

2014/5029B

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・26 年度 総合研究報告書

研究代表者 北村和雄

平成 27 (2015) 年 5 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 -----	11
2. (資料2)仕様書・納品書・試験結果報告書・写真 -----	39
3. (資料3)治験薬概要書 -----	53
4. (資料4)治験実施計画書 -----	93
5. (資料5)説明文書・同意文書 -----	123

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	137
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	139
-----------------------	-----

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）総合研究報告書

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）にて製剤化を行った。また、Phase I（単回投与試験）の臨床治験のプロトコールを作成した。一連の研究には、SMOのノイエス社及びヒ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が担保できた。

【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- α 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、7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の物質特許が切れたことなどから、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、本研究では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

作成を行った。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、治験薬確保とプロトコール作成が終了し、本研究終了後の平成27年度からはPhase I（単回投与試験）医師主導治験への移行が可能となった。

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い、予定通り研究が進捗した。

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た。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、Phase I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

(Phase I) 開始時資料として活用できると判断した。

平成26年3月27日にPMDAでの対面助言を実施し、Phase I 開始のための非臨床試験は充足していること

を確認いただいた。しかしながらPhase I (単回持続投与試験)の終了後にPhase I (反復投与試験)を実施する予定だが、Phase I (反復持続投与試験)の前に反復持続投与の毒性試験を実施することが望ましいとのPMDAからの指導を受けた。そのため、平成26年度に追加配分をいただき、反復持続投与の毒性試験の予備試験を実施しており、平成27年度にPhase I (単回持続投与試験)実施中に反復持続投与の毒性試験の本試験を実施する予定である。

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製剤の作成を行った。まず予備的検討をペプチド研のAMペプチドを用いて行い、ペプチド研のGMPアドレノメデュリン原末完成後に実機での試作と製造を行った。

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している。以上のデータを治験薬概要書に反映したものを資料3として添付する。

4. 治験プロトコールの作成

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ール作成を行っている。第一相治験のプロトコール案に関しても、PMDAの対面助言で相談した。対面助言を実施した、プロトコール案を資料4、同意説明文書を資料5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 I）開始時資料として活用できると判断した。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Phase Iに入ることは可能であるとの結論となった。

Phase I 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。

Phase I 単回投与試験は、添付資料4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いる。

以上の結果より、Phase I 開始の準備がほぼ終了したので、平成27年度にはPhase I に入れることが確実になった。

しかしながらPhase I（単回持続投与試験）の終了後にPhase I（反復投与試験）を実施する予定だが、Phase I（反復持続投与試験）の前に反復持続投与の毒性試験を実施することが望ましいとのPMDAからの指導を受けた。そのため、平成26年度に追加配分をいただき、反復持続投与の毒性試験の予備試験を実施しており、平成27年度にPhase I（単回持続投与試験）実施中に反復持続投与の毒性試験の本試験を実施することで、Phase IIまでの臨床試験が遅滞なく実施できる予定である。

E. 結論

アドレノメデュリン治験薬の製造は順調に進み、Phase I（単回投与試験）を開始するための非臨床試験も充足しており、さらにPhase I（単回投与試験）のプロトコールも完成したことから、本事業はほぼ順調に進展した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagata S, Hikosaka T, Kitamura K: Effect of Adrenomedullin Administration in Two Rat Models of Experimental Inflammatory Bowel Disease. *Am J Life Sci* 3: 39-42 (2015)
2. Kawano S, Kawagoe Y, Kuwasako K, Shimamoto S, Igarashi K, Tokashiki M, Kitamura K, Kato J: Gender-related alterations in plasma adrenomedullin level and its correlation with body weight gain. *Endocr Connect* 4: 43-49 (2015)
3. Kubo K, Tokashiki M, Kuwasako K, Tamura M, Tsuda S, Kubo S, Yoshizawa-KK, Kato J, Kitamura K: Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol. *Peptides* 57: 118-121 (2014)
4. Ashizuka S, Kita T, Inatsu H, Kitamura K: Adrenomedullin: A novel therapy for intractable ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 19:26-27 (2013)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 北村和雄: アドレノメデュリンの展開研究. *心臓* 45:1496-1502 (2013)

9. 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. Kitamura K: Twenty years from adrenomedullin discovery: From basic study to translational research. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 2014-9 (Kyoto, Japan)
2. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Kato J: Novel functions of two G protein-coupled receptor kinases: their marked inhibitory effect on adrenomedullin type 1 receptor signaling. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014, 2014-9 (Kyoto, Japan)
3. Kubo K, Tokashiki M, Kuwasako K, Tamura M, Tsuda S, Kubo S, Yoshizawa KK, Kato J, Kitamura K: Biological properties of adrenomedullin conjugated with polyethylene glycol. The European Society of Cardiology Congress 2014, 2014-8 (Barcelona, Spain)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)

8. 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)
9. 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、 β -アレスタチンの
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)
10. 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)

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

2. 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

3. 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

4. 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

H. 知的財産権の出願登録状況

1. 出願番号：特願2014-058225

(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

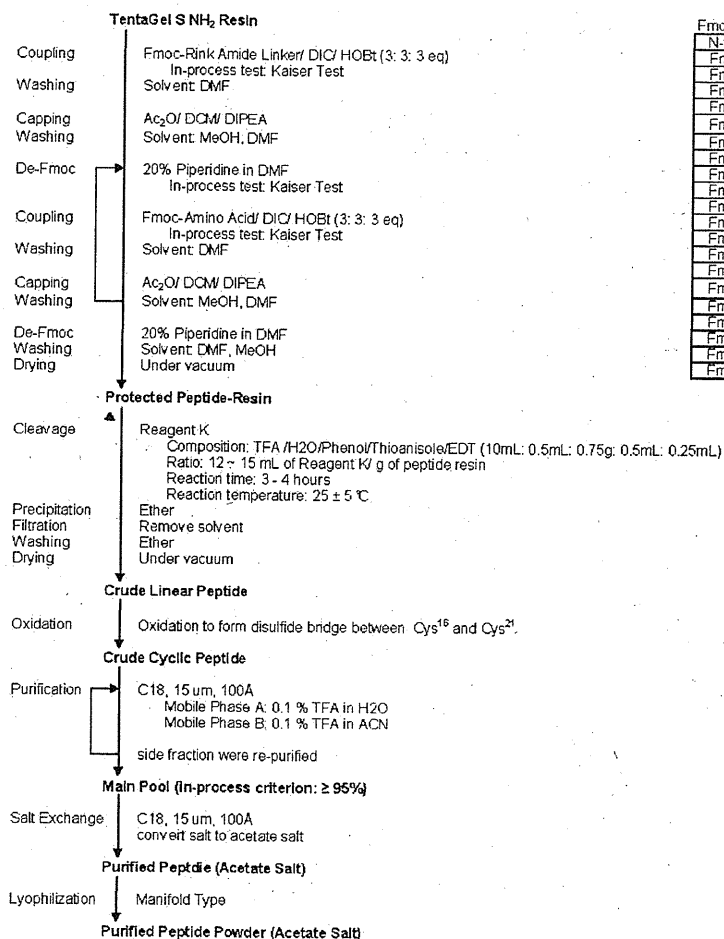
1. アメリカンペプチド(APC)アドレノメデュリンの合成法	-----	3
2. APC アドレノメデュリン lot #51020 分析結果	-----	4
3. APC アドレノメデュリン lot #60303 分析結果	-----	6
4. ペプチド研究所製アドレノメデュリンの合成法	-----	9
5. ペプチド研究所アドレノメデュリンの製品規格・試験方法	-----	10
6. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#550237	-----	13
7. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 lot#551014	-----	15
8. ペプチド研究所製アドレノメデュリン分析結果 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-Val-Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH₂ (disulfide bridge Cys¹⁶).

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-NH₂
 (Disulfide bridge Cys16 -- Cys21)

Date of Mfg: 12 Dec 05 Lot #: 051020 C₂₆₄H₄₀₆N₈₀O₇₇S₃

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]	<table border="0"> <tr><td>Ala</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Arg</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>Asx</td><td>5.10 - 6.90</td></tr> <tr><td>Cys</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Glx</td><td>5.10 - 6.90</td></tr> <tr><td>Gly</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>His</td><td>0.85 - 1.15</td></tr> <tr><td>Ile</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Leu</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Lys</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>Met</td><td>0.85 - 1.15</td></tr> <tr><td>Phe</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>Pro</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Ser</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>Thr</td><td>2.55 - 3.45</td></tr> <tr><td>Tyr</td><td>2.55 - 3.45</td></tr> <tr><td>Val</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> </table>	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	<table border="0"> <tr><td>Ala</td><td>2.06</td></tr> <tr><td>Arg</td><td>4.11</td></tr> <tr><td>Asx</td><td>6.00</td></tr> <tr><td>Cys</td><td>1.75</td></tr> <tr><td>Glx</td><td>5.87</td></tr> <tr><td>Gly</td><td>3.92</td></tr> <tr><td>His</td><td>1.05</td></tr> <tr><td>Ile</td><td>1.96</td></tr> <tr><td>Leu</td><td>2.02</td></tr> <tr><td>Lys</td><td>4.18</td></tr> <tr><td>Met</td><td>0.87</td></tr> <tr><td>Phe</td><td>3.88</td></tr> <tr><td>Pro</td><td>2.29</td></tr> <tr><td>Ser</td><td>3.50</td></tr> <tr><td>Thr</td><td>2.87</td></tr> <tr><td>Tyr</td><td>2.83</td></tr> <tr><td>Val</td><td>2.24</td></tr> </table>	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
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

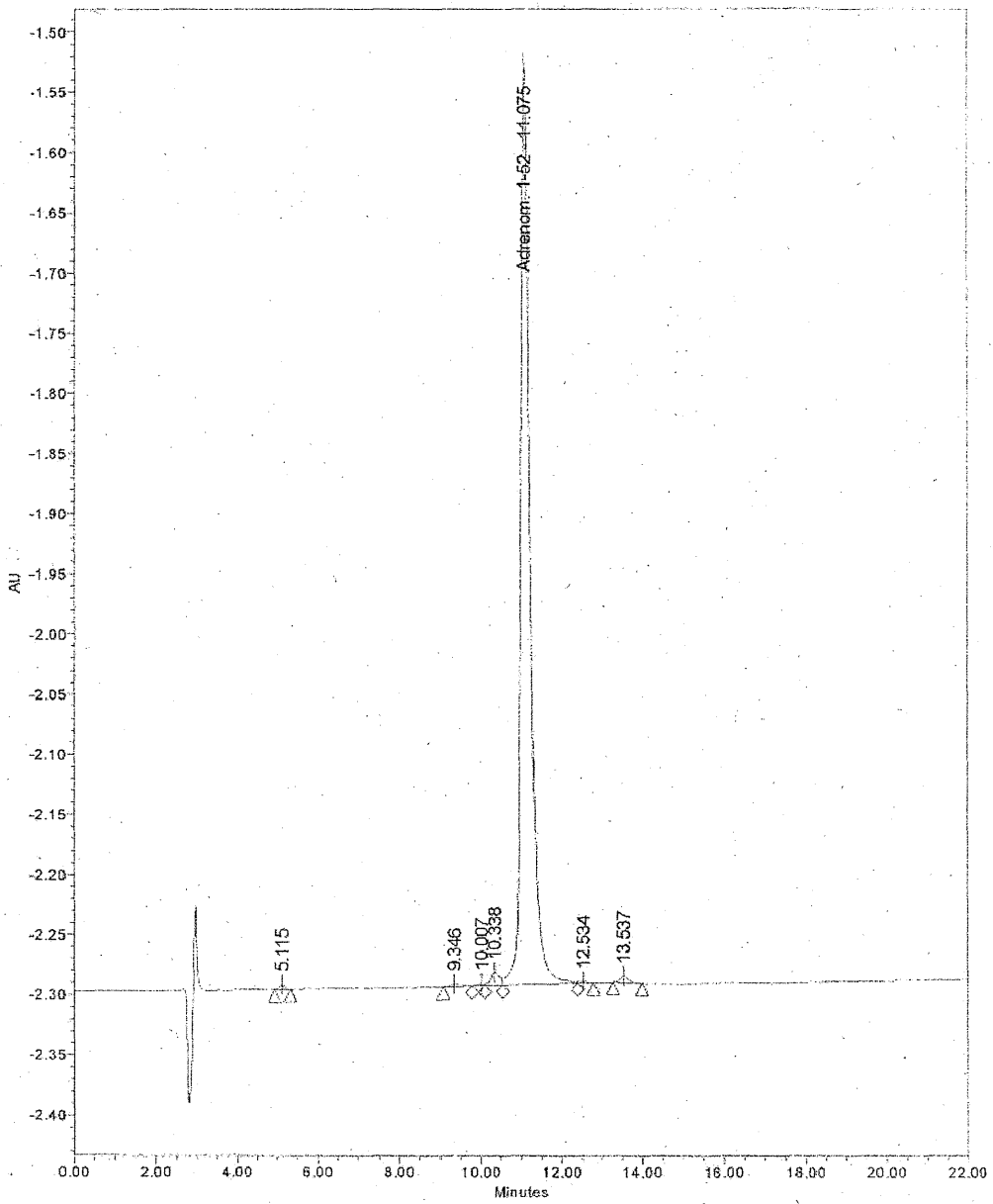
Quality Control: DATE: 23 Dec 05

AMERICAN PEPTIDE COMPANY, INC.

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

1271 Avenida Chelsea
 Vista, CA 92083 USA
 Tel: 760-597-8820 Fax: 760-597-8818

1-2-1, Kuboganka,
 Moriya, Ibaraki 307-0164 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

SR 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)



CERTIFICATE OF ANALYSIS

CODE No: 20.161

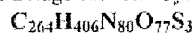
PEPTIDE 22-2-10

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-NH₂

(Disulfide Bridge between Cys¹⁶-Cys²¹)



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></tr> <tr><td>Arg</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>Asx</td><td>5.10 - 6.90</td></tr> <tr><td>Cys</td><td>except</td></tr> <tr><td>Glx</td><td>5.10 - 6.90</td></tr> <tr><td>Gly</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>His</td><td>0.85 - 1.15</td></tr> <tr><td>Ile</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Leu</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Lys</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>Met</td><td>Report</td></tr> <tr><td>Phe</td><td>3.40 - 4.60</td></tr> <tr><td>Pro</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> <tr><td>Ser</td><td>Report</td></tr> <tr><td>Thr</td><td>2.55 - 3.45</td></tr> <tr><td>Tyr</td><td>2.55 - 3.45</td></tr> <tr><td>Val</td><td>1.70 - 2.30</td></tr> </table>	Ala	1.70 - 2.30	Arg	3.40 - 4.60	Asx	5.10 - 6.90	Cys	except	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	Report	Phe	3.40 - 4.60	Pro	1.70 - 2.30	Ser	Report	Thr	2.55 - 3.45	Tyr	2.55 - 3.45	Val	1.70 - 2.30	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr><td>Ala</td><td>2.09</td></tr> <tr><td>Arg</td><td>3.90</td></tr> <tr><td>Asx</td><td>5.64</td></tr> <tr><td>Cys</td><td>except</td></tr> <tr><td>Glx</td><td>5.37</td></tr> <tr><td>Gly</td><td>4.00</td></tr> <tr><td>His</td><td>1.07</td></tr> <tr><td>Ile</td><td>1.99</td></tr> <tr><td>Leu</td><td>2.00</td></tr> <tr><td>Lys</td><td>4.10</td></tr> <tr><td>Met</td><td>0.82</td></tr> <tr><td>Phe</td><td>3.96</td></tr> <tr><td>Pro</td><td>1.79</td></tr> <tr><td>Ser</td><td>3.14</td></tr> <tr><td>Thr</td><td>2.72</td></tr> <tr><td>Tyr</td><td>2.66</td></tr> <tr><td>Val</td><td>1.87</td></tr> </table>	Ala	2.09	Arg	3.90	Asx	5.64	Cys	except	Glx	5.37	Gly	4.00	His	1.07	Ile	1.99	Leu	2.00	Lys	4.10	Met	0.82	Phe	3.96	Pro	1.79	Ser	3.14	Thr	2.72	Tyr	2.66	Val	1.87
Ala	1.70 - 2.30																																																																					
Arg	3.40 - 4.60																																																																					
Asx	5.10 - 6.90																																																																					
Cys	except																																																																					
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	Report																																																																					
Phe	3.40 - 4.60																																																																					
Pro	1.70 - 2.30																																																																					
Ser	Report																																																																					
Thr	2.55 - 3.45																																																																					
Tyr	2.55 - 3.45																																																																					
Val	1.70 - 2.30																																																																					
Ala	2.09																																																																					
Arg	3.90																																																																					
Asx	5.64																																																																					
Cys	except																																																																					
Glx	5.37																																																																					
Gly	4.00																																																																					
His	1.07																																																																					
Ile	1.99																																																																					
Leu	2.00																																																																					
Lys	4.10																																																																					
Met	0.82																																																																					
Phe	3.96																																																																					
Pro	1.79																																																																					
Ser	3.14																																																																					
Thr	2.72																																																																					
Tyr	2.66																																																																					
Val	1.87																																																																					

AMERICAN PEPTIDE COMPANY, INC.

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

1271 Avenida Chelsea
Visita, CA 92081 USA
Tel: 760-597-8820 Fax: 760-597-8818

1-2-1 Kubogayaka
Moriya, Ibaraki 302-0134 Japan
Tel: 81-297-45-6311 Fax: 81-297-45-6350

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

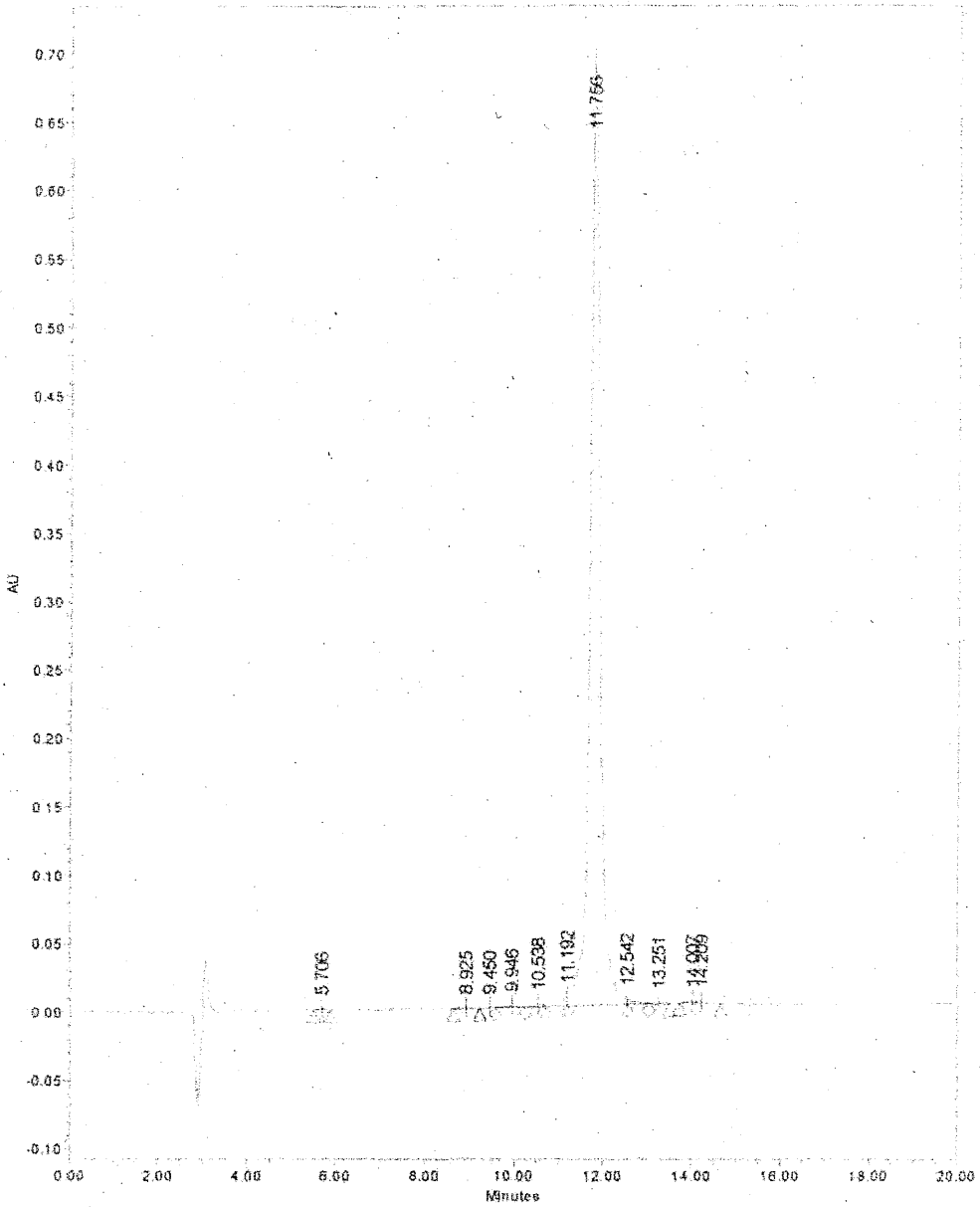
CODE No: 20.161 **PEPTIDE 22-2-10** **M.W 6028.86****SEQUENCE:** H-Tyr-Arg-Gln-Ser-Met-Asn-Asn-Phe-Gln-Gly-Leu-Arg-Ser-Phe-Gly-Cys-Arg-Phe-Gly-Thr-Cys-Thr-Val-Gln-Lys-Leu-Ala-His-Gln-Ile-Tyr-Gln-Phe-Thr-Asp-Lys-Asp-Lys-Asp-Asn-Val-Ala-Pro-Arg-Ser-Lys-Ile-Ser-Pro-Gln-Gly-Tyr-NH₂(Disulfide Bridge between Cys¹⁶-Cys²¹)
C₂₆₄H₄₀₆N₈₀O₇₇S₃

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 ₂ O

THIS MATERIAL WAS PREPARED FOLLOWING cGMP GUIDELINESQuality Assurance: D. J. [Signature] DATE: 21 Jul 06

AMERICAN PEPTIDE COMPANY, INC.Headquarters
777 E. Evelyn Avenue
Sunnyvale, CA 94086 USA
Tel: 408-733-7604 Fax: 408-733-76031271 Avenida Chelsea
Vista, CA 92081 USA
Tel: 760-597-8820 Fax: 760-597-88161-2-1 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 PMPDT; Vial 2; Injection: 1

Processing Method 20_161 TFA Purity

7/19/2006

Page 1 of 2

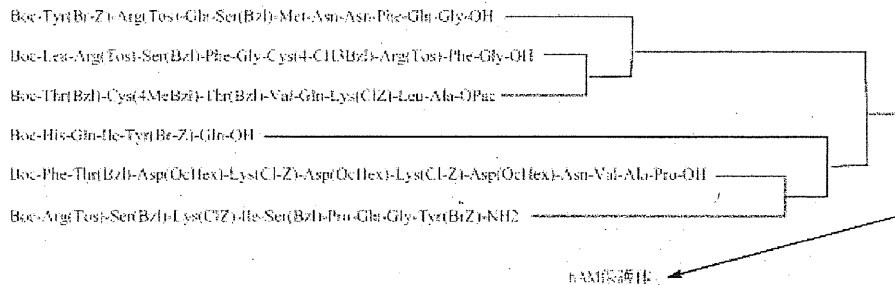
SC 21 June 06

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)