エポエチン　アルファ(遺伝子組換え)

Epoetin Alfa（Genetical Recombination）

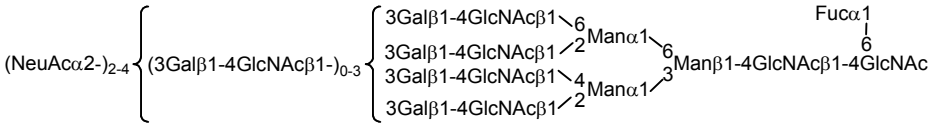
たん白質部分

```
APPRLICDSR VLERYLLEAK EAENITTGCA EHCSLNENIT VPDTKVNFYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVNSSQPWEP LQLHVDKAVS
GLRSLTTLLR ALGAQKEAIS PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGD
```

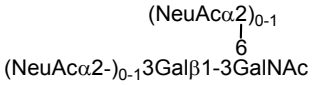
N24，N38，N83及びS126，糖鎖結合

糖鎖部分(主な糖鎖構造)

N24，N38，N83



S126



$C_{809}H_{1301}N_{229}O_{240}S_5$：18235.70

[*113427-24-0*]

本品の本質は，ヒトエリスロポエチンのゲノム DNA を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞で産生される 165 個のアミノ酸残基からなる糖たん白質(分子量約 37000～42000)である．本品は，水溶液である．本品は，赤血球前駆細胞の分化・増殖の促進作用を有する．

本品は定量するとき，1mL 当たり 1.1～1.5mg のたん白質を含み，たん白質 1mg 当たり 1.5×10^5 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　本品及びエポエチンアルファ標準品の適量をとり，それぞれに水を加えて薄める．それぞれの液 3 容量にエポエチンアルファ用試料緩衝液を 1 容量加え，100℃で 5 分間加熱し，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 0.7μg に対応する容量をそれぞれエポエチンアルファ用ポリアクリルアミドゲルの試料液添加溝に注入し，垂直不連続緩衝液系 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う．泳動終了後，ゲル，ポリビニリデンフロライド膜及びろ紙をブロッティング試液に浸した後，セミドライブロッティング装置に取り付け，ろ紙の面積に基づいて 0.7～0.9mA/cm² 定電流で約 1 時間転写する．転写後，ポリビニリデンフロライド膜をエポエチンアルファ用ブロッキング試液に浸し，1 時間以上振とう後，エポエチンアルファ用ブロッキング試液を除き，一次抗体試液を加え，更に一晩振とう又は 4℃で三晩放置する．一次抗体試液を除き，リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液でポリビニリデンフロライド膜を洗浄後，二次抗体試液を加え，1 時間以上振とうする．二次抗体試液を除き，リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液でポリビニリデンフロライド膜を洗浄後，アビジン・ビオチン試液を加え，1 時間以上振とうする．アビジン・ビオチン試液を除き，リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液でポリビニリデンフロライド膜を洗浄する．このポリビニリデンフロライド膜にエポエチンアルファ用基質試液を加えて発色させるとき，試料溶液から得た主泳動帯は標準溶液から得た主泳動帯と同様の泳動像を示す．

ペプチドマップ　本品及びエポエチンアルファ標準品のたん白質 35μg に対応する容量をとり，減圧下で乾固し，残留物を pH7.3 の 0.1mol/L トリス緩衝液 100μL に溶かす．これらの液にエポエチンアルファ用トリプシン試液 5μL を加え，37℃で 6 時間加温し，氷冷後，試料溶液及び標準溶液とする．試料溶液及び標準溶液 45μL 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様のパターンを示す．また，エポエチンアルファ由来の主な 12 本のピーク(T1，T2，T3，T4，T5b，T6，T7，T8，T11，T12，T13 及び T15)を比較するとき，試料溶液及び標準溶液の各ピークの保持時間は同一であり，ピーク高さは同様である．

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：214nm)

カラム：内径 3.9mm，長さ 15cm のステンレス管に 5μm 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：45℃付近の一定温度

移動相 A：水／トリフルオロ酢酸混液(5000：3)

移動相 B：アセトニトリル／水／トリフルオロ酢酸混液(4000：1000：3)

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 ～ 5	98	2
5 ～ 95	98 → 35	2 → 65

流量：毎分 0.75mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液 45μL につき，上記の条件で操作するとき，別紙(1)に示したエポエチンアルファのクロマトグラムと同様のパターンを示す．

糖鎖プロファイル　別に規定する．

シアル酸含量　本品のたん白質約 1nmol に対応する容量を正確にとり，水を加えて正確に 45μL とする．この液に水酸化ナトリウム試液 5μL を正確に加え，氷上で 90 分間放置した後，希酢酸 5μL を正確に加える．この液に水 45μL 及び水／酢酸(100)混液(27：8)100μL をそれぞれ正確に加え，80℃で 210 分間加温する．冷後，この液に蛍光試液 200μL を正確に加え，遮光下，60℃で 2 時間加温する．冷後，この液に水酸化ナトリウム試液 200μL を正確に加えて試料溶液とする．別に用時，0.4mmol/L *N*－アセチルノイラミン酸試液 250μL を正確に量り，0.1mmol/L *N*－グリコリルノイラミン酸試液 20μL 及び水 180μL をそれぞれ正確に加える．この液 45μL を正確に量り，試料溶液と同様の方法で操作し，標準溶液とする．試料溶液及び標準溶液 20μL 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*〉により試験を行う．試料溶液の *N*－アセチルノイラミン酸のピーク面積 A_{T1} 及び *N*－グリコリルノイラミン酸のピーク面積 A_{T2}，並びに標準溶液の *N*－アセチルノイラミン酸のピーク面積 A_{S1} 及び *N*－グリコリルノイラミン酸のピーク面積 A_{S2} を測定する．次式により，本品のシアル酸の含量を求めるとき，10～12mol/mol である．

シアル酸の含量(mol/mol)

$$= (A_{T1}/A_{S1} \times 10 + A_{T2}/A_{S2} \times 1/5)/a$$

a：採取した本品のモル数(nmol)

ただし，本品のモル濃度(mmol/L)は，定量法(1)により求めた本品の波長 280nm における吸光度 A を用いて次式より算出する．

本品のモル濃度(mmol/L)＝ $A \times 10^3/22430$

22430：本品のモル吸光係数 ε

試験条件

検出器：蛍光光度計(励起波長：373nm，蛍光波長：448nm)

カラム：内径 3.9mm，長さ 15cm 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／アセトニトリル／メタノール混液(84：9：7)

移動相 B：水／メタノール混液(1：1)

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 ～ 20	100	0
20 ～ 20.1	100 → 0	0 → 100
20.1 ～ 27	0	100
27 ～ 27.1	0 → 100	100 → 0

流量：毎分 0.6mL

システム適合性

システムの性能：標準溶液 20μL につき，上記の条件で操作するとき，*N*−グリコリルノイラミン酸，*N*−アセチルノイラミン酸の順に溶出し，その分離度は 3 以上である．

システムの再現性：標準溶液 20μL につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，*N*−グリコリルノイラミン酸及び *N*−アセチルノイラミン酸のピーク面積の相対標準偏差はそれぞれ 2.0%以下である．

分子量　確認試験の試料溶液を試料溶液とする．別に分子量標準原液 20μL にエポエチンアルファ用試料緩衝液 6.7μL を加え，100℃で 5 分間加熱し，分子量標準溶液とする．分離ゲル及び濃縮ゲルを用いて調製した垂直不連続緩衝液系 SDS-ポリアクリルアミドゲルに，たん白質 3.5μg に対応する容量の試料溶液及び分子量標準溶液の全量をそれぞれ試料液添加溝に注入し，電気泳動を行った後，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，更に水を加えて 1000mL とした液に浸して染色する．分子量標準溶液の卵白アルブミン(分子量約 45000)，炭酸脱水酵素(分子量約 31000)，大豆トリプシンインヒビター(分子量約 21500)及びリゾチーム(分子量約 14400)の各泳動帯の相対移動度を求め，分子量の対数に対して直線回帰し，検量線を作成する．試料溶液から得た主泳動帯の中心部の相対移動度を求め，検量線より本品の分子量を算出するとき，37000～42000 である．

pH *〈2.54〉*　5.7～6.7

純度試験

（1）　オリゴマー　本品のたん白質 50μg に対応する容量をとり，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，主ピーク以外の合計量は 2%以下である．

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：215nm)

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：リン酸水素二ナトリウム十二水和物 91mg，リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.27g 及び塩化ナトリウム 8.77g を水に溶かし，1000mL とする．

流量：エポエチンアルファの主ピークの保持時間が約 16 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主ピークの溶出終了までの範囲

システム適合性

検出の確認：本品 1 容量に移動相 49 容量を加え，システム適合性試験用溶液とする．たん白質 1μg に対応する容量のシステム適合性試験用溶液から得たエポエチンアルファの主ピークの面積が，本品のエポエチンアルファの主ピークの面積の 1.5～2.5%になることを確認する．

システムの性能：ゲルろ過分子量マーカー用ウシ血清アルブミン 40mg 及びゲルろ過分子量マーカー用キモトリプシノーゲン 20mg を移動相 100mL に溶かす．この液 50μL につき，上記の条件で操作するとき，ウシ血清アルブミン，キモトリプシノーゲンの順に溶出し，その分離度は 4 以上である．

システムの再現性：本品のたん白質 50μg に対応する容量につき，上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき，エポエチンアルファの主ピークの面積の相対標準偏差は 2.0%以下である．

（2）　宿主由来たん白質　別に規定する．

（3）　DNA　別に規定する．

定量法

（1）　たん白質含量　本品の適量をとり，必要ならばリン酸塩緩衝液で薄め，試料溶液とする．試料溶液につき，紫外可視吸光度測定法 *〈2.24〉* により試験を行い，リン酸塩緩衝液を対照として波長 280nm における吸光度 *A* を測定する．

本品 1mL 中のエポエチンアルファのたん白質量(mg)

$= A \times d \times 0.909$

d : 試料溶液を調製したときの希釈倍率

0.909 : エポエチンアルファのたん白質部分の吸光係数 $E^{0.1\%}_{1cm}$の逆数

（2） 比活性

（ⅰ） 試験動物　6～8 週齢の健康な雌マウス(B6D2F1 系など)を用い，試験前 1 週間以上飼育室で一定の飼料及び水を与えて飼育する．

（ⅱ） 標準溶液　エポエチンアルファ標準品にウシ血清アルブミン・生理食塩液を加え，その 1mL 中に正確に 10～40 単位を含む溶液を調製し，これを高用量標準溶液 S_H とする．更に S_H にウシ血清アルブミン・生理食塩液を加え，正確に 4 倍に薄めた溶液を低用量標準溶液 S_L とする．

（ⅲ） 試料溶液　本品にウシ血清アルブミン・生理食塩液を加え，その 1mL 中に高用量標準溶液 S_H 及び低用量標準溶液 S_L に相当する単位を含む溶液を調製し，それぞれ高用量試料溶液 T_H 及び低用量試料溶液 T_L とする．

（ⅳ） 操作法　試験動物を 4 群に分け，各群は 5 匹以上で同数とする．

第 1，2 及び 3 日に，次に示すように標準溶液及び試料溶液を各試験動物に 1 匹当たり正確に 0.2mL ずつ皮下注射する．

第 1 群 : S_H，第 2 群 : S_L，第 3 群 : T_H，第 4 群 : T_L

第 4 日に各試験動物の眼窩静脈叢から試験を行うのに十分な量の血液をとる. 粒子計数装置用希釈液 10mL に血液 20μL を正確に加えて混和後，粒子計数装置用溶血剤 100μL を加えて 5 分間かき混ぜる．粒子計数装置を用い，網状赤血球類似細胞由来の微小粒子数を求める．

（ⅴ） 計算法　(ⅳ)操作法において，S_H，S_L，T_H 及び T_L によって得た微小粒子数を常用対数に変換した値をそれぞれ y_1，y_2，y_3 及び y_4 とする．更に各群の y_1，y_2，y_3 及び y_4 を合計してそれぞれ Y_1，Y_2，Y_3 及び Y_4 とする．

本品の比活性(単位/mg たん白質)＝本品の力価(単位/mL)／C

本品の力価(単位/mL)

＝antilog M × 高用量標準溶液 1mL 中の単位 × d

$M = \log 4 \times Y_a / Y_b$

$Y_a = -Y_1 - Y_2 + Y_3 + Y_4$

$Y_b = Y_1 - Y_2 + Y_3 - Y_4$

d : 高用量試料溶液を調製したときの希釈倍率

C : 定量法(1)により求めた本品のたん白質濃度(mg/mL)

ただし，次の式によって計算される F'は s^2 を計算したときの n に対する表中の F より小さい．また，次の式によって L(P＝0.95)を計算するとき，L は 0.3 以下である．もし，F'が Fを，また L が 0.3 を超えるときは，実験条件を整備して試験を繰り返す．

$F' = (Y_1 - Y_2 - Y_3 + Y_4)^2 / 4fs^2$

f : 各群の試験動物の数．ただし，各群の数は同数とし，かつ 5 以上であること．

$s^2 = (\sum y^2 - Y/f)/n$

$\sum y^2$: 各群の y_1，y_2，y_3 及び y_4 をそれぞれ 2 乗し合計した値

$Y = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + Y_4^2$

$n = 4(f-1)$

$$L = 2\sqrt{(C-1)\{CM^2 + (\log 4)^2\}}$$

$C = Y_b^2 / (Y_b^2 - 4fs^2t^2)$

n に対する $F(=t^2)$の値

n	$t^2=F$	n	$t^2=F$	n	$t^2=F$
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　遮光して，10℃以下に保存する．

容器　密封容器．

9．01 標準品の(1)の項に次を追加する．

エポエチンアルファ標準品

9．41 試薬・試液の項に次を追加する．

アクリルアミド試液　アクリルアミド 150g，*N,N′*－メチレンビスアクリルアミド 4.0g を水に溶かし，500mL とする．

アジ化ナトリウム・リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液　アジ化ナトリウム 0.25g を，塩化ナトリウム 8.0g，塩化カリウム 0.2g，リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.9g 及びリン酸二水素カリウム 0.2g を水に溶かして 1000mL とした液に溶かす．

***N*－アセチルノイラミン酸，エポエチンアルファ用**　$C_{11}H_{19}NO_9$　白色針状結晶性の粉末である．

***N*－アセチルノイラミン酸試液，0.4mmol/L**　エポエチンアルファ用 *N*－アセチルノイラミン酸約 15.5mg を精密に量り，水に溶かし，正確に 50mL とする．この液 *V*mL を正確に量り，水を加えて正確に 100mL とする．

V(mL)＝ 309.3 × 2／*N*－アセチルノイラミン酸の秤取量(mg)

アビジン・ビオチン試液　リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液 15mL にアビジン試液及びビオチン化ペルオキシダーゼ試液各 2 滴を加えて混和する．

一次抗体試液　エポエチンアルファ用ブロッキング試液 1.5mL とアジ化ナトリウム・リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液 13.5mL を混和し，100μg たん白質を含む容量のマウス抗エポエチンアルファモノクローナル抗体，アプロチニン 1×10^5 単位を水 5mL に溶かした液 50μL 及びフェニルメチルスルフォニルフルオリド 1.74mg をメタノール 100mL に溶かした液 100μL を加えて混和する．

ウシ血清アルブミン，ゲルろ過分子量マーカー用　ウシ血清より得られたもの．ゲルろ過クロマトグラフィー用．

基質試液，エポエチンアルファ用　4－クロロ－1－ナフトール 30mg をメタノール 10mL に溶かし，A 液とする．過酸化水素(30)30μL と pH7.5 の 0.02mol/L トリス塩緩衝液 50mL を混和し，B 液とする．用時，A 液と B 液を混和する．

希釈液，粒子計数装置用　血液を希釈するための液

キモトリプシノーゲン，ゲルろ過分子量マーカー用　ウシの脾臓より得られたもの．ゲルろ過クロマトグラフィー用．

***N*－グリコリルノイラミン酸**　$C_{11}H_{19}NO_{10}$　白色針状結晶性の粉末である．

***N*－グリコリルノイラミン酸試液，0.1mmol/L**　*N*－グリコリルノイラミン酸約 16.5mg を精密に量り，水に溶かし，正確に 50mL とする．この液 *V*mL を正確に量り，水を加えて正確に 100mL とする．

V(mL)＝325.3×0.5／*N*－グリコリルノイラミン酸の秤取量(mg)

蛍光試液　亜ジチオン酸ナトリウム 6.27g を水に溶かし 200mL とした液 400μL，2－メルカプトエタノール 210μL，

酢酸(100)321μL，1,2－ジアミノ－4,5－メチレンジオキシベンゼン 31.1mg を水 1.0mL に溶かした液 400μL 及び水 2669μL を混和する．用時製する．

試料緩衝液，エポエチンアルファ用　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．用時，この液 10mL にジチオスレイトール 50mg を加えて溶かす．

トリス塩緩衝液，0.02mol/L，pH7.5　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 及び塩化ナトリウム 29.2g を水に溶かし，塩酸を加えて pH7.5 に調整した後，水を加えて 1000mL とする．

トリス緩衝液，0.1mol/L,pH7.3　2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール 2.42g を水に溶かし，塩酸又は 6mol/L 塩酸試液を加えて pH7.3 に調整した後，水を加えて 200mL とする．

トリプシン試液，エポエチンアルファ用　エポエチンアルファ液体クロマトグラフィー用トリプシン 0.5mg を水 2.5mL に溶かす．

トリプシン，エポエチンアルファ液体クロマトグラフィー用　ウシすい臓由来．25℃，pH8.2 において 1 分間に 1μmol の *p*－トルエンスルホニル－L－アルギニンメチルエステルを加水分解するのに要する酵素量を 1 単位とするとき，本品 1mg は 180 単位以上を含む．

二次抗体試液　エポエチンアルファ用ブロッキング試液 1.5mL とアジ化ナトリウム・リン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液 13.5mL を混和し，ビオチン化ウマ抗マウス IgG 抗体 1 滴を加える．

マウス抗エポエチンアルファモノクローナル抗体　エポエチンアルファ(遺伝子組換え)の N 末端 20 残基のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドをマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体をリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液に溶かした液で，エポエチンアルファ標準物質についてウエスタンブロットを行うとき，反応する．

ブロッキング試液，エポエチンアルファ用　ウエスタンブロット用．

ブロッティング試液　2－アミノ－2－ヒドロキシメチル－1,3－プロパンジオール 5.81g，グリシン 2.93g 及びラウリル硫酸ナトリウム 0.38g を水に溶かし，メタノール 200mL を加えた後，水を加えて 1000mL とする．

分子量標準原液　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 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．この液 500μL にエポエチンアルファ試験用分子量マーカー100μL 及び水 1400μL を加え，100℃で 5 分間加熱したもので，以下の規格に適合するものを用いる．

確認試験　卵白アルブミン，炭酸脱水酵素，大豆トリプシンインヒビター及びリゾチームを 0.1mg ずつとり，それぞれをエポエチンアルファ用試料緩衝液 250μL に溶かし，水を加えて 1mL とし，100℃で 5 分間加熱したものを各基準溶液とする．本品及び各基準溶液 10μL について確認試験に準じて垂直不連続緩衝液系 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い，染色するとき，本品はそれぞれ各基準溶液から得た卵白アルブミン，炭酸脱水酵素，大豆トリプシンインヒビター及びリゾチームの泳動帯の相対移動度と一致する．

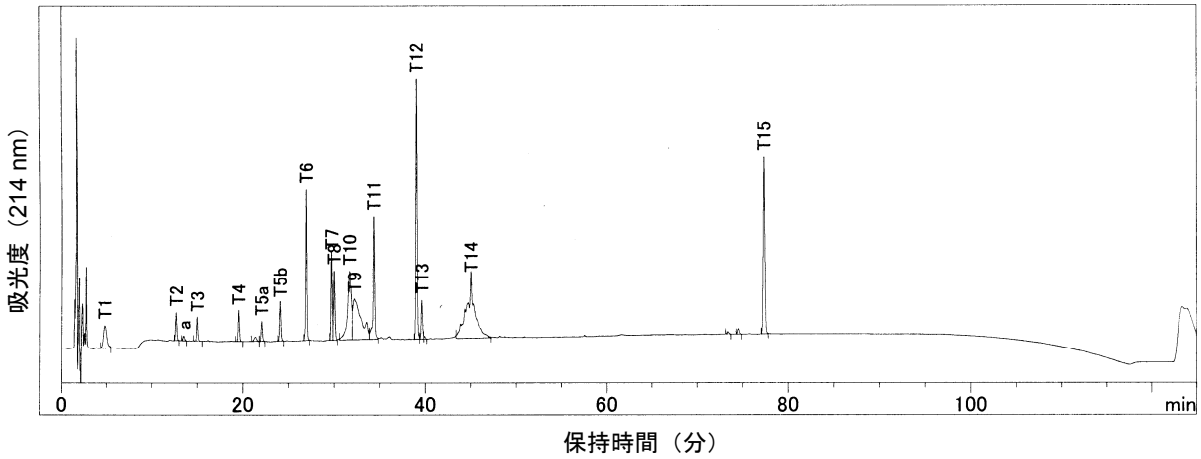
ポリアクリルアミドゲル，エポエチンアルファ用　分離ゲルのアクリルアミド濃度を 12.5%としたポリアクリルアミドゲル．

ポリビニリデンフロライド膜　ウエスタンブロット用．

分子量マーカー，エポエチンアルファ用　200μL 中に卵白アルブミン，炭酸脱水酵素，大豆トリプシンインヒビター及びリゾチームをそれぞれ約 0.4mg 含む．

溶血剤，粒子計数装置用　シアン化カリウムを含み，赤血球を溶血するための液．

リン酸塩緩衝液，エポエチンアルファ用　リン酸二水素ナトリウム二水和物 0.247g，リン酸水素二ナトリウム十二水和物 0.151g 及び塩化ナトリウム 8.77g を水に溶かし，1000mL とする．

粒子計数装置　網状赤血球類似細胞由来の微小粒子数を測定可能な装置．

別紙（1）　エポエチンアルファのクロマトグラム