レノグラスチム（遺伝子組換え）

Lenograstim (Genetical Recombination)

たん白質部分

TPLGPASSLP QSFLLKCLEQ VRKIQGDGAA LQEKLCATYK LCHPEELVLL

GHSLGIPWAP LSSCPSQALQ LAGCLSQLHS GLFLYQGLLQ ALEGISPELG

PTLDTLQLDV ADFATTIWQQ MEELGMAPAL QPTQGAMPAF ASAFQRRAGG

VLVASHLQSF LEVSYRVLRH LAQP

T133, 糖鎖結合

糖鎖部分

$$\begin{array}{c}(\mathrm{NeuAc}\alpha2)_{0\text{-}1}\\ \vert\\ 6\\ \mathrm{NeuAc}\alpha2\text{-}3\mathrm{Gal}\beta1\text{-}3\mathrm{GalNAc}\end{array}$$

$C_{840}H_{1330}N_{222}O_{242}S_8$：18667.41

[*135968-09-1*]

本品の本質は，ヒト顆粒球コロニー刺激因子 cDNA を導入した CHO 細胞で産生される 174 個のアミノ酸残基からなる糖たん白質(分子量：約 20000)である．

本品は，水溶液である．

本品は，好中球誘導活性を有する．

本品は定量するとき，1mL 当たり 0.40～0.60mg のたん白質を含み，たん白質 1mg 当たり 1.02×10^8～1.60×10^8 単位を含む．

性状 本品は無色澄明の液である．

確認試験

（**1**） 本品及びレノグラスチム標準品を試料溶液及び標準溶液とする．試料溶液及び標準溶液のたん白質 20μg に対応する容量につき，次の条件で液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉により試験を行うとき，試料溶液及び標準溶液のレノグラスチムの 2 つのピークの保持時間は等しい．

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：215nm)

カラム：内径 7.5mm，長さ 7.5cm のステンレス管に 10μm の液体クロマトグラフィー用ジエチルアミノエチル基を結合した合成高分子を充てんする．

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相 A：pH7.4 の 0.02mol/L トリス緩衝液

移動相 B：0.5mol/L の塩化ナトリウムを含む pH7.4 の 0.02mol/L トリス緩衝液

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する．

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～35	100→80	0→20
35～40	80	20

流量：レノグラスチムの 2 つのピークのうち，先に溶出するピークの保持時間が約 27 分となるように調整する．

システム適合性

システムの性能：標準溶液のたん白質 20μg に対応する容量につき，上記の条件で操作するとき，レノグラスチムの 2 つのピークの分離度は 4 以上である．

（**2**） 本品及びレノグラスチム標準品 2mL ずつをとり，それぞれ適切な方法で脱塩を行い，脱塩試料及び脱塩標準品とする．脱塩試料及び脱塩標準品を，それぞれ水／1－プロパノール混液(3：2)100μL に加え，尿素・EDTA 試液 4mL ずつを加え，37℃で 18 時間反応する．更に 2－メルカプトエタノール 10μL ずつを加え，37℃で 4 時間反応する．これらの液に，水酸化ナトリウム試液 150μL にヨード酢酸 27mg を溶かした液を加えた後，遮光して 37℃で 15 分間反応する．それぞれの反応液につき，適切な方法で試薬を除き，それぞれ還元カルボキシメチル化試料及び還元カルボキシメチル化標準品とする．還元カルボキシメチル化試料及び還元カルボキシメチル化標準品を，それぞれ水／1－プロパノール混液(3：2)100μL に加え，更に 0.05mol/L 炭酸水素アンモニウム溶液 1mL ずつを加える．これらの液に V8 プロテアーゼの 0.05mol/L 炭酸水素アンモニウム溶液(1→1000)20μL を加え，37℃で 18 時間反応する．各反応液に薄めたトリフルオロ酢酸(1→10)50μL を加えて反応を停止し，試料溶液及び標準溶液とする．試料溶液及び標準溶液 100～150μL につき，次の条件で液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉により試験を行うとき，試料溶液及び標準溶液から得た各々のペプチドのピークの保持時間は等しく，同様の溶出パターンを示す．

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：220nm)

カラム：内径 4.6mm，長さ 25cm のステンレス管に 5μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする．

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相 A：水／液体クロマトグラフィー用アセトニトリル／トリフルオロ酢酸混液(950：50：1)

移動相 B：液体クロマトグラフィー用アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸混液(800：200：1)

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する．

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～120	100→20	0→ 80
120～140	20→ 0	80→100
140～150	0	100

流量：最初に溶出するピークの保持時間が約 33 分となるように調整する．

システム適合性

システムの性能：標準溶液を用い，上記の条件で操作するとき，最初に溶出するピークと 2 番目に溶出するピークの分離度は 15 以上である．

（**3**） 本品 2mL を正確に量り，前処理カラム(前処理用オクタデシルシリル化シリカゲル 0.36g を用いて調製したもの)に添加し，水／アセトニトリル／トリフルオロ酢酸混液(600：400：1)5mL で洗浄後，アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸混液(800：200：1)で溶出し，初めの溶出液 5mL を正確に分取する．この液 1.5mL を試験管に正確に量り，内標準溶液 20μL を正確に加えた後，凍結乾燥する．凍結乾燥物をメタノール／塩化アセチル混液(9：1)250μL に溶かし，封管後，90℃で 2 時間加熱する．冷後，開封して内容物を減圧乾固する．残留物にメタノール 200μL を加え，減圧乾固する．残留物をピリジンのメタノール溶液(1→10)200μL 及び無水酢酸 50μL に溶かし，密栓し 10 分間放置する．この液を約 50℃で減圧乾固し，残留物にメタノール 200μL を加え，約 50℃で減圧乾固する．残留物にピリジン／1,1,1,3,3,3－ヘキサメチルジシラザン／クロロトリメチルシラン混液(10：2：1)50μL を加え，密栓し 30 秒間激しく振り混ぜ，50℃で 10 分間加温する．冷後，ペンタン 300μL を加えて穏やかに振り混ぜた後，更に水 300μL を加えて穏やかに振り混ぜる．上層をとり，窒素気流中で約 10μL に濃縮し，試料溶液とする．別に D－ガラクトース約 54mg 及び *N*－アセチルガラクトサミン約 33mg を精密に量り，水に溶かしてそれぞれ正確に 20mL とし，D－ガラクトース溶液及び *N*－アセチルガラクトサミン溶液とする．次に *N*－アセチルノイラミン酸約 9.3mg を精密に量り，D－ガラクトース溶液 1mL 及び *N*－アセチルガラクトサミン溶液 2mL を正確に加えて溶かし，更に水を加えて正確に 20mL とする．この液 1mL を正確に量り，内標準溶液 1mL を正確に加える．この液 40μL をとり，凍結乾燥する．凍結乾燥物をメタノール／塩化アセチル混液(9：1)250μL に溶かし，以下試料溶液と同様に操作し，単糖標準溶液とする．試料溶液及び単糖標準溶液 2μL につき，次の条件でガスクロマトグラフィー〈*2.02*〉により試験を行い，内標準物質のピーク面積に対する D－ガラクトース，*N*－アセチルガラクトサミン及び *N*－アセチルノイラミン酸のそれぞれの主ピーク面積の比 Q_T 及び Q_S を求め，次式により，各単糖の量(mol/mol レノグラスチム)を求めるとき，D－ガラクトースは 0.7～1.2，*N*－アセチルガラクトサミンは 0.7～1.2 及び *N*－アセチルノイラミン酸は 1.0～2.0 である．

各単糖の含量(mol/mol レノグラスチム)

$= M/(M_m \times D_S) \times Q_T/Q_S \times 18667/C \times 5/3$

M：各単糖の秤取量(mg)
M_m：各単糖の分子量
D－ガラクトース：180.16
N－アセチルガラクトサミン：221.21
N－アセチルノイラミン酸：309.27
D_S：各単糖の希釈倍率
D－ガラクトース：20000
N－アセチルガラクトサミン：10000
N－アセチルノイラミン酸：1000
C：本品のたん白質濃度(mg/mL)
18667：レノグラスチムのたん白質部分の分子量

内標準溶液　ミオイノシトール 48mg を水に溶かし，50mL とする．この液 1mL をとり，水を加えて 20mL とする．

試験条件
検出器：水素炎イオン化検出器
カラム：内径 0.25mm，長さ 30m のフューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフィー用 7%シアノプロピル－7%フェニル－メチルシリコーンポリマーを厚さ 0.25μm で被覆する．
カラム温度：110℃から毎分 10℃で 185℃まで昇温し，次いで 210℃まで毎分 2℃で昇温し，更に 260℃まで毎分 8℃で昇温する．その後 260℃を 15 分間保持する．
キャリヤーガス：ヘリウム
流量：内標準物質の保持時間が約 24 分となるように調整する．

システム適合性
システムの性能：単糖標準溶液 2μL につき，上記の条件で操作するとき，D－ガラクトース，内標準物質，*N*－アセチルガラクトサミン及び *N*－アセチルノイラミン酸の順に溶出し，内標準物質と *N*－アセチルガラクトサミンの分離度は 10 以上である．

純度試験

（**1**） 類縁物質　本品のたん白質 30μg に対応する容量につき，次の条件で液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉により試験を行う．各々のピーク面積を自動積分法により測定し，本品の溶媒以外のピーク面積から面積百分率法によりそれらの量を求めるとき，レノグラスチム以外のピークの合計量は 1.0%以下である．

試験条件
検出器：紫外吸光光度計(測定波長：215nm)
カラム：内径 7.5mm，長さ 60cm のステンレス管に 10μm の液体クロマトグラフィー用多孔質シリカゲルを充てんする．
カラム温度：25℃付近の一定温度
移動相：無水リン酸水素二ナトリウム 1.4g 及び塩化ナトリウム 5.8g を水に溶かし，1000mL とする．この液に，リン酸二水素ナトリウム二水和物 1.6g 及び塩化ナトリウム 5.8g を水に溶かして 1000mL とした液を加えて pH7.4 に調整する．
流量：レノグラスチムの保持時間が約 21 分となるように調整する．
面積測定範囲：レノグラスチムの保持時間の約 2 倍の範囲

システム適合性
検出の確認：0.1vol%ポリソルベート 20 を含む本品の溶媒で薄めたレノグラスチム標準品の溶液（1→500）60μL につき，上記の条件で操作するとき，レノグラスチムのピークを認める．
システムの性能：レノグラスチム標準品を用い，上記の条件で操作するとき，レノグラスチムのピークの理論段数は 2700 段以上である．

（**2**） 宿主由来たん白質　別に規定する．

定量法

（**1**）　たん白質量　本品を試料溶液とする．別にレノグラスチム標準品を標準溶液とする．試料溶液及び標準溶液30μL ずつを正確にとり，次の条件で液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉により試験を行い，それぞれの液のレノグラスチムのピーク面積 A_T 及び A_S を測定する．

本品 1mL 中のたん白質量(mg)= $C_S \times A_T / A_S$

C_S：レノグラスチム標準品のたん白質濃度(mg/mL)

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：220nm)

カラム：内径 4.6mm，長さ 25cm のステンレス管に 5μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする．

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相 A：水／液体クロマトグラフィー用アセトニトリル／トリフルオロ酢酸混液(600：400：1)

移動相 B：液体クロマトグラフィー用アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸混液(800：200：1)

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する．

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0～40	80→30	20→70

流量：レノグラスチムの保持時間が約 35 分となるように調整する．

システム適合性

システムの性能：標準溶液 30μL につき，上記の条件で操作するとき，レノグラスチムのピークの理論段数は 2900 段以上である．

システムの再現性：標準溶液 30μL につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，レノグラスチムのピーク面積の相対標準偏差は 4.0%以下である．

（**2**）　比活性　本品の 1mL 中に 7.69，10.0 及び 13.0 単位（推定値）を含む液となるように FBS・IMDM を加え，それぞれ試料溶液(1)，試料溶液(2)及び試料溶液(3)とする．別にレノグラスチム標準品に FBS・IMDM を加え，1mL 中に 7.69，10.0 及び 13.0 単位を含む液を調製し，それぞれ標準溶液(1)，標準溶液(2)及び標準溶液(3)とする．各試料溶液及び各標準溶液の 100μL を正確に量り，プラスチック製滅菌培養プレートのウェル中へそれぞれ添加し，FBS・IMDM を加えて 1mL 中に 5×10^5 個を含むように調製した NFS－60 細胞懸濁液 50μL を加えて均一にかき混ぜた後，37℃の炭酸ガス培養器に入れ，22 時間培養する．培養後，各ウェルにレザズリン液 15μL を加えて波長 570nm における吸光度 A_{T1} 及び A_{S1} 及び波長 600nm における吸光度 A_{T2} 及び A_{S2} を測定する．標準溶液及び試料溶液の各濃度における反応値［吸光度の差($A_{S1} - A_{S2}$ 及び $A_{T1} - A_{T2}$)］から，平行線検定法により標準溶液に対する試料溶液の効力比(P_r)を求め，本品のたん白質 1mg 当たりのレノグラスチムの力価（単位）を求める．

$P_r = \mathrm{antiln}\,(M)$

$M = (P_T - P_S) / \mathrm{db}$

$P_T = T_1 + T_2 + T_3$　　$P_S = S_1 + S_2 + S_3$

$\mathrm{b} = H_L\,(L_S + L_T) / \mathrm{Inh}$

$H_L = 12\mathrm{n} / (\mathrm{d}^3 - \mathrm{d})$

$L_S = 1S_1 + 2S_2 + 3S_3 - 1/2\,(\mathrm{d} + 1)\,P_S$　　$L_T = 1T_1 + 2T_2 + 3T_3 - 1/2\,(\mathrm{d} + 1)\,P_T$

$\mathrm{d} = 3$　　$\mathrm{I} = \ln 1.3$

$\mathrm{n} = 3$　　$\mathrm{h} = 2$

T_1：試料溶液(1)の反応値の平均　　S_1：標準溶液(1)の反応値の平均

T_2：試料溶液(2)の反応値の平均　　S_2：標準溶液(2)の反応値の平均

T_3：試料溶液(3)の反応値の平均　　S_3：標準溶液(3)の反応値の平均

レノグラスチムの比活性（単位/mg たん白質）= $S \times P_r \times D_T / D_S / C$

S：レノグラスチム標準品の力価（単位/mL）

D_T：試料溶液(3)の希釈倍率

D_S：標準溶液(3)の希釈倍率

C：本品のたん白質濃度（mg/mL）

貯法
保存条件　－20℃以下で保存する．
容器　気密容器．

9．01 標準品の（1）の項に次を追加する．

レノグラスチム標準品

9．41 試薬・試液の項に次を追加する．

***N*－アセチルガラクトサミン**　$C_8H_{15}NO_6$　白色の結晶又は結晶性の粉末である．
含量　98.0%以上．　**定量法**　本品 36mg を水 1mL に溶かし，試料溶液とする．試料溶液 15μL につき，次の条件で液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉により試験を行う．各々のピーク面積につき自動積分法で測定し，面積百分率法により本品の含量を求める．
試験条件
検出器：示差屈折計（検出器温度：40℃付近の一定温度）
カラム：内径 8mm，長さ 30cm のステンレス管に 7μm の液体クロマトグラフィー用スチレン－ジビニルベンゼン共重合体を充てんする．
カラム温度：80℃付近の一定温度
移動相：水
流量：毎分 0.5mL
面積測定範囲：*N*－アセチルガラクトサミンの保持時間の 3 倍の範囲．

***N*－アセチルノイラミン酸**　$C_{11}H_{19}NO_9$　白色の結晶又は結晶性の粉末である．
含量　98.0%以上．　**定量法**　本品 30mg を移動相 1mL に溶かし，試料溶液とする．試料溶液 15μL につき，次の条件で液体クロマトグラフィー〈*2.01*〉により試験を行う．各々のピーク面積につき自動積分法で測定し，面積百分率法により本品の含量を求める．
試験条件
検出器：示差屈折計（検出器温度：40℃付近の一定温度）
カラム：内径 8mm，長さ 30cm のステンレス管に 6μm の液体クロマトグラフィー用スチレン－ジビニルベンゼン共重合体を充てんする．
カラム温度：50℃付近の一定温度
移動相：10mmol/L 過塩素酸溶液
流量：毎分 0.5mL
面積測定範囲：*N*－アセチルノイラミン酸の保持時間の 3 倍の範囲．

イスコフ改変ダルベッコ粉末培地　1L 当たり無水塩化カルシウム 165mg，無水硫酸マグネシウム 97.67mg，塩化カリウム 330mg，硝酸カリウム 76μg，塩化ナトリウム 4.5g，リン酸二水素ナトリウム一水和物 125mg，亜セレン酸ナトリウム五水和物 17.3μg，グリシン 30mg，L－アラニン 25mg，L-アルギニン塩酸塩 84mg，L－アスパラギン 25mg，L－アスパラギン酸 30mg，L－システイン塩酸塩 91.4mg，L－グルタミン酸 75mg，L－グルタミン 584mg，L－ヒスチジン塩酸塩一水和物 42mg，L－イソロイシン 105mg，L－ロイシン 105mg，L－リジン塩酸塩 146mg，L－メチオニン 30mg，L－フェニルアラニン 66mg，L－プロリン 40mg，L－セリン 42mg，L－トレオニン 95mg，L－トリプトファン 16mg，L－チロシン二ナトリウム塩 104mg，L－バリン 94mg，ビオチン 13μg，塩化コリン 4mg，D－パントテン酸カルシウム 4mg，葉酸 4mg，ニコチン酸アミド 4mg，ピリドキサール塩酸塩 4mg，リボフラビン 0.4mg，チアミン塩酸塩 4mg，シアノコバラミン 13μg，ミオイノシトール 7.2mg，ブドウ糖 4.5g，*N*－2－ヒドロキシエチルピペラジン－*N*－2－エタンスルホン酸 5.958g，フェノールレッド 15mg，ピルビン酸ナトリウム 110mg を含有する細胞培養用培地．

NFS-60 細胞　レトロウィルス（Cas-Br-M）を感染させた白血病マウスより製する．J. N. Ihle 等が確立した株（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，1985，82，6687）を適切な培地で馴化させたものを小分けして－150℃以下に凍結保存する．

FBS・IMDM　イスコフ改変ダルベッコ粉末培地 1L 分，カナマイシン硫酸塩(600μg(力価)以上/mg)0.1g，炭酸水素ナトリウム 3.0g 及び 2－メルカプトエタノール溶液(1→10)36μL を水に溶かし 1000mL とした後，ろ過滅菌する．この液に，56℃で 30 分間加温したウシ胎児血清を 10vol%になるように加える．

塩化アセチル　CH_3COCl　無色澄明の液である．

クロロトリメチルシラン　$(CH_3)_3SiCl$　無色～ほとんど無色の液で，刺激臭があり，湿った空気中で発煙する．ジエチルエーテルに極めて溶けやすく，水及びエタノールとは反応する．沸点：約 58℃

トリス緩衝液，0.02mol/L，pH 7.4　2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール 2.4g を水 800mL に溶かし，1mol/L 塩酸試液を加えて pH7.4 に調整した後，水を加えて 1000mL とする．

トリス緩衝液，0.5mol/L，pH 8.1　2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール 12.1g を水 160mL に溶かし，1mol/L 塩酸試液を加えて pH8.1 に調整した後，水を加えて 200mL とする．

尿素・EDTA 試液　尿素 48.0g 及びエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 0.2g を pH8.1 の 0.5mol/L トリス緩衝液に溶かし，100mL とする．

1,1,1,3,3,3－ヘキサメチルジシラザン　$(CH_3)_3SiNHSi(CH_3)_3$　無色～ほとんど無色の液で，ジエチルエーテルに極めて溶けやすく，水及びエタノールとは反応する．沸点：約 125℃

ミオイノシトール　$C_6H_6(OH)_6$　白色の結晶又は結晶性の粉末である．

ヨード酢酸　ICH_2COOH　白色～ほとんど白色の結晶である．

レザズリン液　生細胞測定試験用に製造したもの．