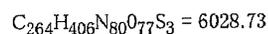


5. ペプチド研究所アドレノメデュリンの製品規格・試験方法

製品規格

品名	Adrenomedullin (Human)
構造	Tyr-Arg-Gln-Ser-Met-Asn-Asn-Phe-Gln-Gly-Leu-Arg-Ser-Phe-Gly-Cys-Arg-Phe-Gly-Thr-Cys-Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH ₂ [Disulfide Bridge: Cys16-Cys21]



本品は酢酸及び水を含有する凍結乾燥品である。

項目	規格値
外観	白色の凍結乾燥粉末
アミノ酸分析	
構成アミノ酸	構造式に由来する 17 種のアミノ酸のピークを認める
アミノ酸モル比	フェニルアラニンのモル比を1としたとき, His: 0.9 ~ 1.1 Ala, Val, Leu, Pro: 各 1.8 ~ 2.2 Gly, Lys, Arg: 各 3.6 ~ 4.4 Asp, Glu: 各 5.3 ~ 6.6
質量分析	スペクトルは分子量=6028.7±3 を支持する
TLC試験	主スポット以外のスポットを認めない(50 μg)
HPLC試験	メチオニン酸化型不純物 1%以下 他の類縁ペプチド不純物合計 1%以下
含量	Net Peptide (C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇₇ S ₃ = 6028.73) として80%以上

試験法

(アミノ酸分析)

本品約 1 mg を精密に量り、加水分解用試験管に入れ、6 mol/L 塩酸試液 0.2 mL を加える。この試験管をドライアイス-メタノール中で凍結し、減圧下融封し、 $110 \pm 2^\circ\text{C}$ で 22 時間加熱する。冷後、開封し、蒸発乾固した後、残留物にクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) (注 1) を加えて、全量を正確に 3 mL とし、試料溶液とする。試料溶液及び混合アミノ酸標準液 (注 2) それぞれ 40 μL について、アミノ酸自動分析計を用いて試験を行い比較するとき、試料溶液から得たクロマトグラムには本品の構成アミノ酸に由来する 17 種のアミノ酸ピークがあることを確認する。そして、試料溶液中のそれらアミノ酸の含量を求め、フェニルアラニンのモル数を 4 としてそれぞれのアミノ酸モル数の比及び、フェニルアラニンの回収率を求める。

(注 1) クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2)

クエン酸ナトリウム ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 294.1) 19.6 g, 塩酸 16.2 mL, チオジグリコール 2.5 mL 及び n-カプリル酸 0.1 mL に水を加えて溶かし、1000 mL とし、塩酸を加えて pH を 2.2 に調整する。

(注 2) 混合アミノ酸標準液

市販 (例: 株式会社 味の素タカラコーポレーション製) のアミノ酸標準混液 (2.5 $\mu\text{mol/mL}$) をホールピペットで 5 mL とり、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.2) (注 1) にて全量を正確に 250 mL とする。

(質量分析)

試験方法は特に定めない。市販の分析測定装置 (質量分析計) を用いて、分子量 6000 程度のペプチドの分子量測定に適した条件で測定する。陽イオンモード、平均分子量測定法等測定条件及び [M+H]⁺ イオン, [M+nH]⁺ 多価イオン, 或いは [M+Na]⁺ 付加イオン等合理的に説明できるピークの測定 m/z 値より分子量 M を計算し求める。

(TLC 試験)

日本薬局方一般試験法の薄層クロマトグラフ法に準じて行う。本品 1 mg を薄めた酢酸 (1 \rightarrow 100) 100 μL に溶かした液 5 μL を薄層クロマトグラフ用セルロースを用いて調製した薄層板にスポットする。次に 1-ブタノール/水/ピリジン/氷酢酸混液 (15:12:10:3) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を 80°C で 30 分間乾燥する。これにニンヒドリンのエタノール溶液 (1 \rightarrow 1000) を均等に噴霧し、 80°C で 10 分間加熱乾燥して発色スポットを観察する。

(HPLC 試験)

本品 1 mg を薄めた酢酸 (1 \rightarrow 100) 100 μL に溶かし試料溶液とする。この液 0.6 μL につき、それぞれ次の条件 1 (イソクラティック法) 及び条件 2 (グラジエント法) を用いて液体クロマトグラフ法により試験を行う。ヒト・アドレノメデュリンのピーク面積 A, メチオニン酸化型ヒト・アドレノメデュリンのピーク面積 B, それ以外のピークの合計面積 S をそれぞれ自動積分法により測定する。

条件 1 の結果より、メチオニン酸化型不純物 (%) を式 $100 \times B / (A+B+S)$ により求める。また、

試験法

条件2の結果より、他の類縁ペプチド不純物合計(%)を式 $100 \times S / (A+B+S)$ により求める。

[操作条件]

検出器：紫外吸光度計（測定波長：210nm）

カラム：内径約 4.6 mm，長さ約 15 cm のステンレス管に $5 \mu\text{m}$ のオクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：室温。

移動相：

（条件1）アセトニトリルの緩衝液①溶液（3→10）。

ただし、ヒト・アドレノメデュリンのピークが5分～7分の間に溶出するようにアセトニトリル濃度或いは流量を調整する。

（条件2）試料注入後から25分間、A液/B液混液（100:0）からA液/B液混液（0:100）へ直線的に混合比を変化させ濃度勾配制御する。

25分から30分まで： B液

（緩衝液①）塩化ナトリウム(NaCl) 5.84 g に水 1000 mL を加えて溶かし、塩酸を加えて pH 2.4 に調整する。

（A液）アセトニトリルの緩衝液①溶液（1→10）。

（B液）アセトニトリルの緩衝液①溶液（6→10）。

流量：毎分約 1 mL

ピークの検出：試料注入3分後から30分まで

(定量法)

本品約 1.5 mg を精密に量り、微量元素分析装置（装置例：パーキンエルマー社製 2400 シリーズII型 CHNS/O アナライザー）を用いて試験し、窒素の含量（重量百分率）を求める。

ヒト・アドレノメデュリン $[\text{C}_{264}\text{H}_{406}\text{N}_{80}\text{O}_{77}\text{S}_3 \text{ (net peptide)} = 6028.73]$

の含量 (%)

$$= \text{窒素の含量}(\%) \div 0.18587$$

6. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#550237



株式会社ペプチド研究所
〒562-8686 大阪府箕面市穂4丁目1番2号
Phone:(072)729-4121 Fax:(072)729-4124

PEPTIDE INSTITUTE, INC.
4-1-2 Ina Minoh-shi, Osaka 562-8686, Japan
Phone:81-72-729-4121 Fax:81-72-729-4124

ヒュービットジェノミクス株式会社 様

2005年3月28日

ペプチド研究所
品質管理室



試験検査報告書

File No. 050109b

品名 : Adrenomedullin (Human)
ロット番号 : 550237
容量・数量 : 900 mg × 1
検査年月日 : 2005年3月1日

[M.W. $C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3 = 6028.73$]

外観 : 白色の凍結乾燥粉末

比旋光度^{*1} : $[\alpha]_D^{20} -89.5^\circ$ (c 0.25, 1% AcOH)

純度試験

TLC^{*2} : 単一スポット

RP-HPLC^{*3} : 99.6%

アミノ酸分析^{*4} : Asp(6) 6.02, Thr(3) 2.91, Ser(4) 3.62, Glu(6) 5.97
Pro(2) 2.05, Gly(4) 4.02, Ala(2) 2.03, 1/2Cystine(2) 1.92
Val(2) 2.00, Met(1) 0.97, Ile(2) 1.96, Leu(2) 2.04
Tyr(3) 2.86, Phe(4) 4.00, Lys(4) 4.00, His(1) 1.00
Arg(4) 3.99, NH₃(10) 10.67 (回収率 Phe, 76.5%)

元素分析^{*5} : 実験値: C, 49.20; H, 7.01; N, 16.44 % (回収率 N, 88.45%)

質量分析値^{*6} : m/z 6029.79

備考: 本品は酢酸塩として製しております。 RP-HPLC チャート添付。

*1 脱水脱酢酸物(net peptide)重量に換算した値。

*2 適用量: 50 μ R, 薄層板: セルロース, 展開液: ブタノール・水・ピリジン・氷酢酸混液(15:12:10:3), 検出: ニンヒドリン試液及びバウリ試液。

*3 カラム: YMC Pack ODS-A 4.6mmI.D.×150mm, 溶離液: 0.1M NaCl (pH 2.4), グラジエント CH₃CN 10%→60%(25min), 流速: 1.0 ml/min, 温度: 室温, 検出: 210nm。

*4 水解条件: 6N HCl, 110°C, 22h。

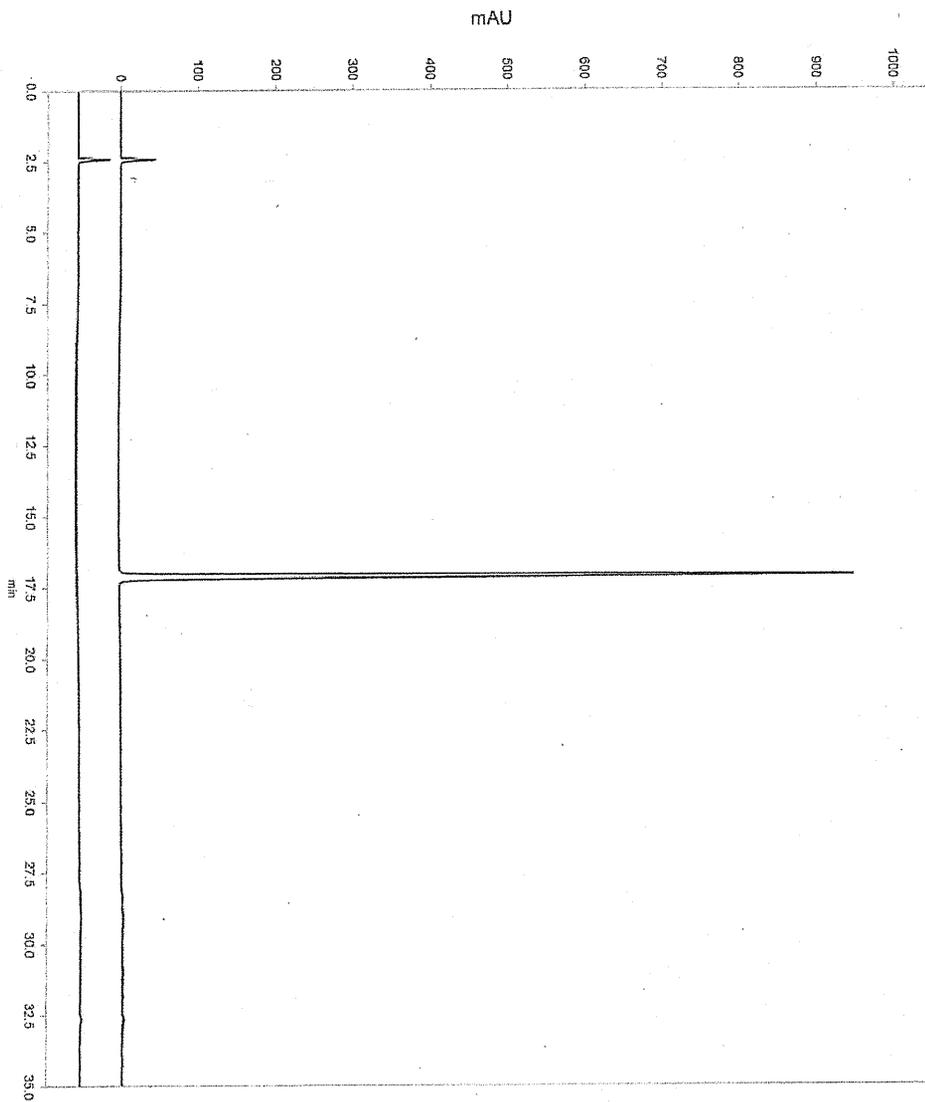
*5 $C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3 \cdot 6.5AcOH \cdot 19H_2O$ からの計算値: C, 49.21; H, 7.01; N, 16.57 %。

*6 MALDI-TOF-MSにて測定, [M+H]⁺average 計算値=6029.741。

Shimadzu CLASS-VP V6.13 SP2 HPLC-10 Area % Report
ファイル名:C:\CLASS-VP\Methods\4000番台\4278 h-Adrenomedullin.met
ファイル名:C:\CLASS-VP\Data\050223\050223-002

分析日時:2005/02/23 11:56:13
印刷日時:2005/02/23 17:07:11

Sample : 4278 Adrenomedullin (Human)
Sample Size : 0.6 μ L (0.70 mg/70 μ L-1% AcOH)
Column : YMC Pack ODS A-302 (4.6 mm I.D. \times 150 mm) # 041593091 + G (4 \times 10)
Eluent : 0.1M NaCl (pH 2.4)
Gradient : Acetonitrile 10% to 60% [25 min.]
Flow Rate : 1.0 mL/min. ; Press. : 110 kg/cm² ; Temp. : 25 $^{\circ}$ C
Detection : CH. 1 210 nm



7. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#551014

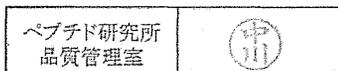


株式会社ペプチド研究所
〒562-8686 大阪府箕面市稲4丁目1番2号
Phone:(072)729-4121 Fax:(072)729-4124

PEPTIDE INSTITUTE, INC.
4-1-2 Ina Minoh-shi, Osaka 562-8686, Japan
Phone:81-72-729-4121 Fax:81-72-729-4124

ヒュービットジェノミクス株式会社 様

2005年10月20日



試験検査報告書

File No. 050590

品名 : Adrenomedullin (Human)
ロット番号 : 551014
容量・数量 : 1100 mg × 1
検査年月日 : 2005年10月17日

[M.W. $C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3 = 6028.73$]

外観 : 白色の凍結乾燥粉末

比旋光度^{*1} : $[\alpha]_D^{20} -106.2^\circ$ (c 0.10, 1% AcOH)

純度試験

T L C^{*2} : 単一スポット

RP-HPLC^{*3} : 98.0%

アミノ酸分析^{*4} :
Asp(6) 6.04, Thr(3) 2.92, Ser(4) 3.63, Glu(6) 6.05
Pro(2) 2.09, Gly(4) 4.05, Ala(2) 2.04, 1/2Cystine(2) 1.89
Val(2) 2.02, Met(1) 0.94, Ile(2) 2.00, Leu(2) 2.05
Tyr(3) 2.87, Phe(4) 4.00, Lys(4) 4.03, His(1) 1.04
Arg(4) 4.05, NH₃(10) 10.97 (回収率 Phe, 80.7%).

元素分析^{*5} : 実験値: C, 47.99; H, 7.18; N, 15.60% (回収率 N, 83.91%).

質量分析値^{*6} : m/z 6029.56

備考: 本品は酢酸塩として製しております。RP-HPLC チャート添付。

*1 脱水脱酢酸物(net peptide)重量に換算した値。

*2 適用量: 50 μg, 薄層板: セルロース, 展開液: ブタノール・水・ピリジン・氷酢酸混液(15:12:10:3), 検出: エンヒドリン試液及びヒバカリ試液。

*3 カラム: YMC Pack ODS-A 4.6mm I.D. × 150mm, 溶離液: 0.1M NaCl (pH 2.4), グラジエント CH₃CN 10%→60%(25min), 流速: 1.0 ml/min, 温度: 室温, 検出: 210nm.

*4 水解条件: 6N HCl, 110°C, 22h.

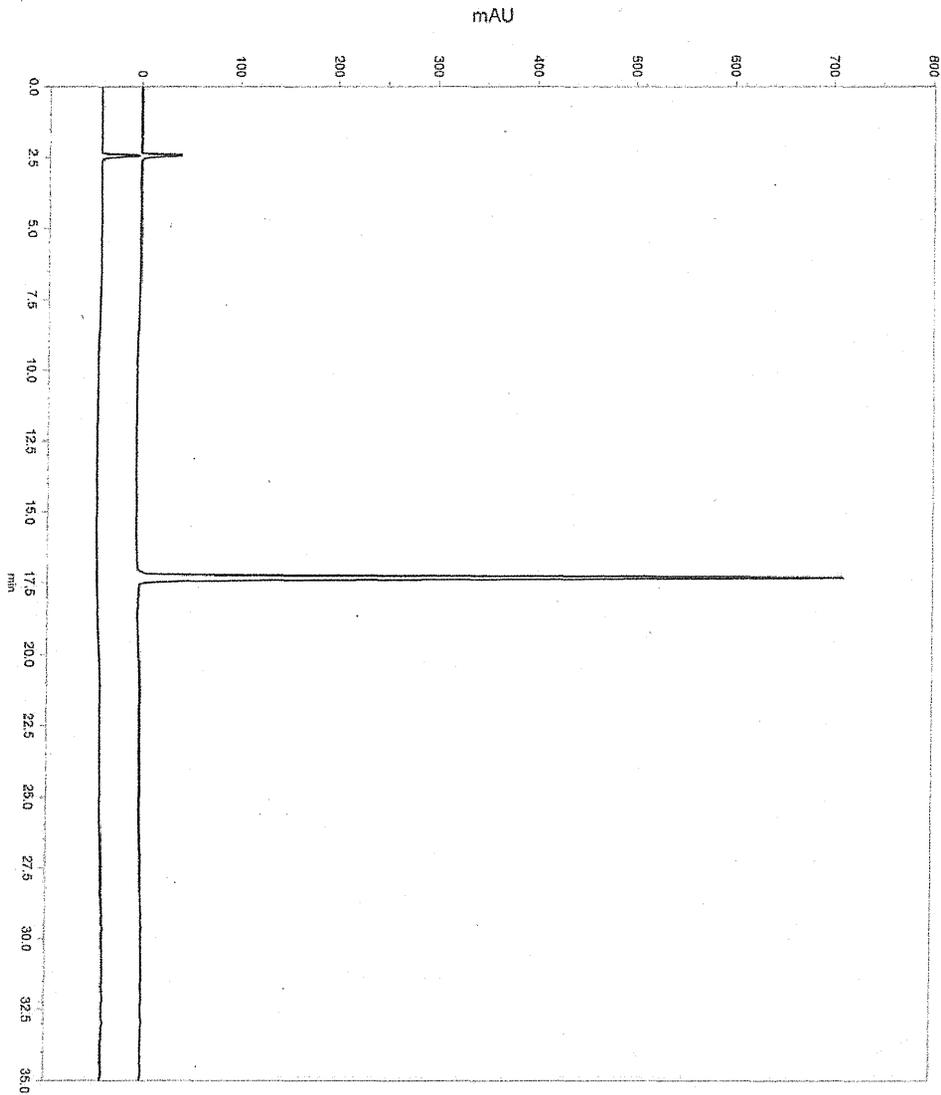
*5 $C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3 \cdot 10AcOH \cdot 26.5H_2O$ からの計算値: C, 48.00; H, 7.08; N, 15.77%.

*6 MALDI-TOF-MSにて測定, [M+H]⁺average 計算値=6029.741).

Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP2 HPLC-9
/ソフト名: C:\CLASS-VP\Methods\4060番台\4278 h-Adrenomedullin.met
ファイル名: C:\CLASS-VP\Data\4051011\4051011-003

Area % Report
分析日時: 2005/10/11 13:11:48
印刷日時: 2005/10/11 13:57:46

Sample : 4278 Adrenomedullin (Human)
Sample Size : 0.6 μ L (1.00mg/100 μ L-1% AcOH)
Column : YMC Pack ODS A-302 (4.6 mm I.D. \times 150 mm) # 041593091(W) + G (4 \times 10mm)
Eluent : 0.1M NaCl (pH 2.4)
Gradient : Acetonitrile 10 % to 60 % [25 min.]
Flow Rate : 1.0 mL/min. , ; Press. : 113 kg/cm² , ; Temp. : 25 $^{\circ}$ C
Detection : CH.1 210 nm



8. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#580908 (非臨床試験では使用していない)



株式会社ペプチド研究所
 彩都研究所 大阪府茨本市彩都あさぎ7丁目2番9号
 Phone:072-643-4411 Fax:072-643-4422
PEPTIDE INSTITUTE, INC.
 SAITO RESEARCH CENTER
 7-2-9 SAITO-ASAGI, IBARAKI-SHI, OSAKA 567-0085, JAPAN
 Phone:81-72-643-4411 Fax:81-72-643-4422



試験検査報告書

2012年3月13日

品名	Adrenomedullin(Human)
ロット番号	580908
製造日	2008年9月18日
容量・数量	20 mg × 2
検査年月日	2008年9月24日～2008年10月27日 2012年3月7日(再検査**)

検査項目	検査結果															
1. 性状	白色粉末															
2. 純度試験 ^{*1}	99%** (規格:95%以上)															
3. 構成アミノ酸 ^{*2}	構成アミノ酸に由来する17種のアミノ酸ピークを認めた。 Pheを4としたときのモル比率 Asp(6) 5.91, Thr(3) 2.85, Ser(4) 3.59, Glu(6) 5.93, Pro(2) 1.98, Gly(4) 3.99, Ala(2) 1.99, Val(2) 1.99, Met(1) 0.67, Ile(2) 1.94, Leu(2) 2.02, Tyr(3) 2.89, Phe(4) 4.00, Lys(4) 4.20, His(1) 1.02, Arg(4) 3.97, 1/2Cystine(2) 1.89 Pheの回収率 86.8%															
4. 酢酸 ^{*3}	8.1%															
5. 水分 ^{*4}	6.0%															
6. 元素分析	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>炭素</th> <th>水素</th> <th>窒素</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>実測値</td> <td>46.50</td> <td>6.95</td> <td>15.27</td> <td>%</td> </tr> <tr> <td>C₂₆H₄₆N₁₀O₁₇S₃・10CH₃COOH・38H₂O からの計算値</td> <td>46.64</td> <td>7.19</td> <td>15.32</td> <td>%</td> </tr> </tbody> </table>		炭素	水素	窒素		実測値	46.50	6.95	15.27	%	C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₇ S ₃ ・10CH ₃ COOH・38H ₂ O からの計算値	46.64	7.19	15.32	%
	炭素	水素	窒素													
実測値	46.50	6.95	15.27	%												
C ₂₆ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₇ S ₃ ・10CH ₃ COOH・38H ₂ O からの計算値	46.64	7.19	15.32	%												
7. 質量スペクトル (MALDI/TOF MS)	実測値: m/z=6029.07 (計算値: [M+H] ⁺ avg =6029.74)															
8. 残留溶媒 ^{*5}	ジエチルエーテル:100ppm 以下(実施した分析条件で検出限界以下) アセトニトリル :70ppm 以下(実施した分析条件で検出限界以下) メタノール :600ppm 以下(実施した分析条件で検出限界以下)															
9. エンドトキシン試験 ^{*6}	0.15EU/mg 以下															
備考	HPLC チャート 2 枚添付 ^{*1} 日局 15 一般試験法, 液体クロマトグラフィーに準じて行う。 カラム:YMC Pack ODS-A, 4.6mm I.D. × 150mm 溶離液:0.1 M NaCl(pH 2.4), グラディエント CH ₃ CN 10% → 60%(25min) 流速:1.0 mL/min, カラム温度:25°C, 検出:220 nm ^{*2} 加水分解条件: 6mol/L 塩酸, 110°C, 22 時間 ^{*3} 日局 15 一般試験法, ガスクロマトグラフィーに準じて行う。 ^{*4} 日局 15 一般試験法, 水分測定法(電量滴定法)に準じて行う。 ^{*5} 日局 15 一般試験法, エンドトキシン試験法(光学的測定法 (1)比濁法)に準じて行う。															

9. 分析結果のまとめ (項目 2. 3. 6. 7. 8.)

試験検査報告書

		ペプチド研究所製			
Lot番号	Lot番号	531117	550237	651014	
製造日	製造日	2003/10/24	2004/8/29	2005/3/1	2005/10/17
M.W.	M.W.	$C_{264}H_{402}N_{80}O_{77}S_3(6028.73)$	$C_{264}H_{402}N_{80}O_{77}S_3(6028.73)$	$C_{264}H_{402}N_{80}O_{77}S_3(6028.73)$	$C_{264}H_{402}N_{80}O_{77}S_3(6028.73)$
外観	外観	白色凍結乾燥粉末	白色凍結乾燥粉末	白色凍結乾燥粉末	白色凍結乾燥粉末
比旋光度	$[\alpha]_D^{25}$	+100.4°C	+100.4°C	+89.50%	+106.20%
純度	TLC	単一スポット	単一スポット	単一スポット	単一スポット
	HPLC	99.00%			
	PR-HPLC		99.00%	99.60%	98.00%
	HEX-HPLC		99.40%		
	HPCE		主ピーク 99.2%		
アミノ酸	Asp(6)	6.02	6.02	6.02	6.04
	Thr(3)	2.93	2.93	2.91	2.92
	Ser(4)	3.72	3.72	3.62	3.63
	Glu(6)	6.07	6.07	6.97	6.05
	Pro(2)	1.98	1.98	2.05	2.09
	Gly(4)	4.04	4.01	4.02	4.05
	Ala(2)	2.02	2.02	2.03	2.04
	1/2Cysteine(2)	1.92	1.92	1.92	1.89
	Val(2)	2	2	2	2.02
	Met(1)	0.97	0.97	0.97	0.94

アミノ酸分析	Ile(2)	1.92	1.92	1.96	2
	Leu(2)	2.04	2.04	2.04	2.05
	Tyr(3)	2.88	2.88	2.86	2.87
	Phe(4)	4	4	4	4
	Lys(4)	3.98	3.98	4	4.03
	His(1)	1.01	1.01	1	1.04
	Arg(4)	3.99	3.99	3.99	4.05
	NH ₃	10.5	10.5	10.67	10.97
	回収率Phe	84.60%	84.60%	76.50%	80.70%
元素分析	実験値	C,47.81%; H,6.98%; N,16.57%; (回収率; N, 87.6%)	C,47.81%; H,6.98%; N,16.57%; (回収率; N, 87.8%)	C,49.2%; H,7.01%; N,16.44%; (回収率; N, 88.45%)	C,47.99%; H,7.18%; N,16.60%; (回収率; N, 83.91%)
質量分析	m/z	6029.87	6029.87	6029.79	6029.66

		phe=4.00	phe=4.00
		APC(アメリカンペプチド社)製	
		51020	60303
	製造日	2007/4/24	2006/7/21
	M.W.	$C_{264}H_{402}N_{80}O_{77}S_3(6028.73)$	$C_{264}H_{402}N_{80}O_{77}S_3(6028.73)$
	外観	White powder	White powder
	純度	97.30%	97.3
	Asp(6)	6	5.64
	Thr(3)	2.87	2.72
	Ser(4)	3.5	3.14
	Glu(6)	5.87	5.37
	Pro(2)	2.29	1.79
	Gly(4)	3.92	4
	Ala(2)	2.06	2.09
	1/2Cysteine(2)	1.75	except
	Val(2)	2.24	1.87
	Met(1)	0.87	0.82
	Ile(2)	1.96	1.99
	Leu(2)	2.02	2
	Tyr(3)	2.83	2.66
	Phe(4)	3.88	3.96
	Lys(4)	4.18	4.1
	His(1)	1.05	1.07
	Arg(4)	4.11	3.9
	NH ₃		
	回収率Phe		
	実験値		
	m/z	6028.2	6028.4

Peptide Content		85.00%	85.80%
Solubility		25mg/ml H ₂ O Clear an	Clear and Colorless
Primary Counter Ion		5.40%	6.10%
Water Content		10.04%	8.20%
Mass Balance		100.80%	100.1

10. APC社製アドレノメデュリンとペプチド研究所製アドレノメデュリンの同時比較

Adrenomedullin(Human)の ロット分析

APC社製の2ロットとペプチド研製の3ロットの比較分析

2014年12月 ペプチド研究所で実施

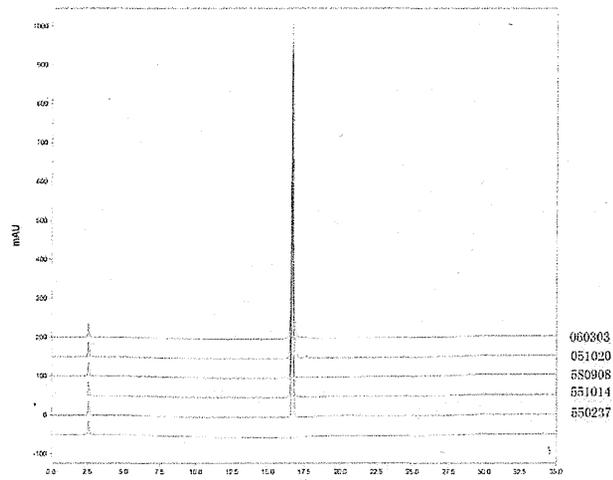
試験試料

品名	ロット番号	製造場所
Adrenomedullin(Human)	550237	株式会社ペプチド研究所 (略称:ペプチド研)
Adrenomedullin(Human)	551014	
Adrenomedullin(Human)	580908	
Adrenomedullin(Human)	051020	American Peptide Company, Inc. (略称:APC)
Adrenomedullin(Human)	060303	

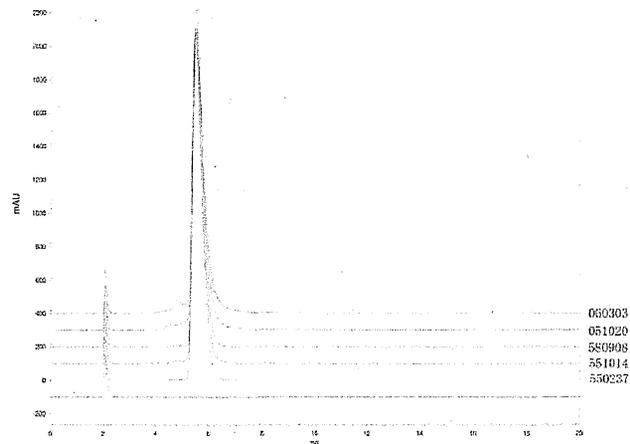
試験項目

- HPLC(グラジエント):純度分析
- HPLC(イソクラ):純度分析
- アミノ酸分析:構造確認
- LC/MS:構造確認及び不純物構造の推定

HPLC(グラジエント)のクロマトグラム



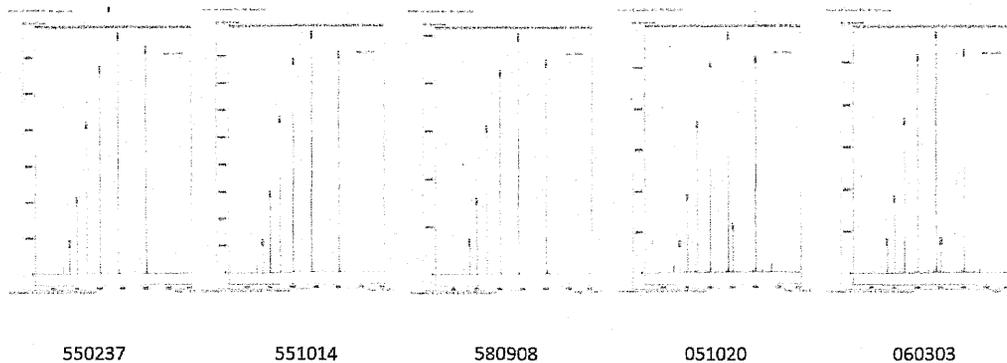
HPLC(イソクラ)のクロマトグラム



HPLC(グラジエント)の分析結果

製造場所	ロット番号	メインピークの面積百分率(%)	
		テーリング処理	垂直分割
ペプチド研	550237	99.8	99.7
	551014	99.2	98.3
	580908	99.6	99.2
APC	051020	97.2	95.3
	060303	99.3	96.5

LC/MSメインピークのスペクトル



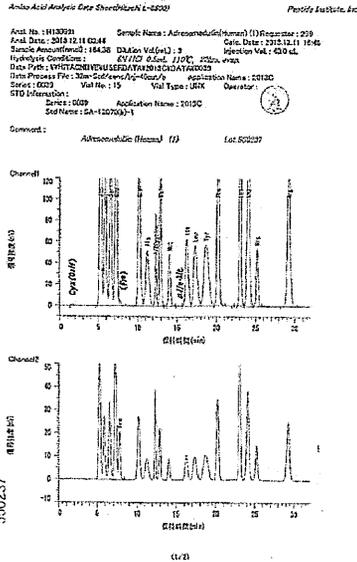
LC/MS分析結果(メインピークの分子量)

電荷	m/z実測値				
	550237	551014	580908	051020	060303
4	1507.9	1507.9	1507.9	1508.0	1508.0
5	1206.6	1206.6	1206.6	1206.6	1206.6
6	1005.6	1005.6	1005.7	1005.7	1005.7
7	862.1	862.1	862.2	862.2	862.2
8	754.5	754.5	754.5	754.5	754.5
9	670.8	670.8	670.8	670.8	670.8
デコンボリューションによる分子量計算値	6027.96	6028.01	6028.02	6028.11	6028.15

LC/MS分析結果

- ペプチド研製ロット
メインピークはAdrenomedullin (Human)の構造を支持
不純物構造の推定を試みたが、構造同定には至らなかった。(不純物が微量のため)
- APC製ロット
メインピークはAdrenomedullin (Human)の構造を支持
9残基目付近までの短鎖ペプチド(ペプチド伸長が途中で止まった不純物)数種検出。(9残基目付近が伸びにくいのか、それとも目的物近傍に重なって除去しにくいのか、いずれの理由によるかは不明。)
- APCロット番号051020において確認できた不純物
Ac-9-52, Ac-13-52, Ac-7-52, Ac-8-52
- APCロット番号060303において確認できた不純物
Ac-9-52, Ac-13-52, Ac-8-52

アミノ酸分析データ



Amino Acid Analysis Data Sheet (Sample L-0500) PerkinElmer, Inc.

Anal. No.: H130031 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (1) (Reagent: 229)
 Anal. Date: 2013.12.11 03:44 Cdn. Date: 2013.12.11 12:46
 Val Type: LMS

Retention	Area	Height	Width	Ratio
1.56	20533	1421	5.49	6.62%
2.82	450200	13224	85.87	8.85%
3.16	243	18700	39.09	0.23%
4.48	186127	17822	49.16	2.33%
5.04	715	51594	31.99	0.10%
6.71	6679	4237		
7.01	1016	8221	55.67	0.48%
8.12	162067	5210	122.01	2.07%
9.16	67463	8703	22.66	1.04%
10.16	16422	18028	25.95	1.84%
11.16	1251	1259	5.3	
12.16	83191	4821	118.74	6.91%
13.16	1590	2193	8.72	0.62%
14.16	1620	10700	65.78	1.93%
15.16	174813	5643	29.74	1.93%
16.16	207062	23170	49.18	2.64%
17.16	201249	17022	93.18	4.00%
18.16	230	111		
19.16	11750	628		
20.16	261422	29522	59.17	3.60%
21.16	42363	22140	140.64	1.02%
22.16	81227	5331	142.7	1.01%
23.16	19016	410		
24.16	301622	12315	61.19	4.65%
25.16	24922	33184	23.47	2.01%

Sum: 104392 60.02%

Key Amino Acid = Phe Residuals = 4 Recovery = 63.1%

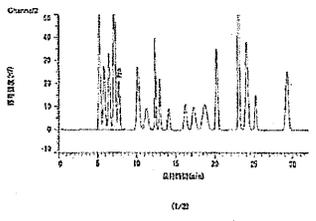
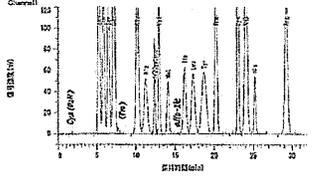
Comment: Cdn (MS): calcd. value and exp. at 1.055
 std: calcd. value and exp. at 1.055

Performed by: 2013.12.11 Checked by: 2013.12.11 [Signature]

Anal. No.: 11120229 Sample Name: Adrenomedullin (U) Receptor: 229
 Anal. Date: 2013.12.11 08:40 Calc. Date: 2013.12.11 10:45
 Sample Amount: 100.000 Division Volume: 3 Injection Vol.: 40.0 ul
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 80°C, 160°C, 200°C
 Data Path: \\PURITY\DATA\11120229\DATA\11120229
 Data Process File: \\PURITY\DATA\11120229\ADRENOMEDULLIN.D
 Acquisition Name: 201302
 Series: 1003 Val No.: 16 Val Type: LMSQ Operator: [Signature]

STD Information:
 Series: 1003 Acquisition Name: 201302
 Std Name: SA-1011000-1

Comment: Adrenomedullin (U) LAL-100004



551014

(1/2)

Anal. No.: 11120229 Sample Name: Adrenomedullin (U) Receptor: 229
 Anal. Date: 2013.12.11 08:40 Calc. Date: 2013.12.11 10:45
 Sample Amount: 100.000 Division Volume: 3 Injection Vol.: 40.0 ul
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 80°C, 160°C, 200°C
 Data Path: \\PURITY\DATA\11120229\DATA\11120229
 Data Process File: \\PURITY\DATA\11120229\ADRENOMEDULLIN.D
 Acquisition Name: 201302
 Series: 1003 Val No.: 16 Val Type: LMSQ Operator: [Signature]

STD Information:
 Series: 1003 Acquisition Name: 201302
 Std Name: SA-1011000-1

Comment: Adrenomedullin (U) LAL-100004

Channel	RT (min)	Area	Height	Width	Ratio	
1	1.58	3291	194	0.02	0.02	
2	2.23	470259	14611	0.25	0.02	
3	3.76	525	340210	14143	400.85	2.24
4	4.48	250220	17703	421.84	2.25	
5	5.00	123	410033	31450	81.97	0.71
6	7.13	3526	4843			
7	8.16	1031	342254	102178	542.20	0.54
8	11.27	101525	52187	28224	1.55	
9	12.31	91786	40516	23542	2.04	
10	12.85	143266	42479	271.21	1.42	
11	14.29	685	500			
12	14.29	83319	45211	137.81	0.51	
13	15.28	1020	705			
14	16.23	102489	62165	371.20	1.51	
15	17.28	172160	54517	243.20	1.97	
16	18.21	340240	21304	420.87	3.82	
17	20.20	277453	102010	441.04	4.52	
18	21.28	2645	371			
19	22.24	10229	1029			
20	23.24	10764	992			
21	24.04	207716	20246	524.00	3.83	
22	24.04	400223	22141	141.81	10.20	
23	25.18	624747	5322	143.11	14.10	
24	26.07	10210	374			
25	26.54	240241	102394	371.20	4.01	
26	28.24	735	248100	19025	203.11	0.50
Total			82244	6216		

Key Active Acid = Phe Residuals = 4 Recovery = 85.4%

Comment: Cyt(AM)1: cald using 40 Ag 1.655
 AM-Phe: cald using 40 Ag 1.655

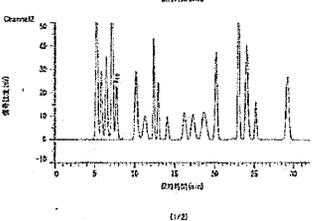
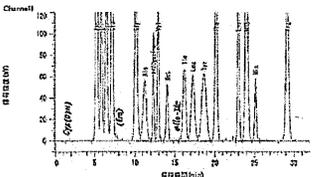
Performed by/Date: 2013.12.11 Checked by/Date: 2013.12.11 JPT

(1/2)

Anal. No.: 11120229 Sample Name: Adrenomedullin (U) Receptor: 229
 Anal. Date: 2013.12.11 08:40 Calc. Date: 2013.12.11 10:45
 Sample Amount: 100.000 Division Volume: 3 Injection Vol.: 40.0 ul
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 80°C, 160°C, 200°C
 Data Path: \\PURITY\DATA\11120229\DATA\11120229
 Data Process File: \\PURITY\DATA\11120229\ADRENOMEDULLIN.D
 Acquisition Name: 201302
 Series: 1003 Val No.: 17 Val Type: LMSQ Operator: [Signature]

STD Information:
 Series: 1003 Acquisition Name: 201302
 Std Name: SA-1011000-1

Comment: Adrenomedullin (U) LAL-100004



580908

(1/2)

Anal. No.: 11120229 Sample Name: Adrenomedullin (U) Receptor: 229
 Anal. Date: 2013.12.11 08:40 Calc. Date: 2013.12.11 10:45
 Sample Amount: 100.000 Division Volume: 3 Injection Vol.: 40.0 ul
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 80°C, 160°C, 200°C
 Data Path: \\PURITY\DATA\11120229\DATA\11120229
 Data Process File: \\PURITY\DATA\11120229\ADRENOMEDULLIN.D
 Acquisition Name: 201302
 Series: 1003 Val No.: 17 Val Type: LMSQ Operator: [Signature]

STD Information:
 Series: 1003 Acquisition Name: 201302
 Std Name: SA-1011000-1

Comment: Adrenomedullin (U) LAL-100004

Channel	RT (min)	Area	Height	Width	Ratio	
1	1.58	3291	194	0.02	0.02	
2	2.23	470259	14611	0.25	0.02	
3	3.76	525	340210	14143	400.85	2.24
4	4.48	250220	17703	421.84	2.25	
5	5.00	123	410033	31450	81.97	0.71
6	7.13	3526	4843			
7	8.16	1031	342254	102178	542.20	0.54
8	11.27	101525	52187	28224	1.55	
9	12.31	91786	40516	23542	2.04	
10	12.85	143266	42479	271.21	1.42	
11	14.29	685	500			
12	14.29	83319	45211	137.81	0.51	
13	15.28	1020	705			
14	16.23	102489	62165	371.20	1.51	
15	17.28	172160	54517	243.20	1.97	
16	18.21	340240	21304	420.87	3.82	
17	20.20	277453	102010	441.04	4.52	
18	21.28	2645	371			
19	22.24	10229	1029			
20	23.24	10764	992			
21	24.04	207716	20246	524.00	3.83	
22	24.04	400223	22141	141.81	10.20	
23	25.18	624747	5322	143.11	14.10	
24	26.07	10210	374			
25	26.54	240241	102394	371.20	4.01	
26	28.24	735	248100	19025	203.11	0.50
Total			82244	6216		

Key Active Acid = Phe Residuals = 4 Recovery = 84.4%

Comment: Cyt(AM)1: cald using 40 Ag 1.655
 AM-Phe: cald using 40 Ag 1.655

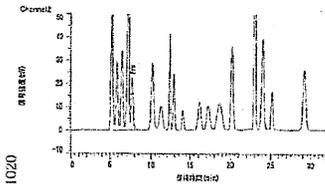
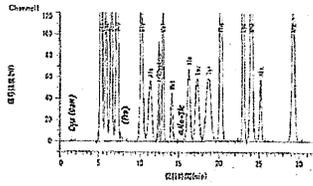
Performed by/Date: 2013.12.11 Checked by/Date: 2013.12.11 JPT

(1/2)

Amico Acid Analysis Data Sheet (Standard L-2000) Piperide Institute, Inc.

Anal. No.: H1120294 Sample Name: Adrenomedullin(10) (Standard) (10) (Repeatability: 100)
 Anal. Date: 2013.12.11 00:20 Calc. Date: 2013.12.11 16:49
 Sample Amount (mg): 10.19 Injection Volume (µl): 3
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl 110°C 24hrs, vials
 Data Path: \\Piperide\Users\Operator\DATA\2013\12\11\H1120294
 Data Process File: 3000\Standard\3000\400000
 Series: 0002 Val No.: 18 Val Type: UNK Operator:
 STD Information: Serial: 0002 Application Name: 2013C
Std Name: (A-1007022)-1

Comment: Adrenomedullin (Standard) (10) Lot: 051605



AFC-051020

Amico Acid Analysis Data Sheet (Standard L-2000) Piperide Institute, Inc.

Anal. No.: H1120214 Sample Name: Adrenomedullin(10) (Standard) (10) (Repeatability: 100)
 Anal. Date: 2013.12.11 00:20 Calc. Date: 2013.12.11 16:44
 Sample Amount (mg): 10.19 Injection Volume (µl): 3
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl 110°C 24hrs, vials
 Data Path: \\Piperide\Users\Operator\DATA\2013\12\11\H1120214
 Data Process File: 3000\Standard\3000\400000
 Series: 0002 Val No.: 18 Val Type: UNK Operator:
 STD Information: Serial: 0002 Application Name: 2013C
Std Name: (A-1007022)-1

Comment: Adrenomedullin (Standard) (10) Lot: 051605

Channel	Retention	Area	Height	Width	Height		
1	Cyt(020)	1.57	17028	1226	2.99	0.077	
2	Arg (10)	2.99	4782529	282048	844.27	5.872	
3	Trp (10)	3.57	3400008	172505	421.82	3.274	
4	Ser (10)	4.57	3224948	182329	458.13	3.522	
5	Glu (10)	5.04	2560202	127178	319.09	2.461	
6	Pro (10)	6.48	27210	5228			
7	Gly (10)	7.78	1016	326222	137776	553.29	4.042
8	Ala (10)	8.77	1128	1344169	10311	298.42	2.119
9	Val(020)	10.16	9371022	82233	201.42	1.520	
10	Met (10)	11.28	1720277	137411	285.26	2.147	
11	Met (10)	14.08	793272	45164	125.41	0.926	
12	Asp(10)	15.04	1504	778			
13	Leu (10)	16.09	1720209	87233	211.58	1.524	
14	Leu (10)	17.28	1780739	10569	83.23	0.621	
15	Trp (10)	18.09	1405423	58142	422.09	3.181	
16	Pro (10)	20.09	2323111	18772	371.14	2.800	
17	-	21.04	326	212			
18	-	22.09	8228	1002			
19	-	23.04	13229	814			
20	Lys (10)	23.09	2914225	227047	556.19	4.122	
21	His (10)	24.04	450501	202264	146.04	1.082	
22	His (10)	25.19	513233	17432	132.29	1.022	
23	-	26.09	2328	255			
24	Arg (10)	26.19	3120454	13223	574.21	3.522	
25	Pro (10)	27.78	316723	22523	306.78	2.119	
Total					833348	61202	

Key Amino Acid = Phe Residuals = 4 Recovery = 82.0%

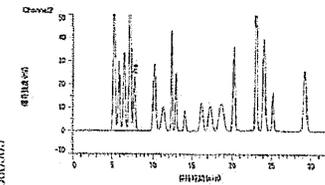
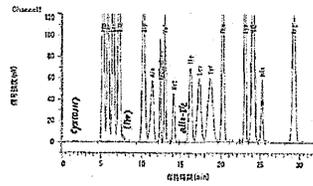
Comment: Cyt(020): calcd value vs. Exp N: 1.005
 Ala(10): calcd value vs. Exp N: 1.005

Performed by/Date: 2013.12.11 Checked by/Date: 2013.12.11, 707

Amico Acid Analysis Data Sheet (Standard L-2000) Piperide Institute, Inc.

Anal. No.: H1120295 Sample Name: Adrenomedullin(10) (Standard) (10) (Repeatability: 100)
 Anal. Date: 2013.12.11 00:20 Calc. Date: 2013.12.11 16:49
 Sample Amount (mg): 10.19 Injection Volume (µl): 3
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl 110°C 24hrs, vials
 Data Path: \\Piperide\Users\Operator\DATA\2013\12\11\H1120295
 Data Process File: 3000\Standard\3000\400000
 Series: 0002 Val No.: 18 Val Type: UNK Operator:
 STD Information: Serial: 0002 Application Name: 2013C
Std Name: (A-1007022)-1

Comment: Adrenomedullin (Standard) (10) Lot: 051605



AFC-0603003

Amico Acid Analysis Data Sheet (Standard L-2000) Piperide Institute, Inc.

Anal. No.: H1120295 Sample Name: Adrenomedullin(10) (Standard) (10) (Repeatability: 100)
 Anal. Date: 2013.12.11 00:20 Calc. Date: 2013.12.11 16:44
 Sample Amount (mg): 10.19 Injection Volume (µl): 3
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl 110°C 24hrs, vials
 Data Path: \\Piperide\Users\Operator\DATA\2013\12\11\H1120295
 Data Process File: 3000\Standard\3000\400000
 Series: 0002 Val No.: 18 Val Type: UNK Operator:
 STD Information: Serial: 0002 Application Name: 2013C
Std Name: (A-1007022)-1

Comment: Adrenomedullin (Standard) (10) Lot: 051605

Channel	Retention	Area	Height	Width	Height		
1	Cyt(020)	1.55	18064	752	2.02	0.012	
2	Arg (10)	2.61	4373225	298150	820.26	5.920	
3	Trp (10)	3.57	2402165	120264	420.00	3.200	
4	Ser (10)	4.57	2181794	175220	431.05	3.210	
5	Glu (10)	5.04	2003052	101237	341.39	2.560	
6	Pro (10)	6.48	52421	3421			
7	Gly (10)	7.78	1016	326222	137776	553.29	4.042
8	Ala (10)	8.77	1720277	137411	298.42	2.119	
9	Val(020)	10.16	9371022	82233	201.42	1.520	
10	Met (10)	11.28	1720277	137411	298.42	2.119	
11	Met (10)	14.08	793272	45164	125.41	0.926	
12	Asp(10)	15.04	1504	778			
13	Leu (10)	16.09	1720209	87233	211.58	1.524	
14	Leu (10)	17.28	1780739	10569	83.23	0.621	
15	Trp (10)	18.09	1405423	58142	422.09	3.181	
16	Pro (10)	20.09	2323111	18772	371.14	2.800	
17	-	21.04	326	212			
18	-	22.09	8228	1002			
19	-	23.04	13229	814			
20	Lys (10)	23.09	2914225	227047	556.19	4.122	
21	His (10)	24.04	450501	202264	146.04	1.082	
22	His (10)	25.19	513233	17432	132.29	1.022	
23	-	26.09	2328	255			
24	Arg (10)	26.19	3120454	13223	574.21	3.522	
25	Pro (10)	27.78	316723	22523	306.78	2.119	
Total					833348	61202	

Key Amino Acid = Phe Residuals = 4 Recovery = 81.7%

Comment: Cyt(020): calcd value vs. Exp N: 1.005
 Ala(10): calcd value vs. Exp N: 1.005

Performed by/Date: 2013.12.11 Checked by/Date: 2013.12.11, 707

アミノ酸分析結果

- ペプチド研製ロット
Adrenomedullin(Human)由来の17種のアミノ酸のピークを認めた。
モル比率も理論値と一致。
通常通りの結果で特に異常なし。
- APC製ロット
Adrenomedullin(Human)由来の17種のアミノ酸のピークを認めた。
モル比率はほぼ理論値と一致したがAla, Lys, His, Proが多少高値(ペプチド研製アドレノメデュリンの規格範囲内)。
⇒高値を示したアミノ酸は何れも、真ん中から見てC端寄りに分布, その結果はLC/MSから推定される不純物の構造から妥当。

結論と考察

- Adrenomedullin(Human) 5ロット(ペプチド研製3ロット及びAPC社製2ロット)を比較し以下の結果が得られた。
- 純度はすべてのロットで95%以上の高純度
- 構造確認試験は同等。
LC/MSのメインピークのシグナルが同等
アミノ酸分析の比率がほぼ同等
- 不純物プロファイルは両社製で異なる
APC社製は, 短鎖ペプチドが主な不純物。
ペプチド研製ロットは, 不純物構造同定には至らなかった。
- 2005年に分析した結果と有意差がなく、アドレノメデュリン原末は-20°Cに保存の条件では、少なくとも8年間は安定性に問題ないことが確認できた。
- 各ロット間で有意差はなく、同等であったことから恒常性は保たれていると判断した。

11. 分析結果のまとめ (項目 10.)

試験検査比較

		ペプチド研究所製			APC(アメリカンペプチド社)製	
Lot番号	Lot番号	580908	550237	551014	51020	60303
実施日	実施日	2013/12/11	2013/12/11	2013/12/11	2013/12/11	2013/12/11
M.W.	M.W.	C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇ ·7S ₃ (6028.73)	C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇ ·7S ₃ (6028.73)	C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇ ·7S ₃ (6028.73)	C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇₇ S ₃ (6028.7	C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇₇ S ₃ (6028.7
外観	外観	白色凍結乾燥 粉末	白色凍結乾燥 粉末	白色凍結乾燥 粉末	白色凍結乾燥 粉末	白色凍結乾燥 粉末
純度(%)	テーリング処 理	99.6	99.8	99.2	97.2	99.3
PR-HPLC	垂直分割	99.2	99.7	98.3	95.3	96.5
アミノ酸分析	Asp(6)	5.862	5.859	5.853	5.85	5.935
	Thr(3)	2.834	2.831	2.826	2.966	2.987
	Ser(4)	3.342	3.393	3.355	3.39	3.319
	Glu(6)	5.717	5.81	5.771	5.808	5.894
	Pro(2)	2.058	2.011	2.04	2.119	2.184
	Gly(4)	3.994	3.985	3.967	4.042	4.028
	Ala(2)	2.019	2.007	1.991	2.11	2.148
	1/2Crystine(2)	2.19	1.934	2.014	2.02	2.142
	Val(2)	1.953	1.944	1.928	2.047	2.086
	Met(1)	0.976	0.97	0.972	0.876	0.887
	Ile(2)	1.922	1.93	1.921	2.024	2.058
	Leu(2)	1.984	1.985	1.979	1.991	2.018
	Tyr(3)	2.844	2.846	2.853	2.826	2.871
	Phe(4)	4	4	4	4	4
	Lys(4)	3.947	3.98	3.943	4.135	4.204
	His(1)	1.018	1.017	1.01	1.055	1.07
	Arg(4)	4.05	4.057	4.061	3.983	3.985
NH ₃		10.078	10.221	10.101	10.022	10.172
質量分析	m/z	6028.02	6027.96	6028.01	6028.11	6028.15

12. 結論

ペプチド研究所製（ロット番号 550237 および 551014）およびアメリカンペプチド（APC）社製（ロット番号 051020）アドレノメデュリン原薬は各ロット間で有意差はなく、同等であったことから恒常性は保たれている。それ故、アドレノメデュリン原薬を用いた非臨床試験は本剤の医師主導治験（Phase 1）開始時資料として活用できると判断する。

仕 様 書

製品名：Adrenomedullin(Human)

宮崎大学