フィアスプ注フレックスタッチ
フィアスプ注ペンフィル
フィアスプ注 100 単位/mL

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
表目次 3
略語一覧 4
2.6.6.1 まとめ 6
2.6.6.2 単回投与毒性試験 9
2.6.6.3 反復投与毒性試験 9
2.6.6.4 遺伝毒性試験 9
2.6.6.5 がん原性試験 9
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 9
2.6.6.6.1 幼若動物を用いた試験 9
2.6.6.7 局所刺激性試験 10
2.6.6.7.1 Faster aspart－ラットを用いた単回及び反復皮下投与時の局所刺激性（Table 2.6.7.16.A/212251） 10
2.6.6.7.2 Faster aspart－ウサギを用いた単回筋肉内、静脈内又は動脈内投与時の局所刺激性（Table 2.6.7.16.B/212147） 11
2.6.6.7.3 FIA（A、B、C 及び D）－ミニブタを用いた単回皮下投与時の局所刺激性（Table 2.6.7.16.C/209322） 11
2.6.6.8 その他の毒性試験 13
2.6.6.8.1 免疫原性 13
2.6.6.8.2 免疫毒性 13
2.6.6.8.3 メカニズム試験 13
2.6.6.8.4 依存性 13
2.6.6.8.5 代謝物 13
2.6.6.8.6 不純物 13
2.6.6.8.6.1 容器及び施栓系からの溶出物の毒性評価 13
2.6.6.8.7 その他－非臨床安全性評価に関するインスリン アスパルトの文献調査 16
2.6.6.9 考察及び結論 16
参考文献 18

表目次

ページ

表 2.6.6-1　非臨床局所刺激性試験で使用された FIA (A-D)、faster aspart 及びノボラピッド®注の処方組成 7

表 2.6.6-2　Faster aspart 及び異なる FIA 処方（A～D）を用いた非臨床局所刺激性試験の概要 8

表 2.6.6-3　10 mL バイアルからの溶出物に対する臨床曝露量（5°C で 29 箇月保存後、30°C で 4 週間保存） 15

表 2.6.6-4　3 mL カートリッジからの溶出物に対する臨床曝露量（5°C で 29 箇月保存後、30°C で 4 週間保存） 15

略語一覧

AUC	:	area under the concentration-time curve（濃度－時間推移曲線下面積）
$AUC_{0\text{-}15min}$		Area under the curve from 0 to 15 minutes（0～15 分時の濃度－時間推移曲線下面積）
$AUC_{0\text{-}60min}$		Area under the curve from 0 to 60 minutes（0～60 分時の濃度－時間推移曲線下面積）
AUC_{inf}	:	Area under the curve to infinity（濃度－時間推移曲線下面積）
*溶出物A	:	[redacted]
*溶出物A誘導体	:	[redacted]
*溶出物B	:	[redacted]
BSA	:	Body surface a ea（体表面積）
C_{max}	:	Maximal concentration（最高血中濃度）
CSII	:	Continuous subcutaneous insulin infusion（持続皮下インスリン注入療法）
FIA	:	Early formulation in development of fast-acting insulin aspart e.g. FIA (A)（Fast-acting insulin aspart の開発初期段階の略号）
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）
HCl	:	Hydrochloride（塩酸塩）
HDMEC	:	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells（ヒト皮膚微小血管内皮細胞）
i.a.	:	Intra-arterial（動脈内）
Iasp	:	Insulin aspart（インスリン アスパルト）
ICH	:	International Conference on Harmonisation（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
i.d.	:	Intra-dermal（皮内）
i.m.	:	Intra-muscular（筋肉内）
i.v.	:	Intravenous（静脈内）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
LASCA	:	Laser Speckle Contrast analysis（レーザースペックルコントラスト解析）
LLOQ	:	Lower limit of quantification（定量下限未満）
LYD	:	Landrace x Yorkshire x Duroc（ランドレース・ヨークシャー・デュロック種）
LOCI	:	Luminescent Oxygen Channelling Immunoassay（蛍光酸素チャネリング免疫測定法）
NaCl	:	Sodium chloride（塩化ナトリウム）
NDA	:	New Drug Application（新薬の承認申請）
NOAEL	:	No Observed Adverse Effect level（無毒性量）
NOEL	:	No Observed Effect Level（無影響量）
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
P_{app}	:	Apparent permeability（みかけの透過係数）
PD	:	Pharmacodynamic（薬力学的作用）
PDE	:	Permissible daily exposure（許容一日曝露量）

*新薬承認情報提供時に置き換え

P-glucose	:	Plasma glucose（血漿中グルコース）
PK	:	Pharmacokinetic（薬物動態）
PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (Japan)（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）
s.c.	:	Subcutaneous（皮下）
SD	:	Standard deviation（標準偏差）
SEM	:	Standard error of the mean（標準誤差）
SPF	:	Specific pathogen-free（特定病原体不在）
T_{max}	:	Time at maximal concentration（最高血中濃度到達時間）
TTC	:	Threshold of Toxicological Concern（毒性学的懸念の閾値）
U	:	Units（単位）
US	:	United States of America（米国）
^{133}Xe	:	Xenon 133

本 Module 中では、本剤（治験成分記号：NN1218）は faster aspart (fast-acting insulin aspart)と記載する。

2.6.6.1 まとめ

Fast-acting insulin aspart（以下、Faster aspart）はインスリン アスパルトを含有する製剤である。インスリン アスパルトはノボラピッド®注（世界各国における販売名）又はNovoLog®（米国における販売名）として世界中で市販され、15年以上にわたり糖尿病患者に処方されており、実臨床での使用経験及び臨床試験データに基づいた有効性及び安全性プロファイルはよく知られている。Faster aspartは長期間皮下投与で用いる製剤として開発されている。ノボラピッド®注と比較して、faster aspartには2種類の添加剤〔ニコチン酸アミド（ナイアシンアミド又はビタミンB_3としても知られる）及びL-アルギニン塩酸塩〕が追加されている。Faster aspartの処方にニコチン酸アミドを添加することで、皮下投与後のインスリン アスパルトの初期吸収が促進し、ノボラピッド®注と比較して速やかな血糖降下作用がもたらされる。L-アルギニン塩酸塩を添加することで、faster aspart処方の安定化が図られている。分子レベルでは、faster aspart及びノボラピッド®注におけるインスリン アスパルトは同一であることから、インスリン受容体に対し同一の生物学的作用を示す。

ニコチン酸アミド及びL-アルギニン（L-アルギニン塩酸塩として算出）は、faster aspart処方中にそれぞれ20.76 mg/mL（約2.1% w/v）及び3.48 mg/mL（約0.35% w/v）含有される。さらに、塩化亜鉛から酢酸亜鉛へ変更しており、faster aspartではpHが7.4から7.1へわずかに低下している。Faster aspartで使用されるその他の添加剤は、ノボラピッド®注のものと同一であり、適用濃度はノボラピッド®注と同等又はそれ以下である。Faster aspartに含まれるニコチン酸アミド及びL-アルギニンは医薬品添加物として使用実績があり、日本薬局方にも収載されており、faster aspart処方中の各含有量は日本における既承認製剤の最大使用量の範囲内である。

Faster aspartの開発プログラム期間中、最適な処方を選択するため添加剤（ニコチン酸アミド及びL-アルギニン）の濃度を変更した複数の処方について検討した。略語であるFIAの後ろに続く（ ）内の文字は、開発中に試験した複数のfaster aspartの処方の記載に用いる。最終処方はFIA（Q）、すなわちfaster aspartである。非臨床の局所刺激性試験で使用された該当するFIA及びノボラピッド®注の製剤処方における添加剤及び組成の概要を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1　　非臨床局所刺激性試験で使用された FIA (A-D)、faster aspart 及びノボラピッド®注の処方組成

	FIA (A-D)	Faster Aspart (FIA (Q))	NovoRapid®	Function of Ingredient
Insulin aspart	100 U/mL (600 nmol/mL)	100 U/mL (600 nmol/mL)	100 U/mL (600 nmol/mL)	Drug substance
Zinc	[redacted] µg/mL[1)]	19.6 µg/mL[2)]	19.6 µg/mL[1)]	Stabilising agent
Phenol	[redacted] mg/mL	1.50 mg/mL	1.50 mg/mL	Preservative
Metacresol	[redacted] mg/mL	1.72 mg/mL	1.72 mg/mL	Preservative
Glycerol	[redacted]	3.3 mg/mL	16 mg/mL	Tonicity agent
[redacted]	[redacted] mg/mL	-	0.58 mg/mL	Tonicity agent
Disodium phosphate dihydrate	[redacted] mg/mL	0.53 mg/mL	1.25 mg/mL	Buffer
Arginine (as L-arginine HCl)	[redacted] mg/ml	3.48 mg/mL	-	Stabilising agent
Nicotinamide	[redacted] mg/ml	20.76 mg/mL	-	Absorption modifier
[redacted]	[redacted] µg/mL	-	-	Stabilising agent
Sodium hydroxide	[redacted]	q.s.	q.s.	pH adjustment
Hydrochloric acid	[redacted]	q.s.	q.s.	pH adjustment
pH	[redacted]	7.1	7.4	n.a.

1) Added as zinc chloride
2) Added as zinc acetate

Faster aspart はインスリン アスパルトを含有する製剤であることから、faster aspart の非臨床安全性評価は、（1）局所刺激性試験及び（2）溶出物の安全性評価に基づき実施した。さらに、インスリンアスパルト製剤の製造販売承認後、査読付き雑誌に掲載されたインスリン アスパルトの非臨床試験の文献調査を実施した。インスリン アスパルトの毒性プロファイルに関しては、ノボラピッド®注の初回承認申請時の添付資料概要（Module 1.13.01）を参照のこと。

ラット及びウサギを用いた faster aspart（FIA (Q)）の局所刺激性及びミニブタを用いた faster aspart の開発初期の処方（FIA(A-D)）の局所刺激性を評価した。いずれの局所刺激性試験も OECD の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）に準拠して行った。単回皮下投与後の局所刺激性について、異なる濃度の L-アルギニン及びニコチン酸アミド〔FIA（A、B、C 及び D）〕を用いてミニブタで評価した。単回及び反復皮下投与後の局所刺激性について、faster aspart を用いてラットで評価した。反復投与試験では、faster aspart を 1 日 1 回、4 週間注射し、その後 2 週間の回復期間を設けた。FIA（A、B、C 及び D）投与、又は faster aspart と上市済みのインスリン アスパルト製剤であるノボラピッド®注投与を比較した場合、ミニブタ及びラットを用いたこれら 2 試験で認められた組織反応は同様で

あった。さらに、faster aspart を静脈内（i.v.）、筋肉内（i.m.）及び動脈内（i.a.）に単回投与後の局所刺激性をウサギで評価した。Faster aspart を静脈内、筋肉内及び動脈内に単回投与後に認められた局所組織反応は、対照群〔0.9%塩化ナトリウム（NaCl）を投与〕と比較した場合、反応特性及び重症度は同等であった。

実施した局所刺激性試験の概要を表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2　　Faster aspart 及び異なる FIA 処方（A～D）を用いた非臨床局所刺激性試験の概要

Study Type	Species	Route of administration	Formulation	Study ID
Single & multiple dose local tolerance	Rat	s.c.	faster aspart	212251
Single dose local tolerance	Rabbit	i.m., i.v. and i.a.	faster aspart	212147
Single dose local tolerance	Minipig	s.c.	FIA (A, B, C, D)	209322

Note: Faster aspart contains 3.48 mg L-arginine and 20.76 mg nicotinamide/mL. FIA (A, B, C and D) contains [redacted] mg L-arginine/mL and [redacted] mg nicotinamide/mL, respectively.

長期保存後及び製品の使用時条件後の容器及び施栓系からの溶出物の評価から、2 種類の溶出物（*溶出物A 及び　*溶出物B　）が特定された。200 単位/日を投与する重度のインスリン抵抗性患者における *溶出物A の臨床曝露量は、ICH Q3C（医薬品の残留溶媒）で概要が設定された、算出された PDE（2.5 mg/人/日）と比較して 12,500 分の 1 未満であり、　*溶出物B　の曝露レベルは、10mL バイアルでは毒性学的懸念の閾値（TTC、1.5 µg/人/日）と比較して 3.75 分の 1 未満、3 mL カートリッジでは 7.5 分の 1 未満であった。したがって、2 種類の溶出物の毒性学的懸念はないものと考えられる。

インスリン アスパルト製剤の製造販売承認後にインスリン アスパルトの非臨床安全性に問題が認められたか特定するため、製造販売承認後に査読済み雑誌に公表されたインスリン アスパルトの非臨床に関する文献を詳細に調査したが、インスリン アスパルトに関する新たな安全性上の警告は確認されなかった。

結論として、ラット、ウサギ及びミニブタを用いた局所刺激性試験及び溶出物の安全性評価のいずれからも、糖尿病患者への長期投与に際し faster aspart が安全に使用されることが裏付けられた。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

該当なし。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

該当なし。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

該当なし。

2.6.6.5　がん原性試験

該当なし。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

該当なし。

2.6.6.6.1　　幼若動物を用いた試験

該当なし。

2.6.6.7　局所刺激性試験

2.6.6.7.1　Faster aspart－ラットを用いた単回及び反復皮下投与時の局所刺激性（Table 2.6.7.16.A/212251）

本試験の目的は、ラットを用いて代替投与部位である頸部及び上背部に 1 日 1 回 28 日間（4 週間）皮下投与し、インスリン アスパルトの市販製剤であるノボラピッド®注と比較して、faster aspart の局所刺激性を評価することであった。第 28 日の最終投与では左大腿部に皮下投与し、単回投与後の局所反応を評価した。潜在的な局所影響の回復性を評価するため、2 週間の回復期間を設けた。投与操作による反応性を評価するため、0.9% NaCl（faster aspart 及びノボラピッド®注と同一容量）を投与対照として設けた。

特定病原体を保有しない（SPF）Sprague Dawley ラットの雌雄各 32 例を用いて試験を実施した。剖検前日まで 1 日 1 回 28 日間投与した。投与部位を 1 日 1 回 28 日間観察しスコア化した。左後肢部の投与部位は、投与後 5 分間観察しスコア化した。試験中、投与容量を一定〔0.17 mL/動物（100 単位/mL）：102 nmol/動物（17 単位/動物）に相当〕に保った。

0.9% NaCl、ノボラピッド®注及び faster aspart を用いて 1 日 1 回 28 日間皮下投与したが、投与部位における局所反応も又はその他の一般状態変化も認められなかった。体重増加及び摂餌量は全群で同様であった。

肉眼的所見として、頸部（隔日投与、第 1~27 日）及び左後肢部（試験最終日である第 28 日）における投与部位の大部分で皮下の発赤が認められた。さらに、上背部における投与部位の数箇所で微～中程度の皮下の発赤が認められた（隔日投与、第 1~27 日）。変化はノボラピッド®注及び faster aspart 投与群で同様であったが、0.9% NaCl 投与群では明らかな変化は認められなかった。回復群の動物では、投与に関連した肉眼的所見は認められなかった。

病理組織学的所見として、ノボラピッド®注又は faster aspart の反復（及び単回）皮下投与により、しばしば投与部位における皮下の線維化又は筋繊維変性／再生に関連した、皮下の壊死、炎症及び出血を特徴とする極微～中等度の局所反応が認められた。ノボラピッド®注又は faster aspart で認められた局所反応特性及び程度はともに同様であった。リンパ節も評価したが、所見は認められなかった。一般に 0.9% NaCl 対照群では、その他の群と比較して、皮下の炎症性細胞浸潤を除きいずれの所見の発生頻度も低かった。2 週間の回復期間後、全群で部分的な回復性が認められ、ノボラピッド®注及び faster aspart に差異は認められなかった。

結論として、ラットに 0.17 mL/動物（17 単位/動物）のノボラピッド®注又は faster aspart を単回及び 1 日 1 回 4 週間反復皮下投与した結果、極微～中等度の局所反応特性及び程度はともに同様であった。

0.9%NaCl 投与群では明らかな反応性は認められなかった。2 週間の回復期間後、全群で回復傾向が認められ、ノボラピッド®注及び faster aspart に差異は認められなかった。

2.6.6.7.2 Faster aspart－ウサギを用いた単回筋肉内、静脈内又は動脈内投与時の局所刺激性（Table 2.6.7.16.B/212147）

本試験の目的は、ウサギに単回筋肉内、静脈内又は動脈内投与時の faster aspart の局所刺激性を、0.9%NaCl と比較評価することであった。本試験では FIA（R）も組み入れたが、本処方は以降の開発に選択されなかったことから、それ以上検討しなかった。Faster aspart と FIA（R）との違いは、[redacted]含有量（それぞれ 19.6 µg/mL 及び [redacted] µg/mL）であった。

投与操作による組織反応性を評価するため、6 群からなるニュージーランドホワイト種ウサギ（4 例/群）の右大腿部又は耳介に faster aspart 0.1 mL をそれぞれ筋肉内、静脈内又は動脈内投与し、同一個体の左大腿部又は耳介には 0.9% NaCl 0.1 mL を投与した。

投与前、投与後 5、30 分及び 2 時間に投与部位を観察しスコア化した。以降は投与部位を毎日観察した。

ラットに 0.1 mL/動物（10 単位/動物）の faster aspart を単回筋肉内、静脈内又は動脈内投与したが、全身毒性に関する一般状態変化又は局所反応は認められなかった。投与により、投与部位における局所性の壊死、炎症及び出血を特徴とする軽微な病理組織学的変化が誘発された。Faster aspart 及び 0.9% NaCl の筋肉内及び動脈内投与で認められた変化の特性及び程度は同様であった。

概して、全群における局所組織反応は許容可能であり、faster aspart 及び 0.9% NaCl 対照について、局所組織反応特性及び程度は同様と考えられた。

2.6.6.7.3 FIA（A、B、C 及び D）－ミニブタを用いた単回皮下投与時の局所刺激性（Table 2.6.7.16.C/209322）

本試験の目的は、ミニブタに単回皮下投与時の開発初期の faster aspart 処方である FIA（A、B、C 及び D）の局所刺激性を、市販製剤であるノボラピッド®注と比較評価することであった。FIA（A、B、C 及び D）は L-アルギニン及びニコチン酸アミドがそれぞれ [redacted] mg/mL 及び [redacted] mg/mL 含まれている（表 2.6.6-1）。

雌性 Göttingen 系ミニブタ（SPF）20 例（4 例／群）に、試験第 1 及び 4 日に投与した。第 6 日に動物を安楽死させた。すなわち、安楽死 2 及び 5 日前に、雌性 Göttingen 系ミニブタ（SPF）4 例／群の背部に 0.1 mL［（100 単位/mL 濃度）；インスリン アスパルト 60 nmol（10 単位）の単回投与に相当］を単回皮下投与した。さらに、投与操作に関連した組織反応を評価するため、各群 1 例に 0.9% NaCl 0.1 mL

を投与した。投与前に動物を麻酔したが、各投与部位の使用は 1 回のみとした。投与実施日では、投与部位を投与後 5 分間及び 2 時間に観察し、以降は毎日観察した。剖検では、全動物の全投与部位を採取し、病理組織学的検査に供した。

投与部位反応を含め、生存期間中に被験物質に関連した有害な一般状態変化は認められなかった。投与部位の病理組織学的評価の結果、軽度～中等度の炎症性変化及び中等度の出血が認められた。FIA（A、B、C 及び D）投与群で認められた組織反応は、ノボラピッド®注投与群で認められたものと同様であった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　　免疫原性

該当なし。

2.6.6.8.2　　免疫毒性

該当なし。

2.6.6.8.3　　メカニズム試験

該当なし。

2.6.6.8.4　　依存性

該当なし。

2.6.6.8.5　　代謝物

該当なし。

2.6.6.8.6　　不純物

2.6.6.8.6.1 容器及び施栓系からの溶出物の毒性評価

faster aspart 処方の容器及び施栓系は、10 mL ガラス製バイアル及び施栓系としてのラミネートラバーディスク、又は 3 mL ガラス製カートリッジ及び施栓系としてのラミネートラバーディスク及びラバープランジャーのいずれかにより構成される。ラミネートラバーは 3 mL カートリッジの先端部を、ラバープランジャーは底辺部を密封する。2 種類の容器及び施栓系は faster aspart に適すると考えられる。詳細は Module 3.2.P.2.4 を参照のこと。

溶出物の長期保存安定性試験［10 mL バイアル及び 3 mL カートリッジとも 5°C で 29 箇月保
30°C で 4 週間保存］において、2 種類の有機溶出物が認められた。溶出物として認められた *溶出物A
に加えて、自然界に存在する *溶出物A　　*溶出物A誘導体
と添加物である[redacted]との反応性物質である　*溶出物B　　が認められた。

*溶出物A　に関しては、ICH Q3C（医薬品の残留溶媒ガイドライン）[1]で概要が示され、設定された臨床曝露量－許容一日曝露量（PDE）比を算出した（表 2.6.6-3 及び表 2.6.6-4）。　*溶出物B　に関しては、科学文献を調査したものの毒性データを見つけることができなかったことから、ICH M7[2]で設定された臨床曝露量－毒性学的懸念の閾値（TTC、1.5 µg/人/日）比を算出した（表 2.6.6-3 及び表 2.6.6-4）。

*新薬承認情報提供時に置き換え

重度のインスリン抵抗性患者に対してインスリン アスパルトの治療用量として 200 単位/日が投与されていることに基づき、溶出物の臨床曝露量を算出した。

*溶出物A の曝露レベルは 10 mL バイアル及び 3 mL カートリッジ共に算出された PDE（2.5 mg/人/日）と比較して 12,500 分の 1 未満であり、*溶出物B の曝露レベルは、10 mL バイアルで TTC（1.5 µg/人/日）と比較して 3.75 分の 1 未満、3 mL カートリッジで 7.5 分の 1 未満であった。したがって、10 mL バイアル及び 3 mL カートリッジからの溶出物は、長期保存及び製品使用時の規格温度で認められたレベルでは、安全性上の懸念はないと考えられた。

*新薬承認情報提供時に置き換え

表 2.6.6-3 10 mL バイアルからの溶出物に対する臨床曝露量（5°C で 29 箇月保存後、30°C で 4 週間保存）

Compound	CAS no.	Maximal concentration of leachables (µg/mL)[a]	Clinical exposure (µg/day)[b]	PDE (mg/person/day)[c)]	Fold to PDE	Fold to TTC (TTC= 1.5 µg/person/day)
*溶出物A [- -]	[redacted]	0.1	0.2	2.5 [b]	12,500	NA
*溶出物B	[redacted]	0.2	0.4	NA	NA	3.75

[a]Long-term leachable analysis Module 3.2.P.2.4.

[b]The clinical exposure are based on a highly insulin resistant patient receiving 200 U/day (~ 2 ml/person/day)

[c]The PDE is calculated based on toxicological data from scientific literature applying same principle as in ICH Q3C i.e. PDE= NOAEL × 50 kg bw./ (F1 × F2 × F3 × F4 × F5). The PDE is based on a NOAEL of 25 mg/kg/day derived from a reproductive and developmental toxicity study in rats. This NOAEL was the lowest observed NOAEL including assessment of carcinogenicity [3,4]. F1 = 5 (extrapolation from rat to human being), F2 = 10 (variation between individuals), F3 = 1 (safety factor for a reproduction and developmental toxicity study covering the complete period of organogenesis), F4 = 10 (safety factor for reproduction toxicity encountered), F5 = 1 (NOAEL has been used).

NA=not applicable

表 2.6.6-4 3 mL カートリッジからの溶出物に対する臨床曝露量（5°C で 29 箇月保存後、30°C で 4 週間保存）

Compound	CAS no.	Maximal concentration of leachables[a] (µg/mL)	Cinical exposure (µg/person/day)[b]	PDE[c] (mg/person/day)	Fold to PDE	Fold to TTC (TTC= 1.5 µg/person/day)
*溶出物A [--]	[redacted]	0.1	0.2	2.5 [b]	12,500	NA
*溶出物B	[redacted]	0.1	0.2	NA	NA	7.5

[a]Long-term leachable analysis Module 3.2.P.2.4.

[b]The clinical exposure are based on a highly insulin resistant patient receiving 200 U/day (~ 2 ml/person/day)

[c]The PDE is calculated based on toxicological data from scientific literature applying same principle as in ICH Q3C i.e. PDE= NOAEL × 50 kg bw./ (F1 × F2 × F3 × F4 × F5). The PDE is based on a NOAEL of 25 mg/kg/day derived from a reproductive and developmental toxicity study in rats. This NOAEL was the lowest observed NOAEL including assessment of carcinogenicity [3,4]. F1 = 5 (extrapolation from rat to human being), F2 = 10 (variation between individuals), F3 = 1 (safety factor for a reproduction and developmental toxicity study covering the complete period of organogenesis), F4 = 10 (safety factor for reproduction toxicity encountered), F5 = 1 (NOAEL has been used). NA=not applicable

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.6.8.7　その他－非臨床安全性評価に関するインスリン アスパルトの文献調査

潜在的な未知の非臨床安全性上の問題を特定するために、1998 年から 2018 年 1 月までの査読済み雑誌に公表されたインスリン アスパルトの非臨床に関する文献について、詳細に調査した[5, 6, 7]。文献検索には以下のデータベース〔STN online subscription database（TOXCENTER (Toxicology Center)）、Hazardous Substance Data Bank（HSDB）、Integrated Risk Information System（IRIS）、International Agency for Research on Cancer（IARC）及び International Programme on Chemical Safety（IPCS）INCHEM〕を使用し、典型的な毒性用語である毒性（tox）、刺激性（ irritation）、感作性（sensitisation）、変異原性（mutagenicity）、遺伝毒性（genotox）、免疫原性（immunotox）、がん原物質（carcinogen）、催奇形性（teratogenicity）、繁殖毒性（reprotox）等を組み合わせ、絞込みすぎないよう注意を払って検索した。要約すると、インスリン アスパルトに関する非臨床試験の包括的な文献調査を実施したが、新たな有害作用は特定されず、公表されたデータからは、インスリン アスパルトの総括的な非臨床リスク評価に変化は認められなかった。

2.6.6.9　考察及び結論

Faster aspart はインスリン アスパルトを含有する製剤である。インスリン アスパルトはノボラピッド®注として世界中で市販され、15 年以上にわたり糖尿病患者に処方されており、有効性及び安全性プロファイルはよく知られている。したがって、faster aspart 処方の毒性評価は局所刺激性試験及び溶出物の安全性評価に基づいた。なお、インスリン アスパルトの製造承認以降に査読済み雑誌に公表されたインスリン アスパルトの非臨床試験に関する文献を詳細に調査したが、新たな安全性上の警告は特定されなかった。

単回皮下投与後の局所刺激性について、異なる濃度の L-アルギニン及びニコチン酸アミドを用いてミニブタで評価した。Faster aspart の単回及び 1 日 1 回 4 週間反復皮下投与及び 2 週間回復後の局所刺激性をラットで評価した。Faster aspart 及び製造販売承認済みのインスリン アスパルト製剤であるノボラピッド®注で組織反応は同様であることが示された。さらに、faster aspart を静脈内、筋肉内及び動脈内に単回投与後の局所刺激性をウサギで評価した。Faster aspart と対照群（0.9%NaCl）の局所組織反応は、反応特性及び重症度とも同等であった。

長期保存後及び製品の使用時条件後の容器及び施栓系からの溶出物の評価から、2 種類の溶出物（*溶出物A及び　*溶出物B ）が特定された。200 単位/日を投与する重度のインスリン抵抗性患者における *溶出物A の臨床曝露量は、ICH Q3C で概要が設定された、算出された PDE（2.5 mg/人/日）と比較して 12,500 分の 1 未満であり、 *溶出物B　の曝露レベルは、10 mL バイアルでは TTC（1.5 µg/人/日）の 3.75 分の 1 未満、3 mL カートリッジでは 7.5 分の 1 未満であった。したがって、2 種類の溶出物の毒性学的懸念はないものと考えられる。

結論として、ラット、ウサギ及びミニブタを用いた局所刺激性試験及び溶出物の安全性評価のいずれからも、糖尿病患者への長期投与に際し faster aspart が安全に使用されることが裏付けられた。

参考文献

1 ICH Q3C, Impurities: Guideline on residual solvents. 4 Feb 2011.

2 ICH M7, Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, 2014.

3 World Health Organisation (WHO) (1996): 833. *溶出物A . Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. Prepared by the forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives [redacted].

4 European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re evaluation of *溶出物A ([redacted]) as a food additive. EFSA J. [redacted].

5 Andersen DN. Literature Search – Insulin Aspart. 2011.

6 Schou TW. Literature Search – Insulin Aspart. 2015.

7 Schou TW. Literature Search – Insulin Aspart. 2018.

フィアスプ注フレックスタッチ
フィアスプ注ペンフィル
フィアスプ注 100 単位/mL

2.6.7 毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.7.1 毒性試験の一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 5
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 5
2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧 6
2.6.7.5 単回投与毒性試験 7
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 7
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 7
2.6.7.8 遺伝毒性 *in vitro* 7
2.6.7.9 遺伝毒性 *in vivo* 7
2.6.7.10 がん原性試験 7
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 7
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 8
2.6.7.13 重要な生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験 8
2.6.7.14 重要な生殖発生毒性試験：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 8
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 8
2.6.7.16 局所刺激性 9
2.6.7.16.A SD ラットを用いた単回及び 4 週間反復皮下投与時の局所刺激性ならびに 2 週間回復性試験 9
2.6.7.16.B ウサギを用いた単回筋肉内、静脈内又は動脈内投与後 4 日の局所刺激性試験 14
2.6.7.16.C ミニブタを用いた単回皮下投与後 2 及び 5 日の局所刺激性試験 18
2.6.7.17 その他の毒性試験 21

2.6.7.1 毒性試験の一覧表

Test Article:
Faster-acting Insulin Aspart

An abbreviated toxicology programme has been conducted for faster aspart including local tolerance studies and safety assessment of the leachables from container closure system since faster aspart is a new formulation of insulin aspart which has a well-established safety profile from the marketed NovoRapid® (see 2.6.6.1).

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration-of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Local Tolerance								
Single and 4-week multiple dose	Rat, Sprague Dawley	Subcutaneously	Daily dosing for 4 weeks, followed by 2 weeks recovery	0 (0.9% sodium chloride), 102 nmol (17U) FIA (Q or R)[1)], or NovoRapid®/ injection site/day (100U/mL and 0.17mL/injection site)	Yes	CiToxLAB Scantox A/S	212251	4.2.3.6-1
Single dose	Rabbit, New Zealand white	Intramuscular, Intravenous, Intra-arterial	Single injection four days before sacrifice	0 (0.9% sodium chloride), 60 nmol (10U) FIA (Q or R)[1)] / injection site (100U/mL and 0.1mL/injection site)	Yes	CiToxLAB Scantox A/S	212147	4.2.3.6-2
Single dose	Minipig, Göttingen	Subcutaneously	Single injection 2	0 (0.9% sodium chloride), 60 nmol	Yes	LAB Research	209322	4.2.3.6-3

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration-of Dosing	Doses	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
			and 5 days before sacrifice	(10 U) FIA (A, B, C, D) or NovoRapid®/ injection site (100U/mL and 0.1mL/injection site)				

[1)] FIA (Q) = faster aspart. In two studies FIA (R) was also included but was not chosen for further development and therefore will not be discussed any further. The difference between FIA (Q) and (R) was the content of zinc, i.e. 19.6µg/ml and [redacted]µg/ml, respectively. Faster aspart contains 3.48 mg L-arginine and 20.76 mg Nicotinamide/mL.

[2)]FIA (A, B, C and D) contains [redacted] mg L-arginine/mL and [redacted] mg nicotinamide/mL, respectively. For further details see 2.6.7.16.C. See [1)] for content of arginine and nicotinamide in faster aspart.

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Not applicable.

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Not applicable.

2.6.7.4 毒性試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧

Test Articles:
Insulin aspart formulations

Batch No.	Purity (%)	Specified Impurities ( )				Study ID	Type of Study
FIA (A) 100 U/mL: [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	209322	Single Dose Local Tolerance
FIA (B) 100 U/mL: [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	209322	Single Dose Local Tolerance
FIA (C) 100 U/mL: [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	209322	Single Dose Local Tolerance
FIA (D) 100 U/mL: [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	209322	Single Dose Local Tolerance
NovoRapid® 100 U/mL: [redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	209322	Single Dose Local Tolerance
FIA(Q)[1] 100 U/mL: [redacted]	[redacted] [2)]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	212147	Single Dose Local Tolerance
FIA (Q)[1] 100 U/mL: [redacted]	[redacted] [2)]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	212251	Multiple Dose Local Tolerance
NovoRapid® 100 U/mL: [redacted]	[redacted] [2)]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	212251	Multiple Dose Local Tolerance

[1)] FIA (Q) = faster aspart

[2)] The value has been calculated as follows: Purity (%) = [redacted]

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Not applicable.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Not applicable.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Not applicable.

2.6.7.8 遺伝毒性 *in vitro*

Not applicable.

2.6.7.9 遺伝毒性 *in vivo*

Not applicable.

2.6.7.10 がん原性試験

Not applicable.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Not applicable.

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

Not applicable.

2.6.7.13 重要な生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験

Not applicable.

2.6.7.14 重要な生殖発生毒性試験：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

Not applicable.

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

Not applicable.

2.6.7.16 局所刺激性

2.6.7.16.A SD ラットを用いた単回及び 4 週間反復皮下投与時の局所刺激性ならびに 2 週間回復性試験

Test Article:
Faster-acting Insulin Aspart

Species/ Strain	Method of Administration	Dose level	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
SPF Sprague Dawley rats	Daily subcutaneous injection, alternately at two separate injection sites in the inter scapular region (neck and upper back) for 4 weeks. The last dose was administered subcutaneously in the left hind leg on day 28. A 2-week recovery group was included.	Dose volume for all dose levels: 0.17 mL/animal/day. Dose level (control): 0.9% sodium chloride Dose levels: FIA (Q)[1)], FIA (R)[2)] and NovoRapid®: 102 nmol/animal/day (17 U/animal/day). Based on the lowest body weight observed on Day -1, the first dose corresponded to 600 nmol/kg (100 U/kg)	Main animals: 4 groups of 5M + 5F Recovery animals: 4 groups of 3M + 3F	No treatment related clinical signs or injection site reactions were observed following injection with 0.9% sodium chloride, NovoRapid®, FIA (Q) or FIA (R). Body weight gain and food consumption were similar in all four groups. Macroscopically, slight to marked subcutaneous red discoloration was reported in the majority of main study injection sites. There were no differences between NovoRapid®, FIA (Q) and FIA (R) dosed groups, whereas the changes were less pronounced in the group treated with 0.9% sodium chloride. No macroscopic changes were recorded in recovery animals. Microscopically, single and multiple subcutaneous injections of NovoRapid®, FIA (Q) or FIA (R) resulted in minimal to moderate local responses characterised by subcutaneous necrosis, inflammation and haemorrhage, often associated with subcutaneous fibrosis and /or myofiber degeneration/regeneration at the injection sites. No findings were observed in the local lymph nodes evaluated. The local tissue reactions induced by FIA (Q), FIA (R) and NovoRapid® were considered to be similar in nature and severity. In animals dosed with 0.9% sodium chloride the reaction was less pronounced. Following the 2-week recovery period, partial recovery occurred in all groups and no differences were observed when findings in the NovoRapid® group were compared to FIA (Q) or to FIA (R) group.	212251

[1)]FIA (Q) = Faster aspart. [2)]IFIA (R) was also included in this study but was not chosen for further development and therefore will not be discussed any further. The difference between FIA (Q) and (R) was the content of zinc.

Nominal Dose (nmol/kg/day)	0.9% NaCl (Control)	NovoRapid® 600	FIA(Q)[1)] 600	FIA(R) 600	0.9% NaCl (Control)	NovoRapid® 600	FIA(Q)[1)] 600	FIA(R) 600
Number of Animals								
Main	M: 5	M: 5	M: 5	M: 5	F: 5	F: 5	F: 5	F: 5
Recovery	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	F: 3	F: 3	F: 3	F: 3
Histopathology (main)								
Injection site 1[a)]								
Necrosis, focal, sc								
Total	2	2	5	5	1	2	3	3
Grade 1 – minimal	2	1	2	2	0	1	2	1
Grade 2 – slight	0	1	2	3	1	1	1	2
Grade 3 – moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Inflammatory cells, focal, sc								
Total	4	4	5	5	5	5	5	5
Grade 1 – minimal	2	0	0	0	2	2	0	2
Grade 2 – slight	2	2	3	4	3	3	5	3
Grade 3 – moderate	0	2	2	1	0	0	0	0
Haemorrhage, focal, sc								
Total	0	2	5	1	2	2	1	3
Grade 1 – minimal	0	0	2	0	1	0	0	1
Grade 2 – slight	0	2	3	1	0	2	1	0
Grade 3 – moderate	0	0	0	0	1	0	0	2
Fibrosis, subcutis, focal/multifocal								
Total	0	4	3	5	1	4	5	5
Grade 1 – minimal	0	1	0	3	1	3	5	2
Grade 2 – slight	0	3	3	2	0	1	0	3
Degeneration/regeneration myofibers, focal/multifocal								
Total	1	1	3	2	1	3	4	4

Nominal Dose (nmol/kg/day)	0.9% NaCl (Control)	NovoRapid® 600	FIA(Q)[1)] 600	FIA(R) 600	0.9% NaCl (Control)	NovoRapid® 600	FIA(Q)[1)] 600	FIA(R) 600
Grade 1 – minimal	1	1	2	2	1	1	3	4
Grade 2 – slight	0	0	1	0	0	2	1	0
Injection site 2[b)]								
Ulcerations/erosions, focal								
Total	0	0	0	1	0	1	0	0
Grade 1 – minimal	0	0	0	1	0	1	0	0
Necrosis, focal, sc								
Total	0	2	1	1	0	2	1	1
Grade 1 – minimal	0	2	1	1	0	1	1	1
Grade 2 – slight	0	0	0	0	0	1	0	0
Inflammatory cells, focal, sc								
Total	4	5	3	5	2	5	5	3
Grade 1 – minimal	4	4	2	5	2	4	3	2
Grade 2 – slight	0	1	1	0	0	1	2	1
Haemorrhage, focal, sc								
Total	0	0	1	0	0	0	2	1
Grade 1 – minimal	0	0	1	0	0	0	2	0
Grade 2 – slight	0	0	0	0	0	0	0	0
Grade 3 – moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Fibrosis, subcutis, focal/multifocal								
Total	0	0	1	3	0	2	2	1
Grade 1 – minimal	0	0	1	3	0	2	2	1
Degeneration/regeneration myofibers, focal/multifocal								
Total	2	2	4	1	2	2	3	4
Grade 1 – minimal	2	2	2	1	2	2	3	4
Grade 2 – slight	0	0	2	0	0	0	0	0

Nominal Dose (nmol/kg/day)	**0.9% NaCl (Control)**	**NovoRapid® 600**	**FIA(Q)[1)] 600**	**FIA(R) 600**	**0.9% NaCl (Control)**	**NovoRapid® 600**	**FIA(Q)[1)] 600**	**FIA(R) 600**
Injection site 3[c)]								
Ulcerations, focal								
Total	0	0	0	0	0	1	0	0
Grade 1 – minimal	0	0	0	0	0	1	0	0
Necrosis, focal, sc								
Total	0	5	2	2	2	4	2	2
Grade 1 – minimal	0	5	1	1	2	3	2	2
Grade 2 – slight	0	0	1	1	0	1	0	0
Inflammatory cells, focal, sc								
Total	5	5	5	5	5	5	4	5
Grade 1 – minimal	5	2	2	4	4	1	4	3
Grade 2 – slight	0	3	3	1	1	4	0	2
Haemorrhage, focal, sc								
Total	0	4	5	2	1	4	3	4
Grade 1 – minimal	0	3	3	2	1	1	2	3
Grade 2 – slight	0	1	1	0	0	3	1	1
Grade 3 – moderate	0	0	1	0	0	0	0	0
Degeneration/regeneration myofibers, focal/multifocal								
Total	0	3	0	0	0	1	0	2
Grade 1 – minimal	0	3	0	0	0	1	0	2
Histopathology (recovery)								
Injection site 1[a)]								
Inflammatory cells, focal, sc								
Total	2	2	3	3	2	2	3	3
Grade 1 – minimal	1	2	3	1	2	2	3	3
Grade 2 – slight	1	0	0	2	0	0	0	0

Nominal Dose (nmol/kg/day)	0.9% NaCl (Control)	NovoRapid® 600	FIA(Q)[1)] 600	FIA(R) 600	0.9% NaCl (Control)	NovoRapid® 600	FIA(Q)[1)] 600	FIA(R) 600
Fibrosis, subcutis, focal/multifocal								
Total	0	1	2	1	0	1	1	0
Grade 1 – minimal	0	1	2	1	0	1	1	0
Injection site 2[b)]								
Inflammatory cells, focal, sc								
Total	1	1	1	2	0	0	1	2
Grade 1 – minimal	1	1	1	1	0	0	1	2
Grade 2 – slight	0	0	0	1	0	0	0	0
Fibrosis, subcutis, focal/multifocal								
Total	0	0	0	1	0	0	0	0
Grade 1 – minimal	0	0	0	1	0	0	0	0
Degeneration/regeneration myofibers, focal/multifocal								
Total	1	0	0	0	0	0	0	0
Grade 1 – minimal	1	0	0	0	0	0	0	0
Injection site 3[c)]								
Inflammatory cells, focal, sc								
Total	1	0	0	1	0	1	0	0
Grade 1 – minimal	1	0	0	1	0	1	0	0
Degeneration/regeneration myofibers, focal/multifocal								
Total	0	0	0	0	1	0	0	0
Grade 1 – minimal	0	0	0	0	1	0	0	0

1) FIA (Q): Faster aspart
a) Neck (alternating dosing every second day), pooled examination
b) Upper back (alternating dosing every second day), pooled examination
c) Left hind leg (single dose, last day of the study, Day 28), pooled examination

2.6.7.16.B ウサギを用いた単回筋肉内、静脈内又は動脈内投与後 4 日の局所刺激性試験

Test Article:
Faster-acting Insulin Aspart

Species/ Strain	Method of Administration	Dose level (per injection site)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Rabbit / New Zealand white	Single intramuscular, intravenous and intra-arterial injection 4 days before sacrifice	Test item was injected in the right side and 0.9% sodium chloride injected in the left side. **Group 1**, Intramuscular: 0.1 mL FIA (Q)[1)] (60 nmol (10 U/injection)) and 0.1 mL 0.9% sodium chloride **Group 2**, Intravenous: 0.1 mL FIA (Q) (60 nmol (10 U/injection)) and 0.1 mL 0.9% sodium chloride **Group 3**, Intra-arterial: 0.1 mL FIA (Q) (60 nmol (10 U/injection)) and 0.1 mL 0.9% sodium chloride **Group 4**, Intramuscular: 0.1 mL FIA (R)[2)] (60 nmol (10 U/injection)) and 0.1 mL 0.9% sodium chloride **Group 5**, Intravenous: 0.1 mL FIA (R) (60 nmol (10 U/injection)) and 0.1 mL 0.9% sodium chloride **Group 6**, Intra-arterial: 0.1 mL FIA (R) (60 nmol (10 U/injection)) and 0.1 mL 0.9% sodium chloride	4 females per group	No treatment related findings were seen on body weights, food consumption and general clinical signs. Local reactions at injection sites during the study revealed only minor observations and no notably differences between FIA (Q), FIA (R) and 0.9% sodium chloride treated groups were seen. The injections caused mild histopathological changes, characterised by minimal to slight focal necrosis, inflammation and haemorrhage at the injection sites. The changes observed in the intramuscular and intra-arterial injection sites following injection with FIA (Q) or FIA (R) and 0.9 % sodium chloride were similar in nature and severity. At the intravenous injection sites changes of a slightly higher grade and incidence were noted following injection with FIA (Q) or FIA (R) compared to intravenous injection with 0.9% sodium chloride. These changes were all mild and most likely representative of minor variations of local tissue reactions, which can be caused by the procedure itself. Overall, the local tissue reactions in all groups were considered to be mild and of similar nature and severity between FIA (Q), FIA (R) and 0.9% sodium chloride.	212147

[1)]FIA (Q) = Faster aspart. [2)]IFIA (R) was also included in this study but was not chosen for further development and therefore will not be discussed any further. The difference between FIA (Q) and (R) was the content of zinc.

Nominal Dose (nmol/injection)	**i.m. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.m. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**		**i.v. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.v. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**		**i.a. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.a. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**	
Number of Animals	F: 4		F: 4		F: 4		F: 4		F: 4		F: 4	
Histopathology												
Injection site (pooled examination)	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Inflammation, focal												
Total	3	2	4	2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Grade 1 – minimal	3	2	3	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Grade 2 – slight	0	0	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Haemorrhage, focal												
Total	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Grade 1 – minimal	0	0	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Grade 2 – slight	0	0	1	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Myofibre necrosis/regeneration, focal												
Total	2	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Grade 1 – minimal	2	1	0	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Myofiber necrosis, focal												
Total	0	0	2	2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Grade 1 – minimal	0	0	2	2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Injection site (Introduction of the needle)	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Infiltration of inflammatory cells, focal, mainly lymphoplasmocytic cells and fibroblasts/oedema												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	1	3	0	2	2	2	1	1
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	1	3	0	2	0	1	1	1
Grade 2 – slight	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	2	1	0	0
Necrosis, perivascular												

Nominal Dose (nmol/injection)	**i.m. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.m. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**		**i.v. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.v. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**		**i.a. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.a. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**	
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	2	0	0	1	0	0	0
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	2	0	0	1	0	0	0
Necrosis, vascular												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	3	0	1	0	0	0	0
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	2	0	1	0	0	0	0
Grade 2 – slight	N/A	N/A	N/A	N/A	0	1	0	0	0	0	0	0
Haemorrhage, focal, perivascular												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	1	1	2
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	1	1	2
Crust, focal												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	0	0	0
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	0	0	0
Intimal proliferation, focal												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	0	0	1	0
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	0	0	1	0
Injection site (Tip of the needle)	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
Infiltration of inflammatory cells, focal, mainly lymphoplasmocytic cells and fibroblasts/oedema												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	0	0	2
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	0	0	1
Grade 2 – slight	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	0	0	0	1
Necrosis, perivascular												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	1	0	1
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	0	1	0	0
Grade 2 – slight	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	0	0	1

Nominal Dose (nmol/injection)	**i.m. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.m. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**		**i.v. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.v. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**		**i.a. 0.9%NaCl / FIA(Q)[1] 60**		**i.a. 0.9%NaCl / FIA(R) 60**	
Necrosis, vascular												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	0	0	0
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	1	0	0	0	0
Haemorrhage, focal, perivascular												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	1	1	1
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	0	1	1
Grade 2 – slight	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	0	1	0	0
Injection site	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
(Proximal to the tip of the needle)												
Infiltration of inflammatory cells, focal, mainly lymphoplasmocytic cells and fibroblasts/oedema												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0	1	0	0	1
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	1	0	1	0	0	0
Grade 2 – slight	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	0	0	0	1
Necrosis, perivascular												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	0	0	0
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	0	0	0
Haemorrhage, focal, perivascular												
Total	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	0	0	2
Grade 1 – minimal	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	0	0	0	2
Grade 2 – slight	N/A	N/A	N/A	N/A	0	0	0	0	1	0	0	0

1) FIA (Q): Faster aspart
L: Left site (0.9% NaCl)
R: Right site (test article)
N/A: Not applicable

2.6.7.16.C ミニブタを用いた単回皮下投与後２及び５日の局所刺激性試験

Test Article:
FIA (A), FIA (B), FIA (C) and FIA (D)

<table>
<tr><th>Species/ Strain</th><th>Method of Administration</th><th>Dose (nmol/injection site)</th><th>Gender and No. per Group</th><th>Noteworthy Findings</th><th>Study ID</th></tr>
<tr>
<td>Göttingen SPF minipigs</td>
<td>Single subcutaneous injection 2 and 5 days before sacrifice</td>
<td>Four different formulations (see table below) of insulin aspart were compared with the marketed formulation of insulin aspart, NovoRapid®.
Injections with 0.1mL 0.9% sodium chloride were included to evaluate the reaction of the injection procedure.
0.1 mL corresponding to 60 nmol (10 U/injection) was injected per injection site.

Overview of excipients in the FIA(A-D) formulations
<table>
<tr><th rowspan="2">(Formulation code)</th><th>Insulin aspart</th><th>Arginine HCl</th><th>Nicotinamide</th><th>[redacted]</th><th>[redacted]</th></tr>
<tr><td>U/mL</td><td>mmol/L (mg/mL)</td><td>mmol/L (mg/mL)</td><td>mmol/L (mg/mL)</td><td>mg/L</td></tr>
<tr><td>FIA (A)</td><td>100</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td></tr>
<tr><td>FIA (B)</td><td>100</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td></tr>
<tr><td>FIA (C)</td><td>100</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td></tr>
<tr><td>FIA (D)</td><td>100</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td><td>[redacted]</td></tr>
<tr><td>E (NovoRapid®)</td><td>100</td><td>-</td><td>-</td><td>10 (0.58)</td><td>-</td></tr>
<tr><td>F [redacted]</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>[redacted]</td><td>-</td></tr>
</table>
Note: Formulation E contains additionally 16 mg glycerol/mL</td>
<td>Five groups of 4 females. Each group was injected with FIA (A), FIA (B), FIA (C), FIA (D) or NovoRapid®. In addition, one animal of each group was also injected with 0.9% sodium chloride.</td>
<td>No FIA formulation related adverse clinical signs were observed during the in-life period including reactions at the injection sites.

The histopathological evaluation of the injection sites showed mild to moderate inflammatory changes and mild to moderate haemorrhage with no difference between the different FIA formulations.
The tissue reactions in the animals dosed with formulations (A, B, C, D) were similar to those observed in the animals dosed with NovoRapid®.</td>
<td>209322</td>
</tr>
</table>

Nominal Dose (nmol/injection)	FIA(A) 60	FIA(B) 60	FIA(C) 60	FIA(D) 60	NovoRapid® 60	Control (0.9%NaCl)
Number of Animals	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 4	F: 5
Histopathology						
Injection site (2 days after injection)						
Inflammation, focal/multifocal, primarily macrophages and neutrophilic granulocytes, subcutis						
Total	1	0	0	1	0	1
Grade 1 – minimal	1	0	0	1	0	1
Focal accumulation of inflammatory cells, neutrophilic granulocytes/Macrophages, subcutis						
Total	3	3	2	3	4	0
Grade 1 – minimal	2	3	2	3	4	0
Grade 2 – slight	1	0	0	0	0	0
Haemorrhage, subcutis, focal						
Total	4	3	4	3	3	1
Grade 1 – minimal	2	1	3	2	3	1
Grade 2 – slight	2	2	1	1	0	0
Needle canal						
Total	4	2	2	3	2	2
Injection site (5 days after injection)						
Inflammation, focal/multifocal, primarily macrophages and neutrophilic granulocytes, subcutis						
Total	2	1	3	3	3	1
Grade 1 – minimal	0	1	3	3	1	0

Nominal Dose (nmol/injection)	**FIA(A) 60**	**FIA(B) 60**	**FIA(C) 60**	**FIA(D) 60**	**NovoRapid® 60**	**Control (0.9%NaCl)**
Grade 2 – slight	1	0	0	0	1	1
Grade 3 – moderate	1	0	0	0	1	0
Focal accumulation of inflammatory cells, neutrophilic granulocytes/Macrophages, subcutis						
Total	2	3	1	1	0	1
Grade 1 – minimal	2	3	1	1	0	1
Haemorrhage, subcutis, focal						
Total	2	2	4	4	4	2
Grade 1 – minimal	0	2	1	3	3	2
Grade 2 – slight	2	0	2	0	1	0
Grade 3 – moderate	0	0	1	1	0	0
Needle canal						
Total	1	3	3	1	3	1

2.6.7.17 その他の毒性試験

Not applicable.