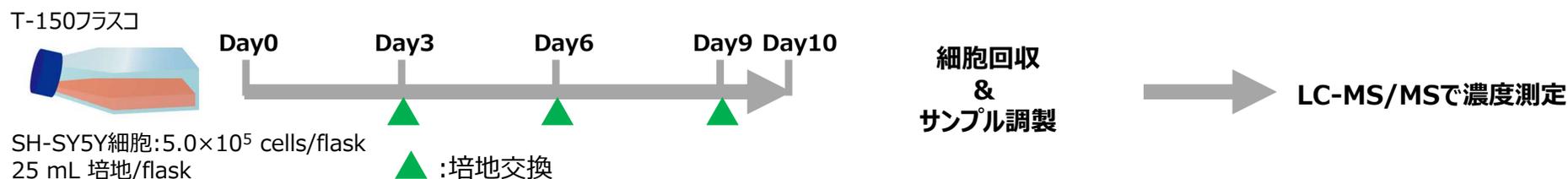


Conclusion :

PG-003を10 ng/mLまたは1000 ng/mLの濃度で、10日間、細胞を培養した後、細胞内のPG-001の残留濃度を測定した結果、いずれの条件でも**定量下限以下**であった。

→ **PG-001は最終製品中に残存しないと考えられる。**

PG-003の細胞内残留性評価方法



培地組成

- DMEM/F-12, HEPES (Thermo)
- 10 % FBS (Thermo)
- 1:1000 Gentamicin, 50 mg/ml (Nacalai)
- 0.01% DMSO
- **PG-003: 10 ng/mL (約 1.94 nM) または 1000 ng/mL (約 194 nM)**

サンプル調製ならびに測定方法

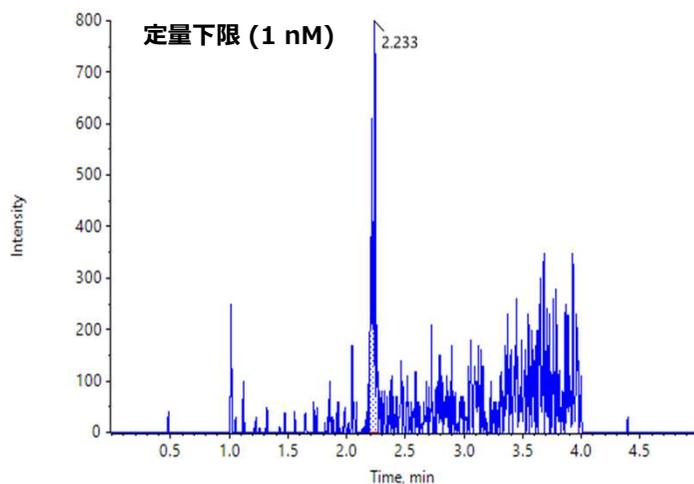
- 1) 回収した細胞を 1.0×10^6 cells/tube で分注
- 2) 凍結融解を2回繰り返すことで細胞破碎
- 3) 50 uLの抽出溶媒の添加によりPG-001を可溶化 (3%ギ酸/アセトニトリル, 20 nM Veparamil) →内部標準物質として添加
- 4) 15,000xg、10分間、4℃にて遠心分離
- 5) 上清を採取し、LC-MS/MSにて測定

検量線サンプルの作成方法

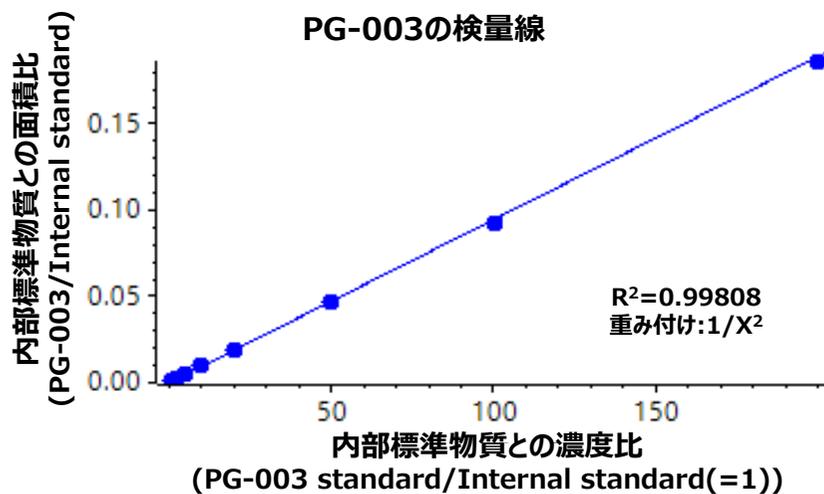
- 1) PG-003を含まない培地で培養したSH-SY5Y細胞を準備
- 2) 回収した細胞を 1.0×10^6 cells/tube で分注
- 3) 凍結融解を2回繰り返すことで細胞破碎
- 4) 異なる濃度のPG-003を含む抽出溶媒(内部標準物質含む)を50 uL添加。PG-003濃度: **0(ブランク), 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 nM**
- 5) 15,000xg、10分間、4℃にて遠心分離
- 6) 上清を採取し、LC-MS/MSにて測定

残留性評価結果の詳細

PG-003のLC-MS/MSにおけるクロマトグラム例



PG-003の検量線



定量下限

1 nM → 0.25 ng (1 nM × 4911.45 g/mol × 50 uL)

LC-MS/MSの測定結果

10 ng/mL

Area:PG-003	Area: IS	測定濃度 (nM)
63	1316968	定量下限以下
49	1319367	定量下限以下
41	1330087	定量下限以下

1000 ng/mL

Area:PG-003	Area: IS	測定濃度 (nM)
47	1317636	定量下限以下
271	1306060	定量下限以下
135	1297578	定量下限以下

1 nM(定量下限のサンプル)

Area:PG-003	Area: IS	測定濃度 (nM)
1285	1342365	1.0 nM

✓ PG-003は細胞内に残留しない