フィルグラスチム(遺伝子組換え)

Filgrastim(Genetical Recombination)

MTPLGPASSL PQSFLLKCLE QVRKIQGDGA ALQEKLCATY KLCHPEELVL
LGHSLGIPWA PLSSCPSQAL QLAGCLSQLH SGLFLYQGLL QALEGISPEL
GPTLDTLQLD VADFATTIWQ QMEELGMAPA LQPTQGAMPA FASAFQRRAG
GVLVASHLQS FLEVSYRVLR HLAQP

$C_{845}H_{1339}N_{223}O_{243}S_9$：18798.61

[*121181-53-1*]

本品の本質は，ヒト顆粒球コロニー刺激因子 cDNA を導入した大腸菌で産生される 175 個のアミノ酸残基からなるたん白質である．本品は，水溶液である．

本品は定量するとき，1mL 当たり 0.45～0.55mg のたん白質を含み，たん白質 1mg 当たり 1.0×10^8 単位以上を含む．

性状　本品は無色澄明の液である．

確認試験　フィルグラスチム用ポリアクリルアミドゲルの大きさに応じて，本品のたん白質 5～10μg に対応する容量をとり，水 10μL を加える．この液 3 容量にフィルグラスチム試料用緩衝液 1 容量を加えて試料溶液とする．別にたん白質量として本品と等量のフィルグラスチム標準品をとり，試料溶液の調製と同様に操作して得た液を標準溶液とする．電気泳動装置にフィルグラスチム用ポリアクリルアミドゲルを取り付け，電極槽に必要量の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用緩衝液を入れる．試料溶液及び標準溶液の全量をそれぞれゲルの溝に注入し，下側を陽極として電気泳動を行う．ブロモフェノールブルーの帯がゲル下端付近に達したとき，電気泳動を終了させる．クーマシーブリリアントブルーR250　1.25g をメタノール 450mL 及び酢酸(100)100mL に溶かし，水を加えて 1000mL とした液に浸して泳動帯を染色するとき，試料溶液から得た泳動帯は標準溶液から得た泳動帯と同様の位置に同様の泳動像を示す．

ペプチドマップ　本品及びフィルグラスチム標準品のたん白質約 80μg に対応する容量をとり，酵素消化用緩衝液 200μL 及び水を加えて全量を 390μL とする．それぞれの液に V8 プロテアーゼ 50μg を水 250μL に溶かした液 10μL を加え，25℃で 17～19 時間反応した後，水／トリフルオロ酢酸混液(19：1)18μL 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 70μL ずつにつき，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，試料溶液から得たクロマトグラムは，標準溶液から得たクロマトグラムと同一の保持時間に同様のピークを示す．また，試料溶液と標準溶液のフィルグラスチムのアミノ酸配列 L48 から E94 を含むピークの面積を比較するとき，その比は 80～120%である．

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：214nm)

カラム：内径 2.1mm，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ブチルシリル化シリカゲルを充てんする．

カラム温度：40℃付近の一定温度

移動相 A：水／トリフルオロ酢酸混液(1000：1)

移動相 B：アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸混液(9000：1000：9)

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 ～ 2	98	2
2 ～ 30	98 → 70	2 → 30
30 ～ 85	70 → 50	30 → 50
85 ～ 90	50 → 2	50 → 98
90 ～ 100	2	98

流量：毎分 0.20mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液 70μL につき，上記の条件で操作するとき，約 10 分以内に溶出する溶媒のピークの後に溶出するフィルグラスチムを構成する主な 8 本のピークの隣接するピークの分離度はそれぞれ 1.5 以上である．

pH 〈*2.54*〉　3.7～4.3

純度試験

(1)　異種たん白質　別に規定する．

(2)　オリゴマー　本品 250μL 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．本品の各々のピーク面積を自動積分法により測定し，それらの量を面積百分率法により求めるとき，フィルグラスチム以外のピークの合計面積は 2%以下である．

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：280nm)

カラム：内径 7.5mm, 長さ 60cm のステンレス管に液体クロマトグラフィー用親水性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：塩化ナトリウム 5.8g を希酢酸 10mL 及び水 900mL に溶かし，水酸化ナトリウム試液を加えて pH5.5 に調整した後，ラウリル硫酸ナトリウム 250mg を加えて溶かし，更に水を加えて 1000mL とする．

流量：フィルグラスチムの保持時間が約 17 分になるように調整する．

面積測定範囲：サイズ排除カラムの排除容積に相当する保持時間からフィルグラスチムの溶出終了までの範囲

システム適合性

検出の確認：本品 10μL を正確に量り，移動相を加えて正確に 1000μL とする．この液 250μL から得たフィルグラスチムのピーク面積が，本品のフィルグラスチムのピーク面積の 0.7～1.3%となることを確認する．

システムの性能：卵白アルブミン 12.5mg 及びミオグロビン 12.5mg を水 5mL に溶かした液 10μL につき，上記の条件で操作するとき，卵白アルブミン，ミオグロビンの順に溶出し，その分離度は 1.7 以上である．

システムの再現性：本品 250μL につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，フィルグラスチムのピーク面積の相対標準偏差は 2.5%以下である．

(3)　チャージアイソマー　本品 100μL 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．本品の各々のピーク面積を自動積分法により測定し，それらの量を面積百分率法により求めるとき，フィルグラスチムに対する相対保持時間約 0.87 のチャージアイソマーのピークの量は 3%以下である．

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：280nm)

カラム：内径 4.6mm, 長さ 35mm のステンレス管に 2.5μm の液体クロマトグラフィー用非多孔性強酸性イオン交換樹脂を充てんする．

カラム温度：25℃付近の一定温度

移動相 A：水 900mL に酢酸(100)1.14mL を加え，水酸化ナトリウム試液を加えて pH5.4 に調整し，水を加えて 1000mL とする．

移動相 B：塩化ナトリウム 5.84g を酢酸(100)1.14mL 及び水 900mL に溶かし，水酸化ナトリウム試液を加えて pH5.4 に調整し，水を加えて 1000mL とする．

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 ～ 2	100	0
2 ～ 10	100 → 40	0 → 60

10 ～ 11	40 → 100	60 → 0
11 ～ 20	100	0

流量：フィルグラスチムの保持時間が約 14 分になるように調整する．

面積測定範囲：6 分から 17 分まで

システム適合性

検出の確認：フィルグラスチム用システム適合性試験用溶液 100μL につき，上記の条件で操作するとき，チャージアイソマー含量が 1.4～2.6%となることを確認する．

システムの性能：フィルグラスチム用システム適合性試験用溶液 100μL につき，上記条件で操作するとき，チャージアイソマー，フィルグラスチムの順に溶出し，その分離度は 1.5 以上である．

システムの再現性：本品 100μL につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，フィルグラスチムのピーク面積の相対標準偏差は 2.5%以下である．

定量法

（1） たん白質含量　本品及びフィルグラスチム標準品 200μL 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，フィル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 中のフィルグラスチムの量(mg/mL)＝$C \times A_T / A_S$

C：フィル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：280nm)

カラム：内径 4.6mm，長さ 25cm のステンレス管に 10μm の液体クロマトグラフィー用オクチ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／1－プロパノール／トリフルオロ酢酸混液(699：300：1)

移動相 B：1－プロパノール／水／トリフルオロ酢酸混液(800：199：1)

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 ～ 2	90	10
2 ～13	90 → 70	10 → 30
13 ～15	70 → 0	30 → 100
15 ～18	0	100

流量：フィルグラスチムの保持時間が約 15 分になるように調整する．

システム適合性

システムの性能：ウラシル 1mg 及びジフェニル 2mg を水／1－プロパノール／トリフルオロ酢酸混液(649：350：1)100mL に溶かした液 200μL を上記の条件で操作するとき，ウラシル，ジフェニルの順に溶出し，その分離度は 8 以上である．ただし，移動相は移動相 A／移動相 B 混液(9：1)とする．

システムの再現性：フィルグラスチム標準品 200μL につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，フィルグラスチムのピーク面積の相対標準偏差は 2.5%以下である

（2） 比活性

（ⅰ） 試験細胞　32D clone3 細胞を用いる．

（ⅱ） 定量用試料希釈液　フィルグラスチム用イスコブ改変ダルベッコ液体培地に 200mmol/L L－グルタミン溶液を 1vol%，ウシ胎仔血清を 5vol%となるように加え，フィルターでろ過滅菌する．

（ⅲ） 標準溶液　フィルグラスチム標準品に 1mL にたん白質 0.5～6ng を含む液となるように定量用試料希釈液を加えて任意の濃度 S_H から 5 段階以上の等比希釈を行い，標準溶液とする．

（ⅳ） 試料溶液　本品に 1mL にたん白質 0.5～6ng を含む液となるように定量用試料希釈液を加えて任意の濃度 U_H から 5 段階以上の等比希釈を行い，試料溶液とする．

（ⅴ） 操作法　培養までの操作は，厳密な無菌的注意のもとで行う．

各濃度の試料溶液及び標準溶液を，それぞれについて細胞培養用 96 穴平底マイクロプレート 3 枚以上を用い，1 枚ごとに 1 穴当たり 100μL ずつ正確に分注する．続いて定量用試料希釈液 1mL 中に細胞数が 1×10^5 個となるように調製した試験細胞浮遊液を 100μL ずつ正確に加え，炭酸ガス濃度 5%の培養器内で 37±2℃で，21～27 時間培養する．培養後，蛍光基質溶液を 40μL ずつ加え，同じ条件で更に 21～51 時間培養する．次に蛍光マイクロプレート

リーダーを用い，励起波長 530～5　60nm，測定波長 590nm における蛍光強度を測定する．試料溶液及び標準溶液共に，少なくとも 3 枚以上のマイクロプレートで各 3 濃度以上の測定値を計算に用いる．

（vi）　計算法　（ｖ)操作法における試料溶液及び標準溶液の各濃度を常用対数に変換した値をそれぞれ x_U 及び x_S とし，更にその合計した値をそれぞれ X_U 及び X_S とする．また，試料溶液及び標準溶液から得られた蛍光強度をそれぞれ y_U 及び y_S，更に各濃度で合計した値をそれぞれ Y_U 及び Y_S とする．試料溶液及び標準溶液の濃度数をそれぞれ n_U 及び n_S，プレート数を r とし，定量法(１)で算出したたん白質含量(mg/mL)を用いて，次の式より本品 1mg たん白質当たりの比活性を求める．

本品 1mg たん白質当たりの比活性(単位/mg)

$$= \text{antilog}\, M \times \text{フィルグラスチム標準品の生物学的活性(単位/mL)} \times \frac{U_H\text{を調製したときの希釈倍数}}{S_H\text{を調製したときの希釈倍数}} \times \frac{U_H}{S_H} \times \frac{1}{\text{本品の定量法(１)の測定値(mg/mL)}}$$

$$M = X_S/n_S - X_U/n_U - (\Sigma Y_S/n_S r - \Sigma Y_U/n_U r)/b$$

$$b = (Sxy_S + Sxy_U)/(Sxx_S + Sxx_U)$$

$$Sxy_S = \Sigma x_S Y_S - X_S \Sigma Y_S/n_S$$

$$Sxy_U = \Sigma x_U Y_U - X_U \Sigma Y_U/n_U$$

$$Sxx_S = r\Sigma x_S^2 - rX_S^2/n_S$$

$$Sxx_U = r\Sigma x_U^2 - rX_U^2/n_U$$

ただし，試験成立条件は下記の 3 項目とする．

1)　F'_S は次表の $m = n_S(r-1)$ に対する F_1 以上であり，F'_U は次表の $m = n_U(r-1)$ に対する F_1 以上である．

$$F'_S = V_{RS}/V_{ES}$$

$$V_{RS} = Sxy_S^2/Sxx_S$$

$$V_{ES} = (\Sigma y_S^2 - \Sigma(Y_S^2/r))/(n_S(r-1))$$

$$F'_U = V_{RU}/V_{EU}$$

$$V_{RU} = Sxy_U^2/Sxx_U$$

$$V_{EU} = \{\Sigma y_U^2 - \Sigma(Y_U^2/r)\}/\{n_U(r-1)\}$$

2)　F'は次表の $m = (n_S + n_U)(r-1)$ に対する F_1 より小さい．

$$F' = V_P/V_E$$

$$V_P = Sxy_S^2/Sxx_S + Sxy_U^2/Sxx_U - (Sxy_S + Sxy_U)^2/(Sxx_S + Sxx_U)$$

$$V_E = \{\Sigma y_S^2 + \Sigma y_U^2 - \Sigma(Y_S^2/r) - \Sigma(Y_U^2/r)\}/\{(n_S + n_U)(r-1)\}$$

3)　$L \leqq 0.3$ である．

$$L = 2/(b(1-g))\sqrt{V_E F_1[(1-g)(1/n_S r + 1/n_U r) + (\Sigma Y_S/n_S r - \Sigma Y_U/n_U r)^2/\{b^2(Sxx_S + Sxx_U)\}]}$$

F_1：$m = (n_S + n_U)(r-1)$ に対する次表の値

$$g = V_E F_1/\{b^2(Sxx_S + Sxx_U)\}$$

m に対する F_1 の値

m	F_1	m	F_1	m	F_1
1	161.45	13	4.667	25	4.242
2	18.51	14	4.600	26	4.225
3	10.129	15	4.543	27	4.210
4	7.709	16	4.494	28	4.196
5	6.608	17	4.451	29	4.183
6	5.987	18	4.414	30	4.171
7	5.591	19	4.381	40	4.085
8	5.318	20	4.351	60	4.001
9	5.117	21	4.325	120	3.920
10	4.965	22	4.301	∞	3.841
11	4.844	23	4.279		
12	4.747	24	4.260		

貯法

保存条件　凍結を避け，10℃以下で保存する．

容器　密封容器．

9．01 標準品の(1)の項に次を追加する．

フィルグラスチム標準品

9．41 試薬･試液の項に次を追加する．

イスコブ改変ダルベッコ液体培地，フィルグラスチム用　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，炭酸水素ナトリウム 3024mg を含有する細胞培養用培地．

緩衝液，酵素消化用　尿素 0.30g を 2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール 6.06g を水に溶かし 100mL とした液 100μL，2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール塩酸塩 7.88g を水に溶かし 100mL とした液 100μL，メチルアミン塩酸塩 2.70g を水に溶かし 100 mL とした液 100μL，ジチオスレイトール 30.9mg を水 1mL に溶かした液 50μL 及び水 420μL に溶かす．

緩衝液，SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動用　2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール 3.0g，グリシン 14.4g 及びラウリル硫酸ナトリウム 1.0g を水に溶かし，1000mL とする．

緩衝液，フィルグラスチム試料用　2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール 1.2g 及びラウリル硫酸ナトリウム 3.2g を水に溶かし，6mol/L 塩酸試液，1mol/L 塩酸試液又は 0.1mol/L 塩酸試液を加えて pH6.8 に調整した後，ブロモフェノールブルー32mg 及びグリセリン 16mL を溶かし，水を加えて 40mL とする．

32D clone3 細胞　マウス骨髄由来 32D 細胞株を G-CSF 存在下で培養し，クローニングした株．

蛍光基質試液　酸化還元指示薬を含む溶液．

システム適合性試験用溶液，フィルグラスチム用　「フィルグラスチム」純度試験(3)により定量するとき，「フィルグラスチム」にチャージアイソマー約 2%を含むように調製したもの．

ポリアクリルアミドゲル，フィルグラスチム用　分離ゲルのアクリルアミド濃度を 15%としたポリアクリルアミドゲル．

9. 42 クロマトグラフィー用担体／充てん剤の項に次を追加する.

ブチルシリル化シリカゲル，液体クロマトグラフィー用 液体クロマトグラフィー用に製造したもの.

非多孔性強酸性イオン交換樹脂，液体クロマトグラフィー用 液体クロマトグラフィー用に製造したもの.