

審議結果報告書

平成 20 年 3 月 6 日
医薬食品局審査管理課

[販売名] ヒュミラ皮下注 40mg
[一般名] アダリムマブ (遺伝子組換え)
[申請者] アボットジャパン株式会社
[申請年月日] 平成 17 年 12 月 26 日

[審議結果]

平成 20 年 2 月 22 日に開催された医薬品第一部会において、本品目を承認して差し支えないとされ、薬事・食品衛生審議会薬事分科会に報告することとされた。

なお、本品目は生物由来製品に該当し、再審査期間は 8 年とし、原体及び製剤ともに劇薬に該当するとされた。

医療事故防止の観点から、販売名を「ヒュミラ皮下注 40mg」から「ヒュミラ皮下注 40mg シリンジ 0.8mL」に変更することとした。

本剤については、下記の 3 点を承認条件とした。

1. 製造販売後、一定数の症例に係るデータが蓄積されるまでの間は、全症例を対象に使用成績調査を実施することにより、本剤の安全性及び有効性に関するデータを早期に収集し、本剤の適正使用に必要な措置を講じること。
2. 大規模な製造販売後調査を実施し、本剤の安全性について十分に検討するとともに、長期投与時の安全性、感染症等の発現について検討すること。
3. 本剤の有効性（関節破壊の進展防止に関する評価を含む）及び安全性等を確認するため、適切な対照群をおいた長期（1 年以上）にわたる二重盲検比較臨床試験を製造販売後に実施すること。

審査報告書

平成 20 年 2 月 14 日

独立行政法人医薬品医療機器総合機構

承認申請のあった下記の医薬品にかかる医薬品医療機器総合機構での審査結果は、以下のとおりである。

記

- [販 売 名] ヒュミラ皮下注 40 mg
[一 般 名] アダリムマブ (遺伝子組換え)
[申 請 者 名] アボットジャパン株式会社
[申請年月日] 平成 17 年 12 月 26 日
[剤型・含量] 1 シリンジ 0.8 mL 中にアダリムマブ (遺伝子組換え) 40mg を含有する注射剤
[申請区分] 医療用医薬品 (1) 新有効成分含有医薬品
[化学構造]

分子量：約 148000

構造式：下記、図 1～図 3 参照

化学名又は本質：

(日本語) ヒト抗ヒト TNF α モノクローナル抗体である IgG₁ の重鎖 (γ 1 鎖) 及び軽鎖 (κ 鎖) をコードする cDNA の発現によりチャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される 451 個のアミノ酸残基 (C₂₁₉₇H₃₃₉₆N₅₈₄O₆₇₈S₁₅ ; 分子量 : 49,318.95, C 末端のリジン残基が欠落しているもの C₂₁₉₁H₃₃₈₄N₅₈₂O₆₇₇S₁₅ ; 分子量 : 49,190.78 を含む) からなる重鎖 2 分子と 214 個のアミノ酸残基 (C₁₀₂₇H₁₆₀₆N₂₈₂O₃₃₂S₆ ; 分子量 : 23,407.82) からなる軽鎖 2 分子からなる糖たん白質 (分子量約 148,000)

(英語) Glycoprotein (molecular weight: ca. 148,000) consisting of two molecules of light chain, each containing 214 amino acid residues (C₁₀₂₇H₁₆₀₆N₂₈₂O₃₃₂S₆; molecular weight: 23,407.82) and two molecules of heavy chain, each containing 451 amino acid residues (C₂₁₉₇H₃₃₉₆N₅₈₄O₆₇₈S₁₅; molecular weight: 49,318.95; including a molecule lacking C-terminal lysine residue 451, C₂₁₉₁H₃₃₈₄N₅₈₂O₆₇₇S₁₅; molecular weight: 49,190.78) produced in Chinese hamster ovary cells transfected with a cDNA encoding heavy chain (γ 1-chain) and light chain (κ -chain) of IgG₁, human anti-human tumor necrosis factor α monoclonal antibody.

[特記事項] なし
 [審査担当部] 新薬審査第四部

図1 アダリムマブ（遺伝子組換え）の軽鎖サブユニットのアミノ酸配列

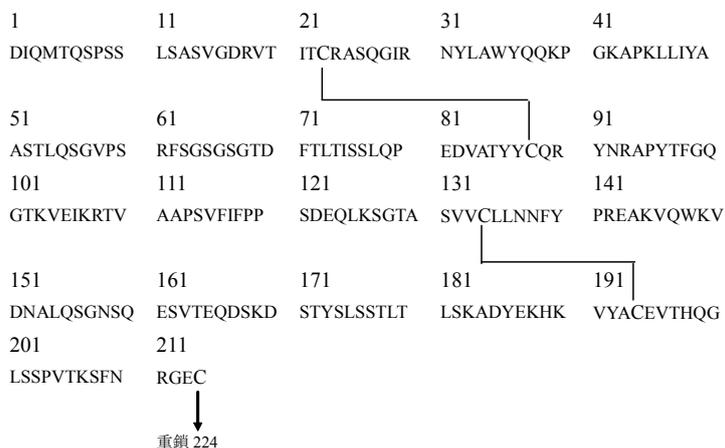
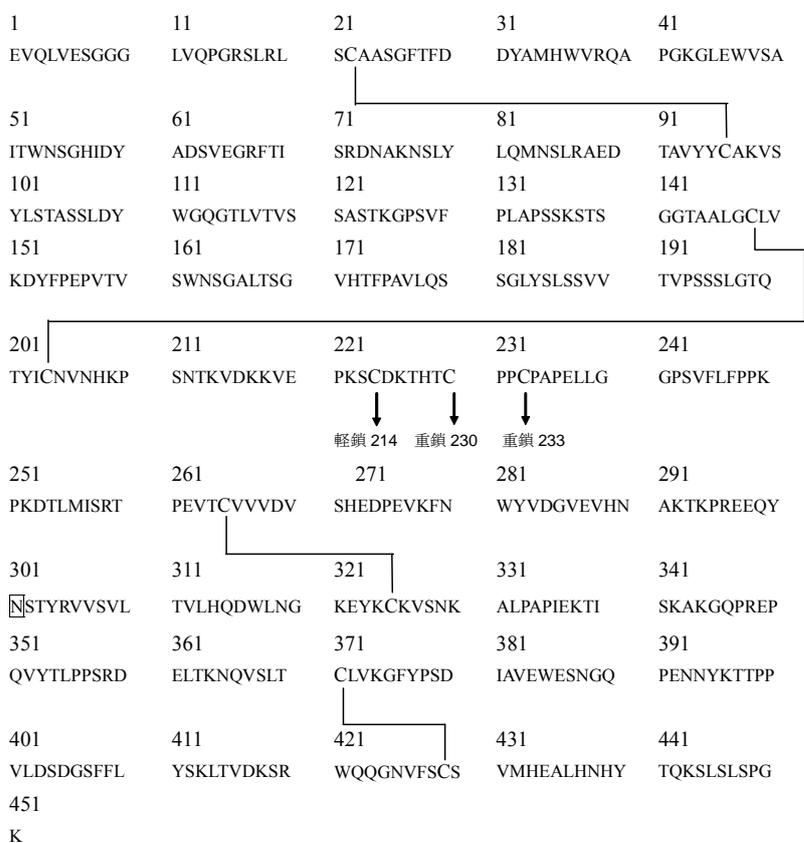
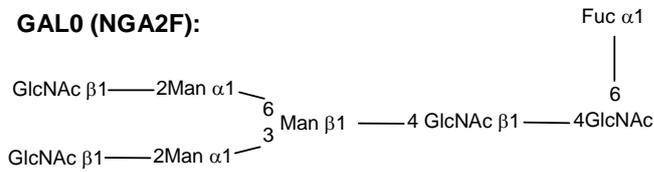


図2 アダリムマブ（遺伝子組換え）の重鎖サブユニットのアミノ酸配列

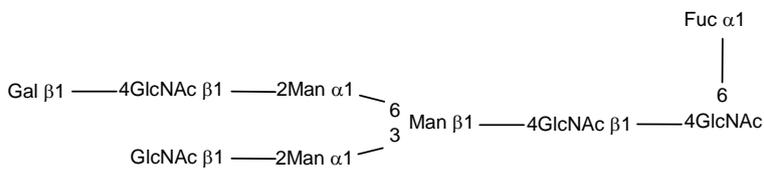
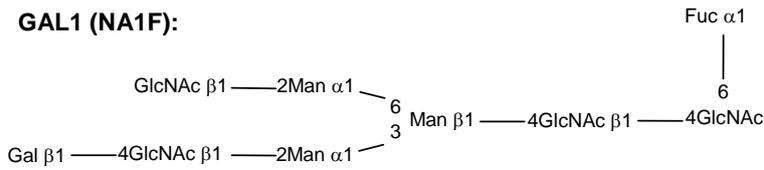


□ : 糖鎖結合位置

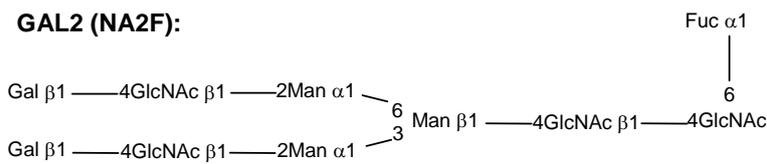
GAL0 (NGA2F):



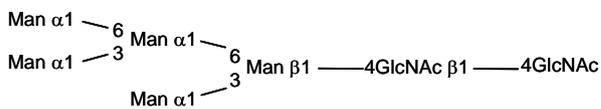
GAL1 (NA1F):



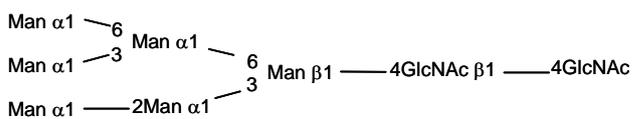
GAL2 (NA2F):



Man5:



Man6:



NGA2F-GlcNAc:

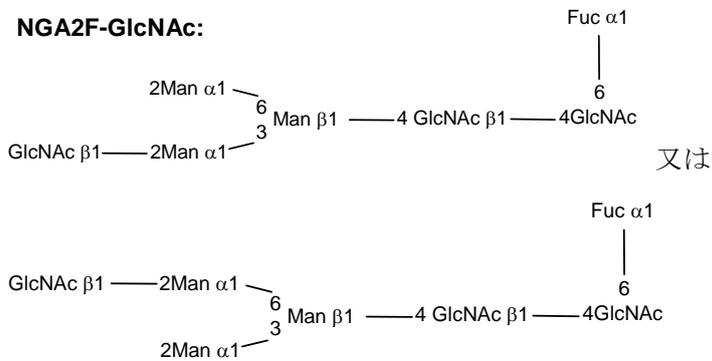


図3 アダリムマブ（遺伝子組換え）の推定糖鎖構造

審査結果

平成 20 年 2 月 14 日

[販 売 名] ヒュミラ皮下注 40 mg
[一 般 名] アダリムマブ（遺伝子組換え）
[申 請 者 名] アボットジャパン株式会社
[申請年月日] 平成 17 年 12 月 26 日
[審査結果]

提出された資料から、関節リウマチに対する本剤の有効性及び安全性が示されたと判断する。

有効性については、ブリッジングコンセプトに基づいた国内における用量反応性試験、海外第Ⅲ相二重盲検比較試験等の成績から示されたと判断する。安全性については、感染症等の重篤な副作用も報告されていることから、本剤の投与に際しては、患者の症状等を十分に観察した上で、リスク・ベネフィットを慎重に判断すること、患者に対しても本剤のリスクを十分に説明することが必要であり、投与後も患者の経過を注意深く観察する必要があると考える。また、自己投与の実施に当たっては、医師、患者等に十分な教育を行い、有効性が確認でき患者自らが適切に自己投与を実施できると判断できる場合にのみ実施すべきであり、自己投与後の症状の推移、副作用の発現等を注意深く観察する必要があると考える。製造販売後には全投与症例を対象とした大規模な製造販売後調査、悪性腫瘍、感染症等の発現について検討する長期特定使用成績調査を実施する必要がある。さらに関節破壊の進展防止効果についても製造販売後に臨床試験において明確化すべきと考える。

以上、医薬品医療機器総合機構における審査の結果、本品目については、下記の承認条件を付した上で、以下の効能・効果、用法・用量で承認して差し支えないと判断した。

[効能・効果] 関節リウマチ（既存治療で効果不十分な場合に限る）
[用法・用量] 通常、成人にはアダリムマブ（遺伝子組換え）として 40mg を 2 週に 1 回、皮下注射する。なお、効果不十分な場合、1 回 80mg まで増量できる。
[承認条件] (1) 製造販売後、一定数の症例に係るデータが蓄積されるまでの間は、全症例を対象に使用成績調査を実施することにより、本剤の安全性及び有効性に関するデータを早期に収集し、本剤の適正使用に必要な措置を講じること。
(2) 大規模な製造販売後調査を実施し、本剤の安全性について十分に

検討するとともに、長期投与時の安全性、感染症等の発現について検討すること。

(3) 本剤の有効性（関節破壊の進展防止に関する評価を含む）及び安全性等を確認するため、適切な対照群をおいた長期（1年以上）にわたる二重盲検比較臨床試験を製造販売後に実施すること。

審査報告（1）

平成 20 年 1 月 17 日作成

I. 申請品目

- [販 売 名] ①ヒュミラ皮下注用 40mg、②ラヒーラ皮下注用 40mg（申請時）
- [一 般 名] アダリムマブ（遺伝子組換え）
- [申 請 者 名] ①アボットジャパン株式会社、②エーザイ株式会社
- [申 請 年 月 日] 平成 17 年 12 月 26 日
- [剤 型 ・ 含 量] 1 シリンジ 0.8 mL 中にアダリムマブ（遺伝子組換え）40mg を含有する注射剤
- [申 請 時 効 能 ・ 効 果] 関節リウマチ（既存治療で効果不十分な場合に限る）
- [申 請 時 用 法 ・ 用 量] 通常、成人にはアダリムマブ（遺伝子組換え）として 40mg を 2 週に 1 回、皮下注射する。なお、効果不十分な場合、1 回 80mg まで増量できる。

II. 提出された資料の概略及び医薬品医療機器総合機構における審査の概略

本申請において、申請者が提出した資料及び医薬品医療機器総合機構（機構）からの照会事項に対する申請者の回答の概略は、以下のようなものであった。

1. 起原又は発見の経緯及び外国における使用状況等に関する資料

本剤の有効成分であるアダリムマブ（遺伝子組換え）（本薬）は、Knoll 社によりファージディスプレイ法を用いて作製された、ヒトの腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor、TNF） α に対し高い親和性と選択性を有する IgG1 サブクラスのヒト型抗ヒト TNF α モノクローナル抗体である。本薬は炎症反応、免疫反応において過剰に発現する TNF α と結合し、TNF α と細胞表面の TNF α 受容体との結合を阻害することにより、炎症性疾患に対し薬効を発現すると考えられている。

本剤は関節リウマチ（RA）の効能で米国においては 2002 年 12 月、EU においては 2003 年 9 月に承認されている。また、その後、欧米では、関節症性乾癬、クローン病等の効能でも承認されており、2007 年 12 月現在、本剤は RA の効能で 72 ヶ国、関節症性乾癬の効能で 62 ヶ国で、クローン病の効能で 41 ヶ国及び乾癬の効能で 29 ヶ国で承認されている。

本剤の RA に対する本邦における臨床開発は、20■■年■■月より開始された。申請者は、国内第Ⅱ/Ⅲ相試験を ICH E5 ガイドラインに基づくブリッジング試験として実施し、海外臨床試験の外挿が可能と判断して、今般、RA を効能・効果とする製造販売承認申請を行った。

本剤は「ヒュミラ皮下注用 40mg」及び「ラヒーラ皮下注用 40mg」として申請されたが、リスクマネージメントの観点から、販売名を「ヒュミラ皮下注 40mg」及び「ラヒーラ皮下

注 40mg」に変更する旨が申請者より説明され、機構はこれを了承した。

2. 品質に関する資料

<提出された資料の概略>

(1) 原薬

本薬は、ヒト抗ヒト TNF α モノクローナル抗体である IgG1 の重鎖 (γ 1 鎖) 及び軽鎖 (κ 鎖) をコードする cDNA の発現によりチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で産生される 451 個のアミノ酸残基 (C₂₁₉₇H₃₃₉₆N₅₈₄O₆₇₈S₁₅; 分子量: 49318.95、C 末端のリジン残基が欠落しているもの C₂₁₉₁H₃₃₈₄N₅₈₂O₆₇₇S₁₅; 分子量: 49190.78) からなる重鎖 2 分子と 214 個のアミノ酸残基 (C₁₀₂₇H₁₆₀₆N₂₈₂O₃₃₂S₆; 分子量: 23407.82) からなる軽鎖 2 分子からなる糖たん白質 (分子量約 148000) である。重鎖は C 末端のリジン残基が 0 個、1 個又は 2 個の混合物である。16 本のジスルフィド結合を有し、重鎖の 301 番目のアスパラギン残基に N-アセチルグルコサミン、マンノース、フコース及びガラクトースより構成される複合型二本鎖糖鎖及び高マンノース型糖鎖が結合している。糖鎖含量はアダリムマブの重量の約 ■ % を占める。

1) 製造方法

① セルバンクシステムの構築

マウス抗ヒト TNF α 抗体 ■■■■■ と同じ中和エピトープを認識するヒト抗 TNF α 抗体の可変領域遺伝子 ■■■■■ をファージディスプレイ法により作製し、■■■■■ 法によりヒト TNF α に対し高親和性を有するアダリムマブ D2E7 を得た。D2E7 の重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子をそれぞれ含む中間ベクター (■■■■■ 及び ■■■■■) を構築した後、これら抗体遺伝子を含む断片を結合し、■■■■■ (アダリムマブ発現ベクター) が構築された。その後、■■■■■ を CHO 細胞 (■■■■■) にトランスフェクションし、ヒト IgG 生産能及びメトトレキサート (MTX) 存在下での増殖能を指標に製造用細胞株が (A*) クローニングされた。この細胞株 (A*) を、MTX を含む PFCHO 増殖培養液中で増殖し、プレマスター・セル・バンク (PMCB)、続いてマスターセルバンク (MCB) が調製された。さらに、MCB からワーキングセルバンク (WCB) が調製された。

② セルバンクの性質及び管理

MCB、WCB 及び医薬品製造のために製造条件を超えて培養された細胞 (CAL) について、純度試験 (下表) 及び特性解析試験 (下表) が実施された。WCB では性能試験 (細胞増殖、培養細胞の細胞生存率、集積生存細胞密度及びハーベスト時のアダリムマブ力価) も行われた。増殖培養液を用いて、各 WCB の培養細胞の性能試験を評価した結果、全て同等であり、規格に適合した。

*: 新薬承認情報提供時に置き換え

表 セルバンク等における純度試験一覧

試験項目	結果		
	MCB	WCB	CAL
マイコプラズマ			
無菌試験（細菌・真菌）			
アイソザイム解析			
ウイルス試験	マウス抗体産生（MAP）試験		
	ハムスター抗体産生（HAP）試験		
	<i>in vivo</i> ウイルス検査（マウス、授乳マウス、モルモット、発育鶏卵（ 、 ）に接種）		
	<i>in vitro</i> ウイルス検査（指示細胞：Vero、MRC-5、CHO-K1、A9）		
	ウシウイルス試験 ¹		
	逆転写酵素活性		
	透過電子顕微鏡試験		
	レトロウイルス感染性試験（S ⁺ L ⁻ フォーカスアッセイ）		
	Co-cultivate 試験（レトロウイルス、 細胞、 細胞）		

NT：試験せず

表 セルバンク等における特性解析試験一覧

試験項目 (試験方法)	結果		
	MCB	WCB	CAL
発現ベクターの挿入部位数 (サザンブロット法)			
重鎖コード領域のコピー数 (サザンブロット法)			
軽鎖コード領域のコピー数 (サザンブロット法)			
重鎖及び軽鎖の mRNA (ノーザンブロット法)			
cDNA 配列			

MCB 及び WCB は緊急時にそなえ、外部機関にそれぞれの一部を保管している。WCB の更新に際しては MCB より新規 WCB を作製し、品質試験（純度試験、特性解析試験等）を行う。なお、MCB は十分量を保管しているため、更新の予定はなく、更新方法は規定され

¹ ウシウイルス：BT 細胞に対しては、ウシウイルス性下痢ウイルス（BVDV）、狂犬病ウイルス、ブルータングウイルス、ウシアデノウイルス 3 及び 5（BAV3、BAV5）、ウシパルボウイルス（BPV）、レオウイルス（REO）、ウシ RS ウイルス（BRSV）、Vero 細胞に対しては、BVDV、狂犬病ウイルス、REO

ていない。

保存期間中の安定性を確認するために、MCB は最低 年 に 回、WCB は年に 回以上、細胞生存率を評価する。

③ 製造工程

本薬の製造工程（ と の二ヶ所で製造）は図のとおりである。

本薬の製造工程について、プロセスバリデーションがなされている。

培養工程について、細胞生存率、アダリムマブ濃度、エンドトキシン、透過電顕観察、マイコプラズマ、*in vitro* ウイルス試験、定量的 PCR（MVM の検出のため）及び滅菌性の評価がなされている。また、一次回収・濃縮工程（イオン交換クロマトグラフィー）及び精製工程（ウイルス不活化とろ過、イオン交換クロマトグラフィー、クロマトグラフィー、ナノろ過）について、バイオーバーデン、エンドトキシン等が恒常的に一定値以下に管理できることが確認されている。

不純物（製造工程由来不純物として、培地成分のメトトレキサート [MTX]、遺伝子組換えヒトインスリン及びプルロニック、宿主細胞由来不純物として、宿主細胞たん白質 [HCP]、残存 DNA 及びプロカテプシン）の除去状況について評価がなされている。MTX は限外ろ過/透析（最終ステップ）で除去が可能であり、遺伝子組換えヒトインスリンはアダリムマブの等電点（約）より酸性であるため、イオン交換クロマトグラフィーカラムで除去可能である。また、プルロニック はイオン交換クロマトグラフィーで検出限界以下まで除去された。HCP はイオン交換クロマトグラフィーカラム、脂質除去深層ろ過及びイオン交換クロマトグラフィーカラムで除去可能である（LRF 約）。残存 DNA はイオン交換クロマトグラフィーカラム、ウイルス不活化と深層ろ過及びイオン交換クロマトグラフィーカラムで除去可能であり、特にウイルス不活化と深層ろ過が有効である。プロカテプシン はウイルス不活化と深層ろ過及びイオン交換クロマトグラフィーで除去可能であり、特にイオン交換クロマトグラフィーが有効である。

細胞培養工程

の工程内容。

[]内はでの培養器及び操作を示す。

各製造には WCB バイアル 本用いる。

ステップ 1 (操作 1)

培養装置: mL

培地: 培地 A

ステップ 1 (操作 2)

培養装置: mL

培地: 培地 A

ステップ 1 (操作 3)

培養装置: mL

培地: 培地 A

ステップ 1 (操作 4)

培養装置: mL

培地: 培地 A

ステップ 1 (操作 5)

培養装置: L

培地: 培地 A

ステップ 1 (操作 6)

培養装置: L

培地: 培地 A

生細胞濃度 \times 細胞/mL 以上でステップ 2 へ移行

[ステップ 1 (操作 7) L で操作 6 を行う]

工程内管理

コンタミネーションチェック²

ステップ 2 (操作 1)

培養装置: L 培養器 L 培養器]

培地: 培地 A

溶存酸素: %

生細胞濃度 \times 細胞/mL になるか酸素流量 SLPM³ [SLPM³]

になった時点でステップ 2 (操作 2) へ移行

工程内管理

コンタミネーションチェック²

ステップ 2 (操作 2)

培養装置: L 培養器 L 培養器]

培地: 培地 B

溶存酸素: %

生細胞濃度 \times 細胞/mL になるか酸素流量 SLPM³ [SLPM³]

になった時点でステップ 3 (生産培養) へ移行

工程内管理

コンタミネーションチェック²

ステップ 3 ()

重要中間体

培養装置: L 培養器 [L 培養器]

培地: 培地 C

溶存酸素: %

温度低下まで (I 相)

温度: \rightarrow °C 溶存酸素濃度 % pH: \rightarrow

生細胞濃度 \times 細胞/mL になるか酸素流量

SLPM³ になった時点で II 相へ移行 [SLPM³]

培養終了まで (II 相)

温度: °C

pH:

工程内管理

マイコプラズマ
in vitro ウイルス⁴
Q-PCR for MVM
滅菌性

² コンタミネーションチェック: 微生物限度試験及び無菌試験

³ SLPM (リットル/分 at 20°C): 酸素流量

⁴ 4 種のインジケーター細胞 (MRC-5 細胞、Vero 細胞、A9 細胞、CHO-K1 細胞) への被験物質接種後、生育培地中での細胞変性や血球吸着及び血球凝縮についての試験を行う。

一次回収：濃縮

一次回収 (段階のろ過)

培養装置： Lハーベストタンク [Lハーベストタンク]

ろ過フィルター (孔径 ~ μm)

ろ過フィルター (孔径 μm)

イオン交換クロマトグラフィー

カラム：

プロセスバリデーションとして L実生産スケール

3ロットで工程パラメータの操作管理値設定

脂質除去深層ろ過及び濃縮

ろ過フィルター (孔径 ~ μm)

μm フィルター

限外ろ過膜 (ft²、分画分子量 kDa) [ft²]

たん白濃度 g/L を超えない範囲に濃縮

保存温度 ろ過済み濃縮液 ~ °C

凍結保存時 ~ °C

精製工程

ウイルス不活化と深層ろ過

pH：約 (分)

ろ過フィルター (孔径 ~ μm)

イオン交換クロマトグラフィー

カラム：

クロマトグラフィー

カラム：

ナノろ過

μm フィルター

ろ過フィルター (または同等のもの)

限外ろ過/透析ろ過

限外ろ過膜 (ft²、分画分子量 kDa) [ft²]

たん白濃度：約 mg/mL になるまで濃縮

ろ過フィルター (孔径 μm)

ろ過、充填

ろ過フィルター (孔径 μm)

充填温度： ~ °C

ビン ()

凍結 アダリムマブ原薬

保存温度： -80°C

は重要工程を示す。

④ 外来性感染性物質の安全性評価

i) 非ウイルス性感染性

原薬の製造工程には動物由来原材料は使用されていないが、MCB の増殖用培地成分及び保存液の成分として含まれる PFCHO 培地 ([redacted] に、ブタ膵臓由来 (米国及びカナダ産) トリプシンを使用して作製された大豆加水分解物が含まれている。このトリプシンには、生物由来原料基準に適合している米国及びカナダ産ウシの乳由来のラクトースが含まれている。また、MCB の増殖用培地成分に [redacted] (米国産ウシ脾臓及び血液の酵素消化物) も用いられている。

MCB の製造の際に、遺伝子組換えヒトインスリンが使用されており、その製造工程でブタ及び鳥由来原材料が用いられているが、これは米国の医薬品市場に供給されている [redacted] 社のインスリン製剤と同一の製造工程である。一方、WCB 作製及び培養工程にも遺伝子組換えヒトインスリンが使用されているが、その製造工程中に動物由来原材料は用いられていない。

ii) 外来性ウイルス等

MCB、WCB 及び CAL に、感染性レトロウイルス、非内在性ウイルス、マイコプラズマ等が含まれないことが確認された (② セルバンクの性質及び管理)。また、未精製バルクについても、工程内管理試験 (非内在性ウイルス、マイコプラズマ、MVM、エンドトキシン、無菌性) が行われている。

各精製工程についてウイルスクリアランス試験が行われており、その結果は下表のとおりであった。

表 ウイルスクリアランス試験結果

工程	X-MuLV ¹⁾	MVM ²⁾	PRV ³⁾	REO3 ⁴⁾
[redacted] イオンクロマトグラフィー	[redacted]	[redacted]	[redacted] ⁵⁾	[redacted]
ウイルス不活化 (pH [redacted])	≥ [redacted]	[redacted] ⁵⁾	≥ [redacted]	[redacted] ⁵⁾
[redacted] イオンクロマトグラフィー	≥ [redacted]	[redacted]	≥ [redacted]	[redacted]
[redacted] クロマトグラフィー	≥ [redacted]	[redacted] ⁵⁾	[redacted]	≥ [redacted]
ナノろ過 ([redacted])	≥ [redacted]	≥ [redacted]	[redacted]	≥ [redacted]
総ウイルスクリアランス指数	≥ 15.19-16.19 ⁶⁾	1.75	≥ 15.89-18.47	≥ 8.92

¹⁾ Xenotropic Murine Leukemia Virus、²⁾ Minute Virus of Mice、³⁾ Porcine Pseudorabies Virus、⁴⁾ Reovirus Type 3、

⁵⁾ ND : no data、⁶⁾ X-MuLV の総 LRF には [redacted] の LRF は加算しない

⑤ 製造工程の開発の経緯 (同等性/同質性)

開発初期の (主に非臨床試験に使用することを目的とした) 本薬製造には、細胞株 (B* 及び C*) が用いられたが、主な臨床試験には新たに CHO 細胞に遺伝子導入して調製したアダリムマブ高産生細胞株 (A*) が用いられた。細胞株 B* 由来ロットは初期の非臨床薬理試験のみに使用しているため、A* 細胞株との同等性評価は行われていない。細胞株

* : 新薬承認情報提供時に置き換え

C* 由来ロットは、規格試験、特性解析及びサル単回静脈内投与薬物動態試験とサル 39 週間反復静脈内投与毒性試験（「3. 非臨床に関する資料 (ii) 薬物動態試験成績」の項参照）により、A* 細胞株由来ロットと同等であることを確認している。さらに、培養操作方法の変更（スケールアップ ■ L 及び ■ L → ■ L 及び ■ L、生産培養温度 ■ °C → ■ °C）、培養器容量の増大（■ L → ■ L、■ L → ■ L 及び ■ L → ■ L）、培地組成の変更（ウシトランスフェリン及び ■ の排除。アミノ酸、ビタミン、微量金属の増量、大豆たん白加水分解物の添加）及び培養条件（pH、培養温度、CO₂ 濃度、酸素流量管理値）の最適化が行なわれた。回収工程（一次回収・濃縮及び精製）では、培養容量の増大に伴う精製処理速度の向上及び各工程の変更（■ イオン交換クロマトグラフィー前処理の限外ろ過及び ■ イオンガードカラムの廃止、低 pH ウイルス不活化工程の追加、ナノろ過工程の最終工程への移動、脂質除去深層ろ過の組み込み、試料液の液性変更）が行われた。

前述の各製造方法で製造された原薬は、以下の同等性/同質性評価が行われ、同等/同質であることが確認された。

- ① 工程評価：生産培養、■ イオン交換クロマトグラフィー、ウイルス不活化と深層ろ過、■ イオン交換クロマトグラフィー、■ クロマトグラフィー及びナノろ過
- ② 特性解析：アミノ酸組成、円偏光二色性、超遠心、MALDI-TOF 又は四重極-TOF 質量スペクトル、質量スペクトル法によるジスルフィド結合帰属及びペプチド分析、遊離 SH 基分析、イムノブロット、■ 細胞を用いたバイオアッセイ及び生物学的活性 (Biacore)
- ③ 品質評価：性状、pH、たん白含量、TNF 結合活性、ペプチドマップ、サイズ排除 HPLC、イオン交換 HPLC（確認試験、純度試験）、糖鎖（複合型糖鎖及び高マンノース型糖鎖の含量）、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（還元、非還元）、バイオバーデン、エンドトキシン、宿主細胞たん白質及び残存 DNA

2) 特性

① 構造

アダリムマブの i) アミノ酸組成、ii) 末端アミノ酸分析、iii) ペプチド分析、iv) ジスルフィド結合位置の検討により一次構造を決定し、v) 糖組成及び糖鎖分析により糖鎖構造を推定した。

i) アミノ酸組成

アダリムマブを酸加水分解後、ニンヒドリンによるポストカラム検出法によりアミノ酸を定量したところ、cDNA配列に基づいた理論値と一致した。

ii) 末端アミノ酸及び末端領域アミノ酸 (N末端アミノ酸配列、C末端アミノ酸配列)

N末端アミノ酸に不均一性は認められず、C末端のリジン残基の付加状態が異なる3種の分子種が存在した。

iii) ペプチド分析

*：新薬承認情報提供時に置き換え

ア) アミノ酸配列

還元アルキル化後、酵素消化して得られた断片ペプチドの質量分析により、アダリムマブ軽鎖の■■■%アミノ酸配列及び重鎖の■■■%アミノ酸配列は、cDNAから推定される配列と完全に一致することが確認された。重鎖の断片ペプチド■■■は強親水性であるため、逆相系HPLCで保持されず同定に至らなかった。

イ) 糖鎖付加位置の決定

LC-ESI/MSにより重鎖の301番目のアスパラギン残基への糖鎖付加が確認された。

iv) ジスルフィド結合

断片ペプチドの質量分析により9箇所のジスルフィド結合（Cys22H-Cys96H、Cys148H-Cys204H、Cys265H-Cys325H、Cys371H-Cys429H、Cys230H-Cys230H、Cys233H-Cys233H、Cys23L-Cys88L、Cys134L-Cys194L、Cys224H-Cys214L）が確認された（ジスルフィド結合位置のHは重鎖、Lは軽鎖を示す）。

v) 糖鎖分析

ガスクロマトグラフィー質量分析により4種類の単糖（フコース、マンノース、グルコサミン、ガラクトース）が検出されたが、シアル酸は検出されなかった。MALDI-TOF MSよりアダリムマブは主として4種類の複合型二本鎖糖鎖（NGA2F、NGA2F +Gal1分子、NGA2F +Gal2分子、NGA2F-GlcNAc1分子）と2種類の高マンノース型糖鎖（Man5、Man6分子）を有し、アダリムマブ重鎖のほとんどに糖鎖が付加していることが確認された。

② 物理的・化学的性質

i) 分子量

SDS-PAGE（コロイドブルー染色又は銀染色）では、非還元条件で主たん白質バンド（約■■■ kDa）が、還元条件で重鎖と軽鎖の特徴的なたん白質バンド（約■■■ kDa及び約■■■ kDa）が確認された。また、サイズ排除HPLC（SEC-HPLC）のパターンは、分子量約■■■ kDaの単量体（■■■%）と約■■■ kDaの二量体（■■■%）と推定されるピークに分離した。

N-グリカナーゼ（PNGase F）処理又はカルボキシペプチダーゼB（CPB）処理後のアダリムマブの分子量をQ-Star®MSで測定したところ、PNGase F処理後の分子量はN結合糖鎖を除去した分子量（■■■ Da、■■■ Da）と一致し、CPB処理後は0LysにNGA2F分子あるいはNGA2F分子とガラクトース1分子又は2分子が付加したものの分子量（■■■ Da、■■■ Da、■■■ Da）と一致した。すなわち、後者はCPB処理によりC末端リジンを除去した分子量が示された。

ii) その他の物理的・化学的性質

等電点電気泳動の結果、等電点（pI）は■■■付近であった。紫外可視吸収スペクトルは■■■ nmにたん白質特有の吸収を示した。円偏光二色性（CD）分析により、βシート構造に特徴的なCDスペクトルが得られた。

③ 免疫学的性質

抗[]抗体又は抗[]抗体を用いたウエスタンブロッティング（還元又は非還元）により、モノクローナル抗体由来のバンドであることが確認された。Biacoreを用いたエピトープマッピングによりアダリムマブとTNF α との結合能を確認した結果、[]TNF α 及び[]TNF α には結合したが、[]TNF α には結合しなかった。

④ 生物学的性質

アダリムマブの生物活性は、以下の4種の試験方法で評価された。

- ① アダリムマブは、TNF α の[]細胞に対する細胞毒性を中和した（IC₅₀：[]×[]M）。
- ② TNF α に対するアダリムマブの結合能（解離定数）、結合速度定数及び解離速度定数はそれぞれ約[]×[]M、[]×[]M⁻¹s⁻¹及び[]×[]s⁻¹であった。
- ③ アダリムマブは、[]×[]M TNF α の受容体結合を阻害した（IC₅₀：[]×[]M）。
- ④ アダリムマブは、ヒト臍帯静脈内皮細胞におけるTNF α の細胞活性化作用を阻害した（IC₅₀：[]×[]M）。

⑤ 目的物質関連物質

アダリムマブのイオン交換HPLCを行った結果、3つの主なピーク（[]分、[]分及び[]分）及びブロードピーク（[]～[]分）が検出された。

i) C末端のリジン変異体

[]分、[]分及び[]分のピークはそれぞれ0Lys（重鎖C末端にリジン残基を有さない、[]%）、1Lys（一方の重鎖C末端にリジン残基を含有、[]%）及び2Lys（両重鎖C末端にリジン残基を含有、[]%）と推定された。これらは同程度のTNF α への結合能、結合速度定数、解離速度定数を示した。キャピラリー電気泳動結果から、それぞれの等電点は[]、[]、[]であった。

ii) 酸性分画

[]分（0Lys）の主ピーク前（[]～[]分）に溶出されるブロードピーク（約[]%）と主ピークとの品質・構造特性を比較した結果、Native Page電気泳動、超遠心及び熱分析、イソアスパラギン酸定量、ジスルフィド結合位置並びにTNF α との結合能に差は認められなかった。

iii) 1Lysと2Lysの間のピーク

1Lysと2Lysの間の（0Lysのピークに対する相対保持時間（RRT）が約[]である）小さなピーク（[]%未満）を、SDS-PAGE、Q-Star[®] MS、ペプチドマップで分析した結果、アダリムマブと同じ結果を示し、TNF α との結合能を有すると考えられた。

⑥ 不純物

i) 製造工程由来不純物

本薬1回投与（40 mg）中に残存する培地成分のMTX、遺伝子組換えヒトインスリン及びプルロニック[®]の量は、MTXが中*スケールで [] ng未満、大*スケールで [] ng未満、プルロニック[®]が中*スケールで [] μg未満、大*で [] μg未満、遺伝子組換えヒトインスリンが中*スケールで [] ng未満、大*スケールで [] ng未満であった。

宿主細胞由来不純物（宿主細胞たん白質（HCP）、プロカテプシン[®]、残存DNA）は、本薬1 mgあたり、HCP含量が中*スケール及び大*スケールともに [] ng未満、プロカテプシン[®]が中*スケール及び大*スケールともに定量限界未満であった。残存DNAは中*スケールで規格値である [] pg/mg未満、大*スケールで定量限界未満（ [] pg/mg未満）であった。

エンドトキシン量（比色法）は、工程内管理試験及び原薬の規格試験により管理されている。

ii) 目的物質由来不純物

SEC-HPLCで二量体と思われる小さなピークが検出された。

③ 規格及び試験方法

原薬の規格及び試験方法として、性状、pH、確認試験（ペプチドマップ、イオン交換 HPLC、SEC-HPLC）、純度試験（イオン交換 HPLC、SEC-HPLC、SDS-PAGE（還元、非還元）、宿主細胞たん白質、残存 DNA、エンドトキシン、微生物限度試験）、糖鎖、TNF 結合活性及びたん白質含量が設定されている。

④ 原薬の安定性

安定性試験は、小*スケール（3ロット）、中*スケール（3ロット）及び大*スケール（6ロット）を用いて、遮光下で-80℃、[]℃、[]℃、[]℃、[]℃/[]%RH及び[]℃/[]%RHで実施された（[]℃は 大*スケールでは行われていない）。測定項目は、性状、pH、イオン交換 HPLC（[]分画、[]分画、[]、[]と []間のピーク）、SEC-HPLC、エンドトキシン、微生物限度試験及び TNF 結合活性であった。各スケールにおける安定性試験の実施期間は下表のとおりである。

表 小*スケール、中*スケール及び大*スケールにおける安定性試験実施期間

	-80℃	[]℃	[]℃	[]℃	[]℃/[]%RH	[]℃/[]%RH
小*スケール	60ヶ月	[]ヶ月	[]ヶ月	[]ヶ月	[]ヶ月	[]ヶ月
中*スケール	[]ヶ月	[]ヶ月				
大*スケール	[]ヶ月	[]	[]ヶ月	[]ヶ月	[]ヶ月	[]ヶ月

小*スケールで-80℃保存時には 60ヶ月まで、[]℃及び[]℃保存時には []ヶ月

*：新薬承認情報提供時に置き換え

まで、 \blacksquare °Cでは \blacksquare ヶ月まで変化は認められなかった。 \blacksquare °C/ \blacksquare %RHでは、 \blacksquare ヶ月後から、イオン交換 HPLC で酸性分画の増加、リジン変異体の減少が認められた。 \blacksquare °C/ \blacksquare %RHでは、 \blacksquare ヶ月後から、イオン交換 HPLC で酸性分画の増加、リジン変異体の減少が、SEC-HPLC で単量体の減少が認められ、TNF 結合活性も低下した。

中* スケール及び 大* スケールは 小* スケールと同様の安定性プロファイルを示したが、 \blacksquare °C/ \blacksquare %RH で、 \blacksquare ヶ月後から性状に不適が認められた。中* 及び 大* ともに \blacksquare °C、 \blacksquare °C（中* スケールのみ）及び \blacksquare °Cにおける安定性試験は、 \blacksquare ヶ月まで継続して実施される予定である。

以上の結果より、原薬の有効期間は -80°C で保存するとき、60ヶ月とされた。

(2) 製剤

1) 製剤設計

本薬は、保存中に不溶性微粒子を生成する可能性があるため、以下の製剤処方が設計された。すなわち、本剤 (0.8 mL) は、有効成分アダリムマブ 40.0 mg、等張化剤である D-マンニトール (9.6 mg) 及び塩化ナトリウム (4.932 mg)、緩衝剤であるクエン酸水和物 (1.044 mg)、クエン酸ナトリウム水和物 (0.244 mg)、リン酸水素二ナトリウム二水和物 (1.224 mg) 及びリン酸二水素ナトリウム (0.688 mg)、pH 調整剤である水酸化ナトリウム (適量)、可溶化剤であるポリソルベート 80 (0.8 mg) 及び注射用水 (適量) からなるプレフィルドシリンジ製剤とされた。過量仕込みはされていない。なお、容器及び施栓系には本薬と相互作用のないシリンジ、ゴム栓ストッパー、ニードルシールドが用いられる。

2) 製剤化工程

添加剤溶液 (等張化剤、緩衝剤、可溶化剤、pH 調整剤) と解凍した原薬を混合し、 \blacksquare μm \blacksquare 製フィルターで無菌ろ過後、さらに無菌ろ過を行いながら無色ガラスシリンジに充填し、ゴム栓ストッパーを打栓する。さらに、プランジャーロッド及びバックストッパーを装着し包装する。無菌ろ過工程及び無菌ろ過・ \blacksquare 工程が重要工程とされた。工程内管理試験として、第一工程 (\blacksquare) では \blacksquare 及び \blacksquare が、第二工程 (\blacksquare 工程) では性状、pH 及び \blacksquare が、第三工程 (無菌ろ過工程) ではフィルター完全性試験が、第四工程 (無菌ろ過・ \blacksquare 工程) ではフィルター完全性及び \blacksquare が設定されている。

3) 規格及び試験方法

製剤の規格及び試験方法として、性状、確認試験、pH、純度試験 (イオン交換 HPLC、SEC-HPLC)、エンドトキシン、注射剤の採取容量試験、不溶性異物試験、不溶性微粒子試験、無菌試験、力価 (TNF 中和能) 及びたん白質含量が設定されている。

4) 製剤の安定性

* : 新薬承認情報提供時に置き換え

安定性試験は、中*スケール（3ロット）及び大*（4ロット）スケール原薬を用いて製造した製剤を用いて、遮光下で5℃、25℃/60%RH及び40℃/75%RHで実施された。各スケールにおける安定性試験の実施期間は、中*スケール5℃で24ヶ月、25℃/60%RH及び40℃/75%RHで6ヶ月であり、大*スケール5℃、25℃/60%RH及び40℃/75%RHでは6ヶ月であった。測定項目は、性状、pH、イオン交換HPLC（ 分画、 分画、 、 と 間のピーク）、SEC-HPLC、不溶性異物、不溶性微粒子、力価（TNF中和能）、たん白質含量、無菌試験、エンドトキシン（大*スケール、5℃のみ実施）であった。

中*スケールで5℃保存時には、イオン交換HPLCにおける酸性分画の増加傾向及びリジン変異体の減少傾向並びにSEC-HPLCにおける単量体の減少傾向が認められたが、その程度はごく僅かであった。また、25℃/60%RH及び40℃/75%RH条件で、イオン交換HPLCにおける酸性分画の経時的な増加とリジン変異体の経時的な減少及びSEC-HPLCにおける単量体の減少が認められた。なお、 及び大*スケールともに5℃における安定性試験は36ヶ月まで継続して実施される予定である。

以上の結果から、本剤の有効期間は遮光下、冷蔵（2～8℃）保存するとき、24ヶ月とされた。

（3）標準物質

初代自家標準物質として、小*スケールで製造された原薬（ロット番号A*）が用いられた。これは、最終的に ± g/L アダリムマブ、 %ポリソルベート80を含むよう、緩衝液（ mmol/L リン酸二水素ナトリウム、 mmol/L リン酸水素二ナトリウム、 mmol/L 塩化ナトリウム、 mmol/L クエン酸ナトリウム、 mmol/L クエン酸、 mmol/L D-マンニトール、pH ）で希釈されたものであり、 ℃で凍結保存されている。ロットA*は、原薬の規格を満たす他、特性解析項目（Massによるペプチド分析、分子量、遊離SH基の同定（ ）、Binding assay）についても確認がなされている。

自家標準物質の更新は、ロットA*の調製方法に準じて調製を行い、ロットA*と同様に原薬の規格試験及び特性解析項目の判定基準に適合することとされている。

<審査の概略>

（1）精製工程のウイルス除去能に及ぼすカラムの再生回数について

機構は、精製工程におけるカラムの再生がウイルス除去能に及ぼす影響について説明を求めた。

申請者は、製造工程に使用する全てのクロマトグラフィー樹脂は mol/L 溶液（ 時間）で殺菌し再使用しており、ウイルス除去を目的としている イオン交換及び クロマトグラフィーカラムの樹脂を、それぞれ 回及び 回再使用してもウイルス除去効果に変化は認められなかったと説明した。また、実際の製造工程における

*：新薬承認情報提供時に置き換え

再使用回数（それぞれ 回、回以下）を承認申請書に記載すると説明した。

機構は、イオン交換及びクロマトグラフィーカラムの実際の製造工程での再使用について、評価された回数内であることからウイルス除去効果に影響を与えないものと判断し、回答を了承した。

（２）再加工について

承認申請資料には再加工についての記載がないが、GMP 実地調査により、標準操作手順書には精製工程（ナノろ過工程及びろ過、充填工程）において1度限り再加工を認める旨の記載があることが判明した。機構は再加工を行うことは否定しないものの、品質管理を行う上で承認申請書に記載する必要があると判断し、申請者に実態を確認した上で適切な対応をするよう求めた。

申請者は、精製工程である第三工程のナノろ過工程及びろ過、充てん工程において、それぞれ使用後のウイルス除去フィルターやフィルターの完全性試験が不適になった場合、各フィルターを交換し、再ろ過を行っていることを説明した。また再加工については、承認申請書の該当箇所に記載をすると説明した。

機構は、フィルター交換による再ろ過にはウイルス安全性面において問題がないと判断し、再加工を了承した。

（３）ウイルス安全性について

機構は、ウイルスクリアランス試験結果、MVM の総 LRF が 1.75 であり、ウイルスの不活化・除去能が十分ではないと考えられることから、原材料及び本剤の製造工程における感染性因子混入の可能性を考慮した上で、本剤のウイルス安全性について説明するよう求めた。

申請者は、ウイルスの安全性確保のために、精製工程で低 pH によるウイルス不活化及びフィルターろ過（ ）によるウイルス除去を行っていることを説明した上で、ウイルスクリアランス試験で用いられたモデルウイルス 4 種（X-MuLV、MVM、PRV 及び Reo3）のうち MVM の総 LRF は 1.75 しか示さなかったものの、① ウイルス感染については十分に研究されている CHO 由来細胞株を用いていること、② MCB、WCB、CAL 及び未精製バルクが MVM に感染していないことを確認していること、③ 製造工程に用いる原材料に動物由来原材料を使用していないこと、④ 精製工程で 3 種（X-MuLV、PRV 及び Reo3）のモデルウイルスは LRF9 以上で不活化・除去されることから、本剤のウイルスに対する安全性は確保できると考えており、MVM に対する LRF 値は低いウイルス感染の懸念はなく、ウイルス安全性の面で問題はないと説明した。

機構は、安全性確保を可能であるとした理由のうち④については、DNA ウイルスでエンベロープ無しの MVM の不活化・除去を評価する上で適切な説明ではないと考えるが、MVM の大きさは nm であり、エンベロープ無しのウイルスのクリアランス値を上げるのは困難であること、また①～③の理由及び低 pH 及びフィルターろ過によりウイルス不活化及

び除去が適切に行われていると考えられることから、臨床使用上ウイルス感染等の問題は生じないと判断し、申請者の回答を了承した。

(4) 原薬の規格及び試験方法について

1) 等電点電気泳動を設定しないことについて

機構は、不純物や電荷の不均一性を管理するために一般的に規格及び試験方法に設定されている等電点電気泳動を本薬で設定しなかった理由について説明を求めた。

申請者は、本剤の開発初期には等電点電気泳動を規格試験に設定していたが、アダリムマブの3つのリジン変異体を分離することが困難であったため、これらを分離するために定量的で再現性のある陽イオン交換クロマトグラフィーを新たに開発し、規格及び試験方法に設定したと説明した。

機構は、目的物質関連物質であるリジン変異体含量を適切に管理するために、等電点電気泳動に代えて陽イオン交換クロマトグラフィーが設定されたことから申請者の説明を了承した。

2) 糖鎖

機構は、糖鎖構造に関して大まかな構造上の類似性に基づき2種に分類した規格は設定されているものの、糖鎖構造を適切に管理するため、主要糖鎖構造の組成比率を規格に設定するよう求めた。

申請者は以下のように回答した。

・本薬 [] ロットの糖鎖組成比率及び類似構造別の組成比率を算出したところ、マイナーな糖鎖 []、[] 及び [] の組成比率はロット間でバラツキが大きかった (CV: [] ~ [] %) が、糖鎖末端に1分子又は2分子のガラクトースを含む糖鎖 (NA1F、NA2F)、糖鎖末端に1分子又は2分子のGlcNAcを含む糖鎖 ((NGA2F、NGA2F-GlcNAc) 及び高マンノース型糖鎖 (Man5+Man6) の組成比率はロット間でのバラツキは小さかった ([] %以下)。

・糖鎖の規格設定にあたり、糖鎖ヘテロ体含量 (組成比率) 及び糖鎖の生物学的性質に及ぼす影響を検討したが、以下のとおり糖鎖組成比の差は生物学的性質に影響を及ぼさなかった。

- ① アダリムマブの主要な糖鎖はガラクトシル化 [] であり ([] 及び [])、2ロット間(ロット番号 B* : [] %、C* : [] %) の生物学的同等性試験 (DE029) の成績は同等であった。
- ② ELISA による TNF α 結合活性は、全てのロットで同等であった。
- ③ Biacore による TNF α 結合能は、特性解析を行った全てのロットで同等であった。
- ④ [] 細胞を用いたバイオアッセイによる TNF α 中和能の測定の結果、2ロット(ロット番号 D* : [] %、E* : [] %) の相対的な生物活性はそれぞれ [] %

* : 新薬承認情報提供時に置き換え

及び ■■■%であった。

以上の結果、マイナーな糖鎖はロット間でのバラツキが大きく、これらマイナーな糖鎖を含む 6 種類の糖鎖全ての組成比率を規格化することは困難であること、糖鎖の組成比率の変動は生物学的性質に影響を及ぼさなかったものの、糖鎖の組成比率にあまり差のないロットでの検討であることから、品質管理が可能で生物学的性質に影響を与えない範囲で、類似構造別に糖鎖を分類した以下の規格に変更する。

- ① ガラクトシル化していない複合型二本鎖糖鎖 (NGA2F + [NGA2F-GlcNAc]) : ■■■ ~ ■■■%
- ② ガラクトシル化している複合型二本鎖糖鎖 (NA1F + NA2F) : ■■■ ~ ■■■%
- ③ 高マンノース型糖鎖 (Man5 + Man6) : ■■■%以下

機構は、糖鎖構造に関して大まかな構造上の類似性に基づいた規格が設定されているものの、品質のより厳密な管理を行うという観点から、申請者が提示した「糖鎖の組成比率の変動が生物学的性質に影響を及ぼさない範囲に類似構造別の規格を設定する」との回答は適切であると判断し、これを了承した。

3. 非臨床に関する資料

(i) 薬理試験成績の概要

効力を裏付ける試験では、*in vitro* 試験として、ヒト TNF α 及びヒト膜結合型 TNF α (pro-TNF) に対する結合特性、TNF α の受容体への結合に対する阻害作用、TNF α の生物活性に対する中和作用、Fc 領域の機能、抗原特異性及び TNF α 中和作用の種特異性が検討されている。また、*in vivo* 試験として、マウスにおける TNF α 誘発致死に対する作用、ウサギにおける TNF α 誘発発熱反応に対する作用及びヒト TNF α 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの関節炎に対する作用が検討されている。さらに、副次的薬理作用としては、各種サイトカイン、受容体に対する影響及び正常ヒト組織との交差反応性が検討されている。安全性薬理試験は、安全性薬理試験ガイドラインが通知された 2003 年 7 月 1 日以前に一般薬理試験ガイドラインに従い実施されている。薬力学的薬物相互作用試験としては、MTX との併用効果について検討されている。

<提出された資料の概略>

(1) 効力を裏付ける試験

1) *in vitro* 試験

① ヒト TNF α との結合親和性 (4.2.1.1-1)

異なる製法により製造された本薬 (■■■■■製法ロット及び■■■■■製法ロット) の遺伝子組換えヒト TNF α (rhTNF α) に対する結合親和性を表面プラズモン共鳴センサー装

置を用いて評価したところ、解離定数 (Kd 値) はそれぞれ $\blacksquare \times \blacksquare$ 及び $\blacksquare \times \blacksquare$ mol/L であった。

② ヒト pro-TNF との結合親和性 (4.2.1.1-1)

ヒト pro-TNF を細胞膜表面上に発現する遺伝子組換えマウス骨髄腫細胞 (\blacksquare) とその対照細胞 (\blacksquare) を用い、本薬との結合親和性をフローサイトメーターを用いて評価したところ、本薬は pro-TNF 発現細胞に結合したが、対照細胞への結合は認められなかった。なお、ヒト IgG1 はいずれの細胞にも結合しなかった。

③ TNF α の受容体への結合に対する阻害作用 (4.2.1.1-2)

ヒト組織球由来 \blacksquare 細胞における TNF α 受容体と 125 I-rhTNF α の結合に対し、本薬の添加は濃度依存的にその結合を阻害し、IC₅₀ 値は $\blacksquare \times \blacksquare$ mol/L であり、 1.0×10^{-7} mol/L では完全に阻害した。

TNF α 受容体には、分子量が 55 kDa 及び 75 kDa の 2 種類のサブタイプ (それぞれ TNF RI 及び TNF RII) が同定されている。遺伝子組換えヒト可溶性受容体 (sTNF RI 及び sTNF RII) と 125 I-rhTNF α の結合に対する本薬の阻害作用をラジオイムノアッセイを利用して評価したところ、本薬の添加は濃度依存的にその結合を阻害し、それぞれの受容体に対する IC₅₀ 値は 1.47×10^{-9} 及び 1.26×10^{-9} mol/L であった。

④ TNF α の生物活性に対する中和作用

a) rhTNF α 誘発細胞傷害に対する中和作用 (4.2.1.1-1)

rhTNF α によって誘発されるマウス線維芽細胞 (\blacksquare 細胞) の細胞死に対して、本薬 (\blacksquare 製法ロット及び \blacksquare 製法ロット) を添加しておくことにより、濃度依存的に細胞死は抑制され、IC₅₀ 値はそれぞれ 3.5×10^{-11} 及び 1.4×10^{-11} mol/L であった。

b) rhTNF α により誘発される接着分子発現に対する中和作用 (4.2.1.1-3)

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における rhTNF α により誘発される接着分子 (ELAM-1, ICAM-1 及び VCAM-1) の発現に対して、本薬の添加は濃度依存的に各接着分子の発現を抑制し、その IC₅₀ 値はそれぞれ $\blacksquare \times \blacksquare$ 、 $\blacksquare \times \blacksquare$ 及び $\blacksquare \times \blacksquare$ mol/L であった。

⑤ Fc 領域の機能

a) 補体依存性細胞傷害 (CDC) 作用 (4.2.1.1-1)

ヒト pro-TNF を細胞膜表面上に発現する \blacksquare 細胞に本薬及び補体源として幼若ウサギ血清を添加したところ、細胞傷害の指標として用いた LDH 濃度の著明な上昇が認められ、その作用強度は陽性対照として用いた IgM クラス抗 MHC 抗体 (anti-H2D) と同程度であった。なお、ヒト IgG1 では細胞傷害性は認められなかった。

b) Fc 受容体との結合性 (4.2.1.1-1)

Fc 受容体を有するヒト組織球由来 \blacksquare 細胞を用いて、本薬の結合性をフローサイトメーターにて評価したところ、本薬の \blacksquare 細胞への結合が確認され、過剰のヒト IgG1 を添加することによりその結合は阻害された。また、抗ヒト Fc 受容体 (FcRI, FcRII 又は FcRIII) 抗体を添加したところ、抗ヒト FcRI 受容体抗体によってのみ本薬の結合は阻害された。

⑥ 抗原特異性 (4.2.1.1-1)

本薬と遺伝子組換えヒトサイトカイン (rhTNF α , rIL-1 α , rIL-1 β , rIL-2, rIL-4, rIL-6, rIL-8, rIFN γ 及び rLT) との結合親和性を表面プラズモン共鳴センサー装置を用いて評価したところ、rhTNF α 以外のサイトカインには結合親和性は認められなかった。

⑦ TNF α 中和作用の種特異性 (4.2.1.1-4)

TNF α によって誘発される [] 細胞の細胞死に対する中和作用を指標にヒト及び異種動物 (アカゲザル、チンパンジー、ヒヒ、カニクイザル、イヌ、マーモセット、ブタ、マウス、ウサギ及びラット) 由来 TNF α に対する本薬の種特異性を評価したところ、IC₅₀ 値はヒト由来 TNF α においては [] \times [] mol/L であったのに対し、上記異種動物由来 TNF α においてはそれぞれ [] \times []、[] \times [] 及び [] \times [] mol/L であった。また、表面プラズモン共鳴センサー装置を用いて結合親和性を評価したところ、[] 及び [] の遺伝子組換え TNF α との結合が確認されたが、遺伝子組換え [] TNF α との結合親和性は認められなかった。

2) *in vivo* 試験

① マウス rhTNF α 誘発致死モデル (4.2.1.1-1)

雌マウスに対して、本薬 0.12、0.37、1.1、3.3 及び 10 μ g/マウスの腹腔内投与 30 分後に rhTNF α /D-ガラクトサミン混合液を腹腔内投与し、24 時間後の生存率を評価したところ、本薬 ([] 製法ロット及び [] 製法ロット) は用量依存的に生存率を改善し、ED₅₀ 値はそれぞれ 1.1~3.3 及び 3.3~10 μ g/マウスであった。一方、ヒト IgG1 及び PBS 投与群においては rhTNF α 誘発致死に対する抑制作用は認められなかった。

② ウサギ rhTNF α 誘発発熱モデル (4.2.1.1-8)

雌ウサギに rhTNF α を静脈内投与することにより誘発される直腸温の上昇は、本薬 14、24、48 及び 137 μ g/kg を rhTNF α の投与 15 分前に静脈内投与することにより用量依存的に抑制され、抑制率はそれぞれ 53、70、94、100 %であった。一方、ヒト IgG1 (30 μ g/kg) の静脈内投与では rhTNF α 誘発直腸温上昇に対する抑制作用は認められず、本薬 138 μ g/kg の単独静脈内投与は直腸温に影響を及ぼさなかった。

③ [] マウス関節炎モデル

ヒト TNF α 遺伝子を導入して作製されたトランスジェニックマウス ([] マウス) は RA に類似した関節炎を発症する (Keffer J et al., *EMBO J* 10: 4025-4031, 1991)。

a) 試験-1 (4.2.1.1-5)

無処置雌雄 [] マウスは非トランスジェニックマウス (非 Tg マウス) と比較して 6~9 週齢から体重増加量が低下し、また 11 週齢で後肢関節は有意に腫大し、重度の関節炎スコア (屈曲運動時の強直及び重度の運動障害) 並びに重度の病理組織学的スコア (軟骨破壊及び骨びらん) を呈した。雌雄 [] マウスに溶媒、本薬 (2.3、23.2 及び 46.5 mg/kg) 並びにヒト IgG1 を 1 週齢から週 3 回 10 週間腹腔内投与したところ、溶媒投与群及びヒト IgG1