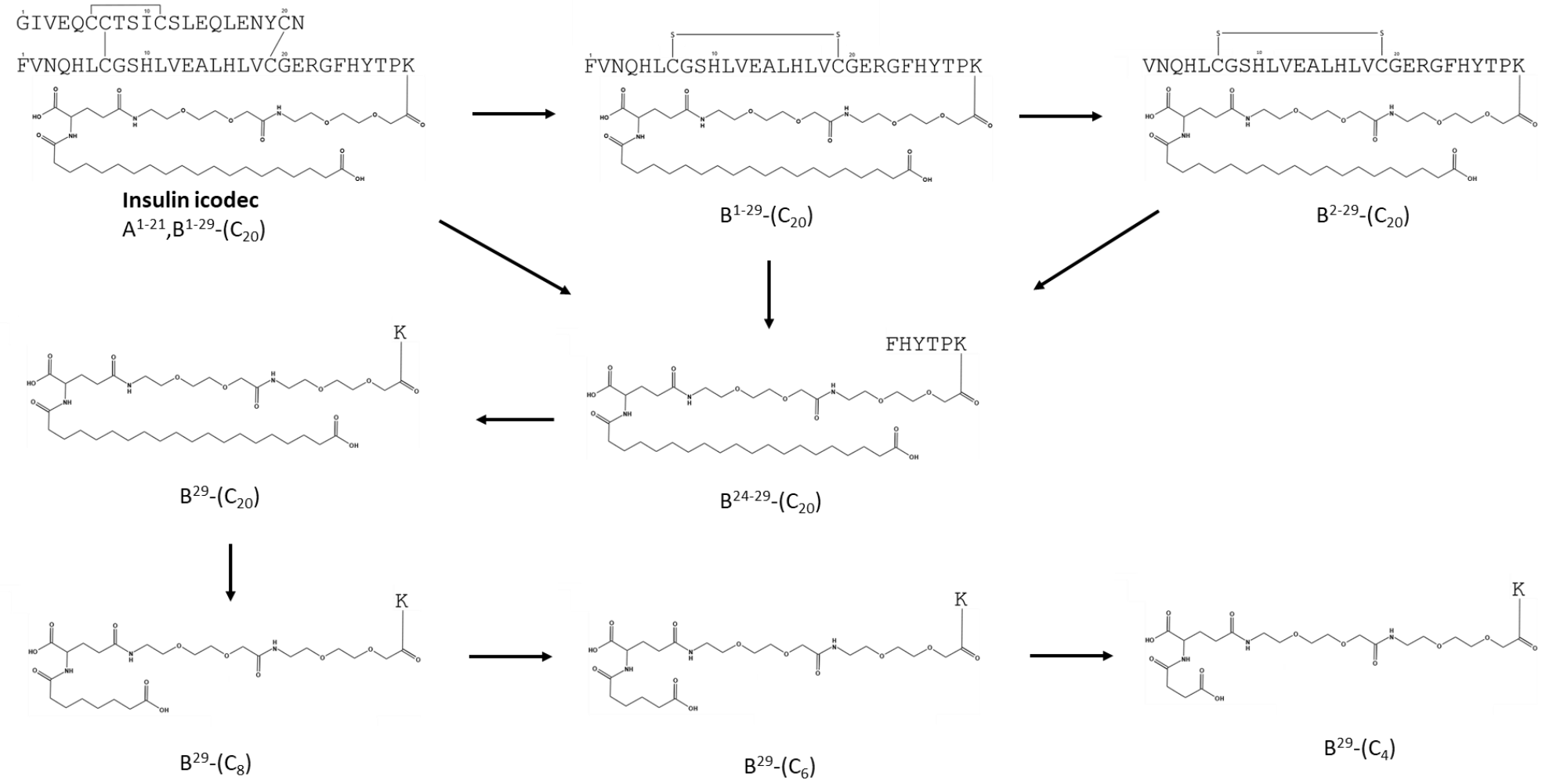
表 2.6.4-7　　イヌの尿中におけるインスリン イコデク及び生成量の多い代謝物の排泄量

Matrix	Test substance / metabolites	Excreted amounts (% of administered dose)
Urine	Insulin icodec	5.62
	B^{29}-(C_4)	12.5
	B^{29}-(C_6)	7.86
	B^{29}-(C_8)	3.27

ヒト

2 型糖尿病を有する男性患者においてインスリン イコデク 24 nmol/kg の週 1 回皮下投与後に採取した血清中の代謝物の構造を同定し（M 2.6.5.9.J, 316976）、定量した（M 2.6.5.9.I, 316976）。同定した 4 種類の代謝物はジスルフィド結合の還元及びタンパク質切断による産物であった。これらの代謝物の構造は $B^{1\text{-}29}$-(C_{20})、$B^{2\text{-}29}$-(C_{20})、$B^{24\text{-}29}$-(C_{20})及び B^{29}-(C_{20})であった（図 2.6.4-4）。さらに、生成量の少ない代謝物としてインスリン イコデクの 2 種類の異性体及び $B^{1\text{-}29}$-(C_{20})代謝物の 2 種類の脱アミド体が同定された（LC-MS で検出されたインスリン イコデクの成分の 1%未満）。同定された代謝物を定量し、その相対的曝露量を表 2.6.4-6 に示す。すべての時点で採取した試料においてインスリン イコデクが血清中の主たる成分であった。ヒトにおいてインスリン イコデク未変化体の尿中排泄量を測定したところ〔4226 試験（M 5.3.3.3）、Section 11.5〕、検出可能なレベルのインスリン イコデクが認められた被験者はごく一部であった。

図 2.6.4-4　　ラット、イヌ及びヒトにおけるインスリン イコデクの推定代謝経路



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 (no metabolite data from rat and human urine)

2.6.4.6　排泄

ラット

胆管カニューレ挿入（BDC）雄性 Sprague Dawley 系ラット（M 2.6.5.14, 212410）及び無処置の雄性 Sprague Dawley 系ラット（M 2.6.5.13.A, 212410）に[^{3}H]-Eic-インスリン イコデク 75 nmol/kg（50 MBq/kg）を単回皮下投与し、放射能の排泄を検討した。蓄積排泄率を表 2.6.4-8 に要約する。無処置の雄性 Sprague Dawley 系ラットにおける投与後 168 時間の平均総回収率は投与した[^{3}H]-インスリン イコデクの 95.1%であった。

イヌ

雄性ビーグル犬に[^{3}H]-ADO-インスリン イコデク 18 nmol/kg を単回皮下投与し、放射能の排泄を検討した（M 2.6.5.13.B, 214108）。蓄積排泄率を表 2.6.4-8 に要約する。投与後 336 時間の平均総回収率は投与した[^{3}H]-インスリン イコデクの 80.8%であった。

表 2.6.4-8　　ラット及びイヌにおける[^{3}H]-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[b]	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. - = not applicable. [a]Sampling 0–24 h post dose. [b]Carcass obtained at end of sampling period

排泄データからインスリン イコデク関連物質の排泄には概して尿及び胆汁／糞が関与していることが示された。

ラットを用いた排泄試験では、投与後 168 時間に残屍中に比較的高い割合の放射能（39%）が認められた。一方、[^{3}H]-Eic-インスリン イコデクを投与したラットでは代謝（β 酸化）及び C_{20} 脂肪酸からのトリチウム（^{3}H 標識水として）の放出後に ^{3}H 標識水が認められた。トリチウム水の生物学的消失は緩徐で、ラットにおける生物学的半減期は約 3 日であることが確認されている[7]。したがって、[^{3}H]-Eic-インスリン イコデク投与後 7 日のラット残屍中に相当量の放射能（^{3}H 標識水）が残存することは予測できないことではなかった。

一方、イヌの残屍中のトリチウム残存量は、代謝的に安定な部位にトリチウムを標識したもう一つの放射能標識体（[^{3}H]-ADO-インスリン イコデク）の投与時では非常に少なかった。

2.6.4.7　薬物動態学的相互作用

血清アルブミン結合の置換（M 2.6.5.6.A, [redacted]120427）

一連の実験において、ヒト血液中の存在量が最も多い脂肪酸であるパルミチン酸による HSA に結合する ^{125}I-インスリン イコデクの置換を検討した。結論として、インスリン イコデクの結合を 50%低下させるためには HSA の 28 倍高い濃度のパルミチン酸が必要である。通常のアルブミン濃度である 4%（600 µmol/L）のパルミチン酸はインスリン イコデクと血清アルブミンとの結合に顕著な影響を及ぼさない。

ラットにおける CYP450 酵素の調節（M 2.6.5.12, 214220）

雌雄 Sprague Dawley 系ラットにインスリン イコデク 20、40、60 及び 80 nmol/kg/日（雄性ラットのみ 80 nmol/kg/日）を 26 週間反復皮下投与し、肝臓における CYP450 酵素活性への影響を検討した。インスリン イコデクの投与により、雄性ラットでは CYP1A、CYP2C、CYP3A 及び CYP2E サブファミリー、雌性ラットでは CYP2B サブファミリーの酵素活性がわずかに上昇した。インスリン イコデク投与後の雄性ラットにおける CYP 活性の上昇は、対照活性の 2.2 倍未満であった。一方、雌性ラットでは、CYP2B 活性の上昇は対照活性の 2 倍未満であった。検討したいずれの CYP 酵素についても明らかな用量依存的な上昇傾向は認められなかったことから、インスリン イコデクは検討した用量では雌雄ラットの CYP450 酵素の調節にほとんど影響を及ぼさず、CYP450 基質のクリアランスへの影響は小さいと考えられた。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

その他の試験は実施していない。

2.6.4.9　考察及び結論

ラット、ウサギ、イヌ及びブタに単回静脈内投与時、単回及び反復皮下投与時のインスリン イコデクの薬物動態を評価した。反復投与後に $t_{1/2}$ 及び投与間隔と一致する蓄積が認められた。ラット、ウサギ及びイヌでは、C_{max} 及び AUC は雌雄いずれにおいても概ね用量比例的に増大し、t_{max} 及び $t_{1/2}$ は投与量、投与期間及び投与頻度と無関係であった。

静脈内投与時と皮下投与時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、半減期延長の主な機序は、他の Basal インスリンでみられる皮下組織からの緩徐な吸収／吸収遅延ではなく、血漿コンパートメントからの緩やかな CL であると考えられる[8]。ラット、イヌ及びブタに静脈内投与時の平均 $t_{1/2}$ は 26～60 時間であり、ラット、イヌ及びブタへの静脈内投与時の平均 $t_{1/2}$ が 15 分未満であるヒトインスリンに比べ大幅に長いことから[9]、ヒトインスリン骨格を修飾してインスリン イコデクを創製した結果、予測された通り薬物動態が根本的に変化したことが示された。

ラット、イヌ及びヒトではインスリン イコデク未変化体が循環血中の主たる成分であった。イヌ及びヒトにおいてインスリン イコデクの 4 種類の循環血中代謝物が同定され、生成量の多い 3 種類の代謝物はラット血漿中でも同定された。ラット及びイヌを用いた毒性試験でこれらの代謝物を定量し、ヒト代謝物の全身曝露を確認した。

ヒトにおける主要な循環血中代謝物は $B^{1\text{-}29}$-(C_{20})であり、インスリン イコデク関連物質の総曝露量の 11%であった。残りの代謝物は $B^{1\text{-}29}$-(C_{20})代謝物のさらなる分解産物であった。インスリン受容体の結合にはインスリンの A 鎖とそのジスルフィド架橋が重要な役割を担っているため、A 鎖が切断された代謝物の構造から、これらの代謝物はインスリン受容体に結合しない[10,11]。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、過剰な薬理作用によるものであるため、これらの代謝物は薬理学的に不活性であり、これらの代謝物による有害作用のリスクは極めて低い。

インスリン イコデク未変化体として尿中（イヌ）に排泄された放射能の割合は低く、多数の代謝物として尿中（ラット、イヌ）、糞中（ラット、イヌ）及び胆汁中（ラット）に排泄された放射能の割合が高かったことから、インスリン イコデクは広範に分解された後、残留代謝物断片として排泄されることが示された。ヒトの尿中へのインスリン イコデク未変化体の排泄量も測定したが、検出可能なレベルのインスリン イコデクが認められた被験者はごく一部であった。

イヌにおける生成量の多い 3 種類の尿中代謝物は、インスリン イコデクの B 鎖ペプチドの完全な切断及び C_{20} 脂肪酸側鎖の広範な β 酸化により生成される代謝物であった。ヒトでも同じ C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体の代謝・排泄経路が認められていることから、この代謝・排泄経路はイヌとヒトに共通するものであることが示唆される。別のアシル化ペプチド治療薬（セマグルチド）を投与したヒトでは[12]、生成量の多い 2 種類の尿中代謝物はインスリン イコデク投与後のイヌの尿中で同定された代謝物と同じであった。同様の脂肪酸側鎖誘導体がインスリン イコデク中のリジンに結合していた。唯一の違いは、セマグルチドの脂肪酸側鎖は 18 個の炭素原子で構成されるのに対して、インスリン イコデクの脂肪酸側鎖は 20 個の炭素原子で構成されることである。

血漿タンパク結合試験により、インスリン イコデクが高い結合能を有し、結合率は検討したすべての動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト）で 99%を超えることが示された。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）よりも高いため、アルブミンと結合したインスリン イコデクが他の薬物によって競合的に置換される可能性は極めて低いと考えられる。したがって、ヒト血清中のアルブミン濃度は、インスリン イコデクよりも 2,000 倍超高くなる。さらに、アルブミン分子 1 個に 7 つの脂肪酸結合部位があり、これによってアルブミンの結合能がさらに高くなっている[13]。

以上より、インスリン イコデクの薬物動態特性ならびに吸収、分布、代謝及び排泄特性は非臨床開発プログラムにおいて十分に検討されたと考えられ、特別な懸念は認められなかった。

参考文献

[1] Food and Drug Administration, CDER. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. May 2001.

[2] Food and Drug Administration, CDER. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Draft Guidance. Sep 2013.

[3] European Medicines Agency. Guideline on Bioanalytical Method Validation (EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 rev. 1 Corr. 2). 21 Jul 2011.

[4] Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, et al. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. Journal of Immunological Methods. 2004;289(1-2):1-16.

[5] Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008;48(5):1267-81.

[6] Ponce R, Abad L, Amaravadi L, Gelzleichter T, Gore E, Green J, et al. Immunogenicity of biologically-derived therapeutics: assessment and interpretation of nonclinical safety studies. Regul Toxicol Pharmacol. 2009;54(2):164-82.

[7] Foy J. The biological half-life of tritiated water in the mouse, rat, guinea-pig and rabbit under tropical conditions and the effect of climate and saline drinking on the biological half-life of tritiated water in the rat. J Cell Comp Physiol. 1964;64(279-82).

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.6.5 薬物動態試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
薬物動態試験の概要表 5
2.6.5.1 薬物動態試験一覧 5
2.6.5.2 分析法及びバリデーション報告書 7
2.6.5.3 吸収（単回投与） 8
2.6.5.3.A [redacted]100102 8
2.6.5.3.B [redacted]100301 8
2.6.5.3.C [redacted]090506 8
2.6.5.3.D [redacted]091001 8
2.6.5.3.E [redacted]100201 (i.v.) 9
2.6.5.3.F [redacted]110501 (i.v.) 9
2.6.5.3.G [redacted]100201 (s.c.) 9
2.6.5.3.H [redacted]110501 (s.c.) 9
2.6.5.3.I [redacted]100902 9
2.6.5.3.J [redacted]160103 9
2.6.5.3.K [^{3}H]-標識体（[^{3}H]ADO-インスリン イコデク）を投与時のラットにおける薬物動態（試験番号：309776） 12
2.6.5.3.L [^{3}H]-標識体（[^{3}H]ADO-インスリン イコデク）を投与時のイヌにおける薬物動態（試験番号 214108） 13
2.6.5.3.M Irwin 法によるプロファイル（試験番号：211472） 14
2.6.5.3.N 心血管系に及ぼす影響（試験番号：211468） 15
2.6.5.3.O ウサギにおける皮下投与試験（試験番号：213152） 16
2.6.5.4 吸収（反復投与） 17
2.6.5.4.A ラットを用いた 4 週間用量範囲設定試験（試験番号：210458） 17
2.6.5.4.B ラットを用いた 8 週間毒性試験（試験番号：211239） 18
2.6.5.4.C ラットを用いた 26 週間毒性試験（試験番号：213297） 19
2.6.5.4.D ラットを用いた 52 週間毒性試験（試験番号：319122） 20
2.6.5.4.E ラットを用いた生殖毒性試験（予備試験）（試験番号：213427） 21
2.6.5.4.F ラットを用いた生殖毒性試験（主要試験）（試験番号：214143） 22
2.6.5.4.G ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（試験番号：321450） 23
2.6.5.4.H ウサギを用いた 2 週間毒性試験（試験番号：213337） 24
2.6.5.4.I ウサギを用いた生殖毒性試験（予備試験）（試験番号：213525） 25
2.6.5.4.J ウサギを用いた生殖毒性試験（主要試験）（試験番号：214091） 26
2.6.5.4.K イヌを用いた 4 週間用量範囲設定試験及び 4 週間最大耐用量試験（試験番号：210459） 27
2.6.5.4.L イヌを用いた 8 週間毒性試験（試験番号：211240） 29
2.6.5.4.M イヌを用いた 26 週間毒性試験（試験番号：213222） 30

2.6.5.4.N　ブタを用いた反復投与試験（試験番号：[redacted]101101）.....32
2.6.5.5　組織分布.....33
2.6.5.6　血漿タンパク質結合.....36
2.6.5.6.A　血清アルブミン結合（試験番号：[redacted]120427）.....36
2.6.5.6.B　複数の動物種由来のアルブミンに対する結合（試験番号：[redacted]120428）.....37
2.6.5.6.C　マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿中タンパク質に対する *in vitro* 結合（試験番号：212035）.....38
2.6.5.6.D　ヒトアルブミンに対する *in vitro* 結合（試験番号：212036）.....39
2.6.5.7　妊娠又は授乳動物を用いた試験.....40
2.6.5.8　その他の分布試験.....40
2.6.5.9　*In vivo* 代謝.....41
2.6.5.9.A　[^{3}H]Eic-インスリン イコデクを投与時のラットにおける循環血中代謝物（試験番号：213016）.....41
2.6.5.9.B　[^{3}H]Eic-インスリン イコデクを投与時のラットにおける排泄物中代謝物（試験番号：213016）.....42
2.6.5.9.C　ラット血漿中代謝物の構造決定（試験番号：212065）.....45
2.6.5.9.D　[^{3}H]ADO-インスリン イコデクを投与時のラットにおける血漿中代謝物（試験番号：314926）.....47
2.6.5.9.E　[^{3}H]ADO-インスリン イコデクを投与時のイヌにおける血漿中代謝物（試験番号：317011）.....48
2.6.5.9.F　[^{3}H]ADO-インスリン イコデクを投与時のイヌにおける排泄物中代謝物（試験番号：317011）.....49
2.6.5.9.G　[^{3}H]ADO-インスリン イデコクを投与時のイヌにおける血漿中代謝物の構造決定（試験番号：319052）.....51
2.6.5.9.H　[^{3}H]ADO-インスリン イデコクを投与時のイヌにおける尿中代謝物の構造決定（試験番号：321418）.....52
2.6.5.9.I　反復投与時のヒトにおける血清代謝物（試験番号：316976）.....53
2.6.5.9.J　反復投与時のヒトにおける血清代謝物の構造決定（試験番号：316976）.....54
2.6.5.10　*In vitro* 代謝.....56
2.6.5.10.A　肝細胞における種間比較（試験番号：211508）.....56
2.6.5.10.B　インスリン分解酵素による *in vitro* 代謝（試験番号：214386）.....57
2.6.5.11　推定代謝経路.....59
2.6.5.12　薬物代謝酵素誘導／阻害.....60
2.6.5.13　排泄.....61
2.6.5.13.A　[^{3}H]Eic-インスリン イコデクを投与時のラットにおける排泄（試験番号：212410）.....61
2.6.5.13.B　[^{3}H]ADO-インスリン イデコクを投与時のイヌにおける排泄（試験番号：214108）.....62
2.6.5.14　胆汁中排泄.....63
2.6.5.15　薬物相互作用.....64

2.6.5.16　その他の薬物動態試験.....64

薬物動態試験の概要表

2.6.5.1 薬物動態試験一覧

Test article: insulin icodec

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP Compliant	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Absorption						
Single dose (pharmacology)						
PK	Wister rat	i.v.	No	Novo Nordisk	[redacted]100102	4.2.2.2-1
PK and PD	SD rat	s.c.	No	Novo Nordisk	[redacted]100301	4.2.2.2-2
PK	Beagle dog	i.v.	No	Novo Nordisk	[redacted]090506	4.2.2.2-3
PK	Beagle dog	s.c.	No	Novo Nordisk	[redacted]091001	4.2.2.2-4
PK	LYD pig	i.v. and s.c.	No	Novo Nordisk	[redacted]100201	4.2.2.2-5
PK	LYD pig	i.v. and s.c.	No	Novo Nordisk	[redacted]110501	4.2.2.2-6
Dose escalation	LYD pig	s.c.	No	Novo Nordisk	[redacted]100902	4.2.2.2-7
PK	LYD pig	s.c.	No	Novo Nordisk	[redacted]160103	4.2.1.1-23
Single dose (ADME)						
PK (radioactivity)	SD rat	s.c.	No	[redacted]	309776	4.2.2.4-4
PK (radioactivity)	Beagle dog	s.c.	No	[redacted]	214108	4.2.2.5-2
Single dose (SP and toxicology)						
Irwin profile	Rat	s.c.	Yes	[redacted]	211472	4.2.1.3-1
CV-effects	Dog	s.c.	Yes	[redacted]	211468	4.2.1.3-5
PK in female rabbits	Rabbit	s.c.	Yes	[redacted]	213152	4.2.3.1-1
Repeat dose (toxicology)						
4-week DRF	Rat	s.c.	No	Novo Nordisk	210458	4.2.3.2-1
8-week toxicity	Rat	s.c.	Yes	Novo Nordisk	211239	4.2.3.2-2
26-week toxicity	Rat	s.c.	Yes	[redacted]	213297	4.2.3.2-3
52-week carcinogenicity	Rat	s.c.	Yes	[redacted]	319122	4.2.3.2-4

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP Compliant	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Preliminary fertility and EFD	Rat	s.c.	Yes	[redacted]	213427	4.2.3.5.1-1
Fertility and EFD	Rat	s.c.	Yes	[redacted]	214143	4.2.3.5.1-2
Pre- and post-natal development	Rat	s.c.	Yes	[redacted]	321450	4.2.3.5.3-1
2-week toxicity	Rabbit	s.c.	No	[redacted]	213337	4.2.3.2-5
Preliminary EFD	Rabbit	s.c.	Yes	[redacted]	213525	4.2.3.5.2-1
EFD	Rabbit	s.c.	Yes	[redacted]	214091	4.2.3.5.2-2
4-week DRF with 4-week MTD	Dog	s.c.	No	[redacted]	210459	4.2.3.2-6
8-week toxicity	Dog	s.c.	Yes	[redacted]	211240	4.2.3.2-7
26-week toxicity	Dog	s.c.	Yes	[redacted]	213222	4.2.3.2-8
Repeat dose (pharmacology)						
Multiple dose in pig	LYD pig	s.c.	No	Novo Nordisk	[redacted]101101	4.2.2.2-8
Distribution						
Tissue distribution	Rat	s.c.	Yes	Novo Nordisk	212436	4.2.2.3-1
Albumin binding	Human	*in vitro*	No	Novo Nordisk	[redacted]120427	5.3.2.1
Albumin binding	Rat, dog, pig, human	*in vitro*	No	Novo Nordisk	[redacted]120428	5.3.2.1
Albumin binding	Human	*in vitro*	No	Novo Nordisk	212036	5.3.2.1
Plasma protein binding	Mouse, rat, rabbit, dog, human	*in vitro*	No	Novo Nordisk	212035	5.3.2.1
Metabolism						
Metabolite profiling (plasma)	Rat	s.c.	No	Novo Nordisk	213016	4.2.2.4-2
Metabolite identification	Rat	s.c.	No	Novo Nordisk	212065	4.2.2.4-1
Metabolite profiling (urine and faeces)	Rat	s.c.	No	Novo Nordisk	213016	4.2.2.4-2

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP Compliant	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Metabolite profiling and identification (plasma)	Rat	s.c.	No	Novo Nordisk	314926	4.2.2.4-5
Metabolite profiling (plasma)	Dog	s.c.	No	Novo Nordisk	317011	4.2.2.4-6
Metabolite profiling (urine and faeces)	Dog	s.c.	No	Novo Nordisk	317011	4.2.2.4-6
Metabolite identification (plasma)	Dog	s.c.	No	Novo Nordisk	319052	4.2.2.4-7
Metabolite identification (urine)	Dog	s.c.	No	Novo Nordisk	321418	4.2.2.4-8
Metabolite profiling	Human	s.c.	No	Novo Nordisk	316976	5.3.2.2
Metabolite identification	Human	s.c.	No	Novo Nordisk	316976	5.3.2.2
In vitro species comparison	Hepatocytes	*in vitro*	No	Novo Nordisk	211508	5.3.2.2
In vitro metabolism	Insulin Degrading Enzyme	*in vitro*	No	Novo Nordisk	214386	5.3.2.2
CYP450 regulation	Rat	s.c.	Yes	[redacted]	214220	4.2.2.4-3
Excretion						
Excretion balance (urine, bile and faeces)	Rat	s.c.	Yes	Novo Nordisk	212410	4.2.2.5-1
Excretion (urine and faeces)	Dog	s.c.	No	Novo Nordisk	214108	4.2.2.5-2
Pharmacokinetic drug interactions						
Displacement of albumin binding	Human albumin	*in vitro*	No	Novo Nordisk	[redacted]120427	5.3.2.1
Other No studies performed						

2.6.5.2 分析法及びバリデーション報告書

Validated LOCI assays for the determination of insulin icodec in plasma from rats and dogs were developed (Nonclinical Summary 2.6.4.2).

2.6.5.3 吸收（单回投与）

Test article: insulin icodec

Study ID	2.6.5.3.A [redacted]100102	2.6.5.3.B [redacted]100301	2.6.5.3.C [redacted]090506	2.6.5.3.D [redacted]091001
Location in CTD	4.2.2.2-1	4.2.2.2-2	4.2.2.2-3	4.2.2.2-4
Species	Wistar rat	SD rat	Beagle dog	Beagle dog
Gender (M/F) / Number of animals	Male, n=5	Male, n=6 per group	Male, n=4	Male, n=6
Feeding condition	Fed	Fed	Fasted 6 hours, fed thereafter	Fasted 6 hours, fed thereafter
Vehicle/Formulation	1.6 µM	2.125 mM, 3.6 zn/6 ins	16 µM	1.7 mM, 7.1 zn/6 ins
Method of Administration	i.v.	s.c.	i.v.	s.c.
Dose (nmol/kg)	1.6	121, 236 & 479 (~ 43,85 & 170 nmol/rat)	1.6 nmol/kg	17
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec
Assay	LOCI/Assay I	LOCI/Assay I	LOCI/Assay I	LOCI/Assay I
PK parameters:				
T_{max} (h) (median value)	-	121) 6 236) 4 479) 2	-	24
C_{max}/D (pM/(nmol/kg))	-	121) 9231 236) 8752 479) 13158	-	6218
AUC/D (h×pM/(nmol/kg))	234,000	121) 326,000 236) 309,000 479) 409,000	1,130,000	720,000
(Time for calculation – h)	Predicted AUC_{inf} based on 0-48 h PK & $T_{½}$	Predicted AUC_{inf} based on 0-92 h PK & $T_{½}$	Predicted AUC_{inf} based on 0-168 h PK & $T_{½}$	Predicted AUC_{inf} based on 0-168 h PK & $T_{½}$
$T_{1/2}$ (h)	26	All: 20	60	56
(Time for calculation – h)	Terminal part of 0-48 h PK	Terminal part of 0-92 h PK	Terminal part of 0-168 h PK	Terminal part of 0-168 h PK

Study ID	2.6.5.3.E [redacted]10 0201 (i.v.)	2.6.5.3.F [redacted]11 0501 (i.v.)	2.6.5.3.G [redacted]10 0201 (s.c.)	2.6.5.3.H [redacted]11 0501 (s.c.)	2.6.5.3.I [redacted]100 902	2.6.5.3.J [redacted]160 103
Location in CTD	4.2.2.2-5	4.2.2.2-6	4.2.2.2-5	4.2.2.2-6	4.2.2.2-7	4.2.1.1-23
Species	LYD pig	LYD pig	LYD pig	LYD pig	LYD pig	LYD pig
Gender (M/F) / Number of animals	Female, n=4 per group	Female n=4 per group	Female n=4 per group	Female n=4 per group	Female n=2 per group	Female n=6, 5 & 7
Feeding condition	Fed	Fed	Fed	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	170 µM	200 µM	**a**) 1.7 mM, 7.1 [redacted]/6 ins **b**) 3.6 mM, 3.6 [redacted]/6 ins **c**) 7.1 mM, 3.6 [redacted]/6 ins	all ~4.0 mM **a**) 3.0 [redacted]/6 ins **b**) 4.0 [redacted]/6 ins **c**) 4.2 [redacted]/6 ins **d**) 4.8 [redacted]/6 ins **e**) 5.1 [redacted]/6 ins **f**) 5.5 [redacted]/6 ins **g**) 6.4 [redacted]/6 ins	7.1 mM 4.7 [redacted]/6 ins (phenol+metacresol)	all ~4.2 mM **a**) 2.3 [redacted]/6 ins (25/25mM phenol+metacresol) **b**) 2.3 [redacted]/6 ins (60/10mM phenol+metacresol) **c**) 4.5 [redacted]/6 ins (25/25mM phenol+metacresol)
Method of Administration	i.v.	i.v.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.
Dose (nmol/kg)	1.7 nmol/kg	2.0 nmol/kg	8.5 nmol/kg	10 nmol/kg (8.8-10.0)	Dose escalation: 8.5, 17, 25.5 & 34 nmol/kg	10 nmol/kg
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec
Assay	LOCI/Assay I	LOCI/Assay II	LOCI/Assay I	LOCI/Assay II	LOCI/Assay I	LOCI/Assay II

Study ID	2.6.5.3.E [redacted]10 0201 (i.v.)	2.6.5.3.F [redacted]11 0501 (i.v.)	2.6.5.3.G [redacted]10 0201 (s.c.)	2.6.5.3.H [redacted]11 0501 (s.c.)	2.6.5.3.I [redacted]100 902	2.6.5.3.J [redacted]160 103
Location in CTD	4.2.2.2-5	4.2.2.2-6	4.2.2.2-5	4.2.2.2-6	4.2.2.2-7	4.2.1.1-23
PK parameters: T_{max} (h) (median value)			**a**) 6 **b**) 24 **c**) 32	**a**) 6 **b**) 28 **c**) 32 **d**) 32 **e**) 32 **f**) 28 **g**) 20	**8.5**) 32 **17**) 32 **25.5**) 32 **34**) 52	**a**) 7 **b**) 8 **c**) 20
Cmax/D (pM/(nmol/kg))			**a**) 6565 **b**) 5809 **c**) 5714	**a**) 6413 **b**) 5699 **c**) 5963 **d**) 6190 **e**) 6932 **f**) 7099 **g**) 7120	**8.5**) 3130 **17**) 3565 **25.5**) 3550 **34**) 3175	**a**) 6899 **b**) 7883 **c**) 5555
AUC/D (h×pM/(nmol/kg))	523,000	720,000	**a**) 490,000 **b**) 542,000 **c**) 445,000	**a**) 555,000 **b**) 561,000 **c**) 699,000 **d**) 694,000 **e**) 617,000 **f**) 617,000 **g**) 696,000	**8.5**) 295,000 **17**) 396,000 **25.5**) 338,000 **34**) NA (one pig in terminal phase)	**a**) 536,000 **b**) 604,000 **c**) 514,000
(Time for calculation – h) $T_{1/2}$ (h)	Predicted AUC_{inf} based on 0-168 h PK & $T_{½}$ 44	Predicted AUC_{inf} based on 0-168 h PK & $T_{½}$ 42	Predicted AUC_{inf} based on 0-168 h PK & $T_{½}$ **a**) 40 **b**) 42 **c**) 37	Predicted AUC_{inf} based on 0-168 h PK & $T_{½}$ **a**) 46 **b**) 48 **c**) 53 **d**) 48 **e**) 45	Predicted AUC_{inf} based on 0-240 h PK & $T_{½}$ **8.5**) 44 **17**) 44 **25.5**) 42 **34**) NA (one pig in terminal phase)	Predicted AUC_{inf} based on 0-240 h PK & $T_{½}$ **a**) 46 **b**) 47 **c**) 45

Study ID	2.6.5.3.E [redacted]10 0201 (i.v.)	2.6.5.3.F [redacted]11 0501 (i.v.)	2.6.5.3.G [redacted]10 0201 (s.c.)	2.6.5.3.H [redacted]11 0501 (s.c.)	2.6.5.3.I [redacted]100 902	2.6.5.3.J [redacted]160 103
Location in CTD	4.2.2.2-5	4.2.2.2-6	4.2.2.2-5	4.2.2.2-6	4.2.2.2-7	4.2.1.1-23
(Time for calculation – h)	Terminal part of 0-168 h PK	Terminal part of 0-168 h PK	Terminal part of 0-168 h PK	**f**) 46 **g**) 54 Terminal part of 0-168 h PK	Terminal part of 0-240 h PK	Terminal part of 0-240 h PK

2.6.5.3.K [^{3}H]-標識体（[^{3}H]ADO-インスリン イコデク）を投与時のラットにおける薬物動態（試験番号：309776）

Location in CTD: 4.2.2.4-4
Study ID: 309776

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: Pharmacokinetics following a single subcutaneous administration to the rat

Dose:	75 nmol/kg and 50 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec				
Vehicle:	15 mg/ml glycerol, 5.65 mg/ml phenol, 1.08 mg/ml metacresol, 1.17 mg/ml sodium chloride and 0.9 µg/ml zinc acetate, pH 7.4				
Route of Administration:	Subcutaneous				
Feeding condition:	Fed				
Species:	Sprague Dawley Rat				
Gender/Number of rats	9M				
Analyte	Radioactivity				
Assay	Liquid scintillation counting				
	PK parameters in plasma		**Whole blood: plasma radioactivity ratios**		
	Non freeze-dried	**Freeze-dried**	**Time (h)**	**Non freeze-dried**	**Freeze-dried**
t_{max} (h)	12	12	4	0.606	0.571
$T_{½}$ (h) [a]	21.4	21.4	8	0.666	0.610
C_{max} (pmol/L)	354000	379000	12	0.639	0.599
AUC_{last} (h x pmol/L)	12800000	13500000	24	0.544	0.573
AUC_{inf} (h x pmol/L)	12900000	13600000	48	0.637	0.583
			72	0.666	0.577
			96	0.630	0.567
			168	0.640	0.581

[a]Terminal samples from one animal per time point (totally nine time/data points)

2.6.5.3.L [^{3}H]-標識体（[^{3}H]ADO-インスリン イコデク）を投与時のイヌにおける薬物動態（試験番号 214108）

Location in CTD: 4.2.2.5-2
Study ID: 214108

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: A study of disposition in plasma, urine and faeces following a single subcutaneous administration to the dog

Dose:	18 nmol/kg and 20 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec				
Vehicle:	15 mg/mL glycerol, 5.65 mg/mL phenol, 1.08 mg/mL metacresol, 1.17 mg/mL sodium chloride and 0.45 µg/mL zinc acetate, pH 7.4				
Route of Administration:	Subcutaneous				
Feeding condition:	Fed				
Species:	Beagle dog				
Gender/Number of rats	2M				
Analyte	Radioactivity				
Assay	Liquid scintillation counting				
	PK parameters in plasma (mean)		**Whole blood: plasma radioactivity ratios (mean)**		
	Non freeze-dried	**Freeze-dried**	**Time (h)**	**Non freeze-dried**	**Freeze-dried**
t_{max} (h)	24	24	4	0.53	0.47
$T_{½}$ (h)	77.2	78.8	8	0.51	0.50
C_{max} (pmol/L)	145000	148000	16	0.56	0.50
AUC_{last} (h x pmol/L)	18400000	18600000	24	0.53	0.51
AUC_{inf} (h x pmol/L)	19500000	19700000	48	0.54	0.49
			72	0.51	0.49
			96	0.57	0.56
			120	0.52	0.53
			168	0.51	0.50
			192	0.48	0.50
			240	0.49	0.52
			336	0.64	0.64

2.6.5.3.M　Irwin 法によるプロファイル（試験番号：211472）

Location in CTD: 4.2.1.3-1
Study ID: 211472

Species	**Rat**		
Gender (M/F) / Number of animals	Males/6/dose		
Feeding condition	fed		
Vehicle/Formulation	16 mg/mL Glycerol, 2.70 mg/mL metacresol, 1.17mg/mL NaCl, (pH 7.4)		
Method of Administration	s.c.		
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	plasma		
Analyte	insulin icodec		
Assay	LOCI		
PK parameters: (± SD)			
Dose (nmol/kg)	**25**	**75**	**150**
t_{max} (h)	24	24	24
C_{max} (pmol/L)	92,100 ± 4,180	333,000 ± 18,200	66,200 ± 126,000
AUC_{last} (h×pmol/L)	3,340,000	11,400,000	23,900,000
$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	NC
Additional Information:	NC – Not calculated		

2.6.5.3.N　心血管系に及ぼす影響（試験番号：211468）

Location in CTD: 4.2.1.3-5
Study ID: 211468

Species	**Dog**		
Gender (M/F) / Number of animals	Males/6/dose		
Feeding condition	fed		
Vehicle/Formulation	16 mg/mL Glycerol, 2.70 mg/mL metacresol, 1.17mg/mL NaCl, (pH 7.4)		
Method of Administration	s.c.		
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	plasma		
Analyte	insulin icodec		
Assay	LOCI		
PK parameters: (± SD)			
Dose (nmol/kg)	**7**	**14**	**21**
t_{max} (h)	21.75	21.75	21.75
C_{max} (pmol/L)	33,600 ± 1,680	75,400 ± 9,800	116,000 ± 4,460
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	566,000 ± 73,100	1,370,000 ± 157,000	2,160,000 ± 147,000
$t_{1/2}$ (h)	44 - 50	43 - 52	64 - 76

2.6.5.3.O　ウサギにおける皮下投与試験（試験番号：213152）

Location in CTD: 4.2.3.1-1
Study ID: 213152

Species	**Rabbit**
Gender (M/F) / Number of animals	Females/5/dose
Feeding condition	fed
Vehicle/Formulation	
Method of Administration	s.c.
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	plasma
Analyte	insulin icodec
Assay	LOCI
PK parameters: (mean ± SD)	
Dose (nmol/kg)	**10**
t_{max} (h)*	8 - 12
C_{max} (pmol/L)	68,600 ± 5,260
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	1,360,000 ± 101,000
AUC (h×pmol/L)	3,250,000 ± 157,000
$t_{1/2}$ (h)**	25 ± 2

* Range (min - max)

**N=4. $t_{½}$ could not be calculated in one rabbit due to missing data in the terminal elimination phase.

2.6.5.4 吸収（反復投与）

Test article: insulin icodec

2.6.5.4.A ラットを用いた 4 週間用量範囲設定試験（試験番号：210458）

Location in CTD: 4.2.3.2-1
Study ID: 210458

Species		**Rats**					
Gender (M/F) / Number of animals		6M+6F/dose					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation							
Method of Administration		Daily s.c.					
Sample		plasma					
Analyte		insulin icodec					
Assay		LOCI					
PK parameters:							
Dose (nmol/kg)		75		150		250/150*	
Day		1	28	1	28	1	28
t_{max} (h)	**Males**	8	8	8	4	6	8
	Females	8	6	8	4	4	6
C_{max} (pM)	**Males**	582,000	1,295,000	1,055,000	2,810,000	1,920,000	2,955,000
	Females	642,000	1,285,000	1,195,000	2,575,000	1,885,000	2,965,000
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*pmol/L)	**Males**	11,060,000	26,380,000	21,420,000	57,660,000	36,000,000	60,130,000
	Females	11,480,000	24,470,000	22,630,000	50,120,000	35,820,000	52,870,000
$t_{1/2}$ (h)	**Males**	NC	NC	NC	37	34	NC
	Females	NC	20	NC	30	NC	25
Additional Information:		*Due to low blood glucose the dose was reduced from 250 to 150 nmol/kg from day 9 No gender differences in PK, dose proportional increase in exposure, accumulation in line with half-life and dosing frequency. NC – Not calculated					

2.6.5.4.B　ラットを用いた 8 週間毒性試験（試験番号：211239）

Location in CTD: 4.2.3.2-2
Study ID: 211239

Species		**Rats**					
Gender (M/F) / Number of animals		10M+10F/dose					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation							
Method of Administration		Daily s.c.					
Sample		plasma					
Analyte		insulin icodec					
Assay		LOCI					
PK parameters:							
Dose (nmol/kg)		25		75		150/100*	
Day		1	56	1	52^{+}	1	49^{+}
t_{max} (h)	**Males**	8	0	8	4	8	8
	Females	8	0	8	24	8	0
C_{max} (pM)	**Males**	109,000	599,000	339,000	1,370,000	676,000	2,130,000
	Females	137,000	321,000	422,000	1,770,000	694,000	1,980,000
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Males**	2,150,000	9,050,000	6,830,000	23,400,000	12,600,000	43,300,000
	Females	2,360,000	5,730,000	7,210,000	40,100,000	12,600,000	38,300,000
$AUC_{0\text{-}168h}$ (h×pmol/L)	**Males**	NC	22,000,000	NC	83,900,000	NC	140,000,000
	Females	NC	12,600,000	NC	139,000,000	NC	111,000,000
AUC (h×pmol/L)	**Males**	NC	NR	NC	90,400,000	NC	154,000,000
	Females	NC	12,600,000	NC	NR	NC	NR
$t_{1/2}$ (h)	**Males**	NC	NR	NC	39	NC	40
	Females	NC	22	NC	NR	NC	NR
Additional Information:		*Due to low blood glucose the dose was reduced from 150 to 100 nmol/kg from day 28. $^{+}$ The intermediate and high dose groups were entered into the recovery phase early due to low blood glucose. No gender differences in PK, dose proportional increase in exposure on Day 1 very variable following the last day of dosing, accumulation somewhat higher than expected from half-life and dosing frequency. Anti-insulin icodec antibodies were formed in the majority of animals, but no consistent effect on PK or PD observed. NC – Not calculated, NR – Not reportable					

2.6.5.4.C　ラットを用いた 26 週間毒性試験（試験番号：213297）

Location in CTD: 4.2.3.2-3
Study ID: 213297

Species		**Rats**											
Gender (M/F) / Number of animals		15M+15F/dose											
Feeding condition		Fed											
Vehicle/Formulation													
Method of Administration		Daily s.c.											
Sample		Plasma											
Analyte		insulin icodec											
Assay		LOCI											
PK parameters:													
Dose (nmol/kg)		20			40			60			80		
Week		-1	13	26	-1	13	26	-1	13	26	-1	13	26
t_{max} (h)	**Males**	4	4	8	8	8	4	8	8	4	8	8	8
	Females	8	8	2	4	4	4	8	8	8	NA	NA	NA
C_{max} (pM)	**Males**	82,800	175,000	210,000	194,000	397,000	392,000	259,000	621,000	581,000	331,000	892,000	897,000
	Females	75,600	180,000	170,000	153,000	532,000	445,000	238,000	547,000	573,000	NA	NA	NA
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Males**	1,430,000	3,490,000	4,340,000	3,250,000	8,520,000	8,920,000	4,750,000	12,700,000	12,500,000	5,680,000	17,800,000	18,600,000
	Females	1,340,000	3,600,000	3,290,000	2,730,000	7,800,000	8,000,000	4,210,000	12,000,000	12,400,000	NA	NA	NA
AUC (h×pmol/L)	**Males**	2,350,000	NC	9,390,000	5,020,000	NC	20,200,000	7,830,000	NC	31,700,000	9,590,000	NC	45,500,000
	Females	2,290,000	NC	6,640,000	4,600,000	NC	16,300,000	6,870,000	NC	24,700,000	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	**Males**	15.5	NC	25	15.7	NC	27.3	16	NC	26.5	17	NC	26
	Females	16.1	NC	21.2	16.9	NC	21.3	15.6	NC	19.4	NA	NA	NA
Additional Information:		Exposure increased approximately proportional to the increase in dose for single dose as well as steady state. Accumulation index, Rac_{Obs}, of 2.4 to 3.3 was slightly higher than what was expected from the half-life (1.5-2.2). Anti-insulin icodec antibodies were formed in 7% of animals dosed. NC – Not calculated, NA – Not applicable											

2.6.5.4.D　ラットを用いた 52 週間毒性試験（試験番号：319122）

Location in CTD: 4.2.3.2-4
Study ID: 319122

Species		**Rats**															
Gender (M/F) / Number of animals		20M+20F/dose												20M+20F/dose			
Feeding condition		Fed												Fed			
Vehicle/Formulation																	
Method of Administration		Daily s.c.												Daily s.c.			
Sample		Plasma												Plasma			
Analyte		insulin icodec												Human insulin			
Assay		LOCI												LOCI			
PK parameters:																	
Dose (nmol/kg)		20			30			40			60			40			
Week		1	24	50	1	24	50	1	24	50	1	24	50	1	24	50	
t_{max} (h)	**Males**	4	4	0	NA	NA	NA	8	4	2	8	4	2	2	2	2	
	Females	8	4	8	4	8	4	8	8	24	NA	NA	NA	2	2	2	
C_{max} (pM)	**Males**	93,900	242,000	213,000	NA	NA	NA	182,000	594,000	434,000	331,000	993,000	1,520,000	2,650	25,100	22,300	
	Females	99,900	201,000	187,000	155,000	399,000	262,000	230,000	521,000	484,000	NA	NA	NA	1,670	19,700	13,100	
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Males**	1,800,000	5,310,000	4,580,000	NA	NA	NA	3,630,000	11,800,000	8,920,000	6,340,000	20,400,000	18,000,000	NC	162,000	106,000	
	Females	1,890,000	4,040,000	3,950,000	2,660,000	7,880,000	5,680,000	4,090,000	9,840,000	10,700,000	NA	NA	NA	NC	NC	53,000	
Additional Information:		In general, the t_{max} ranged from 2 to 8 hours across dose groups and days. The steady state exposure of NNC0148-0287 increased with increasing dose and no sex difference was observed. Accumulation from single dose to steady state of NNC0148-0287 was similar that in previous repeat toxicity studies in rats. Steady state exposure of Human Insulin was the same on Day 169 and 351 with no accumulation observed. The exposure Human Insulin was slightly higher in males. NC – Not calculated, NA – Not applicable															

2.6.5.4.E　ラットを用いた生殖毒性試験（予備試験）（試験番号：213427）

Location in CTD: 4.2.3.5.1-1
Study ID: 213427

Species		**Rats**								
Gender (M/F) / Number of animals		8M+8F/dose								
Feeding condition		Fed								
Vehicle/Formulation										
Method of Administration		Daily s.c.								
Sample		Plasma								
Analyte		insulin icodec								
Assay		LOCI								
PK parameters:										
Dose (nmol/kg)		20		40			60			100
Day		6	17	6	17	26	6	17	26	26
t_{max} (h)	**Males**	NA	NA	NA	NA	4	NA	NA	8	8
	Females	4	8	8	8	NA	4	8	NA	NA
C_{max} (pM)	**Males**	NA	NA	NA	NA	404,000	NA	NA	688,000	1,020,000
	Females	174,000	127,000	350,000	317,000	NA	560,000	396,000	NA,	NA
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Males**	NA	NA	NA	NA	7,530,000	NA	NA	13,600,000	21,200,000
	Females	3,100,000	2,260,000	6,860,000	4,870,000	NA	10,300,000	6,740,000	NA	NA
Additional Information:		Dose proportionality was indicated for both C_{max} and $AUC_{0\text{-}24h}$ in males and females. The exposure in the mated females decreased approximately 20-30% between Day 6 and 17, as seen from mean Rac_{Obs} values for C_{max} and $AUC_{0\text{-}24hr}$ of 0.78 and 0.70, respectively. NC – Not calculated, NA – Not applicable								

2.6.5.4.F　ラットを用いた生殖毒性試験（主要試験）（試験番号：214143）

Location in CTD: 4.2.3.5.1-2
Study ID: 214143

Species		**Rats**								
Gender (M/F) / Number of animals		22M+22F/dose + 3F Satellite animals								
Feeding condition		Fed								
Vehicle/Formulation										
Method of Administration		Daily s.c.								
Sample		Plasma								
Analyte		insulin icodec								
Assay		LOCI								
PK parameters:										
Dose (nmol/kg)		10		30		40	60			100
Day		6	17	6	17	24	6	17	24	24
t_{max} (h)	**Males**	NA	NA	NA	NA	8	NA	NA	12	4
	Females	8	8	4	8	NA	8	4	NA	NA
C_{max} (pM)	**Males**	NA	NA	NA	NA	302,000	NA	NA	656,000	1,050,000
	Females	91,500	64,800	280,000	263,000	NA	626,000	416,000	NA	NA
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Males**	NA	NA	NA	NA	6,330,000	NA	NA	13,500,000	21,200,000
	Females	1,830,000	1,190,000	5,600,000	4,340,000	NA	12,800,000	7,240,000	NA	NA
Additional Information:		The dose–normalised $AUC_{0\text{-}24h}$ and C_{max} values were generally comparable for males on Day 24 (from first dose) and females on Day 6 after pairing, where the TK can be assumed independent of pregnancy. The C_{max} and $AUC_{0\text{-}24h}$ increased with increasing dose in both male and female animals. The increase in exposure was approximately proportional to the increase in dose. The exposure in the mated females was approximately 23%−44% lower on Day 17 as compared to Day 6 after pairing, as seen from the Rac_{Obs} values between 0.56 and 0.77. NC – Not calculated, NA – Not applicable								

2.6.5.4.G　ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（試験番号：321450）

Location in CTD: 4.2.3.5.3-1
Study ID: 321450

Species		**Rat**		
Gender (M/F) / Number of animals		Females/15/dose		
Feeding condition		fed		
Vehicle/Formulation				
Method of Administration		s.c.		
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)		plasma		
Analyte		insulin icodec		
Assay		LOCI		
PK parameters:				
Dose (nmol/kg)		**20**	**35**	**50**
t_{max} (h)	Gestation Day 17	8	8	8
	Lactation Day 11	8	4	8
C_{max} (pmol/L)	Gestation Day 17	146,000	250,000	384,000
	Lactation Day 11	161,000	232,000	408,000
AUC_{last} (h×pmol/L)	Gestation Day 17	2,730,000	4,700,000	7,320,000
	Lactation Day 11	2,940,000	4,370,000	7,330,000
Additional Information:	The steady state exposure increased with increasing dose. Exposure measure as C_{max} and $AUC_{0\text{-}24hr}$ did not change from Gestation Day 17 to Lactation Day 11. Litter animals (F1 generation) at the age 11 days were sample at 4 h after parental (F0 generation) dosing: All samples were below LLOQ (300 pmol/L), except for one Male litter in group 3 (1070 pmol/L) and Female litter in group 4 (350 pmol/L).			

2.6.5.4.H　ウサギを用いた 2 週間毒性試験（試験番号：213337）

Location in CTD: 4.2.3.2-5
Study ID: 213337

Species		**Rabbits**					
Gender (M/F) / Number of animals		4F/dose					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation							
Method of Administration		Daily s.c.					
Sample		plasma					
Analyte		insulin icodec					
Assay		LOCI					
PK parameters:							
Dose (nmol/kg)		**25**		**35**		**50**	
Day		1	14	1	14	1	14
t_{max} (h)	**Females**	8 - 24	4 - 8	8 - 24	8	8 -24	4 - 8
C_{max} (pM)	**Females**	158,000 ± 15,600	489,000 ± 49,000	235,000 ± 27,400	709,000 ± 70,900	356,000 ± 58,700	1,040,000 ± 61,600
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Females**	3,120,000 ± 123,000	10,300,000 ± 761,000	4,680,000 ± 453,000	14,900,000 ± 1,140,000	7,060,000 ± 1,110,000	22,600,000 ± 1,080,000
Additional Information:		Exposure increased with dose and the increase appeared to be dose-proportional within the dose range tested. The exposure increased on multiple dosing with the observed Rac_{Obs} based on C_{max} and $AUC_{0\text{-}24h}$ in the range of 2.41 – 3.55 fold and 2.68 – 3.77 fold, respectively.					

2.6.5.4.I　ウサギを用いた生殖毒性試験（予備試験）（試験番号：213525）

Location in CTD: 4.2.3.5.2-1
Study ID: 213525

Species		**Rabbits**					
Gender (M/F) / Number of animals		6F/dose					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation							
Method of Administration		Daily s.c.					
Sample		plasma					
Analyte		insulin icodec					
Assay		LOCI					
PK parameters:							
Dose (nmol/kg)		**12**		**18**		**24**	
Day		2	19	2	19	2	19
t_{max} (h)	**Females**	24	8	24	4	24	4
C_{max} (pM)	**Females**	75,300	221,000	108,000	325,000	145,000	429,000
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Females**	1,410,000	4,670,000	2,150,000	7,320,000	2,930,000	9,370,000
Additional Information:		The C_{max} and $AUC_{0\text{-}24h}$ increased with increasing dose in a dose-proportional manner. The accumulation index, Rac_{Obs}, ranged from 3.2 to 3.4.					

2.6.5.4.J　ウサギを用いた生殖毒性試験（主要試験）（試験番号：214091）

Location in CTD: 4.2.3.5.2-2
Study ID: 214091

Species		**Rabbits**					
Gender (M/F) / Number of animals		18F/dose					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation							
Method of Administration		Daily s.c.					
Sample		plasma					
Analyte		insulin icodec					
Assay		LOCI					
PK parameters:							
Dose (nmol/kg)		**6**		**12**		**18**	
Day		6	19	6	19	6	19
t_{max} (h)	**Females**	4	4	8	4	8	8
C_{max} (pM)	**Females**	120,000	121,000	268,000	288,000	375,000	409,000
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	**Females**	2,290,000	2,590,000	5,600,000	6,020,000	7,640,000	8,370,000
Additional Information:		The C_{max} and $AUC_{0\text{-}24h}$ increased with increasing dose and the increase in exposure was approximately proportional to the increase in dose. The mean accumulation index, Rac_{Obs}, between Day 19 and Day 6 ranged from 1.08 to 1.13. Rac_{Obs} values close to 1 indicate that the steady state exposure in terms of $AUC_{0\text{-}24h}$ did not change during the course of gestation, following once daily s.c. administration from Day 2					

2.6.5.4.K　イヌを用いた 4 週間用量範囲設定試験及び 4 週間最大耐用量試験（試験番号：210459）

Location in CTD: 4.2.3.2-6
Study ID: 210459

Species		**Dogs**							
Gender (M/F) / Number of animals		1M+1F/group/dosing frequency + 1M+2F for MTD phase							
Feeding condition		Fed							
Vehicle/Formulation									
Method of Administration		Daily or twice weekly s.c. administration							
Sample		plasma							
Analyte		insulin icodec							
Assay		LOCI							
PK parameters: (± SD)									
Phase		**DRF**							
Dose (nmol/kg) (group No.)		**10 (gp 1)**		**20 (gp 2)**		**30 (gp 2)**		**40 (gp 1)**	
Day		**1**	**11**	**1**	**11**	**15**	**25**	**15**	**25**
twice weekly dosing	**t_{max} (h)**	24	4 - 24	24	24	24	24	24	2 - 24
	C_{max} (pM)	50,600 ± 15,600	141,000 ± 4,240	140,000 ± 53,000	294,000 ± 36,800	296,000 ± 42,400	358,000 ± 25,500	290,000 ± 2,830	457,000 ± 69,300
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	864,000 ± 175,000	2,890,000 ± 148,000	2,760,000 ± 1,080,000	6,090,000 ± 407,000	5,860,000 ± 851,000	7,630,000 ± 851,000	5,540,000 ± 228,000	10,000,000 ± 1,110,000
	$t_{1/2}$ (h)	52 - 83		45 - 49		59 - 70		56 - 64	
Dose (nmol/kg) (group No.)		**3 (gp 4)**		**6 (gp 5)**		**9 (gp 5)**		**12 (gp 4)**	
Day		**1**	**11**	**1**	**11**	**15**	**25**	**15**	**25[a]**
Daily Dosing	**t_{max} (h)**	24	2 - 4	24	4 - 8	2 - 8	1 - 24	8 - 24	
	C_{max} (pM)	20,000 ± 1,130	134,000 ± 31,800	42,800 ± 2,260	284,000 ± 76,400	197,000 ± 12,700	267,000 ± 29,700	167,000 ± 9,900	
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	351,000 ± 82,100	2,260,000 ± 189,000	814,000 ± 57,100	5,5000,000 ± 902,000	4,170,000 ± 27,4000	6,140,000 ± 805,000	3, 390,000 ± 282,000	
	$t_{1/2}$ (h)	40		42		NC		NC	

Phase		**MTD**		
Dose (nmol/kg)			**20**	
Day		**1 (naïve animals)[b]**	**29[c]**	**57[d]**
Twice weekly dosing	**t_{max} (h)**	24	18 - 24	18 - 24
	C_{max} (pM)	152,000 ± 4,950	280,000 ± 37,000	232,000 ± 102,000
	AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	2,520,000 ± 169,000	6, 080,000 ± 818,000	4,670,000 ± 2,020,000
	$t_{1/2}$ (h)	54 - 56	50 - 67	50 - 149
Dose (nmol/kg)			**6**	
Day		**1 (naïve animal)[e]**	**29[c]**	**57[f]**
Daily dosing	**t_{max} (h)**	24	8 - 18	1 - 24
	C_{max} (pM)	47,600	121,000 ± 35,700	247,000 ± 69,000
	AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	647,000	2,770,000 ± 861,000	5,360,000 ± 1,220,000
	$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	100
Additional Information:		[a]animals not treated from day 22 due to low plasma glucose, [b]2 animals, [c]4 animals, [d]6 animals, [e]1 animal, [f]5 animals, NC – Not Calculated		

2.6.5.4.L　イヌを用いた 8 週間毒性試験（試験番号：211240）

Location in CTD: 4.2.3.2-7
Study ID: 211240

Species		**Dogs**					
Gender (M/F) / Number of animals		3M+3F/dose main group + 2M + 2F/dose recovery group					
Feeding condition		Fed					
Vehicle/Formulation							
Method of Administration		Twice weekly s.c.					
Sample		plasma					
Analyte		insulin icodec					
Assay		LOCI					
Dose (nmol/kg)		**7**		**14**		**21/18***	
Day		1	53	1	53	1	53
t_{max} (h)	**Males**	18 – 24	18	18 – 24	3 - 18	18 – 24	8 - 18
	Females	8 - 24	4 - 8	24	18	18 – 24	18
C_{max} (pM) (± SD)	**Males**	39,800 ± 3,660	66,400 ± 1,690	85,900 ± 6,400	140,000 ± 10,000	119,000 ± 13,300	195,000 ± 18,000
	Females	44,000 ± 4,530	81,400 ± 10,200	84,900 ± 3,000	207,000 ± 45,500	126,000 ± 9,210	222,000 ± 63,900
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L) (± SD)	**Males**	757,000 ± 87,700	1,470,000 ± 16,900	1,570,000 ± 243,000	3,070,000 ± 148,000	2,170,000 ± 262,000	4,220,000 ± 363,000
	Females	881,000 ± 119,000	1,860,000 ± 257,000	1,560,000 ± 83,300	4,540,000 ± 1,100,000	2,350,000 ± 115,000	4,750,000 ± 1,420,000
$AUC_{0\text{-}72h}$ (h×pmol/L) (± SD)	**Males**	NC	NC	NC	7,630,000 ± 346,000	NC	10,300,000 ± 655,000
	Females	NC	NC	NC	13,500,000 ± 4,860,000	NC	17,000,000 ± 1,010,000
$AUC_{0\text{-}168h}$ (h×pmol/L) (± SD)	**Males**	NC	NC	NC	11,700,000 ± 854,000	NC	15,900,000 ± 320,000
	Females	NC	NC	NC	21,400,000 ± 9,470,000	NC	29,700,000 ± 3,850,000
AUC (h×pmol/L) (± SD)	**Males**	NC	NC	NC	13,300,000 ± 938,000	NC	18,200,000 ± 148,000
	Females	NC	NC	NC	23,600,000 ± 10,400,000	NC	NC
$t_{1/2}$ (h)	**Males**	NC	NC	NC	52 - 56	NC	53 - 55
	Females	NC	NC	NC	41 - 49	NC	77 - 115
Additional Information:		*Due to low blood glucose the dose was reduced from 21 to 18 nmol/kg from day 33. Dose proportional increase in exposure on Day 1 but variable following the last day of dosing, accumulation in line with that expected from half-life and dosing frequency. Significantly higher exposure in female dogs. Anti-insulin icodec antibodies were formed in the majority of animals, but no consistent effect on PK or PD observed. NC – Not calculated					

2.6.5.4.M　イヌを用いた 26 週間毒性試験（試験番号：213222）

Location in CTD: 4.2.3.2-8
Study ID: 213222

Species		**Dogs**								
Gender (M/F) / Number of animals		4M+4F/dose main group + 3M + 3F/dose recovery group only for the 12/9 and the 18/12 dose groups								
Feeding condition		Fed								
Vehicle/Formulation										
Method of Administration		Twice weekly s.c.								
Sample		plasma								
Analyte		insulin icodec								
Assay		LOCI								
Dose (nmol/kg)		**6**			**12/9***			**18/12***		
Day		1	88	190	1	88	190	1	88	190
t_{max} (h)	**Males**	12 – 48	4 - 18	18 - 24	18 – 24	8 - 24	8 - 24	18 - 42	4 – 24	8 - 24
	Females	4 - 24	4 - 24	8 - 24	8 - 24	4 - 24	8 - 24	4 - 24	4 – 24	8 - 24
C_{max} (pM) (± SD)	**Males**	37,900 ± 7,320	66,900 ± 1,610	67,100 ± 6,770	78,300 ± 5,660	109,000 ± 17,000	113,000 ± 14,000	119,000 ± 6,230	154,000 ± 18,100	155,000 ± 23,100
	Females	46,600 ± 4,570	79,400 ± 14,500	68,500 ± 13,200	113,000 ± 38,200	123,000 ± 20,100	116,000 ± 21,2000	143,000 ± 29,900	182,000 ± 58,200	170,000 ± 38,200
$AUC_{0\text{-}964h}$ (h×pmol/L) (± SD)	**Males**	2,160,000 ± 337,000	4,680,000 ± 208,000	4,680,000 ± 525,000	5,510,000 ± 454,000	7,320,000 ± 1,290,000	7,930,000 ± 1,070,000	8,110,000 ± 353,000	10,500,000 ± 1,930,000	11,000,000 ± 2,090,000
	Females	3,080,000 ± 172,000	5,100,000 ± 1,210,000	4,8700,000 ± 835,000	6,050,000 ± 474,000	7,970,000 ± 1,900,000	7,970,000 ± 1,860,000	8,960,000 ± 870,000	12,400,000 ± 5,380,000	11,400,000 ± 2,850,000
AUC (h×pmol/L) (± SD)	**Males**	3,950,000 ± 155,000	NC	NC	8,390,000 ± 1.060,000	NC	12,500,000 ± 2.470,000	11,900,000 ± 695,000	NC	14,900,000 ± 881,000
	Females	4,410,000 ± 453,000	NC	NC	8,290,000 ± 888,000	NC	13,000,000 ± 6,370,000	12,200,000 ± 951,000	NC	19,900,000 ± 8.260,000
$t_{1/2}$ (h)	**Males**	48 - 75	NC	NC	45 – 65	NC	56 - 67	50 - 56	NC	55 - -60
	Females	44 - 61	NC	NC	38 – 56	NC	41 -83	39- 52	NC	49 - 83

Additional Information:	*The doses 12 and 18 was reduced to 9 and 12 nmol/kg from day 25. The C_{max} and $AUC_{0\text{-}96h}$ increased with increasing dose in both male and female animals. The increase in exposure was approximately proportional to the increase in dose. The exposure in steady state on Day 88 and Day 190 was slightly higher than on Day 1 as the mean group accumulation indices, Rac_{Obs} were in the range of 1.3-1.8. This was in accordance with the expected accumulation based on the terminal half-life and the dosing regimen. Eight animals (22% of animals dosed) and three of 12 recovery animals were positive for anti-insulin icodec antibodies four days (96 hours) after the last dose, on day 194. All three animals had lower antibody levels on Day 218, with one of these three animals being negative for antibodies on Day 218. NC – Not calculated,

2.6.5.4.N　ブタを用いた反復投与試験（試験番号：[redacted]101101）

Location in CTD: 4.2.2.2-8
Study ID: [redacted]101101

Species	**LYD pig**
Gender (M/F) / Number of animals	Female n=4 per group
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	8.0 mM, 4.2 [redacted]/6 ins
Method of Administration	s.c.
Dose (nmol/kg)	12 nmol/kg once weekly for 4 weeks
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma
Analyte	Insulin icodec
Assay (2)	LOCI/Assay I
PK parameters:	
T_{max} (h)	**1**. 32 **2**. 30 **3**. 27 **4**. 23
C_{max}/D (pM/(nmol/kg))	**1**. 3032 **2**. 3842 **3**. 3714 **4**. 3736
AUC/D (h×pM/(nmol/kg))	**1**. 313,000 **2**. 324,000 **3**. 336,000 **4**. 338,000
(Time for calculation – h)	$AUC_{0\text{-}168h}$ (all doses)
$T_{1/2}$ (h)	48 (last dose)
(Time for calculation – h)	Terminal part of 0-240 h PK (last dose)

2.6.5.5 組織分布

Test article: insulin icodec

Report Title: [^{3}H]Eic-NNC0148-0000-0287: A Study of Distribution Following Subcutaneous Administration to the Sprague Dawley Rat

Location in CTD: 4.2.2.3-1
Study ID: 212436

Species	**Rat**
Gender (M/F) / Number of animals:	8M
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	16 mg/mL glycerol, 2.35 mg/mL phenol, 2.70 mg/mL metacresol, 20 mM sodium chloride and 206 µg/ml zinc acetate with pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Dose (mg/kg):	75 nmol/kg
Radionuclide:	^{3}H
Specific Activity:	660 GBq/mmol (18 Ci/mmol)

Tissues/organs	**Concentrations: nmol insulin icodec/g of tissue**									**AUC_{all} Tissue:blood ratio**	**$T_{½}$ (hours)**
	4 h	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**120 h**	**168 h**		
Plasma	0.259	0.362	0.439	0.387	0.173	0.100	0.056	0.040	0.025	2.97	43.2
Freeze dried plasma	0.226	0.297	0.379	0.309	0.085	0.044	0.016	0.007	0.001	1.82	18.5
Aortic wall	0.060	0.051	0.142	0.150	0.018	0.014	0.005	0.006	BLQ	0.624	ND
Blood	0.189	0.109	0.165	0.182	0.056	0.017	0.014	0.006	BLQ	1.00	31.9
Bone marrow	0.023	0.021	0.044	0.060	0.010	0.013	0.005	0.003	BLQ	0.283	22.7
Mandibular lymph nodes	0.037	0.022	0.047	0.036	0.027	0.017	0.006	0.004	0.003	0.349	76.1
Spleen	0.022	0.018	0.026	0.029	0.009	0.008	0.004	0.002	BLQ	0.181	32.0
Bile ducts + contents	0.140	0.120	0.358	0.118	0.119	0.036	0.013	0.004	BLQ	1.27	14.9
Kidney cortex inner	0.076	0.057	0.110	0.105	0.037	0.029	0.010	0.006	0.003	0.693	31.0
Kidney cortex outer	0.109	0.119	0.193	0.209	0.057	0.058	0.029	0.016	0.005	1.31	27.4
Kidney medulla	0.085	0.055	0.101	0.088	0.024	0.018	0.007	0.005	BLQ	0.531	29.4
Liver	0.033	0.028	0.064	0.055	0.012	0.015	0.006	0.003	BLQ	0.321	20.7
Urinary bladder wall	0.065	0.145	0.092	0.129	0.036	0.017	BLQ	0.006	BLQ	0.659	28.4
Urine contents	0.069	0.093	0.075	0.063	0.042	0.019	0.010	0.007	BLQ	NA	NA
Lung	0.146	0.086	0.118	0.154	0.044	0.027	0.008	0.005	BLQ	0.833	21.5

Tissues/organs	Concentrations: nmol insulin icodec/g of tissue									AUC_{all} Tissue:blood ratio	$T_{½}$ (hours)
	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	168 h		
Nasal mucosa	0.044	0.021	0.028	0.046	0.026	0.007	0.003	BLQ	BLQ	0.274	15.4
Trachea	0.054	0.034	0.111	0.060	0.035	0.016	0.002	0.003	BLQ	0.463	18.6
Bulbo-urethral gland	0.077	0.053	0.106	0.104	0.027	0.032	0.010	0.005	BLQ	0.624	17.9
Epididymis	0.017	0.024	0.011	0.015	0.009	0.005	0.007	0.003	0.002	0.154	51.5
Preputial gland	0.009	0.010	0.051	0.028	0.015	0.006	0.004	0.004	BLQ	0.211	31.9
Prostate gland	0.017	0.026	0.032	0.028	0.010	0.008	0.004	0.002	0.003	0.207	ND
Seminal vesicles	0.003	BLQ	0.003	0.002	BLQ	0.003	0.002	BLQ	BLQ	0.022	ND
Testis	0.025	0.027	0.040	0.038	0.013	0.008	0.004	0.002	BLQ	0.235	26.4
Adrenal cortex	0.028	0.019	0.036	0.047	0.012	0.010	0.007	0.004	NS	0.262	45.5
Adrenal medulla	0.053	0.049	0.078	0.087	0.023	0.013	0.007	0.003	NS	0.462	24.7
Pancreas	0.052	0.034	0.045	0.055	0.020	0.015	0.005	0.004	BLQ	0.347	28.1
Pineal body	0.031	0.036	0.040	0.045	0.015	0.016	0.006	0.002	BLQ	0.295	16.0
Pituitary gland	0.049	0.038	0.062	0.049	0.015	0.013	0.007	0.005	BLQ	0.336	42.5
Thymus	0.015	0.014	0.021	0.034	0.008	0.010	0.004	BLQ	BLQ	0.171	ND
Thyroid gland	0.042	0.038	0.031	0.052	0.017	0.012	0.009	0.003	BLQ	0.313	24.0
Exorbital lachrymal gland	0.039	0.028	0.043	0.052	0.015	0.016	0.005	0.003	BLQ	0.309	19.9
Harderian gland	0.015	0.023	0.022	0.026	0.011	0.013	0.007	0.003	BLQ	0.205	22.7
Intra-orbital lachrymal gland	0.022	0.024	0.056	0.073	0.018	0.036	0.007	0.004	BLQ	0.424	15.1
Lens	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC	NC
Uveal tract/retina	0.052	0.054	0.055	0.087	0.022	0.034	0.010	0.005	BLQ	0.509	17.4
Brain	0.003	0.003	0.002	0.005	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.009	NC
Choroid plexus	0.006	0.013	0.021	0.057	0.011	0.006	BLQ	BLQ	BLQ	0.194	14.8
Meninges	0.060	0.044	0.037	0.045	0.009	0.012	0.007	0.002	BLQ	0.276	18.6
Spinal cord	0.003	BLQ	0.002	0.002	BLQ	0.002	BLQ	BLQ	BLQ	0.012	ND
Caecum mucosa	0.029	0.018	0.050	0.081	0.008	0.014	0.01	0.004	BLQ	0.336	26.6
Large intestine mucosa	0.017	0.016	0.039	0.056	0.015	0.009	0.009	0.003	0.006	0.313	ND
Oesophageal wall	0.039	0.037	0.049	0.058	0.024	0.012	0.004	0.003	BLQ	0.351	22.7
Rectum mucosa	0.030	0.035	0.057	0.061	0.014	0.019	0.006	0.003	BLQ	0.348	18.0
Small intestine mucosa	0.025	0.015	0.017	0.029	0.012	0.007	0.006	0.002	0.002	0.198	36.7
Stomach mucosa (fundus)	0.021	0.018	0.024	0.037	0.009	0.01	0.003	0.003	BLQ	0.197	27.2
Stomach mucosa (non-fundic)	0.011	0.025	0.027	0.014	0.011	0.012	0.004	0.002	BLQ	0.166	18.6
Brown fat	0.045	0.013	0.253	0.087	0.013	0.012	0.017	0.004	0.015	0.637	ND

Tissues/organs	Concentrations: nmol insulin icodec/g of tissue									AUC_{all} Tissue:blood ratio	$T_{½}$ (hours)
	4 h	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**120 h**	**168 h**		
White fat	0.003	BLQ	0.042	0.007	BLQ	0.003	0.002	BLQ	BLQ	0.068	39.8
Periodontal membrane	0.173	0.184	0.131	0.091	0.035	0.032	0.016	0.004	BLQ	0.793	23.1
Salivary glands	0.059	0.035	0.059	0.067	0.020	0.014	0.006	0.003	BLQ	0.388	21.6
Tongue	0.035	0.040	0.071	0.066	0.030	0.014	0.005	0.003	BLQ	0.421	21.0
Tooth pulp	0.230	0.209	0.300	0.244	0.066	0.051	0.026	0.007	BLQ	1.53	22.5
Bone surface	0.033	0.017	0.035	0.06	0.019	0.013	0.005	0.003	BLQ	0.315	25.6
Dose Site	2.66	0.292	4.63	1.16	0.046	0.033	0.045	0.006	0.015	NA	NA
Muscle	0.013	0.018	0.017	0.025	0.011	0.006	0.003	BLQ	BLQ	0.149	25.6
Myocardium	0.061	0.038	0.058	0.075	0.021	0.009	0.004	0.002	BLQ	0.384	21.2
Skin	0.025	0.022	0.029	0.054	0.017	0.014	0.005	0.002	BLQ	0.288	17.1
Additional Information:	Lower limit of quantification =0.002 nmol/g for all measurements, BLQ – Radioactivity concentration below lower limit of quantification (LOD Plasma = 0.0000164 nmol/g, freeze dried plasma = 0.0000128 nmol/g), ND = Not Detected, NC = Not Calculable, NA = Not Applicable										

2.6.5.6 血漿タンパク質結合

2.6.5.6.A 血清アルブミン結合（試験番号：[redacted]120427）

Location in CTD: 5.3.2.1
Study ID: [redacted]120427

Species	**Human**
Gender (M/F) / Number of animals:	NA – *in vitro*
Feeding condition:	NA
Vehicle/Formulation:	NA
Method of Administration:	NA
Dose (mg/kg):	NA
Radionuclide:	^{125}I
Specific Activity:	1500 Ci/mmol
Analyte/Assay (unit):	CPM (counts per minute)
Sampling time:	NA

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses[a] (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**
Binding to human serum albumin	Human albumin	*In vitro*	N/A	N/A	•The binding affinity of insulin icodec for human serum albumin was estimated to be 9.49 ± 0.64 (mean, ± SEM, n=3) relative to the reference, insulin detemir. •The K_i of palmitate for displacement of insulin icodec from HSA was estimated to 2.2 ± 0.27 µM (mean ± SEM, n=3) •The ratio between the K_i of palmitate and the concentration of HSA (80 nM) is 28, meaning that palmitate needs to be present in a concentration 28 times higher than the HSA concentration to reduce the binding of insulin icodec by 50%. •At a typical serum albumin concentration of 4% (600 µM) the normal variations of palmitate will not have any noticeable effect on the binding of insulin icodec to serum albumin.

2.6.5.6.B　複数の動物種由来のアルブミンに対する結合（試験番号：[redacted]120428）

Location in CTD: 5.3.2.1
Study ID: [redacted]120428

Species	**Rat, Rabbit, Dog, Pig and Human**
Gender (M/F) / Number of animals:	NA – *in vitro*
Feeding condition:	NA
Vehicle/Formulation:	NA
Method of Administration:	NA
Dose (mg/kg):	NA
Radionuclide:	^{125}I
Specific Activity:	1500 Ci/mmol
Analyte/Assay (unit):	CPM (counts per minute)
Sampling time:	NA

***In vitro* or *in vivo* model**	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses[a] (nmol/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**
Binding to albumin from various species	Rat, Rabbit, Dog, Pig and Human	*In vitro*	N/A	N/A	The affinities of insulin icodec for the five different species serum albumin are significantly different and are ranked in the following order, human ≥ pig ≥ rabbit > dog > rat. K_d was 70, 104, 145, 169 and 337 nM for human, pig, rabbit, dog and rat, respectively.

2.6.5.6.C　マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿中タンパク質に対する *in vitro* 結合（試験番号：212035）

Report Title: *In vitro* binding to mouse, rat, rabbit, dog and human plasma proteins

Location in CTD: 5.3.2.1

Study ID: 212035

Study system: Surface plasmon resonance (SPR) biosensor technology was used to determine a dissociation constant, K_D, and percentage fraction unbound of insulin icodec in each species of plasma

Target entity: NNC 0148-0000-0287, batch no. MP0287K6A003

Test system: Pooled EDTA plasma from at least five male and five female CD-1 mice, Sprague Dawley rats, Beagle dogs and humans as well as from female New Zealand White rabbits

Method: SPR technology, using a Biacore T200 instrument, was used to investigate binding between insulin icodec and plasma proteins. Insulin icodec was immobilised to flow cells of CM5 sensor chips. Plasma was passed over the flow cells in nine dilutions in the range of 0.0005%-2.5% (v/v). Binding assays were run at 37°C. A kinetic analysis based on the 1:1 binding model was performed to determine the dissociation constant, K_D, and percentage fraction unbound of insulin icodec in each pool of plasma.

Species	Gender	N	Fraction unbound (%)			Plasma albumin K_D (µM)[a]		
			Mean	±	SD	Mean	±	SD
Mouse (CD-1)	M	8	0.017	±	0.005	0.065	±	0.018
	F	8	0.023	±	0.009	0.088	±	0.035
Rat (Sprague Dawley)	M	8	0.011	±	0.004	0.045	±	0.016
	F	8	0.006	±	0.001	0.028	±	0.006
Rabbit (New Zealand White)	F	8	0.014	±	0.003	0.053	±	0.012
Dog (Beagle)	M	8	0.033	±	0.021	0.128	±	0.080
	F	8	0.019	±	0.008	0.089	±	0.037
Human	M	8	0.015	±	0.005	0.086	±	0.028
	F	6	0.017	±	0.005	0.102	±	0.031

[a] assuming all binding of insulin icodec in plasma was to albumin. Concentration of albumin was determined for each pool of plasma.

Additional Information:

The vast majority of insulin icodec was bound to plasma constituents with more than 99% bound for all species.

2.6.5.6.D　ヒトアルブミンに対する *in vitro* 結合（試験番号：212036）

Report Title: *In vitro* binding of NNC 0148-0000-0287 to human serum albumin

Location in CTD: 5.3.2.1
Study ID: 212036

Study system: Surface plasmon resonance (SPR) biosensor technology was used to determine a dissociation constant, K_D, of insulin icodec binding to human serum albumin
Target entity: NNC 0148-0000-0287, batch no. MP0287K6A003
Test system: 96-99% human serum albumin and essentially fatty acid free human serum albumin
Method: SPR technology, using a Biacore T200 instrument, was used to investigate binding between insulin icodec and human serum albumin. Insulin icodec was immobilised to flow cells of CM5 sensor chips. Human serum albumin was passed over the flow cells in nine dilutions in the range of 0.0005-0.5 g/l. Binding assays were run at 37°C. A kinetic analysis based on the 1:1 binding model was performed to determine the dissociation constant, K_D, of insulin icodec binding to human serum albumin.

Test system	N	Human serum albumin K_D (µM)			Fraction unbound (%)[a]		
		Mean	±	SD	Mean	±	SD
96-99% human serum albumin	8	0.088	±	0.013	0.013	±	0.002
Essentially fatty acid free human serum albumin	8	0.094	±	0.018	0.014	±	0.003

[a]Percentage fraction unbound was based on a concentration of 44 g/l (657 µM) of albumin in plasma.

2.6.5.7　妊娠又は授乳動物を用いた試験

Test article: insulin icodec

No studies performed.

2.6.5.8　その他の分布試験

Test article: insulin icodec

No studies performed.

2.6.5.9 *In vivo* 代謝

Test article: insulin icodec

2.6.5.9.A [^{3}H]Eic-インスリン イコデクを投与時のラットにおける循環血中代謝物（試験番号：213016）

Report Title: [^{3}H]Eic-NNC0148-0000-0287: Investigation of metabolite profiles in plasma, urine, bile and faeces following a single subcutaneous administration of 75 nmol/kg to the Sprague-Dawley rat

Location in CTD: 4.2.2.4-2

Study ID: 213016

Dose (nmol/kg):	75 nmol/ml and 50 MBq/ml of [^{3}H]Eic-insulin icodec									
Vehicle/Formulation:	16 mg/mL glycerol, 2.35 mg/mL phenol, 2.70 mg/mL metacresol, 20 mM sodium chloride and 206 µg/ml zinc acetate with pH 7.4									
Route of Administration:	Subcutaneous									
Assay	High pressure liquid chromatography analysis with radiochemical detection									
Species:	Sprague Dawley Rat									
Gender/Number of rats	7M[a]									
		Concentration (nmol equivalents/g)								
Plasma Components/Metabolites	**Retention Time (min)**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**AUC_{0-96h} (h x nmol/ml)**	**% of AUC_{0-96h}**
P1	3.33	ND	0.004	0.011	0.021	0.044	0.054	0.040	3.31	21.1
P2	26.45	0.012	0.012	0.017	0.013	ND	ND	ND	0.465	2.96
Insulin icodec (P3)	28.34	0.200	0.203	0.331	0.241	0.094	0.038	0.011	11.4	72.6
P4	33.43	ND	ND	0.009	0.008	0.004	ND	ND	0.306	1.95
Total concentration	NA	0.212	0.219	0.367	0.283	0.142	0.092	0.051	15.7	NA

[a]Terminal samples from one animal per time point (totally seven time points)

ND = Not detected, NA = Not applicable

2.6.5.9.B [^{3}H]Eic-インスリン イコデクを投与時のラットにおける排泄物中代謝物（試験番号：213016）

Report Title: [^{3}H]Eic-NNC0148-0000-0287: Investigation of metabolite profiles in plasma, urine, bile and faeces following a single subcutaneous administration of 75 nmol/kg to the Sprague-Dawley rat

Location in CTD: 4.2.2.4-2
Study ID: 213016

Dose:	75 nmol/kg and 50 MBq/kg of [^{3}H]Eic-insulin icodec									
Vehicle:	16 mg/mL glycerol, 2.35 mg/mL phenol, 2.70 mg/mL metacresol, 20 mM sodium chloride and 206 µg/ml zinc acetate, pH 7.4									
Route of Administration:	Subcutaneous									
Assay	High pressure liquid chromatography analysis with radiochemical detection									
Species:	Sprague Dawley Rat									
Gender/Number of rats	3M[a]									
		Fraction of Administered Dose (% of dose)								
Urine Metabolite peaks	**Retention Time (min)**	**0-12 h**	**12-24 h**	**24-48 h**	**48-72 h**	**72-96 h**	**96-120 h**	**120-144 h**	**144-168 h**	**Total 0-168 h**
U1	3.33	0.41	1.46	4.40	3.85	2.98	2.95	2.39	1.79	**20.22**
U2	4.60	ND	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**0.07**
U3	5.40	ND	0.08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**0.08**
U4	9.75	0.14	0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**0.17**
U5	10.73	ND	0.12	0.03	0.05	ND	ND	ND	ND	**0.20**
U6	11.35	ND	0.03	0.06	ND	ND	ND	ND	ND	**0.08**
U7	11.80	ND	ND	0.04	ND	ND	ND	ND	ND	**0.04**
U8	12.33	ND	0.03	0.14	0.05	0.02	ND	ND	ND	**0.23**
U9	13.60	0.07	0.09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**0.16**
U10	14.70	ND	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**0.07**
U11	17.60	0.11	0.08	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**0.19**
U12	18.15	0.06	0.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	**0.18**

[a]pooled samples from three animals (one pool per time interval)

Species:	Sprague Dawley Rat							
Gender/Number of rats	3M[a]							
		Fraction of Administered Dose (% of dose)						
Faeces Metabolite peaks	**Retention Time (min)**	**0-24 h**	**24-48 h**	**48-72 h**	**72-96 h**	**96-120 h**	**120-168 h**	**Total 0-168 h**
F1	3.27	0.94	1.87	2.35	2.69	2.61	2.37	**12.82**
F2	19.20	ND	ND	0.28	ND	ND	ND	**0.28**
F3	22.95	ND	0.71	0.53	ND	ND	ND	**1.24**
F4	23.90	ND	0.53	ND	ND	ND	ND	**0.53**
F5	26.80	ND	1.33	0.69	0.34	ND	ND	**2.36**
F6	27.80	ND	0.83	0.44	ND	ND	ND	**1.26**
F7	33.57	0.38	2.20	1.38	ND	ND	ND	**3.96**
F8	42.60	2.53	2.68	1.57	0.71	ND	ND	**7.49**
F9	53.70	ND	0.85	ND	ND	ND	ND	**0.85**
F10	56.60	ND	0.24	ND	ND	ND	ND	**0.24**

[a]pooled samples from three animals (one pool per time interval)

Species:	Bile duct cannulated Sprague Dawley Rat							
Gender/Number of rats:	2M[b]							
		Fraction of Administered Dose (% of dose)						
Bile Metabolite peaks	**Retention Time (min)**	**0-2 h**	**2-4 h**	**4-6 h**	**6-12 h**	**12-24 h**	**24-48 h**	**Total 0-48 h**
B1	3.40	ND	0.01	0.02	0.22	0.74	3.03	**4.01**
B2	12.30	ND	ND	ND	0.02	0.09	0.09	**0.20**
B3	14.72	ND	0.01	0.02	0.08	0.22	0.25	**0.58**
B4	17.18	ND	0.01	0.01	0.03	0.08	0.06	**0.19**
B5	17.92	ND	0.01	0.02	0.10	0.29	0.41	**0.83**
B6	20.12	ND	0.03	0.05	0.15	0.34	0.28	**0.85**
B7	21.34	ND	0.02	0.03	0.17	0.42	0.46	**1.09**
B8	23.03	0.01	0.05	0.07	0.29	0.66	0.74	**1.83**
B9	24.70	0.02	0.05	0.07	0.36	0.71	1.09	**2.30**
B10	26.06	ND	0.02	0.03	0.11	0.24	0.28	**0.68**
B11	29.48	0.02	0.05	0.08	0.39	0.77	1.21	**2.52**
B12	31.30	ND	0.02	0.03	ND	ND	ND	**0.06**
B13	36.12	ND	0.01	0.01	0.06	0.12	0.18	**0.38**
B14	45.06	ND	0.02	0.03	0.22	0.45	0.78	**1.50**

[b]pooled samples from two animals (one pool per time interval)

2.6.5.9.C　ラット血漿中代謝物の構造決定（試験番号：212065）

Report Title: Metabolite analysis of plasma from Sprague Dawley Rats following subcutaneous administration for 8 weeks

Location in CTD: 4.2.2.4-1
Study ID: 212065

Species:	Rat (Sprague Dawley)
Gender:	Males and females
Assays/Methods:	Analysis of pooled plasma samples with LC-MS and deconvolution of of mass spectrometry data for calculation of the mono isotopic molecular weights

Dosing day	Dose level (nmol/kg/day)	Sex	Sampling time point[b] (h)	Metabolite/ test substance	MS-peak retention time (min)	Mass of protonated ion (amu)	Type of ion[d]	Mass in neutral state (amu)[e,f]	Mass of proposed structure (amu)[e]	Mass Accuracy (ppm)[g]
1	**150**	**Males**	**8**	**insulin icodec**	23.40	6376.9976	$^{C}[M+H^+]^+$	6375.9903	6376.0122	**3.4**
				B^{1-29}-(C_{20})	25.17	4033.0667	$^{C}[M+H^+]^+$	4032.0594	4032.0642	**1.2**
				B^{29}-(C_{20})	29.87	890.5754	$^{C}[M+H^+]^+$	889.5681	889.5624	**-6.4**
	150	**Females**	**8**	**insulin icodec**	23.42	6376.9502	$^{C}[M+H^+]^+$	6375.9429	6376.0122	**10.9**
				B^{1-29}-(C_{20})	25.25	4033.0193	$^{C}[M+H^+]^+$	4032.0120	4032.0642	**12.9**
				B^{29}-(C_{20})	29.87	890.5749	$^{C}[M+H^+]^+$	889.5676	889.5624	**-5.8**
49	**100[a]**	**Males**	**8**	**insulin icodec**	23.44	6376.9629	$^{C}[M+H^+]^+$	6375.9556	6376.0122	**8.9**
				insulin icodec-desamido	23.90	6377.9248	$^{C}[M+H^+]^+$	6376.9175	6376.9962	**12.3**
				insulin icodec isomer	24.25	6376.9873	$^{C}[M+H^+]^+$	6375.9800	6376.0122	**5.0**
				B^{1-29}-(C_{20})	25.22	4033.0483	$^{C}[M+H^+]^+$	4032.0410	4032.0642	**5.8**
				B^{29}-(C_{20})	29.87	890.5764	$^{C}[M+H^+]^+$	889.5691	889.5624	**-7.5**
	100[a]	**Females**	**4**	**insulin icodec**	23.47	6376.9121	$^{C}[M+H^+]^+$	6375.9048	6376.0122	**16.8**
				insulin icodec-desamido	23.89	6377.9316	$^{C}[M+H^+]^+$	6376.9243	6376.9962	**11.3**
				insulin icodec isomer	24.30	6376.9077	$^{C}[M+H^+]^+$	6375.9004	6376.0122	**17.5**
				B^{1-29}-(C_{20})	25.28	4033.0122	$^{C}[M+H^+]^+$	4032.0049	4032.0642	**14.7**
				B^{24-29}-(C_{20})	28.85	768.4478	$^{C}[M+2H^+]^{2+}$	1534.8810	1534.8534	**-18.0**
				B^{29}-(C_{20})	29.90	890.5856	$^{C}[M+H^+]^+$	889.5783	889.5624	**-17.9**

[a]The dose was decreased from 150 to 100 nmol/kg on day 28, with no dosing on days 26 and 27
[b]The time points were selected in the t_{max} range following dosing at both dosing day 1 and 49
[c]Monoisotopic mass of $[M+H]^+$ ions obtained from MS data following MaxEnt3 deconvolution of multiply charged positive ions

[d]The monoisotopic masses of H^+ used in the calculation of M was 1.0073
[e]Monoisotopic mass in neutral state (M)
[f]Obtained mass of M from $[M+XH^+]^{X+}$ ion = (mass of protonated ion × X) – (X × mass of H^+)
[g]Mass accuracy = [(matched mass - M)/M] × 1×10^5

2.6.5.9.D [^{3}H]ADO-インスリン イコデクを投与時のラットにおける血漿中代謝物（試験番号：314926）

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: Metabolite Profile and Identification Analyses of Plasma Samples from Male Sprague Dawley Rats Following Single Subcutaneous Administration

Location in CTD: 4.2.2.4-5

Study ID: 314926

Dose:	75 nmol/kg and 50 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec										
Vehicle:	15 mg/ml glycerol, 5.65 mg/ml phenol, 1.08 mg/ml metacresol, 1.17 mg/ml sodium chloride and 0.9 µg/ml zinc acetate, pH 7.4										
Route of Administration:	Subcutaneous										
Assay	High pressure liquid chromatography analysis with radiochemical detection										
Species:	Sprague Dawley Rat										
Gender/Number of rats	[A]1M										
		Concentration (pmol/L)									
Test substance/ Metabolites	**Retention Time (min)**	**4 h**	**8 h**	**12 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**96 h**	**168 h[b]**	**$AUCl_{last}$ (h×pmol/l)**	**Total AUC_{last} ratio (%)**
Insulin icodec	31.5	156000	253000	354000	228000	95700	33500	20400	2060	12100000	97.7
B^{1-29}-(C_{20})	36.4	ND	ND	ND	6400	3810	1490	850	ND	283000	2.29

ND = Not detected

[a]Samples from one animal per time point, [b] last time point

2.6.5.9.E [^{3}H]ADO-インスリン イコデクを投与時のイヌにおける血漿中代謝物（試験番号：317011）

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: Metabolite Profiling of Biological Samples from Male Beagle Dogs Following Single Subcutaneous Administration

Location in CTD: 4.2.2.4-6

Study ID: 317011

Dose:	18 nmol/kg and 20 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec
Vehicle:	15 mg/ml glycerol, 5.65 mg/ml phenol, 1.08 mg/ml metacresol, 1.17 mg/ml sodium chloride and 0.45 µg/ml zinc acetate, pH 7.4
Route of Administration:	Subcutaneous
Assay	High pressure liquid chromatography analysis with radiochemical detection
Species:	Beagle dogs
Gender/Number of dogs	3 Males

			Plasma concentration (pmol/L)									
HPLC peak name	**Metabolite name[b]**	**Retention time (min)**	**8 h**	**24 h**	**96 h**	**168 h**	**192 h**	**240 h**	**336 h[a]**	**AUC_{last} (h x pmol/L)**	**Total AUC_{last} ratio (%)**	**Total AUC_{last} ratio[c] (%)**
Insulin icodec		29.77	94400	116000	45000	20800	16600	9000	2670	11247272	74.1	80.7
P1		31.50	ND	ND	ND	ND	774	367	ND	100484	0.66	
P2	**B^{2-29}-(C_{20})**	33.83	ND	ND	1790	1760	2130	1570	627	446792	2.94	3.20
P3	**B^{1-29}-(C_{20})**	34.73	1010	3090	5940	5280	5040	3720	1360	1322669	8.71	9.49
P4		38.71	ND	ND	ND	423	419	454	191	95749	0.63	
P5	**B^{24-29}-(C_{20})**	40.35	ND	ND	881	1200	1150	976	503	264729	1.74	1.90
P6		41.58	ND	ND	1480	1620	1690	1440	1130	420089	2.77	
P7		42.58	ND	1820	3130	2360	2120	1530	432	620121	4.09	
P8	**B^{29}-(C_{20})**	43.67	ND	4010	3330	1800	1830	1110	286	661701	4.36	4.75

ND = Not detected

[a]Last time point, [b]Names of structurally identified metabolites in study 319052, [c]Total AUC_{last} ratios without data from peaks of structurally unidentified metabolites (P1, P4, P6 and P7)

2.6.5.9.F [^{3}H]ADO-インスリン イコデクを投与時のイヌにおける排泄物中代謝物（試験番号：317011）

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: Metabolite Profiling of Biological Samples from Male Beagle Dogs Following Single Subcutaneous Administration

Location in CTD: 4.2.2.4-6

Study ID: 317011

Dose:	18 nmol/kg and 20 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec
Vehicle:	15 mg/mL glycerol, 5.65 mg/mL phenol, 1.08 mg/mL metacresol, 1.17 mg/mL sodium chloride and 0.45 µg/mL zinc acetate, pH 7.4
Route of Administration:	Subcutaneous
Assay	High pressure liquid chromatography analysis with radiochemical detection
Species:	Beagle dogs
Gender/Number of dogs	2M[a]

			Fraction of Dose (% of dose)						
Urine HPLC peaks	**Metabolite / test substance**	**Retention Time (min)**	**0-48 h**	**48-96 h**	**96-144 h**	**144-192 h**	**192-264 h**	**264-336 h**	**Total 0-336 h**
U1		4.11	0.333	0.587	0.465	0.313	0.338	0.108	2.15
U2		6.98	ND	0.182	0.0925	0.117	0.0481	0.108	0.547
U3		7.95	0.338	0.724	0.543	0.281	0.286	ND	2.17
U4		8.75	0.205	0.205	0.172	0.0922	ND	0.0775	0.753
U5	**B^{29}-(C_4)**	9.95	1.50	3.77	2.90	1.70	1.85	0.759	12.5
U6	**B^{29}-(C_6)**	11.20	0.991	2.40	1.83	1.080	1.13	0.437	7.86
U7		12.11	0.274	0.506	0.387	0.206	0.129	0.0381	1.54
U8	**B^{29}-(C_8)**	13.67	0.825	1.11	0.573	0.324	0.319	0.121	3.27
U9		16.83	0.525	0.511	0.280	0.151	0.119	0.0370	1.62
U10		19.45	0.870	0.274	0.168	0.0748	0.0485	ND	1.43
U11		20.25	0.966	0.687	0.373	0.188	0.188	0.0528	2.45
U12		23.50	0.419	0.306	0.154	0.0685	0.0542	ND	1.00
U13		27.75	0.152	ND	ND	ND	ND	ND	0.152
Insulin icodec	**Insulin icodec**	30.05	3.47	1.18	0.475	0.235	0.208	0.0506	5.62
U14		34.42	0.153	ND	ND	ND	ND	ND	0.153
U15		44.00	0.126	ND	ND	ND	ND	ND	0.126
Total		-	11.2	12.4	8.41	4.83	4.71	1.79	43.3

[a]pooled samples from two animals (one pool per time interval), ND = not detectable

		Fraction of Dose (% of dose)						
Faeces Metabolite peaks	**Retention Time (min)**	**0-48 h**	**48-96 h**	**96-144 h**	**144-192 h**	**192-264 h**	**264-336 h**	**Total 0-336 h**
F1	5.00	1.20	ND	1.33	ND	ND	ND	2.53
F2	5.94	ND	2.27	ND	0.349	0.935	0.275	3.82
F3	6.83	ND	ND	ND	0.217	ND	ND	0.217
F4	7.71	0.172	ND	0.0667	ND	ND	ND	0.239
F5	9.41	0.120	0.570	0.352	0.124	0.195	0.0538	1.41
F6	10.03	0.370	0.959	0.901	0.409	0.538	0.284	3.46
F7	11.21	0.239	0.753	0.927	0.371	0.509	0.330	3.13
F8	11.87	ND	0.530	0.311	0.203	0.243	0.113	1.40
F9	13.60	0.169	0.241	0.270	0.0773	0.124	0.0647	0.946
F10	14.56	ND	0.215	0.0847	0.0295	0.0805	ND	0.410
F11	16.81	0.0953	0.128	0.124	0.0355	ND	ND	0.383
F12	18.33	ND	0.106	ND	ND	ND	ND	0.106
F13	20.15	0.279	0.350	0.353	0.108	0.110	0.107	1.31
F14	22.15	ND	0.254	0.0871	0.0293	0.0926	ND	0.463
F15	23.43	0.145	0.154	0.150	0.0489	0.0426	ND	0.541
F16	42.42	0.192	0.291	0.208	0.0286	ND	ND	0.719
F17	43.54	0.908	1.18	0.846	0.205	0.237	0.145	3.52
Total	-	3.89	8.00	6.01	2.23	3.11	1.37	24.6

[a]pooled samples from two animals (one pool per time interval), ND = not detectable

2.6.5.9.G [^{3}H]ADO-インスリン イデコクを投与時のイヌにおける血漿中代謝物の構造決定（試験番号：319052）

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: Structure Characterisation of Metabolites in Plasma from the Beagle Dog Following Single Subcutaneous Administration **Location in CTD:** 4.2.2.4-7 **Study ID:** 319052

Dose:	18 nmol/kg and 20 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec
Vehicle	15 mg/ml glycerol, 5.65 mg/ml phenol, 1.08 mg/ml metacresol, 1.17 mg/ml sodium chloride and 0.45 µg/ml zinc acetate, pH 7.4
Route of Administration:	Subcutaneous
Assay:	Analysis of HPLC fractions of plasma and urine samples with UPLC-MS and UPLC-RAM, and processing of mass spectrometry data with MassLynx v4.1 software for calculation of the mono isotopic molecular weights
Species:	Beagle dogs
Gender/number of dogs:	3 Males

HPLC peak name	**Metabolite/ test substance**	**[a]MS-peak retention time (min)**	**[a]Radio-peak retention time (min)**	**[b]Mass over charge (m/z) of protonated/ deprotonated ion**	**Type of charge state**	**[c]Obtained mass of in neutral state (M)**	**Chemical formula from proposed structure**	Mass of proposed structure (amu)	[d]Mass Accuracy (ppm)
Insulin icodec	**Insulin icodec**	22.61	22.67	1063.6759	$[M+6H^+]^{6+}$	6376.0116	$C_{280}H_{435}N_{71}O_{87}S_6$	6376.0121	0.1
P2	**B^{2-29}-(C_{20})**	22.97	23.05	778.0087	$[M+5H^+]^{5+}$	3885.0070	$C_{176}H_{277}N_{45}O_{50}S_2$	3884.9957	-2.9
P3	**B^{1-29}-(C_{20})**	24.03	24.11	807.4186	$[M+5H^+]^{5+}$	4032.0565	$C_{185}H_{286}N_{46}O_{51}S_2$	4032.0642	1.9
P5	**B^{24-29}-(C_{20})**	17.73	17.73	766.4185	$[M-2H^+]^{2-}$	1534.8516	$C_{76}H_{118}N_{12}O_{21}$	1534.8534	1.2
P8	**B^{29}-(C_{20})**	20.72	20.77	888.5558	$[M-H^+]^-$	889.5631	$C_{43}H_{79}N_5O_{14}$	889.5624	-0.8

[a]Matching retention times from radio- and MS-peaks (within an acceptable time difference of ≤0.1 min)

[b]Monoisotopic mass of ion divided by the number of charges (m/z), from the most abundant multiply charged [M+zH+]z+ or [M-zH+]z- ions (z = number of protons with one positive charge)

[c]Monoisotopic mass in neutral state after multiplying m/z with z and subtracting or adding monoisotopic mass of z number of protons, according to the following formulas. M (from protonated ion) = $[M+zH^+]^{z+}$ (m/z) x z - (z x 1.0073), M (from deprotonated ion) = $[M-zH^+]^{z-}$ (m/z) x z + (z x 1.0073)

[d]Mass accuracy = [(matched mass - M)/matched mass] × 10^6

2.6.5.9.H [^{3}H]ADO-インスリン イデコクを投与時のイヌにおける尿中代謝物の構造決定（試験番号：321418）

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: Structure Characterisation of Metabolites in Urine from the Beagle Dog Following Single Subcutaneous Administration

Location in CTD: 4.2.2.4-8
Study ID: 321418

Dose:	18 nmol/kg and 20 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec
Vehicle:	15 mg/ml glycerol, 5.65 mg/ml phenol, 1.08 mg/ml metacresol, 1.17 mg/ml sodium chloride and 0.45 µg/ml zinc acetate, pH 7.4
Route of Administration:	Subcutaneous
Assay:	Analysis of urine samples with UPLC-MS-RAM, and processing of mass spectrometry data with MassLynx v4.1 software for calculation of the mono isotopic molecular weights
Species:	Beagle dogs
Gender/number of dogs:	2 Males

HPLC peak name / metabolite name	[a]MS-peak retention time (min)	[a]Radio-peak retention time (min)	[b]Mass over charge (m/z) of protonated/ deprotonated ion	Type of charge state	[c]Obtained mass of in neutral state (M)	Chemical formula from proposed structure	Mass of proposed structure (amu)	[d]Mass Accuracy (ppm)
Insulin icodec	21.80	21.81	1063.6531	$[M+6H^+]^{6+}$	6375.8748	$C_{280}H_{435}N_{71}O_{87}S_6$	6376.0121	21.5
U5 / B^{29}-(C_4)	21.68	21.69	664.3026	$[M-H^+]^-$	665.3099	$C_{27}H_{47}N_5O_{14}$	665.3120	3.2
U6 / B^{29}-(C_6)	25.09	25.02	692.3286	$[M-H^+]^-$	693.3359	$C_{29}H_{51}N_5O_{14}$	693.3432	10.5
U8 / B^{29}-(C_8)	29.15	29.09	720.3655	$[M-H^+]^-$	721.3728	$C_{31}H_{55}N_5O_{14}$	721.3746	2.5

[a]Matching retention times from radio- and MS-peaks (within an acceptable time difference of ≤0.1 min)

[b]Monoisotopic mass of ion divided by the number of charges (m/z), from the most abundant multiply charged $[M+zH^+]^{z+}$ or $[M-zH^+]^{z-}$ ions (z = number of protons with one positive charge)

[c]Monoisotopic mass in neutral state after multiplying m/z with z and subtracting or adding monoisotopic mass of z number of protons, according to the following formulas. M (from protonated ion) = $[M+zH^+]^{z+}$ (m/z) x z - (z x 1.0073), M (from deprotonated ion) = $[M-zH^+]^{z-}$ (m/z) x z + (z x 1.0073)

[d]Mass accuracy = [(matched mass - M)/matched mass] × 10^6

2.6.5.9.I　反復投与時のヒトにおける血清代謝物（試験番号：316976）

Report Title: Metabolite Analysis of Human Serum from Male Subjects with Type 2 Diabetes Following Multiple Subcutaneous Dosing of NNC0148-0287 – Samples from Trial NN1436-4314

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID: 316976

Dose:	24 nmol/kg of insulin icodec
Vehicle:	15 mg/ml glycerol, 5.65 mg/ml phenol, 1.08 mg/ml metacresol, 1.17 mg/ml sodium chloride and 101 µg/ml zinc acetate, pH 7.4
Route of Administration:	Once weekly s.c. dosing
Assay	Quantification with ultra-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry and calculation of pharmacokinetic parameters by non-compartmental analysis
Species:	Human
Gender:	Males
Numbers of samples	12 pooled samples per time point

			Serum concentrations (pmol/L)							
Dosing at Trial Day	**Number of weekly doses**	**Analytes**	**0 h**	**10 h**	**20 h**	**168 h**	**348 h**	**516 h**	**$AUC_{0\text{-}168h}$ [a] (h x pmol/L)**	**% of total $AUC_{0\text{-}168h}$**
1	**1**	**Insulin icodec**	<LLOQ	227000	225000	107000	-	-	26900000	92.1
		$B^{1\text{-}29}$-(C_{20})	<LLOQ	<LLOQ	5460	15900	-	-	1640000	5.60
		$B^{24\text{-}29}$-(C_{20})	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	<LLOQ	-	-	NC	NC
		B^{29}-(C_{20})	<LLOQ	2980	4170	4350	-	-	681000	2.33
29	**5**	**Insulin icodec**	215000	NA	493000	240000	95500	47100	59100000	85.3
		$B^{1\text{-}29}$-(C_{20})	39300	NA	46600	47900	27500	14100	7850000	11.3
		$B^{24\text{-}29}$-(C_{20})	2880	NA	3110	2990	2710	2690	511000	0.740
		B^{29}-(C_{20})	8790	NA	10900	11200	8490	7060	1830000	2.64

NA = not analysed, - = not sampled and NC = not calculated

LLOQ for insulin icodec = 10000 pmol/L, LLOQ for B-chain = 2000 pmol/L, LLOQ for B24-29 = 1000 pmol/L, LLOQ for B29 = 1000 pmol/L

[a]AUC of the 168 h dosing interval

2.6.5.9.J　反復投与時のヒトにおける血清代謝物の構造決定（試験番号：316976）

Report Title: Metabolite Analysis of Human Serum from Male Subjects with Type 2 Diabetes Following Multiple Subcutaneous Dosing of NNC0148-0287 – Samples from Trial NN1436-4314

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID: 316976

Species:	Human
Gender:	Male
Assays/Methods:	Analysis of pooled serum samples with LC-MS and processing of mass spectrometry data with MassLynx v4.1 software for calculation of the mono isotopic molecular weights

Dose level (nmol/kg/ week)	**Dosing week**	**Time point (h)**	**Metabolite/ test substance**	**MS-peak retention time (min)**	**Mass of protonated ion[c]**	**Type of ion[c, d]**	**Mass in neutral state[e, f] (amu)**	**Mass of proposed structure[e] (amu)**	**Mass Accuracy[g] (ppm)**
24	5	20[a] (t_{max})	**Insulin icodec**	21.77	6377.0229	$[M+H^+]^+$	6376.0156	6376.0122	-0.5
			Insulin icodec isomer-I	20.97	6377.0229	$[M+H^+]^+$	6376.0156	6376.0122	-0.5
			Insulin icodec isomer-II	22.27	6377.0220	$[M+H^+]^+$	6376.0147	6376.0122	-0.4
			B^{1-29}-(C_{20})	22.81	4033.0740	$[M+H^+]^+$	4032.0667	4032.0642	-0.6
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-I	23.36	4034.0374	$[M+H^+]^+$	4033.0301	4033.0482	4.5
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-II	23.73	4034.0630	$[M+H^+]^+$	4033.0557	4033.0482	-1.9
			B^{2-29}-(C_{20})	22.54	3886.0061	$[M+H^+]^+$	3884.9988	3884.9957	-0.8
			B^{24-29}-(C_{20})	27.18	1535.8702	$[M+H^+]^+$	1534.8629	1534.8534	-6.2
		168[b] ($t_{1/2}$)	**Insulin icodec**	21.78	6377.0244	$[M+H^+]^+$	6376.0171	6376.0122	-0.8
			B^{1-29}-(C_{20})	22.81	4033.0735	$[M+H^+]^+$	4032.0662	4032.0642	-0.5
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-I	23.34	4034.0447	$[M+H^+]^+$	4033.0374	4033.0482	2.7
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-II	23.73	4034.0598	$[M+H^+]^+$	4033.0525	4033.0482	-1.1
			B^{2-29}-(C_{20})	22.56	3886.0251	$[M+H^+]^+$	3885.0178	3884.9957	-5.7
			B^{24-29}-(C_{20})	27.20	1535.8705	$[M+H^+]^+$	1534.8632	1534.8534	-6.4
		348[b] ($2xt_{1/2}$)	**Insulin icodec**	21.78	6377.0225	$[M+H^+]^+$	6376.0152	6376.0122	-0.5
			B^{1-29}-(C_{20})	22.83	4033.0757	$[M+H^+]^+$	4032.0684	4032.0642	-1.0
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-I	23.31	4034.0310	$[M+H^+]^+$	4033.0237	4033.0482	6.1
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-II	23.73	4034.0444	$[M+H^+]^+$	4033.0371	4033.0482	2.8

Dose level (nmol/kg/ week)	Dosing week	Time point (h)	Metabolite/ test substance	MS-peak retention time (min)	Mass of protonated ion[c]	Type of ion[c, d]	Mass in neutral state[e, f] (amu)	Mass of proposed structure[e] (amu)	Mass Accuracy[g] (ppm)
			B^{2-29}-(C_{20})	22.54	3885.9995	$[M+H^+]^+$	3884.9922	3884.9957	0.9
			B^{24-29}-(C_{20})	27.16	1535.8634	$[M+H^+]^+$	1534.8561	1534.8534	-1.8
			B29	28.43	890.5681	$[M+H^+]^+$	889.5608	889.5624	1.8
		516[b] ($3xt_{1/2}$)	**Insulin icodec**	21.80	6377.0298	$[M+H^+]^+$	6376.0225	6376.0122	-1.6
			B^{1-29}-(C_{20})	22.83	4033.0732	$[M+H^+]^+$	4032.0659	4032.0642	-0.4
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-I	23.29	4034.0747	$[M+H^+]^+$	4033.0674	4033.0482	-4.8
			B^{1-29}-(C_{20}) desamido-II	23.73	4034.0657	$[M+H^+]^+$	4033.0584	4033.0482	-2.5
			B^{2-29}-(C_{20})	22.54	3886.0151	$[M+H^+]^+$	3885.0078	3884.9957	-3.1
			B^{24-29}-(C_{20})	27.20	1535.8666	$[M+H^+]^+$	1534.8593	1534.8534	-3.8

[a]Time point selected within the t_{max} range following 5th weekly s.c. dose of 24 nmol/kg

[b]Time point selected at 1, 2 and 3 half-life/s following 5th weekly s.c. dose of 24 nmol/kg

[c]Monoisotopic mass of $[M+H]^+$ ions obtained from MS data following MaxEnt3 deconvolution of multiply charged positive ions

[d]The monoisotopic masses of H^+ used in the calculation of M was 1.0073

[e]Monoisotopic mass in neutral state (M)

[f]Obtained mass of M from $[M+H^+]^+$ ion = mass of protonated ion - mass of H^+

[g]Mass accuracy = [(proposed mass - M)/M] x $1x10^6$

2.6.5.10 *In vitro* 代謝

2.6.5.10.A 肝細胞における種間比較（試験番号：211508）

Report Title: [^{3}H]Eic-NNC 0148-0000-0287: Metabolism in mouse, rat, rabbit, dog and human hepatocytes, a cross-species comparison

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID: 211508

Study system: Cryopreserved hepatocytes	**Relative peak area (%)**									
[a]Species	Mouse	Rat	Rabbit	Dog	Human	Mouse	Rat	Rabbit	Dog	Human
Time (hours)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Concentration (nM)	10	10	10	10	10	1000	1000	1000	1000	1000
Components										
H1	27.6	37.0	62.8	12.3	27.5	7.52	8.95	17.2	4.19	5.65
H2	2.87	5.23	4.60	NA	2.36	1.04	1.02	1.57	NA	NA
H3	2.55	2.40	3.11	NA	1.96	NA	0.8	0.86	NA	NA
H4	1.06	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
H5	1.72	3.02	4.26	1.26	3.17	NA	0.85	1.52	NA	NA
H6	0.80	1.59	2.91	1.16	1.89	NA	0.53	0.63	NA	NA
H7	3.39	3.62	NA	2.57	3.39	1.31	2.54	1.02	NA	NA
Insulin icodec	NA	NA	3.82	NA	NA	28.5	47.5	61.2	53.4	61.1
H8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5.15	NA	NA
H9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.22	NA	2.38	NA
H10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.88	4.25	5.13	4.62
H11	3.97	NA	NA	NA	2.49	2.05	1.06	NA	2.84	2.56
H12	50.0	44.1	18.5	81.1	54.8	56.6	31.8	6.57	32.1	26.0
H13	1.28	NA	NA	NA	NA	0.77	NA	NA	NA	NA
H14	0.88	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

[a]Hepatocyte pools from male CD-1 mice, male Sprague Dawley rats, female New Zeeland white rabbits, male beagle dogs and male and female humans.

NA = not applicable

2.6.5.10.B　インスリン分解酵素による *in vitro* 代謝（試験番号：214386）

Report Title: *In vitro* metabolism with human insulin degrading enzyme

Location in CTD: 5.3.2.2

Study ID: 214386

Test substance: Insulin icodec

Comparator: Human insulin

Study system: 10 µM test substance and comparator with10 µg/ml recombinant human insulin degrading enzyme in 40 mM potassium phosphate, pH 7.2. 24 h incubation with insulin icodec and 45 min incubation with human insulin

Test substance	Metabolite sequences from the A- and B-chains[a]	MS-peak retention time (min)	Mass of protonated ion (amu)[b]	Type of ion	Mass in neutral state (amu)[c,d,e]	Mass of proposed structure (amu)	Mass Accuracy (ppm)[f]
Insulin icodec	**Insulin icodec**	24.7	6377.0737	$[M+H^+]^+$	6376.0664	6376.0121	**8.5**
	A^{1-21} - B^{1-10} - B^{15-25}	10.5	4750.1133	$[M+H^+]^+$	4749.1060	4749.0750	**6.5**
	A^{1-21} - B^{1-10} - B^{14-24}	12.1	4684.1206	$[M+H^+]^+$	4683.1133	4683.0532	**12.8**
	A^{1-21} - B^{1-10} - B^{15-24}	11.8	4613.0576	$[M+H^+]^+$	4612.0503	4612.0160	**7.4**
	A^{1-21} - B^{1-10} - B^{17-25}	9.9	4499.9917	$[M+H^+]^+$	4498.9844	4498.932	**11.6**
	A^{1-21} - B^{1-9} - B^{17-25}	11.3	4362.9248	$[M+H^+]^+$	4361.9175	4361.8731	**10.2**
	A^{1-21} - B^{5-10} - B^{15-25}	9.9	4261.8877	$[M+H^+]^+$	4260.8804	4260.8366	**10.3**
	A^{1-21} - B^{5-9} - B^{15-25}	11.2	4124.8237	$[M+H^+]^+$	4123.8164	4123.7777	**9.4**
	A^{1-21} - B^{5-9} - B^{17-25}	10.7	3874.6926	$[M+H^+]^+$	3873.6853	3873.6347	**13.1**
	A^{1-14} - B^{1-10}	7.8	2621.1436	$[M+H^+]^+$	2620.1363	2620.1178	**7.1**
	A^{1-13} - B^{1-10}	7.8	2492.0957	$[M+H^+]^+$	2491.0884	2491.0752	**5.3**
	A^{1-14} - B^{1-9}	9.3	2484.0903	$[M+H^+]^+$	2483.0830	2483.0589	**9.7**
	A^{1-13} - B^{1-9}	9.6	2355.0457	$[M+H^+]^+$	2354.0384	2354.0163	**9.4**
	B^{25-29}*	27.7	1388.8112	$[M+H^+]^+$	1387.8039	1387.7850	**13.6**
	B^{26-29}*	28.5	1251.7528	$[M+H^+]^+$	1250.7455	1250.7261	**15.5**
	B^{28-29}*	28.5	987.6412	$[M+H^+]^+$	986.6339	986.6151	**19.1**

Test substance	Metabolite sequences from the A- and B-chains[a]	MS-peak retention time (min)	Mass of protonated ion (amu)[b]	Type of ion	Mass in neutral state (amu)[c,d,e]	Mass of proposed structure (amu)	Mass Accuracy (ppm)[f]
Human insulin	**Human insulin**	19.3	5804.6802	$[M+H^+]^+$	5803.6729	5803.6376	**6.1**
	A^{14-21} - B^{10-30}	15.1	3486.6513	$[M+H^+]^+$	3485.6440	3485.6424	**0.5**
	A^{14-21} - B^{11-30}	16.5	3349.6218	$[M+H^+]^+$	3348.6145	3348.5835	**9.3**
	A^{15-21} - B^{10-30}	14.1	3323.6155	$[M+H^+]^+$	3322.6082	3322.5791	**8.8**
	A^{15-21} - B^{11-30}	15.6	3186.5488	$[M+H^+]^+$	3185.5415	3185.5202	**6.7**
	A^{14-21} - B^{14-30}	12.4	3008.4114	$[M+H^+]^+$	3007.4041	3007.3884	**5.2**
	A^{14-21} - B^{15-30}	11.7	2937.3823	$[M+H^+]^+$	2936.3750	2936.3513	**8.1**
	A^{15-21} - B^{14-30}	11.2	2845.3735	$[M+H^+]^+$	2844.3662	2844.3251	**14.4**
	A^{1-13} - B^{1-13}	9.1	2833.2947	$[M+H^+]^+$	2832.2874	2832.2703	**6.0**
	A^{14-21} - B^{17-30}	8.1	2661.2249	$[M+H^+]^+$	2660.2176	2660.2039	**5.1**
	A^{1-14} - B^{1-9}	11.4	2518.1069	$[M+H^+]^+$	2517.0996	2517.0797	**7.9**
	A^{1-13} - B^{1-10}	7.8	2492.083	$[M+H^+]^+$	2491.0757	2491.0752	**0.2**
	A^{14-21} - B^{14-25}	15.0	2418.1062	$[M+H^+]^+$	2417.0989	2417.082	**7.0**
	A^{1-13} - B^{1-9}	9.7	2355.0229	$[M+H^+]^+$	2354.0156	2354.0163	**-0.3**
	A^{14-21} - B^{15-25}	14.2	2347.0405	$[M+H^+]^+$	2346.0332	2346.0449	**-5.0**
	A^{14-21} - B^{14-24}	11.3	2271.0447	$[M+H^+]^+$	2270.0374	2270.0136	**10.5**

***** Intact side chain on $LysB^{29}$ in insulin icodec; ADO-ADO-gGlu-C_{20}OH. ADO: 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid. gGlu: gamma-glutamyl.

C_{20}OH: eicosanedioic acid

[a]Metabolite sequences with intact disulphide bonds at $ACys^6$-$ACys^{11}$, $ACys^7$-$BCys^7$ and $ACys^{20}$-$BCys^{17}$

[b]Monoisotopic mass of $[M+H]^+$ ions obtained from MS data following MaxEnt3 deconvolution of multiply charged positive ions

[c]The monoisotopic masses of H^+ used in the calculation of M was 1.0072

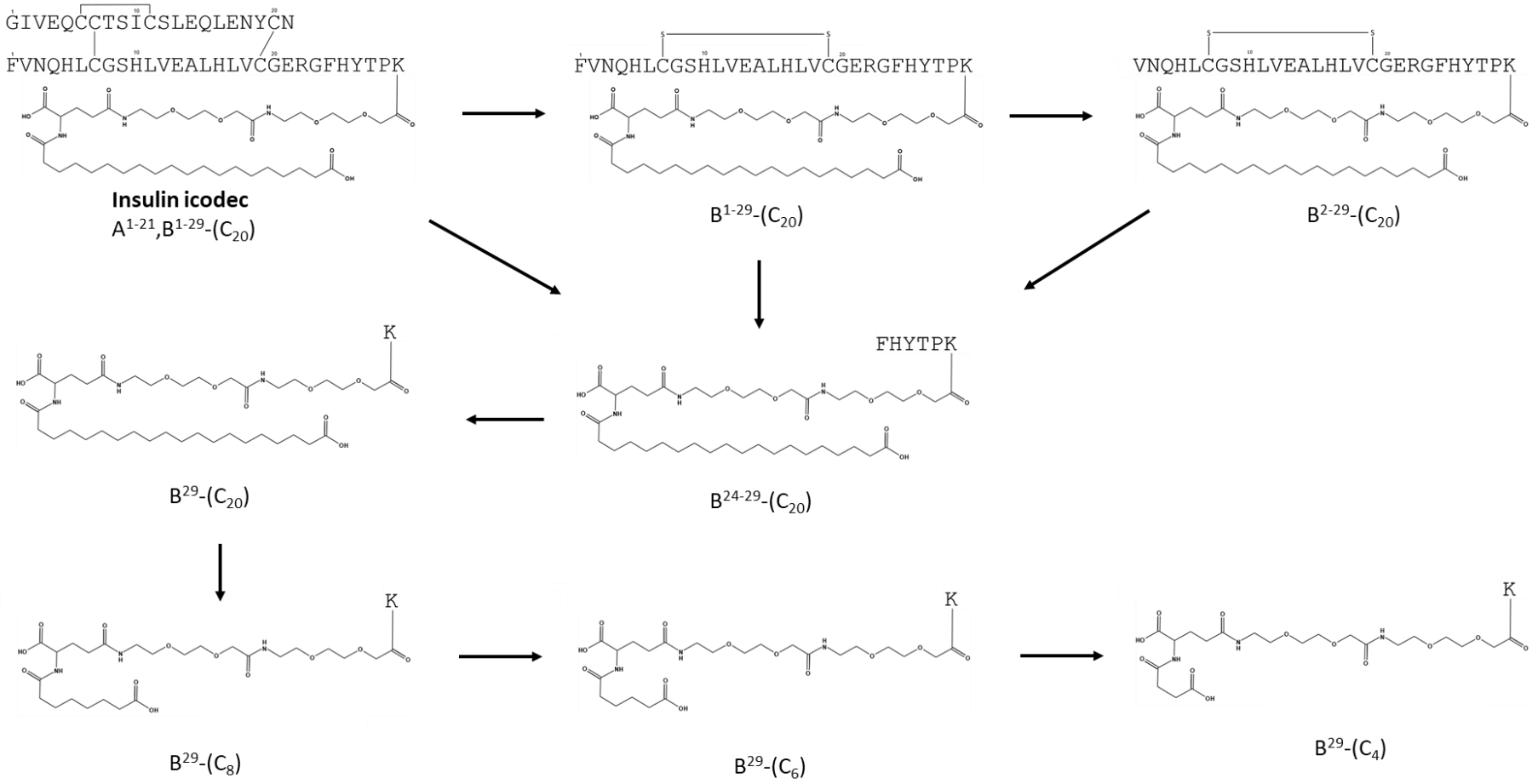
[d]Monoisotopic mass in neutral state (M)

[e]Obtained mass of M from $[M+H]^+$ ion = mass of protonated ion - mass of H^+

[f]Mass accuracy = [(matched mass - M)/M] x $1x10^6$

2.6.5.11 推定代謝経路

The metabolites have been named by their amino acid sequence and length of difatty acid moiety. Plasma metabolites: B^{1-29}-(C_{20}) 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 (dog): B^{29}-(C_8), B^{29}-(C_6) and B^{29}-(C_4). In addition to the principal metabolites shown above, isomers of insulin icodec and deamidation products have been characterised as minor circulating metabolites.



2.6.5.12 薬物代謝酵素誘導／阻害

Test article: insulin icodec

Report Title: Effect on hepatic levels of cytochrome P450 and related parameters in the male and female Sprague-Dawley Rat after subcutaneous daily injection for 26 weeks

Location in CTD: 4.2.2.4-3
Study ID: 214220

Species:	**Sprague Dawley Rat**
Formulation:	Dose vehicle (dilution medium): 21 mg/mL glycerol and 1.17 mg/mL NaCl (control vehicle: 16 mg/mL glycerol, 2.35 mg/mL phenol, 2.70 mg/mL metacresol, 1.17 mg/mL NaCl with pH 7.4)
Method of Administration:	Subcutaneous
Sampling time:	26 weeks after dosing
Methods:	**Experimental method:** Liver microsomes from treated and control animals were prepared by homogenisation and differential centrifugation. Measurement of enzyme activities were performed in duplicates at ca 37ºC using the following marker substrates: Ethoxyresorufin (CYP1A), Pentoxyresorufin (CYP2B), [^{14}C]-Testosterone (CYP3A, CYP2A), [^{14}C]-Tolbutamide (CYP2C) and [^{14}C]-Lauric acid (CYP2E). Metabolite formation was assessed by fluorescence spectroscopy for ethoxyresorufin O-deethylation (EROD) and pentoxyresorufin O-dependentylation (PROD) and radio-HPLC for [^{14}C]-Testosterone hydroxylation (6β, 7α), [^{14}C]-Tolbutamide methylhydroxylation and [^{14}C]-Lauric acid 11-hydroxylation. **Statistical method:** Statistical analysis on the equally numbered sample groups was performed using the Williams' test.

		[a]Enzyme activity or protein amount relative to control						
Dose level (nmol/kg/day)		**20**		**40**		**60**		**80**
Gender (n=5 per group)		**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**
Enzyme/proteins	**Substrates**							
Microsomal proteins	NA	1.0	1.0	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2
Total CYP450	NA	1.0 (1.1)	0.9 (0.9)	1.2 (1.4*)	0.9 (1.0)	1.1 (1.2*)	0.9 (1.0)	1.1 (1.3*)
CYP1A	7-Ethoxyresorufin O-deethylase	1.4 (1.4)	0.9 (0.9)	1.7** (2.0**)	1.0 (1.1)	1.7** (1.9**)	1.2 (1.3)	1.7** (2.0**)
CYP2A	Testosterone 7α-hydroxylase	BLQ	0.9 (0.9)	BLQ	1.0 (1.1)	BLQ	0.9 (1.0)	BLQ
CYP2B	7-Pentoxyresorufin O-dependentylase	1.0 (1.1)	1.3 (1.3)	1.2 (1.6)	1.6* (1.8*)	1.3 (1.6)	1.7* (1.9**)	0.8 (1.0)
CYP2C	Tolbutamide-methylhydroxylase	1.3 (1.3)	0.8 (0.8)	1.5 (1.8**)	0.9 (0.9)	1.3 (1.4**)	1.0 (1.1)	1.2 (1.4**)
CYP2E	Lauric acid 11-hydroxylase	1.4* (1.5)	1.0 (1.0)	1.8* (2.2**)	1.0 (1.0)	1.4* (1.5)	1.0 (1.2)	1.4* (1.6*)
CYP3A	Testosterone 6β-hydroxylase	1.2 (1.3)	BLQ	1.4 (1.7*)	BLQ	1.5 (1.7*)	BLQ	1.2 (1.5*)

[a]Enzyme activity measured as enzymatically transformed amount per mg protein (per g liver in brackets)
Significantly different from controls: *p<0.05; **p<0.01
BLQ = Below limit for quantification
NA = Not applicable

2.6.5.13 排泄

Test article: insulin icodec

2.6.5.13.A [^{3}H]Eic-インスリン イコデクを投与時のラットにおける排泄（試験番号：212410）

Report Title: [^{3}H]Eic-NNC0148-0000-0287: A study of disposition following subcutaneous administration to the Sprague-Dawley rat

Location in CTD: 4.2.2.5-1

Study ID: 212410

Dose (nmol/kg):	75 nmol/kg and 50 MBq/kg of [^{3}H]Eic-insulin icodec				
Vehicle/Formulation:	16 mg/mL glycerol, 2.35 mg/mL phenol, 2.70 mg/mL metacresol, 20 mM sodium chloride and 206 µg/ml zinc acetate with pH 7.4				
Method of Administration:	Subcutaneous				
Feeding condition:	Fed				
Assay	liquid scintillation counting				
Species:	Sprague Dawley Rat				
Gender/Number of animals	3M				
	Excretion routes – Recovery (% of administered dose)				
Time (hours)	**Urine**	**Faeces**	**Cage Wash**	**Carcass**	**Total**
0-12	0.781	0.001	NA	NA	0.782
12-24	2.18	3.85	[b]0.272	NA	6.30
24-48	4.67	11.2	0.277	NA	16.1
48-72	3.94	7.25	0.278	NA	11.5
72-96	3.00	3.73	0.100	NA	6.83
96-120	2.95	2.61	0.197	NA	5.76
120-144	2.39	1.34	0.186	NA	3.92
144-168	1.79	1.03	0.148	NA	2.97
[a]0-168	21.7 ± 4.78	31.0 ± 1.80	1.46 ± 0.359	39.0± 4.00	[c]94.1 ± 2.90

[a]Mean of recoveries with standard deviation (n=3). [b]0-24 h collection. [c]Mean of total recoveries (n=3) including recoveries in exhaled air (0-24 h collection), final cage wash and cage debris.

2.6.5.13.B [^{3}H]ADO-インスリン イデコクを投与時のイヌにおける排泄（試験番号：214108）

Report Title: [^{3}H]ADO-NNC0148-0287: A study of disposition in plasma, urine and faeces following a single subcutaneous administration to the dog

Location in CTD: 4.2.2.5-2
Study ID: 214108

Dose:	18 nmol/kg and 20 MBq/kg of [^{3}H]ADO-insulin icodec
Vehicle:	15 mg/mL glycerol, 5.65 mg/mL phenol, 1.08 mg/mL metacresol, 1.17 mg/mL sodium chloride and 0.45 µg/mL zinc acetate, pH 7.4
Method of Administration:	Subcutaneous
Feeding condition:	Fed
Assay	liquid scintillation counting
Species:	Beagle Dog
Gender/Number of animals	2M

	Excretion routes – Cumulative recovery (% of the administered dose)[a]				
Time interval (hours)	**Urine**	**Faeces**	**Cage Wash**	**Carcass**	**Total**
0-24	3.71	0.67	0.13	-	-
0-48	11.1	4.62	0.37	-	-
0-72	18.3	7.68	0.98	-	-
0-96	23.6	13.0	1.30	-	-
0-120	27.7	16.8	1.52	-	-
0-144	32.2	19.5	1.96	-	-
0-168	35.2	21.2	2.19	-	-
0-192	37.2	21.9	2.36	-	-
0-216	39.2	23.4	2.54	-	-
0-240	40.8	24.4	2.68	-	-
0-264	42.3	25.1	2.81	-	-
0-288	42.5	25.7	2.88	-	-
0-312	43.4	26.1	2.98	-	-
0-336	44.0	26.7	3.11	6.17[b]	**80.8**[c]

[a]Mean recovery (n=2). [b]Recovery in carcass after termination. [c]Total recovery including final cage wash, cage debris and content in swabs from cage wash (0.79% of the dose).

2.6.5.14 胆汁中排泄

Test article: insulin icodec

Report Title: [^{3}H]Eic-NNC0148-0000-0287: A study of disposition following subcutaneous administration to the Sprague-Dawley rat

Location in CTD: 4.2.2.5-1

Study ID: 212410

Dose (nmol/kg):	75 nmol/kg and 50 MBq/kg of [^{3}H]Eic-insulin icodec					
Vehicle/Formulation:	16 mg/mL glycerol, 2.35 mg/mL phenol, 2.70 mg/mL metacresol, 20 mM sodium chloride and 206 µg/ml zinc acetate with pH 7.4					
Method of Administration:	Subcutaneous					
Feeding condition:	Fed					
Assay	liquid scintillation counting					
Species:	Bile duct cannulated Sprague Dawley Rat					
Gender/Number of animals	4M					
	Excretion routes – Recovery (% of administered dose)					
Time (hours)	**Bile**	**Urine**	**Faeces**	**Cage Wash**	**Carcass**	**Total**
0-2	0.034	NA	NA	NA	NA	0.034
2-4	0.204	NA	NA	NA	NA	0.204
4-6	0.337	NA	NA	NA	NA	0.337
6-12	1.24	NA	NA	NA	NA	1.24
12-24	4.09	[b]3.93	[b]1.70	[b]0.565	NA	10.3
24-48	4.47	5.76	2.26	0.364	NA	12.9
[a]0-48	10.4 ± 7.92	9.69 ± 2.73	3.96 ± 1.07	0.929 ± 0.826	79.5 ± 6.02	[c]105 ± 1.56

[a]Mean of recoveries with standard deviation (n=4). [b]0-24 h collection. [c]Mean of total recoveries (n=4) including recoveries in final cage wash and cage debris.

2.6.5.15 薬物相互作用

Test article: insulin icodec

See Section 2.6.5.6.A.

2.6.5.16 その他の薬物動態試験

Test article: insulin icodec

No studies performed.