

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]
	$C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3 = 6028.73$
	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ず、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 $[\text{M}+\text{H}]$ イオン, $[\text{M}+\text{nH}]$ 多価イオン, 或いは $[\text{M}+\text{Na}]$ 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

ビ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 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: ニンヒトリン試液及シバウリ試液。

*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。

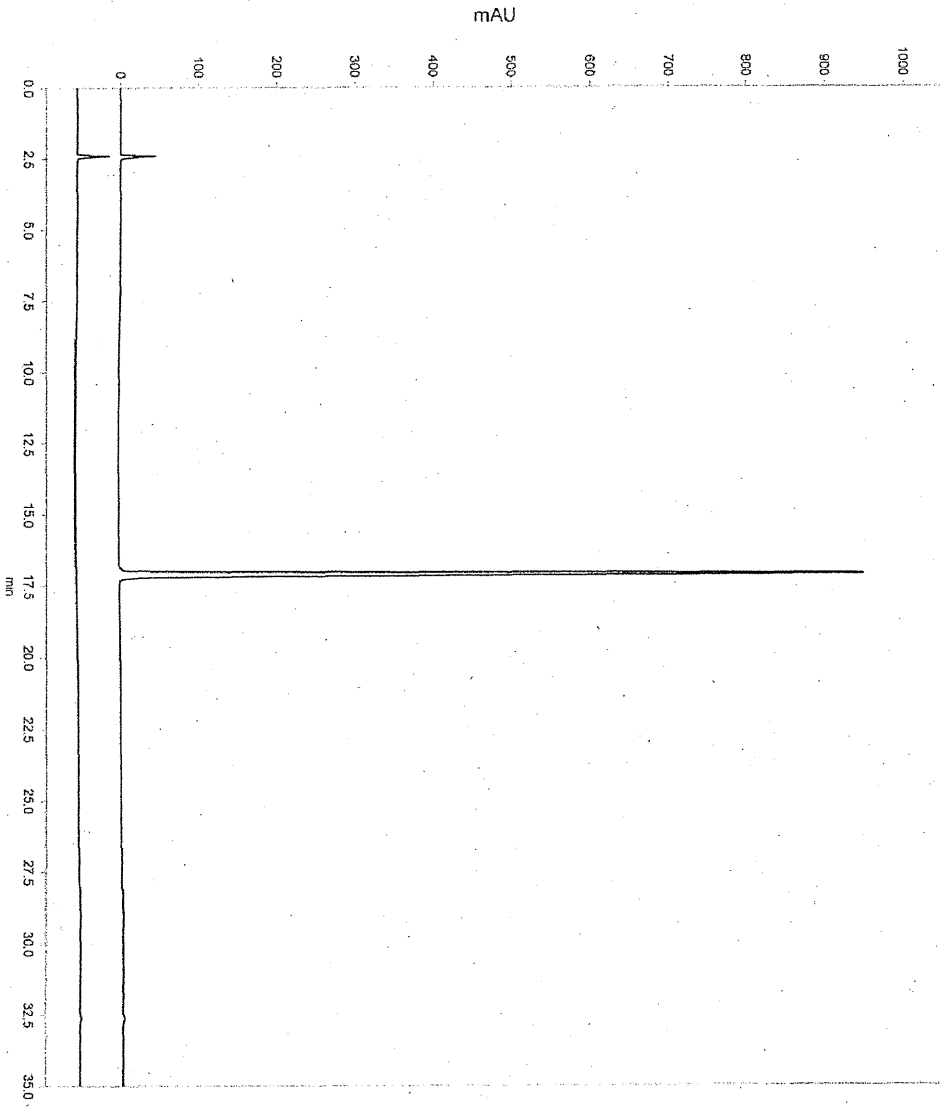
*5 $C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3 \cdot 6.5AcOH \cdot 19H_2O$ からの計算値: C, 49.21; H, 7.01; N, 16.57%。

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

Shimadzu CLASS-VI V6.13 SP2 HPLC-10 Area % Report
Method名: C:\CLASS-VI\Methods\4000番台\4278 h-Adrenomedullin.met
ファイル名: C:\CLASS-VI\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

ビュービットジェノミクス株式会社 様

2005年10月20日

ペプチド研究所
品質管理室



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

TLC^{*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: ニンヒリン試液及びバウリ試液。

*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。

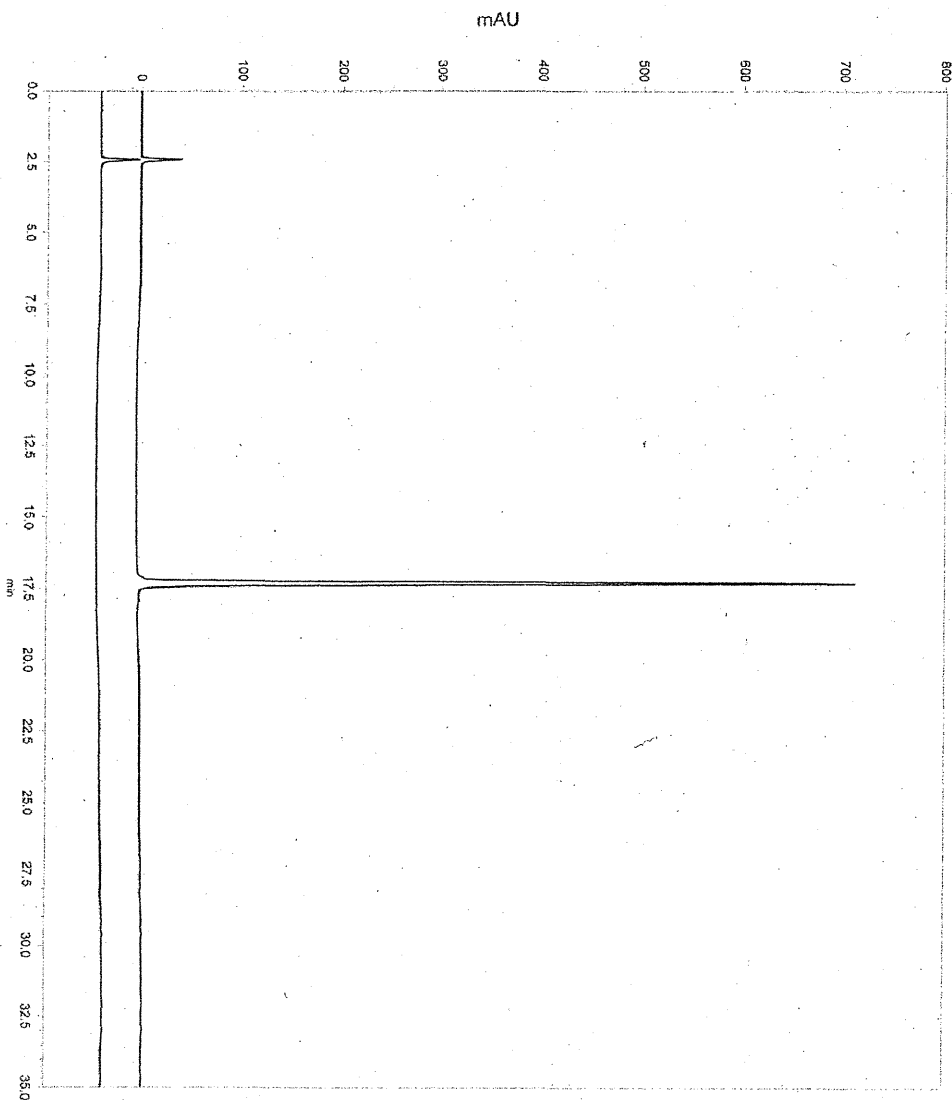
*5 $C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3 \cdot 10AcOH \cdot 26.5H_2O$ からの計算値: C, 48.00; H, 7.08; N, 15.77%。

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

Shimadzu CLASS-VP V6.14 SP2 HPLC-9
文件名: C:\CLASS-VP\FMethods\4000番台\4278 h-Adrenomedullin.met
ファイル名: C:\CLASS-VP\FData\Y051011\Y051011-003

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
 京都研究所
 〒567-0085 大阪府茨木市影島あさぎ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

品質管理
 責任者

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>C₂₈H₄₆N₁₀O₁₇S₂ · 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 ₂₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₇ S ₂ · 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 ₂₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₁₇ S ₂ · 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 ^{*3}	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 ^{*5}	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。															

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

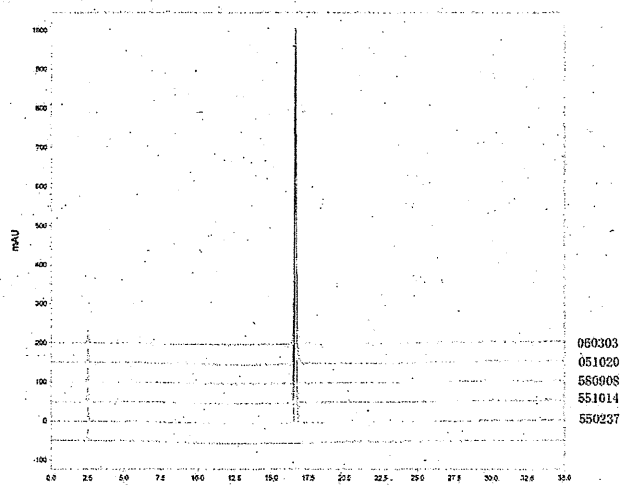
試験試料

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	

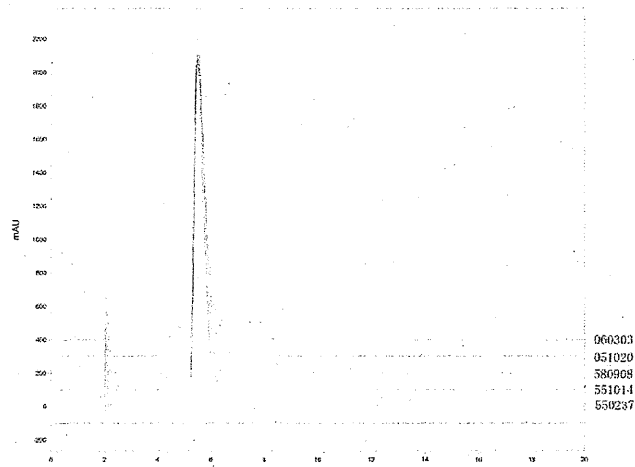
試験項目

- 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



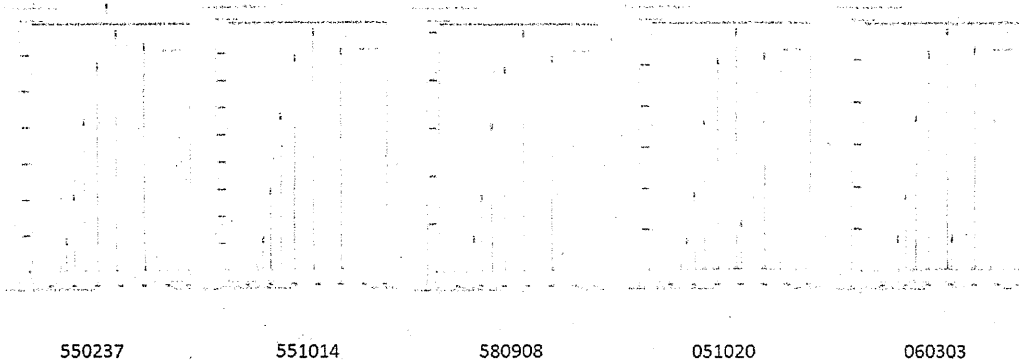
HPLC(イソクラ)のクロマトグラム



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)

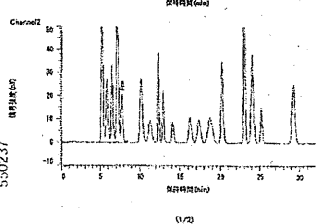
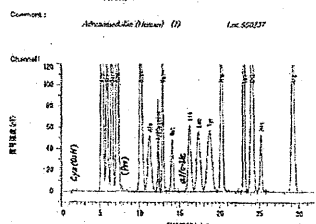
電荷	m/z 値				
	550237	551014	580908	051020	060303
4	1507.9	1507.9	1507.9	1508.0	1508.0
5	1206.6	1206.6	1206.6	1206.6	1206.6
6	1005.6	1005.6	1005.7	1005.7	1005.7
7	862.1	862.1	862.2	862.2	862.2
8	754.5	754.5	754.5	754.5	754.5
9	670.8	670.8	670.8	670.8	670.8
テロンポリマーによる分子量計算値	6027.96	6028.01	6028.02	6028.11	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 (Rev. 11-85) (2)
 Peptide Institute, Inc.
 Anal. No.: H1150311 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (1) (Requestor: 299)
 Anal. Date: 2013.12.11 03:44 Calc. Date: 2013.12.11 16:46
 Sample Amount (mg): 164.26 Division Volume (L): 3 Injection Vol.: 400 µL
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 110°C, 24 hrs, etc.
 Data Path: \\P017\ACM\USER\DATA\ACM\DATA\ARG29
 Data Process File: 2013-Substance-Arg-Hydrolysis Application Name: 2013C
 Series: 0027 Val No.: 15 Val Type: UNK Operator:



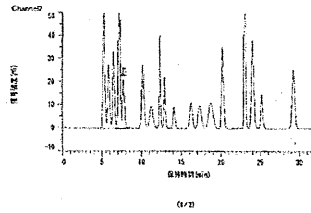
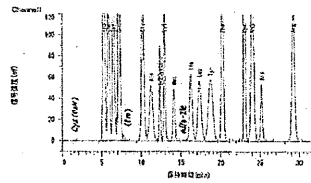
Amino Acid Analysis Data Sheet (Rev. 11-85) (2)
 Peptide Institute, Inc.
 Anal. No.: H1150311 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (1) (Requestor: 299)
 Anal. Date: 2013.12.11 03:44 Calc. Date: 2013.12.11 16:46
 Val Type: UNK

Channel	Retention	Area	Height	Area%	Height%	
1	1.55	20290	1425	2.45	6.21	
2	4.24	5.21	452200	25281	52.37	54.59
3	7.14	0.45	240707	14780	294.06	2.81
4	7.24	5.45	766531	17076	478.14	3.29
5	9.04	0.45	812544	31245	614.94	6.10
6	9.04	7.21	42630	443		
7	9.04	10.10	342924	15231	561.47	3.65
8	9.04	11.22	1420707	53426	252.93	2.00
9	12.04	12.30	87453	8703	272.54	1.04
10	14.04	12.30	145209	12543	272.54	1.04
11	14.04	13.31	7050	433		
12	14.04	14.24	85046	4631	138.34	0.97
13	14.04	15.13	21438	870	2.47	0.07
14	14.04	15.55	161890	63839	272.54	1.04
15	14.04	15.58	174413	64548	270.74	1.04
16	14.04	15.58	245263	57070	401.19	2.44
17	14.04	20.13	302037	17000	653.79	4.00
18	14.04	22.25	3201	211		
19	14.04	22.28	11500	608		
20	14.04	23.03	282428	24664	853.17	5.40
21	14.04	24.74	122483	20514	140.94	1.02
22	14.04	25.13	88657	3321	151.27	1.01
23	14.04	26.04	15016	415		
24	14.04	26.41	302036	12245	571.79	4.00
25	14.04	7.12	94332	2074	243.47	2.01

Total: 160267 85260
 Key Amino Acid = Phe Residuals/Sum = 4 Recovery = 85.7%
 Comment: Cys(7.14): calcd using std. Arg(9.04) 1.00%
 His(14.04): calcd using std. Arg(9.04) 1.00%

Performed by/Date: 2013.12.11 Created by/Time: 2013.12.11 7:04

Anal. No.: H120922 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (2) Requester: 299
 Anal. Date: 2013.12.11 05:55 Calc. Date: 2013.12.11 16:46
 Sample Acquired: 120.87 Division Volume: 3 Injection Vol.: 40.0 µL
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 20 Sec, 110°C, 20% v/v
 Data Path: H:\12\09\22\H120922\ADRENOMEDULLIN\ADRENOMEDULLIN.D
 Data Process File: 23m-Std\Comp\Fp-450679 Application Name: 2013G
 Series: 0255 Vial No.: 19 Vial Type: UMRQ Operator:
 STD Information: Method: 1003 Acquisition Name: 2013G
 Std Name: SA-120702-1
 Comment: Adrenomedullin (Human) (2) Lot: 551014



551014

Anal. No.: H120982 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (2) Requester: 299
 Anal. Date: 2013.12.11 06:59 Calc. Date: 2013.12.11 16:46
 Vial Type: UMRQ

Channel	RT (min)	Area	Std. Dev.	Conc.	Ratio
1 Cys(GND)	1.35	3391	204	0.67	6.06%
2 Asp	8.53	4490510	248131	839.24	5.82%
3 Thr	9.22	3160510	174503	631.53	2.52%
4 Ser	9.48	2160030	117833	475.51	2.33%
5 Glu	7.20	8170372	311800	817.07	3.71%
6 Phe	7.70	78306	4993	522.90	2.81%
7 Gly	80.13	3403356	153878	522.90	2.81%
8 Ala	81.37	1414936	58021	492.24	1.91%
9 Trp(OxTm)	12.37	917346	38006	285.00	2.04%
10 Val	12.93	1431556	124839	773.21	1.92%
11 -	13.51	2893	202		
12 Met	14.29	163700	4921	137.81	0.57%
13 iso-Phe	15.09	18330	733	2.67	0.07%
14 Ile	14.30	1823460	82555	132.25	1.51%
15 Leu	17.39	4782140	34537	280.25	1.97%
16 Tyr	18.11	1406160	57006	464.87	2.65%
17 Pro	20.93	2333430	180910	545.64	4.00%
18 -	21.89	2448	271		
19 -	22.76	10352	1019		
20 -	22.81	10305	933		
21 Lys	23.73	2602714	309138	558.83	3.94%
22 His	24.04	4829232	236441	1431.61	10.10%
23 His	25.19	264507	3392	143.10	1.01%
24 -	26.07	120716	374		
25 Arg	28.01	2522071	128335	570.50	4.06%
26 Pro	7.35	326140	21055	351.11	2.04%
Total				3454.81	62.14%

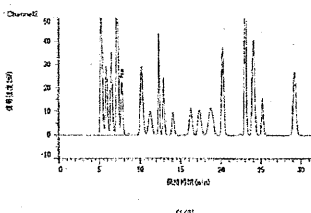
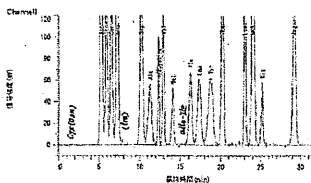
Key Amino Acid = Phe Residuals/Std = 4 Recovery = 85.45%

Comment: Cys(GND) - calcd using std. Amp. x 1.05
 His - calcd using std. R. x 1.05

Performed by/Date: 2013.12.11 Checked by/Date: 2013.12.11 Jof

0792

Anal. No.: H120982 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (2) Requester: 299
 Anal. Date: 2013.12.11 05:28 Calc. Date: 2013.12.11 16:46
 Sample Acquired: 170.81 Division Volume: 3 Injection Vol.: 40.0 µL
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 20 Sec, 110°C, 20% v/v
 Data Path: H:\12\09\82\H120982\ADRENOMEDULLIN\ADRENOMEDULLIN.D
 Data Process File: 23m-Std\Comp\Fp-450679 Application Name: 2013G
 Series: 0255 Vial No.: 17 Vial Type: UMRQ Operator:
 STD Information: Method: 1003 Acquisition Name: 2013G
 Std Name: SA-120702-1
 Comment: Adrenomedullin (Human) (2) Lot: 552028



550908

Anal. No.: H120982 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (2) Requester: 299
 Anal. Date: 2013.12.11 05:25 Calc. Date: 2013.12.11 16:46
 Vial Type: UMRQ

Channel	RT (min)	Area	Std. Dev.	Conc.	Ratio
1 Cys(GND)	1.35	2313	616	1.49	0.06%
2 Asp	8.53	5843445	262007	850.44	3.80%
3 Thr	9.22	3164315	166023	426.50	2.84%
4 Ser	9.48	3150044	139433	207.66	3.34%
5 Glu	7.20	2452225	311718	648.48	2.37%
6 Phe	7.70	31847	3623		
7 Gly	80.16	2703015	144917	626.80	2.54%
8 Ala	81.38	1723092	6733	306.11	2.03%
9 Trp(OxTm)	12.37	1003633	100794	232.70	2.19%
10 Val	12.93	1756693	137103	234.74	1.92%
11 -	13.49	7827	494		
12 Met	14.29	320064	32003	146.19	0.91%
13 iso-Phe	15.23	20301	816	3.25	0.02%
14 Ile	14.30	1737651	87059	291.91	1.92%
15 Leu	17.39	1833049	61188	301.23	1.96%
16 Tyr	18.11	2834487	62134	425.04	2.84%
17 Pro	20.97	3539127	139415	607.64	4.03%
18 -	21.26	4140	438		
19 -	22.22	64009	1624		
20 -	22.39	30426	2373		
21 Lys	23.68	3433500	372836	359.63	3.94%
22 His	24.04	4916847	232611	1520.10	10.27%
23 His	25.19	266004	30263	154.67	1.07%
24 -	26.04	12481	438		
25 Arg	28.19	3544782	142426	615.26	4.05%
26 Pro	7.35	305923	27655	312.64	2.03%
Total				9244.88	62.14%

Key Amino Acid = Phe Residuals/Std = 4 Recovery = 84.43%

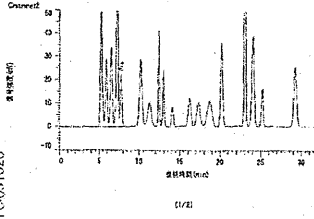
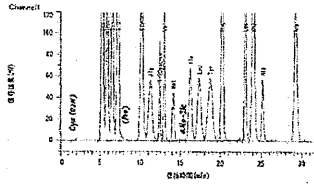
Comment: Cys(GND) - calcd using std. Amp. x 1.05
 His - calcd using std. R. x 1.05

Performed by/Date: 2013.12.11 Checked by/Date: 2013.12.11 Jof

0792

Anal. No.: H112094 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (4) Receptor: 299
 Anal. Date: 2013.12.11 08.33 Calc. Date: 2013.12.11 16.48
 Sample Amount (mmol): 103.19 Division Vol (L): 3 Injection Vol.: 420.0 L
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 110°C, 20hrs, crak
 Data Path: H:\E\ACID\H112094\ANAL\H112094A0031
 Data Process File: 35m-Sto/conv/ty-40conv Application Name: 20130
 Series: 0028 Val. No.: 118 Val. Type: 120K Operator:

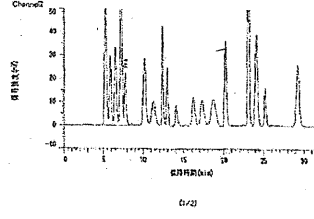
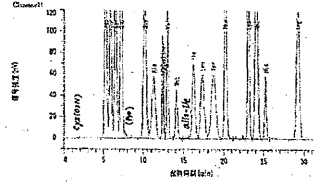
STD Information: Ser. No.: 0055 Application Name: 20130
 Std Name: SA-180709-1
 Comment: Adrenomedullin (Human) (4) Lot: 061020



AAC-051020

Anal. No.: H113095 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (3) Receptor: 288
 Anal. Date: 2013.12.11 07.28 Calc. Date: 2013.12.11 16.48
 Sample Amount (mmol): 571.02 Division Vol (L): 3 Injection Vol.: 420.0 L
 Hydrolysis Conditions: 6N HCl, 110°C, 20hrs, crak
 Data Path: H:\E\ACID\H113095\ANAL\H113095A0031
 Data Process File: 35m-Sto/conv/ty-40conv Application Name: 20130
 Series: 0028 Val. No.: 118 Val. Type: 120K Operator:

STD Information: Ser. No.: 0055 Application Name: 20130
 Std Name: SA-180709-1
 Comment: Adrenomedullin (Human) (3) Lot: 061020



AAC-060305

Anal. No.: H112094 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (4) Receptor: 299
 Anal. Date: 2013.12.11 05.30 Calc. Date: 2013.12.11 16.48
 Val. Type: 120K

Retention	Area	Height	Width	Ratio
1 Cys(296)	1.57	17828	1258	2.99
2 Asp (3)	3.20	4762502	29028	844.97
3 Thr (2)	3.92	2029281	13728	422.88
4 Ser (4)	6.48	3229449	18228	482.12
5 Glu (6)	11.0	3256023	21878	838.05
6 Phe (1)	7.71	77875	5098	2.10
7 Gly (1)	18.16	252023	15932	532.25
8 Ala (2)	11.20	124419	8331	304.48
9 Val (2)	12.08	80130	5023	291.42
10 Val (2)	12.52	177062	12411	452.26
11 Met (1)	14.26	708872	45184	122.41
12 iso-Val (1)	12.22	18544	118	4.02
13 Ile (1)	16.20	1781028	87553	231.96
14 Leu (2)	17.28	1720479	10288	352.22
15 Tyr (3)	18.58	2478428	15482	403.89
16 Phe (4)	28.12	3296511	18035	677.14
17 -	21.27	2506	172	0.71
18 -	22.28	8428	1022	3.12
19 -	22.45	12428	874	2.92
20 Lys (1)	22.02	2918228	182287	580.88
21 His (1)	23.04	4262061	200206	1448.04
22 His (3)	25.10	541322	37482	152.29
23 -	26.01	42081	709	1.65
24 Arg (4)	28.18	3320454	12335	574.21
25 Pro (2)	7.21	378722	23353	504.78
Total				8318.18

Key Amino Acid = Phe Residues/mol = 4 Recovery = 85.01%

Comment: Cys(296): used calc. app. v. 1.055
 Ala(6): used calc. app. v. 1.055

Performed by: 2013.12.11 Checked by: 2013.12.11

Anal. No.: H113095 Sample Name: Adrenomedullin (Human) (3) Receptor: 299
 Anal. Date: 2013.12.11 07.28 Calc. Date: 2013.12.11 16.48
 Val. Type: 120K

Retention	Area	Height	Width	Ratio
1 Cys(296)	1.55	10084	708	4.07
2 Asp (3)	3.21	4971206	29110	940.28
3 Thr (2)	3.92	2462285	15924	433.52
4 Ser (4)	6.48	2984784	17328	481.05
5 Glu (6)	11.0	2702026	21189	947.79
6 Phe (1)	7.71	85284	5481	2.10
7 Gly (1)	18.16	252072	15963	582.18
8 Ala (2)	11.27	178289	11679	311.28
9 Val (2)	12.07	998482	87029	310.81
10 Val (2)	12.52	1813984	149214	504.36
11 Met (1)	14.09	803449	45611	128.81
12 iso-Val (1)	12.22	17005	113	4.02
13 Ile (1)	16.20	1770881	82373	289.35
14 Leu (2)	17.28	1882884	89383	282.28
15 Tyr (3)	18.58	2528003	15847	416.17
16 Phe (4)	28.17	3475882	18430	818.88
17 -	21.27	2601	282	0.71
18 -	22.28	15915	1417	4.92
19 -	22.47	12026	1024	3.12
20 Lys (1)	22.02	3983521	22918	420.25
21 His (1)	23.04	4910181	23117	1474.55
22 His (3)	25.10	181201	18135	153.04
23 -	26.09	10222	381	1.65
24 Arg (4)	28.21	3237250	124218	872.81
25 Pro (2)	7.22	359807	22507	316.55
Total				8168.33

Key Amino Acid = Phe Residues/mol = 4 Recovery = 84.78%

Comment: Cys(296): used calc. app. v. 1.055
 Ala(6): used calc. app. v. 1.055

Performed by: 2013.12.11 Checked by: 2013.12.11

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		
Lot番号	Lot番号	580908	550237	551014
実施日	実施日	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)
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
純度(%)	テーリング処理	99.6	99.8	99.2
PR-HPLC	垂直分割	99.2	99.7	98.3
アミノ酸分析	Asp(6)	5.862	5.859	5.853
	Thr(3)	2.834	2.831	2.826
	Ser(4)	3.342	3.393	3.355
	Glu(6)	5.717	5.81	5.771
	Pro(2)	2.058	2.011	2.04
	Gly(4)	3.994	3.985	3.967
	Ala(2)	2.019	2.007	1.991
	1/2Crystine(2)	2.19	1.934	2.014
	Val(2)	1.953	1.944	1.928
	Met(1)	0.976	0.97	0.972
	Ile(2)	1.922	1.93	1.921
	Leu(2)	1.984	1.985	1.979
	Tyr(3)	2.844	2.846	2.853
	Phe(4)	4	4	4
	Lys(4)	3.947	3.98	3.943
	His(1)	1.018	1.017	1.01
Arg(4)	4.05	4.057	4.061	
	NH ₃	10.078	10.221	10.101
質量分析	m/z	6028.02	6027.96	6028.01

		APC(アメリカンペプチド社)製	
		51020	60303
		2013/12/11	2013/12/11
		C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇ ·7S ₃ (6028.7)	C ₂₆₄ H ₄₀₆ N ₈₀ O ₇ ·7S ₃ (6028.7)
		白色凍結乾燥粉末	白色凍結乾燥粉末
		97.2	99.3
		95.3	96.5
		5.85	5.935
		2.966	2.987
		3.39	3.319
		5.808	5.894
		2.119	2.184
		4.042	4.023
		2.11	2.148
		2.02	2.142
		2.047	2.086
		0.876	0.887
		2.024	2.058
		1.991	2.018
		2.826	2.871
		4	4
		4.195	4.204
		1.055	1.07
		3.983	3.985
		10.022	10.172
		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