

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670550

研究課題名(和文) SPECTと蛍光を同時に行うデュアルイメージング標識薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of dual-modality SPECT/fluorescent probe

研究代表者

上原 知也 (Uehara, Tomoya)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10323403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：体外診断と手術時の可視化の両方を可能とする薬剤の開発を目的に、ガンマ線によるSPECT画像と特定の生体分子のみを特異的に可視化する蛍光画像を同時に可能とするデュアルイメージング薬剤を作製を行った。種々の配位子およびRe錯体を作製し、ジピリジル(Dp)およびベンジルイソニトリル(CN-Bz)を用いた $\text{Re}(\text{CO})_3(\text{Dp})\text{CN-Bz}$ 錯体が蛍光を発することを認めた。現在、センチネルリンパ節(SLN)検出薬剤への応用について検討している。

研究成果の概要(英文)：To develop the dual-modality probes that contain both a radiotracer and a fluorescent label, we synthesized several Re-complex using  $\text{Re}(\text{CO})_3$  core to prepare fluorescent Re-complex. Among them, when the donor groups of the ligand are dipyrityl (Dp) and benzoisonitrile (CN-Bz), the rhenium complex ( $\text{Re}(\text{CO})_3\text{DpCN-Bz}$ ) was fluorescent.  $\text{Re}(\text{CO})_3\text{DpCN-Bz}$  will be conjugated to biomolecules to prepare sentinel node detecting agent.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：SPECT 蛍光 センチネルリンパ節

## 1. 研究開始当初の背景

がん等の手術において、術前に標的の位置を確認することは、手術の計画を立てる上で重要である。しかし、術前に位置確認を行った場合においても開腹あるいは腹腔鏡挿入時に位置がずれることが問題となっている。従って、術前の診断により得られた位置情報と術中の標的の位置を繋ぎ合わせることは、手術時間の短縮、標的の確実な摘出に有用である。放射性核種(RI)標識薬剤は体外計測には有用であるが、放射線は目に見えないことから、視覚的に位置を判断するのは困難である。一方、蛍光薬剤は、体外からの計測は困難であるが、表層では視覚的に位置を判断できる。このような背景から、体外からの診断に有用な SPECT (single photon emission computed tomography) と表層での特異的視覚化を得意とする蛍光イメージングの両方を可能とする薬剤の開発を考えた。

従来 RI と蛍光によるデュアルイメージング薬剤では、RI による体外診断と蛍光による可視化を異なる構造の化合物で行われており、それらの薬剤は体内動態や機能が異なっていた。そのため、高分子薬剤を母体する薬剤設計がとられており、低分子薬剤への応用は困難であった。一方、 $^{99m}\text{Tc}$  と  $\text{Re}$  は同族の元素で化学的性質が類似しており、同じキレートにより同様の構造および動態を示す錯体を作製することが知られている。また、近年、 $\text{Re}$  を配位金属とする錯体により、蛍光を発する配位子も開発されている。このようなことから、 $^{99m}\text{Tc}$  と  $\text{Re}$  と適切な配位子を組み合わせることで、放射性薬剤と蛍光薬剤が同一の動態、機能を有するこれまでに無い薬剤が開発可能と考えられる。また、蛍光薬剤の特徴として、蛍光団の周囲の状況により、蛍光機能をオン・オフすることが可能であることから、そのような機能を取り入れた薬剤の応用も期待できる。

## 2. 研究の目的

体外からの画像診断により得られた標的の位置情報を基に開腹、あるいは腹腔鏡を挿入し、手術時に標的を可視的に検出できれば、手術の効率化、簡便化のみならず、手術時間の短縮による患者負担の軽減にもつながる。本研究では、体外診断と手術時の可視化の両方を可能とする薬剤の開発を目的に、ガンマ線による SPECT 画像と特定の生体分子のみを特異的に可視化する蛍光画像を同時に可能とするデュアルイメージング薬剤を作製する。次いで、作製した化合物を用いて、がんのリンパ節転移の検査であるセンチネルリンパ節 (SLN) 検出薬剤への応用について検討する。

## 3. 研究の方法

本研究では、先ず始めに  $\text{Re}$  および  $^{99m}\text{Tc}$  と有機金属錯体を形成する配位子の設計を行う。RI の標識では、短時間に効率よく標識で

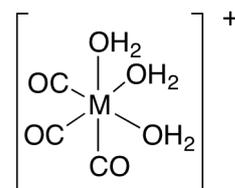


図 1.  $[\text{M}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$  コアの構造

きることが重要であることから、母体骨格として、 $[\text{M}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)]^+$  のコア ( $\text{M}=\text{Re}$  or  $^{99m}\text{Tc}$ ) を選択し、各種配位子を作製することにした。 $\text{Re}$  有機金属錯体に関しては、吸収波長、蛍光

波長、発光収率を評価する。また、蛍光のオン・オフのスイッチ機能を付加し、リソソーム内の代謝により蛍光を発するようにする。より良い錯体が得られた場合には、センチネルリンパ節への集積を示すと考えられるオリゴマンノースやペプチドを配位子と結合し、マウスの足裏の皮下投与による評価系から、センチネルリンパ節の集積を蛍光および放射活性により評価する。

Fmoc-L-Lys の合成

Fmoc-L-Lys(Boc) 500 mg を 4M HCl/AcOEt 5mL に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。析出した白色固体を濾取し減圧乾燥することで目的物を塩酸塩として得た(91.1%)。

Fmoc-L-Lys(dipyridyl) の合成

Fmoc-L-Lys/HCl 1g, 2-pyridinecarboxaldehyde 517 mL, TEA 344mL を dichloroethane 30 mL に懸濁した。NaBH(OAc)<sub>3</sub> 1.57g を加えたのち、遮光、Ar 雰囲気下室温で 4.5 時間攪拌した。反応終了後、反応液を Brine で洗浄した後、有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を濾去した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量のクロロホルムに溶解し、preparative TLC (展開溶媒: CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1) にて精製した(85%)。

L-Lys(dipyridyl) (Lys(Dp)) の合成

Fmoc-L-Lys(dipyridyl) 30 mg を 20 % piperidine/DMF 2 mL に溶解し、室温で 30 分攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を少量の CHCl<sub>3</sub> に溶解、Hexane を加えて静置した。析出した固体をろ取することで目的の配位子 Lys(Dp) を得た (84.8%)。

L-Trp-OMe の合成

-10 °C に冷却した MeOH 10 mL に SOCl<sub>2</sub> 1 mL を Ar 雰囲気下で滴下した。温度を維持したまま 10 分攪拌後、L-Trp 500 mg を加え室温で一晩攪拌した後、溶媒を減圧留去し、残渣を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液に溶解し、CHCl<sub>3</sub> で抽出した。有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を濾去し、溶媒を減圧留去することで L-Trp-OMe を得た(92.3%)。

Fmoc-Lys(dipyridyl)-Trp-OMe の合成

Fmoc-L-Lys(dipyridyl) 227mg、L-Trp-OMe 117mg を DMF 5 mL に溶解し、次いで HOBt・H<sub>2</sub>O 82 mg と DIPEA 91 mL を加えた。氷冷下で WSCI・HCl 103 mg を加えた後、室温で一晩攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣を AcOEt に溶解した。5%クエン酸

水溶液、5% NaHCO<sub>3</sub>水溶液で順次洗浄し、有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を濾去した後、溶媒を減圧濃縮し、preparative TLC (展開溶媒: hexane:ethylacetate:methanol=5:5:1) にて精製した (58.0%)。

#### Lys(dipyridyl)-Trp-OMe (Lys(Dp)-Trp)の合成

Fmoc-L-Lys(dipyridyl)-Trp-OMe 14 mg を 20 % piperidine/DMF 1 mL に溶解し、室温で 90 分攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣を少量の AcOEt に溶解し、Hexane を加えて静置した。析出した固体を MeOH と水の混液に溶解した後、凍結乾燥させることで白色固体として得た(80.0%)。

#### Fmoc-L-Trp-Lys(Boc)-OMe の合成

Lys(Boc)OMe·HCl 100 mg と Fmoc-Trp-OH·2/3IPE 200 mg を DMF 1.5 mL に溶解し、次いで HOBt·H<sub>2</sub>O 62 mg を溶解した。DIPEA 126 mL を加えたのち氷冷下で WSCI·HCl 78 mg を加えた。室温で 3 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去した。残渣を AcOEt に溶解し、5% クエン酸水溶液、5% NaHCO<sub>3</sub>水溶液で順次洗浄し、有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を濾去した後、溶媒を減圧濃縮し、中圧クロマトグラフィを用いて精製した (溶出溶媒: hexane:ethylacetate=1:1) (62.6%)。

#### Fmoc-L-Trp-Lys-OMe の合成

Fmoc-L-Trp-Lys-OMe 100 mg を 4 M HCl/AcOEt 5 mL に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去することで目的物を塩酸塩として得た。(76.3%)。

#### Fmoc-L-Trp-Lys(dipyridyl)-OMe の合成

Fmoc-L-Trp-Lys-OMe 30 mg、2-pyridinecarboxaldehyde 10 mL、TEA 21 mL を dichloroethane 2 mL に溶解した。NaBH(OAc)<sub>3</sub> 1.57 g を加えたのち、遮光、Ar 雰囲気下室温で 4.5 時間攪拌した。反応液を Brine で洗浄し、有機層を Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥させた。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を濾去した後、溶媒を減圧留去した。残渣を少量の CHCl<sub>3</sub> に溶解し、Preparative TLC を用いて精製した (展開溶媒: hexane:ethylacetate:methanol=5:7:1) (40.2%)。

#### L-Trp-Lys(dipyridyl)-OMe (Trp-Lys(Dp))の合成

Fmoc-L-Trp-Lys(dipyridyl)-OMe 17 mg を 20 % piperidine/DMF 1 mL に溶解し、室温で 20 分攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣に Hexane で洗浄することで、目的物を得た (97.6%)。

#### Lys (Dp), Lys(Dp)-Trp, Trp-Lys(Dp)の Re 錯体合成

配位子(Lys (Dp), Lys(Dp)-Trp, Trp-Lys(Dp)) を MeOH に溶解し、1 当量の [NEt<sub>4</sub>]<sub>2</sub>ReBr<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>を加え、65 °C で 90 分加熱還流した。反応液を RP-HPLC にて精製を行い、目的の Re(CO)<sub>3</sub> 錯体を得た。RP-HPLC は A 相: 0.1% TFA/milliQ, B 相: 0.1% TFA/MeOH を用い、B 濃度を 40-100% (0-40 min)に変換する直線グラディエント法により行った。

#### Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz の合成

2,2'-bipyridyl 10 mg、(NEt<sub>4</sub>)[ReBr<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>] 49 mg を MeOH 19.2 mL に溶解し、Ar 雰囲気下室温で 3 時間攪拌した。その後 benzyl isocyanide 23 mL を加え、Ar 雰囲気下 70°C で一晩加熱還流した。Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz は RP-HPLC にて精製を行うことで得た。RP-HPLC は A 相: 0.1% TFA/milliQ, B 相: 0.1% TFA/MeOH を用い、B 濃度を 40-100% (0-40 min)に変換する直線グラディエント法により行った。

#### Re(CO)<sub>3</sub>Dp(COOH)<sub>2</sub>-CN-Bz の合成

2,2'-bipyridine-5,5'-dicarboxylic acid 13 mg を MeOH 3 mL に懸濁し、次いで (NEt<sub>4</sub>)[ReBr<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>] 41 mg を溶解させた。benzyl isocyanide 6.3 mL を加え、Ar 雰囲気下 80°C で 3 時間加熱還流した。反応終了後、HPLC にて化合物 B を単離した。Re(CO)<sub>3</sub>Dp(COOH)<sub>2</sub>-CN-Bz は RP-HPLC にて精製を行うことで得た。RP-HPLC は A 相: 0.1% TFA/milliQ, B 相: 0.1% TFA/MeOH を用い、B 濃度を 50-70-85% (0-10-30 min)に変換する直線グラディエント法により行った。

#### Re(CO)<sub>3</sub>Batho-CN-Bz の合成

Bathophenanthroline 41 mg、BrRe(CO)<sub>5</sub> 25 mg を xylene 2.5 mL に懸濁し、Ar 雰囲気下 150 °C で 6 時間加熱還流した。反応終了後、冷凍庫で反応液を冷却し、析出した沈殿をろ取した。ろ取した粉体を少量の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> に溶解して n-pentane を加え、再結晶を行うことで、BrRe(bathophenanthroline)(CO)<sub>3</sub> を単離した。次いで、BrRe(bathophenanthroline)(CO)<sub>3</sub> 20 mg を MeOH 8.7 mL に懸濁し、benzyl isocyanide 10.4 mL を加え、Ar 雰囲気下 70 °C で一晩加熱還流した。反応終了後、preparative TLC (展開溶媒 CHCl<sub>3</sub>:MeOH=5:1)により精製した。

#### Re(CO)<sub>3</sub>Batho(SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>-CN-Bz の合成

Bathophenanthroline disulfonic acid disodium salt 21 mg、(NEt<sub>4</sub>)[ReBr<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>] 30 mg を MeOH 11.7 mL に溶解し、Ar 雰囲気下室温で 1 時間攪拌した。その後 benzyl isocyanide 10.4 mL を加え、Ar 雰囲気下 70 °C で一晩加熱還流した。反応終了後、Et<sub>2</sub>O を加えて析出した沈殿をろ取し、RP-TLC (展開溶媒 0.005%TFA/水: 0.005%TFA/MeOH=1:1) にて精製した。

#### 吸光度の測定-1

Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp), Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp)-Trp, Re(CO)<sub>3</sub>Trp-Lys(Dp)を MilliQ 水に溶解し、1 x 10<sup>-4</sup>M 溶液を作成した。吸光度計を用いて吸光スペクトルを 200~800nm の波長を 2nm 間隔で測定した。

#### 蛍光の測定

Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp), Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp)-Trp, Re(CO)<sub>3</sub>Trp-Lys(Dp)を MilliQ 水に溶解し、1 x 10<sup>-4</sup>M 溶液を作成した。分光蛍光光度計を用いて蛍光スペクトルを測定し、その量子収率 (F)を求めた。溶存酸素の除去のため、測定直前に 5 分間 Ar でバブリングを行い、セルに蓋をして測定した。量子収率は以下の式によって求め、標準物質として量子収率既知である硫酸キニーネ・2H<sub>2</sub>O の 0.1M 硫酸溶液を用

いた。

$$\Phi_1/\Phi_2=(S_1/S_2)\times\{\varepsilon_2c_2\}/(\varepsilon_1c_1)$$

S: 蛍光スペクトルのピーク面積

$\varepsilon$ : モル吸光係数

c: 溶液の濃度(M)

#### 吸光度測定-2

Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz, Re(CO)<sub>3</sub>Dp(COOH)<sub>2</sub>-CN-Bz, Re(CO)<sub>3</sub>Batho-CN-Bz, Re(CO)<sub>3</sub>Batho(SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>-CN-Bz について、1 x 10<sup>-5</sup>M 溶液を作成し、吸光度計を用いて吸光スペクトルを測定した。溶媒は Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz, Re(CO)<sub>3</sub>Batho(SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>-CN-Bz については、milliQ で、Re(CO)<sub>3</sub>Dp(COOH)<sub>2</sub>-CN-Bz については、167 mM NaOHaq で Re(CO)<sub>3</sub>Batho-CN-Bz については、MeCN とした。なお、測定は 200~800nm の波長を 2 nm 間隔で行った。

#### 蛍光測定-2

Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz, Re(CO)<sub>3</sub>Dp(COOH)<sub>2</sub>-CN-Bz, Re(CO)<sub>3</sub>Batho-CN-Bz, Re(CO)<sub>3</sub>Batho(SO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub>-CN-Bz について 1 x 10<sup>-5</sup>M 溶液を作成し、蛍光測定-1 と同様の手法で量子収率(F)を求めた。溶媒は吸光度測定-2 と同様のものを用いた。

#### 4. 研究成果

[Re(CO)<sub>3</sub>(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup>のコアを用いた錯体の設計、合成及び評価を行った。これまでに、2分子のピリジル基と Re の錯体が蛍光を発するという報告があったことから、リジンのイプシロンアミノ基にピリジル基を2個導入した薬剤(Lys(Dp))を作製した。また、本薬剤の消光には、インドール環が有効であるとの報告から、リジンにトリプトファンをアミノ基側(Trp-Lys(Dp))およびカルボキシル基側に結合した薬剤(Lys(Dp)-Trp)も作製し、それらのレニウム錯体を合成した(図2)。先ず始めに、これらの薬剤の吸収波長、蛍光波長、発光収率を評価した。Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp)の分光光度計のチャート(図3)および全化合物の測定結果を Table 1 に示す。

化合物	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\Phi$
Re(CO) <sub>3</sub> Lys(Dp)	270	350	<10 <sup>-4</sup>
Re(CO) <sub>3</sub> Trp-Lys(Dp)	280	350	0.005
Re(CO) <sub>3</sub> Lys(Dp)-Trp	280	350	0.002

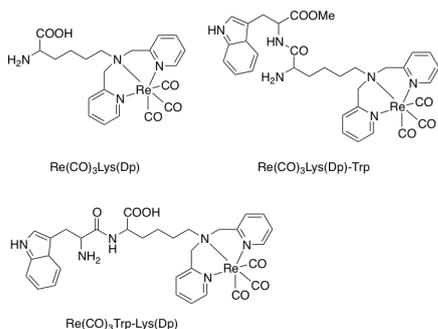


図2. Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp), Re(CO)<sub>3</sub>Trp-Lys(Dp) および Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp)-Trpの構造

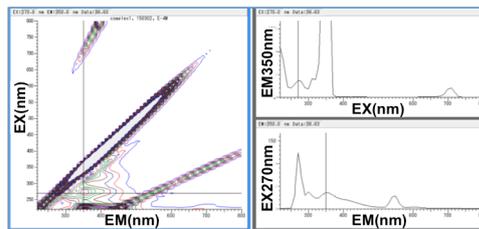


図3. Re(CO)<sub>3</sub>Lys(Dp)の吸収波長及び蛍光波長の測定結果

いずれの化合物も 270-280 nm 付近に吸収が 350 nm 付近に発光が見られた。しかしながら、蛍光収率は、いずれの化合物においても 0.005 以下と既報に比べて非常に小さい値を示した。既報では、エチレングリコール中で測定していたが、今回の測定では、生体に応用することを考え、水溶液中で測定したため、低い値となったと考えられた。また、Trp を付加することにより、蛍光収率が低下するどころか増加する結果となった。既報では、Re 錯体が吸収したエネルギーがインドール骨格に移動することで、蛍光収率が減少するとあったが、今回は Trp とすることで、Re 錯体とインドール環の距離が離れ、エネルギーの移動が行われず、またインドール環の光の吸収が影響し、蛍光収率が向上したと考えられた。しかしながら、いずれの化合物においても、極めて低い蛍光収率を示したことから、新たな配位子が必要と考えられた。

蛍光収率の低下は、2個のピリジル基のフレキシビリティが影響していると考え、2個のピリジル基が結合したジピリジル基を配位子とし、残りの配位部にベンジルイソニトリル(Bz-NC)を導入した新たな薬剤(Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz)を設計した。また、ジピリジル基にカルボン酸を導入した薬剤(Re(CO)<sub>3</sub>Dp(COOH)<sub>2</sub>-CN-Bz)の同様に合成した(図4)。また、ジピリジル基と同様に、

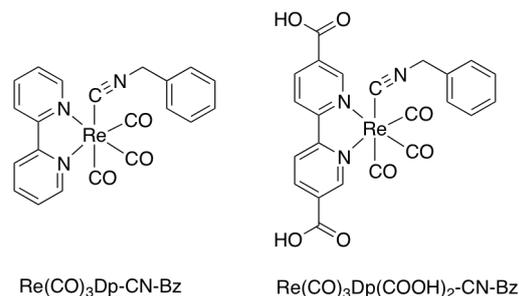


図4. Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz および Re(CO)<sub>3</sub>Dp(COOH)<sub>2</sub>-CN-Bz の構造

金属と配位することが知られている Bathophenanthroline (Re(CO)<sub>3</sub>Batho-CN-Bz) およびその disulfonic acid の Na 塩 (Re(CO)<sub>3</sub>Batho(COONa)<sub>2</sub>-CN-Bz) についても合成を行った(図5)。次いで先ほどと同様に、吸収波長、吸収波長および蛍光収率を測定した(Table 2)。

化合物	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\Phi$
Re(CO) <sub>3</sub> Dp-CN-Bz	310	520	0.045
Re(CO) <sub>3</sub> Dp(COOH) <sub>2</sub> -CN-Bz	320	550	0.014
Re(CO) <sub>3</sub> Batho-CN-Bz	320	532	0.004
Re(CO) <sub>3</sub> Batho(COONa) <sub>2</sub> -CN-Bz	320	536	0.038

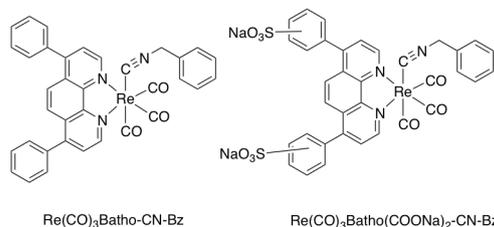


図 5 . Re(CO)<sub>3</sub>Batho-CN-Bz および Re(CO)<sub>3</sub>Batho(COONa)<sub>2</sub>-CN-Bz の構造

いずれの化合物も 310-320 nm 付近に吸収が観察され、520-550 nm 付近に発光が観察された。2 個のピリジン環構造に比べ、共役が多いことから、蛍光波長が超波長側に移行したものと考えられた。一方、蛍光収率は、Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz および Re(CO)<sub>3</sub>Batho(COONa)<sub>2</sub>-CN-Bz が 0.04 前後とこれまでに比べ高 10 倍高い値を示した。これは、2 個のピリジン環がベンゼン環で繋ぎ合わせるにより、配位子の構造がリジッドになり、エネルギーロスが減少したためと考えられる。また、各化合物のカルボキシル基付加体と比較すると、ジピリジン環の電子密度が蛍光収率影響し、直接電子吸引基を入れることで、電子密度が減少し、蛍光収率が低くなったと考えられた。以上のような検討より、最も高い蛍光収率を示した、Re(CO)<sub>3</sub>Dp-CN-Bz を基本キレート骨格として選定し、SLN 検出薬剤への応用に用いた。

SLN 検出薬剤に応用するためには、本キレート骨格に SLN 検出薬剤を結合する必要がある。そのため、カルボキシル基を有する Bz-NC を用い、そのカルボキシル基に SLN 検出薬剤を結合することにした。SLN 検出薬剤としては、SLN に存在するマクロファージを標的として、マクロファージに発現しているマンノース受容体あるいは走化性ペプチド受容体を考え、それぞれ、ヘキサマンノースおよび formyl-Met-Leu-Phe-Lys を用いた。現在、本薬剤を合成し、配位子と結合実験を行っているところである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上原 知也 (UEHARA Tomoya)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：10323403

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

鈴木 紀行 (SUZUKI Noriyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：10376379