

1 エポエチン アルファ(遺伝子組換え)

2 **確認試験の項を確認試験(1)とし、ペプチドマップの項を確認試**
 3 **験(2)とし、分子量、純度試験(1)及び貯法の項を次のように改める。**

4 確認試験

5 (1) 本品及びエポエチンアルファ標準品の適量を取り、そ
 6 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
 7 ンアルファ用試料緩衝液を1容量加え、100℃で5分間加熱
 8 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
 9 タンパク質0.7 µgに対応する容量をそれぞれエポエチンアル
 10 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
 11 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
 12 行う。泳動終了後、ゲル、ポリビニリデンフロライド膜及び
 13 ろ紙をプロットング試液に浸した後、セミドライプロット
 14 ィング装置に取り付け、ろ紙の面積に基づいて0.7~0.9
 15 mA/cm²の定電流で約1時間転写する。転写後、ポリビニリ
 16 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
 17 に浸し、1時間以上振り混ぜた後、エポエチンアルファ用ブ
 18 ロッキング試液を除き、一次抗体試液を加え、更に一晩振り
 19 混ぜるか又は4℃で三晩放置する。一次抗体試液を除き、リ
 20 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
 21 膜を洗浄後、二次抗体試液を加え、1時間以上振り混ぜる。
 22 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
 23 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
 24 液を加え、1時間以上振り混ぜる。アビジン・ビオチン試液
 25 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
 26 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
 27 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、
 28 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
 29 同様の泳動像を示す。

30 (2) 本品及びエポエチンアルファ標準品のタンパク質35
 31 µgに対応する容量を取り、減圧下で乾固し、残留物をpH
 32 7.3の0.1 mol/Lトリス緩衝液100 µLに溶かす。これらの液に
 33 エポエチンアルファ用トリプシン試液5 µLを加え、37℃で
 34 6時間加温し、氷冷後、試料溶液及び標準溶液とする。試料
 35 溶液及び標準溶液45 µLにつき、次の条件で液体クロマトグ
 36 ラフィー(2.01)により試験を行い、両者のクロマトグラム
 37 を比較するとき、同一の保持時間のところに同様のピークを
 38 認める。

39 試験条件

40 検出器：紫外吸光度計(測定波長：214 nm)
 41 カラム：内径3.9 mm、長さ15 cmのステンレス管に5
 42 µmの液体クロマトグラフィー用オクチルシリル化シ
 43 リカゲルを充填する。
 44 カラム温度：45℃付近の一定温度
 45 移動相A：水/トリフルオロ酢酸混液(5000：3)
 46 移動相B：アセトニトリル/水/トリフルオロ酢酸混液
 47 (4000：1000：3)
 48 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ
 49 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

50 流量：毎分0.75 mL

51 システム適合性

52 システムの性能：標準溶液45 µLにつき、上記の条件で
 53 操作するとき、エポエチンアルファ標準品のペプチド
 54 マップにおけるクロマトグラムと同様のパターンを示
 55 す。

56 **分子量** 確認試験(1)の試料溶液を試料溶液とする。別に分子
 57 量標準原液20 µLにエポエチンアルファ用試料緩衝液6.7 µL
 58 を加え、100℃で5分間加熱し、分子量標準溶液とする。分
 59 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
 60 SDSポリアクリルアミドゲルに、タンパク質3.5 µgに対応す
 61 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
 62 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
 63 アントブルーR-250 1.25 gをメタノール450 mL及び酢酸
 64 (100) 100 mLに溶かし、更に水を加えて1000 mLとした液
 65 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
 66 量約45000)、炭酸脱水酵素(分子量約31000)、大豆トリプシ
 67 ンインヒビター(分子量約21500)及びリゾチーム(分子量約
 68 14400)の各バンドの相対移動度を求め、分子量の対数に対
 69 して直線回帰し、検量線を作成する。試料溶液から得た主バ
 70 ンドの中心部の相対移動度を求め、検量線より本品の分子量
 71 を算出するとき、37000~42000である。

72 純度試験

73 (1) 多量体 本品のタンパク質50 µgに対応する容量をと
 74 り、次の条件で液体クロマトグラフィー(2.01)により試験
 75 を行う。各々のピーク面積を自動積分法により測定し、面積
 76 百分率法によりそれらの量を求めるとき、エポエチンアルフ
 77 ェ以外のピークの合計量は2%以下である。

78 試験条件

79 検出器：紫外吸光度計(測定波長：215 nm)
 80 カラム：内径7.5 mm、長さ60 cmのステンレス管に液
 81 体クロマトグラフィー用親水性シリカゲルを充填する。
 82 カラム温度：25℃付近の一定温度
 83 移動相：リン酸水素二ナトリウム十二水和物91 mg、リ
 84 ン酸二水素ナトリウム二水和物0.27 g及び塩化ナトリ
 85 ウム8.77 gを水に溶かし、1000 mLとする。
 86 流量：エポエチンアルファのピークの保持時間が約16
 87 分になるように調整する。
 88 面積測定範囲：サイズ排除カラムの排除容積に相当する
 89 保持時間からエポエチンアルファの溶出終了までの範
 90 囲

91 システム適合性

92 検出の確認：本品1容量に移動相49容量を加え、システ
 93 ム適合性試験用溶液とする。タンパク質1 µgに対応す
 94 る容量のシステム適合性試験用溶液から得たエポエチ
 95 ンアルファのピークの面積が、本品のエポエチンアル
 96 ファのピークの面積の1.5~2.5%になることを確認
 97 する。

98 システムの性能：ゲルろ過分子量マーカー用ウシ血清ア
 99 ルブミン40 mg及びゲルろ過分子量マーカー用キモト

100 リブシノーゲン20 mgを移動相100 mLに溶かす。こ
101 の液50 μ Lにつき、上記の条件で操作するとき、ウシ
102 血清アルブミン、キモトリブシノーゲンの順に溶出し、
103 その分離度は4以上である。

104 システムの再現性：本品のタンパク質50 μ gに対応する
105 容量につき、上記の条件で試験を6回繰り返すとき、
106 エポエチンアルファのピークの面積の相対標準偏差は
107 2.0 %以下である。

108 **貯法**

109 保存条件 -70°C 以下で保存する。

110 容器 気密容器。

111