

1 エポエチン ベータ(遺伝子組換え)

2 Epoetin Beta(Genetical Recombination)

3 タンパク質部分

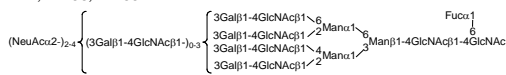
```

APPRLLICDSR VLERYLLEAK EAENITTTGCA EHCSLNENIT VPDTKVNFYA
WKRMEVGGQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS
GLRSLTTLRL ALGAQKEAIS PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLLKLYTGEA CRTGD
    
```

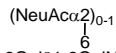
4 N24, N38, N83及びS126, 糖鎖結合

6 糖鎖部分(主な糖鎖構造)

7 N24, N38, N83



8 S126



10

11 C<sub>809</sub>H<sub>1301</sub>N<sub>229</sub>O<sub>240</sub>S<sub>5</sub> : 18235.70(タンパク質部分)

12 [I223I2-54-3]

13 本品の本質は、ヒトエリスロポエチンcDNAを導入したチ  
 14 ャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される165個のアミノ  
 15 酸残基からなる糖タンパク質(分子量約30000)である。本品  
 16 は、水溶液である。本品は、赤血球前駆細胞の分化・増殖促  
 17 進作用を有する。

18 本品は定量するとき、1 mL当たり0.5~1.5 mgのタンパク  
 19 質を含み、タンパク質1 mg当たり1.5×10<sup>5</sup>単位以上を含む。

20 **性状** 本品は無色澄明の液である。

21 **確認試験**

22 (1) 本品及びエポエチンベータ標準品をそれぞれ試料溶液  
 23 及び標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液につき、次の条  
 24 件でキャピラリー電気泳動を行うとき、試料溶液及び標準溶  
 25 液から得た各々のピークの移動時間は等しく、同様の溶出パ  
 26 ターンを示す。

27 **試験条件**

28 検出器：紫外吸光光度計(測定波長：200 nm)

29 カラム：内径50 μm、長さ約50 cmのシリカキャピラ  
 30 ーにアミノ基を化学的に被覆する(有効長約40 cm)。

31 泳動液：リン酸二水素ナトリウム二水和物32.8 gを水に  
 32 溶かして1000 mLとした液に、リン酸水素二ナトリ  
 33 ウム十二水和物75.2 gを水に溶かして1000 mLとした  
 34 液を加えてpH4.5に調整する。この液19容量とエタノ  
 35 ール(99.5)1容量を混和する。

36 泳動温度：20℃付近の一定温度

37 泳動条件：泳動電流(約50 μAの一定電流)、泳動時間(30  
 38 分)

39 試料溶液及び標準溶液の注入：2秒間(加圧法：0.5 psi)

40 ピーク検出範囲：試料注入後10分から30分の範囲(た  
 41 だし本品の溶媒由来のピークを除く)。

42 システム適合性

43 システムの性能：標準溶液につき、上記の条件で操作す  
 44 るとき、エポエチンベータの主ピークを4本以上検出

45 する。最初に検出する主ピークと次に検出する主ピー  
 46 クの分離度は1以上である。

47 システムの再現性：標準溶液につき、上記の条件で試験  
 48 を3回繰り返すとき、最初に検出する主ピークの移動  
 49 時間の相対標準偏差は2%以下である。

50 (2) 本品及びエポエチンベータ標準品のタンパク質600  
 51 μgに相当する量を取り、それぞれ適切な方法で脱塩を行い、  
 52 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、  
 53 N-エチルモルホリン2.3 gを水100 mLに溶かして酢酸(100)  
 54 を加えてpH8.0に調整した液600 μLに溶かし、脱塩試料溶  
 55 液及び脱塩標準溶液とする。脱塩試料溶液及び脱塩標準溶液  
 56 500 μLを取り、エポエチンベータ用トリエチルアミン3.3  
 57 μL及びエポエチンベータ用2-メルカプトエタノール1.5 μL  
 58 を加え、37℃で1時間反応する。冷後、これらの液に、4-  
 59 ビニルピリジン5.5 μLを加え、25℃で1時間反応する。そ  
 60 ぞれの反応液に薄めたエポエチンベータ用トリフルオロ酢酸  
 61 (1→10)50 μLを加えて反応を停止した後、適切な方法で試  
 62 薬を除き、ピリジルエチル化試料及びピリジルエチル化標準  
 63 品とする。ピリジルエチル化試料及びピリジルエチル化標準  
 64 品を炭酸水素ナトリウム溶液(21→2500)500 μLに溶かす。  
 65 その400 μLずつを取り、リシルエンドペプチダーゼの炭酸  
 66 水素ナトリウム溶液(21→2500)溶液(1→50000)16 μLを加え、  
 67 37℃で24時間反応する。ただし、反応開始4時間後及び20時  
 68 間後にリシルエンドペプチダーゼの炭酸水素ナトリウム溶液  
 69 (21→2500)溶液(1→50000)16 μLを加える。各反応液に薄め  
 70 たエポエチンベータ用トリフルオロ酢酸(1→10)100 μLを加  
 71 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  
 72 及び標準溶液100 μLにつき、次の条件で液体クロマトグラ  
 73 フィー (2.01)により試験を行うとき、それぞれの液のリシ  
 74 ルエンドペプチダーゼ消化ペプチドのピークの保持時間は等  
 75 しく、同様の溶出パターンを示す。

76 **試験条件**

77 検出器：紫外吸光光度計(測定波長：214 nm)

78 カラム：内径4.6 mm、長さ25 cmのステンレス管に5  
 79 μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル  
 80 化シリカゲルを充填する。

81 カラム温度：25℃付近の一定温度

82 移動相A：水/エポエチンベータ用トリフルオロ酢酸混  
 83 液(1000 : 1)

84 移動相B：液体クロマトグラフィー用アセトニトリル/  
 85 水/エポエチンベータ用トリフルオロ酢酸混液  
 86 (900 : 100 : 1)

87 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ  
 88 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 ~ 10	90	10
10 ~ 30	90 → 80	10 → 20
30 ~ 50	80	20
50 ~ 130	80 → 40	20 → 60
130 ~ 140	40 → 10	60 → 90
140 ~ 150	10	90

89 流量：溶媒のピークの後に溶出する最初のピークの保持  
 90 時間が約17分となるように調整する。

91 システム適合性  
 92 システムの性能：標準溶液を用い、上記の条件で操作す  
 93 るとき、溶媒のピークの後に主要な9個のペプチドが  
 94 分離して溶出する。5番目と6番目に溶出するピーク  
 95 の分離度は3以上である。

96 (3) 本品100  $\mu\text{L}$ を正確に量り、レソルシノール・硫酸銅  
 97 (II)試液1 mLを加え、沸騰水浴中で30分間加熱する。氷冷後、  
 98 酢酸*n*-ブチル/1-ブタノール混液(4:1)2 mLを加え、激  
 99 しく振り混ぜる。上層をとり、試料溶液とする。別に*N*-ア  
 100 セチルノイラミン酸を水に溶かし、1 mL中に0.1、0.2及び  
 101 0.3 mgを含む液を調製し、標準原液(1)、標準原液(2)及び標  
 102 準原液(3)とする。標準原液(1)、標準原液(2)及び標準原液(3)  
 103 100  $\mu\text{L}$ をそれぞれ正確に量り、レソルシノール・硫酸銅(II)  
 104 試液1 mLをそれぞれ加え、以下試料溶液と同様の操作を行  
 105 い、標準溶液(1)、標準溶液(2)及び標準溶液(3)とする。試料  
 106 溶液、標準溶液(1)、標準溶液(2)及び標準溶液(3)につき、紫  
 107 外可視吸光度測定法(2.24)により試験を行い、625 nmにお  
 108 ける吸光度を測定する。標準溶液から得た検量線を用いて試  
 109 料溶液1 mL当たりのシアル酸の量(mg/mL)を求め、次式に  
 110 よりエポエチンベータタンパク質1 mol当たりのシアル酸量  
 111 (mol/molエポエチンベータタンパク質)を求めるとき、10~  
 112 13である。

113 シアル酸の量(mol/molエポエチンベータタンパク質)  
 114  $=A/C \times 18236/309.27$

115 *A*: 試料溶液のシアル酸量(mg/mL)  
 116 *C*: 本品のタンパク質量(mg/mL)  
 117 18236: エポエチンベータのタンパク質部分の分子量  
 118 309.27: *N*-アセチルノイラミン酸の分子量

119 (4) 糖鎖プロファイル 別に規定する。

120 p*H* (2.54) 7.0~8.0

#### 121 純度試験

122 (1) 類縁物質 本品20  $\mu\text{L}$ につき、次の条件で液体クロマ  
 123 トグラフィー(2.01)により試験を行う。各々のピーク面積  
 124 を自動積分法により測定し、面積百分率法により溶媒以外の  
 125 ピークの量を求めるとき、エポエチンベータ以外のピークの  
 126 合計量は1.0%以下である。

#### 127 試験条件

128 検出器：紫外吸光度計(測定波長：214 nm)  
 129 カラム：内径7.5 mm、長さ60 cmのステンレス管に10  
 130  $\mu\text{m}$ の液体クロマトグラフィー用多孔質シリカゲルを  
 131 充填する。

132 カラム温度：25°C付近の一定温度  
 133 移動相：リン酸二水素ナトリウム二水和物1.6 g及び硫  
 134 酸ナトリウム十水和物16.1 gを水に溶かし、1000 mL  
 135 とした液に、硫酸ナトリウム十水和物16.1 gを0.01  
 136 mol/L水酸化ナトリウム試液に溶かして1000 mLとし  
 137 た液を加えてp*H*6.8に調整する。

138 流量：エポエチンベータの保持時間が約18分となるよ  
 139 うに調整する。

140 面積測定範囲：エポエチンベータの保持時間の約2倍の  
 141 範囲。

142 システム適合性

143 検出の確認：0.05 vol%エポエチンベータ用ポリソルベ  
 144 ート20を含む本品の溶媒で薄めたエポエチンベータ  
 145 標準品の溶液(1→1000)20  $\mu\text{L}$ につき、上記の条件で  
 146 操作するとき、エポエチンベータのピークを検出する。  
 147 システムの性能：エポエチンベータ標準品を用い、上記  
 148 の条件で操作するとき、エポエチンベータのピークの  
 149 理論段数は600段以上である。

150 (2) 宿主由来タンパク質 別に規定する。

151 (3) DNA 別に規定する。

#### 152 定量法

153 (1) タンパク質量 本品を試料溶液とする。別にエポエ  
 154 チンベータ標準品を標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液  
 155 15  $\mu\text{L}$ ずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィー  
 156 (2.01)により試験を行い、それぞれの液のエポエチンベ  
 157 ータのメインピーク及びサブピークの合計面積*A<sub>T</sub>*及び*A<sub>S</sub>*を  
 158 測定する。

159 本品1 mL中のタンパク質量(mg)= $C_s \times A_T/A_S$

160  $C_s$ : エポエチンベータ標準品のタンパク濃度(mg/mL)

#### 161 試験条件

162 検出器：紫外吸光度計(測定波長：214 nm)  
 163 カラム：内径4.6 mm、長さ25 cmのステンレス管に5  
 164  $\mu\text{m}$ の液体クロマトグラフィー用ブチルシリル化シリ  
 165 カゲルを充填する。

166 カラム温度：25°C付近の一定温度

167 移動相A：水/液体クロマトグラフィー用アセトニトリ  
 168 ル/エポエチンベータ用トリフルオロ酢酸混液  
 169 (400:100:1)

170 移動相B：液体クロマトグラフィー用アセトニトリル/  
 171 水/エポエチンベータ用トリフルオロ酢酸混液  
 172 (400:100:1)

173 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ  
 174 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%)
0~18	65→50	35→50
18~33	50→0	50→100
33~43	0	100

175 流量：エポエチンベータのメインピークの保持時間が約  
 176 22分となるように調整する。

#### 177 システム適合性

178 システムの性能：標準溶液15  $\mu\text{L}$ につき、上記の条件で  
 179 操作するとき、エポエチンベータのメインピーク、サ  
 180 ブピークの順に溶出し、メインピークの理論段数は  
 181 600段以上である。

182 システムの再現性：標準溶液15  $\mu\text{L}$ につき、上記の条件  
 183 で試験を6回繰り返すとき、エポエチンベータのメイ  
 184 ンピーク及びサブピークの合計面積の相対標準偏差は  
 185 4.0%以下である。

186 (2) 比活性 本品に1 mL中にエポエチンベータ5、10及  
 187 び20単位相当量(推定値)を含む液となるように0.1 w/v%ウ  
 188 シ血清アルブミン・塩化ナトリウム・リン酸塩緩衝液を加え、  
 189 それぞれ試料溶液(1)、試料溶液(2)及び試料溶液(3)とする。

190 別にエポエチンベータ標準品に1 mL中にエポエチンベータ5,  
191 10及び20単位相当量を含む液となるように0.1 w/v%ウシ血  
192 清アルブミン・塩化ナトリウム・リン酸塩緩衝液を加え、そ  
193 れぞれ標準溶液(1)、標準溶液(2)及び標準溶液(3)とする。各  
194 試料溶液及び各標準溶液0.2 mLずつを正確にとり、ICR系  
195 マウスに皮下投与する。初回投与後1日目及び2日目に、同  
196 様に各溶液0.2 mLずつを投与する。初回投与後3日目に、各  
197 被験マウスの眼窩静脈叢よりヘマトクリット管を用いて採血  
198 し、この採血液20 µLを血液希釈液9.94 mLに加えてかき混  
199 ぜ、希釈血液溶液とする。希釈血液溶液に溶血剤100 µLを  
200 加え、穏やかにかき混ぜて溶血させ、粒子計数分析装置を用  
201 い、溶血剤抵抗性赤血球系細胞の粒子数を測定する。

202 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  
203 ( $P_r$ )を求め、次式により本品のタンパク質1 mg当たりの力  
204 価(単位)を求める。

$$205 P_r = 10^M$$

$$206 M = 4/3 \times i \times T_a / T_b$$

$$207 i = \log 2$$

$$208 T_a = -S_1 - S_2 - S_3 + U_1 + U_2 + U_3$$

$$209 T_b = -S_1 + S_3 - U_1 + U_3$$

210  $U_1$ : 試料溶液(1)の反応値の平均

211  $U_2$ : 試料溶液(2)の反応値の平均

212  $U_3$ : 試料溶液(3)の反応値の平均

213  $S_1$ : 標準溶液(1)の反応値の平均

214  $S_2$ : 標準溶液(2)の反応値の平均

215  $S_3$ : 標準溶液(3)の反応値の平均

216 エポエチンベータ(遺伝子組換え)の比活性(単位/mgタンパク  
217 質)

$$218 = S \times P_r \times D_T / D_S / C$$

219  $S$ : エポエチンベータ標準品の力価(単位/mL)

220  $D_T$ : 試料溶液(3)の希釈倍数

221  $D_S$ : 標準溶液(3)の希釈倍数

222  $C$ : 本品のタンパク質量(mg/mL)

## 223 貯法

224 保存条件 -20°C以下で保存する。

225 容器 気密容器。

226 -----

## 227 9. 01 標準品(1)の項に次を追加する。

228

229 エポエチンベータ標準品

## 230 9. 41 試薬・試液の項に次を追加する。

231

232 ***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  
233 晶性の粉末である。

234 含量 98.0%以上。定量法 本品30 mgを移動相1 mLに  
235 溶かし、試料溶液とする。試料溶液15 µLにつき、次の条件  
236 で液体クロマトグラフィー(2.01)により試験を行う。各々  
237 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  
238 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°C付近の一定温度)

カラム: 内径8 mm、長さ30 cmのステンレス管に6 µm  
の液体クロマトグラフィー用スチレン-ジビニルベン  
ゼン共重合体を充填する。

カラム温度: 50°C付近の一定温度

移動相: 10 mmol/L過塩素酸溶液

流量: 毎分0.5 mL

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

249 **ウシ血清アルブミン・塩化ナトリウム・リン酸塩緩衝液, 0.1**

250 **w/v%** ウシ血清アルブミン1.0 gを水10 mLに溶かし、塩化  
251 ナトリウム8.0 g、塩化カリウム0.2 g、無水リン酸水素二ナ  
252 トリウム1.15 g及びリン酸二水素カリウム0.2 gを水に溶かし、  
253 1000 mLとした液に加える。

254 ***N*-エチルモルホリン**  $C_6H_{13}NO$  無色～黄褐色の液体である。

255 屈折率(2.45)  $n_D^{20}$ : 1.439~1.443

256 比重(2.56)  $d_4^{20}$ : 0.908~0.916

257 **トリエチルアミン**, エポエチンベータ用  $(C_2H_5)_3N$  無色澄  
258 明の液である。

259 比重(2.56)  $d_4^{20}$ : 0.724~0.730

260 水分(2.48) 0.2%以下

261 **トリフルオロ酢酸**, エポエチンベータ用  $CF_3COOH$  無色澄  
262 明の液である。

263 純度試験 本品の50 vol%溶液につき、紫外可視吸光度測定  
264 法(2.24)により試験を行うとき、波長270 nmで0.10以下、  
265 280 nmで0.02以下及び300~400 nmで0.01以下である。

266 **4-ビニルピリジン**  $C_7H_7N$  うすい黄色～黒褐色の液体であ  
267 る。

268 屈折率(2.45)  $n_D^{20}$ : 1.5500~1.5530

269 比重(2.56)  $d_{20}^{20}$ : 0.9850~0.9880

270 **ポリソルベート20**, エポエチンベータ用 黄褐色の澄明～わ  
271 ずかな微濁の液である。

272 粘度(2.53) 300~500 mPa·s

273 酸価(1.13) 3以下

274 けん化価(1.13) 40~50

275 水酸基価(1.13) 95~110

276 水分(2.48) 5.0%以下

277 **2-メルカプトエタノール**, エポエチンベータ用  
278  $HSCH_2CH_2OH$  含硫タンパク質研究用に製造されたもの。

279 **リシルエンドペプチダーゼ** *Lysobacter enzymogenes*から得  
280 たプロテアーゼ。pH7.7、25°Cにおいて1分間に1 µmolのト  
281 シル-グリシル-プロリル-リジン-4-ニトロアニリド酢  
282 酸塩を加水分解する酵素量を1単位とすると、本品1 mgは  
283 約150単位を含む。

284 **レスルシノール・硫酸銅(II)試液** レスルシノール0.1 gを水5  
285 mLに溶かし、0.1 mol/L硫酸銅(II)溶液125 µL、塩酸24 mL  
286 及び水を加えて50 mLとする。使用の4時間前までに調製す  
287 る。

## 288 9. 42 クロマトグラフィー用担体・充填剤の項に次を追加する。

289

290 **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  
291 クロマトグラフィー用に製造したもの。