

# バイオテクノロジー由来医薬品に関する項目 –

## ペプチドマップ法

### 改正1 ステージ4

## イントロダクション

ペプチドマップ法は、タンパク質、特に組換え DNA 技術により得られたものについて、一次構造の解析に用いられる分析方法の一つである。ペプチドマップ法には、アミノ酸残基間のアミド結合を選択的に切断し、予測した一連のペプチドを得るためのタンパク質の化学的または酵素的処理が含まれる。生成したペプチドは、分析分離、検出、及び同定され、アミノ酸配列及びペプチドの化学的修飾に関する情報を与える。ひとたびペプチドマップ中のペプチドの詳細な構造情報が決定されると、この情報は遡って外挿され、ペプチドマップが由来したタンパク質の化学構造情報を与える。ペプチドマップ法は、同様に処理した標準品／標準物質と比較することにより得られた情報から、タンパク質の一次構造の確認、構造上の変化の有無の検出、並びに製造工程の恒常性及び遺伝子安定性の確認を行うことから、比較手法である。

バイオテクノロジー由来タンパク質医薬品の分析の領域では、いくつかペプチドマップの使用目的がある。この章では、新規製品の特性の確認及び既存製品の同一性の確認を目的とした一次構造の決定のためのペプチドマップの利用に焦点を絞る。これは、検体から得られたペプチドマップと、標準物質を同様に処理して得られたペプチドマップを比較することにより達せられる。

## ペプチドマップ法の手順開発のための概論

ペプチドマップ法を適用するタンパク質はそれぞれ固有の特徴を有しており、それをよく理解することで、科学的及び分析学的アプローチにより十分な特異性を示すバリデートされたペプチドマップの開発が可能となる。その上、ペプ

26 チドマップ法の手順の設計は、その目的に応じて異なるだろう。タンパク質の同  
27 一性の確認のためには、ペプチドマップは高い特異性が必要である。タンパク質  
28 への変異に対して予備知識がないことから、全て、またはほぼ全ての範囲の配列  
29 の検出が重要である。全てのペプチドマップ法の設定に際して適用される概論が  
30 ある。

31 一般的に、ペプチドマップ法の手順開発には4つの主なステップが必要で  
32 ある：サンプルの前処理（例えば、脱塩、還元、アルキル化）；アミド結合の選  
33 択的切断；ペプチドの分離；及びペプチドの検出。この章では、ペプチドマップ  
34 法を適用する際の詳細な指針を示す。

35 図1の流れ図は、ペプチドマップ法の手順開発に関わるステップと判断の  
36 概要を示す。一般に、ペプチドマップの手順開発は、タンパク質製剤のアミノ酸  
37 配列の知見から始まる。ペプチドマップ法で用いられる化学的もしくは酵素的タ  
38 ンパク質切断法は、特定のアミノ酸の前または後ろのアミド結合に対して特異性  
39 を持つので、アミノ酸配列に関する知見は生成する一連のペプチドを予測するの  
40 に利用される。コンピューターツールは、配列特異的なペプチド結合の切断が可  
41 能な化学試薬やタンパク質切断酵素により生じるペプチド群を予測するのに、つ  
42 まり *in silico* 消化を実施するために、利用できる。それぞれのペプチドマップ法  
43 の適用に対して、仮想の一連のタンパク質切断ペプチド群（これらを特性解析す  
44 ることで、ペプチドマップの目的を達成するだろう）を設計し、そして、使用す  
45 べきタンパク質切断試薬を決定するために、*in silico* 消化がまず始めに実施され  
46 る。

47 *in silico* 消化実験を実施した後、ペプチドマップ法の手順開発の次のステ  
48 ップは、選択したタンパク質切断処理を行うことであり、その次に、生じたペプ  
49 チドの解析評価を行う。解析評価に用いられる技術は多様であるが、一般に、ま  
50 ずペプチドを分離する方法（逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）など）があ  
51 り、その次に分離されたペプチドを検出及び同定する方法（UV 検出もしくは質

52 量分析、または分取したペプチドのエドマン分解によるアミノ酸配列分析など)  
53 がある。分析結果については、*in silico* 消化により予想された結果と比較し、期  
54 待された結果と十分に一致しない場合は、サンプルの処理やペプチドの分離また  
55 は検出の最適化を繰り返し実施、または計画実験法 (DOE) を用いる。

56

57

### ペプチドマップ法の実験的側面

58 ペプチドマップ法は一般的方法というわけではなく、それぞれの個々のタ  
59 ンパク質に対して特異的なマップを開発することが含まれる。技術は急速に発展  
60 しているけれども、十分に確立された方法がある。これらの方法の違いは、適切  
61 に、各条にて示される。

62

### ペプチドマップ法のためのコンピューターツール

63 ペプチドマップの実験計画の設計を支援する様々なコンピューターツール  
64 がある。*In silico* ペプチドマップ法にこれらのコンピューターツールを使用する  
65 には、まず検体タンパク質のアミノ酸配列から始め、ペプチドマップの生成に用  
66 いる切断試薬を選択する。次に、可能性のあるペプチドのリストが、選択した切  
67 断試薬に対して作成される。使用したコンピューターツールの精巧さに応じて、  
68 可能性のあるペプチドのリストには、MS 分析に対する分子質量及び電荷状態と  
69 質量、疎水性の計算値、クロマトグラフ分析に対する保持係数の計算値など、そ  
70 れぞれのペプチドに関する特性が含まれる。

71 様々な切断試薬に対して可能性のあるペプチドリストを検討することによ  
72 り、どの切断試薬 (または、切断試薬の組み合わせ) がペプチドマップ法の目的  
73 に最も適しているのかを決定することができる。ペプチドマップのためのコンピ  
74 ューターツールは、しばしば、インターネット上で見つけられるタンパク質配列  
75 データベースの構成要素として、または、LC-MS 装置の製造メーカーにより作  
76 られるタンパク質/ペプチドデータ解析ソフトウェアの一部として含まれている。

77

78

## 試料の前処理

79 分析を妨害する添加剤やキャリアタンパク質を含む原薬、製剤または参照  
80 物質の分析には、単離及び精製が必要である。その手順及びその手順に対するそ  
81 れぞれのシステム適合性の要件は、個々の各条に規定される。

82 カオトロピック試薬（例として、グアニジウム塩酸塩、尿素）や界面活性  
83 剤（例として、SDS）は、消化の前に、タンパク質をアンフォールドするた  
84 めに用いられる。多くの場合、酵素が切断部位に十分に作用するように、消化の前  
85 に、ジスルフィド結合の還元アルキル化が必要となる。しかし、システイン残基  
86 間の結合情報はその際に失われてしまう。ジスルフィド結合の還元のための一般  
87 的な試薬には、ジチオスレイトール及びトリス（2-カルボキシエチル）フォス  
88 フィンなどのようなトリアルキルフォスフィン化合物がある。還元したシステイ  
89 ン残基をアルキル化する試薬には、ヨードアセトアミド、ヨード酢酸及び 4-ビ  
90 ニルピリジンがある。

91

92

## 消化

### ペプチド結合の選択的切断

94 ペプチド結合の切断に利用するアプローチの選択は、タンパク質に依存す  
95 る。この選択の過程には、用いる切断の種類—酵素的手法か化学的手法—と、選  
96 択した分類中の切断剤の種類が決まることが含まれる。いくつかの切断剤とその特異性  
97 を表 1 に示す。このリストは、全てを包括したものではない。ほんの少数の方法  
98 が広く利用されている一方で、他の方法または方法の組み合わせを用いること  
99 は、特別な理由がある。

100

101

表 1. 切断試薬の例

種類	試薬	特異性
酵素的 手法	トリプシン、EC 3.4.21.4	Arg 及び Lys 残基の C-末端側
	キモトリプシン、EC 3.4.21.1	疎水性残基（例として、Leu, Met, Ala, 芳香族残基）の C-末端側
	ペプシン A (ペプシン)、EC 3.4.23.1	特異性の低い消化
	リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C エンドペプチダーゼ)、EC 3.4.21.50	Lys 残基の C-末端側
	グルタミルエンドペプチダーゼ (Glu-C エンドプロテアーゼ ; V8 プロテアーゼ) ; ( <i>S. aureus</i> V8 株由来)、EC 3.4.21.19	Glu 及び Asp 残基の C-末端側
	ペプチジル-Asp メタロエンドペプチダーゼ (Asp-N エンドプロテアーゼ)、EC 3.4.24.33	Asp 残基の N-末端側
	クロストリパイン (Arg-C エンドペプチダーゼ)、EC 3.4.22.8	Arg 残基の C-末端側
化学的 手法	臭化シアン	Met 残基の C-末端側
	2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸	Cys 残基の N-末端側
	O-ヨードソ安息香酸	Trp 及び Tyr 残基の C-末端側
	希酸	Asp 及び Pro 残基
	3-ブロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルチオ-3H-インドール (BNPS-スカトール)	Trp 残基

103

104 **適切な消化条件の確立**

105           タンパク質の消化の効率及び再現性に影響を与える因子は、化学的及び酵  
106 素的反応に共通している：pH、温度、時間、基質／反応物質に対する消化酵素  
107 ／試薬の選択と比率。

108           **pH**－ 消化混合物の pH は、一般に分析されるタンパク質ではなく酵素ま  
109 たは試薬により決まる。例えば、臭化シアンを切断試薬として用いるときは、高  
110 い酸性環境（例えば、pH 2、ギ酸）が必要である。しかし、トリプシンを切断  
111 試薬として用いるときは、弱アルカリ環境（H 8）が最適である。

112           **温度**－ 最適な温度は、切断試薬に依存する。例えば、ほとんどの酵素は  
113 25℃から 37℃の範囲に最大活性を有する。温度は、ある程度酵素の特異性を規  
114 定することもある。その様な場合には、あるタンパク質の消化条件を最適化する  
115 ために、温度の微調整が利用できる場合がある。理想的には、消化温度は試料と  
116 関連した化学的副反応及びタンパク質凝集を最小化し、一方、消化試薬の活性を  
117 維持したまま、検体タンパク質の消化されやすさを最大化するのが望ましい。

118           **時間**－ 消化物の変動が生じないように、目的の用途に応じて消化が十分  
119 であることを保証する必要がある。簡単なタイムコース研究は、消化が十分であ  
120 ることを保証する効率的な手段である。消化時間を分から日の範囲まで変化させ、  
121 単一反応の一部分をとって安定化させて、タンパク質の完全な消化に必要な時間  
122 を決めるための分析を行う。

123           **切断試薬の量**－ 望ましいレベルの消化が実用的な時間（つまり、2 から  
124 20 時間）で達せられるように、十分な切断試薬を使用すべきであり、一方、切  
125 断試薬の量はペプチドマップに寄与しないように最小限にする。酵素消化におい  
126 ては、20 : 1 から 200 : 1 のタンパク質とプロテアーゼの量比が、一般に用いら  
127 れる。切断試薬が不安定な場合、切断試薬を 2 回以上に分割して加えることによ  
128 り、結果が改善する可能性がある。別の方法として、固相に結合した酵素を使用

129 すると、相対的に多量のプロテアーゼの使用が可能となり、その一方で酵素の自  
130 己消化による汚染を回避できる。いずれにしても、ペプチドマップ法の次のステ  
131 ップ-分離ステップ-が容易となるように、最終反応容量が少量となるようにす  
132 べきである。化学的切断試薬は、通常過剰量で用いられ、消化終了時に取り除か  
133 れる必要がある。

134 **他のパラメーター** 検体タンパク質の濃度は、実験的に決定されるべきで  
135 ある。検体タンパク質濃度はその後の分離ステップと両立できるべきである。濃  
136 度はタンパク質または部分的に消化されたタンパク質の凝集を最小限となるよう  
137 に低くすべきである。緩衝液の pH、組成及びイオン強度は、切断試薬、タンパ  
138 ク質及びその後の分離方法に応じて異なるだろう。

139 消化により、非特異的切断、脱アミド化、ジスルフィド結合の異性化、メ  
140 チオニン残基の酸化またはペプチドの N-末端のグルタミンの脱アミド化から生  
141 じたピログルタミン基の形成などのような副反応の結果として、ペプチドマップ  
142 が不明瞭になることがある。これらの分解機構は、ペプチドマップ法の手順のコ  
143 ンピューターによるモデル化の間に考慮すべきである。さらに、自己消化は、タ  
144 ンパク質切断酵素が自分自身を消化することにより余分なピークを生じさせる。  
145 この自己消化ペプチドピークの強度は、基質に対する酵素の比及び使用した酵素  
146 の修飾や品質に依存する。自己消化を避けるため、タンパク質切断酵素溶液は、  
147 酵素活性を抑制する pH で調製するか、使用直前に調製すべきである。自己消化  
148 を防ぐような修飾酵素を用いてもよい。例えば、市販のトリプシン調製品（しば  
149 しばプロテオミクスグレードと呼ばれる）を利用することができる。これらは、  
150 自己消化部位数を減らすために、酵素のリシン残基がメチル化またはアセチル化  
151 されている。消化のアーティファクトを同定するために、検体タンパク質以外の  
152 全ての試薬を含む消化対照を用いてブランク試験が実施される。

153 **分離**

154

155           ペプチド混合物の分離は、その複雑さを解決して、データを適切に解釈し  
156 たときに、それが有意義で再現性があるようにしなければならない。いくつかの  
157 方法及び変法が公表されており、多くは定期的に用いられている。全ての方法は、  
158 一般に、よく分離されたペプチドマップを得るという共通の目的を有している。

159           いくつかのパラメータは、有用で頑健性のあるペプチドマップの方法開発  
160 時に考慮すべきである。ペプチドマップの複雑さが、究極的に、条件、カラム及  
161 び移動相の最適な組み合わせを決めるだろう。最高の品質の再現性のあるクロマ  
162 トグラムを得るために、方法最適化実験が必要であろう。基質タンパク質の分子  
163 量もまた、マップの複雑さや適切な分離に影響を与えるだろう。

164

## 165   **クロマトグラフ分離**

166           遺伝子組換えタンパク質の酵素的または化学的消化により生じたペプチド  
167 混合物のクロマトグラフ分析は、一次アミノ酸配列の確認、タンパク質の配列中  
168 の翻訳後修飾、及びジスルフィド結合（還元下と非還元下で調製した試料を比較  
169 することにより）の位置の確認に使われる。多くの技術（例えば、イオン交換、  
170 疎水性、及びキャピラリー電気泳動）がペプチドの分離に使われてきている。し  
171 かし、RPLC は群を抜いて最も一般的に用いられる方法である。この方法は、一  
172 般に高圧液体クロマトグラフシステムにて用いられる。この節では、最も一般的  
173 なペプチド混合物のクロマトグラフ分離法として、広く用いられている RPLC 法  
174 について記述する。

175           **クロマトグラフ用カラム** – クロマトグラフ用カラムの選択は、それぞれ  
176 のタンパク質に対して実験的に決定される。シリカ、ポリマー、もしくはシリカ  
177 とポリマーのハイブリッド基材に、異なったサイズの細孔（80-1000 Å）を持  
178 つ、または細孔を持たないカラムが、適切な分離を与えることが示されている。  
179 カラム粒子径はペプチドの分離に影響を与える。例えば、粒子径 2 μm 以下のカ  
180 ラムが利用可能であり、一般に 3-5 μm の粒子径のものよりも分離効率がよい。  
181 通常、オクチル基やオクタデシル基が結合した固相がペプチドには理想的である。



182 300 Å かそれより小さな細孔を持つオクタデシルシラン (C18) は最も一般的に  
183 用いられている結合相である。

184 **移動相** – ペプチドの LC 分離に最も一般的に用いられている移動相は、有  
185 機溶媒としてアセトニトリルを用いた水である。しかし、メタノール、イソプロ  
186 ピルアルコール、または *n*-プロピルアルコールなどの他の有機溶媒も利用され  
187 る。プロピルアルコールなどのような溶媒は、多くの非常に疎水性の高いペプチ  
188 ドを含む試料に対して有用である一方、親水性のあるペプチドまたは小さなペプ  
189 チドはカラムのボイドピークに溶出するかもしれない。

190 酸/塩基、緩衝塩及びイオンペア試薬などのような移動相添加剤は、一般  
191 にペプチドの高品質なクロマトグラフ分離に必要である。最も一般的に用いられ  
192 ている移動相添加剤は、トリフルオロ酢酸 (TFA) であり、一般的に 0.05%か  
193 ら 0.2%の濃度で用いられている。揮発性酸や塩は、MS との親和性を改善する  
194 ために用いられる。主に MS が一般的な検出法となってきたことから、リン  
195 酸などの他の添加剤は、あまり一般的ではないが、UV 検出を用いる LC でペプ  
196 チドを分離するときは有用である。TFA は、ペプチド分離の品質に有意に良好  
197 な効果をもたらす一方、MS の感度は、イオン化抑制により TFA の影響を受け  
198 る。ギ酸、酢酸、または TFA とこれらの組み合わせにより、イオン化抑制が減  
199 弱され、MS の感度が上がる。さらに、揮発性のアンモニアを含むいくつかの緩  
200 衝液は、UV や MS 検出と親和性がある。基本的に、これらの緩衝液を用いるこ  
201 とにより、カラムを劣化させたり、UV や MS 検出を低下させたりすることなく、  
202 広い範囲の pH を選択して分離を最適化することができる。

203 **グラジエントの選択**– 移動相のグラジエントには、リニアグラジエントま  
204 たはステップグラジエントを含む非リニアグラジエントがある。非常に複雑なペ  
205 プチド混合物の分離には、なだらかなグラジエントが有効であろう。試験の品質  
206 をモニターするためのマーカーとなる 1 個または 2 個のピークが明確に分離する  
207 よう、グラジエントについては最適化する。イソクラティック法 (単一の移動相)

208 は、ペプチド混合物では限られた分離能しか得られないことから、ペプチドマッ  
209 プでの利用は通常避ける。

210 **他のパラメータ-** カラムの温度コントロールは、良好な再現性を得るため  
211 に必須である。また、一般的に逆相カラムにおいて温度を上げると分離能も上が  
212 るため、温度は、ペプチドの分離の最適化や、いくつかのペプチドの保持/溶出  
213 の改善に用いられる。移動相の流速は、用いるカラムの内径に基づく。細孔サイ  
214 ズや様式などのカラムケミストリー並びに粒子径もまた、適切な流速に影響を与  
215 える。

216

217

### 検出

218 検出法として、MSのみではなく、紫外（UV）吸収などの光度検出や蒸  
219 発光散乱検出も利用可能である。検出法の選択は、ペプチドマップの分析上の必  
220 要性に依存する。

221 紫外吸収は、簡単で有用である。LC/UVを組み入れた方法は、バリデー  
222 ト可能であり、再現性が高い。この方法の限界は、UV吸収はペプチドの構造情  
223 報を与えないことである。このことは、ペプチドが共溶出するとき、または不明  
224 なピークが現れたとき、特に複雑な状況となる。

225 LCからの溶出液を直接MSシステムに導入できるので、MSは有用な方  
226 法となっている。MSと適合する移動相を用いることにより、直接質量情報を特  
227 異的に溶出するペプチド及び共溶出するペプチドに関連づけることができる。  
228 MSを用いることにより、LCから溶出するピークに対して質量の帰属が可能と  
229 なる。

230

231

### データの比較

232 バイオテクノロジー由来の被検物質が予期した構造を有するタンパク質製  
233 品であるかを判断するために、被検物質のペプチドマップは、予期したタンパク  
234 質製品の参照標準のペプチドマップと比較される（図2参照）。簡単に言う

235 と、両方のペプチドマップ「フィンガープリント」が一致したならば、被検物質  
236 は参照標準と同一のタンパク質であると十分に確認されたといえる。UV 吸収の  
237 軌跡を比較するための基準には、検出したピーク数、その相対保持時間、ピーク  
238 レスpons及び全体的な溶出プロファイルなどが挙げられる。ソフトウェアによ  
239 りピーク位置を揃え、定量的な比較を行うソフトウェアによるアプローチも利用  
240 可能であるが、視覚的な比較で十分であろう。日常分析において分離方法と質量  
241 分析計を組み合わせることにより、検体と参照試料の同等性について付加的な情  
242 報が得られる。この質量情報については、タンパク質消化物から予測されるペプ  
243 チドの質量に対応させることができ、ペプチドの修飾、欠失、切断ミス、不純物  
244 及び単一ピーク中の分離されなかった共溶出物に関する知見を与える。

245

246

## ペプチドの分析と同定

247

248 この節では、規制当局への申請を支援する目的で、医薬品開発中における  
249 ペプチドマップ法の使用に関するガイダンスを示す。

250 ペプチドマップ法において、タンパク質の酵素的または化学的切断により  
251 生じたペプチドの分析と同定が必要である。目標は、タンパク質の一次構造の少  
252 なくとも 95%について評価できるバリデートされた方法を与えることである。  
253 ペプチドの分析は、クロマトグラフシステムを直接適切な質量分析計に接続する  
254 ことにより、ペプチドをクロマトグラフ分離しながら on-line で直接行うか、も  
255 しくは、フラクションを off-line にて採取し、それぞれペプチドの特性解析を行  
256 う。

257 Off-line 法において、UV 吸収が高速液体クロマトグラフ分離で溶出する  
258 ピークの有無をモニターするために用いられる。それぞれの分画中のペプチドは、  
259 アミノ酸分析、エドマン分解によるアミノ酸配列分析、または MS により同定さ  
260 れる。これらの同定方法を用いる際に、同定に十分な試料を得るために試料量を  
261 スケールアップする必要があるかもしれない。スケールアップによりペプチドの

262 分離が低下しないよう、クロマトグラフシステムを最適化すべきである。エドマ  
263 ン分解では、タンパク質の N-末端のブロックにより分析が妨害されることがあ  
264 る。これを打開するために、ブロックされたペプチドを、MS や C-末端配列分析  
265 (しかし、C-末端配列分析はあまり利用されていない) により、または、N-末  
266 端をブロックしているのがピログルタミン酸である場合は、ピログルタミン酸ア  
267 ミノペプチダーゼを用いて末端のピログルタミン酸を取り除いて、分析する。

268 ペプチドマップ中のペプチドを同定するために、生の MS データは、MS  
269 を用いて得られた  $m/z$  の実験値と、対象のタンパク質から期待されるペプチド  
270 の  $m/z$  の予測値及び MS/MS 断片化パターンを比較するソフトウェアを用いて  
271 解析される。さらに、MS/MS 分析は配列情報を与える。

272 未知のペプチドに対しては、実験データは、検索エンジンを用いてデータ  
273 ベースと比較する。酵素の制約は、対象のタンパク質からペプチドを生成するた  
274 めに用いたタンパク質切断酵素を表し、データ解析に含められるべきである。別  
275 の方法として、実験で得たタンデム MS スペクトルを、データベースと検索エン  
276 ジンを用いて、これらのデータを比較する。ペプチドの  $m/z$  の実験値と予測値  
277 を比較するのと同様に、可能性のある翻訳後修飾の質量に対する動的な修飾を、  
278 データ解析に組み入れることができる。用いる検索エンジンに依存して、各々の  
279 測定したペプチドの同定の確からしさを示すスコアの閾値を確立しておくべきで  
280 ある。酵素の制約は、また、対象のタンパク質をペプチドへ切断するために用い  
281 た酵素の既知のタンパク質切断の規則性に対応するので、データベース解析の中  
282 で示されるべきである。

283

### 284 確認試験としてのペプチドマップの適用

285

286 ペプチドマップ法は、しばしば一般的な方法論として概説されるが、個々  
287 の特異的なタンパク質に対して、特異的なマップを開発することが含まれる。反  
288 対に、同様のペプチドマップ法の手順を異なったタンパク質に適用した場合、生

289 成する一連のペプチドは、明らかに異なるだろう。ペプチドマップは、そのタン  
290 パク質のフィンガープリントと見なせるかもしれない。それで、ペプチドマップ  
291 法はタンパク質の同定に用いることができる。

292 確認試験としての使用は、ペプチドマップ法は、選択的切断により生じる  
293 一連のペプチドは、目的のタンパク質のアミノ酸配列と切断に用いた試薬の特異  
294 性により決定されるという事実依存している。

## バリデーション

295  
296  
297 ペプチドマップ法において、対象とする分析の用途には、アミノ酸配列、  
298 翻訳後修飾及び目的物質関連物質及び目的物質関連不純物の評価が含まれる。同  
299 一性の確認、アミノ酸配列及び翻訳後修飾の評価の目的に用いられる場合には、  
300 手順は確認試験と見なすことができ、データは試験の特異性を支持することが求  
301 められる。しかし、手順の複雑さにより、有意義なシステム適合性の判定基準を  
302 開発するためには、さらなるバリデーションのデータ、精度及び頑健性の特性評  
303 価について考慮しなければならない。ピークの同定及びピークの純度（つまり、  
304 共溶出するペプチド）についても考慮すべきである。

305

## 特異性

306  
307 ペプチドマップの特異性は、適切な参照物質と構造的に類似したタンパク  
308 質試料のペプチドマップを比較することにより確立される。試験に内在する変動  
309 を最小化するために、手順は参照物質と試料について同時に実施し、変更前と変  
310 更後の被検物質から得られた消化物の1:1 (v/v) 混合物及び製品の参照標準を  
311 併行してクロマトグラフ分離を用いて分析する。構造的に類似したタンパク質に  
312 は、参照物質の化学修飾により生成したものや、天然変異や部位特異的な突然変  
313 異により一次構造が異なるものなどが含まれる。参照物質の化学修飾体は、一次  
314 構造の変化を引き起こすことが知られている pH 条件、温度、または化学試薬へ

315 の暴露により作成することができる。これらの変化は、一般的に、アスパラギン  
316 及びグルタミン残基の脱アミド化、メチオニン、ヒスチジンまたはトリプトファ  
317 ン残基の酸化、及びペプチド結合の酸加水分解が含まれる。構造的に類似したタ  
318 ンパク質と参照物質のペプチドマップは、予め決めておいた判定基準を基に比較  
319 される。もし、ペプチドマップが適切に設計されていれば、単一アミノ酸の置換  
320 やアミノ酸側鎖の修飾は容易に検出されるだろう。

321 保持時間、ピークレスポンス（ピーク面積またはピーク高さ）、ピークの  
322 数及び全体的な溶出パターンの視覚的比較は、まず始めに行う。そして、ピーク  
323 レスポンス比の数理的な解析、並びに試料及び参照物質の消化物の 1 : 1 混合物  
324 のクロマトグラムの形状により、補完され、支持される。試料消化物と参照物質  
325 消化物の全てのピークが、同じ保持時間及びピークレスポンス比を示すことによ  
326 り、検体試料の同一性が確認される。

327 もし、始めに有意に異なる相対保持時間で溶出した溶出したピークが、  
328 1 : 1 混合物で単一ピークとして観測されたならば、始めの違いはシステムのば  
329 らつきを示しているのだろう。しかし、もし別々のピークが 1 : 1 混合物で観測  
330 されたならば、これは、それぞれのピーク中のペプチドは同等ではないという証  
331 拠となるだろう。1 : 1 混合物中のピークが、試料及び参照物質消化物の対応す  
332 るピークと比較して有意に広がっているならば、それは異なったペプチドが存在  
333 していることを示しているかもしれない。ペプチドマップのデータ解析のための  
334 コンピューター支援パターン認識ソフトウェアの使用が提案され、適用されてい  
335 るが、コンピューターソフトウェアのバリデーションに関する議論では、現在の  
336 ところ、公定試験での使用を除外している。数理的な式、モデル及びパターン認  
337 識を用いた他の自動化アプローチが利用されている。その様なアプローチ、例え  
338 ば、IR 分光法による自動化された化合物の同定、及びペプチドの同定に対する  
339 ダイオードアレイ UV スペクトル分析の適用が提案されている。これらの方法  
340 は、分離能が不十分、断片化物の共溶出、または、参照物質と試料分解物の絶対  
341 的なピークレスポンスの差により、制約がある。

342 保持時間とピーク面積またはピーク高さの数値比較は、ペプチドマップに  
343 おいて正しく同定された適切なピーク群に対して行う。ピーク面積については、  
344 相対的に小さな変動を示すピークの一つを内標準として用いて計算してよい。ピ  
345 ーク面積の積分はベースラインの変動に影響を受けやすく、解析に誤差をもたら  
346 す可能性があることに留意する。その他の方法として、全てのピーク高さの合計  
347 に対するそれぞれのペプチドピークの高さの百分率を検体試料に対して計算して  
348 もよい。それから百分率を参照物質が対応するピークと比較する。トリプシンの  
349 自己消化の可能性については、ブランクペプチドマップ、つまり、ブランク溶液  
350 をタンパク質の加水分解に使用したのと同じ酵素で処理して得られたペプチド  
351 マップを作成することによりモニターする。

352

353

### 精度

354 ペプチドマップ法の操作の精度の決定を容易にするため、ピークレスポン  
355 ス（ピーク面積、または高さ）及びピークの保持係数を定量化する実験的方法を  
356 開発すべきである。一つのアプローチは、ピークレスポンスとピーク保持時間を、  
357 同一のクロマトグラム中の再現性の高い参照ピークに対して相対的に表して比較  
358 する。内標準ピークの特徴は、下記に記す(システム適合性、タンパク質消化を  
359 参照)。相対ピークレスポンスは、それで、内標準ピークに対するピークレスポ  
360 ンスの比として現される。保持係数はボイド容量ピークに対する相対的なピーク  
361 の保持時間として表される。相対的な比較方法を用いることにより、消化及びク  
362 ロマトグラフのパラメータのわずかな変動に対して、個別に修正する必要性がな  
363 くなる。

364

365

### 頑健性

366

367 ペプチドマップ法において、試験パラメータには、ペプチドの断片化（つ  
368 まり、消化）とペプチドの分離の両方の部分に影響を及ぼすものが含まれる。分

369 析手順中のこれらの二つの重要なステップと関連する試験パラメータは、別々に  
370 考慮される。

371 移動相の組成、プロテアーゼの品質または化学試薬の純度、カラムの変動  
372 及び劣化、消化物の安定性などのような要因は、試験の総合的な能力やその再現  
373 性に影響を与える。それぞれの主要パラメータの許容範囲を評価し、ルーチンの  
374 ロットリリースの目的で試験が用いられる場合の基準値を規定する。

375

### 376 **タンパク質消化**

377 多くのタンパク質断片化の方策は、タンパク質切断酵素を利用している。  
378 結果として、ペプチドマップ法の手順中の消化の部分は、内在的に試験パラメー  
379 タのわずかな変動の影響を受けやすい。これらのパラメータには、消化 pH、緩  
380 衝液、緩衝液の濃度、イオン強度、消化温度、消化速度論、被検物質濃度、プロ  
381 テアーゼの量、プロテアーゼの品質、及び消化物の安定性が含まれる。計画実験  
382 法 (DOE) アプローチを用いて、これらのパラメータを系統的に検討し、試験  
383 のばらつきに与える影響を理解する。ペプチドマップの手順のうち、小さな変動  
384 が精度に影響を与えることが示された消化パラメータは、試験の手順において、  
385 これらの検討により確立及びバリデートされた操作範囲を用いて、注意深く制御  
386 されるべきである。

387 **プロテアーゼの品質または化学試薬の純度** – 被検タンパク質に対する参  
388 照標準または参照物質試料を準備し、異なったロットの切断試薬を用いて消化す  
389 る。それぞれの消化物のクロマトグラムを、ピーク面積、形状及び数の観点から  
390 比較する。同じ手順が、他の重要な化学薬品や試料調製中に用いられる前処理手  
391 順、例えば、還元及び S-カルボキシメチル化試薬などに適用できる。

392 **消化物の安定性** – 消化物をクロマトグラフ法により分離するまで、消化  
393 物を保存しておく条件及び安定に保管できる時間の長さを評価する。単一の消化  
394 物から一定分量ずつを異なった保存条件で保存し、クロマトグラフ法により分離  
395 する。これらのマップは、次に有意な差があるかについて評価する。



396

397 **ペプチドの分離**

398           ペプチドマップ法の手順中のペプチドの分離においては、一般に標準的な  
399 クロマトグラフの分離モードを用いる。この点において最も重要なものは逆相  
400 HPLC である。この節では、ペプチドマップの手順において問題となる傾向があ  
401 るクロマトグラフのパラメータに関する議論に焦点を合わせる。

402           **カラムの考察-** カラム間のばらつきは、単一ロット内でも、ペプチドマッ  
403 プ法の手順の性能に影響を与えうる。試験下のタンパク質の参照物質を消化し、  
404 消化物を単一の製造メーカーの異なるバッチのカラムを用いて分離する。それか  
405 らマップは、全体的な分離の形状、保持時間、分離能について、予め決めておい  
406 た判定基準に従って評価される。

407           頑健性の観点から、総合的なカラム寿命を評価するために、ペプチドマッ  
408 プ試験を異なったカラムで実施し、注入回数を有意に変える（例えば、10 から  
409 250）。結果として得られたマップは、ピークの広がりや全体的な分離に有意な  
410 差がないかどうか比較する。カラムが劣化するに従い、ペプチドマップに影響を  
411 及ぼしうる背圧の増加が観測されるかもしれない。

412           ペプチドマップ用カラムの使用における賢明な注意事項は、元々のカラム  
413 が利用できない、または、製造中止となった場合に、別のカラムを選択するとい  
414 うことである。分析者は異なった製造メーカーの同等のカラムを用いてペプチド  
415 マップ試験を実施し、マップを入念に調べるべきである。粒子の形状、サイズ、  
416 細孔のサイズ及びベッドボリューム、炭素含有率及びエンドキャップの違いは、  
417 保持時間や分離能の有意な違いの原因となる。異なった製造メーカーからのカラ  
418 ムを用いるとき、グラジエント形状の変更がマップの同等性を達するために必要  
419 となるかもしれない。

420           **温度-** ペプチドマップのクロマトグラフの分離能は、室温のわずかな変動  
421 に対して影響を受けやすく、 $> 45^{\circ}\text{C}$ の温度では分離が改善される。分離の温度  
422 依存性は、許容できる温度範囲を定めるために系統的に検討されるべきである。

423 カラムは、温度制御された環境に保っておかれるべきであり、45℃よりも上が  
424 望ましい。

425 **移動相-** 一般的にペプチドの分離に用いられる移動相の組成は、クロマト  
426 グラフの基剤の分解を促進する。水性移動相の酸性（例えば、0.1% TFA）は、  
427 シリカ系カラムでエンドキャップが加水分解により除去され、分離が低下するこ  
428 とが示されている。この現象の影響は、カラム寿命の研究から得られるデータか  
429 ら最も明らかである。

430

431

### システム適合性

432

433 ペプチドマップのバリデーションに用いた装置とルーチンの品質管理試験  
434 で用いられる装置間の同等性について考慮すべきである。システム適合性試験は、  
435 クロマトグラフシステムの分離能及び再現性が行われる分析に対して適切である  
436 ことを確認するために用いられる。これらの試験は、装置、電子機器、分析操作、  
437 及び分析対象試料は、システム全体を構成しているという概念に基づいており、  
438 システム全体として評価される。この定義をペプチドマップ法の手順に適用する  
439 と、通常クロマトグラフ分離に適用されるもの以外に、試験のタンパク質消化の  
440 部分が適切に行われたことを保証するため、さらなる試験を開発することが要求  
441 される。

442

### タンパク質消化

444 ペプチドマップ法の手順のうち、タンパク質消化が適切に実施されたことを  
445 保証する適切なシステム適合性試験を開発する一つのアプローチは、参照物質の  
446 ペプチドマップ中の再現性の高いピークを特定することである。再現性の高いピ  
447 ークの選択において、次の様な基準が考慮されるべきである。

- 448 • そのペプチドは消化パラメータに対して頑健であることが示された消化物  
449 である

- 450       • そのピークはクロマトグラフにより良く分離されている
- 451       • そのピークは良好なシグナル／ノイズ比を示す
- 452       • そのペプチドは、不安定な側鎖をもつアミノ酸残基を含まない
- 453       • そのペプチドは、翻訳後修飾部位を含まない
- 454       • ピーク信号は、他の実験上のアーティファクトの影響を受けない

455       特定においては、タンパク質消化が適切に行われたことを保証するために、  
456 参照ペプチドマップにおける再現性の高いピークの回収に対して適切な操作範囲  
457 を開発する。

458

#### 459 **ペプチドの分離**

460       標準溶液の繰り返し注入の精度、適切なピークの分離及びピークのテーリ  
461 ングに対する要求が含まれているべきである。ペプチドマップの分離の複雑さを  
462 考慮すると、システム適合性の要求を満たすためにクロマトグラフの操作条件へ  
463 の許容可能な変更は、実施前に検証しておかなければならない。参照物質の消化  
464 物は、分析中のクロマトグラフのドリフトを評価するために、検体試料の間に定  
465 期的に組み入れることが推奨される。

466

#### 467 **バリデーション研究**

468

469       ペプチドマッピングのバリデーションでは、実施手順を策定し、詳細に実  
470 施する実験及び所定のペプチドマップに対する判定基準を示す必要がある。バリ  
471 デーションの基準には、頑健性、検出限界、特異性、直線性、範囲、真度、精  
472 度、回収率及び試薬の安定性が含まれる。判定基準は、データの解釈及び判定に  
473 影響を与える重大なテストパラメーターの特定に依存する。

474       判定基準の設定は、タンパク質の一次配列の大部分を構成する適切なピー  
475 クに対して、定量（ピーク面積または高さ）と同定（保持係数）の観点からの実

476 験的な観察に基づいて行われる。適切な判定基準の例としては、二つの近接する  
477 ピークの分離度が $> 2$ である。回収率の不安定なピークに対して、安定した回収  
478 率を示すピークに対する相対ピーク面積の下限を設定する。参照と検体の混合物  
479 において、新しいピークが認められない。

図1. ペプチドマップ 方法開発と評価

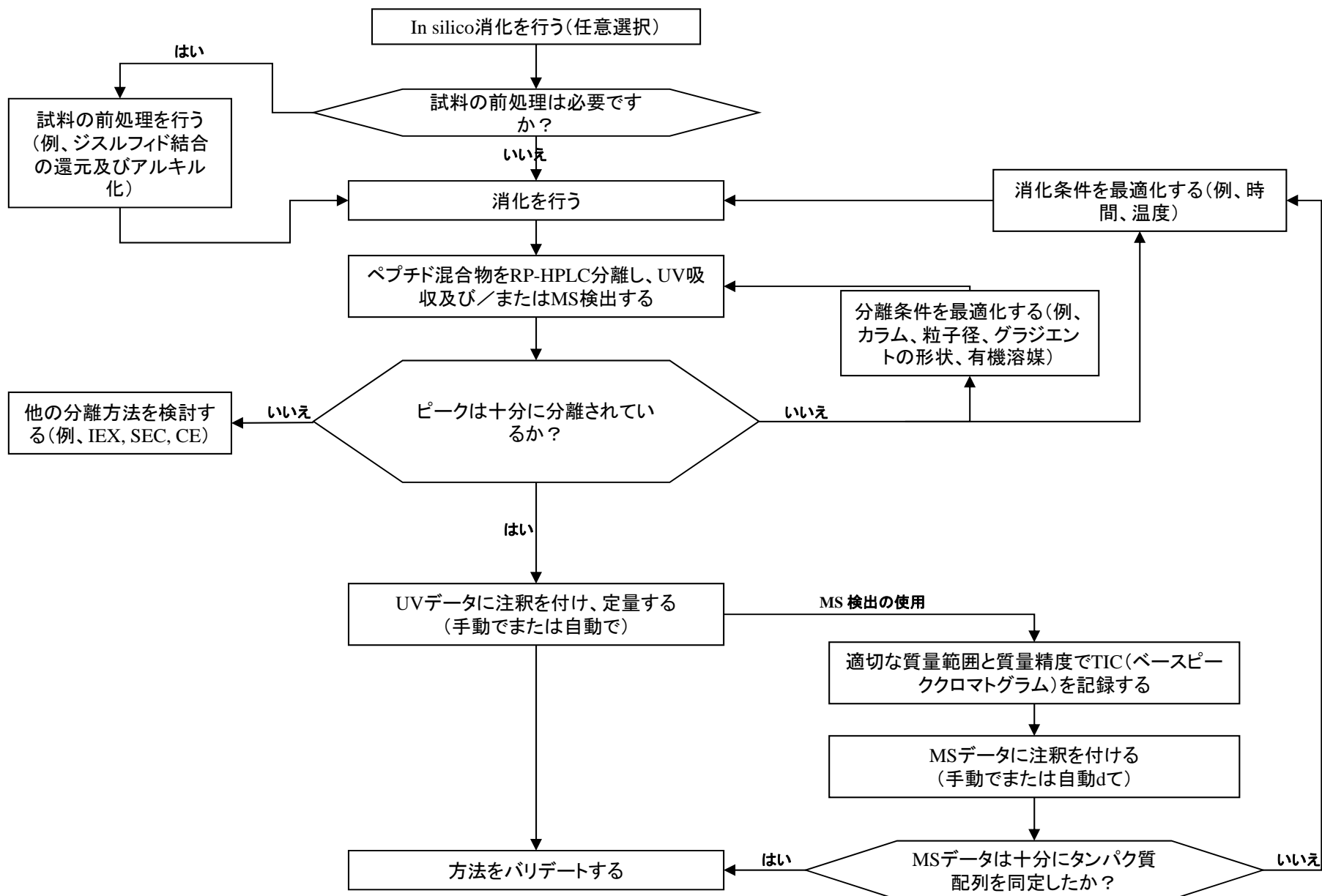


図2. 同一性の確認へのペプチドマップ法の適用

