

201324/97A

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))

難治性潰瘍性大腸炎を対象とした医師主導  
治験のためのアドレノメデュリン製剤の作成

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 北村和雄

平成 26 (2014) 年 8 月

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))

難治性潰瘍性大腸炎を対象とした医師主導  
治験のためのアドレノメデュリン製剤の作成

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 北村和雄

平成 26 (2014) 年 8 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

難治性潰瘍性大腸炎を対象とした医師主導治験のためのアドレノメデュリン製剤の作成 北村 和雄 -----	1
--	---

## II. 資料

1. (資料1)原薬のロット間の同等性と非臨床試験について -----	9
2. (資料2)仕様書・納品書・試験結果報告書・写真 -----	37
3. (資料3)アドレノメデュリンの Phase1 試験について -----	51
4. (資料4)説明文書・同意文書 -----	81

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	93
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	95 ~
-----------------------	------

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業  
（難治性疾患実用化研究事業））総括研究報告書

難治性潰瘍性大腸炎を対象とした医師主導治験のための  
アドレノメデュリン製剤の作成

研究代表者 北村 和雄 宮崎大学医学部 教授

研究要旨

アドレノメデュリン（AM）は本研究代表者等が発見した強力な降圧作用を有した循環調節に重要な生理活性ペプチドである（BBRC 192, 553-560, 1993）。興味深いことに、炎症性疾患ではAMの産生が増加し、AMが抗炎症・臓器保護因子として作用していることを見出した。実際、本研究代表者等は炎症性腸疾患のモデルである酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデル動物にAMを投与すると、炎症が抑制され、病態が改善することを明らかにし（Peptides 26, 2610-2615, 2005）、AMの炎症性腸疾患治療薬としての特許を取得した。さらに、平成21～23年度に臨床応用基盤研究事業として、「AMの炎症性腸疾患治療薬としての臨床応用」として、基礎研究と探索的臨床研究を実施した。その結果、ステロイドやLCAPに抵抗性の難治性潰瘍性大腸炎の患者に1.5pmol/kg/min のAMを投与することで、顕著な腸管粘膜再生がみられ、潰瘍が治癒し寛解に導入できた（Inflamm Bowel Dis 19, E26-E27, 2013）。現在までに7例の患者に投与を行い、有効性は80%以上ときわめて良好であり、有害事象は認めなかった。AMの難治性潰瘍性大腸炎患者に対する効果は明白であり、従来の治療薬とは異なる作用機序の薬剤で、既存の薬剤に上乘せして使用することもできる。しかし、2014年にAMの物質特許が切れることや、低分子化合物ではなく52個のアミノ酸からなるペプチドであるため、合成が難しいことなどから、企業の参入は得難い状況である。そこで、次のステップとして医師主導型治験を実施し、できるだけ早期に治療薬としての承認を得たい。本研究では、医師主導型治験のための製剤の確保とプロトコール作成を行う。治験薬の原料となるAM原末をペプチド研究所にてGMPグレードで5g製造した。現在、完成した原末を用いて、GMP基準の施設（富士薬品）にて製剤化を行っている。また、phase Iの臨床治験のプロトコールを作成する。一連の研究には、SMOのノイエス社及びビュービット社が連携企業・研究協力者として参加することで、各種規制に準拠した治験薬製造及び治験計画作成を担保する。

## 【研究分担者】

芦塚 伸也 宮崎大学医学部 助教

北 俊弘 宮崎大学医学部 准教授

稲津 東彦 宮崎大学医学部 講師

一圓 剛 ヒュービットジェノミクス株式会社 代表取締役社長

## 【研究協力者】

寒川賢治 循環器病研究センター 研究所所長

天本 敏昭 ノイエス株式会社 代表取締役社長

### A. 研究目的

本研究代表者等は1993年にヒト褐色細胞腫組織より、アドレノメデュリン (AM) を強力な降圧作用をはじめ多彩な作用を有する生理活性ペプチドとして発見 (BBRC 192, 553-560, 1993) した。AMは循環器疾患治療薬としても有望であり、連携企業のヒュービットジェノミクス株式会社がAMの急性心筋梗塞治療薬としてのGLP準拠の非臨床試験を実施した。

一方、AMは消化管の粘膜や筋層にも認められ、炎症性疾患では血中濃度が増加している。またAM遺伝子は、IL-6やTNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインで誘導され、誘導された

AMはこれらのサイトカインを強力に抑制する。実際、我々は炎症性腸疾患モデルである酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデルラットを用いて、AMの新規かつ特徴的作用である大腸潰瘍治癒促進効果を報告した

(Peptides 26, 2610-2615, 2005) ; 炎症性腸疾患治療薬としての特許成立済)。

以上の研究成果を踏まえて、我々は平成21~23年度に臨床応用基盤研究事業として、基礎研究と探索的臨床研究を実施した。その結果、ステロイドやLCAPに抵抗性の難治性潰瘍性大腸炎の患者にAMを持続投与することで、顕著な粘膜再生がみられ、潰瘍が治癒し寛解に導入できた。現在までに、8例の患者にAM

投与を実施し、有効性は80%以上と  
きわめて良好であり、有害事象は認  
めなかった。

AMの炎症性腸疾患治療薬として  
の有用性を示す動物実験の成果は  
ヨーロッパをはじめ、国内外のいく  
つかのグループからも公表 (Gut,  
55, 824-832, 2006、Int J Colorectal  
Dis 26, 1453-62, 2011) された。し  
かし、潰瘍性大腸炎患者に対するト  
ランスレーショナルリサーチは他  
施設では行われておらず、我々によ  
り臨床研究でのpoof of  
concept(POC)が得られていること  
は大きな強みである。

以上のように、AMの難治性潰瘍  
性大腸炎に対する効果は明白であ  
り、質の高い潰瘍性大腸炎治療を達  
成できる可能性が非常に高い。しか  
し、2014年にAMの物質特許が切れ  
ることなどから、企業の参入は得難  
い状況である。そのため我々は医師  
主導型治験を実施し、早期に治療薬  
としての承認へとつなげたい。その  
ための最初のステップとして、医師  
主導型治験を実施するための製剤  
の確保とプロトコール作成を行う。  
連携企業のヒュービットジェノミ  
クスが実施した急性心筋梗塞治療  
薬としての前臨床試験のかなりの  
データが流用可能であり、不足して

いる前臨床試験だけを実施する計  
画である。そのため、平成26年度末  
までには追加分の前臨床試験を済  
ませ、治験薬確保とプロトコール作  
成が終了し、本研究終了後には医師  
主導治験への移行が可能となる。

## B. 方法 C.結果

医師主導型治験を実施するため  
の製剤の確保とプロトコール作成  
を行う計画であり、現在の進捗状況  
は次の通りである。

### 1. AM原末の作成

ペプチド研究所に委託して、前臨床  
試験を含めて今回のAM製剤化に必  
要なペプチド原末を一括生産 (ペプ  
チドは化学合成) した。平成26年7  
月に完成した

原末を用いて、現在富士薬品で製剤  
化を実施している。アドレノメデュ  
リンの合成法については、添付資料  
1に記載している。また、完成した  
原末の仕様書、納品書、試験検査報  
告書、写真等は資料2として添付し  
ている。

### 2. 非臨床試験

ヒュービット社が実施した非臨床  
試験データの大半が流用可能である。  
本年度はPMDAでの2回の事前面談

と1回の対面助言を行い、**phase1**に入るための非臨床試験等の充足性について助言いただいた。

非臨床試験では、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を使用して実施している。これらの、ロットに加えて、非臨床試験に用いてないペプチド研究社製（ロット番号**531117**）およびアメリカンペプチド（APC）社製（ロット番号**060303**）アドレノメデュリン原薬も用いて、分析結果を検討した。その結果、

（1）全てのロットについて質量分析から得られたメインピークのスペクトルはアドレノメデュリンの構造を支持した。

（2）全てのロットについて、確認試験として実施したアミノ酸分析結果から、アドレノメデュリン由来の17種のアミノ酸のピークを認め、モル比率も理論値と一致した。

（3）全てのロットについて純度試験結果は何れも**95%**以上で、高純度であった。

結果は、各ロット間に有意差はなく同等であった。

さらに、平成**25**年**12**月にペプチド研究所において、同一の分析条件で、

上記5種類のロットに関して、再分析を実施した（添付資料1）。その結果、上記（1）～（3）の結果が再確認できた。また、ペプチド研究所で設定しているアドレノメデュリンの製品規格に、ペプチド研究所製（ロット番号**550237**および**551014**）アドレノメデュリン原薬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のすべてが規格を充たした。

さらに、ペプチド研究所製のアドレノメデュリン原末は**-20℃**に保存の条件では、全てのロットについて**2005**年に分析した結果と有意差がなく、安定性に問題ない事も確認できた。

以上の結果、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の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（**Phase1**）開始時資料として活用できると判断した。

### 3. AM製剤化・製剤の物性・安定性検証

ペプチド研究所製のAM原末を用

いて、GMP基準を満たした富士薬品富山第二工場に委託してAM製剤の作成を行う。今年度は予備的検討をペプチド研のAMペプチドを用いて、行っており、予定通り予備的検討は昨年度末に終了し、原末完成後に来年度に実機での試作と製造を行う予定である。

作成した製剤が一般的な医薬品が満たすべき基準（厚生労働省「新医薬品の規格及び試験方法の設定に関するガイドライン」）を満たしていることを富士薬品で検証する準備をしている。

#### 4. 治験プロトコルの作成

SMOのノイエス株式会社の天本敏昭博士に研究協力者として参加していただき、治験の第一段階である第一相試験のプロトコル作成を行っている。第一相治験のプロトコル案に関しても、PMDAの対面助言で相談した。対面助言を実施した、プロトコル案を資料3、同意説明文書を資料4として添付した。

#### D. 考察

今回の検討で、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。以上の結果は、平成26年3月27日に実施した対面助言でも認められ、その結果、現在までに実施している非臨床試験でphase1に入ることは可能であるとの結論となった。

Phase1試験は単回投与試験と反復投与試験を実施する予定である。

Phase1単回投与試験は、添付資料3に示したように、低用量からの二重盲検での実施を予定しており、pmdaの対面助言で、本プロトコルでほぼ問題ないとの助言をいただいている。

現在の予定では、今年中に製剤が完成し、加速試験の終了を待って、来年度にはphase1に入れることが確実となった。

#### E. 結論

アドレノメデュリン原末の製造と製剤化は順調に進んでおり、phase1を開始するための非臨床試験も充足していることから、本事業はほぼ順調に進展している。



F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ashizuka S, Kita T, Inatsu H, Kitamura K: Adrenomedullin: A novel therapy for intractable ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 19:26-27 (2013)
2. Nagata S, Hatakeyama K, Asami M, Tokashiki M, Hibino H, Nishiuchi Y, Kuwasako K, Kato J, Asada Y, Kitamura K: Big angiotensin-25: A novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 441:757-762 (2013)
3. Ashizuka S, Inatsu H, Inagaki-Ohara K, Kita T, Kitamura K: Adrenomedullin as a potential therapeutic agent for inflammatory bowel disease. *Current Protein and Peptide Science.* 14:246-255 (2013)
4. Kuwasako K, Hay DL, Nagata S, Murakami M, Kitamura K, Kato J: Functions of third

extracellular loop and helix 8 of Family B GPCRs complexed with RAMPs and characteristics of their receptor trafficking. *Curr Protein Pept Sci* 14:416-428 (2013)

5. 北村和雄: アドレノメデュリンの展開研究. *心臓* 45: 1496-1502 (2013)
6. 鶴田敏博、北村和雄: ストローマからみた心血管病. 「ストローマをターゲットとした心血管病の治療」. *循環器内科*74: 125-131 (2013)

2. 学会発表

1. Kato J, Komatsu Y, Kuwasako K, Kitamura K: Effects of chronically infused proangiotensin-12 in conscious rats. 23rd European Meeting on Hypertension & Cardiovascular Protection, 2013-6 (Milano, Italy)
2. 北村和雄: 我が国で発見された循環調節ペプチド"アドレノメデュリン"の研究. 第77回日本循環器学会総会学術集会、2013年3月(横浜)

3. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、加藤丈司：CGRP受容体と2つのアドレノメデュリン（AM）受容体の異なる活性化機構の同定。第86回日本薬理学会年会、2013年3月（福岡）
  4. Nagata S, Hatakeyama K, Asami M, Hibino H, Nishiuchi Y, Kuwasako K, Kato J, Asada Y, Kitamura K: Big angiotensin-25: a novel glycosylated angiotensin-related peptide isolated from human urine. 第36回日本高血圧学会総会、2013年10月（大阪）
  5. 芦塚伸也、仮屋暢人、三宮一朗、原口大、三木吾郎、星子新理、松本英丈、中島孝治、稲津東彦、北村和雄：消P-480潰瘍性大腸炎に対するアドレノメデュリン療法（続報）。第21回日本消化器関連学会週間（JDDW）、2013年10月（品川）
  6. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、野崎尚美、加藤丈司：G蛋白共役型受容体（GPCR）の重要な細胞内シグナル分子、 $\beta$ -アレステチンの新規作用：1型アドレノメデュリン（AM）受容体の細胞内移行の負の制御。第36回日本高血圧学会総会、2013年10月（大阪）
  7. 桑迫健二、北村和雄、永田さやか、加藤丈司：2型アドレノメデュリン（AM）受容体の再感作促進法の確立。第38回日本分子生物学会年会、2013年12月（神戸）
- H. 知的財産権の出願登録状況
1. 出願番号：PCT/JP2013/060103  
出願日：2013/4/2  
発明の名称：動脈硬化の検査方法  
発明者：北村和雄、浅田祐士郎、山下篤、松浦祐之介  
出願人：国立大学法人宮崎大学
  2. 出願番号：PCT/JP2013/080614  
出願日：2013/11/6  
発明の名称：新規ペプチドおよびその用途  
発明者：北村和雄、浅田祐士郎、永田さやか  
出願人：国立大学法人宮崎大学
  3. 出願番号：特願2014-036815  
出願日：2014/2/27  
発明の名称：急性腎障害に起因する多臓器不全の予防又は治療薬

発明者：北村和雄，池田正浩、園  
田紘子，加藤丈司  
出願人：国立大学法人宮崎大学

4. 出願番号：特願2014-058225  
出願日：2014/3/20  
発明の名称：長時間作用型アドレ  
ノメデュリン誘導体  
発明者：北村和雄，加藤丈司，久  
保恵是，桑迫健二，久保茂，熊谷  
久美子  
出願人：国立大学法人宮崎大学

(資料1)

## 原薬のロット間の同等性と非臨床試験について

宮崎大学医学部内科学講座循環体液制御学分野

作成年月日：2013年12月25日

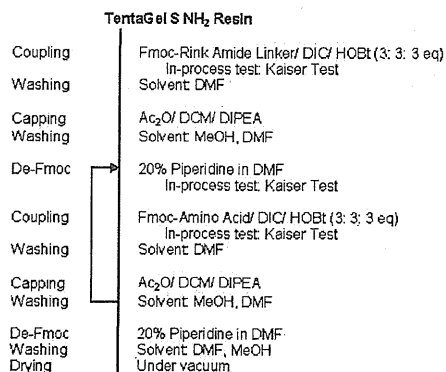
1. アメリカンペプチド(APC)アドレノメデュリンの合成法	-----	3
2. APC アドレノメデュリン lot #51020 分析結果	-----	4
3. APC アドレノメデュリン lot #60303 分析結果	-----	6
4. ペプチド研究所製アドレノメデュリンの合成法	-----	9
5. ペプチド研究所アドレノメデュリンの製品規格・試験方法	-----	10
6. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#550237	-----	13
7. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#551014	-----	15
8. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#580908	-----	
(非臨床試験では使用していない)	-----	17
9. 分析結果のまとめ (項目 2. 3. 6. 7. 8.)	-----	18
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	-----	19
11. 分析結果のまとめ (項目 10.)	-----	27
12. 結論	-----	28

# 1. アメリカンペプチド(APC)アドレノメデュリンの合成法

Adrenomedullin (1-52), human: #22-2-10

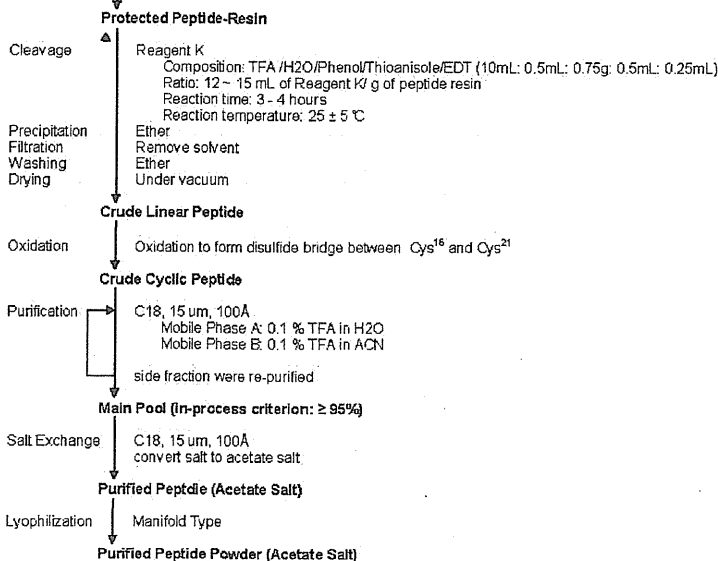
Sequence: Tyr-Arg-Gln-Ser-Met-Asn-Asn-Phe-Gln-Gly-Leu-Arg-Ser-Phe-Gly-Cys-Arg-Phe-Gly-Thr-Cys-Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Asn-Lys-Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH<sub>2</sub> (disulfide bridge Cys<sup>16</sup>).

## Fmoc solid phase synthesis



## Fmoc-Amino Acid used

N-term	AA	PG	C-term
Fmoc-	Ala		-OH
Fmoc-	Arg	(Pbf)	-OH
Fmoc-	Asn	(Trt)	-OH
Fmoc-	Asp	(OtBu)	-OH
Fmoc-	Cys	(Trt)	-OH
Fmoc-	Gln	(Trt)	-OH
Fmoc-	Glu	(OtBu)	-OH
Fmoc-	Gly		-OH
Fmoc-	His	(Trt)	-OH
Fmoc-	Ile		-OH
Fmoc-	Leu		-OH
Fmoc-	Lys	(Boc)	-OH
Fmoc-	Met		-OH
Fmoc-	Phe		-OH
Fmoc-	Pro		-OH
Fmoc-	Ser	(tBu)	-OH
Fmoc-	Thr	(Boc)	-OH
Fmoc-	Trp	(OtBu)	-OH
Fmoc-	Tyr	(tBu)	-OH
Fmoc-	Val		-OH



## 2. APC アドレノメデュリン lot #51020 分析結果



### CERTIFICATE

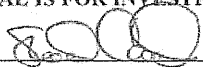
Product No.: 22-2-10      **Adrenomedullin (1-52), human**      M.W 6028.9

H-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<sub>2</sub>  
 (Disulfide bridge Cys16 – Cys21)

Date of Mfg: 12 Dec 05      Lot #: 051020      C<sub>164</sub>H<sub>466</sub>N<sub>10</sub>O<sub>77</sub>S<sub>3</sub>

ATTRIBUTE	CRITERIA	RESULTS
1. Color/Appearance	White to off-white powder	White Powder
2. Purity (%) [HPLC]	≥ 95 %	97.3 %
3. Amino Acid Composition [Hitachi LS 8800]	Ala 1.70 - 2.30 Arg 3.40 - 4.60 Asx 5.10 - 6.90 Cys 1.70 - 2.30 Glx 5.10 - 6.90 Gly 3.40 - 4.60 His 0.85 - 1.15 Ile 1.70 - 2.30 Leu 1.70 - 2.30 Lys 3.40 - 4.60 Met 0.85 - 1.15 Phe 3.40 - 4.60 Pro 1.70 - 2.30 Ser 3.40 - 4.60 Thr 2.55 - 3.45 Tyr 2.55 - 3.45 Val 1.70 - 2.30	Ala 2.06 Arg 4.11 Asx 6.00 Cys 1.75 Glx 5.87 Gly 3.92 His 1.05 Ile 1.96 Leu 2.02 Lys 4.18 Met 0.87 Phe 3.88 Pro 2.29 Ser 3.50 Thr 2.87 Tyr 2.83 Val 2.24
4. Mol. Wt [Mass Spectrometry]	Mol. Wt 6028.9 ± 2.0	6028.2
5. Peptide Content [% N by Elemental Analysis]	Report	85.0%

THIS MATERIAL IS FOR INVESTIGATION (NON HUMAN) USE ONLY

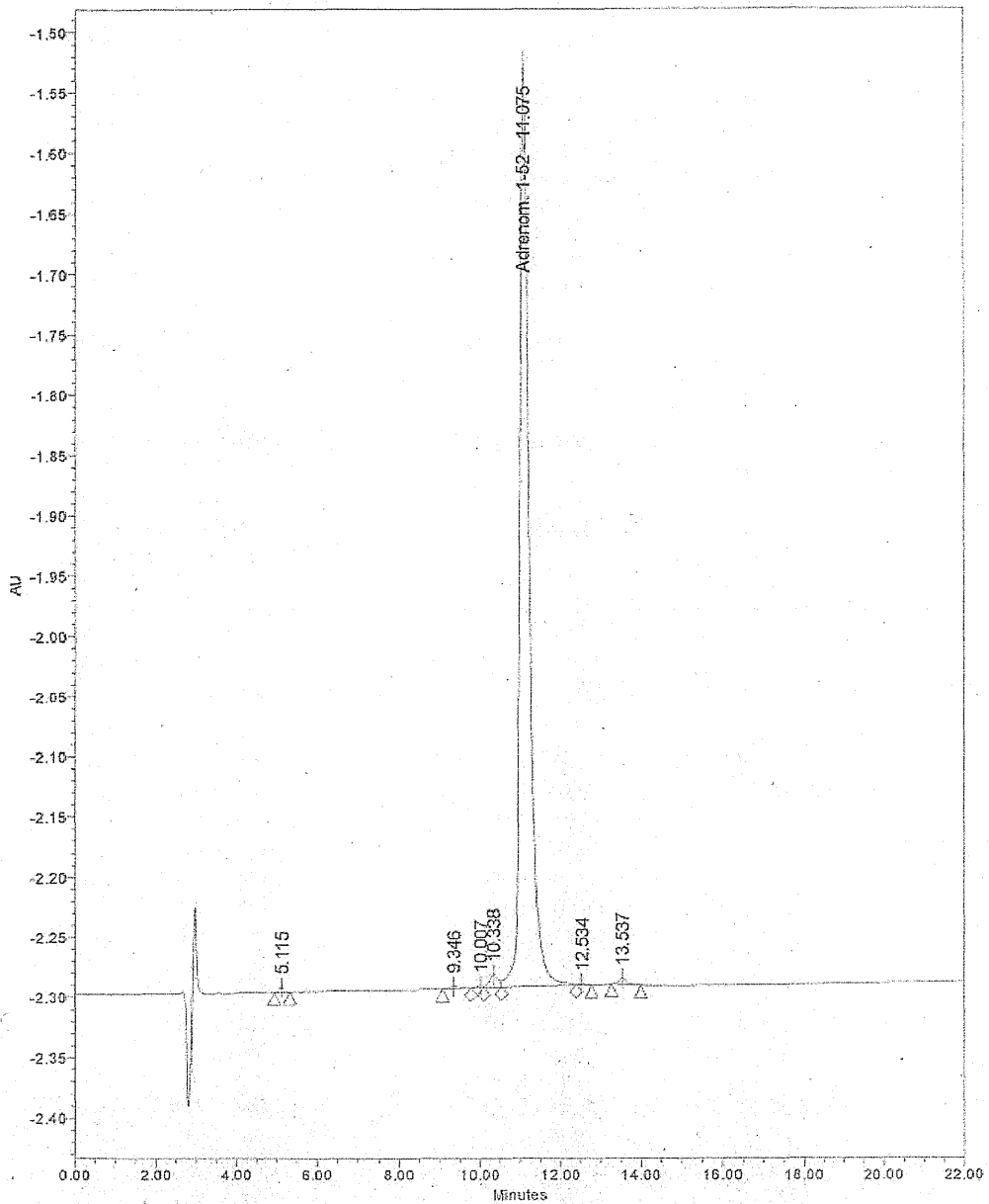
Quality Control:  DATE: 23 Dec 05

#### AMERICAN PEPTIDE COMPANY, INC.

Headquarters  
 777 E. Evelyn Ave  
 Sunnyvale, CA 94086 USA  
 Tel: 408-733-7604 Fax: 408-733-7603

1271 Avenida Chelsoa  
 Vista, CA 92083 USA  
 Tel: 760-597-8620 Fax: 760-597-8816

1-2-1, Kubogasaki,  
 Moriya, Ibaraki 302-0104 Japan  
 Tel: 81-297-45-6311 Fax: 81-297-45-6353



Sample Name: Adrenomedullin 1-52/051020; Date Acquired: 19.Dec.05 06:22:16 PM; Vial: 1; Injection: 2

Processing Method Adrenomedullin

20.Dec.05

*OK 20 Dec 05*  
Page: 1 of 2



3. APC アドレノメデュリン lot #60303 分析結果

(lot#60303 は非臨床試験には未使用)



Page 1 of 2

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

CODE No: 20.161

PEPTIDE 22-2-10

M.W 6028.86

SEQUENCE:

H-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<sub>2</sub>

(Disulfide Bridge between Cys<sup>16</sup>-Cys<sup>21</sup>)  
C<sub>264</sub>H<sub>406</sub>N<sub>80</sub>O<sub>77</sub>S<sub>3</sub>

Date of Mfg: 03 May, 06

Lot #: 060303

Rev 01

ATTRIBUTE	SPECIFICATION	RESULTS																																																																			
1. Color/Appearance	White Powder	White Powder																																																																			
2. Purity (%) (HPLC System)	≥ 95.0 %	97.3%																																																																			
3. Water Content (%w/w) (Karl Fischer)	≤ 10.0 %	8.2%																																																																			
4. Amino Acid Composition (Hitachi model L-8800A)	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr><td>Ala</td><td>1.70 – 2.30</td><td>Ala</td><td>2.09</td></tr> <tr><td>Arg</td><td>3.40 – 4.60</td><td>Arg</td><td>3.90</td></tr> <tr><td>Asx</td><td>5.10 – 6.90</td><td>Asx</td><td>5.64</td></tr> <tr><td>Cys</td><td>except</td><td>Cys</td><td>except</td></tr> <tr><td>Glx</td><td>5.10 – 6.90</td><td>Glx</td><td>5.37</td></tr> <tr><td>Gly</td><td>3.40 – 4.60</td><td>Gly</td><td>4.00</td></tr> <tr><td>His</td><td>0.85 – 1.15</td><td>His</td><td>1.07</td></tr> <tr><td>Ile</td><td>1.70 – 2.30</td><td>Ile</td><td>1.99</td></tr> <tr><td>Leu</td><td>1.70 – 2.30</td><td>Leu</td><td>2.00</td></tr> <tr><td>Lys</td><td>3.40 – 4.60</td><td>Lys</td><td>4.10</td></tr> <tr><td>Met</td><td>Report</td><td>Met</td><td>0.82</td></tr> <tr><td>Phe</td><td>3.40 – 4.60</td><td>Phe</td><td>3.96</td></tr> <tr><td>Pro</td><td>1.70 – 2.30</td><td>Pro</td><td>1.79</td></tr> <tr><td>Ser</td><td>Report</td><td>Ser</td><td>3.14</td></tr> <tr><td>Thr</td><td>2.55 – 3.45</td><td>Thr</td><td>2.72</td></tr> <tr><td>Tyr</td><td>2.55 – 3.45</td><td>Tyr</td><td>2.66</td></tr> <tr><td>Val</td><td>1.70 – 2.30</td><td>Val</td><td>1.87</td></tr> </table>	Ala	1.70 – 2.30	Ala	2.09	Arg	3.40 – 4.60	Arg	3.90	Asx	5.10 – 6.90	Asx	5.64	Cys	except	Cys	except	Glx	5.10 – 6.90	Glx	5.37	Gly	3.40 – 4.60	Gly	4.00	His	0.85 – 1.15	His	1.07	Ile	1.70 – 2.30	Ile	1.99	Leu	1.70 – 2.30	Leu	2.00	Lys	3.40 – 4.60	Lys	4.10	Met	Report	Met	0.82	Phe	3.40 – 4.60	Phe	3.96	Pro	1.70 – 2.30	Pro	1.79	Ser	Report	Ser	3.14	Thr	2.55 – 3.45	Thr	2.72	Tyr	2.55 – 3.45	Tyr	2.66	Val	1.70 – 2.30	Val	1.87
Ala	1.70 – 2.30	Ala	2.09																																																																		
Arg	3.40 – 4.60	Arg	3.90																																																																		
Asx	5.10 – 6.90	Asx	5.64																																																																		
Cys	except	Cys	except																																																																		
Glx	5.10 – 6.90	Glx	5.37																																																																		
Gly	3.40 – 4.60	Gly	4.00																																																																		
His	0.85 – 1.15	His	1.07																																																																		
Ile	1.70 – 2.30	Ile	1.99																																																																		
Leu	1.70 – 2.30	Leu	2.00																																																																		
Lys	3.40 – 4.60	Lys	4.10																																																																		
Met	Report	Met	0.82																																																																		
Phe	3.40 – 4.60	Phe	3.96																																																																		
Pro	1.70 – 2.30	Pro	1.79																																																																		
Ser	Report	Ser	3.14																																																																		
Thr	2.55 – 3.45	Thr	2.72																																																																		
Tyr	2.55 – 3.45	Tyr	2.66																																																																		
Val	1.70 – 2.30	Val	1.87																																																																		

### AMERICAN PEPTIDE COMPANY, INC.

Headquarters  
777 E. Evelyn Avenue  
Sunnyvale, CA 94085 USA  
Tel: 408-733-7604 Fax: 408-733-7603

1271 Avenida Chelsea  
Vista, CA 92081 USA  
Tel: 760-597-8820 Fax: 760-597-8816

1-2-1 Kubogaoka  
Moriya, Ibaraki 302-0104 Japan  
Tel: 81-297-45-6311 Fax: 81-297-45-6353

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

CODE No: 20.161

**PEPTIDE 22-2-10**

M.W 6028.86

**SEQUENCE:**

H-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<sub>2</sub>

(Disulfide Bridge between Cys<sup>16</sup>-Cys<sup>21</sup>) $C_{264}H_{406}N_{80}O_{77}S_3$ 

Date of Mfg: 03 May, 06

Lot #: 060303

Rev 01

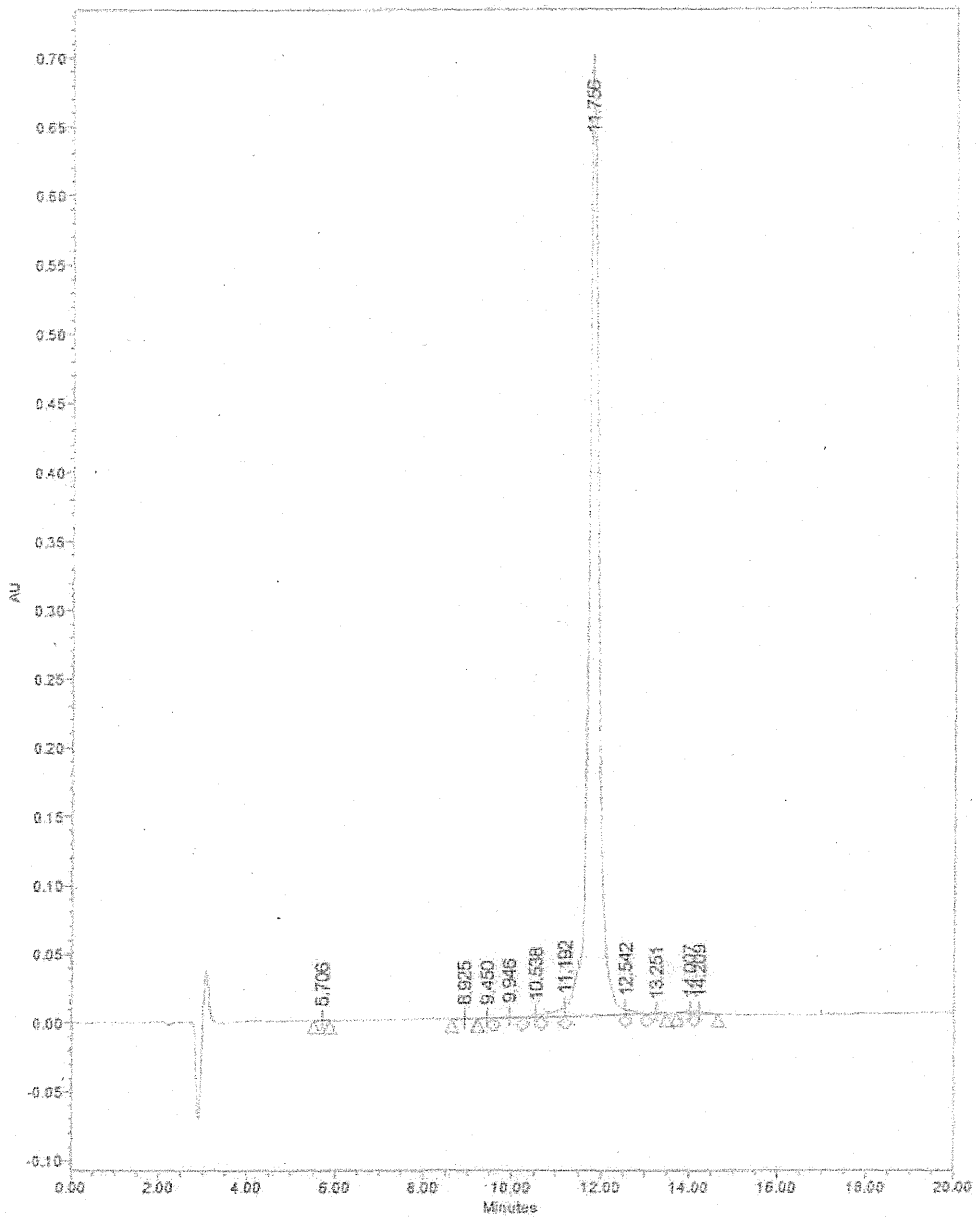
5. Peptide Content (Nitrogen Analysis)	≥ 75.0 %	85.8 %
6. Mol. Wt. (Mass Spectrometry)	Mol. Wt. 6028.9 ± 2.0	6028.4
7. Primary Counter Ion [Acetate] (HPLC)	Report Results	6.1%
8. Mass Balance	95%-105%	100.1%
9. Solubility	Clear and Colorless	Clear and Colorless In H <sub>2</sub> O

**THIS MATERIAL WAS PREPARED FOLLOWING cGMP GUIDELINES**Quality Assurance: *[Signature]*DATE: 21 Jul 06**AMERICAN PEPTIDE COMPANY, INC.**

Headquarters  
777 E. Evelyn Avenue  
Sunnyvale, CA 94086 USA  
Tel: 408-733-7804 Fax: 408-733-7803

1271 Avenida Chelsea  
Vista, CA 92081 USA  
Tel: 760-597-8620 Fax: 760-597-8816

1-2-1 Kubogaoka  
Moriya, Ibaraki 302-0104 Japan  
Tel: 81-297-45-6311 Fax: 81-297-45-631



Sample Name: 20.161 / 060303; Date Acquired: 5/31/2006 12:47:07 PM PDT; Vial: 2; Injection: 1

Processing Method 20\_161.TFA.Purity

7/19/2006

Page: 1 of 2

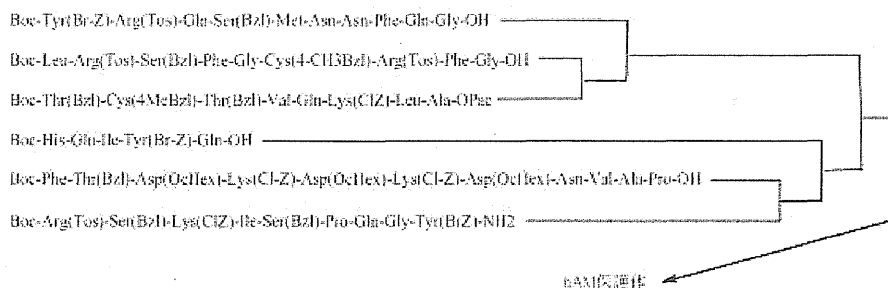
*SC 2174206*

#### 4. ペプチド研究所製アドレノメデュリンの合成法

##### ペプチド研究所

##### Adrenomedullin (Human): hAM製造方法及び製造手順

##### 1) 保護ペプチドの合成(non-GMP製造)



##### 2) 脱保護、SS形成、精製(non-GMP or GMP製造)

hAM保護体

工程1 ↓ 脱Boc TFA処理

hAM脱Boc体

工程2 ↓ 脱保護 HF処理

hAM HF粗ペプチド(2SH体)

工程3 ↓ SS形成 I2処理

↓ 精製 分取HPLC

(アセトニトリル-水/0.1%トリフルオロ酢酸)

工程4 ↓ 精製 CM-toyopearl

(酢酸アンモニウム-水)

工程5 ↓ 精製 分取HPLC

(アセトニトリル-水/0.1%トリフルオロ酢酸)

工程6 ↓ 塩交換 Dowex 1x2 (酢酸水)

工程7 ↓ ゲルろ過 Sephadex(酢酸水)

精製Adrenomedullin (Human)



3) 製剤(注射剤): 富士薬品または東洋紡(株)