

1 テセロイキン(遺伝子組換え)

2 **確認試験(2), 分子量, 純度試験(1),(2),(4), 酢酸の項を次のよう**
3 **に改める。**

4 確認試験

5 (2) 本品及び確認試験用テセロイキンの適量を取り, それ
6 ぞれ1 mL中にタンパク質約0.6 mgを含む液となるように水
7 を加える。これらの液320 μ Lに, pH 9.0の1 mol/Lトリス緩
8 衝液及び薄めたテセロイキン用リシルエンドペプチダーゼ(1
9 \rightarrow 10000)を40 μ Lずつ加え, 37°Cで2時間反応した後, 1
10 mol/L塩酸試液40 μ Lを加えて反応を停止し, 試料溶液及び
11 標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液40 μ Lにつき, 次の
12 条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により試験を行い,
13 両者のクロマトグラムを比較するとき, 同一の保持時間のと
14 ころに同様のピークを認める。

15 試験条件

16 検出器: 紫外吸光度計(測定波長: 214 nm)

17 カラム: 内径4.6 mm, 長さ15 cmのステンレス管に3
18 μ mの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル
19 化シリカゲルを充填する。

20 カラム温度: 30°C付近の一定温度

21 移動相A: トリフルオロ酢酸試液

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

24 移動相の送液: 移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ
25 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 ~ 3	98	2
3 ~ 15	98 \rightarrow 55	2 \rightarrow 45
15 ~ 25	55 \rightarrow 30	45 \rightarrow 70
25 ~ 35	30	70

26 流量: 毎分1.0 mL

27 システム適合性

28 システムの性能: 標準溶液40 μ Lにつき, 上記の条件で
29 操作するとき, 保持時間3分付近に溶媒のピークを認め,
30 保持時間4分から20分付近までにテセロイキンを
31 構成するペプチドの主要な9本のピークを認める。また,
32 6本目のピークと7本目のピークの分離度は1.5以上
33 である。

34 **分子量** 本品10 μ Lに, 水45 μ L, 還元試液20 μ L及びテセロイ
35 キン試料用緩衝液25 μ Lを加え, 65°Cで10分間加熱し, 試料
36 溶液とする。試料溶液10 μ L及びテセロイキン用分子量マー
37 カー10 μ Lにつき, テセロイキンSDSポリアクリルアミドゲ
38 ル電気泳動用緩衝液及びテセロイキン用ポリアクリルアミド
39 ゲルを用いて電気泳動を行う。泳動後, クーマシーブリリア
40 ントブルーG-250を含む液に浸して染色する。その後, 脱色
41 してバンドを検出する。テセロイキン用分子量マーカーから
42 得たバンドの移動距離を求め, 分子量 $1.0 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4$
43 の範囲で分子量の対数に対して直線回帰し, 検量線を作成す
44 る。試料溶液から得た主バンドの中心部の相対移動度を求め,
45 検量線より本品の分子量を求めるとき $1.40 \times 10^4 \sim 1.60 \times$
46 10^4 である。

47 純度試験

48 (1) デスマチオニル体 本品1 mLにタンパク質約0.5 mgを
49 含む液となるように水を加え, 試料溶液とする。この液1.2
50 mLにつき, 次の条件で液体クロマトグラフィー (2.01) により
51 試験を行う。テセロイキンのピーク面積 A_2 及びテセロイ
52 キンに対する相対保持時間約0.8のデスマチオニル体のピー
53 ク面積 A_1 を自動積分法により測定し, 次式によりデスマチ
54 オニル体の量を求めるとき, 1.0%以下である。

$$55 \text{ デスマチオニル体の量}(\%) = A_1 / (A_1 + A_2) \times 100$$

56 試験条件

57 検出器: 紫外吸光度計(測定波長: 280 nm)

58 カラム: 内径7.5 mm, 長さ7.5 cmのステンレス管に10
59 μ mの液体クロマトグラフィー用ジエチルアミノエチル
60 基を結合した合成高分子を充填し, そのカラム2本を直
61 列に接続する。

62 カラム温度: 25°C付近の一定温度

63 移動相A: ジェタノールアミン0.66 gを水400 mLに混和し,
64 1 mol/L塩酸試液を加えてpH 9.0に調整した後, 水を加
65 えて500 mLとする。

66 移動相B: pH 7 ~ 9用両性担体液2 mL及びpH 8~10.5用
67 両性担体液5 mLに水1500 mLを加え, 1 mol/L塩酸試液
68 を加えてpH 7.0に調整した後, 水を加えて2000 mLとす
69 る。

70 移動相の切換え及び試料注入方法: 移動相Aを送液しなが
71 ら試料溶液を注入する。試料溶液は100 μ Lずつ12回繰
72 り返し注入する。全量注入後, 60分間移動相Aを送液し
73 た後, 移動相Bを送液する。試料溶液を測定した後, カ
74 ラムの後処理及び洗浄のために, 1 mol/L塩化ナトリウ
75 ム試液を10分間送液した後, 移動相Aを送液しながら水
76 酸化ナトリウム試液100 μ Lを注入し, 55分後に次の試
77 料溶液の注入を開始する。保持時間は, 移動相Bに切り
78 換えた時点から測定する。

79 流量: 毎分0.8 mL

80 システム適合性

81 システムの性能: ウマ心臓由来で等電点が6.76及び7.16の
82 2種ミオグロビンの混合物を水に溶かし, 約0.5 mg/mL
83 の濃度とする。この液200 μ L, 本品200 μ L及び水2.74
84 mLを混和する。この液1.2 mLにつき, 上記の条件で操
85 作するとき, ミオグロビン, テセロイキンの順に溶出し,
86 その分離度は1.5以上である。

87 (2) 二量体 本品1容量に0.2%ラウリル硫酸ナトリウム試
88 液1容量を加え, 試料溶液とする。この液20 μ Lにつき, 次
89 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。
90 テセロイキンのピーク面積 A_2 及びテセロイキンに対する相
91 対保持時間0.8 ~ 0.9の二量体のピーク面積 A_1 を自動積分法
92 により測定し, 次式により二量体の量を求めるとき, 1.0%
93 以下である。

$$94 \text{ 二量体の量}(\%) = A_1 / (A_1 + A_2) \times 100$$

95 試験条件

96 検出器: 紫外吸光度計(測定波長: 220 nm)

97 カラム: 内径7.5 mm, 長さ60 cmのステンレス管に10 μ m
98 の液体クロマトグラフィー用グリコールエーテル化シリ

99 カゲルを充填する。
 100 カラム温度：25℃付近の一定温度
 101 移動相：ラウリル硫酸ナトリウム1.0 gをpH 7.0の0.1
 102 mol/Lリン酸ナトリウム緩衝液に溶かし、1000 mLとす
 103 る。
 104 流量：テセロイキンの保持時間が30～40分になるように
 105 調整する。
 106 システム適合性
 107 システムの性能：炭酸脱水酵素1 mg及びα-ラクトアル
 108 ブミン1 mgを水20 mLに溶かした液1容量に、0.2%ラ
 109 ウリル硫酸ナトリウム試液1容量を加える。この液20
 110 μLにつき、上記の条件で操作するとき、炭酸脱水酵素、
 111 α-ラクトアルブミンの順に溶出し、その分離度は1.5
 112 以上である。
 113 システムの再現性：試料溶液の適量を正確に量り、移動相
 114 を加えて正確に200倍に希釈する。この液20 μLにつき、
 115 上記の条件で試験を3回繰り返すとき、テセロイキンの
 116 ピーク面積の相対標準偏差は7%以下である。
 117 (4) その他の異種タンパク質 本品5 μLにつき、次の条件
 118 で液体クロマトグラフィー(2.01)により試験を行い、各々
 119 のピーク面積を自動積分法により測定する。面積百分率法に
 120 よりそれらの量を求めるとき、テセロイキン及び溶媒以外の
 121 ピークの合計量は1.0%以下である。

122 試験条件

123 検出器：紫外吸光光度計(測定波長：220 nm)

124 カラム：内径4.6 mm、長さ15 cmのステンレス管に5
 125 μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル
 126 化シリカゲルを充填する。

127 カラム温度：25℃付近の一定温度

128 移動相A：トリフルオロ酢酸試液

129 移動相B：トリフルオロ酢酸の液体クロマトグラフィー
 130 用アセトニトリル溶液(1→1000)

131 移動相の送液：移動相A及び移動相Bの混合比を次のよ
 132 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	55	45
2～28	55 → 0	45 → 100
28～32	0	100

133 流量：0.5 mL/分

134 面積測定範囲：テセロイキンの保持時間の約2倍の範囲

135 システム適合性

136 検出の確認：薄めた酢酸(100) (3→1000) 990 μLを量り、
 137 本品10 μLを正確に加え、システム適合性試験用原液
 138 とする。薄めた酢酸(100) (3→1000) 800 μLを正確に
 139 量り、システム適合性試験用原液200 μLを正確に加
 140 え、システム適合性試験用溶液とする。システム適合
 141 性試験用溶液5 μLから得たテセロイキンのピーク面
 142 積が、システム適合性試験用原液のテセロイキンのピ
 143 ーク面積の10～30%になることを確認する。

144 システムの性能：本品167.2 μLに水7.6 μLを加え、更に
 145 ポリソルベート80 1 gをとり水を加えて100 mLとし
 146 た液33.2 μLを加え、1時間以上静置する。この液5
 147 μLにつき、上記の条件で操作するとき、テセロイキ

148 ンに対する相対保持時間約0.96のピークとテセロイキ
 149 ンの分離度は1.5以上である。

150 **酢酸** 本品適量を正確に量り、水で正確に20倍に希釈し、試
 151 料溶液とする。別に酢酸(100) 1 mLを正確に量り、水を加
 152 えて正確に100 mLとする。この液3 mLを正確に量り、水を加
 153 えて正確に200 mLとし、標準溶液とする。試料溶液及び標
 154 準溶液20 μLにつき、次の条件で液体クロマトグラフィー
 155 (2.01)により試験を行い、酢酸のピーク面積 A_T 及び A_S を測
 156 定し、次式により本品1 mL中の酢酸($C_2H_4O_2$)の量を求め
 157 るとき、2.85～3.15 mgである。

158 本品1 mL中の酢酸($C_2H_4O_2$)の量(mg) = $A_T/A_S \times 0.15 \times$
 159 1.049×20

160 0.15：標準溶液の酢酸(100)濃度(μL/mL)

161 1.049：25℃における酢酸(100)の密度(mg/μL)

162 試験条件

163 検出器：紫外吸光光度計(測定波長：210 nm)

164 カラム：内径4.6 mm、長さ15 cmのステンレス管に、5
 165 μmの液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シ
 166 リカゲルを充填する。

167 カラム温度：40℃付近の一定温度

168 移動相：リン酸0.7 mLに水900 mLを加え、8 mol/L水
 169 酸化ナトリウム試液を加えてpH 3.0に調整した後、水
 170 を加えて1000 mLとする。この液950 mLに液体クロマトグ
 171 ラフィー用メタノール50 mLを加える。

172 流量：酢酸の保持時間が約4分となるように調整する。

173 システム適合性

174 システムの性能：標準溶液20 μLにつき、上記の条件で操
 175 作するとき、酢酸のピークの理論段数及びシンメトリー
 176 係数は、それぞれ3000段以上、2.0以下である。

177 システムの再現性：標準溶液20 μLにつき、上記の条件で
 178 試験を6回繰り返すとき、酢酸のピーク面積の相対標準
 179 偏差は2.0%以下である。

181 9.41 試薬・試液の項に次を追加する。

182 **還元試液** ジチオスレイトールを0.5 mol/Lの濃度で含む溶液。
 183 緩衝液、テセロイキンSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動
 184 用 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸97.6 g、2-アミ
 185 ノー2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール60.6 g、
 186 ラウリル硫酸ナトリウム10.0 g及びエチレンジアミン四酢酸
 187 二水素二ナトリウム二水和物3.0 gを水に溶かし500 mLとす
 188 る。この液50 mLに水を加えて1000 mLとする。

189 **緩衝液、テセロイキン試料用** 10 mL中に2-アミノ-2-ヒド
 190 ロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸塩0.67 g、2-ア
 191 ミノー2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール0.68 g、
 192 ラウリル硫酸リチウム0.80 g、エチレンジアミン四酢酸二水
 193 素二ナトリウム水和物6 mg、グリセリン4 gを含む。

194 **テセロイキン、確認試験用** $C_{698}H_{1127}N_{179}O_{204}S_8$ ：
 195 15547.01[医薬品各条、「テセロイキン(遺伝子組換え)」た
 196 だし、以下の確認試験に適合するもの。

197 **確認試験** 「テセロイキン(遺伝子組換え)」の確認試験(2)
 198 に従い試料溶液を調製する。試料溶液につき質量分析計を備

- 199 えた液体クロマトグラフにて分析を行うとき、テセロイキンの
200 構造を支持する m/z 値のピークが得られる。
- 201 トリス緩衝液, 1 mol/L, pH9.0 2-アミノ-2-ヒドロキシ
202 メチル-1,3-プロパンジオール12.11 gを水50 mLに溶かし,
203 1 mol/L塩酸試液を加えてpHを9.0に調整した後, 水を加え
204 て100 mLとする。
- 205 ポリアクリルアミドゲル, テセロイキン用 分離ゲルのアクリ
206 ルアミド濃度を12%, 濃縮ゲルのアクリルアミド濃度を4%
207 としたポリアクリルアミドゲル。
- 208 2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸 $C_6H_{13}NO_4S$ 白色の
209 結晶又は粉末。
- 210 ラウリル硫酸リチウム $C_{12}H_{25}LiO_4S$ 白色の結晶又は結晶性
211 の粉末。
- 212 純度試験 本品の0.1 mol/L溶液につき, 紫外可視吸光度測
213 定法 (2.24) により波長260 nm及び280 nmにおける吸光度
214 を測定するとき, いずれも0.05以下である。
- 215 リシルエンドペプチダーゼ, テセロイキン用 質量分析グレ
216 ード
- 217 両性担体液, pH 7 ~ 9用 淡黄色~黄色の液。ポリアクリル
218 アミドゲルに混入し電場をかけるとき, pH 7 ~ 9の範囲で
219 pH勾配を形成する性質をもつ多種類の分子からなる混合物。
- 220 **9. 41 試薬・試液の項の以下の試薬を次のように改める。**
- 221 分子量マーカー, テセロイキン用 分子量既知のマーカータン
222 パク質で分子量測定用に調整したもの。[分子量: 1.0×10^4 ,
223 1.5×10^4 , 2.0×10^4 , 2.5×10^4 , 3.7×10^4 , 5.0×10^4 ,
224 7.5×10^4 , 1.0×10^5 , 1.5×10^5 , 2.5×10^5]
- 225
- 226