


平成21年12月9日

超高磁場超高感度 NMR 装置利用による化合物のスクリーニング  
利用成果報告書

公立大学法人横浜市立大学

機関名称	持田製薬株式会社
部署名	創薬研究所
代表者・印	執行役員研究本部長 古迫 正司 
所在地	東京都新宿区四谷一丁目7番地
連絡先	TEL : 0550-89-7881 FAX : 0550-89-0945 E-mail : shoji.furusako@mochida.co.jp
利用区分	( ) 成果非専有利用 (○) トライアルユース
研究題目(利用課題名)	LC-NMR による医薬品代謝物の構造解析
研究目的及び内容(課題の内容)	<p>創薬研究の過程において投与された候補化合物の薬物動態研究は必要不可欠であり、その過程で見出される生体内代謝物の分析や同定は、初期探索段階においては誘導合成支援の観点から、医薬品候補化合物においてはその安全性確認の観点から非常に重要性の高いプロセスである。</p> <p>生体内代謝物などの微量しか得られない化合物の分析には一般に LC/MS/MS が利用されるが、LC/MS/MS から得られる構造情報はフラグメンテーション由来の限定された情報である。一方で溶液 NMR からは、より詳細な構造情報が得られるが、NMR の検出感度が MS より低いため、これまでは数～数十 mg のサンプルが利用可能なケースにおいてのみ利用されてきた。また測定には高磁場 NMR が好ましいが、そのような高価な分析機器を自社で保有・維持できる企業は限定されている。</p> <p>我々は、文部科学省のイノベーション事業を通じて貴大学の高感度フロー型クライオプローブ付 700MHz LC-NMR を活用し、微量しか得られない医薬品代謝物の構造解析の可能性検討を提案した。当該機器の特徴は以下の通りであり、各種測定条件検討実施と既存機器の分析と組み合わせることにより、微量代謝物を対象とした場合でも極めて適切な分析環境を提供すると考えられ</p>

	<p>た。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) LC-NMR であるので、サンプルのロスが少ない</li> <li>2) クライオプローブを装着しており、感度が良い</li> <li>3) 高磁場であり、分解能が高い</li> </ol> <p>実際の検討では、既存医薬品を用いての各種条件検討を中心に 行い、一部代謝物の同定にも活用を試みた。</p>
利用した NMR	<p>( ) 900MHz (○) 高感度フロー型クライオプローブ付 700MHz</p>
研究(利用)期間	<p><b>【当初計画】</b> 研究(利用)時期：平成 19 年 11 月 1 日～平成 21 年 10 月 31 日 研究(利用)期間： 3 週 (総利用日数 21 日)</p> <p><b>【利用期間】</b> 研究(利用)期間： 18.4 週 (総利用日数 129 日) 平成 19 年度 4.7 週 (33 日) 平成 20 年度 13.7 週 (96 日)</p> <p>利用期間の変更理由：当初の計画では 1 次元 <math>^1\text{H}</math>-NMR のみ測定 する予定であったが、測定対象スペクトルを拡大し、1 次元 <math>^{13}\text{C}</math>-NMR および 2 次元 NMR についても測定検討を行った。こ れらスペクトルの測定条件検討に時間を要したため、利用期間を 延長した。</p> <p>※ 当初計画から変更があった場合は、その理由を記入してください。</p>
研究(利用)成果・実績の概要	<p>初めに標準化合物を用いて、1 次元 <math>^1\text{H}</math>-NMR、1 次元 <math>^{13}\text{C}</math>-NMR および各種 2 次元スペクトル(<math>^1\text{H}</math>-<math>^1\text{H}</math> COSY, <math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math> HSQC, <math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math> HMBC)の感度の確認を行った。各種スペクトルは stop-flow 法にて測定した。</p> <p>標準化合物には doxorubicin hydrochloride(MW=580.0)を用い た。但し、1 次元 <math>^{13}\text{C}</math>-NMR については <math>^1\text{H}</math> より感度が低いため、 より単純な構造である chlorphenesin(MW=245.7)を用いた。</p> <p>その結果、1 次元 <math>^1\text{H}</math>-NMR では、<math>1\mu\text{g}</math> の標準化合物(約 1.7nmol) を用い、1 時間の積算によって良好なスペクトルを得た。次に 1 次元 <math>^{13}\text{C}</math>-NMR の測定条件を検討したところ chlorphenesin 100<math>\mu\text{g}</math> (約 400nM) を用い、29 時間の積算を行うことで全ての 炭素シグナルが観測された。しかし S/N が極めて低く、構造決定 への利用は困難と考えられた。</p>

さらに構造決定に重要な情報を与える各種 2 次元 NMR はそれぞれ次の条件にて良好なスペクトルを得た。

$^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  COSY : 化合物量 100 $\mu\text{g}$ , 積算時間 12hr

$^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC : 化合物量 20 $\mu\text{g}$ , 積算時間 12hr

$^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HMBC : 化合物量 100 $\mu\text{g}$ , 積算時間 12hr

感度確認実験の結果より、サンプル量が 100 $\mu\text{g}$  (約 170nmol) 程度あれば、1 次元  $^{13}\text{C}$ -NMR を除く各種スペクトルの測定が可能であることを確認した。この程度の化合物量は探索研究過程において実際に代謝物として取り扱うことが可能なレベルと考えられ、当該 LC-NMR の分析感度が代謝物の構造決定に適切であることが示された。

そこで、弊社で探索段階にあった化合物 A の代謝物構造決定を当該 LC-NMR を用いて検討した。化合物 A をラットに経口投与すると、胆汁中に代謝物 X が出現した。ラット胆汁 3 mL より代謝物 X を粗精製し、LC-NMR を用いて代謝物 X の  $^1\text{H}$ -NMR を測定した。代謝物 X はオキシメチン、オキシメチレン領域に新たにシグナルを有し、マススペクトルから得られた分子量情報と合わせて、グルクロン酸抱合体と決定された。

以上のように高分解能 NMR を LC-NMR として活用することにより、微量しか得ることのできない医薬品候補化合物の代謝物構造を現実的な取り扱い可能な量で決定することができる確率が向上すると考えられた。今後も LC-NMR と LC/MS/MS を併用していくことで、代謝物の構造決定に活用していくことを予定している。

#### 社会・経済への波及効果の見通し

※ 利用成果に基づくイノベーション創出性などについて記入してください。  
また、「トライアルユース」については、利用成果に係る分野の発展性や新分野開拓の可能性などを記入してください。

高磁場 NMR は化合物の構造決定に非常に有用なツールである半面、私企業が個別に保有するには大変高価であり、維持にも莫大な費用を要する。また測定感度の面からも通常の溶液測定では、一定量の測定サンプルが必要であり、今回想定した医薬品代謝物などは測定に必要なサンプル量を得ることが必ずしも現実的でないケースが多かった。

今回のトライアルユースの結果から、これらの問題は横浜市立大学所有の LC-NMR の活用により、解決可能であることが判明した。すなわち、企業単独では設備購入や維持が困難な機器であっても、機器の共用やコラボレーションによって使用可能であれ

	<p>ば、産業応用が可能となり、結果として産業の発展に貢献できる成果を生み出す可能性が高まることをイノベーション事業を通じて確認した。横浜市立大学保有の LC-NMR の活用によって微量サンプルの迅速な構造決定が可能となれば、創薬研究における課題の解決および意思決定が迅速化されるため、医薬品の探索研究期間の短縮に繋がると期待される。</p>
--	---

<p>公開延期の希望の有無</p> <p>※ 特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は、必ず事前に御相談ください。</p>	<p>( ) 有 ( ) 無</p> <p>※ 「有」の場合、その理由を記入してください。</p>
---	---

<p>利用満足度 (複数選択不可)</p>	<p>( ) 大いに満足 ( ) ほぼ満足</p> <p>( ) やや不満 ( ) 大いに不満</p> <p>※ ユーザーサポート等で必要と考えられることがあれば記入してください。</p>
-----------------------	--

<p>施設利用に係る感想・改善等</p>	<p>特になし</p>
----------------------	-------------

<p>「文部科学省の共用ナビ」に対する感想・改善等</p>	<p>特になし</p>
<p>今後の利用希望等</p>	<p>医薬品探索研究において構造決定が必要なケースで、成果占有での有償利用を検討したい。例えば、以下に述べる状況が想定される。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・代謝物の構造決定</li> <li>・微量に含まれる不純物の構造決定（不純物の <i>in vitro</i> 活性が強いケース、合成ルート検討時の不純物の除去・低減を念頭においた構造決定、化合物が分解するケース）</li> </ul>
<p>その他（上記項目以外での御意見等）</p>	<p>特になし</p>

※ 本報告書については、印刷または必要な編集・加工を行った上で公開します。

※ 別途開催予定の利用成果報告会やシンポジウム等で、本報告書の内容についての資料作成や発表をお願いする場合があります。