インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 3
表目次 3
略語一覧 5
2.6.6.1 まとめ 8
2.6.6.2 単回投与毒性 13
2.6.6.3 反復投与毒性 13
2.6.6.3.1 ラットを用いた反復投与毒性試験 14
2.6.6.3.1.1 SD 系ラットへの 1 日 1 回皮下投与による 8 週間毒性試験及び 6 週間回復試験 14
2.6.6.3.1.2 SD 系ラットへの 1 日 1 回皮下投与による 26 週間毒性試験及び 12 週間回復試験 19
2.6.6.3.1.3 SD 系ラットへの 1 日 1 回皮下投与による 52 週間毒性試験 23
2.6.6.3.2 イヌを用いた反復投与毒性試験 31
2.6.6.3.2.1 ビーグル犬への週 2 回皮下投与による 8 週間毒性試験及び 6 週間回復試験 31
2.6.6.3.2.2 ビーグル犬への週 2 回皮下投与による 26 週間毒性試験及び 12 週間回復試験 33
2.6.6.4 遺伝毒性試験 35
2.6.6.4.1 *In vitro* 遺伝毒性試験 36
2.6.6.4.1.1 ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 5 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102）を用いたプレート法による復帰突然変異試験 36
2.6.6.4.2 *In vivo* 遺伝毒性試験 37
2.6.6.5 がん原性試験 37
2.6.6.6 生殖発生毒性 38
2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 39
2.6.6.6.1.1 SD 系ラットへの皮下投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する予備毒性試験 39
2.6.6.6.1.2 SD 系ラットへの皮下投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する毒性試験 42
2.6.6.6.2 胚・胎児発生に関する試験 45
2.6.6.6.2.1 ニュージーランド白色種ウサギへの皮下投与による胚及び胎児発生に関する予備的な毒性試験 45
2.6.6.6.2.2 ニュージーランド白色種ウサギへの皮下投与による胚及び胎児発生に関する毒性試験 47
2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 50
2.6.6.6.3.1 SD 系ラットへの皮下投与による出生前及び出生後の発生に関する試験 50
2.6.6.6.4 幼若動物を用いた試験 56
2.6.6.7 局所刺激性試験 56
2.6.6.7.1.1 ウサギへの静脈内注射後 2 日及び 5 日の局所刺激性試験 57
2.6.6.7.1.2 ブタへの皮下注射後 2、7、14 及び 28 日の局所刺激性試験 58
2.6.6.7.1.3 ミニブタへの 13 週間の反復皮下注射後及び単回皮下注射後の局所刺激性試験 58
2.6.6.8 その他の毒性試験 60

2.6.6.8.1 免疫原性 60
2.6.6.8.2 免疫毒性 60
2.6.6.8.3 依存性 60
2.6.6.8.4 代謝物 61
2.6.6.8.5 不純物及び溶出物 61
2.6.6.8.5.1 製剤中の不純物の評価 61
2.6.6.8.5.2 実際の不純物及び潜在的不純物の変異原性の評価 61
2.6.6.8.5.3 容器・施栓系からの溶出物の評価 62
2.6.6.8.6 インスリン イコデクの臨床用製剤に含有される添加剤の評価 62
2.6.6.8.7 その他の試験 65
2.6.6.9 ヒトにおける曝露量との比較 65
2.6.6.10 考察及び結論 67
参考文献 74

図目次

ページ

図 2.6.6-1 哺育後期の児死亡の有無別にみた F0 雌の哺育中の群平均体重 53

表目次

ページ

表 2.6.6-1 重要な毒性試験の概要 9
表 2.6.6-2 ラットを用いた重要な反復投与毒性試験の概要表 14
表 2.6.6-3 ラットを用いた 8 週間試験－投与群、用量及び動物数 15
表 2.6.6-4 ラットを用いた 26 週間試験－投与群、用量及び動物数 19
表 2.6.6-5 ラットを用いた 52 週間試験－投与群、用量及び動物数 24
表 2.6.6-6 52 週間投与期間終了時点における生存動物数 25
表 2.6.6-7 イヌを用いた重要な反復投与毒性試験の概要表 31
表 2.6.6-8 イヌを用いた 8 週間試験－投与群、用量及び動物数 31
表 2.6.6-9 イヌを用いた 26 週間試験－投与群、用量及び動物数 33
表 2.6.6-10 ラット 52 週間試験の雌における乳腺腫瘍の発生率 38
表 2.6.6-11 ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する毒性試験の概要表 39
表 2.6.6-12 ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する予備的な試験－投与群、用量及び動物数 40
表 2.6.6-13 ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験－投与群、用量及び動物数 42
表 2.6.6-14 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験の概要表 45
表 2.6.6-15 ウサギを用いた胚及び胎児発生に関する予備的な試験－投与群、用量及び動物数 45
表 2.6.6-16 ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験－投与群、用量及び動物数 48
表 2.6.6-17 ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する毒性試験の概要表 50

表 2.6.6-18　ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験のデザイン 51
表 2.6.6-19　50 nmol/kg/日投与群の哺育後期に安楽死又は死亡した出生児における一般状態変化 ... 54
表 2.6.6-20　局所刺激性試験の概要 57
表 2.6.6-21　13 週間局所刺激性試験－試験デザイン 59
表 2.6.6-22　抗インスリン イコデク抗体陽性動物数 60
表 2.6.6-23　NOAEL での酢酸亜鉛に関する動物とヒトの曝露量比 64
表 2.6.6-24　重要な毒性試験における NOAEL での動物とヒトの曝露量比 66

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）〕

2.6.6.1　まとめ

インスリン イコデクは、ICH S6(R1)で定義され、最近では米国食品医薬品局（FDA）の 21 CFR part 600 により指定されたバイオテクノロジー応用医薬品とみなされている[1,2]。このため、インスリン イコデクの毒性プログラムは ICH S6(R1)ガイドライン、欧州医薬品庁（EMA）ガイダンス「Points to consider document on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin analogues」のほか、適切と判断される場合には ICH M3(R2)ガイドラインに従って計画した[1,3,4]。毒性プログラムは、ラットを用いた最長 52 週間の反復投与毒性試験、イヌを用いた最長 26 週間の反復投与毒性試験、ウサギ及びブタを用いた限定的な遺伝毒性試験及び局所刺激性試験で構成される（表 2.6.6-1）。生殖毒性プログラムは ICH S5(R3)ガイドラインに従って実施した[5]。重要な試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に従って実施した。

Sprague-Dawley（SD）系ラット及びビーグル犬は、これらの動物種の薬理学的な反応性と皮下投与用インスリンアナログの評価に用いるげっ歯類及び非げっ歯類として推奨されてきた過去の経緯に基づき、安全性試験に最適な種であると考えられた。受胎能及び出生前・出生後の発生に関する試験には SD 系ラット、胚・胎児発生に関する試験には SD 系ラット及びニュージーランド白色種ウサギを用いた。静脈内又は皮下投与時の局所刺激性の評価にはニュージーランド白色種ウサギ、LYD（デンマーク・ランドレース種、ヨークシャー種、デュロック種の交雑種）ブタ及びゲッチンゲンミニブタを用いた。すべての毒性試験において、投与経路は臨床での予定投与経路である皮下投与とした。

すべての重要な反復投与毒性試験及び生殖毒性試験でトキシコキネティクス（TK）の評価を行い、ヒトにおける曝露量と反復投与毒性試験及び生殖毒性試験における曝露量の比を算出した。

イヌを用いた 8 週間及び 26 週間試験では心電図検査を実施しており、その結果を Module (M) 2.6.2.4.2.3 に示す。

いくつかの試験で低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡が認められたため、試験期間中にインスリン イコデクの用量を減量した。これらの試験では、用量を試験開始時の用量／減量後の用量（例：150/100 nmol/kg/日）で示した。無毒性量（NOAEL）の設定などすべての評価に減量後の用量を用いた。

正常血糖を有する正常動物にインスリンを投与すると、血糖値は正常な生理学的範囲を下回るレベルまで低下する。血糖降下作用の程度及び持続時間に応じて、低血糖様の一般状態変化や、摂餌量の増加、血液生化学的検査値の変化、器官の変化又は低血糖に起因する死亡など二次的な影響がみられることがある。正常血糖を有する動物への投与時にみられるこれらの影響はインスリン特有の薬理作用に起因するものであることから、毒性ではなく目的とする薬理作用又は過剰な薬理作用と考えられる。したがって、目的とする薬理作用又は過剰な薬理作用に起因するもの又はこれに関連するもの以外の有害作用が認められなかった用量を NOAEL とみなす。これは、動物に有害作用が認められなかった用量を NOAEL とみなし、特有の血糖降下作用を考慮していない一部の試験報告書とは異なるアプローチである。提示したデータの解釈の一助として、反復投与毒性試験については無影響量（NOEL）を示した。NOEL はインスリン イコデクによる影響が認められなかった用量とする。

M 2.6.6 に示した試験については、投与の影響が認められたパラメータのみを示して考察を行ない、測定したが投与の影響が認められなかったパラメータに関する記載は省略した。重要な試験の用量設定に用いた承認申請に使用しない反復投与毒性試験については要約のみを M 2.6.7.6 に記載する。

表 2.6.6-1　　重要な毒性試験の概要

Study type and duration	Route of administration	Species
Single-dose toxicity		
	No studies conducted	
Repeat-dose toxicity		
8 weeks with 6 weeks recovery	s.c.	Rat and dog
26 weeks with 12 weeks recovery	s.c.	Rat and dog
52 weeks including carcinogenicity assessment	s.c.	Rat
Reproductive and developmental toxicity studies		
Combined fertility and embryo-foetal development	s.c.	Rat
Embryo-foetal development	s.c.	Rabbit
Pre- and post-natal development	s.c.	Rat
Local tolerance		
Single dose	i.v.	Rabbit
Single and repeat dosing	s.c.	Pig/Minipig

結果

反復投与毒性試験

反復投与毒性試験では、投与に関連する変化はいずれも、正常血糖を有する正常ラット及び正常イヌに投与した場合、正常範囲を超えて血糖値を低下させるというインスリン イデコクの薬理作用又はその二次的な影響に起因するものと考えられた。その裏付けとして、ヒトインスリン（HI）〔Neutral Protamine Hagedorn（NPH）インスリンとして投与〕を 1 日 1 回反復投与により持続的に投与した場合（インスリン イコデクの長期間にわたる曝露／長い半減期を再現）にも同様の変化が認められており、文献でも報告されている。

ラットでは、60 nmol/kg/日以上を投与した雄及び 40 nmol/kg/日以上を投与した雌で低血糖に起因する死亡が認められた。反復投与時の血糖降下作用は雄よりも雌で顕著であった。このため、26 週間及び 52 週間反復投与毒性試験ならびに生殖発生毒性試験の雄にはさらに高い用量を選択した。

30 nmol/kg/日以上を投与した雌及び 60 nmol/kg/日以上を投与した雄で体重増加促進、摂餌量、血漿中尿素及びナトリウムの増加ならびにトリグリセリドの低下が認められた。さらに、8 週間試験では、75 nmol/kg/日以上でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の軽度の増加が認められた。投与後 52 週には 30 nmol/kg/日以上を投与した雌でクレアチニン増加、40 nmol/kg/日以上を投与した雄でリン及びマグネシウムの増加ならびにカリウムの低下が認められた。

ラットを用いた 3 つの試験では、雌雄において膵臓（20 nmol/kg/日以上での膵島萎縮）、褐色脂肪（20 nmol/kg/日以上での空胞形成及び細胞サイズの増大）、坐骨神経（40 nmol/kg/日以上での軸索変性）、骨格筋（40 nmol/kg/日以上での変性、萎縮／壊死）に病理組織学的変化が認められた。26 週間試験の雄では神経及び骨格筋の変化は認められなかった。8 週間試験及び 26 週間試験の雌では、肝臓での染色希薄化（rarefaction）の減少（40 nmol/kg/日以上）が認められ、これと同時に肝臓重量の減少が認められた。8 週間試験のみで雄の副腎（75 nmol/kg/日以上での空胞形成の増大）及び雌の骨髄（75 nmol/kg/日以上での脂肪含量の増加）に変化が認められた。以上の変化はいずれも部分的又は完全な回復性を示した。52 週間試験のみで雌雄の心臓（20 nmol/kg/日以上での線維化の増加)及び精巣（60 nmol/kg/日での精細管の変性／萎縮）に変化が認められた。

イヌを用いた試験では、8 週間にわたる 14 nmol/kg 以上の週 2 回投与後に低血糖様の一般状態変化、血糖値及び内因性インスリン濃度の低下、体重増加抑制及び残餌量減少が認められた。26 週間にわたる 6 nmol/kg 以上の週 2 回投与後に肝臓の絶対重量及び相対重量の減少が認められた。いずれの変化も完全な回復性を示した。インスリン イコデクの投与に関連する病理組織学的変化は認められなかった。

以上の投与に関連する変化は HI を投与した時にも認められており、文献でも報告されていることから、インスリン イコデクの薬理作用である血糖降下作用に関連するものと考えられる。

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において抗インスリン イコデク抗体を測定した。8 週間試験では、投与終了時に 67～77%の動物で抗インスリン イコデク抗体が認められ、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。インスリン イコデクの血糖降下作用及び曝露量の評価に基づき、抗体の産生は試験結果に影響を及ぼしていないと判断した。ラットを用いた 52 週間反復投与試験では、抗体産生に起因すると考えられる曝露量又は血糖降下作用への影響は認められなかったため、抗インスリン イコデク抗体の産生は評価していない。

遺伝毒性及びがん原性

In silico（定量的）構造活性相関〔(Q)SAR〕解析によりインスリン イコデクの C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体〔8-アミノ-3,6-ジオキサオクタン酸（Ado）-Ado-γGlu をリンカーとして B 鎖 29 位のリジン（Lys^{B29}）に付加した C_{20} 脂肪酸側鎖〕を評価した。この解析により C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体は細菌に対して変異原性を示さないと結論され、がん原性、染色体損傷又は遺伝毒性は予測されなかった。さらに、Ames スクリーニング試験では、インスリン イコデクは *in vitro* で遺伝毒性を誘発しなかった。したがって、ICH S6(R1)ガイドラインに従い[1]、インスリン イコデクに関する追加の遺伝毒性試験は実施しなかった。

ラットの 52 週間試験においてインスリン イコデクの発がん作用を評価した。インスリン イコデク又は HI（NPH インスリンとして投与）の投与による過形成又は腫瘍の発生はみられなかった。具体的には、雌における乳腺過形成及び腫瘍の発生率は対照群及び NPH インスリン投与群を含むすべての群で同様であり、投与に関連する変化を検出できる程度であった。さらに、最長 26 週間投与したイヌ又

はラットでは、過形成又は腫瘍の発生においてインスリン イコデクの投与に関連する変化は認められなかった。

生殖発生毒性

ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験では、インスリン イコデクの投与により、交配前の雌雄において血糖値の低下、体重増加促進及び摂餌量の増加など、目的とする薬理作用又はその二次的な影響と一致すると考えられる所見が認められた。母体毒性は認められず、受胎率、着床前胚損失、着床後胚損失、胎盤重量、胎児重量及び性比への影響も認められなかった。また、インスリン イコデクの投与に関連する内臓又は骨格の異常は認められなかった。

ウサギを用いた胚・胎児発生試験では、インスリン イコデクの投与により、血糖値の低下による低血糖様の一般状態変化及び数匹の安楽死、摂餌量の増加、予備試験における体重増加促進など、目的とする薬理作用又はそれによる影響と一致すると考えられる所見が認められた。主試験では、18 nmol/kg/日（高用量）投与群で妊娠 21 日及び 22 日に 2 匹で流産がみられた。流産は、投与だけでなく、妊娠中の胎児の成長が著しく、母動物の代謝にストレスが加わる時期の投与の中止による母動物の代謝の変化に関連するものと考えられる。その裏付けとして、ウサギにインスリン アスパルト、インスリン デテミル、HI（NPH インスリンとして投与）を投与した時にも高用量投与時の現象として流産がみられている。ウサギを用いた主試験では、体重増加量、妊娠子宮重量、平均黄体数、着床数、着床前胚損失、着床後胚損失、吸収胚数、生存胎児数、性比、胎盤及び胎児重量にインスリン イコデクの投与による影響はみられなかった。また、インスリン イコデクの投与に関連する胎児の内臓及び骨格の異常は認められなかった。

ラットを用いた出生前・出生後の発生に関する試験では、20 nmol/kg/日（低用量）及び 35 nmol/kg/日（中用量）で F0 動物又は F1 動物に投与に関連する変化は認められなかった。50 nmol/kg/日（高用量）では、試験期間中に F0 雌 4 匹を安楽死させた。このうち 2 匹は分娩時又は哺育開始時に安楽死させたが、背景データの範囲内と考えられる。残る 2 匹は哺育後期に安楽死させたが（1 匹は同腹児全死亡、1 匹は重度の低血糖様の一般状態変化による）、いずれも通常はみられないものであり、インスリン イコデクの投与に関連するものと考えられた。哺育中の F0 雌の平均体重増加量は 50 nmol/kg/日投与群で対照群と比較して有意に抑制され、この影響は一般状態変化がみられ死亡した出生児の母動物で最も顕著であった。血糖値は全投与群で低かったが、50 nmol/kg/日投与群で最も顕著であった。哺育 14 日までの生児出産母動物数、性比及び同腹児数にインスリン イコデク投与の影響は認められなかった。しかしながら、哺育 15～18 日に動物福祉の観点から 50 nmol/kg/日投与群の出生児 25 匹を安楽死させたほか、4 匹が死亡しており、安楽死させた出生児の大部分に活動性低下、振戦、筋緊張低下、部分的閉瞼、失調性歩行異常など低血糖様の一般状態変化がみられ、いずれも哺育後期に著明な体重減少がみられた数匹の F0 雌から出生した児であった。この死亡により、哺育 21 日の哺育率が低下した。さらに、50 nmol/kg/日投与群では、哺育中の出生児の平均体重増加量がわずかに抑制された。50 nmol/kg/日投与群の出生児の一般状態は、一般状態変化が認められた出生児の F0 雌における出生児の栄養不良、体重増加抑制、一般状態変化及び死亡につながった体重減少の程度と関連するものと考

えられた。インスリン治療全般及び妊娠・授乳期では特に血糖値や低血糖が大きく重視されるため、正常血糖を有する動物に投与した時のこれらの観察結果の臨床的意義は限定的と考えられる。

離乳前には全投与群で F1 動物として選抜しなかった出生児の反射及び肉眼的所見にインスリン イコデク投与の影響は認められず、F1 動物の生存、成長、身体の発育、反射の発達、行動及び生殖などの離乳後の発達に母動物への投与の影響は認められなかった。

局所刺激性

ラット及びイヌへの反復投与後、皮下投与部位の局所反応は対照群とインスリン イコデク投与群で同程度であった。このため、局所反応はインスリン イコデク自体ではなく投与手技又は製剤処方に起因するものと考えられた。ミニブタでは、局所刺激性試験において上市予定製剤を評価した。組織反応は軽度の許容可能な炎症反応であり、インスリン イコデクを溶媒と比較した場合には差はみられなかったが、滅菌等張食塩水と比較した場合に限り軽微な差がみられた。

添加物及び不純物

予定されている用法・用量のインスリン イコデクに使用される添加物は既知のものであり、皮下投与用の市販製剤では酢酸亜鉛を除き同様の含量で安全に使用されている。酢酸亜鉛は皮下投与製剤において使用前例を超える含量であったが、インスリン イコデクの目的とする血糖降下作用に関連する変化以外には、インスリン イコデクの製剤処方に起因する全身毒性の徴候は認められなかった。したがって、添加物に毒性のリスクはないと結論する。

上市予定製剤の不純物の規格限度は非臨床試験において適切に検討されている。

結論

反復投与毒性、がん原性、受胎能、胚・胎児発生毒性及び局所刺激性を評価したインスリン イコデクの非臨床プログラムでは、正常血糖を有する動物への投与時の血糖値低下に関連する所見又はその二次的な影響が明らかとなったのみであった。最高用量での出生前及び出生後の発生に関する毒性試験では、一部の F0 雌で顕著な体重減少が認められ、出生児の栄養不良、一般状態変化及び死亡につながった。インスリン治療全般及び妊娠・授乳期では特に血糖値や低血糖が大きく重視されるため、正常血糖を有する動物に投与した時のこれらの観察結果の臨床的意義は限定的と考えられる。したがって、低血糖の可能性を除き、ヒトの安全性に関して懸念される影響は認められなかった。

2.6.6.2　単回投与毒性

インスリン イコデクの単回投与毒性試験は実施しなかった。代わりに、ICH M3(R2)ガイドラインの推奨に従って[4]、一般毒性試験に用いる動物種において最大耐量（MTD）を決定する用量範囲設定（DRF）試験を実施した。

ラットでは、28 日間の DRF 試験（M 2.6.7.6, 210458）から、135 nmol/kg/日は忍容性良好であったが、225 nmol/kg/日は血糖降下作用が過剰であったため忍容性不良と判断された。

イヌでは、14 日間の投与期間を設けた MTD 試験（M 2.6.7.6, 210459）から、5.1 nmol/kg の 1 日 1 回投与又は 17 nmol/kg の週 2 回投与は忍容性良好であったが、7.7 nmol/kg の 1 日 1 回投与又は 25.5 nmol/kg の週 2 回投与は血糖降下作用が過剰であったため忍容性不良と判断された。

したがって、ラット及びイヌでは MTD が決定したと判断されるため、ICH M3(R2)ガイドラインの推奨に従い[4]、単回投与試験は実施しなかった。

2.6.6.3　反復投与毒性

重要な反復投与試験は、ラットを用いた 8、26 及び 52 週間試験、イヌを用いた 8 及び 26 週間試験（＋最長 12 週間の回復試験）で構成される（表 2.6.6-2 及び表 2.6.6-7）。ラットの 52 週間試験では、がん原性を評価し、対照群に HI（NPH インスリン）を投与した。

最長 8 週間の試験では、動物にグリセロール（グリセリン）、フェノール、メタクレゾール、塩化ナトリウムからなる pH 7.4 の等張水性溶媒（インスリン イコデクの溶媒）で希釈したインスリン イコデクを投与した。対照動物にはこの溶媒を投与した。しかし、インスリン イコデク及び溶媒投与後に投与部位に創傷が認められたため、製剤処方を変更してフェノール及びメタクレゾールの濃度を低下させた。このため、その後の反復投与試験、受胎能及び生殖発生毒性試験では、インスリン イコデクの原液をグリセロール（グリセリン）及び塩化ナトリウムからなる等張希釈液で pH7.4 に希釈し、動物に投与した。対照群には、高用量群と同じ比率の等張希釈液で希釈したインスリン イコデクの溶媒を投与し、対照群と高用量群のフェノール及びメタクレゾールの濃度が同一となるようにした。この調整後は投与部位の創傷は認められず、投与部位局所の組織反応も軽度であった。

2.6.6.3.1　　ラットを用いた反復投与毒性試験

表 2.6.6-2　　ラットを用いた重要な反復投与毒性試験の概要表

Study ID	**211239**	**213297**	**319122**
Strain	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley
Test article	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec
Duration dosing (weeks)	8	26	52
Duration recovery (weeks)	6	12	Not included
Reference	None	None	Human insulin (NPH insulin)
Route of administration	s.c.	s.c.	s.c.
Animals/sex/group	Main study: 4 groups: 10 males and 10 females Recovery study: 4 groups: 10 males and 10 females	Main study: 5 groups: 20 males and 4 groups: 20 females Recovery study: 5 groups: 10 males and 4 groups: 10 females	Main study: 2 groups: 40 males and 40 females (low and mid dose) and 2 group of 48 males and 48 females (control and high dose) Reference group: 48 males and 48 females
Dose levels (nmol/kg/day)	0, 25, 75 or 150/100[a]	Males: 0, 20, 40, 60 or 80 Females: 0, 20, 40 or 60	Males: 0, 20, 40 or 60 Females: 0, 20, 30 or 40 NPH insulin: 40
Conclusion	NOAEL: 100 nmol/kg/day NOEL: <25 nmol/kg/day	NOAEL: males 80 nmol/kg/day and females 60 nmol/kg/day NOEL: <20 nmol/kg/day	NOAEL: males 60 nmol/kg/day and females 40 nmol/kg/day NOEL:<20 nmol/kg/day

[a]Dose-level reduced study day 28 due to hypoglycaemia and hypoglycaemia-related mortality

2.6.6.3.1.1　SD 系ラットへの 1 日 1 回皮下投与による 8 週間毒性試験及び 6 週間回復試験

（M 2.6.7.7.A, 211239）

本試験の目的は、SD 系ラットに 1 日 1 回 8 週間皮下投与した時のインスリン イコデクの毒性及び TK を評価することであった。投与群、用量及び各群の動物数を表 2.6.6-3 に示す。

重度の低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡により、Day 28 以降は高用量を 100 nmol/kg/日まで減量した。用量を減量したにもかかわらず、低血糖に起因する死亡により 75 nmol/kg/日投与群は Day 52、150/100 nmol/kg/日投与群は Day 49～50 に終了となり、対照群及び 25 nmol/kg/日投与群は Day 58～60 に終了となった。回復試験のすべての動物が 6 週間の回復試験終了後に死亡した。したがって、投与終了時には対照群及び低用量群のデータのみを用いて統計解析を実施した。必要と判断される場合には平均値の単純比較により中用量群と高用量群の比較を行ったが、投与期間の差を念頭に置く必要がある。

表 2.6.6-3　　ラットを用いた 8 週間試験－投与群、用量及び動物数

Group	Test article	Dose level	Number of Animals					
			Main Study		Study day(s) of termination	Toxicokinetic/Recovery Study		Study day(s) of termination
		(nmol/kg/day)	Males	Females		Males	Females	
1	Control (vehicle)	0	10	10	58-60	10	10	99-100
2	Insulin icodec	25	10	10	58-60	10	10	99-100
3	Insulin icodec	75	10	10	52	10	10	94
4	Insulin icodec	150/100[a]	10	10	49	10	10	91

[a]High dose reduced study day 28 due to severe hypoglycaemia and related mortality

試験開始時の用量の設定にあたっては、承認申請に使用しないラット 4 週間 DRF 試験の結果を参考とした。この試験では 135 nmol/kg/日まで良好な忍容性が認められた（M 2.6.7.6, 210458）。投与容量は 1 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量、血糖プロファイル（Day 1、Week 7 又は 8）、TK パラメータ、眼底検査、臨床病理学的検査、C-ペプチド、抗薬物抗体の産生を評価した。剖検では、器官重量をはじめとする全項目の肉眼的評価、選択した組織の病理組織学的検査を実施し、6 週間の回復試験中及び終了時に投与に関連する変化の回復性を評価した。

試験期間中に 9 匹が死亡した。高用量群の雌 3 匹が Day 22～25 に死亡したため、Day 28 以降用量を 150 nmol/kg/日から 100 nmol/kg/日に減量した。しかし、75 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹及び 150/100 nmol/kg/日群の雌 2 匹が Day 45～50 に死亡した。さらに、75 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹を重度の低血糖様の一般状態変化によりそれぞれ Day 51 及び Day 47 に安楽死させた。動物に低血糖様の一般状態変化又は突然死がみられたことから、死亡はすべて低血糖に起因するものと考えられ、その裏付けとして、顕微鏡的検査で肝臓の染色希薄化の減少及び神経軸索変性が認められた。低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡は毒性作用ではなくインスリン イコデクの過剰な薬理作用によるものであった。

さらに、Day 43 に中用量群の雄 1 匹を立毛、蒼白、運動失調、喘鳴などの一般状態変化により安楽死させた。この雄は先天性腎芽細胞腫と診断されたが、偶発的なもので、投与に関連するものではないと判断された。

体重増加量に一貫した変化は認められなかった。しかし、150/100 nmol/kg/日投与群の雌雄では Day 7～24 に対照群と比較して体重が高値であった。150/100 nmol/kg/日投与群の動物では回復試験開始時には体重が低値であった。回復試験終了時、雄の体重は正常値に回復したが、雌の体重は対照群よりも低値であった。摂餌量は 150/100 nmol/kg/日投与群の雌雄で最初の 4 週間は増加したが、回復試験開始時には減少していた。

眼底検査では投与に関連する変化は認められなかった。

Day 1 の血糖値から、150 nmol/kg/日投与群の雄の投与後 24 時間ならびに 75 及び 150 nmol/kg/日投与群の雌の投与後 4～24 時間における血糖値の低下は限定的であることが示唆された。投与最終週には、対照群と比較して 150/100 nmol/kg/日投与群の雄では投与前及び投与後 24 時間までのすべての時点で、75 nmol/kg/日投与群又は 150/100 nmol/kg/日投与群の雌では投与前及び投与後 48 時間（75 nmol/kg/日）又は 96 時間（150/100 nmol/kg/日）まで血糖値の低下が認められた。その後は対照群のレベルまで回復した。この影響は用量反応性を示し、雌では同様の用量を投与した雄と比較して血糖値が低値であった。C-ペプチドは投与後 4 時間以内に低下したが、回復試験開始後 7 日以内に正常値に回復した。

上記の低血糖様の一般状態変化、低血糖に起因する死亡、体重、摂餌量、血糖値及び C-ペプチドの変化は、健康な正常血糖ラットにインスリンを投与した時のインスリンの目的とする薬理作用又はその二次的な影響と一致すると考えられた。

25 nmol/kg/日投与群の雌雄及び 25 nmol/kg/日投与群の雄で平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）の軽微な増加が認められた。75 nmol/kg/日群の雌雄及び 150/100 nmol/kg/日群の雌で白血球数の減少が認められた。これと一致して、上記の群ではリンパ球数の減少が認められ、75 nmol/kg/日投与群の雌雄では好中球数の減少が認められた。血液学的検査値の変化はすべて回復試験終了時には回復していた。インスリン イコデクの投与との関連性は不明であり、75 及び 150/100 nmol/kg/日投与群は対照群よりも 6～11 日早く安楽死させたため、データの解釈にあたっては注意が必要である。変化の程度が限定的であるため、有害ではないと考えられた。

血液生化学的検査では、血糖値、AST、ALT、アルカリホスファターゼ、クレアチンキナーゼ及びトリグリセリドにインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化が認められた。

75 及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雌雄で AST 増加が認められ、150/100 nmol/kg/日投与群の雌で ALT 増加が認められた。25 及び 75 nmol/kg/日投与群の雌でアルカリホスファターゼ増加、75 nmol/kg/日投与群の雌でクレアチンキナーゼ増加が認められた。75 及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雄でトリグリセリド減少が認められた。最後に、25 及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雌ならびに 75 及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雄で血糖値の低下が認められた。これらの数値はいずれも回復試験終了後に正常値に回復したが、アルカリホスファターゼ及びクレアチンキナーゼの回復は部分的であった。AST、ALT 及びトリグリセリドの変化は正常血糖ラットにインスリンを投与した時に高頻度に認められており、インスリンの血糖降下作用に対する代償的な適応性変化であると考えられるため、有害ではないと判断された。クレアチンキナーゼ増加は以下に記載する骨格筋の変化に関連するものと考えられる。アルカリホスファターゼ増加は雌のみで認められ、用量との関連性はなく、限定的であり、腸、肝臓又は骨の異常を伴わないものであったことから、投与に関連するものではなく、有害ではないと考えられる。

75 nmol/kg/日投与群の雌で投与終了時に尿量増加が認められたたが、投与終了後 1 週には認められなかった。この所見はインスリンの投与に関連する可能性があるが、限定的であり、用量反応性を示さず、雌のみで認められ、腎臓の病理組織学的変化を伴わなかったことから、有害ではないと考えられる。

投与動物においてインスリン イコデクの全身曝露を確認した。曝露量〔最高血漿中濃度（C_{max}）及び血漿中濃度 - 時間曲線下面積（AUC_{0-24h}）〕は用量依存的に増加したが、投与最終日にはばらつきが大きかったため、用量比例性を確実に評価することはできなかった。終末相半減期（$t_{1/2}$）は 22～54 時間であった。C_{max} 及び AUC_{0-24h} はいずれも約 4 倍増加し、雌では C_{max} 及び AUC_{0-24h} から判断した蓄積量は雄より低かった。投与頻度及び $t_{1/2}$ から判断した蓄積量は予測よりも高かった。

回復試験終了時に主試験群の 55 匹中 37 匹（67%）及び回復試験群の 54 匹中 42 匹（78%）で抗インスリン イコデク抗体が認められた。曝露量及び血糖降下作用から、概して中和抗体の産生はなかったと判断された。しかしながら、一部の動物では血糖降下作用が小さく、曝露量の増加傾向が認められたことから、これらの動物における中和作用を完全に否定することはできない。抗体の産生は概して試験結果に影響を及ぼさないと考えられる。

75 及び 150/100 nmol/kg/日投与群では肝臓の体重比重量の軽微な減少が認められたが、回復試験終了後には変化は認められなかった。肝臓重量の変化は非染色部位の減少と一致するものと考えられた。雄では前立腺、雌では卵巣の絶対重量及び相対重量の限定的な増加が認められた。75 nmol/kg/日投与群の雄及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雌雄で脾臓の絶対重量及び相対重量の減少が認められた。また、全投与群の雄で腎臓の絶対重量及び相対重量の減少が認められた。これらの重量の変化は回復性を示し、裏付けとなる顕微鏡的変化を伴わなかったため、有害ではないと考えられた。さらに、75 及び 150/100 nmol/kg/日投与群は対照群よりも 6～11 日早く安楽死させたため、データの解釈にあたっては注意が必要である。

肉眼的所見として投与部位に潰瘍及び皮下変色が認められた。死亡した動物又は安楽死させた動物の一部では、肉眼的所見として副腎肥大、肺、胃及び胸腺の変色が認められ、いずれも死亡に関連するものと考えられた（出血は認められないか、十分な出血は認められなかった）。

膵臓、肝臓、坐骨神経、骨格筋、骨髄、褐色脂肪及び副腎にインスリン イコデクの最長 8 週間の投与に起因する顕微鏡的変化が認められた。

膵臓では、75 又は 150/100 nmol/kg/日投与群の雌雄で軽微～中等度の膵島萎縮が認められた。肝臓では、75 nmol/kg/日投与群及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雌で非染色部位の減少（肝グリコーゲンの減少に関連すると考えられる）が認められた。これは 75 nmol/kg/日を投与し、Day 43 に安楽死させた回復試験群の雄でも認められた。

75 nmol/kg/日投与群の雌及び 150/100 nmol/kg/日投与群の雌雄では、坐骨神経において神経病変（脱神経）自体によるものと考えられる骨格筋の軽微～軽度の変性／壊死又は萎縮を伴う軽微～軽度の軸索変性が認められた。

75 又は 150/100 nmol/kg/日投与群の雌の骨髄では、軽微～軽度の脂肪含量増加が認められた。全投与群の雌の褐色脂肪では、軽微～中等度の空胞形成及び細胞サイズの増大が認められた。
150/100 nmol/kg/日投与群の雄及び 75 nmol/kg/日を投与し Day 43 に安楽死させた回復試験群の雄では、軽微～軽度の副腎皮質束状帯の空胞形成増加が認められた。

死亡又は安楽死させた動物の脾臓では、辺縁帯において軽度～顕著なリンパ球数減少が認められた。これは、最終的に安楽死させた動物では軽微な変化のみが認められたことから、これらの動物の一般状態によるものと考えられた。

軸索変性及び関連する骨格筋線維萎縮を除くすべての変化が完全な回復性を示した。上記の変化は、正常血糖ラットに HI を投与した時に同様の変化が認められており、文献でも報告されていることから、インスリンの目的とする薬理作用である血糖降下作用によるものと考えられ（2.6.6.8.7 項）、有害ではないと判断される。

約半数の動物で投与部位に小さな創傷が認められたが、群間差はみられなかった。創傷は投与手技／溶媒の組成に起因するものであった。顕微鏡的検査では、対照群を含む全投与群で軽微～中等度の炎症細胞浸潤、壊死、線維芽細胞の活性化／線維化、出血が認められたが、投与群間で明らかな差はみられなかった。回復試験終了時、これらの変化はほぼ消失した。

6 週間の休薬回復試験終了後、150/100 nmol/kg/日投与群の雄ラット 2 匹で AST、ALT 及びアルカリホスファターゼが対照群及び 150/100 nmol/kg/日投与群と比較して高値であった。また、好中球数、好中球分画、単球数及び単球分画はわずかに高値を示した。これらの動物のうち 1 匹では、乳酸脱水素酵素が高値を示し、リンパ球数及びリンパ球分画は低値を示した。いずれの動物も試験終了時に安楽死させ、一般状態変化及び肉眼的変化は認められなかった。肝臓の顕微鏡的検査では胆管周囲の炎症細胞浸潤、胆管過形成及び単細胞壊死／アポトーシスが認められ、これらの変化により酵素活性が増加し、血液学的検査値の変化がみられたと考えられる。8 週間試験のその他の動物又はその後に実施した 26 週間及び 52 週間試験（＋最長 12 週間の回復試験）のラット又はインスリン イコデクを最長 26 週間投与したイヌでは同程度の変化は認められなかった。したがって、これらの所見は偶発的なものであり、投与に関連するものではないと考えられる。

結論として、SD 系ラットへのインスリン イコデク 150/100 nmol/kg/日までの 1 日 1 回皮下投与により、目的とする薬理作用である血糖降下作用又はその二次的な影響、あるいは雌ラットにおける低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡につながった過剰な薬理作用と一致する変化が認められた。観察された変化は、血糖値及び C-ペプチドの低下、体重及び摂餌量の増加、肝臓重量の減少、膵臓、肝臓、坐骨神経、骨格筋、褐色脂肪、副腎及び骨髄の病理組織学的変化であった。試験報告では、報告時点で所見の機序が不明であるため有害と考えられた筋肉の変化に基づき、NOAEL は 25 nmol/kg/日とした。しかしながら、筋肉の変化を含むすべての影響が目的とする薬理作用又はその二次的な影響に関連するものと考えられるため、49 日間の投与後の NOAEL は 100 nmol/kg/日と判断される。NOEL は、25 nmol/kg/日以上で血糖値の低下及び褐色脂肪の変化が認められたため 25 nmol/kg/日未満と判断される。

2.6.6.3.1.2　SD 系ラットへの 1 日 1 回皮下投与による 26 週間毒性試験及び 12 週間回復試験

（M 2.6.7.7.B, 213297）

本試験の目的は、SD 系ラットに 1 日 1 回 26 週間皮下投与した時のインスリン イコデクの毒性及び TK を評価することであった。投与群、用量及び各群の動物数を表 2.6.6-4 に示す。8 週間反復投与試験の経験から、雄はインスリン イコデクの血糖降下作用に対する感受性が低いと考えられるため、雄の高用量群を 1 群追加した。

単回投与時の動態を評価するため Day -5 に投与を行い、Day 1 から少なくとも 26 週間連続して 1 日 1 回投与した。

表 2.6.6-4　　ラットを用いた 26 週間試験－投与群、用量及び動物数

Group	Test article		Number of Animals			
		Dose level	Main Study		Recovery Study	
		(nmol/kg/day)	Males	Females	Males	Females
1	Control (vehicle)	0	20	20	10	10
2	Insulin icodec	20	20	20	10	10
3	Insulin icodec	40	20	20	10	10
4	Insulin icodec	60	20	20	10	10
5	Insulin icodec	80	20	-	10	-

用量の設定にあたっては、雌においてインスリン イコデク 75 nmol/kg/日以上で低血糖又は低血糖に起因する死亡が認められた重要なラット 8 週間試験の結果を参考にした（M 2.6.7.7.A, 211239）。投与容量は 1 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量、血糖プロファイル（Day -5、Week 6、13 及び 26）、血糖値（スポット採血）、TK パラメータ、眼底検査、臨床病理学的検査、抗薬物抗体の産生を評価した。剖検では、器官重量をはじめとする全項目の肉眼的評価、選択した組織の病理組織学的検査を実施し、12 週間の回復試験中及び終了時に投与に関連する変化の回復性を評価した。

60 nmol/kg/日投与群の雌 2 匹で低血糖様の一般状態変化及び極度の低血糖値（0.8～1.6 mmol/L）が認められ、うち 1 匹を安楽死させた。この 2 件の低血糖以外はインスリン イコデクの投与に関連する一般状態変化は認められなかった。低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡は毒性作用ではなくインスリン イコデクの過剰な薬理作用によるものであった。

さらに、26 週間の投与期間中 3 匹が死亡又は安楽死させ、回復試験中に 2 匹を安楽死させた。これらの死亡はいずれも投与に起因するものではなかった。対照群の雄 1 匹及び 40 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹が Week 12 及び 25 の血液学的検査及び血液生化学的検査の直後に死亡していた。Week 23 に 20 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹を潰瘍性腫瘤により安楽死させた。この腫瘤は病理組織学的検査で乳腺腺がんであることが確認された。筋緊張低下、潰瘍形成及び尾の表皮剥脱が認められた 20 nmol/kg/日投与群の雄 1 匹を動物福祉の観点から回復試験の Week 8 に安楽死させた。最後に、60 nmol/kg/日投与群

の雌 1 匹を腹部膨隆により回復試験の Week 7 に安楽死させた。この動物の主な死因は非腺胃部の中等度のびらん／潰瘍形成及び炎症であった。

体重増加量は概して 60 及び 80 nmol/kg/日投与群の雄、40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雌で対照群と比較してやや高かった。増加は用量依存的であり、60 及び 80 nmol/kg/日投与群の雄でそれぞれ約 9%及び 12%、40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雌でそれぞれ 11%及び 15%であった。回復試験中の体重増加量は 80 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりも有意に小さく、回復試験終了までに対照群と同様となった。その他の動物の体重増加量は対照群と同様であり、回復試験終了時には絶対体重が高値を示した。

全体的な摂餌量は 60 又は 80 nmol/kg/日投与群の雄でわずかに（5～6%）増加したが、これは投与期間を通してこれらの動物で摂餌量が一貫して増加したことによる。この傾向は回復試験期間を通して 60 nmol/kg/日投与群の雄で認められ、対照群と比較して約 7%増加した。80 nmol/kg/日投与群の雄における摂餌量は対照群と同様であった。

摂水量に対する投与の影響は認められなかった。しかし、摂水量は全投与群の雌雄、特に雄で対照群と比較してやや増加したが、対照群との差は小さく（大部分の群で 10%未満）、雌雄いずれにおいても用量反応性は認められなかった。回復試験終了時にも同じ傾向が認められた。

体重増加量、摂餌量及び摂水量の変化は、インスリン イコデクの血糖降下作用に対する代償的な反応又はその二次的な影響と考えられた。

眼底検査では投与に関連する変化は認められなかった。

Day -5 の血糖値は、40、60 又は 80 nmol/kg/日投与群の雄でいくつかの時点でやや低値であったが、明らかな用量反応性は認められなかった。40 又は 60 nmol/kg/日投与群の雌で同様の傾向が認められたが、変化の程度は雄よりも小さかった。

Week 6、13 及び 26 の血糖値は 60 及び 80 nmol/kg/日投与群の雄でほぼすべての時点で低値であった。雌では 40 及び 60 nmol/kg/日投与群で一貫して低値であった。60 nmol/kg/日投与群では、この影響は顕著であり、80 nmol/kg/日投与群の雄よりも顕著であった。Week 26 の投与後 48 時間には、投与動物の血糖値は雌雄ともに対照群と同様であったが、投与後 96 及び 120 時間には対照群よりも高値であった。

血糖値の週 1 回の測定では、60 nmol/kg/日投与群の雌では血糖値が一貫して低く、40 nmol/kg/日投与群ではわずかに低かったが、統計的有意差がみられることはまれであった。60 又は 80 nmol/kg/日投与群の雄では同様の血糖値への影響が認められたが、雌よりも程度がやや小さく、統計的有意差がみられることはまれであった。

回復試験の Week 11 には、投与動物の血糖値は対照群と同様であり、完全な回復性を示した。

血液学的検査では、MCH、網状赤血球数及び白血球数にインスリン イコデクの投与に関連する可能性のある変化が認められた。

Week 12 及び 25 に 60 nmol/kg/日投与群の雌で対照群に比べ MCH がやや高値であったが、その差は統計的に有意であったものの軽微であり、有害ではないと考えられた。網状赤血球数は、Week 25 にはすべての投与群の雌で対照群と比較して統計的に有意に少なかったが、用量反応性は認められず、その差は軽微で、雄又は回復試験終了時には差は認められなかった。このため、この所見は有害ではないと判断された。

Week 12 には、60 nmol/kg/日投与群の雌でリンパ球、好塩基球及び大型非染色細胞のわずかではあるが統計的に有意な減少が認められ、全投与群で好酸球数の減少に伴い全白血球数の減少が認められた。Week 25 には 60 nmol/kg/日投与群の雌でリンパ球数及び好酸球数のわずかではあるが統計的に有意な減少が認められたが、差は小さく、雄で同様の傾向が認められなかったことから、雌における群間差は有害ではないと判断された。

血液生化学的検査では、血糖値、トリグリセリド、尿素及びナトリウムにインスリン イコデク投与と関連すると考えられる変化が認められた。

Week 12 及び 25 には 60 及び 80 nmol/kg/日投与群の雄、40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雌で投与に関連する血糖値の低下が認められ、高用量群の雌における低下が顕著であった。Week 25 には 20 nmol/kg/日投与群の雌でも血糖値の低下が認められた。回復試験の Week 12 には 80 nmol/kg/日投与群の雄及び全投与群の雌で対照群と比較して血糖値の上昇傾向がみられた。

Week 12 及び 25 には 60 及び 80 nmol/kg/日投与群の雄、60 nmol/kg/日投与群の雌で血漿中トリグリセリド濃度の統計的に有意な低下がみられ、40 nmol/kg/日投与群の雌における低下は Week 12 と同様であった。この影響は回復試験の Week 12 には認められず、投与群の雄における血漿中トリグリセリド濃度は対照群と同様であったが、特に 40 又は 60 nmol/kg/日投与群の雌で対照群よりも著しく高値であった。

血漿中尿素濃度は、Week 12 には 60 nmol/kg/日投与群の雌でわずかではあるものの統計的に有意に高値であったが、Week 25 には高値でなかった。Week 12 の雄では同様の影響は認められなかったが、Week 25 には 40、60 及び 80 nmol/kg/日投与群の雄で尿素濃度がわずかに高く、80 nmol/kg/日投与群では統計的に有意であった。これらの所見は回復試験の Week 12 までに完全に回復した。

血漿中ナトリウム濃度は、Week 12 及び 25 には 80 nmol/kg/日投与群の雄、Week 25 には 40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雌でわずかに高く、統計的に有意であった。回復試験終了時の数値は対照群と同様であった。

これらの変化はいずれも、正常血糖ラットに HI を投与した時に同様の変化が認められていることから、有害なものではなく、正常血糖ラットに投与した時の脂肪及びタンパク質の代謝ならびに体液平衡へのインスリンの薬理作用に関連するものと考えられた（2.6.6.8.7 項）。

尿検査では、クロール及びカリウム排泄量ならびに尿量にインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化が認められた。

Week 12 に採取した尿の分析では、60 及び 80 nmol/kg/日投与群の雄で対照群と比較してクロール及びカリウム排泄量が多かった。カリウム排泄量は Week 25 にも 40 nmol/kg/日投与群の雄で多かった。Week 12 には 60 nmol/kg/日投与群の雌でクロール及びカリウム排泄量がわずかに多かったが、カリウムについては統計的に有意ではなかった。Week 25 には 40 又は 60 nmol/kg/日投与群の雌でカリウム排泄量が多かった。クロール及びカリウム排泄量の増加は、両時点で大部分の群で認められた尿量の増加によって部分的に説明することができるが、統計的に有意であったのは Week 25 の 40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雌のみであった。これらの影響は回復試験の Week 12 には認められなかったことから、完全に回復したことが示された。変化の程度が限定的であったことと、尿量増加との関連がみられたことから、いずれの影響もいずれも有害ではないと判断された。

尿沈渣の顕微鏡的評価では、投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

インスリン イコデク投与動物においてインスリン イコデクの全身曝露を確認した。最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は 4～8 時間であった。単回投与（Day -5）では $t_{1/2}$ は 15.5～17.0 時間であったが、Week 26 には 19.4～27.3 時間であった。半減期の差は、単回投与と比較して定常状態でのクリアランスが低かったことによると考えられた。曝露量に統計的に有意な性差は認められなかった。単回投与（Day -5）及び定常状態（Week 13 及び 26）での曝露量はほぼ用量比例的に増加した。インスリン イコデクは雌雄いずれにおいても 13 又は 26 週間の 1 日 1 回皮下投与後に蓄積する傾向がみられた。蓄積係数（Rac_{Obs}）は Week 13 と Week 26 で同様であり、2.4～3.3 倍であった。半減期から予測した蓄積（1.5～2.2 倍）よりもやや高かった。Day -5 の投与における外挿された AUC の割合は 1%未満であったため、単回投与期間から 26 週の投与期間までの持ち越しは無視できる程度であった。

検討したすべての時点で、抗インスリン イコデク抗体陽性動物の割合は少なく、各群内で 0～20%であり、投与との明らかな関連は認められなかった。インスリン イコデクを投与した動物の約 8%に相当する 207 匹中 17 匹で抗インスリン イコデク抗体が認められた。抗インスリン イコデク抗体陽性動物の割合は最終投与後 24 時間、120 時間又は 4 週に採取したサンプルと比較して同様であったことから、抗体の測定はサンプル中のインスリン イコデクの存在によって妨げられないことが示唆された。

抗インスリン イコデク抗体陽性動物の血糖値は抗体陰性動物と同じ範囲内であった。インスリン イコデクの曝露量は概して抗インスリン イコデク抗体陽性動物と陰性動物で同程度であり、抗体陽性動物 2 匹では抗体陰性動物よりも曝露量が少なかったが、血糖値への影響は同程度であった。したがって、検出された抗インスリン イコデク抗体は中和作用をもたず、試験結果に影響を及ぼさないと考えられた。

全インスリン イコデク投与群の雌の肝臓の絶対重量及び体重比相対重量は用量依存的かつ統計的に有意に減少した。肝臓重量の変化は回復試験中に消失した。雄では同様の所見は認められなかった。

26 週間の投与終了後又は 12 週間の回復試験終了後の肉眼的検査ではインスリン イコデクの投与に関連する変化は認められなかった。

雌雄ラットの膵臓及び褐色脂肪、雌ラットの肝臓、坐骨神経、脛骨神経及び骨格筋にインスリン イコデクの投与に起因する顕微鏡的変化が認められた。

膵臓では、全投与群の雌雄ラットで軽微～中等度の膵島萎縮の用量依存的な増大が認められた。褐色脂肪（大動脈周囲）では、全投与群の雌雄で軽微～軽度の空胞形成及び細胞サイズの用量依存的な増大が認められた。40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雌では、軽微～軽度の肝細胞の非染色希薄化の減少（肝グリコーゲンの減少によると考えられる）を伴う肝臓重量の低下が認められた。60 nmol/kg/日投与群の雌ラット数匹で坐骨神経／脛骨神経の軽微～顕著な軸索変性が認められた。これらの雌ラットの一部では神経病変（脱神経）自体によるものと考えられる軽微～中等度の骨格筋の変性が認められた。雄では、投与に関連すると考えられる神経又は筋肉の変化は認められなかった。

上記の変化は、正常血糖ラットに HI を投与した時に同様の変化が認められており、文献でも報告されていることから（2.6.6.8.7 項）、インスリンの薬理作用である血糖降下作用によるものと考えられ、有害ではないと判断された。

12 週間の回復試験終了後、褐色脂肪の空胞形成／細胞サイズの増大を除くすべての変化が完全に消失した。褐色脂肪の空胞形成／細胞サイズの増大は部分的に回復した。

投与部位では、対照群を含む全投与群で軽微～軽度の炎症細胞浸潤（場合によって出血を伴う）、局所的な筋変性及び痂疲形成が認められた。

結論として、SD 系ラットへのインスリン イコデク最大 80 nmol/kg/日（雄）及び 60 nmol/kg/日（雌）の 1 日 1 回皮下投与により、高用量群の雌 2 匹では目的とする薬理作用である血糖降下作用又はその二次的な影響、試験終了前に安楽死させた 1 匹では過剰な薬理作用と一致する変化が認められた。観察された変化は、血糖値低下、体重増加、摂餌量増加、臨床病理学的検査値の変化、膵島、褐色脂肪、肝臓、坐骨／脛骨神経及び骨格筋の病理組織学的変化であった。12 週間の回復試験終了時には、褐色脂肪の軽微な変化以外はすべて消失した。いずれの影響も目的とする薬理作用又はその二次的な影響に関連するものと考えられたことから、NOAEL は雄では 80 nmol/kg/日、雌では 60 nmol/kg/日と判断される。NOEL は、20 nmol/kg/以上で血糖値の低下ならびに膵臓及び褐色脂肪の変化が認められたことから、20 nmol/kg/日未満とする。

2.6.6.3.1.3　SD 系ラットへの 1 日 1 回皮下投与による 52 週間毒性試験

（M 2.6.7.7.C, 319122）

本試験は ICH S6(R1)ガイドライン及び EMA ガイダンス「Points to consider document on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin analogues」に従って計画し、インスリン イコデクの慢性毒性、TK 及びがん原性を評価することを目的とした [1,3]。SD 系雌ラットは自然発生乳腺腫瘍の好発系であるため、がん原性評価に最も適切な系統であると考えられている[6,7,8]ことから、本試験では SD 系ラットを使用した。

投与群、用量及び各群の動物数を表 2.6.6-5 に示す。

本試験に用いたインスリン イコデク 40 nmol/kg/日はモル比で HI（NPH インスリンとして投与）と同程度となるように設定した。

表 2.6.6-5　　ラットを用いた 52 週間試験－投与群、用量及び動物数

Group	Test article	Dose level (nmol/kg/day)	Number of Animals	
			Males	Females
1	Control (vehicle)	0	48	48
2	Insulin icodec	20	40	40
3	Insulin icodec	30	-	40
4	Insulin icodec	40	40	48
5	Insulin icodec	60	48	-
6	Human insulin	40	48	48

用量の設定にあたっては、重要なラット 26 週間試験の結果及び試験実施計画書に関する規制当局の助言を参考とした。26 週間試験では、インスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雌で低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡が認められた（M 2.6.7.7.B, 213297）。したがって、雌では高用量の 40 nmol/kg/日を選択した。雄では、26 週間の投与期間には 80 nmol/kg/日が良好な忍容性を示したが、試験期間及び FDA の助言を踏まえ、高用量の 60 nmol/kg/日を選択した。インスリン イコデク及び NPH インスリンの投与容量は 1.0 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、触知可能な腫瘤、体重、摂餌量、血糖プロファイル（Day 1、Week 25 及び 51）、血糖値（スポット採血）、TK パラメータ、眼底検査、血液学的検査及び血液生化学検査を評価した。全動物を剖検に供し、選択した器官の重量を測定した。全動物の選択した器官及び組織を組織学的検査に供した。検討した器官は EMA ガイダンス「Note for guidance on carcinogenic potential」及び米国毒性病理学会の推奨に準拠している[9,10]。試験終了前に安楽死させた動物又は死亡した動物は剖検及び病理組織学的検査に供した。

Week 43 に安楽死させたインスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄 1 匹、Week 30～51 に死亡又は安楽死させた NPH インスリン投与群の雄 1 匹及び雌 2 匹で低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡が認められた。さらに、NPH インスリン投与群の雄 3 匹及び雌 5 匹で低血糖様の一般状態変化が認められた。低血糖様の一般状態変化は、活動性低下、部分的閉瞼、異常歩行／不安定歩行、平伏位／円背位、虚脱、立毛及び呼吸不整であった。

NPH インスリンを投与した上記の動物では、血糖値が極めて低値（0.8～1.3 mmol/L）であったことから低血糖が確認された。インスリン イコデクを投与した雄の一般状態変化が重度であったため、血液を採取することができなかった。低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡は毒性作用ではなくインスリン イコデク及び NPH インスリンの過剰な薬理作用によるものであった。

インスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄 3 匹が Week 3、12 及び 46 に死亡した。死亡前に一般状態変化は認められなかったが、2 匹で膵島萎縮の病理組織学的所見とともに坐骨神経及び骨格筋の変性が認められたことから、死因は投与に関連する低血糖であることが強く示唆された。さらに、イン

スリン イコデク 40 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹で後肢の制御不良が認められたため、Week 24 に安楽死させた。病理組織学的検査で膵島萎縮、坐骨神経及び骨格筋の変性が認められたことから、これらの一般状態変化が投与による低血糖に起因することが裏付けられた。最後に、インスリン イコデク 40 nmol/kg/日投与群の雄 1 匹が Week 37 に死亡しており、骨髄性白血病と診断された。骨髄性白血病自体は投与に関連するものではないが、この状態によりインスリン イコデクの血糖降下作用に対する感受性が高まったことが坐骨神経及び骨格筋の変性により裏付けられる。

Week 52 には腫瘤サイズ、腫瘤破裂、一般状態不良、後肢の制御不良又は損傷など低血糖以外の理由により 22 匹が死亡又は安楽死させたが、その分布に対照群を含む群間で差はみられず、投与との関連性も認められなかった。対照群では 6 匹、インスリン イコデク 20 nmol/kg/日投与群では 7 匹、40 nmol/kg/日投与群では 4 匹、60 nmol/kg/日投与群では 2 匹が死亡した。最後に、NPH インスリン投与群の 3 匹が試験終了前に死亡した。しかしながら、最終的な安楽死までの生存動物数は各群各性 25 匹を超え、EMA ガイダンス [9] に準拠しており、インスリン イコデクの毒性及びがん原性の科学的意義のある評価に十分な数であると考えられた（表 2.6.6-6）。

表 2.6.6-6　　52 週間投与期間終了時点における生存動物数

Treatment	**Vehicle**		**Insulin icodec**			**Human insulin**
Dose (nmol/kg/day)	**0**	**20**	**30**	**40**	**60**	**40**
Initial number of animals (M+F)	48+48	40+40	0+40	40+48	48+0	48+48
Number of surviving animals (M+F)	46+44	34+39	0+40	39+44	42+0	46+44

触知可能な腫脹／腫瘤の群間分布、多重性及び平均発現時間にインスリン イコデク又は NPH インスリンの投与による影響はみられなかった。

体重増加量は概してインスリン イコデク 20 及び 40 nmol/kg/日投与群の雌で対照群と比較してそれぞれ 8%及び 12%高かったが、雄では影響は認められなかった。雌の体重増加量のわずかな変化はインスリン イコデクの血糖降下作用に対する代償的な反応であると考えられる。NPH インスリンの投与による体重増加量への影響は認められなかった。

インスリン イコデク又は NPH インスリンによる摂餌量への影響は認められなかった。

眼底検査では、インスリン イコデク又は NPH インスリンの投与に関連する変化は認められなかった。

Day 1 の投与後 4～8 時間の血糖値は、インスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄及びインスリン イコデク 40 nmol/kg/日投与群の雌で投与前及び対照群の血糖値と比較して低値であった。雌では、血糖値は投与後 24 時間以内に投与前のレベルまで回復したが、全インスリン イコデク投与群の雄で投与後 24 時間の血糖値が低値であった。これは対照群の血糖値が高値であったためと考えられた。

Week 25 及び 51 には、血糖値はインスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄で対照群と比較して一貫して 低く、24 時間の投与間隔を通して比較的平坦な反応を示した。Week 25 にはインスリン イコデク 30 nmol/kg/日投与群の雌及び 40 nmol/kg/日投与群の雌雄で同様の結果が得られたが、Week 51 にはこれらの傾向は認められなかった。

Day1、Week 25 及び 51 には、血糖値は NPH インスリン 40 nmol/kg/日投与群の雌雄で投与前と比較して投与後 2 時間に著しく低値であった。その後、Day 1 には投与前のレベルまで速やかに回復し、Week 25 及び 51 には投与後 4 時間にも極めて低値であったが、その後対照群のレベルまで回復した。

Week 52 には血糖プロファイルのための血液を採取しなかったすべての動物において、投与後 4 時間に血糖値測定のための血液を採取した。血糖値はインスリン イコデク及び NPH インスリンの全投与群の雌雄において統計的に有意に低値であった。

試験期間を通した血糖値測定のためのスポット採血により、インスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄で対照群と比較してわずかではあるが一貫して低値であることが確認された。雌では、インスリン イコデク 40 nmol/kg/日投与群で血糖値低値が散発的に認められた。

NPH インスリン 40 nmol/kg/日投与群の雌雄では、対照群と比較してスポット採血による血糖値が一貫して極めて低かった。

Week 48 に雄、Week 49 に雌において血液学的検査及び血液生化学的検査を実施した。

血液学的検査値では、ヘマトクリット、ヘモグロビン、網状赤血球数、リンパ球数及び白血球数の平均にインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化が認められた。

40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雄では、対照群と比較して ヘマトクリット及びヘモグロビンの平均濃度がわずかに高値で、網状赤血球数がわずかに低値であった。全投与群の雄で、用量反応性は認められなかったものの、リンパ球数及び白血球数がわずかに低値であった。これらの変化は雌ではみられなかった。

NPH インスリン投与群の雄でもヘマトクリット、ヘモグロビン及び MCH の平均がわずかに高値で、網状赤血球数、リンパ球数及び赤血球分布幅がわずかに低値であった。インスリン イコデクと同様に、これらの変化は雌ではみられなかった。

上記の変化は、程度が小さく、用量反応性が認められず、雌で同様の傾向が認められなかったため、有害ではないと考えられた。さらに、NPH インスリンの投与後にも同様の変化が認められた。

凝固パラメータについては、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間及びフィブリノゲン濃度にインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化が認められた。40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雄ならびに 30 及び 40 nmol/kg/日投与群の雌では、対照群と比較してプロトロンビン時間がわずかに短く、活性化部分トロンボプラスチン時間がわずかに長かったが、30 nmol/kg/日投与群の雌におけるプロトロンビン時間については統計的に有意ではなった。全投与群の雄（用量反応

性は認められなかった）及び 40 nmol/kg/日投与群の雌でフィブリノゲン濃度がわずかに高値であった。

NPH インスリン投与群の雌雄でも同様の変化が認められ、プロトロンビン時間のわずかに短く、活性化部分トロンボプラスチン時間がわずかに長かったが、フィブリノゲン濃度の変化は認められなかった。

フィブリノゲン濃度の変化を除き、上記の変化は、程度が小さく、用量反応性が認められず、NPH インスリン投与群の動物で同様の変化が認められなかったため、有害ではないと考えられた。

血液生化学的検査では、血糖値、尿素、クレアチニン、トリグリセリド、ナトリウム、クロール、リン、マグネシウム及びカリウムにインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化が認められた。

血糖値は、20、30 及び 40 nmol/kg/日投与群の雌、60 nmol/kg/日投与群の雄で対照群と比較して低値であった。尿素及びクレアチニン濃度は 30 及び 40 nmol/kg/日投与群の雌でわずかに高く、トリグリセリド濃度は全インスリン イコデク投与群の雌でわずかに低かったものの統計的に有意ではなかった。これらの変化は雄ではみられなかった。

血漿中ナトリウム及びクロール濃度は 30 及び 40 nmol/kg/日投与群の雌ならびに 60 nmol/kg/日投与群の雄で軽微ではあるが統計的に有意に高値であった。血漿中リン濃度は 40 及び 60 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりわずかに高かったが、明らかな用量反応性は認められず、血漿中マグネシウム濃度も 60 nmol/kg/日投与群の雄でわずかに高値であった。血漿中カリウム濃度は 60 nmol/kg/日投与群の雄で低値であった。これらの変化はインスリン イコデクを投与した雌ではみられなかった。

インスリン イコデク投与群の試験終了時に安楽死させた動物数匹（256 匹中 9 匹）では、AST が対照群の最高値の最大 2.8 倍であったが、大部分が雌で、群間に散在していることから用量との関連はみられなかった。これらの動物のうち 3 匹では ALT も高値であった（対照群の最高値の最大 2.8 倍）。これらの変化は肝臓、腎臓、心筋、骨格筋の投与に関連する病理組織学的所見を伴わず、用量反応性を示さず、程度が小さかったことから、偶発的なものと考えられ、投与に関連するものではないと考えられた。その裏付けとして、AST、ALT、アルカリホスファターゼ又はビリルビンの群平均値に統計的に有意な変化は認められなかった。さらに、一般状態不良により安楽死させた 20 nmol/kg/日投与群の雄 1 匹（包皮膿瘍）及び 40 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹（リンパ腫）で肝酵素上昇が認められたが、一般状態によるものと考えられ、投与に関連しないものと判断された。

NPH インスリン投与群では、血糖値は雄で対照群よりもわずかに高く、血漿中尿素濃度は雌雄でわずかに低値であった。これはインスリン イコデクの投与後に認められた変化とは対照的であり、薬理作用の持続時間の差を反映している可能性が高い。血漿中クレアチニン濃度は、インスリン イコデクと同様にわずかに高値であったが、統計的に有意ではなく、トリグリセリド濃度は NPH インスリン投与群の雌で低値であった。これらの変化は雄では認められなかった。クロール濃度は、インスリン イ

コデクと同様に雌でわずかに高く、リン濃度は雌雄で高値であった。血漿中マグネシウム濃度は、インスリン イコデク投与群と異なり特に雌で低値であった。

以上のインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる血液生化学的検査値の変化はいずれも、有害なものではなく、正常血糖を有する動物に投与した時の脂肪及びタンパク質の代謝ならびにイオン平衡へのインスリンの薬理作用に関連するものと考えられた。NPH 投与群でも同様の変化が認められたが、血漿中グルコース、尿素及びマグネシウム濃度の差は薬理作用の持続時間の差によるものと考えられた。

インスリン イコデクを投与した全動物で曝露を確認した。インスリン イコデクの t_{max} は全投与群及び全試験日で 2～8 時間であった。Day 351 の t_{max} は、20 nmol/kg/日投与群の雄で 0 時間、50 nmol/kg/日投与群の雌で 24 時間であったが、これは高値が 1 回のみ認められた TK 評価のためのスパースサンプリングによるものであった。インスリン イコデクの Day 169 及び 351 の定常状態での曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）は用量依存的に増加した。単回投与（Day 1）後の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ も用量依存的に増加した。$AUC_{0\text{-}24h}$ から算出した Day 1 から Day 169 までの蓄積は 2.1～3.3 倍であり、Day 1 から Day 351 までの蓄積は 2.1～2.8 倍であった。Day 169～351 には蓄積は認められず、投与群では曝露量に性差は認められなかった。

NPH インスリン投与群では、投与前又は投与後 24 時間に曝露は認められなかった。NPH インスリンの t_{max} は、雌雄いずれにおいても全試験日で 2 時間であった。NPH インスリンの Day 169 及び 351 の定常状態での曝露量（C_{max} 及び AUC_{last}）は Day 169 から Day 351 まで同程度であり、蓄積は認められなかった。Day 351 には雌と比較して雄で NPH インスリンの曝露量が高い傾向がみられた。これは、NPH インスリン投与群で採取したサンプルにおける曝露量のばらつきが大きかったためと考えられる。

曝露及び血糖降下作用に関するデータからは試験結果に影響を及ぼす抗体の存在が示されなかったため、抗インスリン イコデク抗体の測定は実施しなかった。

最終体重で補正した肝臓重量は、対照群と比較してインスリン イコデク投与群の雄で統計的に有意に低値であったが、明らかな用量反応性は認められなかった。インスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄の最終体重で補正した脾臓重量は対照群と比較してわずかに低値であった。雌雄の肝臓の絶対重量に変化は認められず、雌の体重で補正した肝臓及び脾臓重量に変化は認められなかった。30 及び 40 nmol/kg/日投与群の雌では、対照群と比較して体重で補正した腎臓重量が低値であったが、雌の腎臓の絶対重量及び雄の腎臓重量に変化は認められなかった。

NPH インスリン投与群の雌雄では体重で補正した肝臓重量が低値であった。

器官重量の変化はいずれも、変化の程度が限定的であったこと、用量反応性が認められなかったこと、関連する病理組織学的変化を伴わなかったことから、有害ではないと考えられた。

投与後 52 週の肉眼的検査では、全インスリン イコデク投与群で小型精巣／精巣軟化が低い発現率で認められ、投与に関連するものと考えられた。NPH インスリン投与群の雄でも小型精巣／精巣軟化が認められた。

雌雄の膵臓、坐骨神経、骨格筋及び心筋、雄の大動脈周囲褐色脂肪及び精巣にインスリン イコデクの投与に起因する顕微鏡的変化が認められた。NPH インスリン投与群では、雌の心臓及び坐骨神経ならびに雄の精巣に投与に関連する変化が認められた。

雄では、インスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群で軽微～中等度の膵島萎縮が高い発現率で認められた。さらに、後肢の制御不良により安楽死させたインスリン イコデク 40 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹で軽微な膵島萎縮が認められた。

全インスリン イコデク投与群の雄で軽微～中等度の坐骨神経軸索変性が高い発現率で求められ、発現率及び重症度は 60 nmol/kg/日投与群で最も高かった。この変化（軽度～中等度）は、インスリン イコデク 30 及び 40 nmol/kg/日投与群の雌数匹でも認められた。軽微～中等度の骨格筋筋原線維変性／壊死が 60 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりも高い発現率及び重症度で認められ、上記の安楽死させた 40 nmol/kg/日投与群の雌では、軽度の筋原線維変性／壊死が認められた。さらに、インスリン イコデク 40 nmol/kg/日投与群の死亡し、骨髄性白血病と診断された雄 1 匹では、軽度の坐骨神経変性及び中等度の骨格筋変性が認められた。NPH インスリン投与群の雌 1 匹で軽度の坐骨神経軸索変性が認められた。

心臓では、軽微～軽度の心筋線維化が全インスリン イコデク投与群の雄で対照群と比較してわずかに高い発現率で認められたが、用量反応性は認められなかった。雌では、軽微～軽度の心筋線維化がインスリン イコデク 30 及び 40 nmol/kg/日投与群でわずかに高い重症度又は発現率で認められた。NPH インスリン投与群の雌でも軽微～軽度の心筋線維化が認められた。

大動脈周囲の褐色脂肪では、軽微～中等度の空胞形成／細胞サイズの増大がインスリン イコデク 40 又は 60 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりも高い発現率で認められた。

精巣では、軽微～重度の精細管変性／萎縮がインスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりも高い発現率で認められた。インスリン イコデク 20 及び 40 nmol/kg/日投与群では、投与に関連する変化は認められなかった。NPH インスリン投与群の雄では、軽微～中等度の精細管変性／萎縮がインスリン イコデク 60 nmol/kg/日投与群の雄と同程度の発現率で認められた。

上記の病理組織学的変化はいずれも、NPH インスリン群でも同様の変化が認められ、健康な正常血糖ラットに HI を持続投与した時に認められており、文献でも報告されているため（2.6.6.8.7 項）、インスリンの薬理作用である血糖降下作用によるものと考えられ、有害ではないと判断された。

雌雄の乳腺組織では、過形成を含む非腫瘍性変化及びインスリン イコデク又は NPH インスリンの投与に関連すると考えられる腫瘍性変化は認められなかった。

雌では、認められた乳腺腫瘍の種類は腺がん、腺腫及び線維腺腫であり、発生率は全インスリン イコデク投与群、NPH インスリン投与群及び対照群で同様であった。唯一の例外として、腺腫はインスリン イコデク 40 nmol/kg/日投与群の雌では認められず、偶発的な変化と考えられる。対照群の雌では腺扁平上皮癌が認められた（表 2.6.6-10）。雄では、乳腺腫瘍は NPH インスリン投与群の雄 1 匹で認められた線維腺腫のみであった。

インスリン イコデク又は NPH インスリンの投与に関連しない様々な腫瘍がインスリン イコデク投与群、NPH インスリン投与群又は対照群で低い発現率で認められた。下垂体前葉腺腫がインスリン イコデク投与群、NPH インスリン投与群又は対照群で中程度の発現率で認められたが、投与に関連しないものであった。皮膚では、様々な部位（全動物における投与部位 4 箇所又は標準の皮膚試料採取部位は除く）の腫瘍がインスリン イコデク投与群で極めて低い発現率で認められた。下垂体腫瘍及び皮膚腫瘍はいずれも SD 系ラットにおける偶発的な所見であることが知られているため、インスリン イコデクの投与に関連するものではないと判断された。

投与部位では、対照群、NPH インスリン投与群を含む全インスリン イコデク投与群で炎症細胞浸潤（場合によって出血を伴う）、局所的な筋変性、痂疲／潰瘍形成、過形成及び肉芽腫が認められた。これらの所見は概して発生率が低く、軽微～軽度で、皮下投与手技又は溶媒に関連するものと考えられ、インスリン イコデク又は NPH インスリンの投与に関連するものではないと考えられた。

結論として、SD 系ラットへのインスリン イコデク最大 60 nmol/kg/日（雄）及び 40 nmol/kg/日（雌）の 1 日 1 回皮下投与により、高用量群の雄 4 匹では目的とする薬理作用である血糖降下作用又はその二次的な影響、試験終了前に安楽死させた雌 1 匹では過剰な薬理作用と一致する変化が認められた。観察された変化は、血糖値低下、体重増加（雌）、臨床病理学的検査値の変化、膵島、坐骨神経、骨格筋、心筋、褐色脂肪及び精巣の病理組織学的変化であった。インスリン イコデクの投与は腫瘍の発生と関連しなかった。特に、雌における乳腺腫瘍の発生率は対照群及び NPH インスリン投与群を含むすべての群で同様であった。試験報告では、低血糖に起因する死亡ならびに精巣及び坐骨神経の変化の重症度から、NOAEL は雄で 40 nmol/kg/日、雌で 30 nmol/kg/日とした。しかしながら、低血糖に起因する死亡を含むすべての影響が過剰な薬理作用、目的とする薬理作用又はその二次的な影響に関連するものと考えられるため、NOAEL は雄で 60 nmol/kg/日、雌で 40 nmol/kg/日と判断される。NOEL は、20 nmol/kg/日以上で血糖値の低下ならびに神経及び心臓の変化が認められたことから、20 nmol/kg/日未満とする。

NPH インスリンの投与でも血糖値の低下、死亡、臨床病理学的検査値の変化、坐骨神経、心筋及び精巣の病理組織学的変化が認められたが、インスリン イコデクと同様に腫瘍の発生とは関連しなかった。

2.6.6.3.2 イヌを用いた反復投与毒性試験

表 2.6.6-7 イヌを用いた重要な反復投与毒性試験の概要表

Study ID	**211240**	**213222**
Strain	Beagle	Beagle
Test article	Insulin icodec	Insulin icodec
Duration dosing (weeks)	8	26
Duration recovery (weeks)	6	12
Route of administration	s.c.	s.c.
Animals/sex/group	Main study: 4 groups: 3 males and 3 females Recovery study: 3 groups: 1-2 males and 2 females	Main study: 4 groups: 4 males and 4 females Recovery study: 3 groups: 2-3 males and 2-3 females
Dose levels (nmol/kg twice weekly)	0, 7, 14, 21/18[a]	0, 6, 12/9[b] or 18/12[b]
Conclusion	NOAEL: 18 nmol/kg twice weekly NOEL: <7 nmol/kg twice weekly	NOAEL: 12 nmol/kg twice weekly NOEL: <6 nmol/kg twice weekly

[a]Dose level reduced study day 33 due to clinical signs of hypoglycaemia; [b]High dose-level reduced study day 25 due to hypoglycaemia and mid-dose was reduced to keep dose levels separated.

2.6.6.3.2.1 ビーグル犬への週 2 回皮下投与による 8 週間毒性試験及び 6 週間回復試験

（M 2.6.7.7.D, 211240）

本試験の目的は、ビーグル犬に週 2 回 8 週間皮下投与した時のインスリン イコデクの毒性及び TK を評価することであった。投与群、用量及び各群の動物数を表 2.6.6-8 に示す。

表 2.6.6-8 イヌを用いた 8 週間試験－投与群、用量及び動物数

Group	**Test article**		**Number of Animals**			
		Dose level	**Main Study**		**Recovery Study**	
		(nmol/kg twice weekly)	**Males**	**Females**	**Males**	**Females**
1	Control (vehicle)	0	3	3	1[a]	2
2	Insulin icodec	7	3	3	-	-
3	Insulin icodec	14	3	3	2	2
4	Insulin icodec	21/18[b]	3	3	2	2

[a]Before initiation of the study, one male dog was rejected from the study due to abnormal EKG, consequently, the study was performed in 17 males and 18 females.

[b]Dose level reduced study day 33 due to clinical signs of hypoglycaemia

低血糖値（1.6～2.1 mmol/L）により確認された重度の低血糖様の一般状態変化により、Day 33 以降は高用量である 21 nmol/kg 週 2 回を 18 nmol/kg 週 2 回に減量した。

試験開始時の用量の設定にあたっては、固定用量による 4 週間の投与期間を設けたイヌの MTD 試験の結果を参考とした。この試験では 17 nmol/kg/週 2 回投与の忍容性が良好であった（M 2.6.7.6, 210459）。投与容量は 0.1 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量（残餌量から測定）、血糖プロファイル（Day 1 及び 53）、血糖値（スポット採血）、TK パラメータ、眼底検査、心電図、臨床病理学的検査、内因性インスリン、抗薬物抗体の産生を評価した。剖検では、器官重量をはじめとする全項目の肉眼的評価、選択した組織の病理組織学的検査を実施し、6 週間の回復試験中及び終了時に投与に関連する変化の回復性を評価した。

試験期間中に死亡はみられなかった。Day 30 に 21 nmol/kg を週 2 回投与した雄 2 匹に異常歩行及び振戦などの低血糖様の一般状態変化が認められ、血糖値がそれぞれ 1.6 及び 2.1 mmol/L であったことから低血糖が確認された。両動物とも給餌により回復した。このため、Day 33 以降は用量を 18 nmol/kg 週 2 回に減量した。インスリン イコデクを投与した動物で Day 30 前後に軟便／水様便がみられ、1～10 日間持続した。この所見は一時的なものであり、一般状態への影響はみられなかったことから、投与に関連する可能性はあるが有害ではないと判断された。

21/18 nmol/kg/週 2 回投与群で対照群と比較して体重増加量が大きかったが、回復試験中にわずかに減少した。残餌量はインスリン イコデク投与群で少なかったが、回復試験中に増加し、対照群の数値に近づいた。

血漿中リン濃度は 12 及び 21/18 nmol/kg/日投与群の雄で対照群と比較してわずかに高値で、明らかな用量反応性が認められ、血漿中ナトリウム濃度も 21/18 nmol/kg/日投与群の雌でわずかに高値であった。いずれの変化も回復試験終了時には消失し、有害ではなく、正常血糖を有する動物に投与した時のイオン平衡へのインスリンの薬理作用によるものと判断された。

血糖値は、Day 1 には 21 nmol/kg 投与群で投与後 18 時間に統計的に有意に低値であった。Day 53 には 14 nmol/kg/週 2 回投与群の雄及び 21/18 nmol/kg/週 2 回投与群の雌雄で投与後 18～24 時間に統計的に有意に低値であった。回復試験中には影響は認められなかった。最初の食餌（投与後約 18 時間に相当）前の血糖値を評価するための週 1 回のスポット採血では、21/18 nmol/kg/週 2 回投与群の雌雄及び時に 14 nmol/kg 週 2 回投与群の雌で低値であった。インスリン イコデクを投与した動物で最初の食餌前に測定した内因性インスリン濃度は全投与群で低値であった。血糖値及び内因性インスリン濃度はいずれも回復試験中に正常化した。

上記の体重、残餌量、血液生化学的検査値、血糖値及び内因性インスリンの変化はインスリン イコデクの目的とする薬理作用と一致するものと考えられ、有害ではないと判断された。

眼底検査、心電図、血液学的検査、尿検査、器官重量又は肉眼的検査では、インスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

インスリン イコデクの全身曝露を確認した。投与前試料の約半分及び対照動物の試料において極めて低濃度のインスリン イコデクが検出された。この理由は明らかにされていないが、この所見は試験結果に影響を及ぼすものではなかったと判断された。定常状態での t_{max} は 8～24 時間であり、$t_{1/2}$ は 42～77 時間であった。曝露量は用量比例的に増加した。$AUC_{0\text{-}24h}$ に基づくと、雌では雄よりも曝露量が

高値（20%未満）であったが、C_{max} からは確認されなかった。蓄積量は約 2 倍であり、雌で蓄積が多い傾向がみられた。推定蓄積量は投与間隔及び半減期から予測される蓄積量と一致していた。

投与終了時に主試験及び回復試験動物 26 頭中 20 頭（77%）で抗インスリン イコデク抗体が認められた。回復試験終了時には 8 頭中 4 頭（50%）で抗インスリン イコデク抗体が認められた。14 及び 21/18 nmol/kg/週 2 回投与群の抗体陽性動物各 1 頭については、Week 8 の摂餌前の血糖値及び曝露量が同投与群の他の動物よりも高く、目的とする薬理作用と一致する血糖値の低下がみられたため、中和作用の可能性を否定することはできない。抗体産生は概して試験結果に影響を及ぼすものではないと考えられる。

病理組織学的検査では全身毒性の徴候は認められなかった。投与部位には、溶媒を投与した対照群を含むすべての群で軽微～軽度の炎症性及び壊死性反応が認められた。14 及び 21/18 nmol/kg/週 2 回投与群で重症度の高い炎症細胞浸潤が認められる傾向がわずかにみられたため、インスリン イコデクとの関連性は否定できない。これらの変化は試験期間終了後にはほぼ消失していた。

結論として、ビーグル犬へのインスリン イコデク最大 21/18 nmol/kg の週 2 回皮下投与により、インスリンの目的とする薬理作用又は過剰な薬理作用（血糖降下作用）と一致する変化が認められた。これらの所見は、体重増加、残餌量減少、低血糖様の一般状態変化、血液生化学的検査値の変化、血糖値低下、内因性インスリン濃度低下であった。NOAEL は 18 nmol/kg/週 2 回と判断される。NOEL は、7 nmol/kg/週 2 回以上の投与で一過性の軟便／水様便及び内因性インスリン濃度の低下が認められたことから、7 nmol/kg/週 2 回未満とする。

2.6.6.3.2.2　ビーグル犬への週 2 回皮下投与による 26 週間毒性試験及び 12 週間回復試験

（M 2.6.7.7.E, 213222）

本試験の目的は、ビーグル犬に週 2 回 26 週間皮下投与した時のインスリン イコデクの毒性及び TK を評価することであった。投与群、用量及び各群の動物数を表 2.6.6-9 に示す。投与は Day 1 に開始し、2 回目の投与（Day 4）は Day 1 の動態を評価するため行わず、その後は少なくとも 26 週間連続して週 2 回投与した。

表 2.6.6-9　　イヌを用いた 26 週間試験－投与群、用量及び動物数

Group	Test article	Dose level (nmol/kg twice weekly)	Number of Animals			
			Main Study		Recovery Study	
			Males	Females	Males	Females
1	Control (vehicle)	0	4	4	2	2
2	Insulin icodec	6	4	4	-	-
3	Insulin icodec	12/9[a]	4	4	3	3
4	Insulin icodec	18/12[a]	4	4	3	3

[a]High dose-level reduced study day 25 due to hypoglycaemia and mid-dose was reduced to keep dose levels separated.

低血糖値及び確定低血糖が 1 回認められたため、Day 25 以降は 18 nmol/kg/週 2 回を 12 nmol/kg/週 2 回に減量した。異なる用量を設けるため、12 nmol/kg/週 2 回は 9 nmol/kg/週 2 回に減量した。

試験開始時の用量の設定にあたっては、21 nmol/kg/週 2 回投与で確定低血糖及び低血糖様の一般状態変化が認められた 8 週間反復投与毒性試験の結果を参考とした（M 2.6.7.7.D, 211240）。この試験では、18 nmol/kg/週 2 回投与の忍容性が良好であった。投与容量は 0.1 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量（残餌量から測定）、血糖プロファイル（Day 1、Week 13 及び Week 28 の最終投与後）、血糖値（スポット採血）、TK パラメータ、眼底検査、心電図、臨床病理学的検査、内因性インスリン、抗薬物抗体の産生を評価した。剖検では、器官重量をはじめとする全項目の肉眼的評価、選択した組織の病理組織学的検査を実施し、12 週間の回復試験中及び終了時に投与に関連する変化の回復性を評価した。

試験期間中に死亡はみられなかった。試験期間中、18/12 nmol/kg を週 2 回投与した動物で低血糖様の一般状態変化が 4 件認められた。1 件が Day 23 に認められ、Day 25 に用量を減量したにもかかわらず 2 件が Day 26、1 件が Day 187 に認められた。活動性低下、身震い、冷感、振戦及び運動失調などの一般状態変化が認められ、血糖値 2.1～2.5 mmol/L により低血糖が確認された。いずれも投与翌朝に認められ、給餌又はグルコースの投与により直ちに回復した。これ以外には投与に関連する一般状態変化は認められなかった。

インスリン イコデクの投与による体重増加量又は摂餌量（体重 1 kg/日あたり）への有意な影響は認められなかった。しかしながら、いずれの用量でも投与に関連しない体重増加量のわずかな促進が認められた。眼底検査、心電図、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査（顕微鏡的検査を含む）ではインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

血糖値は、Day 1 には主に 18 nmol/kg 投与群で投与後 12～66 時間に統計的に有意に低値であった。Week 13 には 12/9 及び 18/12 nmol/kg/週 2 回投与群で投与後 12～66 時間に統計的に有意に低値であった。Week 28 には 12/9 及び 18/12 nmol/kg 週 2 回投与群でそれぞれ投与後 2～18 時間及び 12～66 時間に統計的に有意に低値であった。回復試験で得られたデータの統計解析は実施しなかったが、12/9 及び 18/12 nmol/kg 週 2 回投与群では投与後 120 時間にわずかに低値であり、投与後 144 時間の雌でもわずかに低値であった。

血糖値を評価するための週 1 回／隔週のスポット採血では、12/9 又は 18/12 nmol/kg/週 2 回投与群で投与後 18 時間の血糖値が一貫して統計的有意に低値であった。6 nmol/kg/週 2 回投与群の雌では投与後 18 時間に測定した血糖値も低値であった。12/9 又は 18/12 nmol/kg/週 2 回投与群では時に投与前の血糖値が低値であった。

投与動物においてインスリン イコデクの全身曝露を確認した。t_{max} は概ね 4～48 時間であり、大部分が 8～24 時間であった。個々の $t_{1/2}$ は 37～83 時間であり、大部分が約 40～60 時間であった。インスリン イコデクの曝露量に性差がみられる可能性が示され、雌の方が雄よりもわずかに高値であった（20%未満）。

C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}96h}$ は雌雄いずれにおいても用量比例的に増加した。Day 88 及び 190 の定常状態での曝露量は Day 1 と比較してわずかに高く、Rac_{Obs} の群平均は 1.3～1.8 であった。これは $t_{1/2}$ 及び投与法から予測される蓄積量と一致している。

最終投与後 4 日に採取したサンプルでは、インスリン イコデクを投与した 36 頭中 8 頭（22.2%）で抗インスリン イコデク抗体が認められた。回復試験の Week 4 には 12 頭中 2 頭（16.7%）で抗インスリン イコデク抗体が認められた。18/12 nmol/kg/週 2 回投与群の 3 頭では、試験期間を通じて測定した投与前と投与後 18 時間の血糖値の差は、すべての動物で目的とする薬理作用と一致する血糖値の低下がみられた同じ投与群の抗体陰性動物ほど一貫していなかった。したがって、これらの動物における中和作用の可能性を完全に否定することはできない。6 及び 12/9 nmol/kg 週 2 回投与群の動物では、血糖値に対する抗インスリン イコデク抗体の影響は認められなかった。さらに、クリアランスが抗体陰性動物よりも高い抗体陽性動物も低い抗体陽性動物もいたため、抗体の影響は不明である。抗体産生は概して試験結果に影響を及ぼさなかったと考えられる。

6 及び 18/12 nmol/kg/週 2 回投与群の雌では肝臓の相対重量が統計的に有意に低値であった。12/9 nmol/kg/週 2 回投与群の雌でも統計的に有意ではなかったものの同じ傾向がみられた。肝臓の絶対重量も同じ傾向を示したが、統計的に有意ではなかった。回復試験終了時には逆に、インスリン イコデク投与群の雌で肝臓重量が対照群よりも高値であった。顕微鏡的検査では確認されなかったが、肝グリコーゲンに関連すると考えられる。

投与終了後又は 12 週間の回復期間終了後の肉眼的検査では、インスリン イコデクに関連する変化は認められなかった。

病理組織学的検査では全身毒性の徴候は認められなかった。投与部位では、真皮／皮下組織における混合性炎症細胞浸潤、線維芽細胞、散発性の出血、皮下組織における筋原線維の変性／再生といった軽微～軽度の変化が認められた。これらの変化はすべての群で同程度と考えられたため、投与手技に関連するものと判断された。回復期間終了後には投与部位の真皮／皮下組織で主に軽微な変化が認められたが、回復傾向にあった。

結論として、ビーグル犬へのインスリン イコデク最大 18/12 nmol/kg の週 2 回皮下投与により、インスリンの目的とする薬理作用又は過剰な薬理作用（血糖降下作用）と一致する変化が認められた。これらの所見は、低血糖様の一般状態変化、体重増加量の軽微な促進、血糖値低下、肝臓重量減少であった。したがって、NOAEL は 12 nmol/kg/週 2 回と判断される。NOEL は、6 nmol/kg/日以上で血糖値が低下したため、6 nmol/kg/週 2 回未満とする。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

インスリン イコデクは、HI のアミノ酸配列のうち、B 鎖 30 位のスレオニン（Thr^{B30}）を欠落させ、A 鎖 14 位のチロシン（Tyr^{A14}）がグルタミン酸（Glu）に、B 鎖 16 位のチロシン（Tyr^{B16}）及び 25 位のフェニルアラニン（Phe^{B25}）がヒスチジン（His）に置換された HI アナログである。また、C_{20} 脂肪酸

側鎖誘導体（Ado-Ado-γGlu をリンカーとして Lys^{B29} に付加した C_{20} 脂肪酸側鎖）が Lys^{B29} 側鎖のアミノ基を介してペプチド骨格に付加されている。

インスリン イコデクなどのバイオテクノロジー応用医薬品は、ICH S6（R1）ガイドライン[1]に従うと、遺伝毒性試験は一般に必要ないと考えられているが、インスリン イコデクには有機リンカー分子が付加されていることから、追加の評価が必要と考えられる。このような化合物の遺伝毒性試験が必要なのは *in silico* (Q)SAR 解析[11]により有機リンカー分子の DNA 反応性を予測するためである。適切な(Q)SAR 評価（ICH M7 ガイドライン[12]参照）で変異原性の警告構造が認められない分子は、変異原性を示さないものとみなされ、懸念の原因とならず、試験の必要性はないと考えられる。

インスリン イコデクの C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体について Derek Nexus®及び Leadscope® Genetox 統計モデルを用いて(Q)SAR 解析を実施した結果、変異原性の警告構造は認められなかった（M 2.6.7.17.A, 322732）。さらに、ヒトに関連するがん原性、染色体損傷又は遺伝毒性の警告構造も認められなかった。エビデンスの重さから、この構造がヒトに関連する遺伝毒性を示す可能性は低いことが示される。

また、グルタミン酸は食品添加物として広く使用されており、変異原性は評価済みで、Ames 試験及び *in vitro* 染色体異常試験の結果は陰性である[13]。C_{20} 脂肪酸は長鎖ジカルボン酸であり、一般的に脂肪酸は変異原性を示さないと考えられている[14]。

最後に、Ames スクリーニング試験では、インスリン イコデクはヒスチジン要求性ネズミチフス菌株において変異原性を誘発しなかった（2.6.6.4.1 項）。

結論として、インスリン イコデクの遺伝毒性は示されなかった。

2.6.6.4.1 *In vitro* 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1.1 ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 5 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102）を用いたプレート法による復帰突然変異試験

（M 2.6.7.8, 210457）

GLP 非適用のスクリーニング試験において、ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 5 株（TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA102）を用いてインスリン イコデクの変異原性を評価した。ラット肝代謝活性化系（S-9）の存在下及び非存在下において、最終濃度 8、40、200、1,000 又は 5,000 µg/plate のインスリン イコデク、陰性対照（溶媒）及び陽性対照を用いて全 5 株に処理した。全試験菌株に処理後、復帰突然変異体の統計的有意な増加は認められなかった。

結論として、本試験の条件下ではインスリン イコデクは S-9 の存在下及び非存在下でネズミチフス菌 5 株に突然変異を誘発しなかった。

2.6.6.4.2 *In vivo* 遺伝毒性試験

実施せず（2.6.6.4 項参照）。

2.6.6.5 がん原性試験

インスリン イコデクなどのバイオテクノロジー応用医薬品には、標準的な 2 年間のがん原性試験では一般に適切ではないと考えられる（ICH S6）[1]。特に、インスリンは複数の作用をもつホルモンとして広く知られており、主に糖、タンパク質及び脂質代謝の調節に関与するが、細胞増殖作用も有することが知られていることから、「Points to Consider Document on Assessment of the Carcinogenic Potential of Insulin Analogues」（CPMP/SWP/372/01）[3]の推奨に従い、52 週間長期毒性試験の裏付けとして包括的な *in vitro* 試験を実施し、インスリン イコデクと HI の作用を比較した。適切と判断される場合には、関連する増殖因子、インスリン様成長因子-1（IGF-1）又は HI を対照として用いた。*In vitro* 試験の詳細は M 2.6.2.2.1、インスリン イコデクの *in vivo* におけるがん原性の詳細は 2.6.6.3.1.3 項を参照のこと。

In vivo におけるインスリン イコデクのがん原性の評価は、ラット及びイヌを用いたすべての重要な反復投与毒性試験における過形成変化の評価に基づいて行った。さらに、SD 系ラットを用いた 52 週間毒性試験ではがん原性を詳細に検討した。

ラットを用いた 52 週間試験は ICH S6 ガイドライン[1]及び EMA ガイダンス「Points to consider document on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin analogues」[3]に従って計画した。さらに、試験実施計画書は FDA 及び EMA の審査を受け、そのコメントに基づいて HI（NPH）を投与する対照群を設定し、最初に計画した用量に減量した。この試験では、EMA ガイダンス「Note for guidance on carcinogenic potential」[9]及び米国毒性病理学会の推奨事項[10]に従い、全動物のすべての器官の顕微鏡的評価を実施した。

インスリン イコデクは、SD 系ラットを用いた 52 週間毒性試験における全動物の病理組織学的評価においてがん原性を示さなかった。特に、雌の乳腺腫瘍の発生率は、対照群及び NPH インスリン投与群を含むす全群で同様であった（表 2.6.6-10）。非臨床での *in vivo* プログラムを通して、最長 26 週間投与したイヌ又は 52 週間投与したラットにおいて過形成又は腫瘍性病変の発生にインスリン イコデクの投与に関連する変化はみられなかった。

表 2.6.6-10　　ラット 52 週間試験の雌における乳腺腫瘍の発生率

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

インスリン及び IGF-1 受容体との結合、主要なインスリン標的組織における下流でのシグナル伝達及び代謝効果、腫瘍性細胞及び非腫瘍性細胞における細胞分裂促進作用など、インスリン イコデクの *in vitro* における総合的な特性解析により、インスリン イコデクの分子薬理学的プロファイルは HI と同様であり、懸念はないと結論することができる。インスリン イコデクの細胞増殖能／代謝能の効力比は HI と同様であり、インスリン イコデクによる細胞増殖のリスクは高くなく、インスリン イコデクの主な生物学的作用のバランスは HI と変わらないことが示唆される（M 2.6.2.2.1）。

結論として、インスリン イコデクのがん原性を検討する *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験の非臨床パッケージに基づき、すべての試験によりインスリン イコデクのがん原性が HI と同様であることが支持されると考えられる。このため、非臨床におけるインスリン イコデクのがん原性は十分に検討されたと判断される。

2.6.6.6　　生殖発生毒性

ICH S5(R3)ガイドライン[5]に従い、ラットを用いた受胎能、胚・胎児発生、出生前・出生後の発生に関する試験、ウサギを用いた胚・胎児発生試験においてインスリン イコデクの生殖発生毒性を検討した（表 2.6.6-11 及び表 2.6.6-14）。受胎能と胚・胎児発生は併せて評価した。

26 週間反復投与試験と同様に、生殖発生毒性試験の動物にもグリセロール（グリセリン）及び塩化ナトリウムからなる等張希釈液で希釈した pH 7.4 のインスリン イコデクの保存溶液を投与した。対照群には、高用量群と同じ比率の等張希釈液で希釈したインスリン イコデクの溶媒を投与した。

2.6.6.6.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

表 2.6.6-11　ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する毒性試験の概要表

Study ID	**213427**	**213525**
Type of study	Preliminary combined fertility and embryo-foetal toxicity	Combined fertility and embryo-foetal toxicity
Strain	Sprague-Dawley	Sprague-Dawley
Test article	Insulin icodec	Insulin icodec
Route of administration	s.c.	s.c.
Animals/sex/group	4 groups: 8 males and 8 females Satellite animals: 3 females in mid dose group	4 groups: 22 males and 22 females Satellite animals: 3 females/ group
Dose levels (nmol/kg/day)	Males: 0, 40, 60, 100 Females: 0, 20, 40, 60	Males: 0, 40, 60, 100 Females: 0, 10, 30, 60
Dosing period	Males: 4 weeks prior to mating until termination of majority of females Females: 2 weeks prior to mating and up to and including day 17 after mating Satellite females: 2 weeks before mating and up to and including day 19 after mating	Males: 4 weeks prior to mating until termination of majority of females Females: 2 weeks prior to mating and up to and including day 17 after mating Satellite females: 2 weeks before mating and up to and including day 19 after mating
Conclusion	Males: 100 nmol/kg/day was well tolerated Females: 60 nmol/kg/day was well tolerated Litter: No effects on fertility or embryo-foetal survival. At all dose levels, a number of minor skeletal changes and one incidence of a major skeletal change at 60 nmol/kg/day were recorded.	NOAEL male fertility: 100 nmol/kg/day NOAEL female fertility and maternal toxicity: 60 nmol/kg/day NOAEL embryo-foetal development: 60 nmol/kg/day

2.6.6.6.1.1　SD 系ラットへの皮下投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する予備毒性試験

（M 2.6.7.11, 213427）

本試験の目的は、主試験に適した用量を特定し、受胎能及び胚・胎児発生に対するインスリン イコデクの影響に関する予備的な情報を収集することであった。投与群、用量及び各群の動物数を表 2.6.6-12 に示す。雄には交配前 4 週間から大部分の雌の剖検まで合計 53～60 日間、1 日 1 回皮下投与した。雌には交配前 2 週間から交配 17 日後（妊娠 17 日）まで投与した。また、胎児と母動物の曝露量比を評価するため、サテライト群の雌に交配 19 日後まで 40 nmol/kg/日を投与し、雄には投与を行わなかった。

表 2.6.6-12　　ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する予備的な試験－投与群、用量及び動物数

Group	Test article	Male dose levels (nmol/kg/day)	Number of males	Female dose levels (nmol/kg/day)	Number of females (number of satellite females)
1	Control (vehicle)	0	8	0	8
2	Insulin icodec	40	8	20	8
3	Insulin icodec	60	8	40	8 (3)
4	Insulin icodec	100	8	60	8

用量の設定にあたっては、ラットを用いた 8 週間反復投与試験の結果を参考とした（M 2.6.7.7.A, 211239）。この試験では、雌では 75 nmol/kg/日投与の忍容性は認められず、雄では 100 nmol/kg/日投与の忍容性が認められた。投与容量は 1 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量、発情周期の長さ及び規則性、交配能、血糖プロファイル（妊娠 6 日、妊娠 17 日及び交配後の雄）、TK パラメータを評価した。剖検では、成熟動物の全項目の肉眼的評価を実施し、選択した器官の重量を測定し、受胎能を評価した。同腹児数を測定し、胎児の外表検査及び骨格検査を行った。

親動物の試験成績

試験期間中、死亡、低血糖様の一般状態変化又は投与による一般状態変化は認められなかった。

投与開始後 2 週間の体重増加量は、100 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりも大きかった。交配後の体重増加量は対照群よりも抑制された。このため、全体的な体重増加量は対照群と同程度であった。これと一致して、投与開始後 1 週間の摂餌量も 100 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりも高かった。40 又は 60 nmol/kg/日投与群では影響はみられなかった。

交配前の雌では全投与群で対照群よりも体重増加量が促進された。妊娠期間中、全体的な体重増加量は 20 及び 40 nmol/kg/日投与群では対照群よりもわずかに促進したが、統計的に有意ではなく、60 nmol/kg/日投与群では差はみられなかった。平均妊娠子宮重量は全投与群で高値であった。このため、40 及び 60 nmol/kg/日投与群では妊娠子宮重量で調整した母動物の体重増加量が抑制された。交配前の摂餌量は全投与群で高かったが、交配後は対照群と同様であった。

100 及び 60 nmol/kg/日投与群の雄における Day 26 及び交配後当日朝の血糖値は対照よりも低かったが、40 nmol/kg/日投与群では決定的な影響は認められなかった。

妊娠 6 日の雌では、40 又は 60 nmol/kg/日の投与後 4 時間に血糖値の軽微な低下がみられ、この影響は 60 nmol/kg/日の投与後 8 時間にもみられたが、それほど顕著ではなかった。妊娠 17 日には検討したいずれの用量でも血糖値に投与の明らかな影響は認められなかった。

投与動物においてインスリン イコデクの全身曝露を確認した。雌雄いずれにおいても C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の用量比例性が示された。全身濃度は投与後 4～8 時間に最大に達した。交配後の雌における曝露量は妊娠 6 日から 17 日までに約 20～30%減少した。妊娠 20 日には胎児の血漿中濃度は 40 nmol/kg/日を投与した母動物の約 5%であった。

発情周期の長さ及び規則性、交配までの期間、交配能及び妊娠率に投与の影響はみられなかった。

成熟雌雄動物では投与に関連する肉眼的所見は認められず、投与部位に特筆すべき所見は認められなかった。精巣上体の絶対重量及び体重比相対重量は、対照群と比較して 100 nmol/kg/日投与群で高値であった。これらの変化は程度が限定的であるため毒性学的に意義のあるものではないと判断された。その他の器官重量に投与の影響は認められなかった。

胎児の試験成績

インスリン イコデク投与群の雌では対照群と比較して黄体数、着床数及び生存胎児数が多かった。これは、用量反応性が認められず、対照動物の黄体数が背景データから推測した黄体数よりも少なかったため、投与に関連するものではないと判断された。着床前又は着床後胚損失、胎盤重量、胎児重量及び性比には影響はみられなかった。

全投与群で軽微な異常が認められ、発生率は対照群よりも高かった。

全投与群で第 13/14 肋骨及び第 14/14 肋骨の短縮及び過剰形成が認められた。40 及び 60 nmol/kg/日投与群では、肋骨の内側性の肥厚／彎曲が高頻度で認められた。

20 及び 60 nmol/kg/日投与群では、頭蓋中心、舌骨及び仙尾骨の骨化遅延／不完全骨化が認められた。また、60 nmol/kg/日投与群では骨盤骨の骨化遅延／不完全骨化が認められた。

60 nmol/kg/日投与群では、1 匹において重大な異常と考えられる長骨の彎曲／短小／肥厚が認められた。

背景データ（主に 1 群あたりの動物数の多い生殖に関する主試験で得られたデータ）と比較すると、予備的な試験の 60 nmol/kg/日投与群における肋骨の内側性の肥厚／彎曲、第 13/14 肋骨及び第 14/14 肋骨の短縮及び過剰形成、骨盤骨の骨化低下、長骨の彎曲／短小／肥厚の発生率は高いと考えられた。

以上の骨格の変化については、明らかな用量-反応関係が認められず、重大な骨格の変化は 1 件のみであり、1 群あたりの動物数が少ないことにより試験の検出力が低いことから、インスリン イコデク投与との関連性は不明である。

結論として、受胎能及び胚・胎児発生に関する予備試験では、雄ではインスリン イコデク 100 nmol/kg/日まで、雌では 60 nmol/kg/日までの 1 日 1 回皮下投与は忍容性が良好であり、交配前の雌雄いずれにおいても目的とする薬理作用又はその二次的な影響（血糖値低下、体重増加及び摂餌量増加）

が認められた。母体毒性の徴候は認められず、受胎能及び胚・胎児の生存への影響も認められなかった。全投与群で軽微な骨格の変化が多数認められたほか、重大な骨格の変化が 1 件認められたが、インスリン イコデクの投与との関連性は不明である。

2.6.6.6.1.2　SD 系ラットへの皮下投与による受胎能及び胚・胎児発生に関する毒性試験

（M 2.6.7.12.A, 214143）

本試験の目的は、SD 系ラットに 1 日 1 回皮下投与した時のインスリン イコデクの受胎能及び胚・胎児発生に対する影響を評価することであった。投与群、用量及び各群の動物数を表 2.6.6-13 に示す。雄には交配前 4 週間から大部分の雌の剖検まで合計 56～62 日間投与した。雌には交配前 2 週間から交配 17 日後（妊娠 17 日）まで投与した。また、胎児と母動物の曝露量比を評価するため、4 つのサテライト群の雌に交配 19 日後まで投与し、雄には投与を行わなかった。

表 2.6.6-13　　ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験－投与群、用量及び動物数

Group	Test article	Male dose levels (nmol/kg/day)	Number of males	Female dose levels (nmol/kg/day)	Number of females (number of satellite females)
1	Control (vehicle)	0	22	0	22 (3)
2	Insulin icodec	40	22	10	22 (3)
3	Insulin icodec	60	22	30	22 (3)
4	Insulin icodec	100	22	60	22 (3)

用量の設定にあたっては、投与との関連性が不明な骨格の変化が認められた受胎能及び胚・胎児発生に関する予備的な試験の結果を参考とした（M 2.6.7.11, 213427）。雌では、変化が再度認められ、主試験で確認された場合には、NOAEL を設定するため低用量及び中用量のインスリン イコデクを減量した。投与容量は 1 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量、発情周期の長さ及び規則性、交配能、血糖プロファイル（妊娠 6 日、妊娠 17 日、Day 24 及び交配確認後の雄）、TK パラメータを評価した。剖検では、成熟動物の全項目の肉眼的評価を実施し、選択した器官の重量を測定し、受胎能を評価した。同腹児数を測定し、胎児の外表、内臓及び骨格検査を行った。

親動物の試験成績

Day 48 に 100 nmol/kg/日投与群の雄 1 匹で低血糖様の一般状態変化が認められた。血糖値は 0.6 mmol/L であった。グルコースを投与したが改善されなかった。上切歯破損により通常の摂餌が不可能となり、安楽死となった。試験期間中、これ以外には低血糖様の一般状態変化又は投与による一般状態変化は認められなかった。

投与開始後 1～2 週間の体重増加量は、インスリン イコデク投与群のすべての雄で対照群よりも促進した。交配後の体重増加量は 100 nmol/kg/日投与群の雄のみで大きかった。交配前の摂餌量は 100 nmol/kg/日投与群の雄で対照群よりも多く、その後差はみられなかった。

60 nmol/kg/日投与群の雌では、交配前の体重増加量は対照群よりわずかに促進したが、妊娠中は対照群より統計的に有意に抑制された。平均妊娠子宮重量は、対照群と比較して 60 nmol/kg/日投与群でわずかに高値であり、妊娠子宮重量の寄与を調整した場合でも、妊娠期間中の母動物の体重変化量は対照群より小さかった。10 及び 30 nmol/kg/日投与群では、体重増加量、子宮重量、妊娠子宮重量で調整した体重は対照群と同様であった。交配前の摂餌量は 60 nmol/kg/日投与群の雌で高かったが、交配後は対照群と同様であった。

血糖値は Day 24 に 100 nmol/kg/日投与群の雄で低値であった。60 nmol/kg/日投与群の雄では対照群よりやや低値であったが、40 nmol/kg/日投与群では対照群との間に一貫した差は認められなかった。100 nmol/kg/日投与群の雄では交配後当日朝の血糖値は著しく低値であったが、60 及び 40 nmol/kg/日投与群では決定的な影響は認められなかった。

妊娠 6 日の雌では、全投与群で投与後 4、8 及び 12 時間に投与に関連する血糖値の低下がみられた。60 nmol/kg/日投与群の雌では、投与後 2 及び 24 時間にも低値であった。

妊娠 17 日には検討したすべての用量で投与後 12 時間の血糖値が対照群よりも低かった。60 nmol/kg/日投与群では、投与後 4 及び 8 時間にも低値であった。この影響は 60 nmol/kg/日投与群で最も顕著であったが、明らかな用量反応性は認められなかった。

投与動物においてインスリン イコデクの全身曝露を確認した。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は雌雄いずれにおいても用量依存的に増加した。全身濃度は投与後 4～12 時間に最大に達し、大部分は投与後 8 時間に最大に達した。交配後の雌における曝露量は妊娠 6 日から 17 日までに約 23～44%減少した。妊娠 20 日の最終投与後 24 時間には、個々の胎児と母動物の曝露量比は 3～6%であった。胎児における絶対濃度は用量依存的に増加したが、胎児と母動物の曝露量比に用量依存性は認められなかった。

発情周期の長さ及び規則性、交配までの期間、交配能及び妊娠率に投与の影響はみられなかった。

成熟雌雄動物では投与に関連する肉眼的所見は認められず、投与部位に特筆すべき所見は認められなかった。雌雄いずれにおいても副腎の絶対重量及び体重比相対重量に影響は認められなかった。検討したいずれの用量でも精巣上体、前立腺、精嚢又は精巣の絶対重量に投与の影響は認められなかった。100 nmol/kg/日投与群の雄では、精巣上体及び精巣の体重比相対重量が統計的に有意に低く、試験終了時の体重は統計的に有意に高かったが、これらの器官の絶対重量が対照群と同様であったことを反映していた。

胎児の試験成績

雌 3 匹（対照群の雌 2 匹及び 30 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹）では妊娠が確認されず、さらに対照群の雌 1 匹で全胚吸収が認められた。インスリン イコデク投与群の雌では、対照群と比較して平均黄体数、着床数及び生存胎児数がわずかに少なかった。しかしながら、用量反応性が認められず、いずれの差も統計的に有意ではなく、個々の黄体数を測定したところ投与による減少傾向がみられなかったことから、偶発的なもので、インスリン イコデクの投与に関連するものではないと判断された。平均胎盤重量は 60 nmol/kg/日投与群でわずかではあるが統計的に有意に低値であった。個々の同腹児数を測定したところ投与に関連する胎盤重量の減少傾向がみられなかったことから、この差は、対照群の平均胎盤重量が 1 例のみ極めて高値であったことが一因と考えられた。さらに、高用量群の胎盤重量の群平均は、背景データの範囲をわずかに超えていたが、対照群の範囲を超えていた動物は 1 匹のみであった（M 2.6.7.12.A, 214143）。このため、これらの変化は偶発的なもので、インスリン イコデクの投与に関連するものではないと判断された。

着床前又は着床後胚損失、胎児重量及び性比への影響は認められなかった。

胎児の内臓又は骨格の重大な異常及び軽微な異常の発生率に投与との関連性は認められなかった。

60 nmol/kg/日投与群では左臍動脈の発生率が対照群よりわずかに高かった。これは血管の側性の軽微な変化であり、有害な影響ではないと考えられる。また、60 nmol/kg/日投与群では対照群と比較して左葉の突出を伴う横隔膜菲薄化の発生率がわずかに高かった。いずれの変化も背景データの範囲内であるため、インスリン イコデクの投与に関連するものではないと考えられる（M 2.6.7.12.A, 214143）。

結論として、雄ではインスリン イコデク 100 nmol/kg/日まで、雌では 60 nmol/kg/日まで忍容性良好であったが、雌雄いずれにおいても目的とする薬理作用又はその二次的な影響と一致する所見（血糖値低下、体重増加及び摂餌量増加）が認められた。母体毒性の徴候は認められず、受胎能及び胚・胎児の生存への影響あるいは重大及び軽微な胎児の異常は認められなかった。100 nmol/kg/日投与群の雄 1 匹で上切歯破損により摂餌量に影響がみられため、インスリン イコデクの血糖降下作用が強く現れ、その結果、低血糖様の一般状態変化が認められ、試験終了前に安楽死処置した。認められた所見はインスリン イコデクの目的とする薬理作用によるものであったため、雄の受胎能に関する NOAEL は 100 nmol/kg/日と判断され、雌の受胎能、母体毒性及び胚・胎児発生に関する NOAEL は 60 nmol/kg/日と判断される。

2.6.6.6.2　胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.6-14　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験の概要表

Study ID	**213525**	**214091**
Type of study	Preliminary embryo-foetal toxicity study	Embryo-foetal toxicity study
Species/strain	New Zealand White Rabbits	New Zealand White Rabbits
Test article	Insulin icodec	Insulin icodec
Route of administration	s.c.	s.c.
Animals/sex/group	4 groups: 6 females	4 groups: 22 females
Dose levels (nmol/kg/day)	0, 12, 18 or 24	0, 6, 12 or 18
Dosing period	Day 2 and up to and including day 19 after mating	Day 2 and up to and including day 19 after mating
Conclusion	Females: hypoglycaemia at 24 nmol/kg/day Litter: increased pre- and post-implantation losses. At all dose levels, minor skeletal abnormalities and at one major cranial abnormality at 24 nmol/kg/day were recoded.	NOAEL maternal toxicity: 18 nmol/kg/day NOAEL embryo-foetal development: 18 nmol/kg/day

2.6.6.6.2.1　ニュージーランド白色種ウサギへの皮下投与による胚及び胎児発生に関する予備的な毒性試験

（M 2.6.7.11, 213525）

本試験の目的は、主試験に適した用量を特定し、ウサギに交配 2～19 日後（妊娠 2～19 日）に 1 日 1 回皮下投与した時の胚・胎児発生に対するインスリン イコデクの影響について予備的な情報を収集することであった（表 2.6.6-15）。

表 2.6.6-15　ウサギを用いた胚及び胎児発生に関する予備的な試験－投与群、用量及び動物数

Group	**Test article**	**Dose levels (nmol/kg/day)**	**Number of females**
1	Control (vehicle)	0	6
2	Insulin icodec	12	6
3	Insulin icodec	18	6
4	Insulin icodec	24	6

用量の設定にあたっては、非妊娠ウサギにインスリン イコデク 25、35 又は 50 nmol/kg/日投与群を 14 日間皮下投与した予備試験の結果を参考とした（M 2.6.7.6, 213337）。25 nmol/kg/日投与は忍容性が良好であったが、これよりも高用量では各群 1 匹において低血糖様の一般状態変化が認められ、試験終了前に安楽死させた。投与間隔の設定にあたっては、1 日 1 回投与時の定常状態での曝露量が週 2 回投与時よりも高値であった非妊娠ウサギにおける単回投与試験の結果を参考とした（M 2.6.7.6,

213152）。交配 2 日後に投与を開始し、交配 6 日後に定常状態での曝露量を測定した。投与容量は 0.25 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量、血糖プロファイル（妊娠 2 日及び 19 日）、TK パラメータ及び抗インスリン イコデク抗体の産生を評価した。妊娠 29 日に全生存雌動物を安楽死させ、肉眼的検査を実施した。同腹児数を測定し、胎児の外表、内臓及び骨格検査を行った。

親動物の試験成績

流産の徴候が認められた対照群の雌 1 匹及び 24 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹をそれぞれ妊娠 28 日及び 21 日に安楽死させた。両動物とも流産の徴候が出現する前に数日間の摂餌量の減少がみられた。24 nmol/kg/日投与群の雌では妊娠 18 日に低血糖様の一般状態変化（不安定歩行）及び低血糖値（2.4 mmol/L）が認められた。グルコースの経口投与後、血糖値は 7.0 mmol/L となった。しかしながら、妊娠 21 日には流産の徴候が認められ、血糖値が 2.7 mmol/L となったため、試験終了前に安楽死させた。流産は摂餌量の減少によるものと考えられ、インスリン イコデク投与群では、低血糖値がさらに流産に影響した可能性が高い。

これ以外に投与に関連すると考えられる一般状態変化は認められなかった。

24 nmol/kg/日投与群では、妊娠 2～16 日の平均体重増加量が対照群よりやや大きかった。その後の平均体重増加量は対照群と同様であった。妊娠 19 日の投与中止後は 24 nmol/kg/日投与群で軽微な体重減少が認められたのに対して、対照群では軽微な体重増加が認められた。18 又は 12 nmol/kg/日投与群では体重に決定的な影響は認められなかった。

24 nmol/kg/日投与群では、平均妊娠子宮重量が対照群よりも低値であり、この群の平均同腹児数が少ないことを反映していた。妊娠子宮重量で調整した母動物の体重の変化量は対照群と同様であった。18 nmol/kg/日投与群では、平均妊娠子宮重量は対照群と同様であり、妊娠子宮重量で調整した母動物の体重の変化量は対照群よりも小さかった。12 nmol/kg/日投与群では、平均妊娠子宮重量及び妊娠子宮重量で調整した母動物の体重の変化量は対照群と同様であった。

24 nmol/kg/日投与群では、妊娠 6～15 日の平均摂餌量が対照群よりわずかに増加した。18 及び 24 nmol/kg/日投与群では、妊娠 20～28 日の平均摂餌量が対照群よりわずかに減少した。

交配 2 日後の平均血糖値は検討したすべての用量で対照群と同様であったが、24 nmol/kg/日投与群では投与後 24 時間の平均血糖値が対照群よりやや低値であった。交配 19 日後の平均血糖値はすべての用量で対照群より低値で、24 nmol/kg/日投与群で最も顕著であった。

投与動物においてインスリン イコデクの全身曝露を確認した。t_{max} は、初回投与日は 24 時間、妊娠 19 日は 4～8 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量比例的に増加した。Rac_{Obs} は 3.2～3.4 であった。妊娠 2～19 日にはインスリン イコデクが 1 日 1 回皮下投与後に蓄積する傾向がみられた。

抗インスリン イコデク抗体は検出されなかった。

肉眼的検査では投与に関連すると考えられる母動物の所見は認められなかった。投与部位に特筆すべき所見は認められなかった。

胎児の試験成績

24 nmol/kg/日投与群では、着床前及び着床後胚損失率が高かったため、平均着床数が対照群より少なかった。このため、平均生存同腹児数は対照群よりも少なかった。18 又は 12 nmol/kg/日投与群では平均着床数及び生存同腹児数に対して投与の明らかな影響は認められなかったが、同腹児数の減少傾向がややみられた。肉眼的検査では投与に関連する胎児の変化は認められなかった。

平均胎盤重量は 24 nmol/kg/日投与群のみで対照群よりわずかに高値であった。

インスリン イコデク投与群全体における平均胎児重量は対照群より高い傾向がみられたが、これはインスリン イコデク投与群における同腹児数が少なかったことを反映していると考えられる。

18 nmol/kg/日投与群では、骨化遅延／不完全骨化／胸骨分節未骨化の発生率が対照群及び背景データの範囲をやや上回った。

全投与群で、用量との関連性はみられないものの軽微な頭蓋骨異常（縫合骨、亀裂及び過剰縫合）が少数認められ、24 nmol/kg/日投与群の胎児 1 匹では重大な頭蓋骨異常（前頭隆起を伴う前頭骨の部分的癒合）が認められた。24 nmol/kg/日投与群でみられた過剰縫合を除き、いずれの所見も背景データ（異常がみられた同腹児数）の範囲を超えていた。上記の骨格の変化は、用量反応性が認められなかったため投与との関連性は不明と考えられる。さらに、この試験は予備試験であるため、1 群あたりの動物数が少なく、これらのデータの確定的な解釈は難しい。

投与に関連する内臓の異常は認められなかった。

結論として、胚・胎児発生に関する予備試験では、最大 24 nmol/kg/日の 1 日 1 回皮下投与により目的とする薬理作用又はその二次的な影響（血糖値低下、体重増加及び摂餌量増加）が認められた。24 nmol/kg/日投与群で着床前及び着床後胚損失率が高かった。軽微な頭蓋骨異常として認められた胚・胎児発生への軽微な影響はすべての投与群で認められ、24 nmol/kg/日投与群では胎児 1 匹において重大な頭蓋骨異常が認められた。これらの変化はインスリン イコデクの投与に関連しないものと判断された。

2.6.6.6.2.2　ニュージーランド白色種ウサギへの皮下投与による胚及び胎児発生に関する毒性試験

（M 2.6.7.13.A, 214091）

本試験の目的は、ニュージーランド白色種ウサギに交配 2～19 日後（妊娠 2～19 日）に 1 日 1 回皮下投与時の胚・胎児発生に対するインスリン イコデクの影響を評価することであった（表 2.6.6-16）。

表 2.6.6-16　　ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験－投与群、用量及び動物数

Group	Test article	Dose levels (nmol/kg/day)	Number of females
1	Control (vehicle)	0	22
2	Insulin icodec	6	22
3	Insulin icodec	12	22
4	Insulin icodec	18	22

用量の設定にあたっては、妊娠ウサギを用いた予備的な試験の結果を参考とした（M 2.6.7.11, 213525）。この試験では 18 nmol/kg/日は忍容性良好であったが、24 nmol/mg/日は母動物の低血糖、着床前及び着床後胚損失が認められたことから最大耐量を上回ると判断された。交配 2 日後に投与を開始し、交配 6 日後に定常状態での曝露量を測定した。投与容量は 0.25 mL/kg とした。

試験期間中、一般状態、体重、摂餌量、血糖プロファイル（妊娠 6 日及び 19 日）、TK パラメータを評価した。妊娠 29 日に全生存雌動物を安楽死させ、肉眼的検査を実施した。同腹児数を測定し、胎児の外表、内臓及び骨格の肉眼的検査を行った。

親動物の試験成績

18 nmol/kg/日投与群の雌 2 匹で流産が認められ、18 nmol/kg/日投与群の 1 匹及び 12 nmol/kg/日投与群の 1 匹を重度の低血糖様の一般状態変化により安楽死させた。

流産の徴候（ケージ内の赤色染色及び胎児由来と考えられる組織）が認められた 18 nmol/kg/日投与群の雌 2 匹を妊娠 22 日又は 21 日に安楽死させた。両動物ともに赤色染色が確認されるまでの最大 3 日間の摂餌量が少なかった。このうち 1 匹では血糖値が低値（3.61 mmol/L）であった。剖検ではいずれの雌においても流産後の着床痕が認められた。

また、動物福祉の観点から、重度の低血糖様の一般状態変化が認められた 2 匹を安楽死させた。18 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹は低血糖様の一般状態変化及び低血糖値（1.6 mmol/L）が認められたため妊娠 13 日に安楽死させた。剖検では 5 匹の着床（吸収胚 2 個及び生存胎児 3 匹）により妊娠を確認した。12 nmol/kg/日投与群の雌 1 匹は低血糖様の一般状態変化及び低血糖値（1.1 mmol/L）が認められたため妊娠 11 日に安楽死させた。剖検では、10 匹の死亡胎児により妊娠を確認した。この動物における低血糖は、不注意により夜間にケージの扉が開き、摂餌及び摂水不能となったことによる。

これ以外には投与に関連すると考えられる一般状態変化は認められなかった。

上記の安楽死処置のほかには、0、6、12 及び 18 nmol/kg/日投与群のそれぞれ 2 匹、2 匹、3 匹及び 1 匹で妊娠が確認されなかった。

投与中又は投与中止後の体重増加量に投与の影響は認められなかった。妊娠子宮重量及び妊娠子宮重量の寄与を調整した体重の変化量にも投与の影響は認められなかった。

妊娠 6～14 日の摂餌量は 18 nmol/kg/日投与群で対照群と比較してわずかに高かった。投与中止後（妊娠 20～28 日）の摂餌量はすべての群で同様であった。

妊娠 6 日の平均血糖値は、12 及び 18 nmol/kg/日投与群で対照群よりも一貫して低く、投与後 8 時間を除くすべての時点で用量反応性が認められた。6 nmol/kg/日投与群では、投与後 4 及び 8 時間の平均血糖値が対照群と比較してやや低かった。

妊娠 19 日には全投与群で投与前、投与後 1、2、4 及び 24 時間の平均血糖値が対照群よりも低く、投与後 1 時間を除くすべての時点で用量反応性が認められた。投与後 8 時間の血糖値は 18 nmol/kg/日投与群では対照群と同様であったが、6 又は 12 nmol/kg/日投与群では対照群よりも低かった。

投与動物においてインスリン イコデクの全身曝露を確認した。t_{max} は 4～8 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ は用量依存的に増加し、曝露量はほぼ用量比例的に増加した。妊娠 19～26 日の Rac_{Obs} の平均は 1.08～1.13 であった。Rac_{Obs} が 1 に近かったことから、定常状態での曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）は妊娠期間中、妊娠 2 日からの 1 日 1 回皮下投与後に変化しなかったことが示唆される。

肉眼的検査では投与に関連すると考えられる母動物の所見は認められなかった。投与部位に特筆すべき所見は認められなかった。

胎児の試験成績

黄体数、着床数、吸収胚数及び生存胎児数の平均、性比、着床前及び着床後胚損失率、胎盤重量、同腹児重量及び胎児重量の平均に母動物への 18 nmol/kg/日までの投与の影響は認められなかった。

胎児の内臓及び骨格の重大な異常及び軽微な異常の発生率に投与との関連性は認められなかった。

18 及び 12 nmol/kg/日投与群では、20 本胸腰椎体、複数の胸椎及び肋骨の異常の発生率が対照群よりも高かった。18 nmol/kg/日投与群では対照群と比較して、骨盤帯の片側尾側移動の発生率がわずかに高かった。これらの所見は背景データの範囲内であったため（M 2.6.7.13.A, 214091）、偶発的なもので、インスリン イコデクの投与に関連するものではないと判断された。

6 nmol/kg/日投与群では、髄膜瘤を有する胎児 1 匹が認められた。背景データの範囲を超えていたが、インスリン イコデク投与群では他の頭部の異常が認められなかったため、偶発的なもので、投与に関連するものではないと判断された。

対照群を含む全投与群で、それぞれ 1 匹の胎児に脊椎の様々な位置での彎曲が認められた。対照群で認められた脊椎彎曲及び 12 nmol/kg/日投与群で認められた胸椎彎曲は背景データの範囲内であった。6 nmol/kg/日投与群で認められた頸胸椎彎曲及び 18 nmol/kg/日投与群で認められた仙尾彎曲は背景データの範囲外であったが、脊椎の異常は対照群を含む全群で認められているため、インスリン イコデクの投与に関連するものではないと判断された。

結論として、インスリン最大 18 nmol/kg/日の 1 日 1 回皮下投与により目的とする薬理作用又はその二次的な影響（血糖値低下及び摂餌量増加）と一致する所見が認められたため、母体毒性はないと判断される。18 nmol/kg/日投与群の雌 2 匹で流産の徴候が認められ、さらに動物福祉の観点から、低血糖様の一般状態変化が認められた同投与群の雌 1 匹を安楽死させた。試験報告では、流産及び低血糖に起因する死亡から、母動物における NOAEL は 12 nmol/kg/日投与群とした。しかしながら、いずれの所見も HI 及びインスリンアナログ（インスリン アスパルト及びインスリン デテミル）の投与後に認められているため、インスリンの薬理作用に関連するものと考えられる。したがって、母体毒性に関する NOAEL は 18 nmol/kg/日と判断される。胎児の内臓又は骨格の重大な異常及び軽微な異常の発生率に投与との関連性は認められなかった。したがって、胚・胎児発生に関する NOAEL は 18 nmol/kg/日と判断される。

2.6.6.6.3　出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験

表 2.6.6-17　ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する毒性試験の概要表

Study ID	**321450**
Type of study	Pre- and post-natal development study
Strain	Sprague-Dawley
Test article	Insulin icodec
Route of administration	s.c.
Animals/sex/group	4 groups: 22 females
Dose levels (nmol/kg/day)	0, 20, 35 or 50 except gestation day 21 to lactation day 2 where dose levels were halved to reduce the risk of hypoglycaemia
Dosing period (days)	Day 6 of gestation to day 20 of lactation
Conclusion	NOAEL maternal toxicity: 35 nmol/kg/day NOAEL pre- and post-natal development offspring: 35 nmol/kg/day

2.6.6.6.3.1　SD 系ラットへの皮下投与による出生前及び出生後の発生に関する試験

（M 2.6.7.14, 321450）

本試験の目的は、SD 系ラットに 1 日 1 回皮下投与した時の出生前及び出生後の発生に対するインスリン イコデクの影響を評価することであった。F0 雌に妊娠 6 日から哺育 20 日まで投与した（表 2.6.6-18）。

表 2.6.6-18　　ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験のデザイン

Group	Test article	Dose levels (nmol/kg/day)			Number of animals		
		Gestation day 6 to 20	Gestation day 21 to lactation day 2	Lactation day 3 to 21	F0 females	F1 males	F1 females
1	Control (vehicle)	0	0	0	22	20	20
2	Insulin icodec	20	10	20	22	20	20
3	Insulin icodec	35	17.5	35	22	20	20
4	Insulin icodec	50	25	50	22	20	20

ラットにおける出生前及び出生後の発生は主試験のみで評価し、用量の設定にあたっては受胎能及び胚・胎児発生に関する主試験の結果を参考とした（M 2.6.7.14, 321450）。この試験では 60 nmol/kg/日まで有害な影響は認められなかった。しかしながら、妊娠期間を通して投与を行う予定であったため、低血糖のリスクを軽減するために高用量の 50 nmol/kg/日を選択した。さらに、分娩時及び哺育初期の低血糖のリスクを軽減するため、妊娠 21 日から哺育 2 日まですべての用量を 2 分の 1 に減量した。投与容量は 1.0 mL/kg/日としたが、妊娠 21 日から哺育 2 日までは 0.5 mL/kg/日とした。

F1 動物にはインスリン イコデクを直接投与しなかったため、曝露は子宮内又は母乳を介したものであった。

F0 雌には離乳まで哺育させ、哺育 21 日に安楽死させた。生後 4 日に同腹児数を 10 匹（可能であれば雄 5 匹、雌 5 匹）とした。試験期間中、F0 雌の一般状態、体重、摂餌量、妊娠期間、分娩及び肉眼的病理所見を評価した。すべての F1 動物において、同腹児数、生存胎児数、性比、一般状態、体重、反射（表面反射及び空中立ち直り反射）の発達、離乳前の視覚機能（瞳孔反射）及び聴覚機能（驚愕反応）を評価した。

生後 21 日より前に同腹の雄 1 匹及び雌 1 匹を選抜し、F1 動物とした。選抜しなかった出生児は生後 21 日に安楽死させ、肉眼的検査を行った。選抜した F1 雌雄は標準的な出生後評価に供し、一般状態、体重及び摂餌量を評価した。さらに、感覚反応、運動活性、学習能力（モリス水迷路）、プレパルス抑制を検討した。また、性成熟度、交配能及び受胎能も評価した。

F1 雌を交配 14 日後に安楽死させ、F1 雄を大部分の F1 雌の後に安楽死させた。雌雄動物の肉眼的検査を行った。

妊娠 17 日及び哺育 20 日にすべての F0 雌からサンプルを採取し、曝露量を分析した。さらに、哺育 20 日に血糖値を測定した。哺育 11 日にすべての F0 雌、同腹の F1 雌雄各 1 匹からサンプルを採取し、曝露量及び血糖値を分析した。

F0 親動物の試験成績

試験期間中、50 nmol/kg/日投与群の雌 4 匹を安楽死させ、20 及び 35 nmol/kg/日投与群では安楽死処置を行わなかった。

妊娠 23 日に分娩困難となった雌 1 匹（No. 74）を安楽死させた。肉眼的検査では子宮内に 6 匹の生存胎児が認められた。

哺育 1 日に雌 1 匹（No. 76）で同腹児全死亡が認められ、安楽死させた。出生児 17 匹中 16 匹は臍帯が付着したまま死亡しており、いずれの出生児においても胃内に母乳がみられなかった。成熟雌動物の胃内に餌はみられなかった。

これらの雌動物 2 匹の死亡はいずれも、雌対照動物最大 2 匹で分娩障害が認められ、対照群 1 群あたり雌対照動物 1 匹で同腹児全死亡が認められた背景データの範囲内であった（M 2.6.7.14, 321450）。したがって、これらの雌動物の死亡は偶発的なものであり、投与に関連するものではないと判断された。

哺育 16 日に雌 1 匹（No. 83）で同腹児の全死亡が認められ、安楽死させた。哺育 15 日に出生児 1 匹を動物福祉の観点から安楽死させた。胃内には母乳がみられた。残る 7 匹は哺育 16 日に死亡又は安楽死させた。出生児で認められた一般状態変化は、振戦、失調性歩行異常、喘ぎ呼吸及び活動性低下であった。出生児 7 匹中 4 匹で胃内に異常な暗色化内容物が認められ、うち 3 匹では胃内に母乳がみられなかった。

最後に、哺育 17 日に動物福祉の観点から雌 1 匹（No. 85）を安楽死させた。歩行障害及び協調運動障害のほか、後肢の制御不良が認められた。哺育 11 日の投与後 24 時間の血糖値は低値（3.18 nmol/L）であり、安楽死処置前の血糖値は極めて低値（1.31 nmol/L）であった。さらに、哺育 11～17 日に体重が 36 g 減少した。同腹児も一般状態変化は認められなかったものの安楽死させた。

雌動物 No. 83 の出生児でみられた一般状態変化の種類のほか、後肢の制御不良は低血糖に関連する神経変性に伴うことが多いことから、いずれの死亡も投与に関連するものと考えられる。

その他に投与に関連すると考えられる一般状態変化は認められなかった。

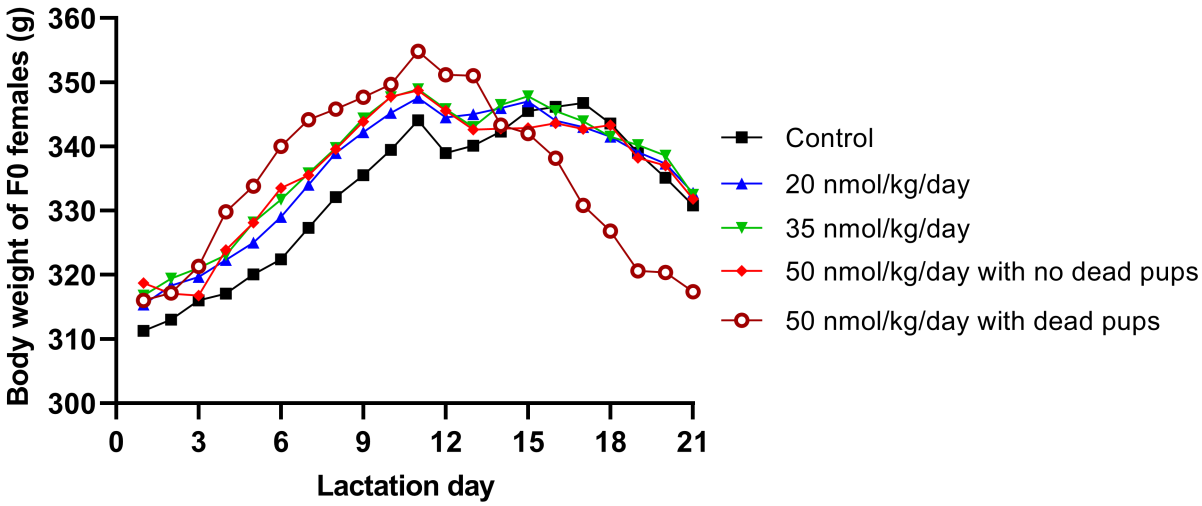
妊娠中の平均体重増加量にはいずれの投与群でも投与の影響はみられなかった。

哺育期間を通して、平均体重増加量は 50 nmol/kg/日投与群の雌で統計的に有意に抑制された（対照群と比較して 56%低い）。20 又は 35 nmol/kg/日投与群の雌でも体重増加量はわずかに抑制された（対照群と比較して 10%及び 19%低い）、統計的に有意ではなかった。

哺育 14 日前後には、対照群を含むすべての群で平均体重が減少したが（図 2.6.6-1）、哺育期間中に児が安楽死又は死亡した 50 nmol/kg/日投与群の雌動物では、平均体重の減少がより顕著であり、その

他の雌動物では平均体重増加量は対照群と同程度であった（図 2.6.6-1）。20 及び 35 nmol/kg/日投与群の雌の体重は対照群と同程度であった。

図 2.6.6-1　　哺育後期の児死亡の有無別にみた F0 雌の哺育中の群平均体重



Note: Body weight of F0 female number 85 not included, as this animal was euthanised due to clinical signs of hypoglycaemia and as a consequence her pups were sacrificed as well

群平均摂餌量には、すべての群ならびに哺育期間中に 20 及び 35 nmol/kg/日を投与した雌で投与の影響はみられなかった。

50 nmol/kg/日投与群の雌では、哺育 4～13 日の群平均摂餌量は対照群よりも高かった。その後、平均摂餌量は対照群よりも少なく、この影響は、哺育後期に児が死亡した雌で最も顕著であった。授乳 1～21 日の平均摂餌量は概して対照群と同様であった。

授乳 11 日の血糖値は、35 又は 50 nmol/kg/日投与群の雌では投与前、投与後 2、4、8、24 時間、20 nmol/kg/日投与群の雌では投与後 4、8、24 時間に低値であった。投与後 4 及び 24 時間には用量反応性が認められた。

授乳 20 日の投与後 4 時間に測定した血糖値は、すべての投与群で低値であり、用量反応性を示す傾向がみられた。

授乳 11 日及び 20 日のいずれにおいても、血糖降下作用は 50 nmol/kg/日投与群で最も顕著であり、哺育後期に児が死亡した雌では、血糖値が群平均よりも低い傾向がみられた。

妊娠期間は 50 nmol/kg/日投与群の雌でわずかではあるが統計的有意に長く、最長妊娠期間は対照群よりも 0.5 日長く、雌 2 匹では妊娠期間が 23.5 日であった。しかしながら、これらの数値は背景データの範囲内であったため、投与に関連するものではないと判断された。

生児出産母動物数（出産率）にインスリン イコデク投与の影響はみられなかった。

妊娠 17 日及び授乳 11 日にはインスリン イコデクを投与したすべての F0 雌で被験物質への全身曝露が認められた。妊娠 17 日及び授乳 11 日の定常状態での曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24h}）は用量依存的に増加した。C_{max} 及び AUC_{0-24h} には妊娠 17 日から授乳 11 日まで変化はみられなかった。

生後 21 日の肉眼的検査では、投与に関連する所見は認められなかった。

F1 離乳前の試験成績

着床数、一腹あたりの児数及び一腹あたりの生存児数に投与の影響は認められなかった。同様に、同腹児数にも哺育 14 日まで投与の影響は認められなかった。しかしながら、哺育 21 日には、50 nmol/kg/日投与群で生存児数（哺育率）が対照群より少なく、哺育 15～18 日の児死亡率が高かったことを反映していた。動物福祉の観点から 25 匹を安楽死させたほか、4 匹が死亡していた。動物福祉の観点から安楽死させた出生児のうち 17 匹及び死亡していた 2 匹には活動性低下、振戦、筋緊張低下、部分的閉瞼、失調性歩行異常などの低血糖様の一般状態変化が認められた（表 2.6.6-19）。一般状態変化を認めなかった 8 匹は母動物とともに動物福祉の観点から安楽死させ、2 匹は一般状態変化を認めなかったにもかかわらず死亡していた。上記の通り、いずれの出生児も平均体重の減少が同じ投与群の他の動物よりも顕著であった F0 雌から出生した児であった。肉眼的検査では、哺育中に安楽死又は死亡した 29 匹中 9 匹で胃内に母乳がみられなかった。対照群及び 20 又は 35 nmol/kg/日投与群では、哺育後期に一般状態変化及び死亡はみられなかった。

性比に投与の影響は認められなかった。

表 2.6.6-19　　50 nmol/kg/日投与群の哺育後期に安楽死又は死亡した出生児における一般状態変化

F1 animal number	Lactation day of death	Number of pups affected	Clinical signs	Pup ID (killed or found dead)
69	18	2	Decreased activity, uncoordinated abnormal gait, partially closed eyelids.	M2 and **M4**
75	18	3	Tremor, reduced body tone, decreased activity partially closed eyelids, uncoordinated abnormal gait.	**M2**, **M4** and **F7**
78	16	4	Decreased activity, uncoordinated abnormal gait.	M2, F6, F7 and F8
82	18	2	Decreased activity, uncoordinated abnormal gait.	M2#¤ and F9
83	15	1	Tremor, uncoordinated abnormal gait, gasping, decreased activity	M4
83	16	7	Tremor, uncoordinated abnormal gait, decreased activity.	M1, M2, **M3**¤, F7, **F8**, F9 and **F10**¤
85	17	8	N/A - Dam euthanised for welfare reasons. No signs observed in offspring, but they were killed along with the dam	M1#, M2#, M3#, M4#, F7#, F8#, F9# and F10#
88	17	2	Tremor, uncoordinated abnormal gait, decreased activity	**M4**#¤ and **F15**

No signs observed in offspring; ¤ Found dead; **Bold** indicates no milk in stomach

生後 1 日の雌雄の平均体重は 50 nmol/kg/日投与群で対照群よりわずかに少なく、雄では統計的に有意であった。その後の体重増加量は生後 7～18 日の雌雄で低かった。少量の摂餌を開始した生後 18～21 日には、雄の体重増加量が対照群よりも促進された。哺育中、生後 1～21 日の平均体重増加量は概して 50 nmol/kg/日投与群の雌雄でわずかに抑制され、雌で統計的に有意であった。

哺育中の児の平均体重増加量は、20 及び 35 nmol/kg/日投与群で対照群よりわずかに促進され、35 nmol/kg/日投与群の雄で統計的に有意であった。

生後 11 日の母動物への投与後 4 時間の血糖値に投与の影響は認められなかった。

50 nmol/kg/日投与群では、一般状態変化を認めた児（雌動物 No. 83 の児）の血糖値を測定したところ、疎データではあったものの、一般状態変化を認めない児と比較して約 40%低値であった。

離乳前の表面反射、空中立ち直り反射、瞳孔反射及び驚愕反射にはいずれの用量においても母動物への投与の影響は認められなかった。

F1 動物の生後 11 日（F0 動物における授乳 11 日に相当）にインスリン イコデクの曝露量を測定した。このうち 2 匹（母動物に 35 nmol/kg/日を投与した 1 匹及び 50 nmol/kg/日を投与した 1 匹）では、曝露量はそれぞれ F0 雌における C_{max} の 217 分の 1～1,166 分の 1 であった。このほかの F1 動物では定量下限値（LLOQ）未満であった。

F1 動物として選抜せず、生後 21 日に安楽死させた出生児では投与に関連する肉眼的変化は認められなかった。50 nmol/kg/日投与群の F0 雌から出生し、哺育後期に動物福祉の観点から安楽死させた、あるいは死亡していた出生児では、9 匹で胃内に母乳がみられず、うち 3 匹では胃内に異常な暗色化内容物が認められた。別の 1 匹でも胃内に異常な内容物が認められた。これらの 4 匹は雌動物 No. 83 から出生した同腹児であった。

F1 離乳後の試験成績（選抜した出生児）

交配前及び交配後の F1 動物の外観及び行動にはいずれの投与群においても母動物への投与に関連すると考えられる変化はみられなかった。

生後 30～32 日の学習能力（モリス水迷路）、生後 40～42 日の聴覚性驚愕反応のプレパルス抑制、生後 25 日の運動活性にはいずれの投与群においても母動物への投与の影響は認められなかった。

雄、交配前の雌及び妊娠中の雌における体重増加量にはいずれの投与群においても母動物への投与の影響は認められなかった。

雌雄の性成熟度、交配までの期間、交配能及び受胎能についても、いずれの投与群においても母動物への投与の影響は認められなかった。

着床前胚損失数は母動物への 35 nmol/kg/日投与後の雌で対照群よりも多かったが、統計的に有意ではなく、母動物への 50 nmol/kg/日投与後の着床前胚損失数は対照群と同様であったことから、偶発的なもので、母動物への投与に関連するものではないと判断された。

着床数、吸収胚数、着床後胚損失、生存胎児数に母動物への投与の影響は認められないと判断された。

結論として、インスリン イコデク 50 nmol/kg/日投与群では哺育中の F0 雌で平均体重増加量及び摂餌量が低く、安楽死させた F0 雌では高かった。50 nmol/kg/日投与群の F0 雌 6 匹では、これらの影響がより顕著であった。35 又は 20 nmol/kg/日投与群では、体重増加量は統計的に有意ではなかったものの、わずかに抑制され。35 nmol/kg/日投与群では体重増加量がわずかに抑制され、他の毒性の徴候が認められなかったため、F0 動物での母体毒性に関する NOAEL は 35 nmol/kg/日投与群と判断される。

50 nmol/kg/日では、F1 動物において離乳前及び離乳後にインスリン イコデクの直接的な影響は認められなかった。しかしながら、離乳前に 50 nmol/kg/日を母動物に投与した場合には、雌雄いずれにおいても低血糖様の一般状態変化を認め、生後 21 日より前に死亡又は安楽死させた児が多く、児の体重増加量が抑制された。これらの影響は、上記の出生児の栄養不良につながった F0 雌 6 匹の体重減少量に関連するものと考えられた。したがって、出生前及び出生後の児の生存及び発達に関する NOAEL は 35 nmol/kg/日と判断される。

2.6.6.6.4　　幼若動物を用いた試験

インスリンの小児及び成人における生理学及び薬理学はいずれも既知であることから、幼若動物を用いた毒性試験により新たな知見は得られないものと考えられた。一般に、毒性プログラムでは投与開始時に思春期前後の動物が用いられる。したがって、幼若動物を用いた試験は実施していない。

2.6.6.7　　局所刺激性試験

EMA の「Guideline on Non-clinical Local Tolerance Testing of Medicinal Products [15]に従い、ブタモデルを用いて、最初の臨床試験で使用したものとほぼ同じ製剤の皮下注射後の局所刺激性を評価した。さらに、ウサギにおいて単回静脈内注射後の局所組織反応を評価した。最後に、ミニブタにおいて上市予定製剤の局所刺激性を評価した（表 2.6.6-20）。

表 2.6.6-20　　局所刺激性試験の概要

Study ID	**212218**	**211280**	**319245**
Species/strain	Rabbit/New Zealand White	Pig/LYD	Minipig/Göttingen
Test article	Insulin icodec	Insulin icodec	Insulin icodec
Comparator	Vehicle for insulin icodec	2 vehicles for insulin icodec and sterile isotonic saline	Vehicle for insulin icodec and sterile isotonic saline
Dose route	i.v.	s.c.	s.c.
No of animals	5 females	4 females	10 females
Dosing	Single dose 2 or 5 days before sacrifice, 100 µL/injection of insulin icodec or comparator was injected	Single dose 2. 7, 14 or 28 days before sacrifice, 100 µL/injection site of insulin icodec or comparators were injected	Insulin icodec and vehicle: once weekly for 13 weeks at the same injection site for each test item, 30 µL/injection. Single dose of insulin icodec, vehicle or sterile isotonic saline 2 days before sacrifice, applying a new injection site for each test article, 30 µL /injection.
Results	Single intravenous injection of insulin icodec caused a mild inflammatory reaction 2 and 5 days after injection	The tissue reaction after injection of insulin icodec was characterized by mild inflammatory changes comparable to that seen after injection of the tested vehicles and only minor differences in response were seen when compared to sterile isotonic saline	The tissue reaction after single injection of insulin icodec was characterized by mild inflammatory changes comparable to that seen after injection of vehicle for insulin icodec and sterile isotonic saline

2.6.6.7.1.1　ウサギへの静脈内注射後 2 日及び 5 日の局所刺激性試験

（M 2.6.7.16, 212218）

ウサギへの単回静脈内注射後 2 日及び 5 日にインスリン イコデクの局所刺激性を評価した。雌ニュージーランド白色種ウサギ 5 匹の右耳にインスリン イコデク、左耳にインスリン イコデクの溶媒を安楽死処置前 2 日又は 5 日に単回静脈内注射した。注射液量は 100 µL とした。組成はインスリン イコデク 600 nmol/mL、亜鉛（酢酸亜鉛として）19.6 µg/mL、フェノール 1.5 mg/mL、グリセロール（グリセリン）16.0 mg/mL、リン酸水素二ナトリウム二水和物 1.25 mg/mL、塩化ナトリウム 1.17 mg、pH 7.4 であった。溶媒の組成も同様であるが、インスリン イコデク及び酢酸亜鉛は含有しない。

注射前、注射後 2 分、30 分及び 3 時間後に注射部位を観察し、スコアを付けた。その後は注射部位を 1 日 1 回観察した。

注射部位で認められた一般状態変化及び肉眼的所見はインスリン イコデクと溶媒で同様であった。注射後 2 日に顕微鏡的に軽微～軽度の限局性壊死及び軽微～中等度の炎症細胞浸潤／出血が認められた。この時点では、インスリン イコデクの注射後に針穿刺部位に認められた変化は溶媒よりも重度で

ある傾向がみられた。注射後 5 日には軽微～軽度の限局性炎症細胞浸潤が数例認められたが、インスリン イコデクと溶媒との間に差は認められなかった。

結論として、インスリン イコデクの単回静脈内注射により、注射後 2 及び 5 日に軽度の炎症反応が認められた。注射後 2 日にはインスリン イコデクによる反応は溶媒よりもやや顕著であったが、注射後 5 日には同程度であった。

2.6.6.7.1.2　ブタへの皮下注射後 2、7、14 及び 28 日の局所刺激性試験

（M 2.6.7.16, 211280）

ブタにおける局所刺激性を各動物の剖検前 2、7、14 及び 28 日の 4 箇所の注射に基づいて評価した。評価した製剤処方はヒト初回投与試験に用いたものとほぼ同じであったが、亜鉛濃度がやや高かった（臨床試験に用いた製剤処方では 206 µg/mL、非臨床試験に用いた製剤処方では 220.7 µg/mL）。

剖検前 2、7、14 及び 28 日に雌 LYD ブタ 4 頭にインスリン イコデク 100 µL〔インスリン イコデク 4,200 nmol/mL、グリセロール（グリセリン）16 mg/mL、フェノール 2.35 mg/mL、メタクレゾール 2.70 mg/mL、亜鉛（酢酸亜鉛として）220.7 µg/mL、塩化ナトリウム 1.17 mg/mL、pH 7.4〕、インスリン イコデクの溶媒〔グリセロール（グリセリン）16 mg/mL、フェノール 2.35 mg/mL、メタクレゾール 2.70 mg/mL、塩化ナトリウム 1.17 mg/mL、pH 7.4〕、別の溶媒〔グリセロール（グリセリン）16 mg/mL、フェノール 1.5 mg/mL、メタクレゾール 1.73 mg/mL、塩化ナトリウム 1.17 mg/mL、pH 7.4〕又は滅菌等張食塩液を別々の部位に注射した。インスリン イコデクの注射部位計 16 箇所を評価した。いずれの注射部位においても、2 種の溶媒及び食塩液による目視できる局所反応は認められなかった。注射部位 16 箇所中 14 箇所ではインスリン イコデクによる局所反応は認められなかった。残る 2 箇所では、辛うじて確認できる一過性の腫脹が認められた。いずれの反応も 2 回目の注射後に認められたが、3 回目及び 4 回目の注射後にはインスリン イコデクに関連する反応は認められなかった。

顕微鏡的に炎症細胞浸潤及びコラーゲン分解／脂肪細胞壊死を伴う軽度の局所反応がみられた。反応は注射後 7 日にピークに達し、線維芽細胞の活性化も認められた。その後の数日間に減弱し、注射後 28 日にほぼ完全に消失した。インスリン イコデクを滅菌等張食塩液と比較したときにのみ、反応に軽微な差が認められたが、インスリン イコデクを溶媒と比較したときには、反応に差は認められなかった。

結論として、インスリン イコデク注射後の組織反応は軽度の炎症性変化であり、溶媒の注射後に認められたものと同程度であった。

2.6.6.7.1.3　ミニブタへの 13 週間の反復皮下注射後及び単回皮下注射後の局所刺激性試験

（M 2.6.7.16, 319245）

ミニブタにおいてインスリン イコデクの上市予定製剤の局所刺激性を評価した。

ミニブタ 10 頭にインスリン イコデク又はインスリン イコデクの溶媒を FlexTouch®ペン型注入器を用いて同じ部位に 13 週間皮下注射した。その後、別の注射部位にインスリン イコデク及びインスリン イコデクの溶媒を単回注射し、滅菌等張食塩液も注射した（表 2.6.6-21）。2 日後、動物を安楽死させ、単回注射部位を顕微鏡的に評価した。

注射液量は、インスリン イコデクの濃度が 4,200 nmol/mL であるため、インスリン イコデク 126 nmol に相当する 30 µL とした。

インスリン イコデク製剤 1 mL あたりの組成はインスリン イコデク 4,200 nmol、亜鉛（酢酸亜鉛として）101 µg（[redacted]）、グリセロール（グリセリン）15 mg、フェノール 5.65 mg、メタクレゾール 1.08 mg、塩化ナトリウム 1.17 mg、pH 7.4、溶媒 1 mL あたりの組成はグリセロール（グリセリン）15 mg、フェノール 5.65 mg、メタクレゾール 1.08 mg、塩化ナトリウム 1.17 mg、リン酸水素二ナトリウム二水和物 0.53 mg/mL、pH 7.4 であった。

試験期間中、注射実施日には注射中、注射直後及び注射後約 2 時間に注射部位を目視検査した。注射を実施しない日は注射部位を 1 日 1 回評価した。

表 2.6.6-21　　13 週間局所刺激性試験－試験デザイン

Pen-injector/content	Injection regime	Injection site identity
FlexTouch® with insulin icodec	Once weekly in study week 1-13	6
FlexTouch® with insulin icodec	Once in study week 14	7
FlexTouch® with vehicle	Once weekly in study week 1-13	8
FlexTouch® with vehicle	Once in study week 14	9
FlexTouch® with saline	Once in study week 14	10

[a]Injection site 1-5 was used with a device/drug combination not relevant for this programme

インスリン イコデクの注射部位 20 箇所（反復注射 10 箇所、単回注射 10 箇所）の一般状態変化を評価し、単回注射部位 10 箇所を顕微鏡的に評価した。

インスリン イコデクの 13 週間の週 1 回反復注射後に認められた一般状態変化は主に軽度の腫脹で、発現率が低かった。溶媒の反復注射後に認められた一般状態変化はほとんど認められなかった。

Week 14 には、インスリン イコデク、溶媒又は滅菌等張食塩液の単回注射後に注射部位の反応は認められなかった。

注射部位にインスリン イコデクに関連すると考えられる肉眼的所見は認められなかった。

単回注射部位の顕微鏡的検査では、インスリン イコデクの注射後、時に軽微な限局性出血を伴う軽微な限局性炎症細胞浸潤が認められた。認められた局所変化は溶媒又は食塩液の注射後に認められた変化と同程度であった。表皮及び真皮上層に穿刺部位病変のほか、限局性炎症細胞浸潤／浮腫も認められたが、インスリン イコデク、溶媒及び食塩液で差はみられなかった。

結論として、インスリン イコデクの注射部位に軽度の腫脹が認められた。インスリン イコデク単回注射後の顕微鏡的な組織反応は軽度の炎症性変化であり、インスリン イコデクの溶媒及び滅菌等張食塩液の注射後に認められたものと同程度であった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 免疫原性

免疫原性の評価は重要な反復投与毒性試験に組み込まれている。ペプチド薬剤に対する抗体産生は、その薬剤の曝露量を減少させるため、毒性試験の評価に支障をきたす可能性がある。そのため、ラット及びイヌを用いた最長 26 週間の反復投与毒性試験において抗インスリン イコデク抗体の産生を検討することとした。8 週間試験では、投与終了時点で 67～77%の動物に抗インスリン イコデク抗体が認められ、26 週間試験では 8～22%の動物に抗インスリン イコデク抗体が認められた（表 2.6.6-22）。抗インスリン イコデク抗体陽性動物の割合は投与終了時点と回復試験中で同様であったことから、抗体の測定はサンプル中のインスリン イコデクの存在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、ラット及びイヌを用いた 8 週間試験ならびにイヌを用いた 26 週間試験の数匹では中和作用の可能性を完全に否定することはできない。しかしながら、大部分の動物で目的とする血糖降下作用が認められたことから、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た。

表 2.6.6-22 抗インスリン イコデク抗体陽性動物数

Species	**Rat**		**Dog**	
Study duration in weeks + weeks of recovery (study identification)	**8+6**[a] (211239)	**26+12**[b] (213297)	**8+6**[a] (211240)	**26+12**[c] (213222)
Insulin icodec antibody positive animals / total number of animals - at end of treatment (% positive)	37/55 (67%)	11/137 (8%)	20/26 (77%)	8/36 (22%)
Insulin icodec antibody positive animals / total number of animals - after recovery (% positive)	42/54 (78%)	5/70 (7%)	4/8 (50%)	2/12 (17%)

[a]Antibodies measured at end of recovery; [b]In the recovery period antibodies were measured 4 weeks after last dosing; [c]In the recovery period antibodies were measured during week 4 of recovery

2.6.6.8.2 免疫毒性

免疫毒性試験は実施していない。重要な反復投与試験において血液学的検査値、血漿グロブリン、免疫器官の重量及び病理組織学的所見の評価など、標準の免疫毒性試験項目を検討した。免疫毒性を示す投与に関連する徴候は認められなかった。

2.6.6.8.3 依存性

インスリン イコデクは、従来の乱用薬物の分類であるオピエート、麻薬、中枢神経刺激剤／抗うつ剤、幻覚剤又はカンナビノイドに属すものではないと考えられるため、非臨床試験において薬物乱用

性（薬物依存性）の評価は実施していない。また、既存のインスリン製剤については、依存性（乱用性）は不明である。

2.6.6.8.4　代謝物

インスリン イコデクはタンパク質、ペプチド、脂肪酸分解物及びアミノ酸に代謝される（M 2.6.4.5）。したがって、代謝物の毒性試験は必要なく、実施していない。

2.6.6.8.5　不純物及び溶出物

2.6.6.8.5.1　製剤中の不純物の評価

ラットを用いた 26 週間試験で測定した不純物レベルに基づいて、非臨床試験で検討された目的物質関連物質及び目的物質由来不純物のレベルと申請する製剤規格を比較した（M 2.6.7.17.B）。不純物を（i）親水性不純物、（ii）親水性関連物質、（iii）疎水性関連物質及び（iv）疎水性不純物の 4 つの不純物群に分類した。不純物及び高分子量タンパク質（HMWP）ごとに NOAEL での不純物レベルを規格限度値でのヒトにおける不純物量と比較した（M 3.2.P.5.1）。上記の 4 つの群に分類した個々の不純物は M 3.2.P.5.5 を参照のこと。

4 つの不純物群は規格限度値における臨床曝露量の 10～34 倍高い濃度で検討し、HMWP は規格限度の 11 倍高い濃度で検討した。ラットを用いた 26 週間毒性試験及び非臨床試験用ロット（M 3.2.S.2.6）と実生産の製造工程で製造されたロット（M 3.2.S.2.6）の同等性／同質性に基づき、4 つの不純物群の規格限度は非臨床試験において適切に検討されたと判断する。

非臨床安全性試験に用いたインスリン イコデクの全ロットの概要を M 2.6.7.4 に示す。

2.6.6.8.5.2　実際の不純物及び潜在的不純物の変異原性の評価

ICH S6 ガイドライン [1] に記載されている通り、インスリン イコデクなどのバイオテクノロジー応用医薬品は一般に、DNA 又は他の染色体物質と直接相互作用することはないと考えられる。したがって、インスリン イコデク中の付加体又はそのバイオテクノロジー由来の不純物が DNA と直接相互作用し、懸念の原因となることはないと考えられる。

しかしながら、インスリン イコデクのほか、おそらく不純物もタンパク質分解を受けることから、慎重なアプローチをとっている。そのため、C_{20}脂肪酸側鎖誘導体由来の不純物と、インスリン イコデクの A 鎖及び B 鎖から放出され、低分子化合物となる可能性のある付加体（遊離付加体）を持つ個々のアミノ酸由来の不純物の変異原性を評価した。

ICH M7 ガイドライン [12] によると、不純物の変異原性は、最初にがん原性及び細菌の変異原性に関するデータを検索することにより評価する必要がある。データが得られない場合は、細菌の変異原性の予測に焦点を当てた(Q)SAR 解析を実施する必要がある。インスリン イコデクのような週 1 回投与製剤の場合、変異原性不純物の許容摂取量は投与 1 回あたり 10 µg である [12]。

様々な化合物を Ames 試験（すべて Ames 陰性）又は Derek Nexus®及び Leadscope® Genetox 統計モデルを用いた *in silico* (Q)SAR 解析で評価した。

簡潔に述べると、2 個の　　*不純物A　　及び 2 個の　　*不純物B　　がクラス 3「警告構造」に分類された。このほかの不純物はいずれもクラス 5「警告構造なし」に分類された。

1 回の投与あたり、[redacted]体は 10 µg、　　*不純物A　　として 296 µg を超えてはならない。これは、最大投与量を 700 単位/週とすると、インスリン イコデクの 1 週間あたりの投与量の 1.0%に相当する。

1 回の投与あたり、[redacted]体は 10 µg、　　*不純物B　　として 361 µg を超えてはならない。これは、最大投与量を 700 単位/週とすると、インスリン イコデクの 1 週間あたりの投与量の 1.2%に相当する。

2.6.6.8.5.3　容器・施栓系からの溶出物の評価

インスリン イコデク製剤の容器・施栓系は、1.5 mL 又は 3.0 mL のガラス製カートリッジと施栓系としてのラミネートゴム栓及びゴム製プランジャーで構成される。ラミネートゴム栓でカートリッジの上部を密閉し、ゴム製プランジャーで下部を密閉する。

容器・施栓系の長期溶出試験を実施している。安全性評価については M 3.2.P.2.4 に記載している。簡潔に述べると、溶出試験で測定された溶出物量は非経口投与製剤について Product Quality Research Institute（PQRI）が推奨する安全性の確認が必要な閾値（Qualification Threshold）である 5 µg/日を下回り[16]、ICH M7(R1)に規定される許容摂取量である 10 µg/日[12]を下回っている。

以上のことから、長期溶出試験で測定された容器・施栓系の溶出物量では患者に対する安全性の懸念はないと判断される。

2.6.6.8.6　インスリン イコデクの臨床用製剤に含有される添加剤の評価

インスリン イコデク製剤は、安定剤として亜鉛（酢酸亜鉛中の亜鉛含有量として）101 µg/mL、安定剤及び防腐剤としてフェノール 5.65 mg/mL、防腐剤としてメタクレゾール 1.08 mg/mL を含有する製剤として処方され、等張化剤としてグリセロール（グリセリン）15 mg/mL 及び塩化ナトリウム 1.17 mg/mL が添加されている（M 3.2.P.2.1）。

これらの添加剤は長期投与を目的とした皮下投与製剤での使用実績があり、日本薬局方及び医薬品添加物規格にも掲載されている。また、フェノール、メタクレゾール及びグリセロール（グリセリン）は、オゼンピック®、ゾルトファイ®、ノボラピッド®／NovoLog®、レベミル®及びランタス®など、現在上市されている長期投与を目的とした皮下投与製剤にも同様の濃度で使用されている[17,18,19,20,21]。インスリン イコデクの予定されている用法・用量では、これらの添加剤の量が現在上市されている製剤の投与後の量を超えることはない。

一方、インスリン イコデク製剤は安定剤として 101 µg/mL の亜鉛（酢酸亜鉛 283 µg/mL に相当）を用いて処方されている。週 1 回投与製剤ではインスリンの含量が多い（4200 nmol/mL）ため、他のインスリン製剤より亜鉛含量が多い。他の濃縮インスリン製剤における亜鉛の含量は、例えばランタス® XR ソロスター皮下注（Toujeo®）では 90 µg 亜鉛/mL[22]、ヒューマリン® R U-500[23]（米国で承認）では 85 µg 亜鉛/mL である。

日本人被験者における臨床用量の中央値は 150 単位/回又は 2.18 単位/kg（母集団薬物動態解析 Modelling report、M 5.3.3.5）であり、これらは 61 µg 酢酸亜鉛/回又は 0.88 µg 酢酸亜鉛/kg/回に相当する。

酢酸亜鉛

酢酸亜鉛は FDA の非活性成分データベースに記載されている。皮下投与経路では、1 回投与当たりの最大量は 2.3 mg である[24]。

さらに、酢酸亜鉛（E650）は食品添加物として承認されており、食品中の最高濃度は 1000 mg/kg 又は 1000 mg/L である[25]。

亜鉛

欧州食品安全機関（EFSA）は、亜鉛の許容上限摂取量（UL）を設定する目的で、亜鉛及びその化合物についてこれまでに得られている毒性データを調査した。EFSA によると、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験から得られた証拠の重み付け評価により、一部で陽性結果があるものの、亜鉛に遺伝毒性はないとの結論が裏付けられている[26]。亜鉛のがん原性に関しては、公表時点で結論を下すために十分な試験データが得られていなかった。EFSA は、銅欠乏が亜鉛の UL の導出に重大な影響を及ぼすことを特定し、ヒトにおける経口での NOAEL は 50 mg/日に設定された。

亜鉛の経口許容一日曝露量（PDE）である 13 mg/日と、これに相当する非経口 PDE の 1.3 mg/日（バイオアベイラビリティを 10%と仮定）が EMA により設定されたが、ICH Q3D がこれに取って代わった[27]。亜鉛は低毒性であること、また、各極規制で取扱いが異なっていることから、ICH Q3D において亜鉛は PDE 値が設定されなかった元素不純物のグループに属する。

酢酸塩

酢酸塩（酢酸として）は、クラス 3 の溶媒（ヒトへの毒性が低度で健康に基づく曝露量制限は必要ない溶媒）として記載されている。クラス 3 の溶媒の PDE は 1 日あたり 50 mg 以上である[28]。

インスリン イコデク

動物を用いるすべてのインスリンイコデクの毒性試験において、酢酸亜鉛はインスリン イコデク投与液に含まれていたが、対照動物には酢酸亜鉛を含まない溶媒が投与された。表 2.6.6-23 に、NOAEL

での酢酸亜鉛の用量（投与 1 回あたり）と日本人被験者における臨床曝露量との比較を示し、曝露量比を算出した。

表 2.6.6-23　　NOAEL での酢酸亜鉛に関する動物とヒトの曝露量比

Study type	Species	Study ID	Gender	NOAEL insulin icodec (nmol/kg/dose)	Zinc acetate (µg/kg/dose)	Exposure ratio
Clinical dose @ 2.18 U/kg					0.88	-
General toxicity						
8-week	Rat	211239	M+F	100	13.81	15.6
26-week	Rat	213297	M	80	11.01	12.5
			F	60	8.26	9.4
52-week	Rat	319122	M	60	4.05	4.6
			F	40	2.70	3.1
8-week	Dog	211240	M+F	18	2.49	2.8
26-week	Dog	213222	M+F	12	1.65	1.9
Reproduction toxicity						
Fertility and EFD	Rat	214143	M	100	13.76	15.6
			F	60	8.26	9.4
EFD	Rabbit	214091	F	18	2.48	2.8
Pre- and post-natal development	Rat	321450	F	35	2.36	2.7

Abbreviation: EFD: Embryofetal development

インスリン イコデク治療の一部として日本人被験者に投与される酢酸亜鉛の臨床用量（61 µg）は、FDA 非活性成分データベースに従った皮下投与での酢酸亜鉛の最大用量（2.3 mg）と比較して極めて低い。さらに、この用量は、亜鉛及び酢酸塩について設定された非経口 PDE をそれぞれ下回っている。

非臨床安全性試験において、酢酸亜鉛は使用したインスリン イコデクの投与液に含まれていた。これらの試験における曝露量比は 1.6～13 であった。酢酸亜鉛はこれらの試験における用量制限因子ではないと考えられた。また、注意すべきこととして、これらの試験は酢酸亜鉛の毒性を評価するために計画されたものではなく、これらの試験での用量制限因子はインスリン イコデクであった。

臨床用製剤の局所刺激性を、ミニブタを用いて評価したところ、反応は軽度であり、インスリン イコデクの溶媒及び滅菌等張食塩液の投与後に認められたものと類似していた。これに一致して、第 3 相試験データをプールした所見では、注射部位関連の副作用が報告されたインスリン イコデク投与被験者の比率（1.9%）は、1 日 1 回の Basal インスリン投与を受けた被験者の比率（1.7%）と同程度であった。

結論として、インスリン イコデクにおける 101 µg/mL の亜鉛（283 µg/mL 酢酸亜鉛）の使用は安全性に問題なく、添加剤として安全性が確認されていると考えられる。

また、インスリン イコデクの血糖降下作用に関連する変化以外には、インスリン イコデクの製剤処方に起因する全身毒性の徴候は認められなかった。したがって、インスリン イコデクの添加剤に毒性のリスクはないと判断する。

2.6.6.8.7　その他の試験

その他の試験はインスリン イコデクでは実施していない。しかしながら、インスリン イコデクに起因する所見を考慮し、HI を持続注入するラット試験を実施した[29]。

2.6.6.9　ヒトにおける曝露量との比較

重要な毒性試験における NOAEL での曝露量を日本人患者における平均臨床用量である 150 単位/週でのヒトにおける曝露量と比較した〔Modelling report (M 5.3.3.5)〕。曝露量（表 2.6.6-24）を定常状態での $C_{average}$（$AUC_{tau/tau}$）として表す。これは、動物種によって投与頻度が異なる場合に全身曝露量を比較するための正確な方法と考えられている。

NOAEL は、大部分の試験で検討した最高用量であり、血糖降下作用に対する忍容性により制限された。正常血糖を有する正常動物にインスリンを投与すると低血糖に関連する一般状態変化がみられることがよく知られているが、実臨床では血糖値がモニタリングされるため、この臨床的意義は限定的と考えられる。したがって、動物とヒトの曝露量比は小さいものの（表 2.6.6-24）、許容可能と考えられる。

表 2.6.6-24　　重要な毒性試験における NOAEL での動物とヒトの曝露量比

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

[a]$C_{average}$ = AUC_{tau}/tau e.g. "$AUC_{0\text{-}24h}$/24" in rats

[b]Exposure multiples calculated as: $C_{average}$ in animals/$C_{average}$ in human.

[c]Modelling report (M 5.3.3.5)

[d]Gestation day 17

[e]Lactation day 11

2.6.6.10　考察及び結論

インスリン イコデクは、ICH S6(R1)で定義され、最近 FDA より指定されたバイオテクノロジー応用医薬品とみなされている[1,2]。このため、インスリン イコデクの毒性プログラムは ICH S6(R1)ガイドライン、EMA ガイダンス「Points to consider document on the non-clinical assessment of the carcinogenic potential of insulin analogues」のほか、適切と判断される場合には ICH M3(R2)ガイドラインに従って計画しており[1,3,4]、SD 系ラットを用いた最長 52 週間の反復投与試験、ビーグル犬を用いた最長 26 週間の反復投与試験が含まれる。受胎能、生殖発生毒性の検討には、ICH S5(R3)ガイドラインに従ってラット及びウサギを用いた[5]。ラット、ウサギ及びイヌはインスリンに対して薬理学的反応性を示すため、インスリン イコデクの毒性試験に適した動物種であると考えられる。局所刺激性の検討にはウサギ及び（ミニ）ブタを用いた。

反復投与毒性プロファイル

反復投与毒性試験では、投与に関連する変化はいずれも、正常血糖を有する正常ラット及び正常イヌに投与した場合、正常範囲を超えて血糖値を低下させるというインスリン イコデクの薬理作用又はその二次的な影響に起因するものであった。

ラットを用いた試験

ラットでは、60 nmol/kg/日以上を投与した雄及び 40 nmol/kg/日以上を投与した雌で低血糖に起因する死亡が認められた。これと一致して、反復投与時の血糖降下作用は雄よりも雌で顕著であった。この差は HI を持続注入した場合にも認められており[29]、肝臓でのグルコース放出など代償性適応反応の性差に関連するものと考えられる[30,31]。HI（NPH インスリン）を対照としたラットの 52 週間試験では、40 nmol/kg/日投与群の雌雄で低血糖様の一般状態変化及び低血糖に起因する死亡が認められた。

30 nmol/kg/日以上を投与した雌及び 60 nmol/kg/日以上を投与した雄で体重増加促進、摂餌量、血漿中尿素及びナトリウムの増加ならびにトリグリセリドの低下が認められた。8 週間試験では、75 nmol/kg/日以上で軽度の AST の増加及び ALT の増加が認められた。投与後 52 週には 30 nmol/kg/日以上を投与した雌でクレアチニン増加、40 nmol/kg/日以上を投与した雄でリン及びマグネシウムの増加ならびにカリウムの低下が認められた。これらの変化はインスリンの血糖降下作用に対する代償作用と一致すると考えられ[32,33,34,35]、評価したところ完全な回復性を示した。その裏付けとして、ラットを用いた 52 週間試験でも HI の持続注入後[29]又は NPH インスリンの投与後に同程度の変化が認められたが、血漿中マグネシウム濃度の増加はみられなかった。

膵臓、坐骨／脛骨神経、骨格筋、副腎、褐色脂肪、骨髄、心筋及び精巣にインスリン イコデクの目的とする血糖降下作用又はその二次的な影響に関連すると考えられる病理組織学的変化が認められた。HI の 8 週間の持続注入後又は NPH インスリン（52 週間試験の対照群）の 52 週間の反復投与後にも膵臓、坐骨／脛骨神経、骨格筋、褐色脂肪、心筋及び精巣の変化が認められた。

膵臓では、8 週間試験の 25 nmol/kg/日投与群を除く全インスリン イコデク投与群で投与後 26 週まで膵島萎縮が認められた。52 週間試験では高用量群（40 nmol/kg/日投与群の雌及び 60 nmol/kg/日投与群の雄）で膵島萎縮が認められた。この変化は、低血糖値による内因性インスリンの分泌低下によるものと考えられ、HI の持続注入後にも認められている [29,33,36]。これと一致して、投与期間中は C-ペプチド分泌量も低下していた。

坐骨／脛骨神経では、20 nmol/kg/日以上を投与した動物で神経病変（脱神経）自体によるものと考えられる骨格筋の変性／壊死又は萎縮を伴う軸索変性が認められた。これらの変化は HI の持続注入後及び NPH インスリンの反復投与後にも認められており、他の研究で報告されたように、誘発された持続的な低血糖に関連するものと考えられる [29,37,38,39,40]。

8 週間試験において 75 nmol/kg/日以上を投与した雄で副腎皮質束状帯の空胞形成増加が認められた。この変化は、ストレス反応[41]又は低血糖値に対する適応反応に関連するグルココルチコイドの分泌増加によるものと考えられる[42]。

肝臓では、40 nmol/kg/日以上を投与した雌で投与後 26 週まで非染色部位の減少が認められた。これは、グリコーゲン量の減少、すなわち、インスリンの血糖降下作用に対するグリコーゲン分解の亢進を反映しているものと考えられ、肝臓重量減少の説明になる[43,44]。

褐色脂肪では、空胞形成の増大及び細胞サイズの増大が投与後 26 週まではインスリン イコデクのすべての用量で認められ、52 週間投与した雄では 40 nmol/kg/日以上で認められた。また、8 週間試験において 75 nmol/kg/日以上を投与した動物で骨髄の脂肪含量増加が認められた。いずれの変化も、脂肪細胞に対するインスリンの代謝作用によりグルコースの取り込みと脂肪の蓄積が促進されたことに起因するものと考えられ[45,46,47]、この変化は HI の持続注入後にも認められた [29]。

以上の変化はいずれも、投与の中止により完全又は部分的に消失した。

心臓では、20 nmol/kg/日以上を 52 週間投与した雌雄で心筋線維化が認められた。この所見は NPH インスリンを投与した雌でも認められているため、他の研究で報告されたように、インスリンの血糖降下作用に関連するものと考えられる[48]。

精巣では、60 nmol/kg/日を 52 週間投与した雄で精細管の変性／萎縮が認められた。NPH インスリンを投与した雄でも同様の変化が認められた。ラットにおける精巣の変化は低血糖に起因するものであるため[49,50]、インスリンの血糖降下作用に関連するものと考えられる。

ラットを用いたインスリン イコデクの反復投与試験、HI 持続注入試験、ラット 52 週間試験における NPH インスリン投与群における所見から、投与に関連する所見のパターンはいくつかの違いはあるものの（例えば、精巣の所見は 52 週間の投与後にのみ認められており、副腎及び骨髄の変化は高用量を用いたラット 8 週間試験のみで認められている）、一貫していると考えられる。これらの軽微な差は、試験期間、用量の設定及びインスリン イコデクと HI の作用の持続時間の差に関連するものと考えられる。

イヌを用いた試験

イヌを用いた試験で認められた変化は、いずれもインスリン イコデクの目的とする血糖降下作用又はその二次的な影響に関連するものと考えられた。認められた変化は、8 週間の投与後の低血糖様の一般状態変化、血糖値低下、内因性インスリン濃度低下、体重増加、残餌量減少、26 週間の投与後の肝臓の絶対重量及び相対重量の減少であった。これらの変化は 12/9 nmol/kg 以上の週 2 回投与で認められ、完全な回復性を示した。インスリン イコデクの投与に関連する病理組織学的変化は認められなかった。

結論として、健康な正常血糖ラット及びイヌを用いた反復投与試験により、認められた変化は血糖値を正常な生理学的範囲を下回るレベルまで低下させるインスリン イコデクの血糖降下作用又はその二次的な影響によるものであることが明らかにされた。同程度の変化は HI の持続注入又は NPH インスリンの反復投与でも認められており、文献でも報告されている。このように、非臨床プログラムではインスリン イコデクに関連する特有の変化は特定されなかった。

免疫原性

ラット及びイヌを用いた反復投与試験における抗インスリン イコデクの産生は試験の結果及び妥当性に影響を及ぼすものではないと判断される。

受胎能及び胚・胎児発生

ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験では、インスリン イコデクの投与により、交配前の雌雄において血糖値の低下、体重増加量及び摂餌量の増加など、目的とする薬理作用又はその二次的な影響と一致すると考えられる所見が認められた。予備試験では精巣上体重量の増加が認められた。しかしながら、この所見は他の試験では確認されなかったため、偶発的なものと判断された。母体毒性の徴候は認められず、受胎能、着床前胚損失、着床後胚損失、胎盤重量、胎児重量及び性比への影響も認められなかった。予備試験では、全投与群で多数の軽微な骨格異常（肋骨の短縮及び過剰形成、肋骨の内側性の肥厚／彎曲、骨化遅延／不完全骨化）の発生率が高かったが、用量-反応関係は認められなかった。さらに、1 匹において重大な骨格異常（長骨の彎曲／短小／肥厚）が認められた。これらの変化は、同じ高用量を用いた主試験では報告されなかったため、偶発的なもので、1 群あたりの動物数が少ないという予備試験のデザインに関連するものと考えられた。

ラットの主試験では、60 nmol/kg/日投与群で左臍動脈及び左葉の突出を伴う横隔膜菲薄化の発生率が対照群よりわずかに高かった。いずれの変化も背景データの範囲内であるため、偶発的なものと判断された。

結論として、ラットの受胎能又は胚・胎児発生にはインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

ウサギを用いた胚・胎児発生試験では、インスリン イコデクの投与により、血糖値の低下による低血糖様の一般状態変化及び数匹の安楽死、摂餌量の増加、予備試験における体重増加量の促進など、目的とする薬理作用又はそれによる影響と一致すると考えられる所見が認められた。

予備試験では、24 nmol/kg/日投与群の 1 匹及び対照群の 1 匹で流産がみられた。流産の前の摂餌量は極めて少なく、インスリン イコデク投与群では血糖値も低値であった。流産は、その原因となることが知られている摂餌量低下によるものと考えられ[51]、インスリン イコデク投与群では、低血糖値がさらに流産に寄与した可能性が高い。主試験では、投与終了後の妊娠 21 日及び 22 日に 18 nmol/kg/日投与群の 2 匹で流産がみられた。流産の前の摂餌量はやや少なく、1 匹では血糖値も低値であった。これらの変化が流産の一因となった可能性がある。しかしながら、摂餌量の減少は予備試験ほど顕著ではなく、これ自体は流産を誘発するほどのものではかったことから [51]、流産は、投与だけでなく、妊娠中の胎児の成長が著しく、母動物の代謝にストレスが加わる時期の投与の中止による母動物の代謝の変化に関連するものと考えられる[52]。その裏付けとして、ウサギにインスリン アスパルト、インスリン デテミルのほか、HI（NPH インスリン）を投与した場合にも妊娠期間中ほぼ同じ時点（妊娠 21 日又は 22 日）で高用量投与時の現象として流産がみられており、摂餌量への影響はないか限定的であった[53,54]。

ウサギを用いた主試験では、体重増加量、妊娠子宮重量、平均黄体数、着床数、着床前胚損失率、着床後胚損失率、吸収胚数、生存胎児数、性比、胎盤及び胎児重量にインスリン イコデクの影響はみられなかった。予備試験の 24 nmol/kg/日投与群では、部分的には着床前及び着床後胚損失率が高かったことにより平均着床数が対照群よりも少なかった。主試験で確認された通り、18 又は 12 nmol/kg/日投与群では影響は認められなかった。

予備試験の 18 nmol/kg/日投与群では、骨化遅延／不完全骨化／胸骨分節未骨化が認められた。全投与群で、用量との関連性はみられないものの、多数の軽微な頭蓋骨異常（縫合骨、亀裂及び過剰縫合）の発生率が高く、24 nmol/kg/日投与群の胎児 1 匹では重大な頭蓋骨異常（前頭隆起を伴う前頭骨の部分的癒合）が認められた。ラットでは、主試験でこれらの骨格異常は認められなかったため、見かけ上の増加は偶発的なもので、1 群あたりの動物数が少ないという予備試験のデザインに関連するものと考えられた。

主試験の 18 及び 12 nmol/kg/日投与群では、第 20 胸腰椎、複数の胸椎及び肋骨の異常の発生率が対照群よりやや高く、18 nmol/kg/日投与群では骨盤帯の片側尾側移動の発生率が対照群よりやや高かった。これらの所見は背景データの範囲内であったため、偶発的なものと判断された。主試験の 6 nmol/kg/日投与群では髄膜瘤を有する胎児 1 匹が認められた。他のインスリン イコデク投与群ではこのほかの頭部の異常が認められなかったため、偶発的なものと判断された。

結論として、ウサギの胚・胎児発生にはインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる影響は認められなかった。

出生前及び出生後の発生

ラットを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、20 nmol/kg/日（低用量）投与群及び35 nmol/kg/日（中用量）投与群で認められたインスリン イコデクの投与に関連すると考えられる変化は、血糖値低下のほか、哺育中の体重増加量が対照群よりもわずかに抑制されたことである。認められた変化は限定的で、F0 雌及び出生児に毒性の徴候が認められなかったため、いずれの影響も有害なものではないと判断された。50 nmol/kg/日投与群（高用量）では、F0 雌 4 匹を安楽死させた。安楽死の理由は、このうち 1 匹が分娩困難、1 匹が授乳初期の同腹児全死亡であった。いずれも背景データの範囲内であったため、偶発的なものであり、投与に関連するものではないと判断された。残る 2 匹の安楽死は哺育後期の同腹児全死亡又は血糖値 1.31 mmol/L により確認された重度の低血糖様の一般状態変化によるものであった。哺育後期の同腹児全死亡はまれである。このことと、高用量群の他の 5 腹で散発的な児の死亡が認められたことから、投与に関連するものと考えられる。別の母動物で認められた低血糖値及び関連する一般状態変化はインスリンの過剰な薬理作用と一致するため、投与に関連するものと判断された。妊娠中の F0 雌の平均体重増加量に投与の影響はみられなかった。一方、哺育 1～21 日の 50 nmol/kg/日投与群の F0 雌では、体重増加量が対照群の 2 分の 1 以上であった。哺育 14 日前後には対照群を含むすべての群で平均体重が減少した。哺育後期に児が安楽死又は死亡した 50 nmol/kg/日投与群の F0 雌 6 匹では、体重減少及び摂餌量の減少がより顕著であったが、同じ投与群の他の雌動物では平均体重減少量及び摂餌量は対照群と同程度であった。この F0 雌 6 匹において同じ投与群の他の雌動物に比べ摂餌量が少なく、体重減少が大きかった理由は不明であるが、おそらく、これらの雌動物は哺育後期の乳汁分泌に必要なエネルギー量の増加とインスリン イコデクの血糖降下作用に対する感受性が特に高かったと考えられる。

50 nmol/kg/日投与群の F0 雌 6 匹から出生した 19 匹/6 腹を哺育 15～18 日に活動性低下、振戦、筋緊張低下、部分的閉瞼、失調性歩行異常など低血糖様の一般状態変化により動物福祉の観点から安楽死させた。同腹児全死亡が 1 腹認められた。一般状態変化を認めた児の血糖値を測定したところ、疎データではあったものの、一般状態変化を認めない児と比較して約 40%低値であったが、一般状態変化は認められなかった。さらに、2 匹の死亡がみられた。いずれも哺育後期に著明な体重減少がみられた上記の F0 雌数匹から出生した児であった。哺育後期の出生児の一般状態変化及び死亡はまれであり、母動物へのインスリン イコデクの投与に関連するものと考えられる。母乳を介したインスリン イコデクの曝露が低血糖様の一般状態変化を引き起こす可能性は低いと考えられ、曝露量が低かった児は 2 匹（1 匹は 35 nmol/kg/日を投与した母動物の児、1 匹は 50 nmol/kg/日を投与した母動物の児）のみであったことからも裏付けられる。一方、出生児に一般状態変化がみられた F0 雌の体重減少は、出生児の体重増加量が抑制され、胃内に母乳がみられず、血糖値が低かったことから裏付けられるように、出生児の栄養不良を引き起こしたと考えられる。この栄養不良が一般状態変化や死亡につながった。その裏付けとして、授乳期の母動物の摂餌量を制限すると出生児の体重増加に影響を及ぼすことが明らかにされている[55]。出生児が哺育 18 日に少量の摂餌を開始したことにより、その後は栄養不良の影響が軽減された[56]。これに伴い、特に雄出生児の哺育 18～21 日の体重増加は、対照群の雄出生児よりも促進された。さらに、前述の低血糖様の一般状態変化を認めた F0 雌の全同腹児（8 匹）を母動物とともに安楽死させた。

このほかには、いずれの用量においても生存率、体重増加量、摂餌量、性成熟度、感覚検査への反応、交配までの期間、交配能及び受胎能など F1 動物の発達に対する母動物への投与の影響は認められなかった。

結論として、F1 動物に直接的な影響は認められなかったが、50 nmol/kg/日を投与した F0 雌 6 匹では、哺育後期に顕著な体重減少がみられ、出生児の栄養不良、一般状態変化及び死亡につながった。さらに、50 nmol/kg/日を投与した F0 雌 1 匹に低血糖様の一般状態変化が認められ、安楽死させた。これらの影響はインスリン イコデクの投与に関連するものと考えられる。インスリン治療全般及び妊娠・授乳期では特に血糖値や低血糖が大きく重視されるため、正常血糖を有する動物に投与した時のこれらの観察結果の臨床的意義は限定的と考えられる。35 nmol/kg/日以下では F0 動物及び F1 動物のいずれにおいても投与に関連する有害な変化は認められなかった。

遺伝毒性及びがん原性

インスリン イコデクの C_{20} 脂肪酸側鎖誘導体の *in silico* (Q)SAR 解析では、細菌変異原性は認められず、がん原性、染色体損傷又は遺伝毒性は警告されなかった。さらに、Ames スクリーニング試験では、インスリン イコデクは *in vitro* で遺伝毒性を誘発しなかった。したがって、ICH S6(R1)ガイドライン [1] に従い、インスリン イコデクについてはこれ以上の遺伝毒性試験は実施しなかった。

ICH S6 ガイドラインに従い、標準的な 2 年間のがん原性試験は実施しなかった [1]。しかしながら、インスリンは糖及び脂質代謝の調節、細胞増殖作用など複数の作用をもつホルモンとして広く知られていることから、SD 系ラットを用いた 52 週間毒性試験において、インスリン イコデクの *in vivo* におけるがん原性を詳細に検討した。さらに、包括的な *in vitro* 試験を実施した。

インスリン イコデクは、SD 系ラットを用いた 52 週間毒性試験における全動物のすべての器官の病理組織学的評価においてがん原性を示さなかった。雌動物の乳腺を特に重点を置いて評価したところ、対照群の雌又は HI（NPH インスリンとして）投与群の雌と比較して、インスリン イコデク群の雌では細胞過形成や良性又は悪性腫瘍の発生率の増加は認められなかった。乳腺腫瘍の発生率は対照群及び HI 群を含むすべての群で 42～44%であり、インスリン イコデクによる増加がみられるか否かを確認できる程度であった。また、試験終了時点での動物数は各群 34 匹以上であり、検討した用量は MTD に近いか、数例では MTD を超えていた。したがって、本試験はインスリン イコデクのがん原性について決定的な評価を下すうえで妥当と考えられる。非臨床での *in vivo* プログラムを通して、最長 26 週間投与したイヌ及び最長 52 週間投与したラットにおいて過形成又は腫瘍性病変の発生にインスリン イコデクの投与に関連する変化はみられなかった。

インスリン受容体及び IGF-1 受容体の受容体プロファイリング、インスリン受容体の細胞内シグナル伝達及び動態、主要なインスリン標的組織における代謝効果、ヒト由来腫瘍性細胞及び非腫瘍性細胞における細胞分裂促進作用など、インスリン イコデクの *in vitro* における総合的な特性解析により、インスリン イコデクの分子薬理学的プロファイルに懸念はないと結論することができる。インスリン

イコデクの細胞増殖能／代謝能の効力比はHIと同様であることから、インスリン イコデクの主な生物学的作用のバランスはHIと変わらないことが示唆される（M 2.6.2.2.1）。

結論として、インスリン イコデクの遺伝毒性は警告されず、がん原性はHIと同様であることが明らかにされた。

局所刺激性

ミニブタにおいて上市予定製剤の局所刺激性を評価した。組織反応は軽度で許容範囲内の炎症性変化であり、インスリン イコデクの溶媒及び滅菌等張食塩液の注射後に認められたものと同程度であった。

添加剤の評価

インスリン イコデクは安定剤として亜鉛（酢酸亜鉛中の亜鉛含量として）、安定剤及び防腐剤としてフェノール、防腐剤としてメタクレゾールを含有する製剤として処方され、等張化剤としてグリセロール（グリセリン）及び塩化ナトリウムが添加されている。これらの添加剤は、長期投与で承認されている他の医薬品で使用され、日本薬局方及び医薬品添加物規格に収載されている。さらにインスリン イコデクの目的とする血糖降下作用に関連する変化以外には、インスリン イコデクの製剤処方に起因する全身毒性の徴候は認められなかった。したがって、インスリン イコデクの添加剤に毒性のリスクはないと判断する。

全体的な結論

反復投与毒性、がん原性、受胎能、胚・胎児発生毒性及び局所刺激性を評価したインスリン イコデクの非臨床プログラムでは、正常血糖を有する動物への投与時の血糖値低下に関連する所見又はその二次的な影響が明らかとなったのみであった。最高用量での出生前及び出生後の発生に関する毒性試験では、一部のF0雌で顕著な体重減少が認められ、出生児の栄養不良、一般状態変化及び死亡につながった。インスリン治療全般及び妊娠・授乳期では特に血糖値や低血糖が大きく重視されるため、正常血糖を有する動物に投与した時のこれらの観察結果の臨床的意義は限定的と考えられる。したがって、低血糖の可能性を除き、ヒトの安全性に関して懸念される影響は認められなかった。

参考文献

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

[2] Food and Drug Administration. Code of Federal Registrations, 21 CFR Part 600. Definition of the Term “Biological Product”, Federal Register 2020; 85: 10057-10063. 2020.

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

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

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

[6] Harman SM, Talbert GB. Reproductive Aging. In: Finch CE, Scheider EL, eds. Handbook of the Biology of Aging. New York: Van-Nostrand Reinhold Co. 1985:457-510.

[7] Wise PM. The role of the hypothalamus in aging of the female reproductive system. J Steroid Biochem. 1987;27(4-6):713-9.

[8] Kacew S, Ruben Z, McConnell RF. Strain as a determinant factor in the differential responsiveness of rats to chemicals. Toxicologic Pathology. 1995;23(6):701-14.

[9] European Medicines Agency. Note for guidance on carcinogenic potential (CPMP/AWP/2877/00), Jul 2002.

[10] Bregman CL, Adler RR, Morton DG, Regan KS, Yano BL, Pathology SoT. Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the Society of Toxicologic Pathology (STP). Toxicol Pathol. 2003;31(2):252-3.

[11] Thybaud V, Kasper P, Sobol Z, Elhajouji A, Fellows M, Guerard M, et al. Genotoxicity assessment of peptide/protein-related biotherapeutics: points to consider before testing. Mutagenesis. 2016;31(4):375-84.

[12] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk M7(R1), Current step 4 version. 31 Mar 2017.

[13] Ishidate M, Jr., Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M, et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. Food Chem Toxicol. 1984;22(8):623-36.

[14] WHO Food Additives Series 40: Safety evaluation of certain food additives and contaminants. The Forty-ninth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 1998.

[15] European Medicines Agency. Guideline on non-clinical local tolerance testing of medicinal products (EMA/CHMP/SWP/2145/2000 Rev. 1). 22 Oct 2015.

[16] PQRI. Product Quality Research Institute. Safety Thresholds and Best Demonstrated Practices for Extractables and Leachables in Parenteral Drug Products (Intravenous, Subcutaneous, and Intramuscular), 28 October 2021. ISBN: 978-1-945584-30-5. 1-94.

[17] Ozempic® – FDA Approval Package Label, 2017.

[18] Xultophy® – FDA Approval Package Label, 2016.

[19] NovoLog® – FDA Approval Package Label, 2015.

[20] Levemir® – FDA Approval Package Label, 2012.

[21] Lantus® – FDA Approval Package Label, 2009.

[22] Toujeo®– FDA Approval Package Label, 2019.

[23] Humulin R U-500 – FDA Approved Label, 2016.

[24] U.S. Food and Drug Administration. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [internet] 2023.

[25] COMMISSION REGULATION (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives [Internet]. 2011.

[26] EFSA. NDA Panel. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. [Internet] ISBN:92-9199-014-0. 2006.

[27] ICH Harmonised Tripartite Guideline. ICH guideline Q3D (R1) on elemental impurities. 2019.

[28] ICH Harmonised Tripartite Guideline. ICH guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents. 2021.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[41] Frith CH, Botts S, Jokinen MP, Eighmy JJ, Hailey JR, Morgan SJ, et al. Non-proliferative lesions of the endocrine system in rats. In: Guides for Toxicologic Pathology. STP/ARP/AFIP, Washington DC. 2000;1-22.

[42] Leakey JEA, Seng JE, Allaben WT. Influence of body weight, diet, and stress on aging, survival and pathological endpoints in rodents: implications for toxicity testing and risk assessment. Regulatory Research Perspectives. 2004;4:1-29.

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

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

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

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

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

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

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

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

[51] Cappon GD, Fleeman TL, Chapin RE, Hurtt ME. Effects of feed restriction during organogenesis on embryo-fetal development in rabbit. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2005;74(5):424-30.

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

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

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

[55] Shirley B. The food intake of rats during pregnancy and lactation. Lab Anim Sci. 1984;34(2):169-72.

[56] Hanley TR, Jr., Watanabe PG. Measurement of solid feed consumption patterns in neonatal rats by 141Ce-radiolabeled microspheres. Toxicol Appl Pharmacol. 1985;77(3):496-500.

インスリン イコデク（遺伝子組換え）

2.6.7 毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
毒性試験の概要表 3
2.6.7.1 毒性試験の一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 8
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 10
2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧 18
2.6.7.5 単回投与毒性試験 19
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 20
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 24
2.6.7.7.A ラットを用いた 8 週間毒性試験及び 6 週間回復性試験（試験番号：211239） 24
2.6.7.7.B ラットを用いた 26 週間毒性試験及び 12 週間回復性試験（試験番号：213297） 38
2.6.7.7.C ラットを用いた 52 週間毒性試験 50
2.6.7.7.D イヌを用いた 8 週間毒性試験及び 6 週間回復性試験（試験番号：211240） 61
2.6.7.7.E イヌを用いた 26 週間毒性試験及び 12 週間回復性試験（試験番号：213222） 68
2.6.7.8 遺伝毒性試験：*in vitro* 75
2.6.7.9 遺伝毒性試験：*in vivo* 77
2.6.7.10 がん原性試験 77
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 78
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験：重要な試験 80
2.6.7.12.A Sprague-Dawley 系ラットを用いた皮下投与による受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験(試験番号：214143) 80
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験 87
2.6.7.13.A ニュージーランド白色種ウサギを用いた皮下投与による胚・胎児の発生に関する試験 87
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 93
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 99
2.6.7.16 局所刺激性 100
2.6.7.17 その他の毒性試験 102
2.6.7.17.A その他の毒性試験 102
2.6.7.17.B 不純物の規格限度値の評価 102

毒性試験の概要表

2.6.7.1 毒性試験の一覧表

Test Article: Insulin icodec

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (dose regimen)	Doses (nmol/kg[b])	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Single-Dose Toxicity No studies were performed[a]								
Repeat-Dose Toxicity								
4-week dose range finding	Rat, Sprague-Dawley	subcutaneous	4 weeks (Daily dosing)	0, 67.5, 135, 225/135	No	Novo Nordisk	210458	4.2.3.2-1
8-week study with a 6-week recovery period	Rat, Sprague-Dawley	subcutaneous	8 weeks (Daily dosing)	0, 25, 75, 150/100	Yes	Novo Nordisk	211239	4.2.3.2-2
26-week study with a 12-week recovery period	Rat, Sprague-Dawley	subcutaneous	26 weeks (Daily dosing)	0, 20, 40, 60 and in males only 80	Yes	[redacted]	213297	4.2.3.2-3
52-week study	Rat, Sprague-Dawley	subcutaneous	52 weeks (Daily dosing)	Insulin icodec Males: 0, 20, 40, 60 Females: 0, 20, 30, 40 NPH insulin Males and females 40	Yes	[redacted]	319122	4.2.3.2-4
Maximum tolerated dose (MTD) study	Dog Beagle	subcutaneous	4 weeks MTD-escalation	MTD escalation twice weekly	No	[redacted]	210459	4.2.3.2-6

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (dose regimen)	Doses (nmol/kg[b])	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
			+ 4 weeks Fixed dose (Daily and twice weekly)	10, 20, 30, 40 MTD escalation daily 3, 6, 9, 12 Fixed dose twice weekly 20 Fixed dose daily dosing; 6				
8-week study with a 6-week recovery period	Dog Beagle	subcutaneous	8 weeks	0, 7, 14, 21/18 twice weekly	Yes	[redacted]	211240	4.2.3.2-7
26-week study with a 12-week recovery period	Dog Beagle	subcutaneous	26 weeks	0, 6, 12/9, 18/12 twice weekly	Yes	[redacted]	213222	4.2.3.2-8
Genotoxicity								
Reverse Mutation (Ames)	NA	NA	NA	8, 40, 200, 1000, 5000 µg/plate	No	[redacted]	210457	4.2.3.3.1-1
Carcinogenicity								
No studies have been performed								
Reproductive and Developmental Toxicity								
Preliminary combined fertility and embryo-foetal development	Rat, Sprague-Dawley	subcutaneous	Females: 2 weeks prior to and throughout pairing, until and including Day 17 after mating; satellite	Females: 0, 20, 40, 60 (satellite only 40) Males: 0, 40, 60, 100	Yes	[redacted]	213427	4.2.3.5.1-1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (dose regimen)	Doses (nmol/kg[b])	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
			females until and including Day 19 after mating Males: 4 weeks prior to and throughout pairing, until termination of the females (Daily dosing)					
Combined fertility and embryo-foetal development	Rat, Sprague-Dawley	subcutaneous	Females: 2 weeks prior to and throughout pairing, until and including day 17 of gestation; satellite until and including day 19 of gestation Males: 4 weeks prior to and throughout pairing, until termination of the females (Daily dosing)	Females: 0, 10, 30, 60 Males: 0, 40, 60, 100	Yes	[redacted]	214143	4.2.3.5.1-2
Single-dose toxicokinetic study in non-pregnant animals	Rabbit, New Zealand White	subcutaneous	NA	10	Yes	[redacted]	213152	4.2.3.1-1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (dose regimen)	Doses (nmol/kg[b])	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Pilot study in non-pregnant animals	Rabbit, New Zealand White	subcutaneous	2 weeks (Daily dosing)	25, 35, 50	No	[redacted]	213337	4.2.3.2-5
Preliminary embryo-foetal development	Rabbit, New Zealand White	subcutaneous	Day 2-19 of gestation (Daily dosing)	0, 12, 18, 24	Yes	[redacted]	213525	4.2.3.5.2-1
Embryo-foetal development	Rabbit, New Zealand White	subcutaneous	Day 2-19 of gestation (Daily dosing)	0, 6, 12, 18	Yes	[redacted]	214091	4.2.3.5.2-2
Pre- and post-natal development	Rat, Sprague-Dawley	subcutaneous	Day 6 after mating to day 20 of lactation (Daily dosing)	0, 20, 35, 50 Lowered to 0, 10, 17.5, 25 from day 21 after mating up to and including day 2 of lactation	Yes	[redacted]	321450	4.2.3.5.3-1
Local Tolerance								
Local tolerance 2 and 5 days after injection	Rabbit, New Zealand White	intravenous	Single dose	60 nmol/injection	Yes	[redacted]	212218	4.2.3.6-2
Local tolerance 2, 7, 14 and 28 days after injection	Pig, LYD	subcutaneous	Single dose (x4)	420 nmol/injection site	Yes	[redacted]	211280	4.2.3.6-1
Local tolerance study after 13 weeks repeated and single subcutaneous dosing in minipigs	Minipig	subcutaneous	Repeated daily dosing for 13 weeks and single dose	126 nmol /injection site	Yes	[redacted]	319245	4.2.3.6-3

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing (dose regimen)	Doses (nmol/kg[b])	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Other Toxicity Studies *In silico* toxicity, Derek Nexus screening	NA	NA	NA	NA	No	[redacted]	322732	4.2.3.7.7-1

NA, non-applicable; LYD, cross breed Danish Landrace, Yorkshire and Duroc

a –These studies are replaced by Maximum Tolerable Dose/Dose Range Finding studies reported under repeat-dose toxicity (Study IDs 210458 and 210459).

b –XX/YY indicates that the dose was reduced during the study due to severe clinical signs of hypoglycaemia and/or hypoglycaemia-related mortality.

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Insulin icodec

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (nmol/kg[a])	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
4-week dose range finding	Rat, Sprague-Dawley	Daily s.c. dosing	0, 67.5, 135, 225/135	No	210458	4.2.3.2-1
8-week study with a 6-week recovery period	Rat, Sprague-Dawley	Daily s.c. dosing	0, 25, 75, 150/100	Yes	211239	4.2.3.2-2
26-week study with a 12-week recovery period	Rat, Sprague-Dawley	Daily s.c. dosing	0, 20, 40, 60, 80 (male only)	Yes	213297	4.2.3.2-3
52-week study	Rat, Sprague-Dawley	Daily s.c. dosing	Females: 0, 20, 30, 40 Males: 0, 20, 40, 60 NPH insulin males and females 40	yes	319122	4.2.3.2-4
Preliminary combined fertility and embryo-foetal development	Rat, Sprague-Dawley	Daily s.c. dosing	Females: 0, 20, 40, 60 Males: 0, 40, 60, 100	Yes	213427	4.2.3.5.1-1
Combined fertility and embryo-foetal development	Rat, Sprague-Dawley	Daily s.c. dosing	Females: 0, 10, 30, 60 Males: 0, 40, 60, 100	Yes	214143	4.2.3.5.1-2
Pre- and post-natal development	Rat, Sprague-Dawley	Daily s.c. dosing	0, 20, 35, 50 Lowered to 0, 10, 17.5, 25 from day 21 after mating to day 2 of lactation	Yes	321450	4.2.3.5.3-1
Single-dose toxicokinetic study in non-pregnant animals	Rabbit, New Zealand White	Daily s.c. dosing	10	Yes	213152	4.2.3.1-1

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (nmol/kg[a])	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
Pilot study in non-pregnant animals	Rabbit, New Zealand White	Daily s.c. dosing	25, 35, 50	No	213337	4.2.3.2-5
Preliminary embryo-foetal development	Rabbit, New Zealand White	Daily s.c. dosing	0, 12, 18, 24	Yes	213525	4.2.3.5.2-1
Embryo-foetal development	Rabbit, New Zealand White	Daily s.c. dosing	0, 6, 12, 18	Yes	214091	4.2.3.5.2-2
Maximum tolerated dose study	Dog, Beagle	Twice weekly and daily s.c. dosing	MTD escalation twice weekly 8.5, 17, 25.5, 34 MTD escalation daily 2.6, 5.1, 7.7, 10.2 Fixed dose twice weekly 17. Fixed dose daily 5.1	No	210459	4.2.3.2-6
8-week study with a 6-week recovery period	Dog, Beagle	Twice weekly s.c. dosing	0, 7, 14, 21/18	Yes	211240	4.2.3.2-7
26-week study with a 12-week recovery period	Dog, Beagle	Twice weekly s.c. dosing	0, 6, 12/9, 18/12	Yes	213222	4.2.3.2-8

a – XX/YY indicates that the dose was reduced during the study due to severe clinical signs of hypoglycaemia and/or hypoglycaemia-related mortality.

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Insulin icodec

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates					
4-week dose range finding	210458	rat	Daily dosing s.c. 6M+6F/dose	Dose (nmol/kg)[a]		75		150		250/150[b]	
				Day		1	28	1	28	1	28
				C_{max} (pmol/L)	Male	582,000	1,295,000	1,055,000	2,810,000	1,920,000	2,955,000
					Female	642,000	1,285,000	1,195,000	2,575,000	1,885,000	2,965,000
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	11,060,000	26,380,000	21,420,000	57,660,000	36,000,000	60,130,000
					Female	11,480,000	24,470,000	22,630,000	50,120,000	35,820,000	52,870,000
8-week study with a 6-week recovery period	211239	rat	Daily dosing s.c. 10M+10F/dose	Dose (nmol/kg)		25		75		150/100[c]	
				Day		1	56	1	52[d]	1	49[e]
				C_{max} (pmol/L)	Male	109,000	599,000	339,000	1,370,000	676,000	2,130,000
					Female	137,000	321,000	422,000	1,770,000	694,000	1,980,000
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	2,150,000	9,050,000	6,830,000	23,400,000	12,600,000	43,300,000
					Female	2,360,000	5,730,000	7,210,000	40,100,000	12,600,000	38,300,000

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates					
26-week study with a 12-week recovery period	213297	rat	Daily dosing s.c. 15M+15F/dose	Dose (nmol/kg)		20			40		
				Week		-1	13	26	-1	13	26
				C_{max} (pmol/L)	Male	82,800	175,000	210,000	194,000	397,000	392,000
					Female	75,600	180,000	170,000	153,000	532,000	445,000
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	1,430,000	3,490,000	4,340,000	3,250,000	8,520,000	8,920,000
					Female	1,340,000	3,600,000	3,290,000	2,730,000	7,800,000	8,000,000
				Dose (nmol/kg)		60			80		
				Week		-1	13	26	-1	13	26
				C_{max} (pmol/L)	Male	259,000	621,000	581,000	331,000	892,000	897,000
					Female	238,000	547,000	573,000	NA	NA	NA
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	4,750,000	12,700,000	12,500,000	5,680,000	17,800,000	18,600,000
					Female	4,210,000	12,000,000	12,400,000	NA	NA	NA

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates					
52-week Study	319122	rat	Daily dosing s.c. 20M+20F/dose	Dose (nmol/kg)		20			30		
				Day		1	169	351	1	169	351
				C_{max} (pmol/L)	Male	93,900	242,000	213,000	NA	NA	NA
					Female	99,900	201,000	187,000	155,000	399,000	262,000
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	1,800,000	5,310,000	4,580,000	NA	NA	NA
					Female	1,890,000	4,040,000	3,950,000	2,660,000	7,880,000	5,680,000
				Dose (nmol/kg)		40			60		
				Day		1	169	351	1	169	351
				C_{max} (pmol/L)	Male	182,000	594,000	434,000	331,000	993,000	1,520,000
					Female	230,000	521,000	484,000	NA	NA	NA
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	3,630,000	11,800,000	8,920,000	6,340,000	20,400,000	18,000,000
					Female	4,090,000	9,840,000	10,700,000	NA	NA	NA
				NPH insulin – NNC0121-0308							
				Dose (nmol/kg)		40					
				Day		1	169	351			
				C_{max} (pmol/L)	Male	2,650	25,100	22,300			
					Female	1,670	19,700	13,100			
				AUC_{last} (h×pmol/L)	Male	6,000	24,000	106,000			
					Female	4,000	8,000	53,000			
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	NA	162,000	106,000			
					Female	NA	NA	53,000			

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates								
TK Preliminary combined fertility and embryo-foetal development	213427	rat	Daily dosing s.c. 8M+8F/dose	Dose (nmol/kg)		20		40			60		100	
				Day		6	17	6	17	26	6	17	26	26
				C_{max} (pmol/L)	Male	NA	NA	NA	NA	404,000	NA	NA	688,000	1,020,000
					Female	174,000	127,000	350,000	317,000	NA	560,000	396,000	NA,	NA
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	NA	NA	NA	NA	7,530,000	NA	NA	13,600,000	21,200,000
					Female	3,100,000	2,260,000	6,860,000	4,870,000	NA	10,300,000	6,740,000	NA	NA
TK - Combined fertility and embryo-foetal development	214143	rat	Daily s.c. dosing 22M+22F/dose + 3F satellite animals	Dose (nmol/kg)		10		30		40	60		100	
				Day		6	17	6	17	24	6	17	24	24
				C_{max} (pmol/L)	Male	NA	NA	NA	NA	302,000	NA	NA	656,000	1,050,000
					Female	91,500	64,800	280,000	263,000	NA,	626,000	416,000	NA	NA
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	NA	NA	NA	NA	6,330,000	NA	NA	13,500,000	21,200,000
					Female	1,830,000	1,190,000	5,600,000	4,340,000	NA	12,800,000	7,240,000	NA	NA
Pre- and post natal development	321450	rat	Daily Dosing 15F/dose	Dose (nmol/kg)[f]		20			35			50		
				Day[g]		17	11		17	11		17	11	
				C_{max} (pmol/L)	Females	146,000	161,000		250,000	232,000		384,000	408,000	
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Females	2,730,000	2,940,000		4,700,000	4,370,000		7,320,000	7,330,000	
Single-dose toxicokinetic study in non-pregnant animals	213152	rabbit	s.c. dosing 5F/dose	Dose (nmol/kg)		10								
				Day		1								
				C_{max} (pmol/L)	Female	68,600 ± 5,260								
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Female	1,360,000 ± 101,000								

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates					
TK - Pilot study in non-pregnant animals	213337	rabbit	Daily s.c. dosing 4F/dose	Dose (nmol/kg)		25		35		50	
				Day		1	14	1	14	1	14
				C_{max} (pmol/L)	Female	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_{0-24h} (h×pmol/L)	Female	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
TK - Preliminary embryo-foetal development	213525	rabbit	Daily s.c. dosing 6F/dose	Dose (nmol/kg)		12		18		24	
				Day		2	19	2	19	2	19
				C_{max} (pmol/L)	Female	75,300	221,000	108,000	325,000	145,000	429,000
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Female	1,410,000	4,670,000	2,150,000	7,320,000	2,930,000	9,370,000
TK - Embryo-foetal development	214091	rabbit	Daily s.c. dosing 18F/dose	Dose (nmol/kg)		6		12		18	
				Day		6	19	6	19	6	19
				C_{max} (pmol/L)	Female	120,000	121,000	268,000	288,000	375,000	409,000
				AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	Female	2,290,000	2,590,000	5,600,000	6,020,000	7,640,000	8,370,000

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information	Parameter estimates							
Maximum tolerated dose study	210459	dog	Daily and twice weekly s.c. 1M+1F/group/ dosing	Phase	MTD escalation (twice weekly dosing)							
				Dose (nmol/kg)	10		20		30		40	
				Day	1	11	1	11	15	25	15	25
				C_{max} (pmol/L)	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
				Phase	MTD escalation (daily dosing)							
				Dose (nmol/kg)	3		6		9[h]		12[i]	
				Day	1	11	1	11	15	25	15	25
				C_{max} (pmol/L)	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	N/A
				$AUC_{0\text{-}24h}$ (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	N/A
			Twice weekly s.c. 3M + 3F/ group/dosing Daily s.c. 3M + 2F/ group/dosing	Phase	Fixed dose (twice weekly dosing)							
				Dose (nmol/kg)	20							
				Day	29 (naïve animals)[j]		29 (non-naïve animals)[k]		57			
				C_{max} (pmol/L)	152,000 ± 4,950		280,000 ± 37,000		232,000 ± 102,000			
				$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	2,520,000 ± 169,000		6, 080,000 ± 818,000		4,670,000 ± 2,020,000			
				Phase	Fixed dose (daily dosing)							
				Dose (nmol/kg)	6							
				Day	29 (naïve animal)[l]		29 (non-naïve animals)[k]		57			
				C_{max} (pmol/L)	47,600		121,000 ± 35,700		247,000 ± 69,000			
				$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	647,000		2,770,000 ± 861,000		5,360,000 ± 1,220,000			

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates					
8-week study with a 6-week recovery period	211240	dog	Twice weekly s.c. 3M+3F/dose main group + 2M + 2F/dose recovery group	Dose (nmol/kg)		7		14		21/18[m]	
				Day		1	53	1	53	1	53
				C_{max} (pmol/L)	Male	39,800 ± 3,660	66,400 ± 1,690	85,900 ± 6,400	140,000 ± 10,000	119,000 ± 13,300	195,000 ± 18,000
					Female	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_{0-24h} (h×pmol/L)	Male	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
					Female	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_{0-72h} (h×pmol/L)	Male	NC	NC	NC	7,630,000 ± 346,000	NC	10,300,000 ± 655,000
					Female	NC	NC	NC	13,500,000 ± 4,860,000	NC	17,000,000 ± 1,010,000

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates					
26-week study with a 12-week recovery period	213222	dog	Twice weekly s.c. 4M+4F/dose main group + 3M + 3F/dose recovery group only for the 12/9 and the 18/12 dose groups	Dose (nmol/kg)		6			12/9[n]		
				Day		1	88	190	1	88	190
				C_{max} (pmol/L)	Male	37,900 ± 7,320	66,900 ± 1,610	67,100 ± 6,770	78,300 ± 5,660	109,000 ± 17,000	113,000 ± 14,000
					Female	46,600 ± 4,570	79,400 ± 14,500	68,500 ± 13,200	113,000 ± 38,200	123,000 ± 20,100	116,000 ± 21,200
				AUC_{0-96h} (h×pmol/L)	Male	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
					Female	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
				AUC (h×pmol/L)	Male	3,950,000 ± 155,000	NC	NC	8,390,000 ± 1.060,000	NC	12,500,000 ± 2.470,000
					Female	4,410,000 ± 453,000	NC	NC	8,290,000 ± 888,000	NC	13,000,000 ± 6,370,000
				Dose (nmol/kg)		18/12[n]					
				Day		1		88		190	

Type of Study	Study ID	Species	Administration method and animal number	Parameter information		Parameter estimates		
				C_{max} (pmol/L)	Male	119,000 ± 6,230	154,000 ± 18,100	155,000 ± 23,100
					Female	143,000 ± 29,900	182,000 ± 58,200	170,000 ± 38,200
				$AUC_{0\text{-}96h}$ (h×pmol/L)	Male	8,110,000 ± 353,000	10,500,000 ± 1,930,000	11,000,000 ± 2,090,000
					Female	8,960,000 ± 870,000	12,400,000 ± 5,380,000	11,400,000 ± 2,850,000
				AUC (h×pmol/L)	Male	11,900,000 ± 695,000	NC	14,900,000 ± 881,000
					Female	12,200,000 ± 951,000	NC	19,900,000 ± 8.260,000

NC, not calculated. N/A, not applicable ±SD (Standard deviation)

a – The target dose levels were 0, 75, 150 and 250/150 nmol/kg/day were used for toxicokinetic calculations. In error, a concentration factor of 1.89 (instead of the correct 1.7) was used for dose formulation preparation. This error was not discovered before after end of dosing and therefor the dose levels were corrected to 0, 67.5, 135, 225/135 nmol/kg/day. This was considered to have no consequences for the calculated TK parameters.

b – The dose level was reduced from 250 (corrected 225) to 150 (corrected 135) nmol/kg/day from Day 9 and onwards due to measurement of very low blood glucose levels.

c –The dose level was reduced from 150 to 100 nmol/kg/day on Day 28 and onwards due to hypoglycaemia-related mortality, two high dose animals.

d – Main study animals dosed 75 nmol/kg/day were pre-schedule sacrificed (Day 52) due to clinical signs of hypoglycaemia and hypoglycaemic-related mortality. Corresponding TK/recovery animals initiated the 6-weeks recovery period at this point.

e – Main study animals dosed 150/100 nmol/kg/day were pre-schedule sacrificed (Day 49) due to clinical signs of hypoglycaemia and hypoglycaemic-related mortality. Corresponding TK/recovery animals initiated the 6-weeks recovery period at this point.

f – The dose level was lowered from 20, 35 and 50 nmol/kg to 10, 17.5 and 25 nmol/kg from Day 21 after mating to Day 2 of lactation.

g – Day 17 corresponds to Day 17 after mating and Day 11 to day 11 of lactation.

h – For animals dosed 9 nmol/kg/day, dosing was pre-schedule terminated after the 11th dose (from Day 26) exceeding the MTD observing very low plasma glucose concentrations (pre-feeding Day 25).

i – For animals dosed 12 nmol/kg/day, dosing was pre-schedule terminated after the 8th dose (from Day 23) exceeding the MTD observing clinical signs of hypoglycaemia or very low plasma glucose concentrations (pre-feeding).

j – One male and one female

k – Two males and two females dosed in the MTD phase

l – One male

m – The dose level was reduced from 21 to 18 nmol/kg/twice weekly on Day 33 due to adverse clinical signs of hypoglycaemia (e.g. abnormal gait, trembling,) confirmed by very low plasma glucose levels (~ 2 mmol/L).

n – The dose level was reduced from 12 to 9 nmol/kg/twice weekly and 18 to 12 nmol/kg/twice weekly on Day 25 due to adverse clinical signs of hypoglycaemia (e.g. abnormal gait, trembling,) confirmed by very low plasma glucose levels (~ 2 mmol/L).

2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Insulin icodec

Type of study	Study ID	Drug substance batch number	Drug product batch number	HMWP (%)	Purity (%)	Specified impurities (%)			
						Hydrophilic impurities	Hydrophilic related	Hydrophobic related	Hydrophobic impurities
Ames genotoxicity study	210457	[redacted]							
4-week DRF rat	210458								
8-week rat	211239								
26-week rat	213297								
52-week rat	319122								
MTD dog	210459								
8-week dog	211240								
26-week dog	213222								
Preliminary combined fertility and embryo-foetal toxicity rat	213427								
Combined fertility and embryo-foetal toxicity rat	214143								
Single dose TK in rabbit	213152								
Tolerability study rabbit	213337								
Preliminary embryo-foetal development in rabbits	213525								
Embryo-foetal development in rabbits	214091								

Type of study	Study ID	Drug substance batch number	Drug product batch number	HMWP (%)	Purity (%)	Specified impurities (%)			
						Hydrophilic impurities	Hydrophilic related	Hydrophobic related	Hydrophobic impurities
Pre- and post-natal development in rats	321450	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]			
Local tolerance in rabbit (i.v.)	212218								
Local tolerance in pigs (s.c.)	211280								
Local tolerance in minipigs (s.c)	319245								

Note: Purity, HMWP and Specified impurity levels (%) from Drug Product batch certificates.
- : value not reported

[redacted]

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Insulin icodec

Single-dose toxicity studies will not be performed, since dose-ranging studies defining the maximum tolerable dose levels have been performed in the general toxicity species.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: Insulin icodec

Species/ Strain	Method of Administration Formulation/vehicle	Duration of Dosing	Doses (nmol/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study ID
Rat/Sprague-Dawley	Subcutaneous [stock solution] and vehicle: [insulin icodec 0-225 nmol/mL and zinc acetate 0-166 µM] in a vehicle of Glycerol 1.6%, sodium chloride 20 mM, phenol 17 mM, cresol 20 mM, pH 7.4	DRF 4 weeks	Daily: 0, 67.5, 135, 225/135[a]	6 males + 6 females	NA	The high dose 225 nmol/kg was reduced to 135 nmol/kg on study day 9 due to measurement of very low blood glucose levels. Decreased absolute and/or relative liver weight was seen in males and females. At microscopy, atrophy of pancreatic islets and decreased hepatocellular rarefaction were observed. Minor inflammatory injection site reactions related to the injection procedure and/vehicle were seen in all dose groups. Except for injection site reaction, all changes were considered related to the pharmacological action of insulin icodec. **In conclusion**, daily dosing of insulin icodec up to 135 nmol/kg/day was well tolerated for 4 weeks.	210458

Species/ Strain	Method of Administration Formulation/vehicle	Duration of Dosing	Doses (nmol/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study ID
Rabbit/New Zealand White	Subcutaneous [stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µg/mL], phenol 2.35 mg/ml, m-cresol 2.70 mg/ml, NaCl 1.17 mg/ml, glycerol 16 mg/ml, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting a dose formulation with a concentration of insulin icodec 40 nmol/mL and zinc acetate 1.96 µg/mL, phenol 0.0224 mg/mL, m-cresol 0.0257 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.79 mg/mL, pH 7.4	Single dose	10	5 females	NA	The single subcutaneous injection followed by a 14-day observation period was well tolerated and not associated with any treatment related clinical signs. Evaluation of the toxicokinetic samples clearly showed systemic exposure in all dosed animals, with plasma concentrations returning to LLOQ after 168 hours. The t_{max} was observed to be in the range of 8-12 hours post dosing. The terminal half-life ($t_{½}$) ranged between 23 and 28 hours. There was no evidence of treatment related macroscopic signs following a single dose administration. **In conclusion**, based on $t_{½}$, daily dosing is expected to cause high accumulation ratios, but give higher SS levels than twice weekly dosing. Once daily dosing was therefore used in the subsequent rabbit studies.	213152

Species/ Strain	Method of Administration Formulation/vehicle	Duration of Dosing	Doses (nmol/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study ID
Rabbit/New Zealand White	Subcutaneous [stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µg/mL], phenol 2.35 mg/ml, m-cresol 2.70 mg/ml, NaCl 1.17 mg/ml, glycerol 16 mg/ml, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting a dose formulation with concentration ranges of insulin icodec 0-200 nmol/mL and zinc acetate 0-9.810 µg/mL, phenol 0.0560-0.1119 mg/mL, m-cresol 0.0643-0.1286 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.76-20.88 mg/mL, pH 7.4	MTD 2 weeks	Daily: 25, 35, 50	4 females/group	NA	Administration of insulin icodec resulted in an increased body weight and food consumption and a constant lowering of blood glucose levels. There were no adverse findings at 25 nmol/kg/day but at doses of 35 and 50 nmol/kg/day, one animal at each dose level showed clinical signs of hypoglycaemia leading to their premature death. **In conclusion**, for the subsequent preliminary embryo-foetal development study, a dose level up to 25 nmol/kg/day is considered appropriate for the high dose group.	213337

Species/ Strain	Method of Administration Formulation/vehicle	Duration of Dosing	Doses (nmol/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL	Noteworthy Findings	Study ID
Dog/Beagle	Subcutaneous [stock solution] and vehicle: [insulin icodec 25.5-340 nmol/mL[b] zinc acetate 0-266 µM] in a vehicle of glycerol 1.6%, sodium chloride 20 mM, phenol 17 mM and cresol 20 mM, pH 7.4	MTD escalation: 2 weeks at each dose level[c] Fixed dose: 4 weeks	Twice weekly: 8.5, 17, 25.5, 34, Daily: 2.6, 5.1, 7.7[c], 10.2[e] Twice weekly: 17 Daily: 5.1	2 groups of 1 male + 1 female 2 groups of 1 male + 1 female 3[f] males + 3[f] females 3[f] males + 2 females	NA	Clinical signs of hypoglycaemia were seen at 10.2 nmol/kg/day and at 34 nmol/kg twice weekly. At 7.7 nmol/kg/day and 25.5 nmol/kg twice weekly very low blood glucose levels were observed. In the MTD escalation phase dosing with 7.7 and 10.2 nmol/kg/day was stopped after 11 or 8 days of dosing, respectively. At microscopy, mild subcutaneous focal necrosis, accumulation of neutrophils and mononuclear cells, focal accumulation of fibroblasts/fibrosis and haemorrhage were seen at the injection sites. No signs of systemic toxicity were observed. **In conclusion**, twice weekly dosing of 17 nmol/kg or daily dosing of 5.1 nmol/kg was well tolerated for 4 weeks. Based on plasma glucose concentrations and less accumulation of insulin icodec, twice weekly dosing regimen in dogs is considered more tolerable than daily administration.	210459

a –The dose level was reduced from 225 to 135 nmol/kg/day from Day 9 and onwards due to measurement of very low blood glucose levels. The dose levels given are potency corrected.

b – The dose levels given are potency corrected.

c – Dosing for 14 days in a daily or a twice weekly dosing regimen at each dose-step. No treatment-free period was allowed between doses or phases. Twice weekly dosing: one group dosed 8.5 nmol/kg followed by 34 nmol/kg and one group dosed 17.5 nmol/kg followed by 22.5 nmol/kg. Daily dosing. one group dosed 2.6 nmol/kg followed by 10.2 nmol/kg and one group dosed 5.1 nmol/kg followed by 7.7 nmol/kg.

d – For animals dosed 7.7 nmol/kg/day, dosing was pre-scheduled terminated after the 11th dose (from Day 26) exceeding the MTD observing very low plasma glucose concentrations (pre-feeding Day 25).

e – For animals dosed 10.2 nmol/kg/day, dosing was pre-schedule terminated after the 8th dose (from Day 23) exceeding the MTD observing clinical signs of hypoglycaemia or very low plasma glucose concentrations (pre-feeding).

f – Animals from MTD escalation phase + one naïve animal.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Test Article: Insulin icodec

2.6.7.7.A ラットを用いた 8 週間毒性試験及び 6 週間回復性試験（試験番号：211239）

Report Title: NNC 0148-0000-0287: 8-weeks daily subcutaneous toxicity study in rats with toxicokinetics and 6 weeks recovery

Study ID: 211239

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** 8 weeks daily	**Location in CTD:** 4.2.3.2-2
Initial Age: 7-8 weeks at initiation of dosing	**Duration of Recovery:** 6 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous	
	Formulation/vehicle: [stock solution] and vehicle: [insulin icodec 250 nmol/mL and zinc acetate 12.3 µg/mL], phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, NaCl 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/mL, pH 7.4 diluted with vehicle for insulin icodec.	

Parameters collected:

Body weight, food consumption, clinical observations, ophthalmoscopy, haematology, coagulation, clinical chemistry, toxicokinetics, urinalysis, organ weight, macroscopy, histopathology

Special Features: Blood glucose profiling, C-peptide, antibodies towards insulin icodec

No Observed Adverse-Effect Level: 100 nmol/kg body weight.

Brief conclusion:

It is concluded that daily subcutaneous administration of insulin icodec to Sprague-Dawley rats at doses up to 150/100 nmol/kg/day induced changes consistent with the intended pharmacological action in lowering blood glucose or subsequent hereto, or an exaggerated pharmacological effect leading to clinical signs of hypoglycaemia and related mortality in female rats at doses ≥75 nmol/kg/day. The observed changes included decrease in blood glucose and C-peptide and increased body weight and food consumption, decreased liver weight and histopathological changes in pancreas, liver, sciatic nerve, skeletal muscle, brown fat, adrenal glands and bone marrow. In the study report, based on the muscle changes, which at time of reporting was considered adverse as the mechanism behind the finding was not clear, a NOAEL of 25 nmol/kg/day was established. However, as all effects including the muscle changes are considered related to the intended pharmacological action or subsequent hereto, the NOAEL is considered to be 100 nmol/kg/day. Plasma glucose was decreased and changes in brown fat were observed at 25 nmol/kg/day and above, hence the NOEL is below 25 nmol/kg/day.

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Number of animals								
Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Day of termination – main study[bc]	58-60	58-60	58-60	58-60	52[b]	52[b]	49[c]	49-50[c]
Recovery	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Day for starting the recovery period	57	57	57	57	53	53	50	50
Day of termination - Recovery[bc]	99-100	99-100	99-100	99-100	94	94	91	91
Toxicokinetics (Recovery animals)								
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L) Day 1	NA	NA	2,150,000	2,360,000	6,830,000	7,210,000	12,600,000	12,600,000
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L) Day last (56/ 52/ 49)	NA	NA	9,050,000	5,730,000	23,400,000	40,100,000	43,300,000	38,300,000
C_{max} (pmol/L) Day 1	NA	NA	109,000	137,000	339,000	422,000	676,000	694,000
C_{max} (pmol/L) Day (last)	NA	NA	599,000	321,000	1,370,000	1,770,000	2,130,000	1,980,000
t_{max} (h) Day 1	NA	NA	8	8	8	8	8	8
t_{max} (h) Day (last)	NA	NA	0	0	4	24	8	0
Noteworthy Findings								
Mortality (Main and recovery animals)								
Hypoglycaemia related mortality[d]								
Main animals	N/A	N/A	-	-	-	1	-	2
Recovery animals	-	-	-	-	-	1	-	4
Animals dead/sacrificed for other reasons								
Main animals	-	-	-	-	-	-	-	-
Recovery animals	-	-	-	-	1[e]	-	-	-
Clinical signs of hypoglycaemia (Main and recovery animals)								
Number of animals with hypoglycaemia	N/A	N/A	-	-	-	1	-	1

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Other clinical signs (Main and recovery animals)								
Injection site reactions, number of animals with wounds								
Main and recovery animals								
Week 1-4	9	13	11	17	12	15	10	14
Week 5-8	6	8	7	7	7	12	7	8
Recovery animals	1	1	1	1	1	0	0	0
Body weight gain (g/animal/day)								
Main animals								
Day -1 – 49	3.91	1.82	4.36	1.99	4.09	1.87	4.10	2.05
Day -1 – 56[f]	3.69	1.68	4.03	1.85	NA	NA	NA	NA
Recovery animals								
Recovery period[g]	1.72	0.76	1.70	0.75	1.96	0.31	1.15	-0.09
Body weight (g)								
Main animals								
Day 24	412.8	251.2	435.6	258.3	406.6	251.3	442.2	278.1
Day 49	475.9	281.6	508.5	290.8	478.3	273.4	488.2	288.6
Recovery animals								
Day 59	486.4	276.4	485.7	280.9	505.6	270.4	490.3	243.3*
Day 91	547.6	300.5	545.1	306.8	579.3	296.7	549.0	258.3**
Food consumption (g/animal/day)								
Main study animals								
Day -1-49	25.0	16.0	25.9	15.5	25.2	17.0	25.8	20.2
Day -1-56[f]	25.7	16.5	26.6	16.1	NA	NA	NA	NA
Recovery animals								
Recovery period[g]	25.2	16.5	25.0	16.3	25.6	16.4	24.5	14.4
Ophthalmoscopy (Main and recovery animals)								
Week 7 or 8	-	-	-	-	-	-	-	-

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Blood glucose (mmol/L) (Recovery animals):								
Day 1								
Pre-dose	7.51	7.51	6.99	8.02	7.46	8.43	7.31	7.78
4 hours	7.82	8.02	7.80	7.80	6.92	6.79*	6.84	5.85**
8 hours	7.30	7.47	7.45	6.59	6.35	5.96**	6.33	4.38***
24 hours	7.77	7.49	7.25	7.82	7.25	6.35	6.48**	4.54***
Last day of dosing[h]								
4 hours	7.33	6.51	7.59	7.14	6.28	4.60	5.67	3.37
8 hours	7.16	7.24	8.17	5.92*	9.66[i]	4.46[i]	5.26	3.09
24 hours	8.45	7.81	7.75	7.86	7.66	5.77	5.66	4.47
48 hours	7.39	7.26	7.43	7.27	7.59	6.03	7.69	7.52
96 hours	7.37	6.97	7.20	7.43	7.15	6.57	10.56	5.11
144 hours	7.44	7.08	6.79	7.01	7.32	7.12	7.75	6.23
168 hours	7.33	7.44	7.16	6.96	7.56	6.48	8.19	7.87
C-peptide (pmol/L) (Recovery animals)[k]								
Pre-dose Day 1	1033.7	732.7	903.0	729.7	894.0	692.3	1055.0	485.7
4 hours after dosing Day 1	834.7	487.3	515.0	395.7	261.0	179.3	206.0	34.0
Day 7 of recovery	1069.8	644.4	833.8	531.5	795.8	291.3	1102.2	437.5
Haematology (End of dosing – Main animals)[h]								
Mean cell haemoglobin (fmol)	1.09	1.17	1.13*	1.19*	1.11	1.19	1.15	1.21
Mean cell haemoglobin concentration (mmol/L)	20.17	20.92	20.55*	21.11	20.32	21.00	20.56	20.85
White blood cells (10^9/L)	6.90	4.90	6.80	4.34	3.91	2.42	8.25	3.31
Lymphocytes (10^9/L)	5.55	4.10	5.43	3.60	3.07	1.80	6.99	2.47
Neutrophiles (10^9/L)	1.10	0.61	1.15	0.59	0.72	0.49	0.97	0.66

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Haematology (End of recovery – Recovery animals)[i]								
Mean cell haemoglobin (fmol)	1.11	1.19	1.10	1.18	1.09	1.19	1.11	1.18
Mean cell haemoglobin concentration (mmol/L)	20.52	20.84	20.40	20.89	20.53	20.94	20.44	21.35
White blood cells (10^9/L)	7.62	4.15	8.02	4.25	7.17	5.35	7.64	4.11
Lymphocytes (10^9/L)	6.27	3.47	6.62	3.37	5.73	4.51	5.78	3.42
Neutrophiles (10^9/L)	1.05	0.53	1.11	0.71	1.15	0.64	1.47	0.49
Blood chemistry (End of dosing – Main animals)[h]								
Aspartate transaminase (U/L)	76.8	86.3	81.6	96.3	97.3	119.0	96.1	177.6
Alanine transaminase (U/L)	55.4	58.2	62.3	61.3	57.5	49.9	54.1	90.9
Alkaline phosphatase (U/L)	155.9	84.0	154.6	109.6*	147.5	104.1	139.9	84.4
Creatinine kinase CK (U/L)	167	144	199	152	197	224	186	154
Triglycerides (mmol/L)	1.27	0.77	1.10	0.57	0.58	0.51	0.72	0.97
Glucose (mmol/mL)	10.76	10.13	10.77	8.92	6.98	11.23	5.28	2.44
Blood chemistry (End of recovery – Recovery animals)[h]								
Aspartate transaminase (U/L)	86.6	120.0	86.9	119.2	88.6	104.8	82.5	91.5
Alanine transaminase (U/L)	62.8	84.5	65.1	76.8	60.2	66.6	62.8[j]	65.7
Alkaline phosphatase (U/L)	126.1	91.0	146.2	105.8*	125.1	97.0	133.1[j]	130.7
Creatinine kinase CK (U/L)	149	125	152	127	169	144	181	137
Triglycerides (mmol/L)	1.24	1.12	1.40	0.93	1.19	1.09	1.12	0.79
Glucose (mmol/mL)	11.13	10.04	10.29	9.92	11.02	9.97	10.92	9.30
Urinalysis (Last week of dosing – Main animals)								
Volume (mL)	3.9	2.0	3.5	1.8	5.5	5.2*	ND	ND
Urinalysis (after one week of recovery – Recovery animals)								
Volume (mL)	3.4	3.4	5.8	4.3	5.8	3.8	5.2	1.8

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Antidrug antibody								
No. of positive/total animals (End of dosing – Main animals)	1/20		15/20		9/18		13/17	
No. of positive/total animals (End of recovery – Recovery animals)	0/20		11/20		16/18		15/16	
Organ weights (End of dosing – Main animals)[h]								
Liver – Absolute (mg)	14602	8705	14608	8579	12680	7751	13483	8433
Liver –Relative (% of body weight)	2.94	3.04	2.80	2.89	2.63	2.98	2.77	2.92
Prostate – Absolute (mg)	1248	NA	1378	NA	1360	NA	1508	NA
Prostate – Relative (% of body weight)	0.257	NA	0.262	NA	0.286	NA	0.310	NA
Ovaries – Absolute (mg)	NA	96.9	NA	110.0	NA	99.6	NA	124.3
Ovaries – Relative (% of body weight)	NA	0.0339	NA	0.0367	NA	0.0385	NA	0.0432
Spleen – Absolute (mg)	736	556	737	581	619	515	678	453
Spleen – Relative (% of body weight)	0.150	0.194	0.141	0.195	0.130	0.198	0.139	0.157
Kidneys – Absolute (mg)	3113	1783	3037	1847	2800	1773	2765	1838
Kidneys – Relative (% of body weight)	0.628	0.623	0.582	0.622	0.583	0.690	0.567	0.639
Organ weights (End of recovery – Recovery animals)								
Liver – Absolute (mg)	15120	9307	15883	9152	15655	9259	14809	8247
Liver –Relative (% of body weight)	2.73	3.10	2.90	2.99	2.70	3.17	2.75	3.20
Prostate – Absolute (mg)	1497	NA	1512	NA	1399	NA	1535	NA
Prostate – Relative (% of body weight)	0.274	NA	0.278	NA	0.243	NA	0.288	NA
Ovaries – Absolute (mg)	NA	97.5	NA	95.9	NA	98.6	NA	94.1
Ovaries – Relative (% of body weight)	NA	0.0322	NA	0.0313	NA	0.0342	NA	0.0365
Spleen – Absolute (mg)	704	533	718	523	700	560	720	504
Spleen – Relative (% of body weight)	0.128	0.177	0.131	0.171	0.122	0.191	0.134	0.195
Kidneys – Absolute (mg)	3156	1808	3046	1804	3152	1806	2999	1759
Kidneys – Relative (% of body weight)	0.575	0.600	0.557	0.591	0.545	0.618	0.561	0.681

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Macroscopy (End of dosing – Main animals)[l]								
Injection Site, multiple doses[m]								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	9(1)	10	8(2)
Ulcer	0	4	1	1	0	0	0	0
Stomach – discoloration dark								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	9(1)	10	8(2)
Total	0	0	0	0	0	(1)	0	0
Thymus – discoloration red								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	9(1)	10	8(2)
Total	0	0	0	0	0	0	0	(1)
Lungs – discoloration red								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	9(1)	10	8(2)
Total	0	0	0	0	0	0	0	(1)
Macroscopy (End of recovery - Recovery animals)[l]								
Injection site, multiple doses[m]								
Number of animals examined	10	10	10	10	9(1)	9(1)	10	6(4)
Adrenal – enlarged								
Number of animals examined	10	10	10	10	9(1)	9(1)	10	6(4)
Total	0	0	0	0	(1)	0	0	(1)
Stomach – discoloration red								
Number of animals examined	10	10	10	10	9(1)	9(1)	10	6(4)
Total	0	0	0	0	(1)	(1)	0	(1)
Thymus – discoloration dark								
Number of animals examined	10	10	10	10	9(1)	9(1)	10	6(4)
Total	0	0	0	0	0	0	0	(1)
Lungs – discoloration red								
Number of animals examined	10	10	10	10	9(1)	9(1)	10	6(4)
Total	0	0	0	0	0	0	0	(3)

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Microscopy (End of dosing – Main animals)[l]								
Pancreas – Islet atrophy								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	9	10	8(1)
Minimal	0	0	0	0	1	1	2	0
Slight	0	0	0	0	1	2	3	0
Moderate	0	0	0	0	1	6	2	8(1)
Total	0	0	0	0	3	9	7	8(1)
Liver – Decreased rarefaction								
Number of animals examined	10	10	10	9	10	9(1)	10	8(2)
Total	0	0	0	0	0	4(1)	0	1(2)
Sciatic nerve – Axonal degeneration								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	8(1)	10	8(2)
Minimal	0	0	0	0	0	2(1)	7	4(2)
Slight	0	0	0	0	0	4	0	3
Total	0	0	0	0	0	6 (1)	7	7(2)
Skeletal muscle								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	8(1)	10	8(2)
Myofiber degeneration/necrosis								
Minimal	1	0	0	0	0	4(1)	5	5(1)
Slight	0	0	0	0	0	1	0	1(1)
Total	1	0	0	0	0	5(1)	5	6(2)
Myofiber atrophy								
Minimal	0	0	0	0	0	2(1)	6	4
Slight	0	0	0	0	0	4	1	4(2)
Total	0	0	0	0	0	6(1)	7	8(2)
Bone marrow, sternum – Increased fat content								
Number of animals examined	10	10	10	10	9	9(1)	10	8(2)
Minimal	0	2	0	3	0	1	0	4

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Slight	0	0	0	0	0	1	0	3(1)
Total	0	2	0	3	0	2	0	8
Bone marrow, femur – Increased fat content								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	8(1)	10	8(2)
Minimal	0	0	0	0	0	2	0	7(2)
Total	0	0	0	0	0	2	0	7(2)
Brown fat – Increased vacuolar/cellular size								
Number of animals examined	10	10	1	10	0	9(1)	10	8(2)
Minimal	0	0	0	2	0	2	0	0
Slight	0	0	0	0	0	3	0	7(1)
Moderate	0	0	0	0	0	(1)	0	1(1)
Total	0	0	0	2	0	5(1)	0	8(2)
Adrenal glands – Increased vacuolation, zona fasciculata								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	9(1)	10	8(2)
Minimal	1	0	0	0	0	(1)	5	0
Slight	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	2	0	0	0	0	(1)	5	0
Spleen – Decreased number of lymphocytes, marginal zone								
Number of animals examined	10	10	10	10	10	9(1)	10	8(2)
Minimal	0	0	0	0	0	(1)	0	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	(1)
Marked	0	0	0	0	0	0	0	(1)
Total	0	0	0	0	0	(1)	0	2(2)
Injection Site, multiple doses[m]								
Number of animals examined:	10	10	10	10	10	9(1)	10	8(2)
Inflammatory cell infiltration, dermis	4	2	1	0	0	0	0	0

Compound	Vehicle		Insulin icodec					
Daily Dose (nmol/kg)	0 (Control)		25		75		150 / 100[a]	
Group no.	1M	1F	2M	2F	3M	3F	4M	4F
Minimal	4	2	1	0	0	0	0	0
Total	4	2	1	0	0	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, sc.								
Minimal	1	5	3	1	4	6(1)	6	5(1)
Slight	6	4	5	4	6	0	3	0
Moderate	0	0	2	1	0	0	1	0
Total	7	9	10	6	10	6(1)	10	5(1)
Necrosis/collagenolysis, sc.								
Minimal	0	4	1	0	4	4	4	3(1)
Slight	6	1	5	3	3	(1)	2	0
Moderate	1	0	1	2	0	0	0	0
Total	7	5	7	5	7	4(1)	6	3(1)
Haemorrhage, dermis								
Minimal	0	1	0	0	0	1	0	0
Total	0	1	0	0	0	1	0	0
Haemorrhage, sc.								
Minimal	3	2	4	2	4	2	7	3(1)
Slight	0	4	3	3	3	2	1	1
Moderate	1	0	1	1	0	(1)	0	0
Total	4	6	8	6	8	4(1)	8	4(1)
Fibroblast activation/Collagen deposition, dermis								
Minimal	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	2	0	0	0	0	0	0	0
Fibroblast activation/Collagen deposition, sc.								
Minimal	1	4	4	2	6	2	2	4(1)
Slight	6	3	3	2	4	0	4	1
Moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Total	7	7	8	4	10	2	6	5(1)

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Fibrosis/Granulation Tissue, dermis								
Minimal	0	1	0	0	0	2	0	0
Slight	0	0	1	0	0	1	0	0
Total	0	1	1	0	0	3	0	0
Fibrosis/Granulation Tissue, sc.								
Minimal	0	1	0	1	0	0	0	0
Slight	0	1	0	0	0	2	0	1
Total	0	2	0	1	0	2	0	1
Crust								
Total	1	4	1	0	0	2	0	0
Ulceration								
Minimal	1	0	1	0	0	1	0	0
Slight	0	2	0	0	0	0	0	0
Total	1	2	1	0	0	1	0	0
Microscopy (End of Recovery – Recovery animals)[ln]								
Liver[o]								
Number of animals examined	0	10	0	0	(1)	9(1)	10	6(4)
Decreased rarefaction								
Total	0	0	0	0	(1)	(1)	0	(3)
Inflammatory cell infiltration, peribiliary, chronic active								
Slight	0	0	0	0	0	0	2	0
Total	0	0	0	0	0	0	2	0
Bile duct hyperplasia								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Total	0	0	0	0	0	0	2	0

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Fibrosis, peribiliary								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Total	0	0	0	0	0	0	1	0
Hepatocellular single cell necrosis/apoptosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	0
Total	0	0	0	0	0	0	2	0
Exudate, perivascular, portal, focal. Total								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Total	0	0	0	0	0	0	1	0
Sciatic nerve – Axonal degeneration								
Number of animals examined	10	10	0	0	(1)	9(1)	10	6(4)
Minimal	0	1	0	0	0	6(1)	8	2(3)
Slight	0	0	0	0	0	1	2	4(1)
Total	0	1	0	0	0	7(1)	10	6(4)
Skeletal muscle – Myofiber atrophy								
Number of animals examined	10	10	0	0	(1)	9(1)	10	6(4)
Minimal	0	0	0	0	0	(1)	0	3
Slight	0	0	0	0	0	0	0	(1)
Total	0	0	0	0	0	(1)	0	3(1)
Injection Site, multiple doses[m]								
Number of animals examined:	10	10	10	10	9(1)	9(1)	10	6(4)
Inflammatory cell infiltration, dermis								
Minimal	0	1	1	0	1	0	0	0
Total	0	1	1	0	1	0	0	0
Inflammatory cell infiltration, sc.								
Minimal	1	1	2	1	2	3	0	0
Slight	0	0	0	0	0	(1)	0	0
Total	1	1	2	1	2	3(1)	0	0

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**25**		**75**		**150 / 100[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Necrosis/Collagenolysis, sc.								
Minimal	0	0	0	0	2	0	0	0
Total	0	0	0	0	2	0	0	0
Haemorrhage, dermis								
Minimal	0	0	1	0	0	0	1	0
Total	0	0	1	0	0	0	1	0
Haemorrhage, sc.								
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
Total	0	0	0	0	1	0	0	0
Fibroblast activation/Collagen deposition, sc.								
Minimal	0	0	0	0	1	1	0	0
Total	0	0	0	0	1	1	0	0
Fibrosis/Granulation tissue, dermis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	0	0	0	0	0	0	0	1
Fibrosis/Granulation tissue, sc.								
Minimal	1	0	2	0	0	0	0	0
Slight	1	1	0	0	0	1	0	0
Moderate	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	2	1	2	1	0	1	0	0
Crust								
Total	0	0	0	0	0	0	0	(1)
Ulceration								
Total	0	1	0	1	0	0	0	0

- No noteworthy findings. LLOQ lower limit of quantification. ND – not determined. NA – not applicable.

. Statistical methods, ANOVA followed by Dunnett's test or Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon Rank-Sum test for most parameters the control group was compared to group 2 but not group 3 and 4 due to pre-term termination of these groups.

* - $p<0.05$ ** - $p<0.01$ *** - $p < 0.001$

a –The dose level was reduced from 150 to 100 nmol/kg/day on Day 28 and onwards due to hypoglycaemia-related mortality.

b – Main study animals dosed 75 nmol/kg/day were pre-schedule sacrificed (Day 52) due to clinical signs of hypoglycaemia and hypoglycaemic-related mortality. Corresponding recovery animals initiated the 6-weeks recovery period at this point.

c – Main study animals dosed 150/100 nmol/kg/day were pre-schedule sacrificed (Day 49) due to clinical signs of hypoglycaemia and hypoglycaemic-related mortality. Corresponding TK/recovery animals initiated the 6-weeks recovery period at this point.

d – Animals found dead or pre-schedule euthanized due to severe clinical signs of hypoglycaemia.

e – One animal (male No. 69) was euthanized Day 43 due to clinical signs (piloerection, pale, ataxia and noisy respiration) cause of death was considered to be a nephroblastoma (incidental tumor finding).

f – Pre-schedule termination of Groups 3 and 4 main study animals.

g – Recovery period for Groups 1 and 2 was Day 56-98, for Group 3 Day 52-94 and for Group 4 Day 49-91 as dosing of Group 3 and 4 was prescheduled terminated.

h – Statistical analysis only performed for Group 2 compared to Group 1 (scheduled terminated). No statistical analysis performed for Groups 3 and 4 due to pre-scheduled termination.

i – Measured 6 h after dosing instead of 8 hours after dosing.

j – Values for animal no 74 and 77 are excluded from calculation of means values to show recovery in all other animals of the group. Individual values for animal no 74: ALAT: 1227 U/L, ASAT: 498 U/L, ALP: 680 U/L, neutrophils 2.34 10^9/L (25.6%), monocytes 0.32 10^9/L (3.5%). Individual values for animal no 77: ALAT: 2610 U/L, ASAT: 2765 U/L, ALP: 1186 U/L, neutrophils 3.06 10^9/L (49.3%), monocytes 0.25 10^9/L (4%) and lymphocytes 2.66 10^9/L (42.9%) and LDH: 2650 U/L (only changed in this animal).

k – C-peptide analysis was conducted as a non- GLP activity.

l – Numbers in () indicate the number of decedents in that phase of the study.

m – Injection site, neck left: Out of the four injection sites dosed multiple times, the injection site, neck left, was chosen to be representative of the macroscopic and microscopic findings.

n – Only organs with findings considered related to treatment are shown, not organs where the treatment related changes have resolved

o – Diagnosis as presented in appendix P to the study report.

2.6.7.7.B　ラットを用いた 26 週間毒性試験及び 12 週間回復性試験（試験番号：213297）

Report title: NNC0148-0000-0287: Toxicity study by Subcutaneous daily injection to Sprague-Dawley rats for 26 weeks followed by a 12-week recovery period

Study ID: 213297

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Duration of dosing: 26 weeks daily dosing followed by a 12-week recovery period**	**Location in CTD:** 4.2.3.2-3
Initial Age: 48-54 days at initiation of dosing	**Duration of postdose:** 12 weeks (recovery animals)	
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous bolus injection	**GLP compliance:** Yes
	Formulation/vehicle: [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µ/mL] phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/mL, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting dose formulations with concentration ranges of insulin icodec 0-80 nmol/mL and zinc acetate 0.981-3.924 µg/mL, phenol 0.0112–0.0448 mg/mL, m-cresol 0.0129-0.0514 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.90-20.98 mg/mL, pH 7.4.	

Parameters collected:
Body weight change (%), body weight (%), food consumption (%), water consumption (%), clinical observations, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, urinalysis, urine microscopy, dose formulation analysis, bioanalysis, toxicokinetic analysis, antibody analysis, organ weights (%), gross pathology and histopathology

Special features: Plasma glucose profiling, antibody analysis.

No Observed Adverse-Effect Level: 80 nmol/kg/day for males and 60 nmol/kg/day for females

Brief conclusion: It is concluded that daily subcutaneous administration of insulin icodec to Sprague-Dawley rats at doses up to 80 nmol/kg/day in males and up to 60 nmol/kg/day in females induced changes consistent with the intended pharmacological action or effects subsequent hereto of insulin icodec or, in the case of two high dose females, exaggerated pharmacological effects that lead to the premature sacrifice of one animal. The observed changes included decreased blood glucose levels, increased bodyweight and food consumption, changes in clinical pathology, histopathological changes within the pancreatic islets (atrophy), brown fat (reduced vacuolar/cellular size), liver (decreased rarefaction) and sciatic/tibial nerves (axonal degeneration) with secondary myodegeneration of the skeletal muscle in the high dose females. At the end of the 12-week recovery period, with the exception of two females that had previously received 60 nmol/kg/day still exhibiting a minimal residually increased vacuolar/cellular size of brown fat, all other reported effects of treatment had resolved. As all effects were considered related to the intended pharmacological action or subsequent hereto, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) is considered to be 80 nmol/kg/day for males and 60 nmol/kg/day for females. Plasma glucose was decreased and changes in pancreas and brown fat were observed at 20 nmol/kg/day and above, hence the NOEL is below 20 nmol/kg/day.

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Number of Animals										
Main	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 20	M: 20	F: 0
Recovery	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 0
Toxicokinetics (Main and recovery animals)[a]:										
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L) Week -1	NA	NA	1,430,000	1,340,000	3,250,000	2,730,000	4,750,000	4,210,000	5,680,000	-
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L) Week 13	NA	NA	3,490,000	3,600,000	8,520,000	7,800,000	12,700,000	12,000,000	17,800,000	-
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L) Week 26	NA	NA	4,340,000	3,290,000	8,920,000	8,000,000	12,500,000	12,400,000	18,600,000	-
C_{max} (pmol/L) Week -1	NA	NA	82,800	75,600	194,000	153,000	259,000	238,000	331,000	-
C_{max} (pmol/L) Week 13	NA	NA	175,000	180,000	397,000	532,000	621,000	547,000	892,000	-
C_{max} (pmol/L) Week 26	NA	NA	210,000	170,000	392,000	445,000	581,000	573,000	897,000	-
T_{max} (h) Week -1	NA	NA	4	8	8	4	8	8	8	-
T_{max} (h) Week 13	NA	NA	4	8	8	4	8	8	8	-
T_{max} (h) Week 26	NA	NA	8	2	4	4	4	8	8	-
Noteworthy Findings										
Mortality (Main and recovery animals)										
Hypoglycaemia related mortality[b]	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Animals found dead or sacrificed for other reasons										
Treatment period (Main animals)	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-
Recovery period (Recovery animals)	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-
Clinical signs of hypoglycaemia (Main and recovery animals)[c]										
Number of animals with hypoglycaemia	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Number of hypoglycaemic episodes per animal	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Other clinical signs (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body weight gain (g)[b]										
Main and recovery animals, Weeks 0-26	399	162	+7	+3	+3	+11*	+9*	+15**	+12**	-
Recovery animals, Weeks R0-R12	45	23	-17	0	-24	+17	-9	+39	-82**	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Body weight (g)[b]										
End of treatment (Main and recovery animals)	624	345	+5	+1	+2	+4	+7	+7	+8	-
End of recovery period (Recovery animals)	681	366	-1	-1	+3	+5	+10	+10	+2	-
Food consumption (g/animal/week)[d]										
Main and recovery animals, mean of weeks 1-26	201	149	+3	0	+1	+1	+5*	+3	+6*	-
Recovery animals, mean of recovery weeks R1-R12	201	151	+4	-3	+1	0	+7	-3	+1	-
Water consumption (mL/animal/week)[d]										
Main and recovery animals, mean of weeks 1-26	253	212	+7	+4	+8	+7	+15*	+4	+9*	-
Recovery animals, mean of weeks R1-R11	228	220	+12	-5	+11	+9	+20	+12	+7	-
Ophthalmoscopy (Main and recovery animals)										
Week 26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plasma glucose (mmol/L) (Main and recovery animals)										
Day -5										
Pre-dose	9.65	9.26	9.57	9.48	8.67	8.39	9.15	8.47	9.17	-
2 hours	8.83	9.65	9.34	8.90	8.41	9.42	8.23	8.02**	7.72	-
4 hours	10.75	10.14	9.19*	8.99	8.42**	8.32	6.83**	8.57	7.38**	-
8 hours	10.27	9.48	9.03	10.46	7.26**	8.51	9.02**	8.01	5.98**	-
24 hours	10.64	9.40	10.13	10.98	9.29*	9.68	8.23**	8.33	8.51**	-
48 hours	9.32	10.10	9.02	9.62	8.61	8.92	9.21	8.40	9.10	-
96 hours	10.21	10.36	9.07	7.99**	8.49	10.42	8.86	8.95	8.37	-
120 hours	10.04	10.15	8.94	9.32	9.19	8.39**	8.54*	8.97**	8.74*	-
Week 6										
Pre-dose	9.94	8.89	8.82	7.91	8.19	7.41	7.45	6.98	8.94	-
2 hours	9.58	8.76	10.63	10.24	10.99	8.26	10.44	6.24	8.34	-
4 hours	9.45	8.99	9.47	9.92	10.83	9.95	7.54	8.31	8.66	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
8 hours	11.25	10.77	11.47	11.13	12.07	11.59	9.81	7.56	7.40*	-
24 hours	14.72	10.42	12.14	10.56	11.08*	9.03	10.36**	7.57*	8.53**	-
Week 13										
Pre-dose	10.08	9.84	9.76	7.96	7.76	7.92	8.72	5.71**	6.00**	-
2 hours	10.54	9.46	9.94	9.25	10.52	5.86*	7.99*	4.97**	7.41*	-
4 hours	9.63	9.75	10.64	8.84	9.05	7.46	6.90	4.95**	7.18	-
8 hours	11.04	10.37	10.62	8.08	8.79**	6.70**	8.52**	5.64**	6.80**	-
24 hours	9.18	10.79	11.22	9.32	8.88	8.94	8.90	5.26**	6.44	-
Week 26										
Pre-dose	9.55	7.97	8.07	6.95	7.22	6.01	6.60*	5.24*	6.44*	-
2 hours	8.33	8.57	9.80	8.24	10.23	6.18	7.41	5.16	6.65	-
4 hours	9.54	8.18	10.13	9.11	10.60	6.35	8.31	5.85	9.25	-
8 hours	9.64	9.60	8.82	8.84	10.95	8.25	9.31	6.11*	6.07*	-
24 hours	10.62	7.75	12.45	8.68	9.10	7.29	8.53	5.86	8.59	-
48 hours	10.01	9.12	8.74	9.32	10.95	8.78	10.16	9.00	10.41	-
96 hours	8.24	7.39	10.48	7.11	10.14	9.78*	10.35	9.18*	11.00*	-
120 hours	9.37	8.81	9.74	8.26	11.85*	9.85	11.42*	10.73*	11.10*	-
Whole blood glucose (mmol/L) (Main and recovery animals)										
Week 1	6.77	6.93	6.94	7.07	6.74	6.50	6.29	5.75**	6.55	-
Week 2	7.02	7.09	7.00	6.86	7.04	6.43*	6.70	6.03**	6.64	-
Week 3	6.73	7.14	7.11	6.90	6.53	6.61	6.55	5.31**	6.84	-
Week 4	7.03	7.05	7.18	6.87	6.79	6.72	6.46	5.89**	6.19	-
Week 5	6.72	7.22	7.05	6.71	6.66	6.93	6.25	5.83**	6.83	-
Week 7	6.91	6.85	6.88	6.81	7.09	6.72	6.23	5.84**	6.07*	-
Week 8	6.40	6.27	6.82	6.39	6.91	6.61	6.36	5.73	6.75	-
Week 9	6.69	6.65	6.74	6.68	6.80	6.76	5.77	5.14**	6.45	-
Week 10	6.39	6.49	6.85	6.16	6.12	5.84	5.85	5.92	6.14	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Week 11	6.36	6.42	6.92	6.46	6.58	6.65	6.06	5.06**	6.18	-
Week 14	6.43	6.30	6.89	6.52	6.75	6.49	6.03	5.47	6.14	-
Week 15	6.43	6.44	6.54	6.50	6.70	6.30	6.40	5.58*	6.38	-
Week 16	6.58	6.30	6.69	6.51	6.40	6.62	5.82	4.93**	6.28	-
Week 17	6.15	6.16	6.62	6.32	6.54	6.06	5.77	4.87**	5.36	-
Week 18	5.97	6.08	6.34	6.16	6.38	5.54	5.62	4.58**	5.81	-
Week 19	6.42	6.35	6.92	6.72	6.51	5.68	6.07	4.67**	6.32	-
Week 20	6.47	6.42	6.90	6.19	6.39	5.62	6.18	5.38	5.67	-
Week 21	6.21	6.26	6.80	6.22	6.59	5.79	5.32	5.15*	5.80	-
Week 22	6.69	6.55	7.06	6.29	6.45	5.70	5.83	5.05**	6.34	-
Week 23	6.42	6.60	6.88	6.28	6.64	5.91	5.97	5.01**	5.83	-
Week 24	6.73	6.53	7.26	6.72	7.16	5.73	6.40	4.56**	6.17	-
Recovery week 11	6.21	6.32	6.42	6.38	6.63	6.40	6.74	6.67	6.45	-
Haematology (Main and recovery animals)										
Week 12										
Mean Cell Haemoglobin (pg)	17.8	18.9	18.1	19.1	18.1	19.1	18.0	19.4**	18.1*	-
Reticulocyte ($x10^{12}$/L)	0.197	0.150	0.219	0.151	0.214	0.157	0.204	0.155	0.211	-
Lymphocytes ($x10^{9}$/L)	9.84	7.70	8.97	7.03	9.60	7.00	8.64	6.01**	9.74	-
Basophils ($x10^{9}$/L)	0.08	0.06	0.07	0.05	0.09	0.05	0.06	0.03**	0.08	-
Large Unstained Cells ($x10^{9}$/L)	0.16	0.13	0.14	0.11	0.14	0.12	0.14	0.09**	0.16	-
Eosinophils ($x10^{9}$/L)	0.18	0.18	0.16	0.13**	0.18	0.12**	0.15	0.12**	0.16	-
White Blood Cells ($x10^{9}$/L)	12.54	9.57	11.39	8.64	12.25	8.76	11.08	7.77**	12.33	-
Week 25										
Mean Cell Haemoglobin (pg)	17.3	18.8	17.5	19.1	17.5	19.0	17.4	19.4**	17.4	-
Reticulocyte ($x10^{12}$/L)	0.199	0.173	0.208	0.147*	0.207	0.151*	0.187	0.154*	0.208	-
Lymphocytes ($x10^{9}$/L)	9.07	6.56	8.33	5.86	8.37	6.37	7.75*	5.54*	9.06	-
Basophils ($x10^{9}$/L)	0.07	0.05	0.06	0.04	0.07	0.05	0.06	0.04	0.08	-
Large Unstained Cells ($x10^{9}$/L)	0.13	0.09	0.12	0.08	0.11	0.08	0.12	0.07	0.11	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Eosinophils (x10^9/L)	0.17	0.13	0.16	0.12	0.17	0.13	0.15	0.10*	0.17	-
White Blood Cells (x10^9/L)	11.39	7.87	10.58	7.17	10.69	7.83	10.48	6.84	11.80	-
Haematology (Recovery animals)										
Recovery week 12										
Mean Cell Haemoglobin (pg)	17.0	18.5	16.8	18.3	16.5	18.4	16.8	18.7	17.0	-
Reticulocyte (x10^{12}/L)	0.205	0.145	0.212	0.169	0.197	0.173	0.201	0.160	0.205	-
Lymphocytes (x10^9/L)	7.60	5.41	7.26	5.21	6.93	5.58	6.63	4.37	7.68	-
Basophils (x10^9/L)	0.04	0.02	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	-
Large Unstained Cells (x10^9/L)	0.16	0.12	0.16	0.09	0.14	0.11	0.10	0.07	0.14	-
Eosinophils (x10^9/L)	0.12	0.12	0.14	0.08	0.17	0.09	0.11	0.08	0.14	-
White Blood Cells (x10^9/L)	9.66	6.71	9.79	6.28	10.04	7.16	8.84	5.34	10.05	-
Blood Chemistry (Main and recovery animals)										
Week 12										
Glucose (mmol/L)	9.62	9.17	9.60	8.58	9.18	8.12**	8.51**	5.54**	7.79**	-
Triglycerides (mmol/L)	1.38	1.40	1.48	1.35	1.22	1.07*	1.18*	0.97**	1.16*	-
Urea (mmol/L)	5.57	5.92	5.72	6.24	5.51	6.05	5.92	6.69**	5.94	-
Sodium (mmol/L)	139	139	139	139	139	140	139	140	140**	-
Week 25										
Glucose (mmol/L)	8.29	8.29	8.26	7.57*	8.18	6.79**	7.16**	5.04**	6.61**	-
Triglycerides (mmol/L)	1.63	1.48	1.64	1.56	1.40	1.46	1.29	1.25	1.35	-
Urea (mmol/L)	4.21	5.17	4.34	5.13	4.67	5.19	4.65	5.41	5.04**	-
Sodium (mmol/L)	141	140	140	141	141	141*	140	142**	142*	-
Blood Chemistry (Recovery animals)										
Recovery week 12										
Glucose (mmol/L)	7.95	7.14	8.13	8.70*	8.25	8.23*	8.80	8.66**	9.16*	-
Triglycerides (mmol/L)	1.50	1.51	1.44	1.92	1.44	2.66**	1.53	2.55**	1.50	-
Urea (mmol/L)	4.45	5.30	3.97	5.07	4.28	5.02	4.73	5.38	4.72	-
Sodium (mmol/L)	140	138	139	138	139	138	138	138	139	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Urinalysis (Main and recovery animals)										
Week 12										
Chloride (mmol)	0.233	0.167	0.327	0.149	0.299	0.188	0.398**	0.263**	0.367**	-
Potassium (mmol)	0.379	0.308	0.502	0.291	0.440	0.293	0.597**	0.359	0.564**	-
Volume (mL)	3.6	2.4	4.9	2.6	3.8	2.3	5.4	2.8	4.1	-
Week 25										
Chloride (mmol)	0.255	0.135	0.259	0.126	0.294	0.200	0.332	0.147	0.319	-
Potassium (mmol)	0.377	0.235	0.427	0.251	0.473*	0.326*	0.480*	0.304**	0.521**	-
Volume (mL)	4.0	1.8	3.8	2.5	4.7	3.2**	4.4	2.5**	4.7	-
Urinalysis (Recovery animals)										
Recovery week 12										
Chloride (mmol)	0.454	0.250	0.438	0.165	0.318	0.289	0.410	0.231	0.330	-
Potassium (mmol)	0.496	0.305	0.524	0.239	0.447	0.334	0.505	0.321	0.419	-
Volume (mL)	4.7	2.7	5.0	2.0	2.8	3.2	5.9	3.6	3.7	-
Antidrug antibodies										
No of positive/total animals (Week 26 – main animals)	NA		3/39		4/39		2/39		2/20	
No of positive/total animals (Week 1 Recovery – recovery animals)	NA		1/20		1/20		0/20		1/10	
No of positive/total animals (Week 4 Recovery – recovery animals)	NA		2/20		0/20		1/20		2/10	
Organ weights (Week 26 – main animals)[de]										
Liver – Absolute (g)	21.478	12.420	+2	-11*	-8	-13**	-5	-14**	+1	-
Liver – Relative (% of body weight)	3.49	3.57	-4	-13**	-8	-16**	-9	-19**	-6	-
Organ weights[de] (Recovery week 12 – Recovery animals)										
Liver – Absolute (g)	23.141	11.872	-1	-6	-4	+8	-1	+10	0	-
Liver – Relative (% of body weight)	3.39	3.27	0	-4	-6	+1	-11	+2	-3	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Macroscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microscopy (Week 26 – Main animals)[f]										
Pancreas – Atrophy Islet Cell										
Number of animals examined:	19(1)	20	20	19(1)	20	19(1)	20	18(1)	20	-
Minimal	0	0	2	4	6	8	10	1	3	-
Slight	0	0	1	0	3	3	4	10	10	-
Moderate	0	0	0	0	0	3	0	3(1)	1	-
Total	0	0	3	4	9	14	14	14(1)	14	-
Brown fat (aorta) – Increased vacuolar/cell size										
Number of animals examined:	18(1)	20	20	18(1)	20	19(1)	20	19(1)	19	-
Minimal	0	0	8	5(1)	8	7	8	1	5	-
Slight	0	0	0	0	0	1	2	9(1)	9	-
Total	0	0	8	5(1)	8	8	10	10(1)	14	-
Liver - Decreased rarefaction										
Number of animals examined:	19(1)	20	20	19(1)	20	19(1)	20	19(1)	20	-
Minimal	0	0	0	1	0	2	0	0	0	-
Slight	0	0	0	0	0	10	0	14	0	-
Total	0	0	0	1	0	12	0	14	0	-
Sciatic Nerve – Axonal degeneration										
Number of animals examined:	19(1)	19	20	19(1)	20	19(1)	20	19(1)	20	-
Minimal	0	0	1	1	3	1	2	1	1	-
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0(1)		
Total	0	0	1	1	4	1	2	3(1)	1	-

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Tibial Nerve – Axonal degeneration										
Number of animals examined:	18(1)	20	20	19(1)	20	19(1)	20	18(1)	19	-
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	3	1	-
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0	-
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-
Total	0	0	0	0	2	0	1	3(1)	1	-
Skeletal Muscle – Myodegeneration										
Number of animals examined:	18(1)	20	20	19(1)	20	19(1)	20	19(1)	18	-
Minimal	9	4	4	8	11	7	7	6	7	-
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0(1)	0	
Total	9	4	4	8	11	7	7	8(1)	7	-
Dorsal injection site 1										
Number of animals examined	19(1)	20	0	0(1)	0	0(1)	0	19(1)	20	
Inflammatory cell infiltration, muscle										
Minimal	2	0	0	0	0	0	0	1	0	-
Total	2	0	0	0	0	0	0	1	0	-
Inflammatory cell infiltration, dermal										
Minimal	2	4	0	0	0	0(1)	0	0	0	-
Total	2	4	0	0	0	0(1)	0	0	0	-
Inflammatory cell infiltration, subcutaneously										
Minimal	2	3	0	0	0	0	0	0	0	-
Total	2	3	0	0	0	0	0	0	0	-
Scab(s)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-
Slight	0	1	0	0	0	0	0	0	0	-
Total	0	1	0	0	0	0	0	2	0	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Dorsal injection site 2										
Number of animals examined	19(1)	20	0	0(1)	0	1(1)	0	19(1)	20	
Inflammatory cell infiltration, muscle										
Minimal	1	2	0	0(1)	0	1	0	1	1	
Total	1	2	0	0(1)	0	1	0	1	1	
Inflammatory cell infiltration, dermal										
Minimal	2	2	0	0	0	0(1)	0	2	0	-
Total	2	2	0	0	0	0(1)	0	2	0	-
Inflammatory cell infiltration, subcutaneously										
Minimal	3	2	0	0(1)	0	0	0	3	3	-
Slight	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-
Total	3	2	0	0(1)	0	1	0	3	3	-
Scab(s)										
Minimal	2	2	0	0	0	0	0	0	1	-
Total	2	2	0	0	0	0	0	0	1	-
Haemorrhage subcutaneously										
Minimal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Slight	1	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Total	2	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Granuloma(s)										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
Dorsal injection site 3										
Number of animals examined	19(1)	20	0	0(1)	0	0(1)	0	19(1)	20	
Inflammatory cell infiltration, muscle										
Minimal	0	3	0	0	0	0	0	3	0	-
Total	0	3	0	0	0	0	0	3	0	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Inflammatory cell infiltration, dermal										
Minimal	0	0	0	0	0	0(1)	0	4	0	-
Total	0	0	0	0	0	0(1)	0	4	0	-
Inflammatory cell infiltration, subcutaneously										
Minimal	1	2	0	0	0	0(1)	0	3	2	-
Total	1	2	0	0	0	0(1)	0	3	2	-
Scab(s)										
Minimal	0	2	0	0	0	0	0	0	1	-
Total	0	2	0	0	0	0	0	0	1	-
Haemorrhage subcutaneously										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-
Total	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-
Dorsal injection site 4										
Number of animals examined	19(1)	20	0	1(1)	0	0(1)	0	19(1)	20	
Inflammatory cell infiltration, muscle										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-
Total	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-
Inflammatory cell infiltration, dermal										
Minimal	0	3	0	1(1)	0	0(1)	0	5	1	-
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
Total	0	3	0	1(1)	0	0(1)	0	5	2	-
Inflammatory cell infiltration, subcutaneously										
Minimal	0	2	0	0	0	0	0	1	0	-
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
Total	0	2	0	0	0	0	0	1	1	-
Muscle degeneration/regeneration										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**							
Daily Dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**20**		**40**		**60**		**80**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**	**5M**	**-**
Microscopy (Week 12 Recovery – Recovery animals)[f]										
Increased vacuolar/cell size brown fat (aorta)										
Number of animals examined:	10	10	9(1)	10	10	10	10	9(1)	10	-
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-
Total	0	0	0	0	0	0	0	2	0	-

- No noteworthy findings.

Statistical methods, Levene's test, if homogenous variance, Williams' test for monotonic dose-response or Dunnett's test for non-monotonic dose-response. If logarithmic transformation failed to achieve homogenous variance, Shirley's tests for monotonic dose-response or Steel's test for non- monotonic dose-response.

* - $p<0.05$ ** - $p<0.01$

a - In control animals, exposure was below the Lower Limit of Quantification (LLOQ).

b - Mortality is considered related to hypoglycaemia when an animal died without previous signs of hypoglycaemia, with no other cause of demise suggested by necropsy and/or histopathology.

c - Number of animals with signs of hypoglycaemia

d - At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

e - Both absolute and relative to body weight organ weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute and relative organ weights.

f – Numbers in () indicate the number of decedents in that phase of the study.

2.6.7.7.C　ラットを用いた 52 週間毒性試験

Report Title: NNC0148-0287: A 52-week Carcinogenicity Assessment Study by Daily Subcutaneous Administration to Sprague-Dawley Rats

Study ID: 319122

Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** 52 weeks daily dosing	**Location in CTD:** 4.2.3.2-4
Initial Age: 66 to 72 days at initiation of dosing	**Method of Administration:** Subcutaneous bolus injection	
Date of First Dose: [redacted]	**Vehicle/Formulation:** [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 101µg/mL], phenol 5.65 mg/mL, disodium hydrogen phosphate dihydrate 0.53 mg/mL, m-cresol 1.08 mg/mL, glycerol 15 mg/mL, pH 7.4 diluted with a isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, pH 7.4, resulting dose formulations with concentration ranges of insulin icodec 0-60 nmol/mL and zinc acetate 0-1.4429 µg/mL, phenol 0.0269-0.0807 mg/mL, m-cresol 0.0051-0.0154 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg /mL, glycerol 20.91-20.97 mg/mL, pH 7.4.	**GLP Compliance:** Yes[a]
	Treatment of Controls: Group 1 (Control) - Vehicle for NNC0148-0287 diluted with isotonic dilution medium. Group 6 (Reference) - NPH insulin diluted in vehicle for NPH insulin.	

Parameters collected: Body weight gain, body weight (%), food consumption (%), ophthalmoscopy, clinical observations, palpable masses, haematology, blood chemistry, dose formulation analysis, bioanalysis, toxicokinetic analysis, organ weights (%), gross pathology, histopathology

Special Features: Plasma glucose profiles, blood glucose spot sampling (Accu-check™)[a], additional group dosed with NPH insulin (reference group)

Brief conclusion: It was concluded that subcutaneous administration of insulin icodec or NPH insulin to Sprague-Dawley rats for 52 weeks caused a range of findings that were consistent with known responses in healthy rats when dosed insulin. Such findings included hypoglycaemic episodes, predominantly with NPH insulin, which for insulin icodec led to the death of four high dose males and one high dose female. They also included expected findings in the pancreas, sciatic nerve, skeletal muscle and heart of males and females, periaortic brown adipose tissue of males and in the testes of animals given insulin icodec and in the sciatic nerve and heart of females and testes of males given NPH insulin. There were, however, no increases in incidences of hyperplastic changes or mammary gland tumours with either material, and tumour development in other organs was also not altered by treatment and, consequently, insulin icodec and NPH insulin were not carcinogenic to Sprague-Dawley rats. In the study report, based on the hypoglycaemia-related mortality and the severity of changes in testis and sciatic nerve, NOAELs of 40 and 30 nmol/kg/day was established for males and females, respectively. However, as all effects including hypoglycaemia-related mortality are considered related to either exaggerated, intended pharmacology or subsequent hereto, the NOAEL is considered to be 60 nmol/kg/day for males and 40 nmol/kg/day for females. Plasma glucose was decreased and changes in nerve and heart were observed at 20 nmol/kg/day and above, hence the NOEL is below 20 nmol/kg/day.

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Number of animals	M: 48	F: 48	M: 40	F: 40	M: 0	F: 40	M: 40	F: 48	M: 48	F: 0	M: 48	F: 48
Toxicokinetics												
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L): Day 1	BLLOQ	BLLOQ	1,800,000	1,890,000	NA	2,660,000	3,630,000	4,090,000	6,340,000	NA	BLLOQ	BLLOQ
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L): Day 169	BLLOQ	BLLOQ	5,310,000	4,040,000	NA	7,880,000	11,800,000	9,840,000	20,400,000	NA	162	BLLOQ
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L): Day 351	BLLOQ	BLLOQ	4,580,000	3,950,000	NA	5,680,000	8,920,000	10,700,000	18,000,000	NA	106	53
AUC_{last} (h×pmol/L): Day 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6	4
AUC_{last} (h×pmol/L): Day 169	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	162	55
AUC_{last} (h×pmol/L): Day 351	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	106	53
C_{max} (pmol/L): Day 1	BLLOQ	BLLOQ	93,900	99,900	NA	155,000	182,000	230,000	331,000	NA	2.65	1.67
C_{max} (pmol/L): Day 169	BLLOQ	BLLOQ	242,000	201,000	NA	399,000	594,000	521,000	993,000	NA	25.1	19.7
C_{max} (pmol/L): Day 351	BLLOQ	BLLOQ	213,000	187,000	NA	262,000	434,000	484,000	1,520,000	NA	22.3	13.1
Noteworthy Findings												
Mortality[b]												
Hypoglycaemia related mortality	0	0	0	0	NA	0	0	1	4	NA	1	2
Animals found dead or sacrificed for other reasons	2	4	6	1	NA	0	1	3	2	NA	1	2
Clinical signs of hypoglycaemia												
Number of animals with hypoglycaemia	0	0	1	0	NA	0	0	0	1	NA	4	7
Highest number of hypoglycaemic episodes per animal	0	0	1	0	NA	0	0	0	2	NA	2	7
Palpable masses												
Number of animals with palpable masses	5	17	2	18	NA	17	0	18	4	NA	4	22
Total number of palpable masses	6	30	2	29	NA	25	0	20	4	NA	4	36

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**								**NPH insulin**	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Body weight gain (g)[c]												
Week 0-52	478	210	+2	+8	NA	-2	+5	+12**	+2	NA	+2	-2
Body weight (g)[c]												
End of treatment (Week 52)	717 g	399 g	+1	+4	NA	-2	+4	+6	+1	NA	0	-3
Food consumption (g/animal/week)[c]												
Weeks 1-52	200 g	148 g	0	-1	NA	-4	0	0	+1	NA	-2	-3
Ophthalmoscopy												
Week 46	-	-	-	-	NA	-	-	-	-	NA	-	-
Plasma glucose (mmol/L)												
Day 1												
0 hour	8.63	8.53	8.59	9.23	NA	8.36	9.25	8.64	8.58	NA	9.21	8.46
2 hours	7.90	7.89	8.28	7.88	NA	8.36	7.77	7.80	8.23	NA	3.30**	4.04**
4 hours	8.47	8.04	7.87	7.88	NA	8.04	7.84	7.70	7.30	NA	7.67	6.83
8 hours	8.62	8.52	8.11	7.97	NA	7.63	8.21	7.00*	7.34*	NA	8.00	7.77
24 hours	9.18	8.42	8.26*	7.85	NA	7.75	8.34*	8.21	7.76**	NA	9.10	8.40
Week 25												
0 hour	7.79	7.25	7.53	6.23	NA	5.54*	6.43**	4.74**	5.11**	NA	8.73*	7.60
2 hours	7.22	7.30	7.83	6.70	NA	6.06**	7.04	6.15**	4.16**	NA	2.26**	2.06**
4 hours	8.37	6.83	7.17	6.39	NA	6.18	6.79	6.52	5.52**	NA	3.14**	2.14**
8 hours	8.18	7.10	6.97	6.18	NA	6.50	5.25*	4.26**	5.45*	NA	7.44	7.50
24 hours	7.30	7.40	7.28	6.66	NA	6.08	6.42	6.92	4.17**	NA	8.00	7.09
Week 51												
0 hour	10.21	7.24	9.27	7.72	NA	7.10	7.82**	6.27	5.69**	NA	9.57	10.10**
2 hours	8.98	6.91	7.75	6.77	NA	7.72	8.63	7.05	6.93	NA	4.59	3.81**
4 hours	8.75	7.52	7.55*	7.01	NA	7.10	9.42	6.61	8.28	NA	3.87**	4.40**
8 hours	9.65	7.25	8.99	6.85	NA	7.87	7.73	7.21	7.28	NA	9.59	6.32
24 hours	12.38	8.20	9.72*	7.41	NA	7.10	9.81*	8.17	6.24**	NA	12.33	8.26

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Whole blood glucose[a] (Accu-check) (mmol/L)												
Week 3	6.4	6.2	6.2	6.3	NA	6.0	6.1	6.1	6.1	NA	3.0**	3.3**
Week 5	6.5	6.5	6.4	6.6	NA	6.5	6.5	6.3	6.0	NA	3.3**	3.6**
Week 7	6.6	6.4	6.3	6.3	NA	6.4**	6.2*	6.3**	5.4**	NA	3.2**	3.5**
Week 11	6.5	6.5	6.4	6.2	NA	5.9	6.7	5.8	4.9**	NA	3.5**	3.6**
Week 15	6.6	6.5	6.9	6.4	NA	6.3	6.5	6.5	5.8	NA	4.1**	5.4
Week 19	6.6	6.3	6.5	6.4	NA	6.1	6.4	6.1	5.3**	NA	3.6**	3.8**
Week 23	6.4	6.3	6.5	5.9	NA	6.0	6.1	6.2	5.4	NA	3.3**	3.9**
Week 27	6.3	5.9	6.4	5.9	NA	6.0	6.5	5.8	5.8	NA	3.9**	3.6**
Week 31	7.2	6.2	6.3*	5.9	NA	5.8*	6.2*	5.8*	4.9**	NA	3.3**	3.5**
Week 35	6.3	6.1	6.2	5.7	NA	5.7	6.2	5.6*	5.4*	NA	3.8**	3.5**
Week 39	6.5	5.9	6.4	5.6	NA	5.5	6.4	6.0	6.2	NA	4.1**	3.6**
Week 43	6.1	5.9	6.0	5.7	NA	5.6	6.3	5.7	5.3	NA	3.7**	3.7**
Week 47	6.6	6.0	6.8	5.7	NA	5.9	6.4	6.0	6.1	NA	4.6**	3.2**
Hematology												
Week 48 (males) and 49 (females)												
Haematocrit (L/L)	0.438	0.406	0.443	0.404	NA	0.416	0.449*	0.402	0.446*	NA	0.448*	0.412
Hemoglobin (g/dL)	14.4	13.8	14.7	13.8	NA	14.2	14.8**	13.7	14.8**	NA	14.9**	14.1
Mean Cell Haemoglobin (pg)	17.7	19.4	17.7	19.5	NA	19.5	17.8	19.5	18.0	NA	18.1*	19.5
Reticulocyte ($x10^{12}$/L)	0.183	0.111	0.172	0.115	NA	0.115	0.167*	0.112	0.165*	NA	0.159**	0.109
Red cell distribution width (%)	14.7	11.2	14.5	11.1	NA	11.0	14.2	11.0	14.1	NA	14.0*	11.1
Lymphocytes ($x10^9$/L)	8.23	3.94	6.90**	3.97	NA	3.59	7.34**	3.55	6.75**	NA	7.32*	4.39
White Blood Cells ($x10^9$/L)	10.19	5.32	9.07*	5.26	NA	4.90	9.15*	4.88	8.60**	NA	9.43	5.89
Prothrombin time (sec)	20.9	19.2	20.9	19.2	NA	18.5	20.3*	18.7*	20.2**	NA	19.5**	18.5**
Activated partial thromboplastin time (sec)	16.5	15.7	17.1	15.7	NA	17.4*	18.1*	16.9*	19.0**	NA	19.9**	18.0**
Fibrinogen (g/L)	3.10	1.80	3.43*	1.99	NA	1.84	3.49*	2.02*	3.35*	NA	2.89	1.81

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Blood Chemistry												
Week 48 (males) and 49 (females)												
Urea (mmol/L)	4.75	5.66	4.90	5.70	NA	5.86*	4.71	5.95**	4.90	NA	4.45**	4.98
Creatinine (µmol/L)	34	36	35	38	NA	38*	34	39**	34	NA	35	38
Glucose (mmol/L)	10.71	8.40	9.97	7.35**	NA	6.98**	9.93	6.45**	7.71**	NA	11.69*	8.72
Triglycerides (mmol/L)	1.39	2.12	1.40	1.83	NA	1.84	1.35	1.91	1.30	NA	1.39	1.56**
Sodium (mmol/L)	142	140	142	141	NA	141**	142	142**	143**	NA	142	141
Chloride (mmol/L)	100.8	97.6	100.8	98.3	NA	98.6*	101.1	99.3**	101.7**	NA	100.4	98.4*
Potassium (mmol/L)	4.86	4.24	5.01	4.31	NA	4.13	4.79	4.11	4.66*	NA	4.91	4.25
Phosphorus (mmol/L)	1.34	1.22	1.32	1.26	NA	1.28	1.42*	1.25	1.39*	NA	1.47**	1.33**
Magnesium (mmol/L)	0.82	0.93	0.82	0.92	NA	0.92	0.83	0.92	0.84**	NA	0.78**	0.86**
Organ weights [c, d]												
Liver - Absolute (%)	23.101g	13.891g	-4	0	NA	-7	-2	+1	-3	NA	-6	-10**
Liver - Adjusted to terminal body weight (%)	23.473g	13.978g	-5*	-3	NA	-5	-6**	-4	-5**	NA	-7**	-7**
Kidney - Absolute (%)	3.992g	2.481g	0	-1	NA	-5	+1	-2	-2	NA	0	-3
Kidney - Adjusted to terminal body weight (%)	4.034g	2.490g	-1	-3	NA	-4*	-2	-6**	-3	NA	0	-1
Spleen - Absolute (%)	0.977g	0.559g	-4	+14	NA	0	+1	+4	-5	NA	-3	-5
Spleen - Adjusted to terminal body weight (%)	0.989g	0.553g	-5	+8	NA	+3	-2	0	-7*	NA	-4	-2
Macropathology												
Testis												
Number of animals examined:	46	NA	34	NA	NA	NA	39	NA	42	NA	46	NA
Small												
Total number (%)	0	NA	0	NA	NA	NA	1 (3)	NA	2 (5)	NA	1 (2)	NA
Soft												
Total number (%)	0	NA	1 (3)	NA	NA	NA	1 (3)	NA	4 (10)	NA	1 (2)	NA

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Histopathology (Week 52)[e]												
Non-Neoplastic findings												
Pancreas - Atrophy islet cell												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	39 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	44 (4)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Minimal	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)	1 (1)	2 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Slight	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4)	NA	0 (0)	0 (0)
Moderate	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)	1 (1)	6 (5)	NA	0 (0)	0 (0)
Incidence (%)[f]	2.1	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	2.5	4.2	22.9	NA	0.0	0.0
Sciatic Nerve - Axonal degeneration												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	39 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	44 (4)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Minimal	5 (0)	1 (1)	7 (1)	1 (1)	NA	2 (0)	4 (0)	2 (0)	12 (0)	NA	6 (0)	2 (0)
Slight	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	2 (1)	0 (0)	3 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Moderate	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (1)	1 (3)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	5 (0)	1 (1)	7 (1)	1 (1)	NA	3 (0)	6 (1)	2 (1)	16 (3)	NA	6 (0)	3 (0)
Incidence (%)[f]	10.4	4.2	20.0	5.0	NA	7.5	17.5	6.3	39.6	NA	12.5	6.3
Skeletal Muscle - degeneration/necrosis, myofiber												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	39 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	44 (4)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Minimal	1 (0)	0 (1)	1 (0)	1 (0)	NA	1 (0)	1 (0)	0 (0)	1 (1)	NA	0 (0)	0 (0)
Slight	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (1)	2 (1)	NA	0 (0)	0 (0)
Moderate	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	1 (0)	0 (1)	1 (0)	1 (0)	NA	1 (0)	1 (1)	0 (1)	3 (2)	NA	0 (0)	0 (0)
Incidence (%)[f]	2.1	2.1	2.5	2.5	NA	2.5	5.0	2.1	10.4	NA	0.0	0.0
Heart - Fibrosis, myocardial												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	39 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	44 (4)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Minimal	8 (0)	3 (0)	8 (1)	2 (0)	NA	4 (0)	6 (0)	6 (0)	9 (0)	NA	6 (1)	5 (0)
Slight	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	3 (0)	1 (0)	2 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	8 (0)	3 (0)	9 (1)	2 (0)	NA	4 (0)	9 (0)	7 (0)	11 (0)	NA	6 (1)	5 (0)

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Incidence (%)[f]	16.7	6.3	25.0	5.0	NA	10.0	22.5	14.6	22.9	NA	14.6	10.4
Adipose Tissue, Periaortic - Vacuolar/cell size, increased, brown adipose tissue												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	38 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	43 (3)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Minimal	6 (0)	8 (0)	5 (1)	7 (1)	NA	8 (0)	12 (0)	10 (0)	17 (2)	NA	2 (0)	3 (1)
Slight	3 (0)	2 (0)	3 (0)	4 (0)	NA	1 (0)	5 (0)	1 (0)	5 (0)	NA	2 (0)	0 (0)
Moderate	2 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	11 (0)	10 (0)	8 (1)	11 (1)	NA	9 (0)	17 (0)	11 (0)	23 (2)	NA	4 (0)	3 (1)
Incidence (%)[f]	22.9	20.8	22.5	30.8	NA	22.5	42.5	23.9	52.1	NA	8.3	8.3
Testis - Degeneration/atrophy, tubular												
Number of animals examined:	46 (2)	NA	34 (6)	NA	NA	NA	39 (1)	NA	42 (6)	NA	46 (2)	NA
Minimal	2 (0)	NA	2 (0)	NA	NA	NA	2 (0)	NA	2 (1)	NA	8 (0)	NA
Slight	0 (0)	NA	1 (1)	NA	NA	NA	0 (0)	NA	1 (1)	NA	0 (0)	NA
Moderate	0 (0)	NA	0 (0)	NA	NA	NA	0 (0)	NA	0 (1)	NA	1 (0)	NA
Marked	0 (0)	NA	0 (0)	NA	NA	NA	0 (0)	NA	1 (0)	NA	1 (0)	NA
Severe	1 (0)	NA	1 (0)	NA	NA	NA	1 (0)	NA	2 (0)	NA	0 (0)	NA
Total	3 (0)	NA	4 (1)	NA	NA	NA	3 (0)	NA	6 (3)	NA	10 (0)	NA
Incidence (%)[f]	6.3	NA	12.5	NA	NA	NA	7.5	NA	18.8	NA	20.8	NA
Mammary glands												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	39 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	44 (4)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Hyperplasia, lobuloaveolar												
Minimal	0 (0)	11 (0)	1 (0)	10 (0)	NA	14 (0)	0 (0)	12 (1)	0 (0)	NA	0 (0)	14 (1)
Slight	0 (0)	19 (2)	0 (0)	14 (1)	NA	15 (0)	0 (0)	15 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	18 (2)
Moderate	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	2 (0)
Total	0 (0)	31 (2)	1 (0)	24 (1)	NA	31 (0)	0 (0)	29 (1)	0 (0)	NA	0 (0)	34 (3)
Incidence (%)[f]	0.0	68.8	2.5	62.5	NA	77.5	0.0	62.5	0.0	NA	0.0	77.1

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Hyperplasia, lobuloaveolar, atypical												
Minimal	2 (0)	10 (0)	1 (0)	5 (0)	NA	3 (0)	2 (0)	8 (1)	3 (0)	NA	3 (0)	6 (0)
Slight	0 (0)	3 (1)	0 (0)	3 (1)	NA	2 (0)	0 (0)	6 (1)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (1)
Moderate	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	NA	1 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Total	2 (0)	13 (1)	1 (0)	9 (1)	NA	6 (0)	2 (0)	15 (2)	3 (0)	NA	3 (0)	8 (1)
Incidence (%)[f]	4.2	29.2	2.5	25.0	NA	15.0	5.0	35.4	6.3	NA	6.3	18.8
Dilatation, duct/aveolar												
Minimal	1 (0)	10 (0)	3 (1)	15 (0)	NA	9 (0)	2 (0)	14 (1)	3 (0)	NA	1 (0)	17 (0)
Slight	1 (0)	8 (3)	1 (0)	7 (1)	NA	12 (0)	1 (0)	9 (0)	2 (0)	NA	2 (0)	7 (2)
Moderate	0 (0)	10 (1)	0 (0)	6 (0)	NA	9 (0)	0 (0)	8 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	7 (0)
Marked	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	4 (0)
Total	2 (0)	28 (4)	4 (1)	29 (1)	NA	32 (0)	3 (0)	32 (1)	5 (0)	NA	3 (0)	35 (2)
Incidence (%)[f]	4.2	66.7	12.5	75.0	NA	80.0	7.5	68.8	10.4	NA	6.3	77.1
Injection Sites 1-4, Combined												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	39 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	44 (4)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Degeneration/ Regeneration/ Necrosis, Myofiber, Panniculus Muscle												
Minimal	6 (0)	10 (1)	2 (2)	7 (0)	NA	2 (0)	6 (1)	5 (0)	2 (2)	NA	1 (0)	7 (1)
Slight	0 (0)	3 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (1)	5 (2)
Total	6 (0)	13 (1)	2 (2)	7 (0)	NA	2 (0)	6 (1)	5 (0)	2 (2)	NA	1 (1)	12 (3)
Infiltrate, Inflammatory Cell, Subcutaneous												
Minimal	13 (0)	7 (0)	6 (2)	14 (0)	NA	11 (0)	7 (0)	10 (0)	8 (4)	NA	10 (0)	13 (3)
Slight	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	4 (0)	2 (0)
Moderate	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Total	14 (1)	7 (0)	6 (2)	14 (0)	NA	11 (0)	8 (0)	11 (0)	8 (4)	NA	14 (0)	16* (3)
Serocellular Crust(s)												

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control)		20		30		40		60		40	
Group no.	1M	1F	2M	2F		3F	4M	4F	5M		6M	6F
Minimal	2 (0)	5 (2)	1 (1)	5 (0)	NA	7 (0)	3 (0)	2 (1)	2 (0)	NA	3 (0)	10 (0)
Slight	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	2 (0)	6 (2)	1 (1)	5 (0)	NA	7 (0)	3 (0)	2 (1)	2 (0)	NA	3 (0)	10 (0)
Hemorrhage, Subcutaneous												
Minimal	2 (0)	2 (0)	0 (1)	5 (1)	NA	2 (0)	3 (1)	1 (0)	0 (1)	NA	8 (0)	7 (4)
Slight	3 (1)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	0 (1)	5 (0)
Total	5 (1)	3 (0)	0 (1)	5 (1)	NA	3 (0)	3 (1)	2 (0)	0 (1)	NA	8 (1)	12* (4*)
Microgranuloma(ta), Hair Shaft/Keratin/Plant Material												
Minimal	9 (0)	6 (0)	4 (0)	7 (0)	NA	11 (0)	11 (0)	9 (1)	9 (2)	NA	7 (0)	10 (0)
Slight	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	2 (0)	0 (0)
Total	9 (0)	6 (0)	4 (0)	7 (0)	NA	12 (0)	11 (0)	9 (1)	9 (2)	NA	9 (0)	10 (0)
Arteritis/Periarteritis												
Minimal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	NA	0 (0)	0 (0)
Ulceration, Epidermal												
Minimal	1 (0)	2 (1)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)	1 (0)	1 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Slight	0 (0)	1 (0)	0 (0)	1 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Total	1 (0)	3 (1)	0 (0)	1 (0)	NA	3 (0)	0 (0)	2 (0)	1 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Hyperplasia, Epidermal												
Minimal	0 (0)	0 (1)	2 (0)	3 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	4 (0)
Slight	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	0 (0)	2 (1)	2 (0)	3 (0)	NA	4 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	4 (0)
Infiltrate, Inflammatory Cell, Dermal												
Minimal	4 (0)	1 (0)	1 (1)	2 (0)	NA	0 (0)	2 (0)	1 (0)	2 (0)	NA	1 (0)	1 (0)
Slight	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	4 (0)	2 (0)	1 (1)	2 (0)	NA	0 (0)	2 (0)	1 (0)	2 (0)	NA	1 (0)	1 (0)

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control)**		**20**		**30**		**40**		**60**		**40**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**		**3F**	**4M**	**4F**	**5M**		**6M**	**6F**
Fibrosis, Subcutaneous												
Minimal	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Slight	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)
Total	1 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	1 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	1 (0)
Infiltrate, Inflammatory Cell, Perivascular												
Minimal	1 (0)	2 (0)	1 (0)	2 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)
Total	1 (0)	2 (0)	1 (0)	2 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)
Fibrosis, Dermal												
Minimal	0 (0)	6 (0)	0 (0)	3 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	5 (0)	2 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Total	0 (0)	6 (0)	0 (0)	3 (0)	NA	2 (0)	0 (0)	5 (0)	2 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Granuloma(ta)												
Moderate	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Total	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Needle Tract												
Total	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	2 (0)
Necrosis, Subcutaneous												
Slight	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Total	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Neoplastic findings												
Mammary gland												
Number of animals examined:	46 (2)	44 (4)	34 (6)	39 (1)	NA	40 (0)	39 (1)	44 (4)	42 (6)	NA	46 (2)	44 (4)
Adenocarcinoma												
Present	0 (0)	11 (2)	0 (0)	11 (1)	NA	10 (0)	0 (0)	11 (1)	0 (0)	NA	0 (0)	13 (1)
Incidence (%)[f]	0.0	27.1	0.0	30.0	NA	25.0	0.0	25.0	0.0	NA	0.0	29.2
Carcinoma, adenosquamous												
Present	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	0 (0)
Incidence (%)[f]	0.0	2.1	0.0	0.0	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	0.0

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec								NPH insulin	
Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control)		20		30		40		60		40	
Group no.	1M	1F	2M	2F		3F	4M	4F	5M		6M	6F
Adenoma												
Present	0 (0)	3 (0)	0 (0)	1 (0)	NA	6 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA	0 (0)	1 (0)
Incidence (%)[f]	0.0	6.3	0.0	2.5	NA	15.0	0.0	0.0	0.0	NA	0.0	2.1
Fibroadenoma												
Present	0 (0)	6 (1)	0 (0)	5 (1)	NA	5 (0)	0 (0)	9 (0)	0 (0)	NA	1 (0)	8 (0)
Incidence (%)[f]	0.0	14.6	0.0	15.0	NA	12.5	0.0	18.8	0.0	NA	2.1	16.7

- No noteworthy findings; $AUC_{(0\text{-}24h)}$ = Area under concentration-time curve from time 0 to 24 hours post dose; BLLOQ = Below the Lower Limit of Quantification; AUC_{last} = Area under concentration-time curve from last dose; C_{max} = Maximum (peak) observed drug concentration; M - Male, F - Female, NA - Not applicable

Statistical methods, Levene's test, if homogenous variance, Williams' test for monotonic dose-response or Dunnett's test for non-monotonic dose-response. If logarithmic transformation failed to achieve homogenous variance, Shirley's tests for monotonic dose-response or Steel's test for non- monotonic dose-response.

* - $p<0.05$ ** - $p<0.01$

a - No claim of compliance was made for the blood glucose concentration data derived from the use of a commercially available monitoring system (Accu-Chek® system).

b - Includes all animals that were killed or died prematurely during the treatment period. Treatment-related hypoglycaemia was considered to have been the main contributor to death for eight animals. The main contributor for the remaining 22 deaths were not related to treatment with NNC0148-0287 or NPH insulin.

c - For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

d - Both absolute and terminal body weight adjusted organ weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute and adjusted organ weights.

e - Numbers in () indicate the number of decedents in the study

f - Total terminal and early decedent percentage incidence

2.6.7.7.D　イヌを用いた 8 週間毒性試験及び 6 週間回復性試験（試験番号：211240）

Report Title: NNC 0148-0000-0287: A subcutaneous 8-weeks toxicity study in dogs followed by a 6-week recovery period　**Study ID:** 211240

Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** 8 weeks twice weekly	**Location in CTD:** 4.2.3.2-7
Initial Age: 6-7 months at initiation of dosing	**Duration of Recovery:** 6 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous	
	Formulation/vehicle: [stock solution] and vehicle: [insulin icodec 250 nmol/mL and zinc acetate 12.3 µg/mL], phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, NaCl 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/ml, pH 7.4 diluted with vehicle for insulin icodec.	

Parameters collected:
Body weight (%), food consumption, clinical observations, injection site reactions, electrocardiography, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, toxicokinetics, organ weight, gross pathology and histopathology

Special Features: Blood glucose profiling, dog endogenous insulin, antibodies towards insulin icodec

No Observed Adverse-Effect Level: 18 nmol/kg body weight twice weekly

Brief conclusion: Dosing with 7, 14 and 21/18[a] nmol/kg insulin icodec twice weekly resulted in treatment-related clinical signs of hypoglycaemia in 2 high dose males confirmed by low plasma glucose concentrations. Consequently, the dose level of 21 nmol/kg was reduced to 18 nmol/kg from study day 33. Soft/watery faeces were seen from approximately study day 30 and throughout the remaining dosing period in animals dosed insulin icodec.

Treatment related increase of body weight gain and decreased food remains were observed in high dose animals when compared to controls. Minimal increases were seen in plasma phosphorus and sodium in males and females, respectively. Significant decreases in blood glucose levels were seen at 14 and 21/18 nmol/kg twice weekly. Endogenous dog insulin was decreased in animals dosed insulin icodec and normalised during recovery. Systemic exposure was confirmed in animals dosed insulin icodec. Antibodies towards insulin icodec were detected in the majority of animals dosed insulin icodec. In the majority of animals, evaluated based on exposure and blood glucose lowering effect, there was no indication of formation of neutralising antibodies. Minor (minimal to slight) injection site reactions were observed in all groups including the vehicle dosed control group. As all effects were considered related to the intended pharmacological action or subsequent hereto, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) is considered to be 18 nmol/kg/twice weekly. As transient soft/watery faeces and decreased endogenous insulin level were observed at 7 nmol/kg twice weekly and above, the NOEL is below 7 nmol/kg/twice weekly.

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**7**		**14**		**21 / 18**[a]	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Number of animals								
Main	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Recovery	M: 1	F: 2	M: 0	F: 0	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Toxicokinetics								
AUC_{0-24h} (h×pmol/L) Day 1	NA	NA	757,000	881,000	1,570,000	1,560,000	2,170,000	2,350,000
AUC_{0-24h} (h×pmol/L) Day 53	NA	NA	1,470,000	1,860,000	3,070,000	4,540,000	4,220,000	4,750,000
C_{max} (pmol/L) Day 1	NA	NA	39,800	44,000	85,900	84,900	119,000	126,000
C_{max} (pmol/L) Day 53	NA	NA	66,400	81,400	140,000	207,000	195,000	222,000
t_{max} (h) Day 1	NA	NA	22	19	23	24	22	20
t_{max} (h) Day 53	NA	NA	18	8	13	18	12	18
$t_{½}$ (h) Day 53	NA	NA				41 – 115[b]		
Noteworthy Findings								
Mortality – all animals	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical signs of hypoglycaemia (Main and recovery animals)								
Number of animals with hypoglycaemia	NA	NA	0	0	0	0	2	0
Other clinical signs (Main and recovery animals)								
Number of animals with soft and watery faeces	0	0	3	2	5	3	5	4
Body weight gain (kg)[c]								
End of treatment (Main and recovery animals)	1.5	1.1	+27	+36	+40	+18	+60*	+45
End of recovery (Recovery animals)	-0.2	-0.2	N/A	N/A	0	0	-50	-100
Body weight (kg)[c]								
End of treatment (Main and recovery animals)	9.3	8.3	+4	+8	+5	+4	+10	+7
Food remains (g/animal accumulated)								
End of treatment (Main and recovery animals)	1639	1831	0	135	320	18	27	39
End of recovery (Recovery animals)	3531	2779	NA	NA	1673	1110	816	1558
Ophthalmoscopy								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**7**		**14**		**21 / 18**[a]	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Electrocardiography								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
End of recovery (Recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Plasma Glucose (mmol/L) (Main and recovery animals)								
Day 1								
Pre-dosing	5.78	6.34	6.10	6.10	5.94	6.08	6.34	5.90
1 hour	5.45	5.96	6.17	5.83	5.92	6.06	6.04	5.74
2.5 hours	5.63	5.94	5.87	5.67	5.84	5.74	5.88	5.50
4 hours	5.58	6.02	5.83	5.60	6.00	6.08	5.54	5.60
8 hours	5.78	5.78	6.00	6.07	5.90	6.02	5.90	5.62
18 hours	5.93	6.48	6.00	5.70	5.48	5.48	4.28**	4.18**
24 hours	5.68	5.86	6.27	6.17	5.98	6.02	5.82	5.08
Day 53								
Pre-dosing	5.55	5.76	5.40	5.20	4.24**	4.48*	4.02*	3.74**
1 hour	5.83	5.72	6.00	5.30	4.88	4.50**	5.56	4.44**
2.5 hours	4.93	5.46	5.63	5.43	4.72	5.06	5.22	4.98
4 hours	4.80	4.80	5.13	4.60	5.06	4.86	5.56	4.98
8 hours	5.60	5.32	5.90	5.27	5.00	4.72	5.24	4.58
18 hours	5.43	6.00	5.07	4.63	3.28**	3.76*	2.68**	3.32**
24 hours	5.35	5.62	6.27	5.30	5.60	5.34	6.24*	5.50
Plasma glucose before first meal (mmol/L) (Main and recovery animals)								
Day 8	5.48	6.04	5.43	5.40	4.86*	4.84**	3.34*	3.64**
Day 15	5.28	5.70	5.47	5.13	4.40	4.54*	3.48**	3.34**
Day 22	5.05	5.48	5.17	5.03	4.40	4.62	3.46	3.38**
Day 29	5.25	5.60	5.57	4.63**	4.08	4.32*	3.34*	3.22**
Day 36	5.38	5.90	5.27	5.13	4.34	5.02	3.80	3.92**

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**7**		**14**		**21 / 18**[a]	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Day 43	5.00	5.32	5.03	4.93	4.06	4.10	3.50	3.68*
Day 50	5.20	5.38	5.53	4.73	4.36*	4.70*	3.98	4.00*
Day 56-57	5.08	5.68	5.30	5.33	3.88	4.72	3.44	4.26**
Plasma glucose before first meal (mmol/L) (Recovery animals)								
Day 63	5.30	5.45	NA	NA	5.35	4.80	5.65	5.05
Day 71	4.90	5.05	NA	NA	4.90	4.70	5.50	4.90
Day 78	5.40	5.50	NA	NA	5.20	5.35	5.50	4.95
Day 85	5.20	5.10	NA	NA	5.15	4.70	5.45	4.95
Day 92	5.10	5.20	NA	NA	5.25	5.10	5.55	4.75
Dog endogenous insulin (pmol/L)								
Last day of dosing before first meal (Main and recovery animals)	21.2	27	<16.0	17.8	<10.4	<61.0	<25.3	<19.3
End of recovery before first meal (Recovery animals	15.9	19.9	NA	NA	29.1	54.1	24.4	35.3
Haematology								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Chemistry (End of dosing – Main and recovery animals)								
Phosphorus (mmol/L)	1.61	1.71	1.65	1.63	1.88*	1.60	2.04**	1.84
Sodium (mmol/L)	147.3	148.1	148.4	149.8	148.4	149.3	148.8	149.5**
Blood Chemistry (End of recovery – Recovery animals)								
Phosphorus (mmol/L)	1.37	1.45	NA	NA	1.54	1.39	1.30	1.40
Sodium (mmol/L)	144.4	146.1	NA	NA	146.4	144.4	146.2	146.9
Urinalysis and microscopy								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**7**		**14**		**21 / 18**[a]	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Antidrug antibodies								
No of positive/total animals (End of treatment – main animals)	0/6		5/6		4/6		5/6	
No. of positive/total animals (End of treatment – recovery animals)	0/3		NA		3/4		3/4	
No. of positive (End of recovery – recovery animals)	0/3		NA		1/4		2/4	
Organ weights								
End of treatment (Main animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Macroscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
End of treatment (Main animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Microscopy (End of treatment – Main animals)								
Injection site 1+2[d]								
Number of animals examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Inflammation focal								
Minimal	2	2	2	3	2	1	1	0
Slight	1	1	1	0	0	2	2	3
Total	3	3	3	3	2	3	3	3
Necrosis focal								
Minimal	1	1	1	1	1	1	1	0
Slight	1	1	0	0	0	0	0	1
Total	2	2	1	1	1	1	1	1
Fibrosis focal								
Minimal	1	1	2	0	0	2	1	2
Slight	0	1	0	0	0	0	1	1
Total	1	2	2	0	0	2	2	3
Degeneration/regeneration myofibres								
Minimal	0	1	0	1	0	1	0	0

Compound	**Vehicle**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**7**		**14**		**21 / 18[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Slight	0	0	1	0	0	1	0	0
Total	0	1	1	1	0	2	0	0
Haemorrhage focal								
Minimal	0	0	0	0	0	1	0	1
Slight	1	0	0	0	0	0	0	0
Total	1	0	0	0	0	1	0	1
Injection site 3[d]								
Number examined	3	3	3	3	3	3	3	3
Ulceration focal								
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
Total	0	0	0	0	1	0	0	0
Inflammation focal								
Minimal	1	1	2	1	1	1	1	2
Slight	0	0	0	0	1	0	1	0
Total	1	1	2	1	2	1	2	2
Necrosis focal								
Minimal	0	0	0	0	1	1	0	0
Total	0	0	0	0	1	1	0	0
Haemorrhage focal								
Minimal	1	0	0	0	1	0	0	0
Slight	0	1	0	0	0	2	1	1
Moderate	0	0	0	0	0	1	0	0
Total	1	1	0	0	1	3	1	1

- No noteworthy findings. N/A not applicable

Statistical methods, ANOVA/Dunnett's t-test, Kruskal Wallis/Dunn's test.

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

a – The dose level was reduced from 21 to 18 nmol/kg/twice weekly on Day 33 due to adverse clinical signs of hypoglycaemia (e.g. abnormal gait, trembling,) confirmed by very low plasma glucose levels (~ 2 mmol/L).

b – For both Groups 3 and 4.

c — At end of dosing period for controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

d – The injections were rotated between the two injection sites (Nos 1 and 2, left and right ear respectively), so that each site was used once weekly throughout the study. The last dose was given in injection site between the shoulders (No 3) in order to investigate possible acute local skin reactions at the injection site.

2.6.7.7.E　イヌを用いた 26 週間毒性試験及び 12 週間回復性試験（試験番号：213222）

Study ID: 213222

Report Title: NNC0148-0000-0287: Toxicity study by subcutaneous twice weekly dosing to dogs for 26 weeks followed by a 12-week recovery period

Location in CTD: 4.2.3.2-8

Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** at least 27 weeks	**GLP compliance:** Yes
Initial Age: 9 to 10 months at initiation of dosing	**Duration of Postdose:** 12 weeks	
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous twice weekly	
	Formulation/vehicle: [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µg/mL], phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/mL, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting in formulations with concentration ranges of insulin icodec 0-120 nmol/mL and zinc acetate 0-5.89 µg/mL, phenol 0.034–0.067 mg/mL, m-cresol 0.039-0.077 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.9 mg/mL, pH 7.4.	

Parameters collected:

Body Weight (%), body weight gain (%), food remains, food consumption measured as gram food/kg body weight (%), clinical observations, ophthalmoscopy, electrocardiography, dose formulation analysis, haematology, clinical chemistry, urinalysis, urine microscopy, bioanalysis and toxicokinetic evaluation, organ weights (%), gross pathology, histopathology

Special Features: Plasma glucose profiling, One Touch glucose sampling, antibody analysis

No Observed Adverse-Effect Level: 12 nmol/kg body weight twice weekly

Brief conclusion:

Twice weekly subcutaneous dosing of Beagle dogs with insulin icodec at dose levels of 0, 6, 12/9 or 18/12 nmol/ kg body weight for at least 27 weeks with a 12-week recovery period did not result in any toxicological findings, but only in effects related to the intended pharmacological action or exaggerated pharmacology of insulin such as lowered plasma glucose and clinical signs of hypoglycaemia. The dose levels were lowered as of study day 25 of the study due to low plasma glucose levels and a single incidence of severe hypoglycaemia at 18 nmol/kg twice weekly. On the same occasion, the dose level of the group dosed 12 nmol/kg twice weekly was lowered to 9 nmol/kg twice weekly in order to keep a reasonable span between dose levels.

Clinical signs of hypoglycaemia were observed on four occasions in animals dosed 18/12 nmol/kg twice weekly and, as expected, plasma glucose levels were lowered in animals dosed 12/9 and 18/12 nmol/kg twice weekly throughout the study. In three animals at 18/12 nmol/kg twice weekly, a potential limited neutralising effect of antibodies towards insulin icodec cannot be excluded, as a less consistent and smaller plasma glucose lowering effect was seen when comparing to antibody negative animals.

Based on the above the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) was considered to be 12 nmol/kg twice weekly. Plasma glucose was decreased at 6 nmol/kg/day and above, hence the NOEL is below 6 nmol/kg twice weekly.

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**6**		**12/9[a]**		**18/12[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Number of Animals (Main study)	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Number of Animals (Recovery)	M: 2	F: 2	M: 0	F: 0	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3
Toxicokinetics:								
$AUC_{0\text{-}96h}$ (h×pmol/L) Day 1	NA	NA	2,610,000	3,080,000	5,510,000	6,050,000	8,110,000	8,960,000
$AUC_{0\text{-}96h}$ (h×pmol/L) Day 88	NA	NA	4,680,000	5,100,000	7,320,000	7,970,000	10,500,000	12,400,000
$AUC_{0\text{-}96h}$ (h×pmol/L) Day 190	NA	NA	4,680,000	4,870,000	7,930,000	7,970,000	11,000,000	11,400,000
C_{maz} (pmol/L) Day 1	NA	NA	37,900	46,600	78,300	113,000	119,000	143,000
C_{maz} (pmol/L) Day 88	NA	NA	66,900	79,400	109,000	123,000	154,000	182,000
C_{maz} (pmol/L) Day 190	NA	NA	67,100	68,500	113,000	116,000	155,000	170,000
t_{maz} (h) Day 1	NA	NA	24.0	16.0	23.1	16.0	25.7	16.6
t_{maz} (h) Day 88	NA	NA	13.0	12.5	13.7	14.3	19.4	13.7
t_{maz} (h) Day 190	NA	NA	19.5	18.5	16.6	15.1	13.7	12.3
Noteworthy findings								
Mortality (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Signs (Main and recovery animals)								
Number of animals with hypoglycaemia	0	0	0	0	0	0	2	1
Number of hypoglycaemic episodes	0	0	0	0	0	0	2	2
Body weight (kg)[b]								
End of treatment (Main and recovery animals)	11.3	10.0	+1	+4	+1	+3	0	+2
End of recovery (Recovery animal)	10.6	10.5	NA	NA	+4	-6	+12	+4
Body weight gain								
End of treatment (Main and recovery animals) (kg)[b]	1.8	1.4	+17	+29	+17	+29	+17	+21
End of recovery (Recovery animals - Day 190-274) (kg)	-0.2	-0.3	NA	NA	-0.2	-0.6	+0.2	0
Food consumption (g/kg body weight/day)[bc]								
End of treatment (Main and recovery animals)	64.3	66.2	+2	+8	+7	0	+4	0
End of recovery (Recovery animals - Day 191-274)	63.2	51.4	NA	NA	-1	-4	-7	+8
Ophthalmoscopy								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**6**		**12/9[a]**		**18/12[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Electrocardiography								
Week 12/13 (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Plasma glucose (mmol/L)								
(Main and recovery animals)								
Day 1								
Pre-dosing	6.22	5.72	6.53	6.15	6.14	6.10	6.21	6.41 **
2 hours	5.72	5.45	5.98	5.80	5.40	5.46	5.46	5.26
4 hours	5.52	5.78	5.90	6.30	5.56	5.40	5.34	5.44
8 hours	5.65	5.47	5.65	5.60	5.50	5.47	5.73	5.44
12 hours	5.90	5.50	5.80	5.95	5.50	4.84	4.67 **	4.71
18 hours	6.10	5.92	6.00	5.98	5.41 *	5.17	4.36 **	4.29 ***
24 hours	5.77	5.55	5.83	5.75	5.31	5.43	5.31	5.09
42 hours	6.28	5.80	6.20	5.95	5.71 *	5.27	4.37 **	4.37 *
48 hours	6.15	5.87	6.30	5.85	5.91	5.87	5.77	5.44
66 hours	6.68	6.45	6.65	6.43	5.93	5.67 **	5.70 *	5.47
72 hours	5.78	5.47	5.98	5.60	5.53	5.44	5.39	5.39
90 hours	6.28	6.05	6.40	6.10	5.81	5.69	5.74	5.69
96 hours	5.78	5.77	5.98	5.85	5.49	5.70	5.63	5.66
114 hours	6.12	5.72	6.13	6.08	5.80	5.49	5.73	5.71
120 hours	5.70	5.48	5.88	5.30	5.30	5.51	5.70	5.57
138 hours	6.08	5.85	6.35	6.30	5.90	5.81	5.80	5.96
144 hours	5.80	5.45	5.95	5.17	5.03	5.74	5.66	5.46
162 hours	5.78	5.63	6.05	5.78	5.69	5.53	5.63	5.61
168 hours	5.33	5.48	5.68	5.60	5.30	5.39	5.47	5.79
Week 13								
pre-dosing	5.37	5.38	5.33	4.80	4.97	5.44	5.36	5.27
2 hours	5.17	4.83	5.05	4.73	4.83	4.43	4.41	3.83
4 hours	4.77	4.75	4.45	5.08	4.34	4.94	4.76	4.86
8 hours	4.95	5.23	5.10	4.60	4.90	5.09	4.73	4.81
12 hours	5.72	5.65	5.15 *	5.18	4.79 **	4.39 **	3.57 **	3.77 *

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**6**		**12/9[a]**		**18/12[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
18 hours	5.85	5.70	5.43	5.30	4.86	4.34 **	3.31 ***	3.60 **
24 hours	5.00	4.85	4.73	4.83	4.84	4.59	4.27	4.46
42 hours	5.55	5.42	5.25	5.15	4.99 *	4.66 *	3.83 **	3.83 *
48 hours	5.35	5.12	5.25	5.18	5.06	4.69	5.21	4.86
66 hours	5.58	5.52	5.55	5.53	5.14	5.03	4.27 *	4.34
72 hours	5.48	5.43	5.65	5.20	4.96	5.20	5.40	5.16
90 hours	5.75	5.52	5.68	5.45	5.44	5.29	4.99	4.63
96 hours	5.18	4.92	4.93	5.38	6.07	5.13	4.86	4.73
Week 28								
pre-dosing	5.35	5.40	5.60	5.83	5.01	5.14	5.64	5.07
2 hours	4.97	4.97	5.33	4.98	4.04 *	4.50	4.11	4.11
4 hours	5.07	5.43	5.08	5.33	4.80	4.69	4.76	4.66
8 hours	4.65	4.50	4.95	4.88	4.59	4.10	4.73	4.24
12 hours	4.63	5.12	4.70	4.83	3.37 **	3.56 **	2.96 *	3.06 ***
18 hours	5.50	5.43	5.23	5.15	4.31 *	4.13 **	3.27 ***	3.81 *
24 hours	5.30	4.75	4.88	5.45	4.56	4.21	5.00	4.81
42 hours	5.75	5.55	5.53	5.55	4.86	4.26	3.83 ***	4.00 *
48 hours	5.03	4.72	4.83	5.13	4.30	4.00	4.87	4.63
66 hours	5.58	5.27	5.30	5.45	4.77	4.64	4.19 **	4.44
72 hours	4.92	4.88	4.98	5.50	4.67	4.66	5.49	4.23
90 hours	5.78	5.53	5.48	5.65	5.26	4.66	4.96	5.03
96 hours	4.90	4.62	4.95	5.58	4.83	4.71	5.23	4.79
Recovery animals, only								
120 hours	6.20	5.30	-	-	5.17	4.53	4.50	4.37
144 hours	4.60	5.40	-	-	4.77	4.30	5.13	4.63
168 hours	5.70	5.35	-	-	5.20	5.00	5.13	4.57
336 hours	5.20	4.25	-	-	4.93	5.53	5.40	5.30
504 hours	4.70	5.05	-	-	4.70	5.03	5.07	5.47
One Touch, plasma glucose (mmol/L)								
(Main and recovery animals)								
Day 11 (pre-dose)	6.02	5.58	5.63	4.90	5.41	5.06	6.00	5.67

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec					
Twice weekly dose (nmol/kg)	0 (Control)		6		12/9[a]		18/12[a]	
Group no.	1M	1F	2M	2F	3M	3F	4M	4F
Day 12 (18 hours post dose)	6.43	5.93	5.73	5.58	4.90 ***	4.49 **	3.67 ***	3.64 ***
Day 18 (pre-dose)	5.90	5.60	5.68	5.35	5.19	4.90	5.69	5.13
Day 19 (18 hours post dose)	6.05	5.78	5.25	4.65 *	3.63 ***	3.61 ***	2.60 ***	<2.87 ***
Day 25 (pre-dose)	6.22	4.95	5.68	5.30	5.44	4.57	5.53	4.93
Day 26 (18 hours post dose)	6.00	5.80	5.20	5.03	3.57 ***	3.40 ***	3.00 ***	3.36 ***
Day 32 (pre-dose)	5.90	5.90	5.85	5.45	5.47	4.97 *	5.53	5.51
Day 33 (18 hours post dose)	6.12	5.78	5.53	5.10	4.64 **	3.66 ***	3.17 ***	3.86 ***
Day 39 (pre-dose)	5.78	5.73	5.90	5.45	5.53	4.93	5.57	5.47
Day 40 (18 hours post dose)	6.22	5.65	6.08	5.68	5.06 *	4.39	3.90 ***	4.40
Day 46 (pre-dose)	6.00	5.25	5.75	5.43	5.37	4.66	5.51	5.43
Day 47 (18 hours post dose)	6.28	5.93	6.00	5.58	4.99 *	4.19 **	3.89 ***	4.16 **
Day 53 (pre-dose)	5.97	5.55	5.48	6.18	5.06 **	5.20	5.39	5.21
Day 54 (18 hours post dose)	5.53	5.87	4.83	5.30	4.17 *	4.16 **	3.53 ***	3.93 **
Day 67 (pre-dose)	5.77	4.55	5.40	4.63	4.80 *	4.40	5.36	4.61
Day 68 (18 hours post dose)	5.88	5.33	4.73	4.78	4.40 **	3.56 ***	<3.16 ***	<3.41 **
Day 81 (pre-dose)	5.48	4.60	5.30	5.23	4.99	4.33	4.83	4.96
Day 82 (18 hours post dose)	5.95	5.05	5.63	4.73	5.01	3.76 *	3.46 ***	<3.29 **
Day 95 (pre-dose)	4.73	5.18	4.75	5.25	4.51	4.30 *	4.63	4.76
Day 96 (18 hours post dose)	6.27	5.22	5.30	4.70	4.86 **	3.90 **	3.59 ***	<3.49 ***
Day 109 (pre-dose)	5.57	4.90	5.75	5.15	5.19	4.90	5.03	4.77
Day 110 (18 hours post dose)	5.67	5.75	4.60	4.95	4.33 **	4.24 *	3.54 ***	<3.36 ***
Day 123 (pre-dose)	5.38	5.73	4.45	4.88	4.70	4.29 **	5.17	4.53 *
Day 124 (18 hours post dose)	5.70	5.20	5.58	4.70	4.40 **	4.09 *	3.50 ***	3.61 **
Day 137 (pre-dose)	5.30	5.23	4.78	4.90	4.80	4.10	4.69	4.49
Day 138 (18 hours post dose)	6.07	5.30	5.43	5.23	4.96 *	4.29	3.70 ***	<3.57 **
Day 151 (pre-dose)	5.38	5.02	5.43	4.90	4.90	4.31	5.26	4.27
Day 152 (18 hours post dose)	5.68	5.42	4.53	4.95	4.03 **	3.76 **	3.47 ***	3.79 **
Day 165 (pre-dose)	5.32	4.92	5.88	5.80	5.27	5.07	4.93	4.83
Day 166 (18 hours post dose)	6.18	5.37	5.45	4.90	4.91 *	3.56 *	4.13 ***	3.63 *
Day 179 (pre-dose)	5.67	5.50	5.30	5.13	5.01	4.94	5.13	4.63 **
Day 180 (18 hours post dose)	5.92	5.37	4.83	5.00	4.06 ***	3.46 **	3.26 ***	<3.46 **

Compound	Vehicle, diluted		Insulin icodec					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**6**		**12/9[a]**		**18/12[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Day 195 (18 hours post dose)	5.78	5.43	5.20	5.20	4.83	4.23	3.98 *	<4.00
Haematology								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis and microscopy								
End of treatment (Main and recovery animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Antidrug antibody								
No. of positive/total animals (End of treatment – main and recovery animals)	0/12		2/8		3/14		3/14	
No. of positive/total animals (End of recovery – recovery animals)	0/4		NA		1/6		1/6	
Organ weights (End of treatment – main animals)[b]								
Liver – Absolute (g)	293.18	283.25	-6	-3	+7	-11	-2	-9
Liver – Relative (% of body weight)	2.55	2.92	-5	-9**	+8	-14	+2	-9*
Organ weights (End of recovery – recovery animals)[b]								
Liver – Absolute (g)	280.66	253.90	NA	NA	+10	0	+12	+15
Liver – Relative (% of body weight)	2.62	2.42	NA	NA	+5	+8	+3	+12
Macroscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Microscopy (End of treatment – main animals)								
Injection sites								
Number of injection sites examined (4/animal compiled incidences)	16	16	16	16	16	16	16	16
Inflammatory cells								
Minimal	11	6	4	6	7	12	5	3
Slight	0	2	3	3	0	2	3	5
Total	11	8	7	9	7	14	8	8
Haemorrhage focal								
Minimal	1	0	0	0	0	3	0	0
Slight	0	1	0	0	0	0	0	1

Compound	**Vehicle, diluted**		**Insulin icodec**					
Twice weekly dose (nmol/kg)	**0 (Control)**		**6**		**12/9[a]**		**18/12[a]**	
Group no.	**1M**	**1F**	**2M**	**2F**	**3M**	**3F**	**4M**	**4F**
Total	1	1	0	0	0	3	0	1
Crust								
Minimal	11	8	7	4	6	8	4	2
Slight	0	1	0	0	1	1	1	0
Total	11	9	7	4	7	9	5	2
Ulceration								
Minimal	0	0	0	0	2	0	0	0
Slight	0	0	0	0	0	1	0	0
Total	0	0	0	0	2	1	0	0
Microscopy (End of recovery – recovery animals)								
Injection sites								
Number of injection sites examined (4/animal compiled incidences)	8	8	0	0	12	12	12	12
Inflammatory cells								
Minimal	0	0	NA	NA	2	2	2	4
Total	0	0	NA	NA	2	2	2	4
Crust								
Minimal	2	1	NA	NA	10	4	7	6
Slight	0	0	NA	NA	0	0	1	0
Total	2	1	NA	NA	10	4	8	6
Ulceration								
Minimal	1	0	NA	NA	0	0	0	0
Total	1	0	NA	NA	0	0	0	0

NA Not applicable; - No noteworthy findings. * - $p<0.05$ ** - $p<0.01$ *** - $p<0.001$ (ANOVA/Dunnett's t-test, Kruskal Wallis/Dunn's test; Group 1 was compared to Group 2, 3 and 4).

a – From Day 25, Dose level of Group 4 was reduced due to confirmed hypoglycaemia and the dose level of Group 3 was reduced to keep dose levels reasonable spaced.

b – For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls in the direction indicated. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

c – Food consumption is given in kg as well.

2.6.7.8 遺伝毒性試験：*in vitro*

Test Article: Insulin icodec

Report Title: NNC 0148-0000-0287 Reverse mutation in five histidine-requiring strains of *Salmonella typhimurium* using a treat and plate methodology

Study ID: 210457

Test for Induction of: Reverse Mutations (Ames)	**No. of Independent Assays:** 1	**Location in CTD:** 4.2.3.3.1-1
Strains: *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA102	**No. of Replicate Cultures:** 5 (negative control) 3 (test article in five concentrations & positive controls)	**GLP Compliance:** No (screening study)
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S-9	**No. of Cells Analysed/Culture:** N/A	
Vehicles for Test Article: Purified water	**For Positive Controls[a]:** 2NF, NQO, AAN, ICR-191 and MMS formulated in DMSO, plus MNNG and MMC formulated in water. **For Negative Controls:** purified water (vehicle)	
Treatment: Plate incorporation		**Date of Treatment:** February 2011
Cytotoxic Effects: Evidence of toxicity in the form of a marked reduction in revertant numbers was observed in strain TA1537		
Genotoxic Effects: Negative		

Brief conclusion:

No statistically significantly increases in the number of revertant colonies were observed following insulin icodec treatments of five *Salmonella typhimurium* test strains (TA98, TA100, TA1535, TA1537 and TA102) in the absence and presence of S-9. This study was considered therefore to have provided no evidence of any insulin icodec mutagenic activity under the conditions employed in this screening study. These conditions included treatments at concentrations up to 5000 µg/plate (the maximum recommended concentration according to OECD guideline 471, ICH harmonised tripartite guideline S2A and UKEMS guidelines).

			Main Experiment revertant Colony Counts				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration or Dose Level (µg/plate)**	**TA98**	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**TA102**
Without Activation	Insulin icodec	Vehicle	21 ± 5	112 ± 13	12 ± 4	9 ± 4	283 ± 17
		8	23 ± 3	107 ± 16	5 ± 1	9 ± 2	263 ± 25
		40	19 ± 6	97 ± 18	7 ± 3	4 ± 3	300 ± 19
		200	16 ± 4	113 ± 8	10 ± 2	8 ± 5	289 ± 3
		1000	25 ± 8	104 ± 8	11 ± 4	5 ± 3	289 ± 14
		5000	21 ± 7	107 ± 12	13 ± 5	5 ± 4	271 ± 28
	Positive Control	Compound[a]	2NF	NQO	MNNG	ICR-191	MMC
		Concentration (µg/plate)	25	1	2.5	1	0.05
		Revertants	720 ± 74	947 ± 120	1008 ± 53	800 ± 69	1136 ± 65

			Main Experiment revertant Colony Counts				
Metabolic Activation	**Test Article**	**Concentration or Dose Level (µg/plate)**	**TA98**	**TA100**	**TA1535**	**TA1537**	**TA102**
With Activation	Insulin icodec	Vehicle	18 ± 3	112 ± 18	9 ± 4	6 ± 1	200 ± 10
		8	21 ± 5	112 ± 14	12 ± 4	7 ± 2	183 ± 28
		40	15 ± 1	104 ± 17	9 ± 7	3 ± 1	206 ± 13
		200	14 ± 2	117 ± 4	12 ± 7	6 ± 3	211 ± 16
		1000	21 ± 4	111 ± 8	17 ± 5	4 ± 5	202 ± 8
		5000	16 ± 2	113 ± 18	15 ± 6	8 ± 4	194 ± 4
	Positive Control	Compound[a]	AAN	AAN	AAN	AAN	MMS
		Concentration (µg/plate)	2.5	2.5	5	2.5	1250
		Revertants	452 ± 10	394 ± 37	91 ± 5	67 ± 12	688 ± 22

Statistical analysis: Dunnett's t-test

a – Positive controls: 2NF (2-Nitrofluorene), NQO (4-nitroquinoline 1-oxide), MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), ICR-191 (ICR-191 mutagen), MMC (Mitomycin C), MMS (Methyl methanesulphonate) and AAN (2-Aminoanthracene).

2.6.7.9　遺伝毒性試験：*in vivo*

No studies have been performed, see Nonclinical Summary M 2.6.6.4.

2.6.7.10　がん原性試験

No studies have been performed, see Nonclinical Summary M 2.6.6.5.

Test Article: insulin icodec

Test Article: insulin icodec

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test Article: insulin icodec

Species/ strain	Method of administration (Formulation/vehicle)	Duration of dosing	Doses (nmol/kg/day)	Sex and no. per group	Noteworthy findings	Study ID
Rat/Sprague-Dawley	Subcutaneous [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µg/mL], phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/mL, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting dose formulations with concentration ranges of insulin icodec 0-100 nmol/mL and zinc acetate 0.981-4.904 µg/mL, phenol 0.0112–0.0560 mg/mL, m-cresol 0.0129-0.0643 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.88-20.98 mg/mL, pH 7.4	Males: 4 weeks before pairing and until day 23-28 after mating Females Groups 1- 4: 2 weeks before pairing up to and including day 17 of gestation. Females Group 5 (Satellite animals): 2 weeks before pairing up to and including day 19 of gestation.	Males: 0, 40, 60 or 100 Females: 0, 20, 40 or 60 Satellite females: 40	Groups 1-4: 8 males + 8 females Group 5: 3 females	Doses up to 100 nmol/kg/day in males and 60 nmol/kg/day in females was well tolerated and induced the intended pharmacological effects or effects subsequent hereto (reduction in plasma glucose levels, increased bodyweight and food consumption) in both sexes prior to pairing. There were no signs of maternal toxicity and no effects on fertility or embryo-foetal survival. At all dose levels there was a higher incidence of 13/14, 14/14 short supernumerary ribs. At 40 and 60 nmol/kg/day, there was a higher incidence of medially thickened /kinked ribs as well. At 20 and 60 nmol/kg/day there was delayed/incomplete ossification of cranial centres, hyoid and sacrocaudal vertebrae. In addition, delayed/incomplete ossification of pelvic bones was seen at 60 nmol/kg/day. At 60 nmol/kg/day, one incidence of bent/short/thickened long bones was observed. These findings are considered of uncertain relation to treatment. Systemic exposure to insulin icodec was confirmed in dosed animals. In conclusion, for the subsequent fertility and embryo-foetal main study, a male dose level up to 100 nmol/kg/day and a female dose level up to 60 nmol/kg/day were considered appropriate for the high dose groups.	213427

Species/ strain	Method of administration (Formulation/vehicle)	Duration of dosing	Doses (nmol/kg/day)	Sex and no. per group	Noteworthy findings	Study ID
Rabbit/ New Zealand White	Subcutaneous [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µg/mL], phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/mL, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting dose formulations with concentration ranges of insulin icodec 0- 96 nmol/mL and zinc acetate 2.354-4.905 µg/mL, phenol 0.0269–0.0537 mg/mL, m-cresol 0.0257-0.0617 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.89-20.94 mg/mL, pH 7.4.	Days 2-19 of gestation	0, 12, 18, 24	6 females	Doses up to 24 nmol/kg/day induced the intended pharmacological effects or effects subsequent hereto (reduction in plasma glucose levels, increased bodyweight and food consumption). A dose of 24 nmol/kg/day was associated with signs of hypoglycaemia, low plasma glucose values and increased pre- and post-implantation loss. Minor effects on embryo-foetal development, manifested as minor skeletal cranial abnormalities (sutural bones, fissures and additional sutures), were evident in all treated groups and at 24 nmol/kg/day there was a major cranial abnormality evident in one foetus (partially fused frontal bones with frontal bump/ridge). In addition, at 18 nmol/kg/day only, there was an increase in delayed/incomplete ossification/unossified sternebrae. All changes were considered of uncertain relation to treatment. Systemic exposure to insulin icodec was confirmed in the dosed animals. No antibodies towards insulin icodec were detected. In conclusion, for the subsequent fertility and embryo-foetal main study, a dose level up to 18 nmol/kg/day was considered appropriate for the high dose group.	213525

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

Test Article: Insulin icodec

2.6.7.12.A Sprague-Dawley 系ラットを用いた皮下投与による受胎能及び胚・胎児の発生に関する試験 (試験番号：214143)

Test Article: Insulin icodec

Report Title: NNC0148-0000-0287: Study for effects on fertility and embryo-foetal development in the Sprague-Dawley rat by subcutaneous administration

Study ID: 214143

Design similar to ICH S5: Annex 1, section 1.1.1 and 1.1.2: Yes		**Location in CTD:** 4.2.3.5.1-2
Species/Strain: Rat/Sprague-Dawley	**Duration of Dosing:** Males**:** Daily for 4 weeks before pairing, throughout pairing and until termination of the study Females**:** Daily for 2 weeks before pairing, throughout pairing up to and including day 17 after mating (i.e. gestation day 17)	**GLP Compliance:** Yes
	Day of Mating: Day 0	
Initial Age: Males: 82 days old (approximately) Females: 75 to 82 days old at initiation of dosing	**Day of C-Section**: Day 20	
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration:** Subcutaneous	
	Formulation/vehicle: [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µg/mL], phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/mL, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting dose formulations with concentration ranges of insulin icodec 0-100 nmol/mL and zinc acetate 0.490-4.905 mg/mL, phenol 0.0056–0.0560 mg/mL, m-cresol 0.0064-0.0643 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.88-20.99 mg/mL, pH 7.4.	

Parameters collected:

Males: Toxicokinetics, clinical observations, necropsy observations, body weight (%), food consumption (%), pre-coital interval, No. of males that mated, No. of fertile males, reproductive organ weights (%)

Females: Toxicokinetics, clinical observations, necropsy observations, premating body weight (%), gestation body weight (%), premating food consumption (%), gestation food consumption (%), mean No. oestrous cycles/14 days, pre-coital interval, No. of females sperm-positive, No. of pregnant females (fertility),
Litter: Mean No. of corpora lutea, mean No. of implantation sites**,** mean No. of resorptions (early and late), mean % pre- and post-implantation loss, mean live litter size, mean foetal body weight, mean placental weight, foetal sex ratios, foetal pathology (gross external, visceral and skeletal anomalies), total number of affected foetuses and litters

Special Features: Plasma glucose profiling, whole blood glucose analysis in males, foetal:dam exposure ratio

No Observed Adverse-Effect Level

F0 Males: 100 nmol/kg/day

F0 Females: 60 nmol/kg/day

F1 Litters: 60 nmol/kg/day

Brief conclusion: The repeat daily subcutaneous administration of insulin icodec in this fertility and embryo-foetal development study at doses up to 100 nmol/kg/day in males and 60 nmol/kg/day in females were well tolerated but induced findings consistent with the intended pharmacological effects or effects subsequent hereto such as reduced plasma glucose levels, increased bodyweight and food consumption in both sexes. There were no signs of maternal toxicity and no effects on fertility or embryo-foetal survival or development. Treated females appeared to show marginally lower mean numbers of corpora and thus implantations and live young. However, there was no dose response, none of the differences attained statistical significance and review of the individual corpora lutea counts did not reveal any treatment related trend to lower counts. Statistically significantly lower mean placental weights at the high dose level were considered minor and the difference was partly due to one atypically high mean placental weight in the control group. The incidences of left umbilical artery and thinning of the diaphragm with protrusion of liver lobe were slightly higher than concurrent control group. However, both incidences were within the historical control data range and thus no effect of treatment was inferred. One male receiving 100 nmol/kg/day was prematurely sacrificed after exhibiting signs of hypoglycaemia and this was considered to have arisen as the animal had broken top incisors, which hampered the animals normal feeding resulting in the animal becoming hypoglycaemic. Due to the increased bodyweight in males dosed 100 nmol/kg/day, the weight of epididymides and testes relative to bodyweight were decreased. As the findings observed were attributed to the intended pharmacological action or secondary hereto of the test material, the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) for male fertility is considered to be 100 nmol/kg/day, for maternal toxicity and female fertility 60 nmol/kg/day and for embryo-foetal development 60 nmol/kg/day.

Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control)	40 nmol/kg/day	60 nmol/kg/day	100 nmol/kg/day
Males				
Toxicokinetics[a]				
Study day 24				
t_{max} (h)	NA	8	12	4
C_{max} (pmol/L)	NA	302,000	656,000	1,050,000
AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	NA	6,330,000	13,500,000	21,200,000
No. evaluated	22	22	22	22
No. died or sacrificed moribund	0	0	0	1
Number of males with hypoglycaemia[b]	0	0	0	1
Terminal body weight (g)[c]	544	+1	+3	+7**
Body weight gain (g)[c]				
Day 1-8	26	+19*	+38**	+58**
Day 1-15	52	+6	+15*	+33**
Day 29-53	51	-6	+14	+24**
Day 1-53	142	0	+13*	+23**
Food consumption (g/animal/day)[c]				
Days 1-28	30	0	0	+7*
Plasma glucose – study day 24 (mmol/L)				
2 hours	9.56	9.79	8.14	5.64*
4 hours	8.66	8.72	8.85	5.09**
8 hours	12.56	10.32*	10.47*	6.96**
12 hours	10.41	10.66	8.36*	6.24**
24 hours	10.08	10.34	7.50	6.01*
Whole blood glucose (mmol/L)				
At confirmation of mating	6.8	6.8	6.0	4.2**
Organ weights relative to body weight (%)[c]				
Epididymidies	0.259	-4	-4	-8**
Testes	0.686	-3	-4	-8**

Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control)	10 nmol/kg/day	30 nmol/kg/day	60 nmol/kg/day
Foetal:dam exposure: gestation day 19, 24 hours after dosing				
Foetal concentration (pmol/L)	-	740	3200	5600
Maternal concentration (pmol/L)	-	20,000	70,000	120,000
Foetal/maternal ratio	-	0.036	0.045	0.048
Foetal/maternal %	-	3.6	4.5	4.8
Females				
Toxicokinetics[a]				
Gestation day 6				
t_{max} (h)	NA	8	4	8
C_{max} (pmol/L)	NA	91,500	280,000	626,000
AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	NA	1,830,000	5,600,000	12,800,000
Gestation day 17				
t_{max} (h)	NA	8	8	4
C_{max} (pmol/L)	NA	64,800	263,000	416,000
AUC_{0-24h} (h×pmol/L)	NA	1,190,000	4,340,000	7,240,000
No. pregnant	20	22	21	22
No. died or sacrificed	0	0	0	0
No. with total resorption of litter	1	0	0	0
Number of females with hypoglycaemia	0	0	0	0
Body weight gain (g)[c]				
Prior to paring				
Days 1-15	22	+5	+5	+14
During gestation				
Days 0-18	108	+3	+1	-10
Days 18-20	36	-14	-11	-22**
Days 0-20	145	-3	-3	-14*

Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control)	10 nmol/kg/day	30 nmol/kg/day	60 nmol/kg/day
Gravid uterine weight (g)[c]	93	-5	-2	-9
Adjusted body weight change (g)[c]				
Day 0-20	51	+8	0	-24**
Food consumption (g/animal/day)[c]				
Prior to paring				
Days 1-14	19	0	0	+11*
During gestation				
Days 0-17	26	0	0	0
Plasma glucose (mmol/L)				
Gestation day 6				
2 hours	9.01	9.79	8.87	7.09**
4 hours	11.86	9.17**	8.69**	5.05**
8 hours	10.32	8.88	8.56	4.48**
12 hours	11.78	8.39*	8.09**	5.32**
24 hours	9.20	8.52	9.03	6.93*
Gestation day 17				
2 hours	6.90	6.02	6.08	6.05
4 hours	7.00	6.47	6.12	5.61
8 hours	7.78	6.73	7.00	4.32**
12 hours	7.58	6.24*	6.59*	6.35*
24 hours	7.74	6.66	6.53	6.38
No. of corpora lutea	17.9	16.6	16.9	16.8
No of implantations	16.8	16.1	16.6	16.1
No. of live young – males	7.6	8.0	7.6	8.0
No. of live young – females	8.3	6.6	7.9	6.8*
No. of live young – total	15.9	14.6	15.5	14.8

Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control)	10 nmol/kg/day	30 nmol/kg/day	60 nmol/kg/day
Placental weight – gestation on Day 20 (g)[c]	0.58	-2	-5	-10*
Sex ratio (% males)	47.5	54.0	48.0	54.4
Pre-implantation loss (%)	6.0	4.7	2.8	4.7
Post-implantation loss (%)	5.1	9.3	6.8	8.1
Foetal weight - males and females combined (g)[a]	3.66	+3	+3	-1
Minor foetal abnormalities (No. of affected litters/foetuses)				
Left umbilical artery	1/1	1/1	0/0	4/4
Thinning of diaphragm with liver protrusion	0/0	0/0	0/0	3/2
Number of litters/foetuses examined	152/19	161/22	162/21	162/22

- No noteworthy findings.

Statistical methods, Bartlett's test, if homogenous variance, Williams' test for monotonic dose-response or Dunnett's test for non-monotonic dose-response. If logarithmic or square-root transformation failed to achieve homogenous variance, Shirley's tests for monotonic dose-response or Steel's test for non- monotonic dose-response. For pre/post implantation loss, Wald chi-square tests were applied.

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

a – In control animals, exposure was below the Lower Limit of Quantification (LLOQ).

b – Includes animal that died from hypoglycaemic episode.

c – For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

Historical control data on placental weight - Sprague-Dawley (Crl:CD) rat for Study ID 214143 based on 21 studies

	Placental Weight (g)
Min	0.53
Max	0.58
Mean	0.56

Historical control data on selected foetal abnormalities - Sprague-Dawley (Crl:CD) rat for Study ID 214143 based on 12 studies

Study Number	1		2		3		4[a]		5		6	
Treatment period – days of gestation	6 to 17		-14 to 17		6 to 19				6 to 19		6 to 17	
Necropsy start date (month.year)	4.13		5.13		1.13				12.13		12.13	
Visceral abnormalities												
Number foetuses/litters examined at necropsy[b]	149	20	154	21	153	20			156	20	149	20
Umbilical artery - left	3	3	4	4	1	1			3	3	-	-
Diaphragm- thinning with protrusion	-	-	3	2	1	1			1	1	3	3

Study Number	7		8[a]		9		10		11		12	
Treatment period – days of gestation	-28 to 17				6 to 17		6 to 19		6 to 17		6 to 19	
Necropsy start date (month.year)	1.14				2.14		4.14		5.14		7.14	
Visceral abnormalities												
Number foetuses/litters examined at necropsy[b]	76	10			148	20	149	20	156	20	146	19
Umbilical artery - left	-	-	-	-	1	1	1	1	2	2	-	-
Diaphragm- thinning with protrusion	2	1	-	-	-	-	-	-	2	2	3	3

a – Skeletal examination only

b – Individual foetuses/litters may occur in more than one category

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験

Test Article: Insulin icodec

2.6.7.13.A　ニュージーランド白色種ウサギを用いた皮下投与による胚・胎児の発生に関する試験

Test Article: Insulin icodec

Report Title: NNC0148-0000-0287: Study for effects on embryo-foetal development in the New Zealand White rabbit by subcutaneous administration

Study ID: 214091

Design similar to ICH S5 Annex 1, section 1.1.2: Yes		**Location in CTD:** 4.2.3.5.2-2
Species/Strain: Rabbit/ New Zealand White	**Duration of Dosing:** Females: Daily from day 2 to 19 after mating	
	Day of Mating: Day 0	
Initial Age: 23-31 weeks of age at initiation of dosing	**Day of C-Section**: Day 29	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted]	**Method of Administration**: Subcutaneous	
	Formulation/vehicle: [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 206 µg/mL], phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 16 mg/mL, pH 7.4 diluted with an isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, resulting in formulations with concentration ranges of insulin icodec 0-72 nmol/mL and zinc acetate 0-3.533 µg/mL, phenol 0.0134–0.0403 mg/mL, m-cresol 0.0154-0.0463 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL, glycerol 20.91-20.97 mg/mL, pH 7.4.	

Parameters collected:

Females: Toxicokinetics, clinical observations, necropsy observations, body weight (%), food consumption (%).

Litter: Mean No. of corpora lutea, mean No. of implantation sites**,** mean No. of resorptions (early and late), mean % pre- and post-implantation loss, mean live litter size, mean foetal body weight, mean placental weight, foetal sex ratios, foetal pathology (gross external, visceral and skeletal anomalies), total number of affected foetuses and litters

Special Features: Plasma glucose profiling

No Observed Adverse-Effect Level

Maternal: 12 nmol/kg/day

Embryo-foetal development: 18 nmol/kg/day

Brief conclusion: The repeat daily subcutaneous administration to New Zealand White rabbits of insulin icodec, at doses up to 18 nmol/kg/day induced findings consistent with the intended pharmacological effects or secondary effects hereto (reduction in plasma glucose levels and increased food consumption) and as such, are considered not to represent maternal toxicity. Two females receiving 18 nmol/kg/day showed signs of abortion and one further female at this dose level was killed for welfare reasons after exhibiting signs consistent with hypoglycaemia. The abortions as well as the hypoglycaemia related mortality have been seen after dosing with human insulin and with insulin analogues (insulin aspart and insulin detemir) and are therefore considered related to the pharmacological effect of insulin. In addition, a female receiving 12 nmol/kg/day was killed for welfare reasons after exhibiting signs consistent with hypoglycaemia, however, this was attributed to the animal being deprived of food and water overnight following the cage door inadvertently coming open during the night. The incidence of major and minor foetal visceral and skeletal abnormalities revealed no relationship to treatment. The incidence of 20 thoracolumbar vertebra(e), multiple thoracic vertebral and rib abnormalities and unilateral caudal shift pelvic girdle were slightly higher than concurrent control, however, all incidences were within the historical control data range and thus no effect of treatment was inferred. At 6 nmol/kg/day there was one foetus with meningocele. Although outside of historical control data range, in the absence of any other head abnormalities in the other treated groups, this was not considered to be a treatment effect. In the study report, based on the abortions and hypoglycaemia-related mortality, a maternal NOAEL of 12 nmol/kg/day was established. However, as both findings have been seen after dosing with human insulin and with insulin analogues, they are considered related to the pharmacological effect of insulin. Hence, the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) for maternal toxicity is considered to be 18 nmol/kg/day. The NOAEL for embryo-foetal development is considered to be 18 nmol/kg/day.

Daily Dose (nmol/kg/day)	**0 (Control) nmol/kg/day**	**6 nmol/kg/day**	**12 nmol/kg/day**	**18 nmol/kg/day**
Toxicokinetics[a]				
Gestation day 6				
T_{max} (h)	NA	4	8	8
C_{max} (pmol/L)	NA	120,000	268,000	375,000
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	NA	2,290,000	5,600,000	7,640,000
Toxicokinetics[a]				
Gestation day 19				
T_{max} (h)	NA	4	4	8
C_{max} (pmol/L)	NA	121,000	288,000	409,000
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h×pmol/L)	NA	2,590,000	6,020,000	8,370,000
No. of pregnant	20	20	19	21
Total No. sacrificed	0	0	1	3
No. showing signs of abortion[b]	0	0	0	2
No. sacrificed due to hypoglycaemia[c]	0	0	1	1
No. of animals with hypoglycaemia	0	0	1	2

Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control) nmol/kg/day	6 nmol/kg/day	12 nmol/kg/day	18 nmol/kg/day
Body weight change during gestation (kg)[d]				
Days 2-19	0.15	-20	-20	+20
Days 6-19	0.14	-7	-14	+7
Days 19-29	0.16	0	+6	+6
Gravid uterine weight (kg)[d]	0.46	-4	+4	+4
Body weight adjusted to uterine weight (kg)[d]	3.43	-2	+3	-3
Food consumption) during gestation (g/animal/day)[d]				
Days 2-19	117	-2	+2	+9
Days 6-19	116	-1	+1	+11
Days 20-28	109	0	-6	0
Plasma glucose (mmol/L)				
Gestation day 6				
pre-dosing	7.89	7.53	7.28	6.20
1 hour	7.19	7.16	7.03	5.81
2 hours	7.27	7.35	5.98	5.31
4 hours	7.68	6.45	6.93	5.46
8 hours	7.82	6.97	5.42	7.04
24 hours	7.28	8.21	6.90	4.77
Gestation day 19				
pre-dosing	7.13	6.59	7.05	5.53
1 hour	7.28	7.00	7.14	6.59
2 hours	7.53	7.25	6.14	4.38
4 hours	7.46	6.59	5.93	5.25
8 hours	7.19	6.65	5.49	7.51
24 hours	6.75	6.34	6.20	6.33

Daily Dose (nmol/kg/day)	0 (Control) nmol/kg/day	6 nmol/kg/day	12 nmol/kg/day	18 nmol/kg/day
Major foetal abnormalities (No. of affected foetuses/litters)				
Meningocele	0/0	1/1	0/0	0/0
Multiple rib/thoracic vertebral abnormalities	0/0	0/0	1/1	2/2
Cervicothoracic scoliosis	0/0	1/1	0/0	0/0
Thoracic scoliosis	0/0	0/0	1/1	0/0
Lumbar scoliosis	1/1	0/0	0/0	0/0
Sacrocaudal scoliosis	0/0	0/0	0/0	1/1
Number of foetuses/litters examined[e]	134/20	125/20	124/18	123/18
Minor skeletal abnormalities (No. of affected foetuses/litters)				
Pelvic girdle – unilateral caudal shift	3/3	3/3	2/2	6/4
20 Thoracolumbar vertebrae	10/6	15/7	24/7	29/7
Number of foetuses/litters examined[e]	134/20	125/20	124/18	123/18
Number of intact skeletons/litters examined[f]	85/20	77/19	77/18	77/18

- No noteworthy findings.

Statistical methods, Bartlett's test, if homogenous variance, Williams' test for monotonic dose-response or Dunnett's test for non-monotonic dose-response. If logarithmic or square-root transformation failed to achieve homogenous variance, Shirley's tests for monotonic dose-response or Steel's test for non- monotonic dose-response.

* - $p<0.05$ ** - $p<0.01$

a - In control animals, exposure was below the Lower Limit of Quantification (LLOQ).

b – Includes two females receiving 18 nmol/kg/day that showed signs of abortion and was thus sacrificed on gestation day 21 or 22.

c – Includes two animals that died which had suffered hypoglycaemic episodes or had low blood glucose levels.

d – For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

e – The total number of foetuses available for examination including the one third of eviscerated foetuses which were decapitated, and heads stored in Bouin's fluid prior to free-hand serial sectioning and examination for soft tissue abnormalities.

f – The total number of eviscerated foetuses and torsos which were fixed in Industrial Methylated Spirit, processed and stained with Alizarin Red and assessed for skeletal development and abnormalities.

Historical control data on selected foetal abnormalities - in the New Zealand white rabbits for study number 214091 based on 12 studies

Study Number **Necropsy start date (month.year)**	1 4.13		2 7.13		3 7.13		4 8.13		5 9.13		6 11.13	
Major abnormalities												
Number foetuses/litters examined at necropsy[a]	167	20	195	21	154	20	179	21	149	20	133	18
Meningocele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Multiple rib/thoracic vertebral abnormalities	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Cervicothoracic scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thoracic scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lumbar scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Sacrocaudal scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minor skeletal abnormalities												
Number fetuses/litters examined at necropsy[a]	167	20	195	21	154	20	179	21	149	20	133	18
Number of intact skeletons/litters examined	106	20	123	21	96	20	111	21	69	20	81	18
Ribs and vertebral configuration												
Pelvic girdle unilateral caudal shift	4	4	-	-	8	6	6	6	5	5	7	4
20 Thoracolumbar vertebrae	33	12	47	13	33	12	37	14	16	8	22	11

Study Number **Necropsy start date (month.year)**	7 1.14		8 1.14		9[b] 2.14		10 3.14		11 4.14		12 4.14	
Major abnormalities												
Number fetuses/litters examined at necropsy[a]	45	6	165	19	24	3	136	22	156	20	150	18
Meningocele	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Multiple rib/thoracic vertebral abnormalities	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Cervicothoracic scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thoracic scoliosis	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-
Lumbar scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacrocaudal scoliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Study Number	7		8		9[b]		10		11		12	
Necropsy start date (month.year)	1.14		1.14		2.14		3.14		4.14		4.14	
Skeletal abnormalities												
Number fetuses/litters examined at necropsy[a]	45	6	165	19	24	3	136	22	156	20	150	18
Number of intact skeletons/litters examined	28	6	105	19	24	3	87	22	97	20	71	18
Ribs and vertebral configuration												
Pelvic girdle unilateral caudal shift	2	2	4	2	0	0	6	4	7	3	4	4
20 Thoracolumbar vertebrae	11	4	22	9	9	2	15	9	20	11	14	9

a – Individual fetuses/litters may occur in more than one category

b – Skeletal examination only

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

Test Article: Insulin icodec

Report Title: NNC0148-0287: Pre- and Post Natal Development Study in the Sprague Dawley Rat by Daily Subcutaneous Administration

Study ID: 321450

Design similar to ICH S5 Annex 1, section 1.1.3: Yes		**Location in CTD:** 4.2.3.5.3-1
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing**: gestation day 6 to lactation day 20	**Day of Mating:** Day 0
Initial Age: 76 to 82 days at initiation of dosing	**Method of Administration**: Subcutaneous injection	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: [redacted]	**Formulation/Vehicle:** [Stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 101 µg/mL], phenol 5.65 mg/mL, disodium hydrogen phosphate dihydrate 0.53 mg/mL, m-cresol 1.08 mg/mL, glycerol 15 mg/mL, pH 7.4 diluted with a isotonic dilution medium composed of glycerol 21 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, pH 7.4, resulting dose formulations with concentration ranges of insulin icodec 0-50 nmol/mL and zinc acetate 0-1.202 µg/mL, phenol 0.0269-0.0673 mg/mL, m-cresol 0.0051-0.0129 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg /mL, glycerol 20.93-20.97 mg/mL, pH 7.4.	
	Litters Culled/Not Culled: Culled	
Special Features: Toxicokinetic evaluation gestation day 17 and lactation day 11, measurement of blood glucose lactation days 11 and 20 in F0 females and in F1 offspring day 11 of age		

No Observed Adverse-Effect Level
F0 Females: 35 nmol/kg/day
F1 Males: 35 nmol/kg/day
F1 Females: 35 nmol/kg/day

Brief conclusion: Administration of insulin icodec at 50 nmol/kg/day resulted in low body weight gain and food consumption for females during lactation and an increased incidence of females being euthanised. Body weight gain, although not statistically significant, was marginally low during lactation at 35 or 20 nmol/kg/day. As body weight gain was slightly low at 35 nmol/kg/day and no other signs of toxicity were observed, the No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) for maternal toxicity in the F0 generation was 35 nmol/kg/day. Treatment at 50 nmol/kg/day was not associated with any effects in the F1 generation post weaning, however, administration to the parental (F0) females at this level led to a high incidence of pups with clinical signs resembling those of hypoglycaemia, resulting in their death (being found dead or euthanised) and low body weight gain for male and female pups prior to Day 21. The NOAEL for the pre- and post-natal survival of the offspring was 35 nmol/kg/day.

Daily Dose (nmol/kg/day)[a]		0 (Control)	20	35	50
F0 Females:	**Toxicokinetics:**				
	Gestation day 17				
	AUC $_{(0\text{-}24h)}$ (h×pmo/L)	NA	2,730,000	4,700,000	7,320,000
	C_{max} (pmol/L)	NA	146,000	250,000	384,000
	t_{max} (h)	NA	8	8	8
	Lactation day 11				
	AUC $_{(0\text{-}24h)}$ (hr*pmol/L)	NA	2,940,000	4,370,000	7,330,000
	C_{max} (pmol/L)	NA	161,000	232,000	408,000
	t_{max} (h)	NA	8	4	8
	No. pregnant	22	22	22	22
	Mortality				
	Hyperglycaemia mortality	0	0	0	1
	Found dead or euthanized for welfare reasons	0	0	0	1
	Total litter loss	0	0	0	2
	Clinical signs of hypoglycaemia				
	Number of animals with hypoglycaemia	0	0	0	1
	Number of hypoglycaemia episodes per animal	0	0	0	1
	Other clinical signs	-	-	-	-
	Abnormal parturition	0	0	0	1
	Gestation body weight change	-	-	-	-
	Lactation body weight change (g)				
	Days 4-12	22	23	23	21
	Days 13-21	-9	-12	-11	-17
	Days 1-21	19	17	16	9**
	Gestation food consumption	-	-	-	-
	Lactation food consumption (g/animal/day)[b,c]				
	Days 4-13	59	+7	+8	+6
	Days 13-21	74	+4	+4	-10
	Days 1-21	62	+5	+5	-2
	Plasma glucose (mmol/mL)				
	Lactation day 11				
	Pre-dosing	5.57	5.66	4.80	3.06 (2.49)[d]
	2 hours	6.17	6.15	5.07	2.69* (NA)[d]
	4 hours	6.24	4.94	3.98*	3.64* (3.04)[d]

Daily Dose (nmol/kg/day)[a]		0 (Control)	20	35	50
	8 hours	6.49	3.81	3.54	4.02 (3.65)[d]
	24 hours	6.59	5.55	4.67	2.97** (NA)[d]
	Lactation day 20				
	4 hours	6.98	6.06	5.49	4.17** (4.0)[e]
	Mean duration of gestation (days)	22.4	22.6	22.6	22.6
	Macroscopic (all F0 females)	-	-	-	-
F1 Litters: (Preweaning)	**No. litters evaluated**	22	22	22	21
	Toxicokinetics:				
	Lactation day 11 (Number of pups showing exposure)	0	0	1	1
	Exposure in pups (pmol/L)	NA	NA	1,070	350
	Mean no. pups/litter	15.0	15.1	14.6	14.8
	Mean no. liveborn pups/litter	14.8	14.7	14.4	14.2
	Postnatal survival to day 4 of age (Before cull)	14.7	14.6	14.3	14.1
	Postnatal survival to day 4 of age (After cull)	9.8	10.0	9.9	10.0
	Postnatal survival to weaning (lactation index)	7.9	8.0	7.9	7.3
	Lactation day 15 to 18				
	Pup mortality				
	Found dead or euthanized for welfare reasons (no of pups (litters))[e]	0	0	0	29 (7)
	Pup clinical signs				
	Signs resembling those of hypoglycaemia (no of pups (litters))	0	0	0	19 (6)
	Other clinical signs	-	-	-	-
	Change in pup body weights (g)[b]				
	Males				
	Day 1 (after cull)	7.2	-1	-2	-6*
	Days 7-11 of age	9.6	+8	+8	-11**
	Days 11-14 of age	9.0	+5	0	-31**
	Days 14-18 of age	11.5	+7	+8	-20*
	Days 18-21 of age	11.7	+4	+12**	+13**
	Days 1-21 of age	51.2	+6	+8*	-5
	Females				
	Day 1 (after cull)	6.7	+2	0	-4

Daily Dose (nmol/kg/day)[a]		0 (Control)	20	35	50
	Days 7-11 of age	9.2	+10*	+9*	-9
	Days 11-14 of age	8.8	+5	+1	-35**
	Days 14-18 of age	11.1	+6	+9	-13
	Days 18-21 of age	11.5	-1	+7	+4
	Days 1-21 of age	49.6	+5	+7	-7*
	Pup sex ratios	-	-	-	-
	Pup plasma glucose (mmol/mL)				
	Males				
	Day 11 of age, 4 hours	8.48	8.63	8.48	8.15
	Females				
	Day 11 of age, 4 hours	8.38	8.49	8.52	7.81
	Sparse sampling at occasions of clinical signs in pups				
	Male pups with clinical signs	NA	NA	NA	6.35
	Male pups without clinical signs	NA	NA	NA	12.15
	Female pups with clinical signs	NA	NA	NA	7.18
	Female pups without clinical signs	NA	NA	NA	10.26
	Pre-weaning examinations	-	-	-	-
	Pup macroscopy (all animals)				
	Terminally sacrificed	-	-	-	-
	Euthanised or found dead lactation day 15-18 (number/number examined)[f]				
	No milk in stomach	NA	NA	NA	9/29
	Abnormal/dark content in stomach	NA	NA	NA	4/29
F1 Males: (Postweaning)	**No. evaluated postweaning**	20	20	20	20
	No. died or sacrificed moribund	0	0	0	0
	Clinical signs	-	-	-	-
	Body weight Change (g)[b]				
	Days 1-67	412	+2	+4	-3
	Mean age of preputial separation (days)	43.9	44.0	42.7	43.5
	Sensory function	-	-	-	-
	Motor activity	-	-	-	-
	Learning and memory	-	-	-	-

Daily Dose (nmol/kg/day)[a]		0 (Control)	20	35	50
	No. of males that mated	19	20	20	20
	No. of fertile males	18	19	20	20
	Macroscopy	-	-	-	-
F1 Females:	**No. evaluated postweaning**	20	20	20	20
(Postweaning)	**No. died or sacrificed moribund**	0	0	0	0
	Clinical signs	-	-	-	-
	Premating body weight change (g)[b]				
	Days 1-46	159	+3	+6	+1
	Gestation body weight change (g)[b]				
	Days 0-14	75	-3	-13	-8
	Mean age of vaginal patency (days)	33.2	32.6	33.5	33.6
	Sensory function	-	-	-	-
	Motor activity	-	-	-	-
	Learning and memory	-	-	-	-
	No. of females with confirmation of mating	19	20	20	20
	No. of pregnant females	18	19	20	20
	Mean no. corpora lutea	16.2	17.0	16.3	16.4
	Mean no. implantations	15.4	15.9	14.5	15.5
	Mean % preimplantation loss	5.3	6.6	12.8	5.3
	Macroscopy	-	-	-	-

- No noteworthy findings. NA = not applicable. *-$p<0.05$ ** - $p<0.01$ (Williams' test or Dunnett's test)

a – Dose concentrations were halved to 10, 17.5 or 25 nmol/kg/day from Day 21 of gestation up to and including Day 2 of lactation.

b – For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

c – Mean food consumption in the given interval.

d – Blood glucose values of females with dead pups between lactation day 15-18 (single animal values).

e – Blood glucose values of females with dead pups between lactation day 15-18 (mean of four values, animal no 75, 78, 82 and 88).

f – Offspring a F0 female (no. 85) is included. Female no 85 was euthanised due to clinical signs of hypoglycaemia and her 8 offspring not showing any clinical signs together with her.

Historical control data on duration of gestation - in the Sprague-Dawley (Crl:CD) rat approximately 9.5 to 11.5 weeks old at paring for Study ID 321450 based on 7 studies

		Gestation duration (days)				
Pairing date	**Number of pregnant animals**	**22**	**22.5**	**23**	**23.5**	**Gestation index**
Jan-16	22	55	27	18	0	100
Feb-16	22	45	36	14	5	100
May-16	22	36	41	23	0	100
Aug-16	22	36	36	27	0	100
Oct-17	22	48	33	19	0	95
Nov-19	22	24	48	29	0	95
Apr-20	22	45	36	18	0	100
Mean (%)		41.3	36.7	21.1	0.7	98.6
Minimum (%)		24	27	14	0	95
Maximum (%)		55	48	29	5	100

Historical control data on dystocia - in the Sprague-Dawley (Crl:CD) rat for Study ID 321450

Species	Rat
Strain	Sprague-Dawley
Year	2017
Number of studies	2

	Number of females who were euthanised due to difficulties during parturition (dystocia)
Study 1	1
Study 2	2

Historical control data on total litter loss - in the Sprague-Dawley (Crl:CD) rat for study number 321450

Species	Rat
Strain	Sprague-Dawley
Year	2017
Number of studies	1

Number of animals which experienced a total litter loss		**Number of pups live on Day**		
	Implantations			
		Day 1	Day 4	Day 13
1	3	1	0	0

2.6.7.15　幼若動物を用いた試験

No studies have been performed.

2.6.7.16 局所刺激性

Test Article: Insulin icodec

Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rabbit/New Zealand White	Single intravenously 2 and 5 days before sacrifice.	Injection volume 100 µl /injection [stock solution] and vehicle: [insulin icodec: 600 nmol/mL and zinc acetate 19.6 µg/mL] formulated in vehicle of phenol 1.25 mg/mL, disodiumhydrogen phosphate dihydrate 1.5 mg/mL, glycerol 16 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, pH 7.4	5 Females / time point	The clinical signs and macroscopic findings at injection site were similar between insulin icodec and vehicle. Microscopically, minimal to slight focal necrosis, minimal to moderate infiltration of inflammatory cells and minimal to moderate haemorrhage were observed 2 days after injection. A tendency towards more severe changes was observed at the site of needle introduction following injection with insulin icodec compared to vehicle. Five days after injection, minimal to slight focal infiltration of inflammatory cells were observed with no difference between insulin icodec and vehicle. **In conclusion**, single intravenous injection of insulin icodec caused a mild inflammatory reaction 2 and 5 days after injection.	212218
Pig/ Danish Landrace/ Yorkshire/Duroc cross breed	Subcutaneously, 4 single injections at 4 separate injection sites 2, 7, 14 and 28 days before sacrifice. The dosing was done with a NovoPen® 4 fitted with a NovoFine® 30G needle.	Injection volume 100 µl /injection site [stock solution] and vehicle: [insulin icodec 4200 nmol/mL and zinc acetate 220.7 µg/mL] formulated in a vehicle (vehicle 1) of phenol 2.35 mg/mL, m-cresol 2.70 mg/mL, glycerol 16 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, pH 7.4 Vehicle 2: a vehicle containing phenol 1.50	4 Females	Except for a clinically barely perceptible and transient swelling in 2 out of 16 injection sites, the clinical and the macroscopic examinations revealed no changes related to insulin icodec. Microscopically, a mild local reaction with inflammatory cell infiltration and collagenolysis/adipocyte necrosis was seen. The reaction peaked seven days after injection where fibroblast activation was added to the findings. It decreased during the following days with an almost full recovery 28 days after injection. No difference in response was seen when insulin icodec was compared to Vehicle 1 (insulin icodec vehicle) and Vehicle 2 and only minor differences in response were seen when insulin icodec was compared to sterile isotonic saline. **In conclusion**, the tissue reaction was characterized by mild inflammatory changes.	211280

Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
		mg/mL, m-cresol 1.73 mg/mL, glycerol 16 mg/mL and sodium chloride 1.17 mg/mL, pH 7.4 Sterile isotonic saline.			
Minipig/ Ellegaard Göttingen	Subcutaneously, 13 repeated injections at a separate injection site/formulation/pig and single injection 2 days before sacrifice at another injection site/formulation/pig The dosing was done with FlexTouch® pen-injector fitted with a NovoFine® 30G needle.	Injection volume 30 µL/injection site. [stock solution] and vehicle: insulin icodec 4200 nmol/mL, 101 µg/mL zinc acetate ([redacted])] in a vehicle of glycerol 15 mg/mL, phenol 5.65 mg/mL, m-cresol 1.08 mg/mL, sodium chloride 1.17 mg/mL and only in vehicle disodium hydrogen phosphate, dihydrate 0.53 mg/mL, pH 7.4 Sterile isotonic saline (single dose only).	10 Females	For injection of insulin icodec once weekly for 13 weeks, the clinical signs were mild swelling seen at a low incidence. Injections with vehicle revealed very few signs. The single injection in week 14 with insulin icodec, vehicle or saline, revealed at microscopy minimal, focal inflammatory cell infiltration occasionally associated with minimal, focal haemorrhage. Further, the local changes were comparable to the changes recorded after injection of the vehicle or saline. Needle tract lesions as well as focal inflammatory cell infiltrates/oedema were also recorded in the epidermis and upper part of dermis with no difference between treatments. **In conclusion**, the tissue reaction was characterized by mild inflammatory changes.	319245

2.6.7.17　その他の毒性試験

Test Article: Insulin icodec

2.6.7.17.A　その他の毒性試験

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (nmol/kg/day)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
In silico toxicology, Derek Nexus System and Leadscope Model Applier	NA	NA	NA	NA	No alerts for carcinogenicity, chromosome damage, genotoxicity or mutagenicity were identified for the structure insulin icodec linker structure.	322732

2.6.7.17.B　不純物の規格限度値の評価

Impurity group	Rat 26-week study (Study ID 213297)		To be marketed drug product		Animal-to-human exposure ratio
	Batch [redacted]	NOAEL: 60 nmol/kg/day (420 nmol/kg/week)	Proposed specifications[a]	Clinical dose[b]: 2.87 U/kg/week (17.22 nmol/kg/week)	
	Impurity level (%)	Impurity dose (nmol/kg/week)	Impurity level (%)	Impurity dose (nmol/kg/week)	
Hydrophilic impurities	[redacted]	3.36	1.2	0.20664	16
Hydrophilic related substances		18.06	3.9	0.67158	27
Hydrophobic related substances		4.20	2.4	0.41328	10
Hydrophobic impurities		13.02	2.2	0.37884	34
HMWP		2.94	1.5	0.2583	11

a – See 3.2.P.5.1 Specification for Drug Product – 3 ml (same specification limits for all product variants)

b – 2.87 U/kg/week was the average (median) clinical dose in phase 2 and 3 trials (Modelling report, 5.3.3.5)