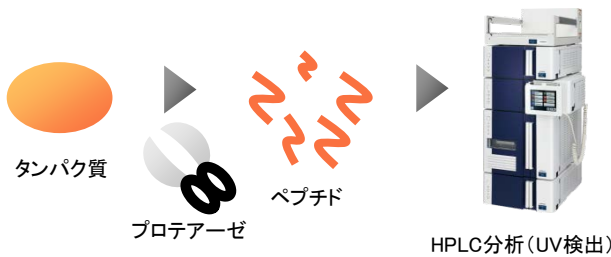


■ バイオ医薬品分析への応用 ～ペプチドマップ法～

AS/LC-002

バイオ医薬品とは、組み換えDNA技術および細胞培養技術を応用して製造するタンパク質性医薬品のことで、原材料が生物起源の高分子であることが特長です。その試験法や評価方法については、指針やガイドラインがいくつか出されています。今回は、バイオ医薬品の確認試験法の一方法である『ペプチドマップ法』について紹介いたします。ペプチドマップ法は、タンパク質の特性解析、同一性や安定性の評価、変異の検出を目的とした方法です。多くのペプチドピークが出現するLCのクロマトグラムの溶出パターンを比較するため、ピークの保持時間や面積値の再現性が良好であることが非常に重要な要素となります。ここではモデルサンプルとしてBSAと、バイオ医薬品の代表格である抗体医薬品 (IgG) を用いて、その消化物をLCで測定し、再現性を評価しました。

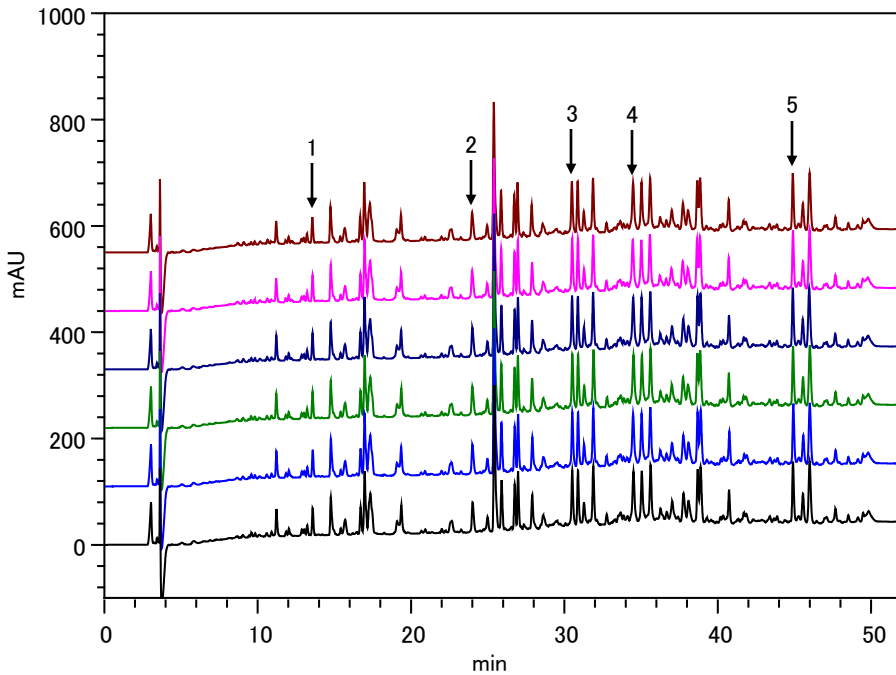
◆ ペプチドマップ法概要 ◆



タンパク質を化学的もしくは酵素的に消化して、生じたペプチド断片をLCなどで分離検出、そのクロマトパターンを比較することで、構成しているアミノ酸の変化を確認する試験法です。

\* ペプチドマップ法は、三薬局方 (USP、EP、JP) での調和合意に基づき規定された試験法で、第十六改正日本薬局方 (JP) の参考情報に記載されています。

■ BSA(ウシ血清アルブミン) 消化物の測定例



<測定条件>

カラム : LaChrom C18 (5 μm)  
 4.6 mm I.D. × 250 mm  
 溶離液 : A) 0.1 % TFA / H<sub>2</sub>O (v/v)  
 B) 0.1 % TFA / CH<sub>3</sub>CN (v/v)  
 \* Gradient  
 流量 : 1.0 mL/min  
 カラム温度 : 40 °C  
 検出波長 : UV 215 nm  
 注入量 : 10 μL  
 \* ダイナミックミキサ使用

<試料調製>

試料 (BSA)  
 | ← トリプシンをBSAの 1/100 重量添加  
 反応 37 °C、16 hr  
 |  
 熱処理 90 °C、10 min  
 |  
 遠心分離 10,000 rpm、10min、3 °C  
 |  
 上清を注入試料とする

■ ピーク保持時間及び面積値再現性 (n=6)

【保持時間】	ピークNo.	1	2	3	4	5
Average		13.579	23.998	30.508	34.488	44.911
SD		0.009	0.012	0.012	0.018	0.012
%RSD		0.06	0.05	0.04	0.05	0.03

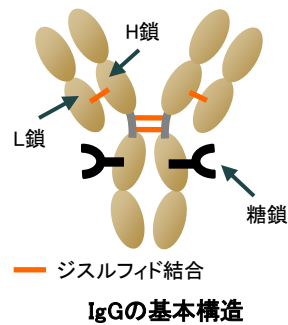
【面積値】	ピークNo.	1	2	3	4	5
Average		313951	477180	729175	922057	814068
SD		6957	11499	17599	22397	21035
%RSD		2.22	2.41	2.41	2.43	2.58

6回繰り返し測定時、ピーク保持時間再現性(%RSD)は0.06%以下、ピーク面積値再現性(%RSD)は2.6%以下と、非常に良好な再現性が得られました。これにより、ペプチドマップ法で信頼性の高いクロマトパターン解析がおこなえることがわかります。

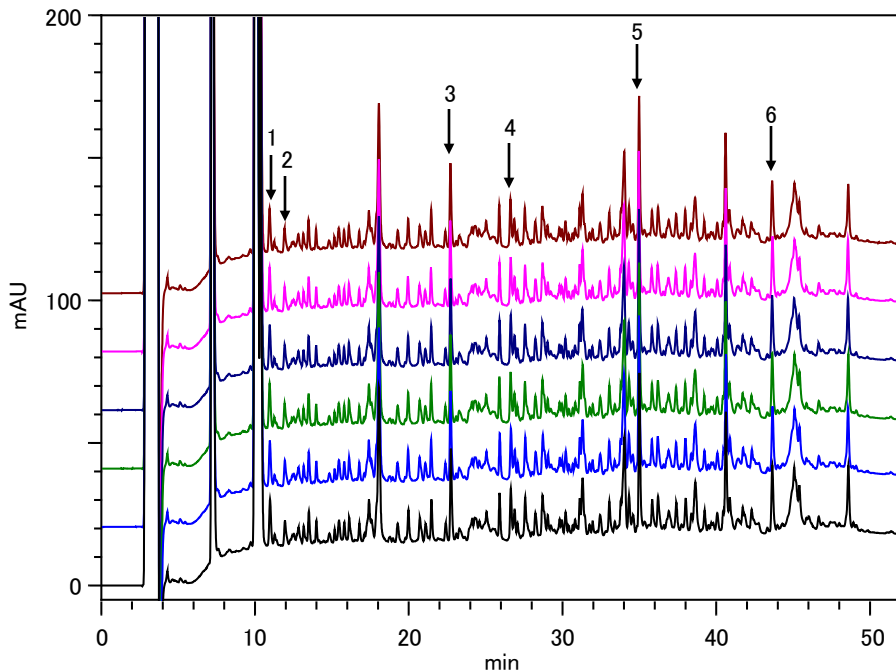
◆ 抗体医薬品 (IgG) の構造 ◆

バイオ医薬品の中でも抗体(免疫グロブリン)を利用した抗体医薬品は、多くが糖鎖構造を持つ糖タンパク質で、その高い特異性や有効性から特に注目されています。免疫グロブリンには数種類ありますが、抗体医薬として実用化されているのは主にIgGで、“Y”字型の4本鎖構造が特徴的です。H鎖、L鎖各2本がそれぞれがS-S結合(ジスルフィド結合)で結びつくことにより、Y字型のヘテロテトラマーを形成しています。また翻訳後修飾により、糖鎖が結合していますが、この糖鎖構造が活性に大きく影響するとされています。

ここではIgGを還元アルキル化後トリプシン消化し、そのペプチド断片をLCで測定しクロマトパターンにおける、ピークの保持時間と面積値再現性を評価しました。



■ IgG消化物の測定例



<測定条件>

カラム : LaChrom C18 (5 μm) 4.6 mm I.D. × 250 mm  
 溶離液 : A) 0.1 % TFA / H<sub>2</sub>O (v/v)  
 B) 0.1 % TFA / CH<sub>3</sub>CN (v/v) \* Gradient  
 流量 : 1.0 mL/min  
 カラム温度 : 40 °C  
 検出波長 : UV 215 nm  
 注入量 : 10 μL  
 \* ダイナミックミキサ使用

<試料調製>

試料 (IgG)  
 ← ジチオスレイトール (DTT) を終濃度 10 mmol/L になるように添加  
 反応 37 °C、30 min  
 ← ヨードアセトアミド (IAA) を終濃度 40 mmol/L になるように添加  
 反応 37 °C、30min、遮光下  
 ← システイン (Cys) を終濃度 40 mmol/L になるように添加  
 反応 37 °C、30 min  
 ← トリプシンをIgGの 1/100 重量添加  
 反応 37 °C、16 hr  
 熱処理 90 °C、10 min  
 遠心分離 10,000 rpm、10min、3 °C  
 上清を注入試料とする

①

①還元アルキル化処理

■ ピーク保持時間及び面積値再現性 (n=6)

【保持時間】	ピークNo.	1	2	3	4	5	6
Average		10.960	11.934	22.716	26.630	34.979	43.647
SD		0.012	0.011	0.013	0.010	0.013	0.010
%RSD		0.11	0.09	0.06	0.04	0.04	0.02

【面積値】	ピークNo.	1	2	3	4	5	6
Average		131165	80680	227672	135253	418818	200076
SD		2547	2585	6966	4474	16010	8164
%RSD		1.94	3.20	3.06	3.31	3.82	4.08

6回繰り返し測定時、ピーク保持時間再現性(%RSD)は0.1%以下、ピーク面積値再現性(%RSD)は4.1%以下と、非常に良好な再現性が得られました。IgG消化物のような、より複雑なペプチドの測定でも信頼性の高いクロマトパターン解析がおこなえることがわかります。

主な装置構成 : Chromaster  
 5110 ポンプ(低圧Gr、ダイナミックミキサ)、5210 オートサンブラ、5310 カラムオープン、5410 UV検出器

注意: 本資料に掲載のデータは測定例を示すもので、性能を保証するものではありません。