

肝臓の有機アニオントランスポーター機能の
インビボ評価のための核医学分子
イメージングプローブの開発に関する研究

2014

屋木 祐亮

目次

緒言.....	1
第一章 鈴木カップリング反応を用いた ^{18}F 標識化合物合成法の開発とそれによる	
$[^{18}\text{F}]$ pitavastatin の合成.....	3
結果.....	5
考察.....	29
実験の部.....	32
第二章 肝臓の有機アニオントランスポーター機能のインビボ評価のための核医学	
分子イメージングプローブとしての ^{18}F 標識 pitavastatin 誘導体の開発.....	44
結果.....	46
考察.....	62
実験の部.....	66
結語.....	79
引用文献.....	80
謝辞.....	85

緒言

肝臓には有機アニオントランスポーター (OATP) のサブタイプ OATP1B1 及び OATP1B3 があり、アニオン性薬物の肝細胞内への取込みに関与している^{1,2}。それらには遺伝子多型が存在したり、薬物間相互作用を起こしたりすることがあるため、そのことが薬物治療に影響を与え、また副作用の発現に関与していることが報告されている^{3,4}。したがって、臨床において肝臓における OATP 機能のインビボ評価法の開発が望まれている。そこで、OATP の機能評価の開発には、非侵襲的に生体内分子の分布を特異的かつ高感度にイメージングできる核医学診断法が有用と考えられ、核医学分子イメージングプローブの開発研究が、近年盛んに行われている。しかし、ヒトでの肝取込みにおいて寄与率が高い OATP1B1 に対する選択性の低さや高い肝取込みクリアランスなどのために、これまで有効なプローブは開発されていない⁵⁻⁷。

そこで本研究では、高脂血症用薬である pitavastatin が主として OATP1B1 により取り込まれ、さらにその肝取込みクリアランスも肝血流速度の半分以下と取込み能の評価に適した性質を有していることに着目して^{8,9}、pitavastatin を母体化合物とした、肝臓 OATP 機能のインビボ評価のための核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。

まず、pitavastatin には構成元素としてフッ素が含まれていること、またフッ素には放射性同位体で PET 核種として優れた放射物理特性を有する ¹⁸F があることから、¹⁸F 標識 pitavastatin を合成することを計画した。この目的を達成するためには、標識体の合成法として、¹⁸F の半減期 (110 分) を考慮した短時間での高い放射化学的収率が希求条件となる。そのため、現在用いられている非放射性の pitavastatin の合成法¹⁰⁻¹³は合成経路、¹⁸F の導入法などの観点からその利用は難しく、新たに ¹⁸F 標識化合物に適した合成法の開発が要求された。そこで、合成の最終的な段階での ¹⁸F の効率よい導入を考え、4-iodophenyldiphenylsulfonium triflate¹⁴より得られた 4-[¹⁸F]fluoroiodobenzene ([¹⁸F]FIB)¹⁵を用いた鈴木カップリング反応¹⁶を行い、目的物を合成することに成功した。さらに、この反応にマイクロ波加熱^{17,18}を利用することで放射化学的収率を向上させることにも成功したが、同時にこの合成法では臨床利用するために必要な放射能を有する目的物を安定して得るのは難しいことも見出した¹⁹。

次に、上記の結果をもとに、臨床利用が可能なプローブを開発するために、高い放射化学的収率による合成、OATP1B1 への高い親和性と選択性などの因子を考え、

[¹⁸F]pitavastatin の誘導体を設計・合成することを計画した。そこで、代謝経路²⁰及び OATP の認識性⁸から、アニオン性を示すカルボキシル基を含むキノリン側鎖部分の構造は保持し、代謝安定性及び基質特異性の影響が少ないフルオロアリーのフルオロ基を、¹⁸F 標識体がより簡便、高収率で合成できるフルオロエトキシ基へと変換した PTV-F1 を設計した。その結果、[¹⁸F]PTV-F1 は 2 段階の反応で、放射化学的収率 $45 \pm 3\%$ 、放射化学的純度 99% 以上で得られ、[¹⁸F]pitavastatin の場合に比べ約 4 倍の放射化学的収率で合成することに成功した。また、細胞取込み実験において、PTV-F1 は pitavastatin と同様に、OATP 過剰発現細胞には高く取り込まれたが、OATP を発現していない細胞には取り込まれなかったことから、誘導体化が基質特異性に影響を与えず、PTV-F1 は OATP の基質になることを認めた。そこで、[¹⁸F]PTV-F1 を正常ラットに投与して肝臓での化学形を調べた結果、肝臓中でも安定に存在することが示された。さらに、ラットを用いて PET 撮像実験を行った結果、速やかな肝臓への取込み及び腸管への排泄が明瞭に描出され、また PET 測定から得た数値データから肝取込みクリアランスを integration plot 法²¹により解析したところ、肝取込みクリアランスは正常ラットでは 11.0 ± 2.1 mL/min/kg となり、取込み能解析に適した値を有することが示された。また、OATP1B1 阻害剤リファンピシン²²を同時投与したラットでは肝取込みクリアランスは約 1/5 に低下し、本化合物は OATP 特異的に取り込まれることが示された。さらに、合成および精製の条件検討の結果に基づいた自動合成法の確立、安全性の確認なども行い、本化合物が臨床応用可能な OATP 機能評価のための核医学分子イメージングプローブとなりうることを見出した。

以上、本研究は、肝臓における有機アニオントランスポーター機能のインビボ評価のための核医学分子イメージングプローブの開発に関する基礎的成果をおさめたものであり、これらの知見は今後の薬物体内動態研究、臨床での薬物治療に有益な情報を提供するものと考えられる。

これらの結果について、以下に詳述する。

第 1 章

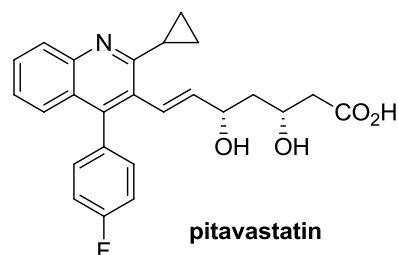
鈴木カップリング反応を用いた ^{18}F 標識化合物合成法の開発と それによる ^{18}F pitavastatin の合成

有機アニオントランスポーター (OATP) は肝臓におけるトランスポーターの一つであり、異物の代謝排泄に重要な役割を担っている^{1,2}。特に OATP1B1 及び OATP1B3 は肝取込みや多数のアニオン性化合物の輸送に関与するため、OATP の機能差によって薬物の治療効果に影響を及ぼすことが分かっている。その OATP の機能差は遺伝子多型や薬物間の相互作用によって起こるため、個人差が大きいと考えられている^{3,4}。しかし、これまで OATP の機能評価法は確立されておらず、機能差による影響を判断することはできないため、あらかじめ治療効果や副作用の発現を予測することは困難である。

一方、核医学分子イメージング法は、非侵襲的に生体内分子の分布を特異的かつ高感度にイメージングできる機能診断法として注目されている。その中でも、陽電子断層撮像法 (Positron Emission Tomography, PET) は単光子放出断層撮像法 (Single photon emission computed tomography, SPECT) に比べ高感度で定量性に優れている^{23,24}。そのため、臨床での OATP 評価のために核医学イメージング法の利用が注目されている。

これまでに生体内 OATP 機能評価のために様々な PET 用核医学分子イメージングプローブが検討されてきたが、それらはヒトにおける肝取込みの寄与率が高い OATP1B1 に対する低選択性や肝取込み能評価に適した肝取込みクリアランスを有していないことなどから OATP 機能評価に有効なプローブは見出されておらず、新たな PET プローブ開発が求められている⁵⁻⁷。

そこで本研究では、高脂血症治療薬である pitavastatin が OATP1B1 により選択的に肝臓へ取り込まれることに着目して、pitavastatin をイメージングプローブ開発における母体化合物として選択した。Pitavastatin の肝取込みクリアランスは肝血流量の 50% 以下であり、OATP1B1



による取込み能評価に適した値を示すことが報告されている^{8,9}。さらに構造中にフッ素原子を有しており、PET 核種である ^{18}F を用いることで物理的及び化学的性質を維持したまま、PET プローブ化が可能であると考えた。

しかし、 ^{18}F pitavastatin の合成には ^{18}F の半減期、導入法の観点から新たな合成法の開発が必要となった。そこで、芳香環に直接 ^{18}F を導入する必要がある ^{18}F pitavastatin の合

成には ^{18}F 標識化試薬を用いた方法が有用と考え、その ^{18}F 標識化試薬として $[^{18}\text{F}]\text{fluoroiodobenzene}$ を用い、鈴木カップリング反応によって合成することを計画した。

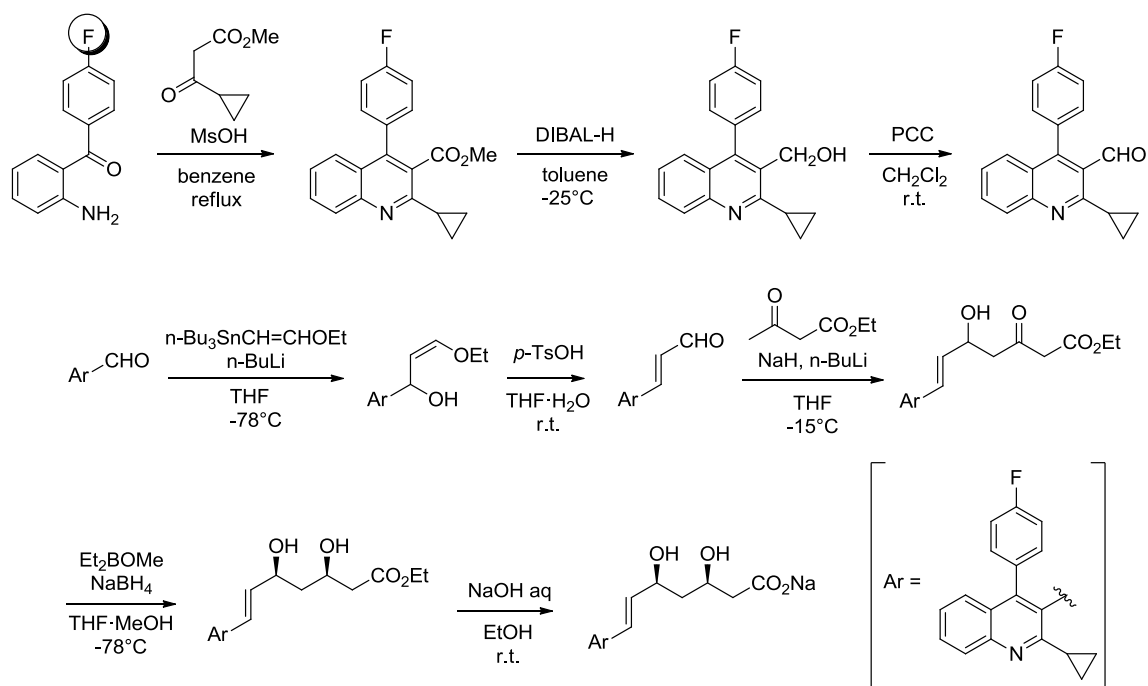
以上より、本章では $[^{18}\text{F}]$ フッ素アリアル誘導体との鈴木カップリング反応を用いた ^{18}F 標識化合物合成法の開発とそれによる $[^{18}\text{F}]\text{pitavastatin}$ の合成を行った。

これらの結果について、以下に詳述する。

結果

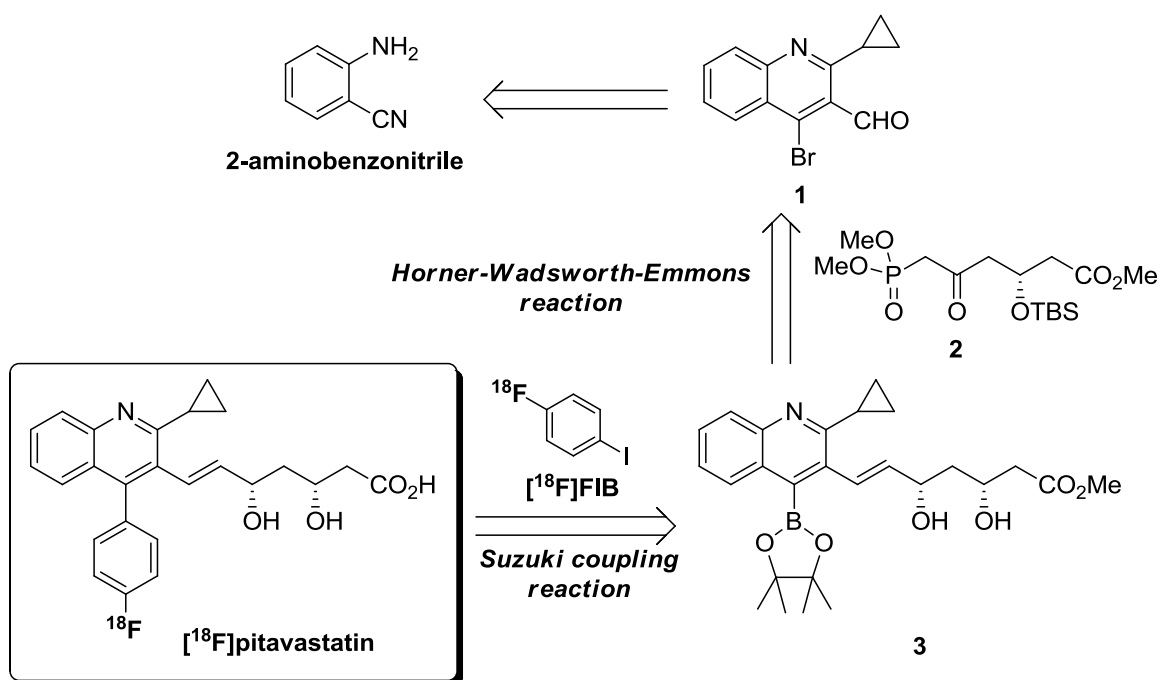
1. ^{18}F 標識を指向した pitavastatin の新規合成経路の開発

従来の pitavastatin 合成法¹⁰⁻¹³では、フッ素原子が合成序盤に導入されており、半減期が 109.7 分の ^{18}F を導入した [^{18}F]pitavastatin の合成への応用は困難であるため、合成終盤におけるフッ素原子の導入を目的とした新規合成経路の開発を検討した (Scheme 1-1)。



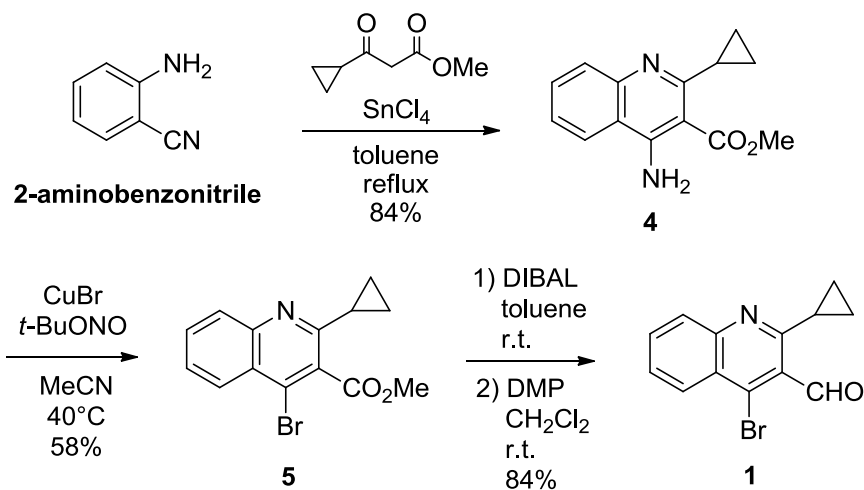
Scheme 1-1. Previous synthetic strategy of pitavastatin¹⁰⁻¹³

合成終盤における ^{18}F の導入を考慮し、鈴木カップリング反応を鍵反応とした pitavastatin の合成経路について逆合成解析を示す (Scheme 1-2)。 ^{18}F pitavastatin はボロン酸エステル **3** と 4- ^{18}F fluoroiodobenzene (^{18}F FIB) との鈴木カップリング反応によって合成することとした。そしてボロン酸エステル **3** の側鎖部分は不斉活性リン酸エステル **2**²⁶ を用いた Horner-Wadsworth-Emmons 反応によって導入し、キノリン誘導体 **1** は 2-aminobenzonitrile より誘導することを計画した。



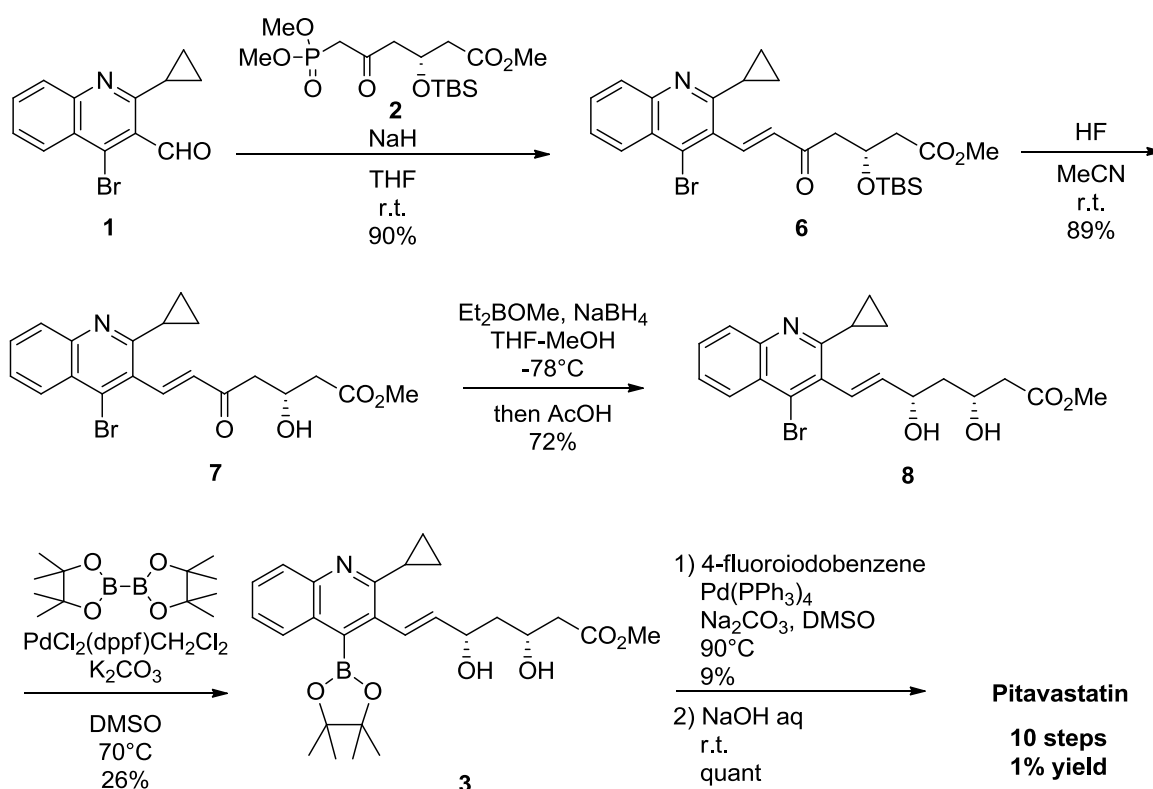
Scheme 1-2. Retrosynthetic analysis of ^{18}F pitavastatin by using the Suzuki-coupling

まず、逆合成解析に従い、アルデヒド **1** の合成を検討した (Scheme 1-3)。2-aminobenzonitrile に対し、四塩化スズを用いた Friedlander 反応^{27,28} によってアミノキノリン **4** とした後、臭化銅を用いたザンドマイヤー反応によってアミノ基をブロモ基へと変換し、ブロモキノリン **5** を得た。DIBAL 還元によってメチルエステルをアルコールに変換した後、Dess-Martin 酸化によってアルデヒド **1** を得た。



Scheme 1-3. Synthesis of aldehyde **1** from 2-aminobenzonitrile

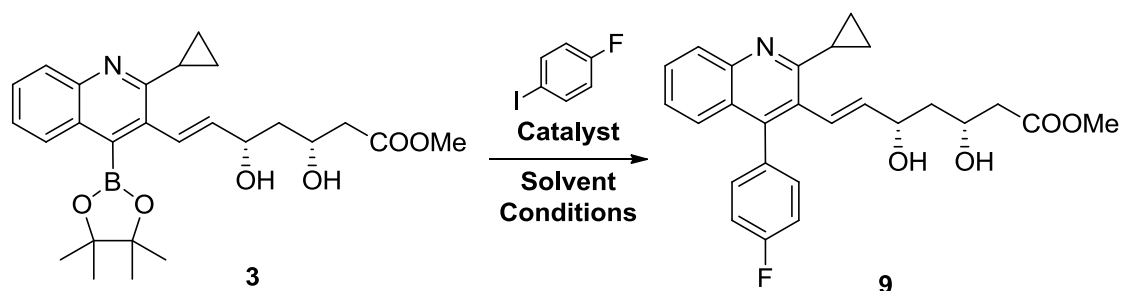
続いて、アルデヒド**1**と光学活性リン酸エステル**2**に対し、水素化ナトリウムで処理し、Horner-Wadsworth-Emmons 反応によって光学活性エステルを有したキノリン**6**を得た(Scheme 1-4)。そして、フッ化水素酸で処理すると、89%の収率でβ-ヒドロキシエステル**7**が得られた。さらに、ジエチルメトキシボランを用いたカルボニル基のジアステレオ選択的な還元反応によりジオール**8**を単一で得られた。次に、著者はブロモ基をボロン酸エステルに変換する際にまず、ジオール基の保護(アセトナイド基、アセチル基)を行った。ジオール保護体に対し、パラジウム触媒存在下、bis(pinacolato)diboron を作用させたが、分解物のみが得られる結果となった。そこで、無保護の状態で行ったところ、反応が進行し、ボロン酸エステル**3**を得ることができた。DMSO中、Pd(PPh₃)₄及び炭酸ナトリウム存在下において加熱したところ、鈴木カップリング反応の進行し、カップリング体が得られた。最後に、水酸化ナトリウム水溶液で処理することで、10工程、総収率1%でpitavastatinを得た。結果として鈴木カップリング反応を用いたpitavastatinの新規合成経路を確立した。



Scheme 1-4. Synthesis of aldehyde **1** from 2-aminobenzonitrile

次に、 ^{18}F pitavastatin の合成に向けて、さらなる鈴木カップリング反応の最適化を行った (Table 1-5)。DMSO 中、炭酸ナトリウム存在下において 2 種類のパラジウム触媒 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 及び $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$ を用いて検討したところ、反応の進行は確認されたが長時間の加熱が必要であった (Table 1-1, entry 1,2)。また、2 種類の触媒を同時に用いた場合に、最も反応効率が良かった (Table 1-1, entry 3)。しかし、 ^{18}F 標識を考慮し短時間での反応を行ったが、目的物は得られなかった (Table 1-1, entry 4,5)。そこで、反応液の攪拌の効率化、反応温度上昇の効率化などから反応を短時間で効率よく行えると期待されるマイクロ波反応装置を用いることを考え、検討したところ、短時間で反応が進行し、マイクロ波加熱による本反応の促進が確認できた (Table 1-1, entry 6,7)。

Table 1-1. Suzuki coupling reaction from boronic ester **3** with 4-fluoriodobenzene



Entry	Catalyst	Conditions		MW ^a	Yield [%] ^b
		temp.[°C]	time [min]		
1	$\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$	90	540	-	<10
2	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$	80	540	-	<10
3	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$	90	540	-	50
4	$\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$	90	30	-	n. r.
5	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$	120	10	-	n. r.
6	$\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$	120	10	+	<10
7	$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4/\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$	120	10	+	<10

a: Microwave: Discover from CEM; power = 200 W, pressure = 250 psi

b: Yields was determaind from LC-MS; n. r. = no reaction

2. 放射性薬剤合成を目的とした新規マイクロ波反応装置の基礎検討

前述した結果において、マイクロ波加熱による鈴木カップリング反応の促進が確認されたため、 ^{18}F pitavastatin の合成にマイクロ波加熱を用いることを計画した。しかし、現在市販されているマイクロ波反応装置では発振器にマグネトロンを用いており、放射性薬剤合成における少量の反応溶媒に対して十分なマイクロ波効果を与えることは困難であると予想された。そこで、放射性薬剤合成への利用を目的とし、発振器に固体素子を用いた新規マイクロ波反応装置の開発を行った。

以下、新規マイクロ波反応装置の加熱性能評価及び ^{18}F 標識化合物合成への応用の検討について詳述する。

2-1. 新規マイクロ波反応装置の特徴

マイクロ波合成は 1986 年に Gedye¹⁷ や Giguere¹⁸ らによってガラス封管中に反応物を電子レンジを用いて加熱する合成が報告されて以来、反応時間の短縮、収率及び選択性の向上などのさまざまな報告がなされている²⁹⁻³³。しかし、マイクロ波反応装置としては問題が多く、近年になってようやく化学反応に応用できる小型の化学合成用のマイクロ波照射装置が開発された³⁴。また、最近短半減期核種を用いることから短時間合成が必要とされる PET イメージングプローブ合成においてもマイクロ波反応装置の応用が注目されている。特に ^{18}F 標識反応においては主に高温条件を必要とすることが多いため、マイクロ波加熱を利用することで合成時間の短縮、収率向上、副生成物の抑制などが期待できる³⁵⁻³⁸。しかし、 ^{18}F 標識反応では通常の有機反応と比べ、反応溶媒量が非常に少なく物質濃度は希薄なため効率的なマイクロ波照射が一般的に難しい。特に、出力の大きいマグネトロンを発振器として用いる市販のマイクロ波照射装置では少量の溶媒に対し適切な電力でマイクロ波照射することが難しく、十分なマイクロ波効果は得られない。

所属研究室と株式会社サイダ・FDS との共同で最近開発された新規の装置は、マイクロ波（波長：1 mm～1 m の電磁波）の中でも無線通信以外の産業用途に許された ISM 帯（周波数 2.4 GHz～2.5 GHz）を電力目的で利用した、放射性薬剤合成用小型マイクロ波照射装置である。この装置はマイクロ波の発振・制御部を別体とすることで、加熱目的物を配置する照射ユニットをホットセル内のわずかな場所にも納められるサイズになっている。さらに導波管などを用いず、アンテナから直接、共振空洞へ電磁波エネルギーを照射する構造も小型化の一因である (Figure 1-1)。

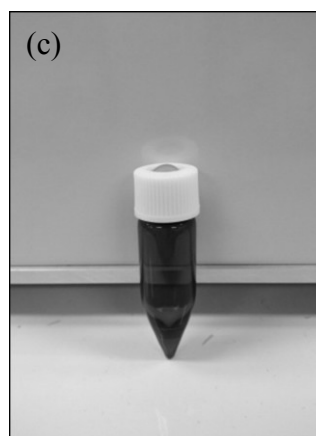
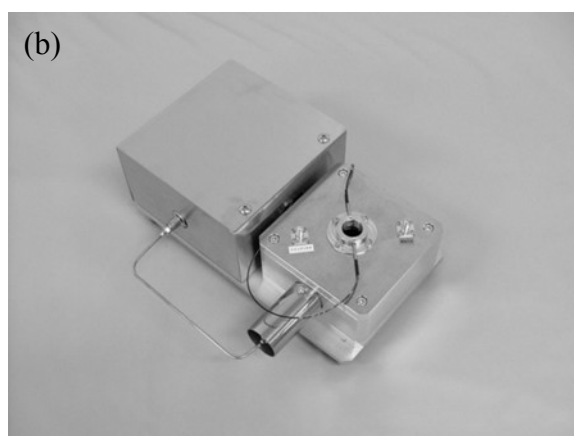
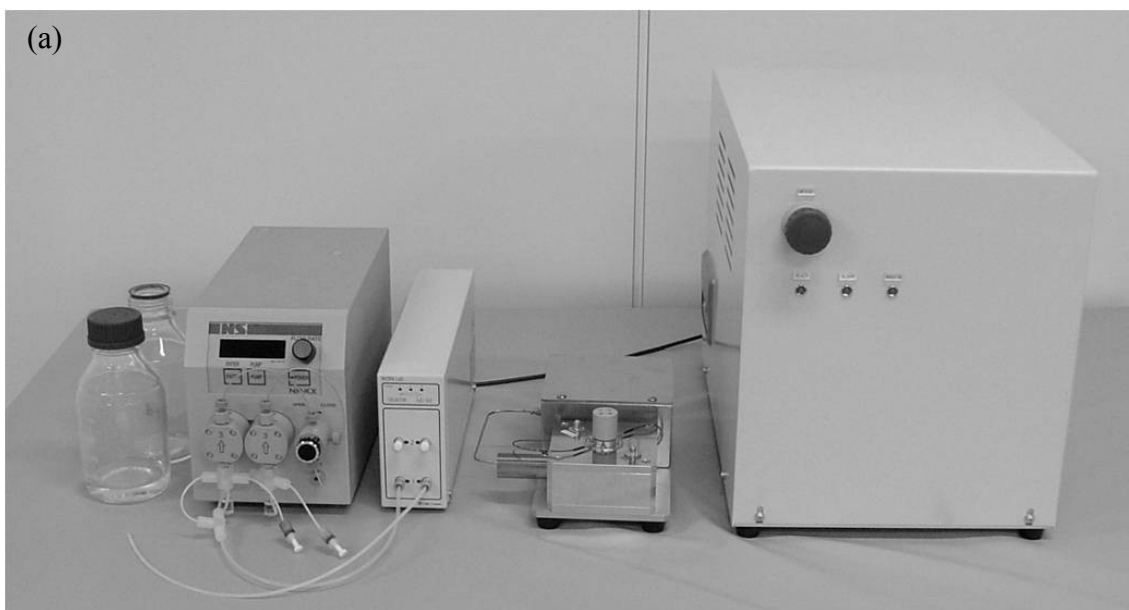


Figure 1-1. (a) Resonance-type microwave reactor system (Left: liquid delivering unit, Center: resonant cavity, Right: oscillation unit). (b) Resonant cavity (TM010 mode); inner diameter: ϕ 82 mm, inner height: 30 mm, outer size; depth: 16 cm, width: 23 cm, height: 9 cm. (c) Screw-cap pressure vessel.

家庭用の電子レンジも同じマイクロ波を利用して食品などを加熱するが、加熱領域の電磁界分布が予測困難な電子レンジに対して、本装置は、電場と磁場の分布が精密に計算された共振空洞内で最もエネルギーの得やすい場所に加熱目的物を配置する構造を有し、少ない電力で効率の良い加熱を実現することができる。このような精密に計算された共振空洞へマイクロ波を伝搬させるためには、加熱目的物を含めた空洞内全体に共振するように、マイクロ波の周波数を同調させる必要がある。本装置は電磁界のフィードバック制御と 2.4 GHz~2.5 GHz で精密に周波数可変な固体発振器を使用することで実現した。

本装置による加熱とは、加熱目的物自身が電磁波エネルギーを吸収することにより、マイクロ波が浸透する範囲（水の場合、電力が半減する深度は 1 cm ほど）で内部から均一に昇温させることを意味する。加熱されやすい溶媒は、例えば、水、アセトニトリル、DMSO などの極性溶媒である。加熱のしくみは、分極が極大になるのに必要な時間（緩和時間）程度の周期をもつ電磁波の交番電界に、極性分子の振動が少し遅れて追従するために発熱すると言われている³²。

また、一般に容器の材料として使用される硼珪酸ガラスやポリプロピレンなどはマイクロ波の吸収が少ない。容器を素通りしたマイクロ波は吸収の良い溶媒を集中的に加熱する。

そのため、放射性薬剤合成のような極少量のサンプルを加熱する際は、容器の熱容量の影響が少なく、エネルギーは熱伝導よりはるかに早く目的物に到達するため、ヒーターのような外部加熱条件に比べてサンプルのみを瞬時に均一に加熱することができる。

硼珪酸ガラス製バイアル (Figure 1-1c) に溶媒を 1 mL を入れた時の電界分布シミュレーションにおいて、電気力線が加熱目的物である溶媒によく集中して密になっていることを示している (Figure 1-2)。

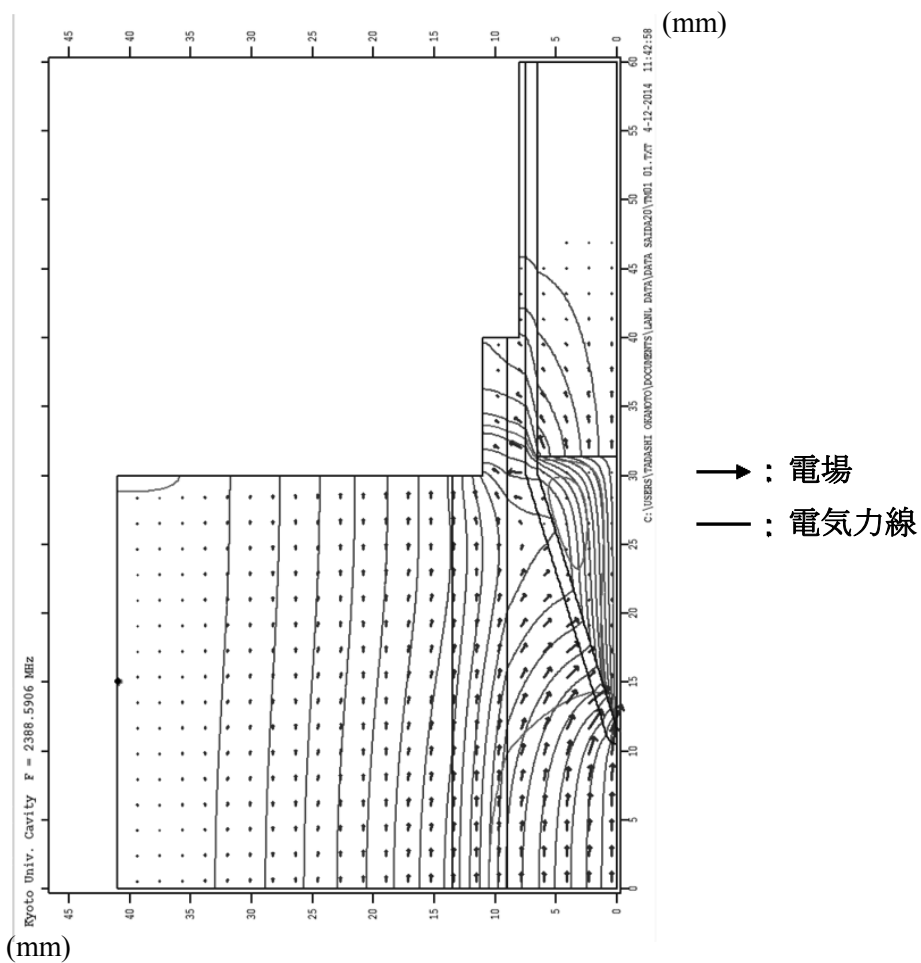


Figure 1-2. Simulation of the electromagnetic field in the left half of a borosilicate vessel containing 1 mL of solvent.

2-2. 加熱性能評価

本装置 (SAIDA) と CEM 社によって ^{18}F 化合物の合成をはじめとするマイクロ波加熱を用いた放射性薬剤合成の目的で開発されたマイクロ波照射装置 (PETWave) において、MeCN の温度上昇速度について比較を行った。溶媒量を 200 μL に定め、設定温度は 60°C、沸点温度の 80°C の 2 種類の条件で行い、また溶媒量の 500 μL 、100 μL 、50 μL の 3 種類についても同様な実験を行った (Table 1-2)。本装置ではマイクロ波照射開始より約 30 秒以内で設定温度に達した後、安定した温度保持を経て、照射が終了した。一方、PETWave においては設定温度に達するまで 3 分以上要し、さらに 80°C の場合、20 分以上照射したが、設定温度に達しなかった。また、PETWave では溶媒量の減少に伴い加熱効率の低下が見られたが、本装置の加熱効率は変化しなかった。結果として、本装置のマイクロ波照射による加熱効率は PETWave に比べ優れていることが示された。

Table 1-2. Evaluation of a heating effect in MeCN (mean \pm SD, n = 3)

Temperature (MeCN, 200 μL)	Time to reach temperature (s)		Warming rate ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$)	
	SAIDA	PETwave	SAIDA	PETwave
60°C	8 \pm 1	188 \pm 5	4.3 \pm 0.3	0.17 \pm 0.01.
80°C	12 \pm 0	>1200 (68°C)*	4.3 \pm 0.1	n.d.
Volume (MeCN, 80°C)	Time to reach temperature (s)		Warming rate ($^{\circ}\text{C}/\text{s}$)	
	SAIDA	PETwave	SAIDA	PETwave
500 μL	17 \pm 4	91 \pm 6	2.9 \pm 0.5	0.58 \pm 0.04
200 μL	12 \pm 0	>1200 (68°C)*	4.3 \pm 0.1	n.d.
100 μL	13 \pm 1	>1200 (56°C)*	4.0 \pm 0.2	n.d.
50 μL	12 \pm 1	>1200 (58°C)*	4.0 \pm 0.3	n.d.

n.d.: not detected, *: Highest temperature

次に、その他の有機溶媒 (DMF, DMSO, MeOH, toluene, THF) においても温度上昇速度について同様に評価した (Table 1-3)。高沸点溶媒である DMF や DMSO において、高温条件でも素早い温度上昇が見られ、さらにプロトン性溶媒である MeOH では最も速い温度上昇速度が得られた。誘電損失が比較的小さい toluene そして THF の評価において、多少の温度上昇速度の低下が見られたが、問題なく加熱できた。

Table 1-3. Evaluation of a heating effect in other organic solvents for PET synthesis (mean \pm SD, n = 3)

Solvent*, Temperature	Time to reach temperature (s)	Warming rate ($^{\circ}$ C/s)
DMF, 60 $^{\circ}$ C	7 \pm 1	4.8 \pm 0.5
DMF, 80 $^{\circ}$ C	10 \pm 1	5.6 \pm 0.3
DMF, 150 $^{\circ}$ C	33 \pm 1	3.6 \pm 0.1
DMSO, 60 $^{\circ}$ C	7 \pm 1	4.7 \pm 0.5
DMSO, 80 $^{\circ}$ C	12 \pm 1	4.9 \pm 0.6
DMSO, 180 $^{\circ}$ C**	35 \pm 2	4.3 \pm 0.1
MeOH, 65 $^{\circ}$ C	6 \pm 1	5.8 \pm 0.4
Toluene, 60 $^{\circ}$ C	13 \pm 1	2.7 \pm 0.2
Toluene, 80 $^{\circ}$ C	18 \pm 1	2.9 \pm 0.2
Toluene, 110 $^{\circ}$ C	29 \pm 0	2.8 \pm 0.1
THF, 65 $^{\circ}$ C	11 \pm 2	3.5 \pm 0.3

*: 200 μ L of solvents were used. **: The highest of preset temperature.

2-3. ^{18}F 標識化合物合成への応用の検討

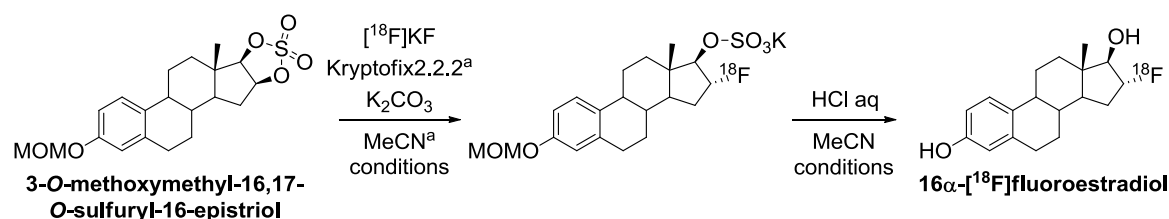
次に、本装置の有用性を評価するために、臨床応用されている 3 種類の ^{18}F 標識化合物について合成検討を行った。

^{18}F Fluoroestradiol (^{18}F FES)

エストロゲン受容体評価用プローブの 16α - ^{18}F fluoroestradiol (^{18}F FES) の合成検討を行った (Table 1-4)。 ^{18}F FES は女性ホルモンであるエストロゲンの中で最も生理活性の高いエストラジオールの誘導体であり、エストロゲン依存性疾患の診断やホルモン治療の効果判定に役立つと期待されている^{39,40}。さらに乳がんのホルモン療法に対し、治療前の効果予測として腫瘍や転移巣のエストロゲン受容体の有無判定にも有用と考えられている。フッ素標識に汎用される脱離基であるスルホン酸エステル基が使われ、一般的にはフッ素化反応 10 分、脱保護反応 10 分で合成される。

まず、従来のホットプレートを用いる加熱条件 (外部加熱条件) で検討したところ、64 % の収率で目的物が得られた (Table 1-4, Entry 1)。しかし、外部加熱条件で反応時間をそれぞれ 2 分間にとると、脱保護反応が進行せず、目的物は得られなかった (Table 1-4, Entry 2)。そこで、本装置のマイクロ波加熱を用いると、それぞれ 1 分で反応は完遂し、収率 89 % で目的物が得られた。(Table 1-4, Entry 3)。さらに、前駆体量について検討を行ったところ、25 % まで低減しても、外部加熱条件とほぼ同等な収率が得られた (Table 1-4, Entry 4,5)。

Table 1-4. Rapid synthesis of 16α - ^{18}F fluoroestradiol using microwave reactor



Entry	Precursor	Conditions		MW	Yield [%] ^b
		fluorination	deprotection		
1	0.5 mg (1.27 μmol)	100°C, 10 min	100°C, 10 min	-	68 \pm 2
2	0.5 mg (1.27 μmol)	100°C, 2 min	100°C, 2 min	-	no reaction
3	0.5 mg (1.27 μmol)	100°C, 1 min	100°C, 1 min	+	89 \pm 2
4	0.25 mg (0.63 μmol)	100°C, 1 min	100°C, 1 min	+	78 \pm 7
5	0.125 mg (0.32 μmol)	100°C, 1 min	100°C, 1 min	+	70 \pm 9

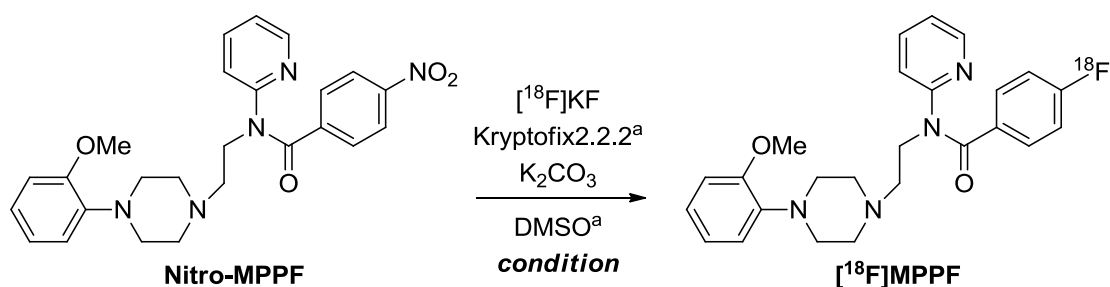
^a Kryptofix 2.2.2; 5.0 mg, MeCN; 100 μL

^b Determined from radio-TLC, Data are the mean \pm SD (n = 3)

4-[¹⁸F]Fluoro-*N*-[2-[1-(methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl-*N*-2-pyridinyl benzamide ([¹⁸F]MPPF)

芳香環に対するフッ素化反応のモデル化合物として、4-[¹⁸F]fluoro-*N*-[2-[1-(methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl-*N*-2-pyridinyl-benzamide ([¹⁸F]MPPF) を選択した (Table 1-5)。この [¹⁸F]MPPF はセロトニン (5-HT_{1A}) 受容体評価用プローブとして報告されている⁴¹。また、 [¹⁸F]MPPF は脱離基にニトロ基が使われ、一般的にはフッ素化反応 10 分で合成される⁴²。10 分間の外部加熱条件では収率が 47 %であったのに対し、本装置を用いた 1 分間のマイクロ波加熱では 74 %の収率で目的物が得られ、反応時間、収率ともに改善した (Table 1-5, Entry 1, 2)。また、前駆体量についても 25 %まで低減可能であることが示された (Table 1-5, Entry 3, 4)。

Table 1-5. Rapid synthesis of [¹⁸F]MPPF using microwave reactor



Entry	Precursor	Condition	MW	Yield [%] ^b
1	1.5 mg (3.25 μmol)	180°C, 10 min	-	47 ± 10
2	1.5 mg (3.25 μmol)	180°C, 1 min	+	74 ± 2
3	0.75 mg (1.63 μmol)	180°C, 1 min	+	56 ± 8
4	0.375 mg (0.81 μmol)	180°C, 1 min	+	44 ± 3

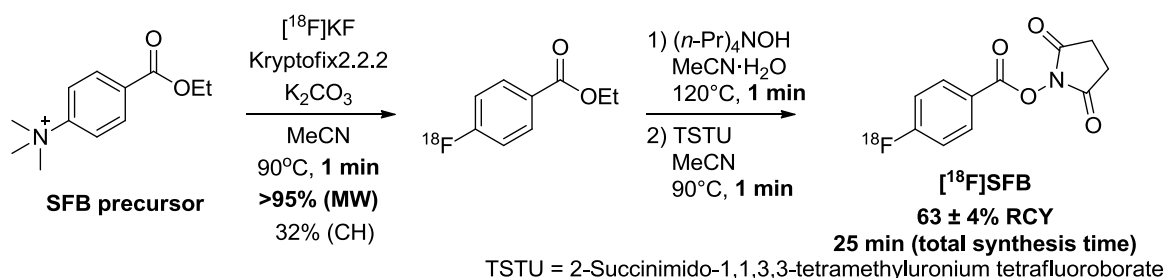
^a Kryptofix2.2.2; 5.0 mg, DMSO; 100 μL,

^b Determined from radio-TLC, Data are the mean ± SD (n = 3)

Succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB)

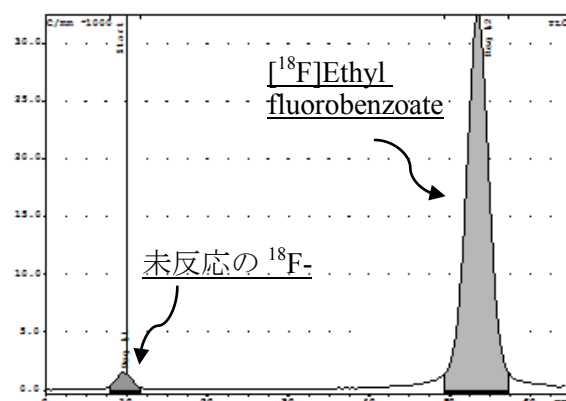
多段階反応 PET 合成モデル化合物としてペプチドや核酸などの標識試薬である Succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB)^{43,44} の合成検討を行った (Scheme 1-5)。 [¹⁸F]SFB はフッ素化、脱保護、活性エステル化と 3 段階の反応を経て合成される。そのため、1 時間近く合成時間を要する。

フッ素化、脱保護そして活性エステル化においてそれぞれ 1 分間のマイクロ波加熱を行い、固相抽出法による精製を行った。結果として総合成時間を 25 分で [¹⁸F]SFB を放射化学的収率 63 ± 4 % で合成することに成功した。特に、フッ素化反応の radio-TLC を用いた評価において、外部加熱条件 (CH) では 32 % の反応進行率であったが、マイクロ波加熱 (MW) では 95 % 以上となった (Figure 1-3)。



Scheme 1-5. Rapid synthesis of Succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate using microwave reactor

○マイクロ波加熱 (MW)



○通常加熱 (CH)

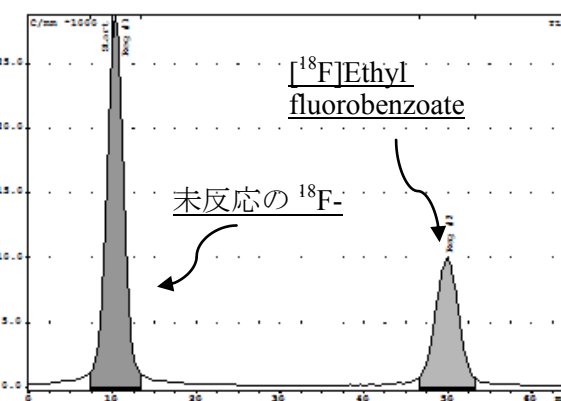


Figure 1-3. Radio TLC analysis of synthesis of ethyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate with microwave heating (MW) or conventional heating (CH)

3. 鈴木カップリング反応を用いた $[^{18}\text{F}]$ pitavastatin の合成

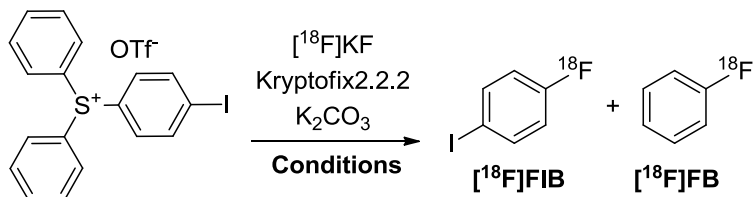
新規マイクロ波反応装置を $[^{18}\text{F}]$ pitavastatin 合成に用いることとし、まず鈴木カップリング反応に必要な $[^{18}\text{F}]$ FIB の合成検討に着手した。

当初、前駆体として diiodophenyliodonium tosylate^{44,45} を使用していた。しかし、精製段階において副生成物である iodobenzene の混入が避けられず、得られた $[^{18}\text{F}]$ FIB の比放射能は低かった。そこで今回、高い比放射能を有した $[^{18}\text{F}]$ FIB を得るために、近年報告された iodophenyldiphenylsulfonium triflate を用いた合成法について検討を行った。

3-1. 4- $[^{18}\text{F}]$ Fluoroiodobenzene ($[^{18}\text{F}]$ FIB) の合成

MeCN 中において $[^{18}\text{F}]$ KF 及び Kryptofix2.2.2 存在下で 80 °C で加熱したところ、反応進行率は 22 %であった (Table 1-6, Entry 1)。100 °C まで上昇させたところ、進行率は 2 倍となった (Table 1-6, Entry 2)。しかし、さらに反応時間を延長し、反応温度を上昇させたが、改善は見られなかった (Table 1-6, Entry 3-5)。そこで、DMF や DMSO で検討したところ、DMF 中 120 °C、10 分間加熱を行う条件が最も良かった (Table 1-6, Entry 6-10)。このときの HPLC 分析において、生成した $[^{18}\text{F}]$ FIB のピークと非標識体のピークは一致し、副生成物との分離も容易であった (Figure 1-4)。しかし、最適条件による反応後、HPLC 精製したが、DMF が高極性溶媒であるために単離収率は低かった。一方、MeCN による反応条件では、単離収率は大幅に向上し、さらに Sep-pak を用いた簡易精製で鈴木カップリング反応に使用可能な放射化学的純度を有する $[^{18}\text{F}]$ FIB が得られた。さらに、新規マイクロ波反応装置を用いることで収率及び反応時間が改善し、放射化学的収率 $56 \pm 3 \%$ 、放射化学的純度 95 %以上で $[^{18}\text{F}]$ FIB を得ることに成功した (Scheme 1-6)。

Table 1-6. Fluorination of 4-iodophenyldiphenyl sulfonium triflate



Entry	Conditions			Yield [%] ^a	
	Solvent	Temp. [°C]	time [min]	[¹⁸ F]FIB	[¹⁸ F]FB
1	MeCN	80	10	22	0
2	MeCN	100	10	44	6
3	MeCN	100	20	41	7
4	MeCN	110	10	42	9
5	MeCN	120	10	48	8
6	DMF	100	10	54	10
7	DMF	100	20	34	8
8	DMF	110	10	40	9
9	DMF	120	10	56	10
10	DMSO	100	10	20	9

a: Yield was determined by radio-HPLC

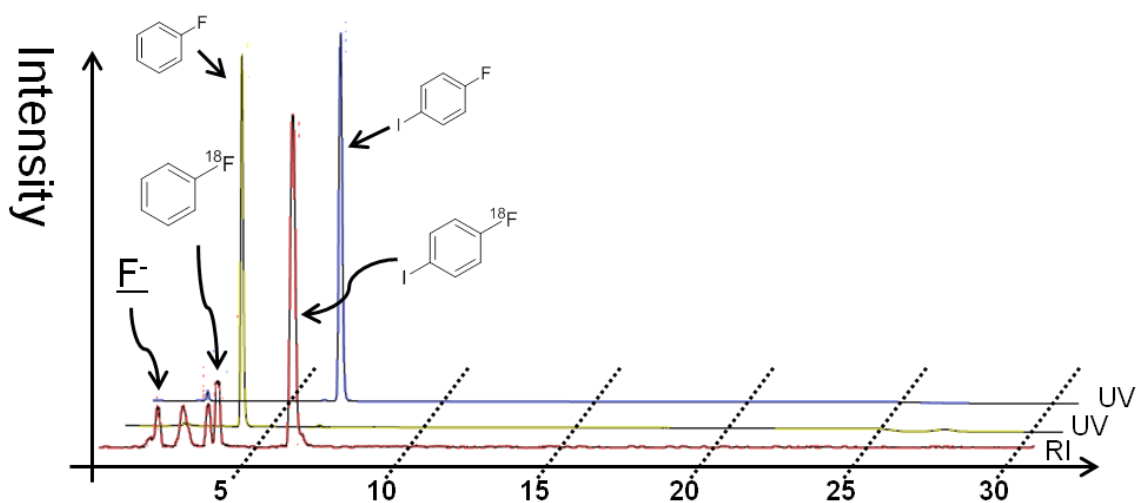
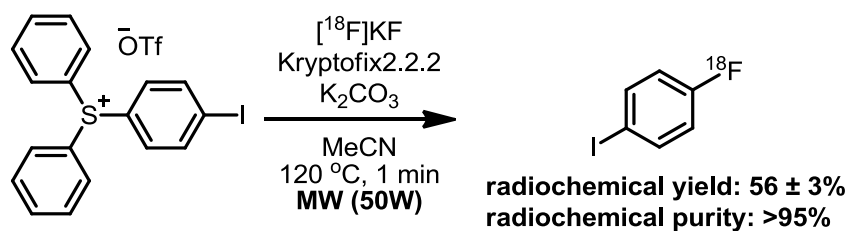


Figure 1-4. HPLC chart of [¹⁸F]FIB, [¹⁸F]fluorobenzene and cold products.

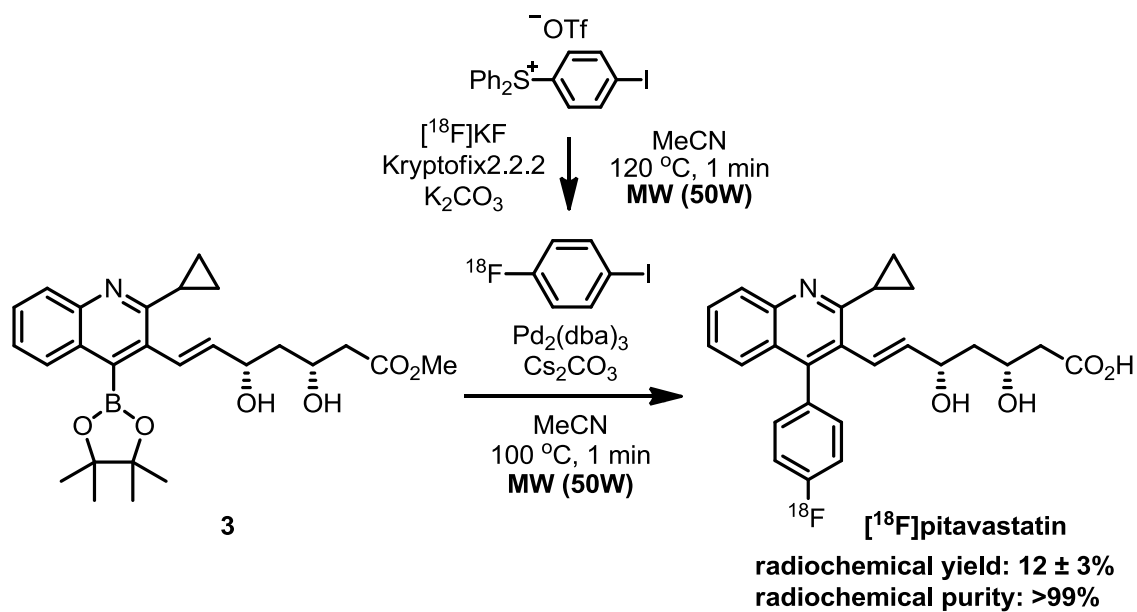


Scheme 1-6. Synthesis of [¹⁸F]FIB using microwave reactor

3-2. [¹⁸F]FIB を用いた鈴木カップリング反応検討

[¹⁸F]FIB を用いたボロン酸エステル **3** との鈴木カップリング反応検討を行った (Table 1-7)。

まず、非標識体を合成した反応条件では[¹⁸F]**9**は得られなかった (Table 1-7, entry 1-5)。そこで、パラジウム触媒を Pd₂(dba)₃ に変えたところ、反応は進行し、[¹⁸F]**9** が得られた (Table 1-7, entry 6-8)。さらに塩基に Cs₂CO₃ を使用することで収率が向上し、さらに脱保護反応が進行した[¹⁸F]pitavastatin も同時に得られた (Table 1-7, entry 9-11)。DMF を用いた反応条件が最も収率が良かったが、HPLC による精製を行ったが[¹⁸F]pitavastatin の単離収率は 10%以下となり、思うような結果は得られなかった (Table 1-7, entry 11)。そこで、次に収率の良い MeCN を用いる条件 (Table 1-7, entry 10) を採用し HPLC によって精製したところ、単離収率は 18 ± 4% となり DMF の場合よりも良好な結果が得られた。続いて反応温度を検討したところ、80°C では[¹⁸F]FIB が残存し、さらに温度を上げた 120°C では副生成物が増加した (Table 1-7, entry 12, 13)。さらに、マイクロ波照射下における加熱で反応進行率は 63 ± 3% となり、放射化学的収率も 28 ± 3% まで改善し (Table 1-7, Entry 14)、HPLC 分析においても非標識体のピークと一致した (Figure 1-5)。結果として、著者はマイクロ波照射下における 2 種類の反応を経て、[¹⁸F]pitavastatin を放射化学的収率 12 ± 3% (decay corrected from [¹⁸F]KF) で合成することに成功した (Scheme 1-7)。



Scheme 1-7. Synthesis of [^{18}F]pitavastatin by using the Suzuki coupling

4. [¹⁸F]Pitavastatin の肝臓 OATP 機能のインビボ評価用プローブとしての評価

4-1. [¹⁸F]Pitavastatin の *in vivo* における安定性評価

[¹⁸F]Pitavastatin 投与後の生体内放射能（血液、肝臓、胆汁）について正常ラットを用いて逆相 TLC を用いたオートラジオグラフィーにより分析を行った (Figure 1-6)。血液において、目立った代謝物は確認されなかった。一方、胆汁及び肝臓においては多少の代謝物は確認されたが、投与後 40 分後においても肝臓では 95 % 以上、胆汁では 80 % 以上が未変化体で存在していることを認めた。

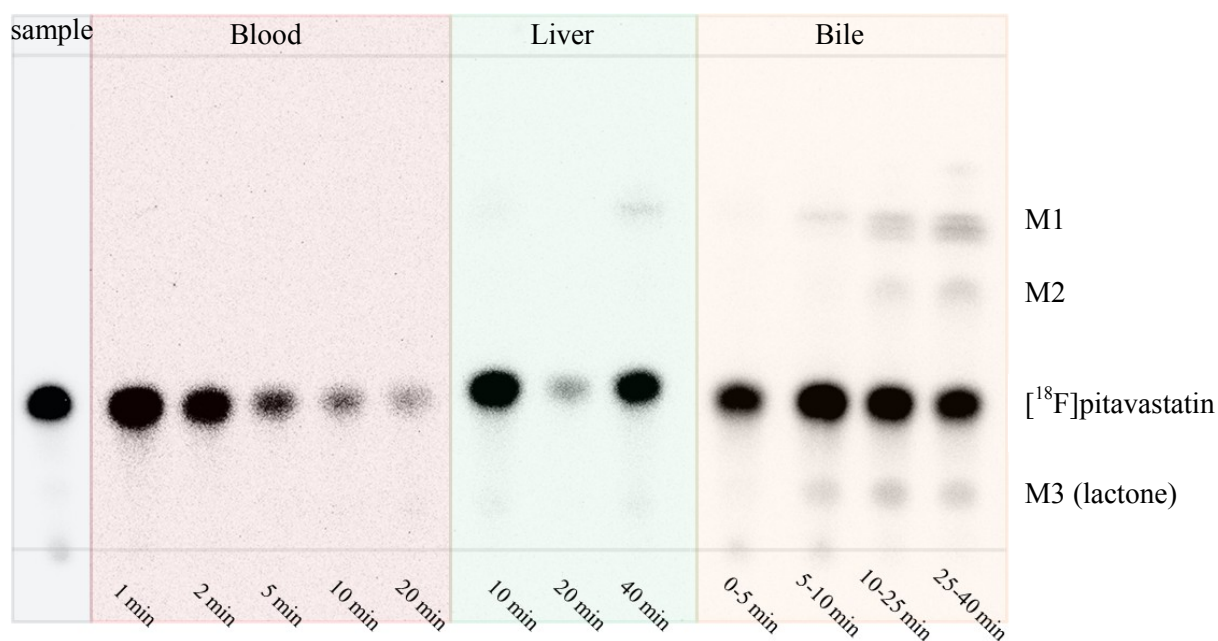


Figure 1-6. Representative TLC autoradiograms on the radio metabolite analysis after intravenous administration of [¹⁸F]pitavastatin in normal rat.

4-2. [¹⁸F]Pitavastatin を用いた正常ラットの体内動態評価

[¹⁸F]Pitavastatin の *in vivo* 基礎検討として正常ラット (SD ラット、8 週齢、雄性) を用いて体内動態を調べた (Table 1-8)。

無麻酔下において [¹⁸F]pitavastatin (148-396 kBq/100 μL) をそれぞれ尾静脈より投与し、投与後 2, 5, 10, 15, 30, 60 分にて屠殺後各臓器を摘出した。各臓器の放射能の測定結果より集積量 (% ID/organ) を算出した。その結果、投与後早期から肝臓における放射能が高く、10 分後において最大値 (71.5 %ID/organ) を示した。時間の経過に伴い、肝臓の放射能集積の低下及び腸の放射能集積の上昇が確認された。

Table 1-8. Biodistribution of [¹⁸F]pitavastatin in SD rat.

	%ID/organ ± SD (n = 5)					
	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
Blood*	9.70±1.09	3.77±0.43	2.26±0.15	1.54±0.15	0.99±0.14	1.07±0.60
Heart	0.19±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.12±0.02	0.12±0.04
Lung	0.30±0.02	0.18±0.04	0.11±0.02	0.09±0.02	0.03±0.01	0.06±0.03
Liver	69.56±1.66	70.11±2.74	71.54±3.40	68.05±6.38	54.11±5.13	32.61±3.69
Pancreas	0.22±0.08	0.06±0.03	0.06±0.02	0.05±0.04	0.03±0.02	0.04±0.02
Spleen	0.08±0.01	0.04±0.01	0.02±0.00	0.02±0.01	0.01±0.01	0.02±0.02
Stomach	0.18±0.03	0.29±0.21	0.10±0.10	0.34±0.31	0.28±0.33	0.12±0.04
Intestine	4.00±0.30	8.20±0.90	13.33±3.72	20.22±2.79	33.78±5.74	64.86±7.72
Kidney	7.46±0.37	2.13±0.34	1.25±0.27	0.97±0.25	0.68±0.10	0.55±0.19
Bone	0.04±0.02	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01

*Supposing that weight of blood in SD rat was 10 % of total body weight.

4-3. [¹⁸F]Pitavastatin を用いた正常ラットにおける PET 撮像及び解析

正常ラット (SD ラット、8 週齢、雄性) において PET 撮像を行った (Figure 1-7)。 [¹⁸F]pitavastatin (5-10 MBq/100 μL) をイソフルラン麻酔下 (1.5 %, 2.0 L/min) のラットに尾静脈投与し、投与後 60 分間血液採取を行いながら経時的に撮像した。また、OATP 阻害剤であるリファンピシン (1.5 μmol/min/kg) を持続静注しながら同様に撮像した。その結果、両群ともに集積量の絶対量は異なるが、投与後早期から放射能が肝臓及び腎臓へ集積し、他臓器における高い放射能集積は見られなかった。時間の経過に伴い、肝臓及び腎臓の集積は消失し、腸の放射能集積が増加していることが確認された。

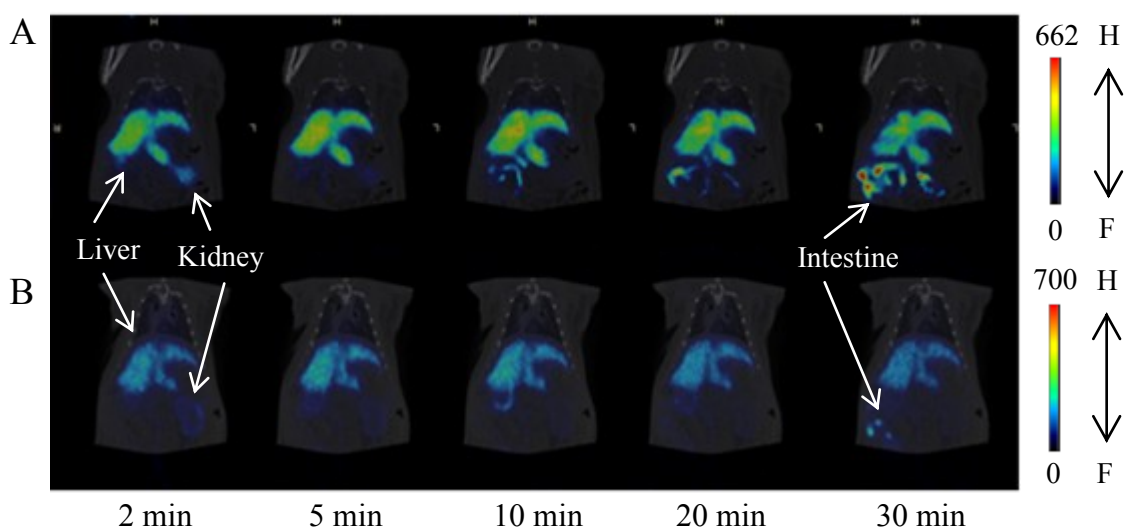


Figure 1-7. PET images of rat abdominal regions taken after intravenous administration of [¹⁸F]pitavastatin. Coronal maximum intensity projecting PET images of radioactivity in the abdominal region were captured at 2, 5, 10, 20 and 30 min in control rats (A), rifampicin-treated rats at an infusion rate of 1.5 μmol/min/kg (B).

PET 画像は解析ソフト PMOD を、血中の放射能は μ FmPC システムを用いて解析した (Figure 1-8)。血液中の放射能は両群ともに投与後 5 分で急速に低下し、30 分後には放射能がほとんどない状態となった。肝臓において、リファンピシン非処置群では投与後 9 分に最大 47% の集積を示し、それ以降は徐々に低下した。

一方、リファンピシン処置群では投与後 5 分において最大値を示したが、27% にとどまった。血液中の放射能はリファンピシン処置群では非処置群に比べ、滞留する傾向が見られた。

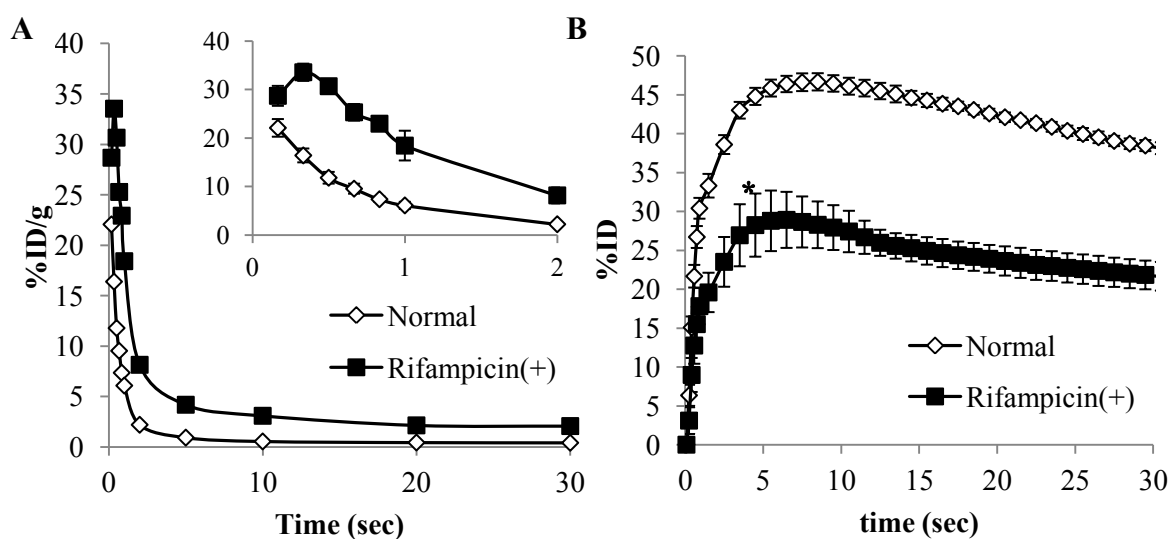


Figure 1-8. Time profiles of the radioactivity in blood from the μ FmPC system (A), liver quantified by PET imaging analysis 30 minutes after intravenous administration of [18 F]pitavastatin (B). Each symbol represents control rats and rifampicin-treated rats (1.5 mmol/min/kg for at least a 90-minute PET scan), with the bar of mean \pm SE (n = 3). Inset figures show the data points within 2 minutes.

AUC 及び integration plot 法により肝取込みクリアランス ($CL_{\text{uptake,liver}}$) 及び初期分布容積 (V_E) を算出した (Figure 1-9, Table 1-9)。AUC は非処置群に比べ、リファンピシン処置群が大きい結果となった。代謝及び胆汁排泄が無視できると考えられる投与後 5 分までの集積結果から、肝取込みクリアランスはそれぞれ 8.42 ± 0.63 、 2.06 ± 0.18 (mL/min/kg) となり、リファンピシン処置群において肝取込みクリアランスが約 20 %にまで有意に低下していることが示された。初期分布容積はそれぞれ 0.71 ± 0.14 、 0.38 ± 0.10 (mL/kg) となった。

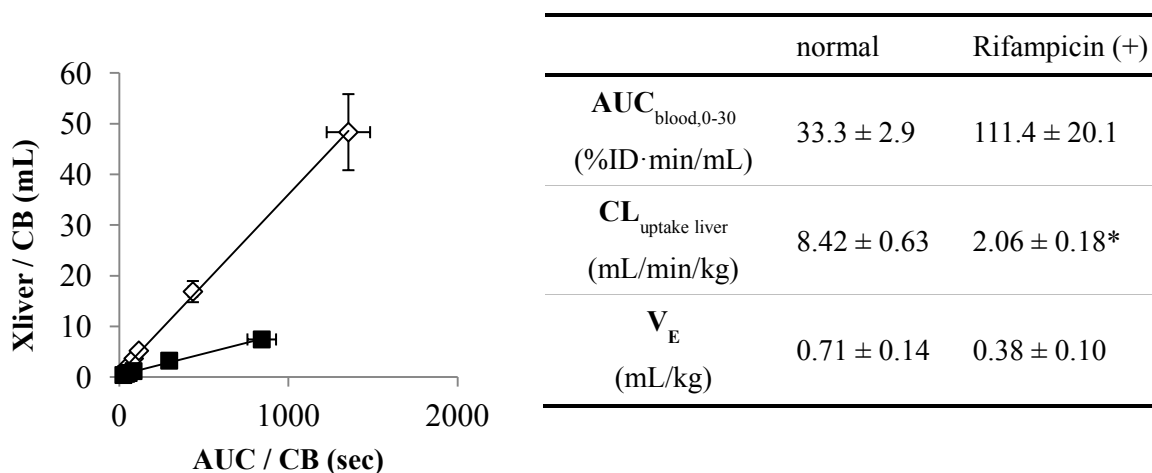


Figure 1-9. Integration plots were drawn for the calculation of hepatic uptake of total radioactivity in control rats and rifampicin-treated rats. The data represent the mean \pm SE (n = 3).

Table 1-9. Pharmacokinetic parameters of [^{18}F]pitavastatin after its intravenous administration in rats. The values represent the mean \pm SE (n = 3). (*t*-test, * $p < 0.05$).

考察

本章では、鈴木カップリング反応を用いた ^{18}F 標識化合物合成法の開発とそれによる ^{18}F pitavastatin の合成について検討した。

^{18}F 導入を考慮した pitavastatin の新規合成経路の開発を行った (Scheme 1-3, 4)。鈴木カップリング反応前駆体であるボロン酸エステル **3** の合成では、ジオール基に保護基があると反応が進行しなかった。これは、保護によって嵩高くなってしまい、bis(pinacolato)diboron が近づけないため、反応が進行せず、分解物となったと考えられる。一方、保護がない状態では、嵩高さが軽減され、さらに水酸基が bis(pinacolato)diboron のホウ素と相互作用した結果、反応が進行したと考えられる。

放射性薬剤合成への利用を目的とし、新規マイクロ波反応装置の開発を行った。

新規マイクロ波反応装置の加熱性能評価を行ったところ、MeCN (200 μL) において迅速な温度上昇を示し、さらに 50 μL へと溶媒量を減らしても温度上昇速度は低下しなかった (Table 1-2)。また、放射性薬剤合成に汎用される溶媒においても優れた加熱性能を示した (Table 1-3)。これらの結果から、本装置が少量の溶媒に対しても、マイクロ波照射シミュレーションで示しているように十分なマイクロ波効果を与えたと考えられる (Figure 1-2)。

結果として、本装置はわずかな物質質量で希薄な条件下において反応を行う放射性薬剤合成において非常に有用といえる。

^{18}F FES、 ^{18}F MPPF そして ^{18}F SFB を選択し、本装置を用いて ^{18}F 標識化合物合成検討を行った。 ^{18}F FES 及び ^{18}F MPPF おいて、外部加熱条件と比較して、反応効率及び収率の向上が見られた (Table 1-4, 5)。さらに、前駆体量の低減も可能であった。 ^{18}F SFB の合成でも総合成時間が短縮でき、かつ放射化学的収率も向上した (Scheme 1-5)。特にフッ素化反応では、反応進行率が約 3 倍向上した (Figure 1-3)。これらはマイクロ波加熱の特徴である内部加熱⁴⁷によって起こったと考えられる。外部加熱条件では容器の外側から温度が上昇するに比べ、マイクロ波加熱では容器内部の反応溶媒において急速な温度上昇が起こるため、均一な加熱が実現し、効率よく反応が進行した。また、マイクロ波には熱的な効果以外にマイクロ波そのものが収率や選択性に影響を与える非熱効果⁴⁸⁻⁵¹も数多く報告されていることから、この効果が本反応に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

Iodophenyldiphenylsulfonium triflate を用いた $[^{18}\text{F}]\text{FIB}$ の合成において、 $[^{18}\text{F}]\text{FIB}$ をマイクロ波加熱によって、短時間で収率良く得ることができた (Table 1-6)。しかし、DMF を用いた条件では単離収率は低かった。これは DMF が高極性溶媒のため、逆相カラムに目的物が保持されなかったと考えられる。そこで、低極性である MeCN を反応溶媒に用いることで、Sep-pak Light C18 による固相抽出精製で放射化学的純度 95 %以上を確保できた。

鈴木カップリング反応を用いた $[^{18}\text{F}]\text{pitavastatin}$ 合成検討において、非標識体合成と同様な反応条件では目的物は得られなかった (Table 1-7, Entry 1-5)。そこで、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ を用いると反応が進行した (Table 1-7, Entry 7)。鈴木カップリング反応は基質特異性が高く、基質によって反応条件が大きく異なることが多い⁵²。そのため、今回の反応に適していたパラジウム触媒が $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ であり、トレーサ量である $[^{18}\text{F}]\text{FIB}$ に対しても、パラジウムの酸化的付加反応が素早く進行し、カップリング体が生成したと考えられる。さらに、マイクロ波加熱を用いることで、収率の向上及び反応時間の短縮ができた (Scheme 1-7)。実際、鈴木カップリング反応に対し、マイクロ波加熱を使用することで収率の向上、ごく少量の触媒での進行が見られるなどの報告⁵³⁻⁵⁵があり、同様に反応の促進が起こったと予想される。そして、今回得られた結果からも、新たに開発したマイクロ波反応装置が非常に少ない物質質量に対しても使用可能であり、放射性薬剤合成に応用可能であることが示された。

正常ラットに $[^{18}\text{F}]\text{pitavastatin}$ を投与後、体内の化合物を分析し、生体内の安定性評価を行った (Figure 1-6)。胆汁中及び肝臓中に代謝物が確認されたが、投与後 40 分後においてもそれぞれ 80 %、95 %以上、未変化体で存在し、生体内において安定であることが示された。なお、代謝物として確認されたものは3種類であった。これらは、pitavastatin の代謝物に関する知見²⁰より、それぞれ M1 や M2 は側鎖の β 酸化や水酸化を受けた代謝物がさらにタウリンやグルクロン酸によって抱合されて極性が上昇した化合物と考えられる。また、M3 は pitavastatin よりも極性が低い化合物であることからラクトン体と予想される。

正常ラットを用いて $[^{18}\text{F}]\text{pitavastatin}$ の体内動態評価を行った (Table 1-8)。放射能集積は主に肝臓、腸、血液そして腎臓において確認され、他臓器への分布は見られなかった。これは報告されている非標識体の体内動態²⁰と酷似しており、生体内にて安定であることから鈴木カップリング反応によって合成した $[^{18}\text{F}]\text{pitavastatin}$ が生体内で OATP 機能を評価できる可能性を示している。

最後に、正常ラットを用いて、血液採取しながら、経時的に PET 撮像を行った (Figure 1-7)。その結果、投与後早期に肝臓や腎臓へ放射能集積が見られ、時間の経過に伴い、腸への移行が確認できた。これは体内動態評価の結果と一致しており、胆汁排泄されることを示している。また、OATP 阻害剤であるリファンピシン同時投与下で同様な実験を行ったところ、非処置群に比べ臓器集積は低下し、血液に放射能が滞留する傾向がみられた。これらの結果より、 $[^{18}\text{F}]$ pitavastatin は OATP 特異的に肝臓に取り込まれていることが示唆された。

さらに、得られた PET 画像より解析を行い、肝取込みクリアランスを算出した (Figure 1-9, Table 1-9)。排泄のパラメータを無視できると考えられる投与後 0-5 分間における解析結果より、肝取込みクリアランスは 8.42 ± 0.63 (mL/min/kg) となり、肝血流速度に近い値を示す $[^{11}\text{C}]$ TIC (55 mL/min/kg)⁵, $[^{11}\text{C}]$ Telmisartan (63 mL/min/kg)⁶ よりも半分以下の値を示し、肝取込み能評価に適していることが示された。また、リファンピシン処置群では非処置群に比べ、肝取込みクリアランスの有意な低下が見られた。以上の結果より、 $[^{18}\text{F}]$ pitavastatin は既存の PET プローブに比べても、より OATP 機能評価に適した性質を有することが示された。

しかし、実際に OATP の生体内評価のための核医学分子イメージングプローブとして臨床応用するためには、自動合成化が必須となる。 $[^{18}\text{F}]$ pitavastatin の合成はマイクロ波加熱を用いても収率は 12% に留まり、さらに $[^{18}\text{F}]$ FIB の揮発性や 2 段階合成も自動合成のためには問題となる。そのため、臨床利用に必要な量を安定して自動合成することは難しいと予想された。

実験の部

試薬・機器

$^1\text{H-NMR}$ は JEOL JNM-AL400, JEOL JNM-LA500 を用い、内部標準物質として tetramethylsilane (TMS)、測定溶媒として CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$ を用いて測定した。IR は島津社製 Shimadzu FTIR-8300 を用いて測定した。液体クロマトグラム質量分析計 (LC-MS) は定速ポンプ (LC-10AP, 島津製作所) に分光光度検出器 (SPD-10AP, 島津製作所) および MS 検出器 (MS-2010, 島津製作所) を用いて測定した。MS は Shimadzu GC-MS-QP Plus を用いて測定した。比旋光度は堀場製作所社製 Horiba SEPA-500 を用いて測定した。フラッシュカラムクロマトグラフィーは関東化学社製 Silica Gel 60N を用いた。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck 社製 Kieselgel 60 F-254 plates を用いた。分取用 TLC (PTLC) は Merck 社製 Silica gel 60 F-254 plate (0.5 mm) を用いた。分取用 HPLC は JAI LC-908 を用い、GPC カラムは JAIGEL 1H と 2H を用いた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は定速ポンプ (LC-8A or LC-20A, 島津製作所) に分光光度検出器 (SPD-20A, 島津製作所) およびオンライン RI 検出器 (US-3000 radioHPLC detector, ユニバーサル技研社) を接続した系を用いた。反応に用いた無水溶媒は、常法に従い無水としたものを用いた。試薬の多くは、Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Nacalai Tesque, Inc., Aldrich Chemical Inc. から購入した。また、ketophosphonate は日産化学株式会社より提供していただいたものを使用した。

^{18}F は京都大学医学部附属病院設置の住友重機械工業社製超小型サイクロトロン CYPRIS HM-18 及び太陽日酸製 [^{18}O] H_2O を用いて製造した。放射能は ALOKA 社製キュリーメーター (IGC-7)、PerkinElmer 社製オートウェルガンマカウンター (Wallac 1480 WIZARD 3) を用いて測定した。イメージングプレート及びその解析は富士フイルム社製 BAS SR2040、BAS-5000、MultiGauge image analysis program を使用し行った。Radio-TLC 分析は (miniGITA Star g-radioactivity TLC scanner, RAYTEST 社) を用いて行った。

PET 装置による画像の収集は、Triumph (TriFoil Imaging Inc., Chatsworth, CA, USA) を用いて行った。

略語

TBS: *tert*-Butyldimethylsilyl

TBAF: Tetrabutylammonium fluoride

OATP: Organic anion transporting polypeptide

SPECT: Single photon emission computed tomography

PET: Positron emission tomography

FIB: *p*-Fluoroiodobenzene

DIBAL: Diisobutylaluminium hydride

DMSO: Dimethylsulfoxide

MW: Microwave

DMF: Dimethylformamide

THF: Tetrahydrofuran

HPLC: High performance liquid chromatography

AUC: Area under the curve

FES: 16 α -Fluoroestradiol

MPPF: 4-Fluoro-*N*-[2-[1-(methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl-*N*-2-pyridinyl-benzamide

SFB: Succinimidyl 4-fluorobenzoate

TLC: Thin layer chromatography

¹⁸F 標識を指向した pitavastatin の新規合成経路の開発

Methyl (4-amino-2-cyclopropylquinolin-3-yl)carboxylate (4)

アルゴン雰囲気下、Methyl 3-cyclopropyl-3-oxopropanoate (20.0g, 140 mmol) のトルエン (280 mL) 溶液に 2-aminobenzonitrile (16.6 g, 140 mmol) を加えた。塩化スズ (IV) (73.3 g, 281 mmol) を水浴下 (15°C) において滴下した。室温にて 30 分攪拌した後、還流温度 (115°C) にて 3 時間攪拌した。室温まで冷却した後、飽和炭酸ナトリウム水溶液 (700 mL) を滴下し、析出した固形物を粉砕した。反応液をセライトろ過し、ろ液より酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (300 mL) にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで紫色固体 **4** (28.5 g, 84 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.59 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.64 (brs, 2H), 3.95 (s, 3H), 2.62 (tt, *J* = 8.0 Hz, 4.9 Hz, 1H), 1.24 (qd, *J* = 4.9 Hz, 2.6 Hz, 2H), 0.94 (dq, *J* = 8.0 Hz, 2.6 Hz, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.0, 161.9, 152.3, 147.7, 130.8, 129.2, 124.4, 120.4, 116.6, 103.5, 51.7, 17.2, 9.4 (2C); MS (EI⁺, 70 eV): *m/z*: 242 (M⁺, 100), 214 (98), 209 (76), 183 (86), 171 (30), 154 (28); HRMS calcd for C₁₄H₁₄N₂O₂ (M⁺): 242.1055, found 242.1060.

Methyl (4-bromo-2-cyclopropylquinolin-3-yl)carboxylate (5)

アルゴン雰囲気下、**4** (28.5 g, 117 mmol) の MeCN (280 mL) 溶液に臭化銅 (I) (29.5 g, 206 mmol) を加えた。亜硝酸 *tert*-ブチル (18.2 g, 176 mmol) を水浴下 (15°C) において滴下した。40°C にて 2.5 時間攪拌した後、室温にて一晩攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL) を加え、反応液をセライトろ過後、ろ液より酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (300 mL) にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 20/1) にて精製し、橙色油状物 **5** (20.9 g, 58 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.11 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.68 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.52 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H), 2.06 (tt, *J* = 8.0 Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.24 (qd, *J* = 4.6 Hz, 2.9 Hz, 2H), 0.94 (dq, *J* = 8.0 Hz, 2.9 Hz, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 167.8, 158.7, 150.8, 130.8, 130.7, 130.4, 129.2, 127.0, 126.9, 125.1, 53.0, 15.8, 10.7 (2C); MS (EI⁺, 70 eV): *m/z*: 305 (M⁺, 68), 277 (100), 262 (39), 246 (91), 226 (19), 167 (90); HRMS calcd for C₁₄H₁₂BrNO₂ (M⁺): 305.00509, found 305.00583.

(4-Bromo-2-cyclopropylquinolin-3-yl)carbaldehyde (**1**)

アルゴン雰囲気下、**5** (3.2 g, 10.4 mmol) の toluene (20 mL) 溶液に diisobutylaluminiumLithium hydride (1.0 M in hexane, 20.8 mL, 20.8 mmol) を氷浴下において滴下した。室温にて1時間攪拌後、氷浴下において5%硫酸水溶液 (200 mL) を滴下した。一晩攪拌後、反応液を酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水 (300 mL) にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで褐色固体 **5a** (2.3 g) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.10 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.23 (s, 2H), 2.53 (tt, $J = 8.0$ Hz, 4.2 Hz, 1H), 2.27 (brs, 1H), 1.29 (qd, $J = 4.2$ Hz, 3.1 Hz, 2H), 1.06 (dq, $J = 8.2$ Hz, 3.1 Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): 162.1, 147.8, 136.2, 131.6, 130.0, 129.0, 127.3, 126.7, 126.3, 62.4, 14.2, 11.5 (2C); MS (EI): m/z : 279 ($M+2$, 87), 277 (M^+ , 89), 260 (100), 248 (24), 179 (37), 167 (49); HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{BrNO}$ (M^+): 277.0102, found 277.0096

アルゴン雰囲気下、**5a** (1.0 g, 3.6 mmol) の CH_2Cl_2 (20 mL) 溶液に Dess-Martin reagent (1.7 g, 3.9 mmol) を氷浴下において加えた。室温にて3時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL) を加えた。酢酸エチルによって3回抽出した後、合わせた有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液及び飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた無色油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) にて精製し、無色固体 **1** (830 mg, 84 % yield, 2 steps) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 10.7 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.76 (brt, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.56 (brt, $J = 8.2$ Hz, 1H), 3.02 (tt, $J = 8.2$ Hz, 4.2 Hz, 1H), 1.24 (qd, $J = 4.2$ Hz, 3.1 Hz, 2H), 0.94 (dq, $J = 8.2$ Hz, 3.1 Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 194.0, 162.1, 149.0, 140.8, 132.5, 129.2, 127.2, 127.0, 126.8, 125.5, 14.2, 11.5 (2C); MS (EI $^+$, 15 eV): m/z : 275 (M^+ , 8.6), 247 (100), 196 (1.3), 168 (2.8); HRMS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{BrNO}$ (M^+): 274.9945, found 274.9939.

Methyl (3*R*,6*E*)-7-(4-bromo-2-cyclopropylquinolin-3-yl)-3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-5-oxohept-6-enoate (**6**)

アルゴン雰囲気下、水素化ナトリウム (0.73 g, 18.2 mmol, 60 % dispersion in oil) の THF (12.5 mL) 溶液にケトリン酸エステル **2** (7.0 g, 18.3 mmol) の THF (48 mL) 溶液を氷浴下において滴下した。同温度にて1時間攪拌した後、**1** (4.81 g, 17.4 mmol) の THF 溶液 (75 mL)

を滴下し、室温にて 16 時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液を加えた。酢酸エチルによって 3 回抽出した後、合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた赤褐色油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 5/1) にて精製し、黄色油状物 **6** (1.4 g, 90 % yield) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.16 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.53 (brt, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 4.76 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.06 (dd, $J = 15.8$ Hz, 6.9 Hz, 1H), 2.97 (dd, $J = 15.8$ Hz, 5.7 Hz, 1H), 2.65 (dd, $J = 14.7$ Hz, 5.7 Hz, 1H), 2.59 (dd, $J = 14.7$ Hz, 6.3 Hz, 1H), 2.30 (tt, $J = 8.0$ Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.35 (dq, $J = 4.6$ Hz, 3.0 Hz, 2H), 1.05 (dq, $J = 8.0$ Hz, 3.0 Hz, 2H), 0.85 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.09 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 197.5, 171.4, 160.1, 147.5, 140.4, 135.0, 134.7, 130.5, 129.8, 129.1, 127.0 (2C), 126.9, 125.9, 66.1, 51.5, 48.2, 42.5, 25.7 (3C), 17.9, 16.5, 11.0, -4.7, -4.9; MS (CI): m/z : 534 (M+2, 100), 532 (M^+ , 96), 474 (50), 400 (39), 320 (32), 217 (39), 133 (41), 75 (41); HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{BrNO}_4\text{Si}$ (M^+): 532.1518, found 532.1515 [α] $^{20}_{\text{D}}$: 1.685 (c 0.99, MeOH);

Methyl (3R,6E)-7-(4-bromo-2-cyclopropylquinolin-3-yl)-3-hydroxy -5-oxohept-6-enoate (7)

アルゴン雰囲気下、**6** (400 mg, 0.75 mmol) の MeCN (1.0 mL) 溶液にフッ化水素酸の水及び MeCN 混合溶液 (48 % HF aq / MeCN = 1 / 19, 4.0 mL) を氷浴下において加えた。室温にて 19 時間攪拌後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (40 mL) を加えた。酢酸エチルによって 3 回抽出した後、合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) にて精製し、黄色固体 **7** (280 mg, 89 % yield) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.15 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.68 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.53 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 4.65 (brs, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.53 (brs, 1H), 3.05 (dd, $J = 17.1$ Hz, 7.4 Hz, 1H), 3.00 (dd, $J = 17.1$ Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.65 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.28 (tt, $J = 8.0$ Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.35 (dq, $J = 4.6$ Hz, 3.1 Hz, 2H), 1.05 (dq, $J = 8.0$ Hz, 3.1 Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 198.6, 172.2, 160.1, 147.5, 141.0, 134.8, 134.4, 130.6, 129.5, 129.0, 127.0 (2C), 125.8, 64.5, 51.5, 46.4, 40.6, 16.5, 11.0 (2C); MS (EI): m/z : 419 (M+2, 0.1), 417 (M^+ , 0.1), 315 (22), 236 (100), 102 (3.0), 74 (3.0); HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{BrNO}_4$ (M^+): 417.0575, found 417.0583; [α] $^{20}_{\text{D}}$: -7.727 (c 0.99, MeOH);

Methyl (3R, 5S, 6E)-7-(4-bromo-2-cyclopropylquinolin-3-yl)-3,5-dihydroxyhept-6-enoate (8)

アルゴン雰囲気下、**7** (4.0 g, 9.6 mmol) の THF (30 mL) 及び MeOH (6 mL) の混合溶液に -78°C 下において、diethylmethoxyborane (1.0 M in THF, 10.8 mL, 10.8 mmol) を加え、同温度にて 20 分間攪拌した。Sodium borohydride (452 mg, 10.7 mmol) を加え、同温度にて 1 時間攪拌後、酢酸 (5.7 mL) の酢酸エチル (27 mL) 溶液を滴下し、同温度にて 10 分間攪拌後、3 時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルによって 3 回抽出した後、合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) にて精製し、黄色固体 **8** (2.9 g, 72 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 8.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.63 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 16.0 Hz, 1.1 Hz, 1H), 6.09 (dd, *J* = 16.0 Hz, 5.7 Hz, 1H), 4.73 (brs, 1H), 4.42 (brs, 1H), 3.81 (s, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.63 (s, 1H), 2.57 (dd, *J* = 6.8 Hz, 1.7 Hz, 2H), 2.42 (tt, *J* = 8.0 Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.91 - 1.80 (m, 2H), 1.29 (dd, *J* = 4.6 Hz, 2.6 Hz, 2H), 1.01 (dq, *J* = 8.0 Hz, 2.6 Hz, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 172.9, 160.9, 147.0, 140.0, 133.8, 131.8, 129.5, 127.0 (2C), 126.6, 126.5, 126.2, 72.4, 68.4, 51.9, 42.4, 41.4, 16.4, 10.7 (2C); MS (EI): *m/z*: 421 (M+2, 3.2), 419 (M⁺, 3.3), 383 (7.5), 340 (38), 298 (45), 274 (100), 220 (56); HRMS calcd for C₂₀H₂₂BrNO₄ (M⁺): 419.0732, found 419.0729; [α]_D²⁰: 22.858 (*c* 1.00, MeOH);

Methyl (3*R*, 5*S*, 6*E*)-7-{2-cyclopropyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3-dioxabolan-2-yl)quinolin-3-yl}-3-*l*,5-dihydroxyhept-6-enoate (3)

8 (1.0 g, 2.4 mmol)、bis(pinacolato)diboron (0.79 g, 3.1 mmol)、炭酸カリウム (1.0 g, 7.2 mmol) 及び PdCl₂(dppf)CH₂Cl₂ (0.19 g, 0.24 mmol) を加え、系内をアルゴン置換した。DMSO (40 mL) を加え、脱気、アルゴン置換を 3 回繰り返した。70°C にて 4 時間攪拌し、室温に冷却してシリカゲルを加えてセライトろ過した。ろ液に酢酸エチルを加え、水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄して、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を留去し、アセトニトリル共沸を 3 回繰り返した後、得られた残渣を逆相 HPLC (Cosmosil AR-II 10 x 250 mm, MeCN/H₂O = 50/50, flow rate = 5.0 mL/min) によって精製した。得られた褐色あめ状物をジイソプロピルエーテル/*n*-ヘプタン = 1/1 にて粉末化、ろ取り、淡褐色固体 **3** (0.29 g, 26 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.91 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.56 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.40 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 16.0 Hz, 1.4 Hz, 1H), 6.03 (dd, *J* = 16.0 Hz, 5.4 Hz, 1H), 4.66 (brs, 1H), 4.38 (brs, 1H), 3.75 (brs, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.32 (brs, 1H), 2.56 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 2.54 (s, 1H), 2.28 (tt, *J* = 8.0 Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.87 - 1.78 (m, 2H), 1.46 (s, 12H), 1.25 - 1.20

(m, 2H), 0.98 (dd, $J = 8.0$ Hz, 3.1 Hz, 2H); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 172.9, 159.6, 146.3, 138.2, 135.6, 129.2, 128.9 (2C), 128.4, 127.2 (2C), 125.4, 84.7 (2C), 72.4, 68.5, 51.9, 42.7, 41.3, 25.3 (2C), 25.2 (2C), 15.4, 9.5, 9.3; MS (EI): m/z : 467 (M^+ , 6.8), 346 (100), 322 (80), 220 (92), 206 (57); HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{BNO}_6$ (M^+): 467.2479, found 467.2481; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: 22.932 (c 1.00, MeOH);

Methyl (3R, 5S, 6E)-7-{2-cyclopropyl-4-(4-fluorophenyl)quinolin-3-yl}-3,5-dihydroxyhept-6-enoate (9)

9 (37 mg, 0.079 mmol)、1-fluoro-4-iodobenzene (26 mg, 0.12 mmol)、 K_2CO_3 (25 mg, 0.24 mmol)、tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0) (9.1 mg, 0.0079 mmol) 及び $\text{PdCl}_2(\text{dppf})\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (6.2 mg, 0.0079 mmol) を加え、系内をアルゴン置換した。DMSO (0.5 mL) を加え、脱気、アルゴン置換を 3 回繰り返した。90°C にて 9 時間攪拌し、室温に冷却し、水を加えた。酢酸エチルにて抽出し、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を留去し、アセトニトリル共沸を 3 回繰り返した後、得られた残渣を逆相 HPLC (Cosmosil AR-II 10 x 250 mm, MeCN/ H_2O = 50/50, flow rate = 5.0 mL/min) によって精製して、褐色あめ状物 **9** (3 mg, 9 % yield (50 % conversion yield)) を得た。

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.95 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.35 - 7.28 (m, 2H), 7.24 - 7.13 (m, 4H), 6.63 (dd, $J = 16.0$ Hz, 1.4 Hz, 1H), 5.58 (dd, $J = 16.0$ Hz, 6.3 Hz, 1H), 4.40 (m, $J = 2.6$ Hz, 1H), 4.15 - 4.10 (m, 1H), 3.60 (br, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.10 (br, 1H), 2.50 - 2.36 (m, 3H), 1.50 (ddd, $J = 9.2$ Hz, 4.0 Hz, 1.1 Hz, 1H), 1.37 - 1.30 (m, 3H), 0.98 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2.3 Hz, 2H); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 172.9, 162.2 (d, $J_{\text{F}} = 246.5$ Hz), 161.2, 160.7, 146.8, 144.2, 139.7, 133.5, 131.8 (dd, $J_{\text{F}} = 28.8$ Hz, 7.8 Hz) (2C), 129.3, 128.9, 126.1, 126.0, 125.8, 125.4, 115.3 (dd, $J_{\text{F}} = 21.6$ Hz, 3.3 Hz) (2C), 72.4, 68.0, 51.9, 42.3, 41.2, 15.9, 10.3, 10.2; MS (EI): m/z : 435 (M^+ , 5.2), 314 (56), 280 (100), 274 (70), 220 (14); HRMS calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{FNO}_4$ (M^+): 435.1846, found 435.1849; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: 35.707 (c 0.68, MeOH);

(3R, 5S, 6E)-7-{2-cyclopropyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3-dioxabolan-2-yl)quinolin-3-yl}-3,5-dihydroxyhept-6-enoic acid (pitavastatin)

9 (10 mg, 0.023 mmol) の MeOH (1.0 mL) 溶液に氷冷下において、1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液 (1.0 mL) を加えた。室温にて 1 時間攪拌後、溶媒を留去し、**pitavastatin** (10 mg, quant.) を得た。

^1H -NMR (500 MHz, DMSO) δ : 7.83 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.36 - 7.23 (m,

6H), 6.48 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 5.80 (br, 1H), 5.57 (dd, $J = 16.0$ Hz, 5.5 Hz, 1H), 4.93 (brs, 1H), 4.13 (m, 1H), 3.65 (brs, 1H), 3.40 (m, 4H), 2.08 (brd, $J = 12.0$ Hz, 1H), 1.95 (dd, $J = 15.5$ Hz, 8.6 Hz, 1H), 1.40 (dt, $J = 14.3$ Hz, 7.8 Hz, 1H), 1.20 - 1.00 (m, 5H); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 178.5, 161.6, 160.6, 144.8, 142.2, 133.1 (2C), 132.0 (dd, $J_F = 37.4$ Hz, 8.0 Hz)(2C), 129.6, 128.8, 128.3, 125.7, 125.6 (2C), 123.1, 115.2 (dd, $J_F = 21.0$ Hz, 9.3 Hz) (2C), 68.9, 65.6, 44.2, 40.0, 15.3, 10.7 (2C); MS (FAB+): m/z : 444 (M^+); HRMS (FAB+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{FNO}_4$: 422.1768, found 422.1762; $[\alpha]_D^{20}$: 22.265 (c 0.22, MeCN/ H_2O);

鈴木カップリング反応検討

9 (1.0 mg, 2.14 μmol)、1-fluoro-4-iodobenzene (0.7 mg, 3.21 μmol)、base (4.28 μmol)、Pd catalyst (0.214 μmol) を加え、系内をアルゴン置換した。DMSO (0.5 mL) を加え、脱気、アルゴン置換を 3 回繰り返した。90°C にて 9 時間攪拌し、室温に冷却し、水を加えた。酢酸エチルにて抽出し、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を留去し、アセトニトリル共沸を 3 回繰り返した後、得られた残渣を LC-MS によって分析した。

放射性薬剤合成を目的とした新規マイクロ波反応装置の基礎検討

加熱性能評価

マイクロ波反応装置 (サイダ社製 (SAIDA)、CEM 社製 (PETWave)) において検討を行った。褐色バイアル (ホウ珪酸ガラス, 大船製作所) に溶媒 200 μL (MeCN, MeOH, DMF, DMSO, Toluene, THF) を加えた後、反応温度 (60°C, 80°C, 沸点温度) に設定し、50 W で温調制御モードによりマイクロ波を照射した。さらに MeCN の場合は、溶媒量 (100 μL , 50 μL) についても評価した。

^{18}F 標識化合物合成検討

4- ^{18}F fluoro-*N*-[2-[1-(methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-*N*-2-pyridinyl-benzamide (^{18}F MPPF)

^{18}F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge に保持させた後、 K_2CO_3 水溶液 (33 mM, 300 μL) により溶出させた。Kryptofix2.2.2 (5 mg, 13.3 μmol)、MeCN (500 μL , Merck) に、 ^{18}F 含有 K_2CO_3 水溶液 (37 -74 MBq) を加え、アルゴン気流下で 120°C に加熱し共沸脱水した。MeCN (1.0 mL) を 2 回に分けて追加しさらに共沸脱水した。ここ

に Nitro-MPPF (0.375 - 1.5 mg, 0.81 - 3.25 μmol) の DMSO 溶液 (100 μL) を加え、マイクロ波照射下 180°C で 1 分間加熱した。反応後、radio-TLC により収率を算出した。

[¹⁸F]Fluoroestradiol ([¹⁸F]FES)

¹⁸F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge に保持させた後、K₂CO₃ 水溶液 (33 mM, 300 μL) により溶出させた。Kryptofix2.2.2 (5 mg, 13.3 μmol)、MeCN (500 μL , Merck) に、¹⁸F 含有 K₂CO₃ 水溶液 (37 - 74 MBq) を加え、アルゴン気流下で 120°C に加熱し共沸脱水した。MeCN (1.0 mL) を 2 回に分けて追加しさらに共沸脱水した。ここに 3-*O*-methoxymethyl-16,17-*O*-sulfuryl-16-epistriol (0.125 - 0.5 mg, 0.32 - 1.27 μmol) の MeCN 溶液 (100 μL) を加え、マイクロ波照射下 100°C で 1 分間加熱した。次に、0.6 M HCl/90 % MeCN 溶液 (100 μL) を加え、さらにマイクロ波照射下 100°C で 1 分間加熱した。反応後、radio-TLC により収率を算出した。

[¹⁸F]Succinimidyl 4-fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB)

¹⁸F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge に保持させた後、K₂CO₃ 水溶液 (33 mM, 300 μL) により溶出させた。Kryptofix2.2.2 (5 mg, 13.3 μmol)、MeCN (500 μL , Merck) に、¹⁸F 含有 K₂CO₃ 水溶液 (7.4 GBq) を加え、アルゴン気流下で 120 °C に加熱し共沸脱水した。MeCN (1.0 mL) を 2 回に分けて追加しさらに共沸脱水した。ここに 4-ethoxycarbonyl-*N,N,N*-trimethylanilinium trifluoromethanesulfonate (2.0 mg, 13.0 μmol) の MeCN 溶液 (200 μL) を加え、マイクロ波照射下 90 °C で 1 分間加熱した。溶液に tetrapropylammonium hydroxide (1.0 M in water, 20 μL , 20 μmol) を加え、マイクロ波照射下 90 °C で 1 分間加熱した。次に *O*-(*N*-succinimidyl)-*N,N,N',N'*-tetra-methyluranium tetrafluoroborate (15 mg, 50 μmol) の MeCN 溶液 (200 μL) を加え、マイクロ波照射下 90 °C で 1 分間加熱した。5 % (v/v) 酢酸水溶液 (10 mL) で希釈した反応溶液を Sep-Pak Accell Plus CM Plus Light Cartridge に通し陽イオン性化合物を除去後、Sep-Pak Plus PS-2 Cartridge に通し、[¹⁸F]SFB を保持させた。次に water/MeCN (80:20, 20 mL) を通し、不純物を除去した後、MeCN (2.5 mL) を通して [¹⁸F]SFB の MeCN 溶液 (999 MBq) を得た。

4-[¹⁸F]Fluoroiodobenzene ([¹⁸F]FIB) の合成

¹⁸F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge に保持させた後、K₂CO₃ 水溶液 (33 mM, 300 μL) により溶出させた。Kryptofix2.2.2 (5 mg, 13.3 μmol)、MeCN (500 μL , Merck) に、¹⁸F 含有 K₂CO₃ 水溶液 (3.7 GBq) を加え、アルゴン気流下で 120°C

に加熱し共沸脱水した。MeCN (1.0 mL) を 2 回に分けて追加しさらに共沸脱水した。次に 4-iodophenyldiphenylsulfonium triflate (2.0 mg, 3.71 μ mol) の MeCN (150 μ l) 溶液を加え、マイクロ波照射下 120°C で 1 分間加熱した。反応後、水 (3 mL) で希釈した反応液を Sep-Pak Light C18 Cartridge へと通した後、水 (10 mL) で洗浄した。アルゴンガスを通した後、さらに MeCN (500 μ L) を通し、放射化学的純度 95 %以上で 4-[¹⁸F]fluoroiodobenzene (2.3 GBq) を得た。(HPLC 分析条件: Xbridge BEH 1.0 x 150 mm, MeOH/20 mM phosphate buffer (pH 2.5) = 70/30, Flow : 1.0 ml/min, UV : 254 nm)

[¹⁸F]FIB を用いた鈴木カップリング反応検討

10 (2.0 mg)、tris(dibenzylideneacetone)dipalladium (0) (1.0 mg)、Cs₂CO₃ (4.0 mg) の MeCN (100 μ L) 溶液に [¹⁸F]FIB の MeCN (18.5 ~ 37.0 MBq, 100 μ L) 溶液を加え、マイクロ波照射下 100°C で 1 分間加熱した。反応後、溶液を COSMONICE(R) Filter (S)(0.45 μ m, 4 mm) へ通し、不溶物を除去後、逆相 HPLC (Cosmosil 5C₁₈-AR-II 10 x 250 mm, MeOH/20 mM phosphate buffer (pH 2.5) = 70/30, flow rate 5.0 mL/min) により精製し、 [¹⁸F]pitavastatin を放射化学的収率 12 \pm 3 % (decay corrected from [¹⁸F]KF)、放射化学的純度 99 %以上で得た。(HPLC 分析条件: Cosmosil 5C₁₈-AR-II 4.6 x 150 mm, MeOH/20 mM phosphate buffer (pH 2.5) = 70/30, Flow : 1.0 ml/min, UV : 254 nm)

[¹⁸F]pitavastatin の肝臓 OATP 機能のインビボ評価用プローブとしての評価

動物

Sprague-Dawley (SD) 雄ラット (222-333 g、8-10 週齢) は日本 SLC 株式会社より購入した。室温及び照明管理下において飼育し、適宜給餌及び給水した。動物実験は京都大学動物実験委員会の指針を遵守して行った。

in vivo における安定性評価

SD ラット (8-10 週齢、雄性) に対し、イソフルラン吸引麻酔下 (1.5 %, 2.0 L/min) で大腿動脈及び胆管へカニューレ (polyethylene tube, I.D 0.5 mm, O.D. 0.8 mm) を挿入し、 [¹⁸F]pitavastatin (37 MBq/100 μ L) を尾静脈より投与した。投与後、1, 2, 10, 20, 40 分後に血液を、0-5, 5-10, 10-25, 25-40 分後に胆汁を採取した。肝組織はラット肝臓を 10, 20, 40 分後に腹部大動脈を切断した後、摘出、ホモジナイズすることにより得た。血液、胆汁、肝組

織のサンプルに MeCN を加え、遠心後 (12000 rpm, 0°C, 2 min) その上清を逆相 TLC に添加した。室温下で展開し (MeCN/water/acetic acid=50/50/0.75)、イメージングプレート BAS SR2040 imaging plates に 90-360 分間露光させ、読み取り (Fuji BAS-5000 analyzer) 及び解析 (The MultiGauge image analysis program) を行った。

正常ラットの体内動態評価

SD ラット (8 週齢、雄性) へ [¹⁸F]pitavastatin (0.15-0.22 MBq/100 µL) をラット尾静脈より投与した。投与後、2, 5, 10, 15, 30, 60 分に各臓器 (血液、心臓、肺、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、骨) を摘出した (n = 5)。各臓器の重量と放射能とを測定し、単位重量あたりの放射能から集積量 (%ID/organ) を算出した。

PET/CT 撮像

SD ラット (8 週齢、雄性) に対し、イソフルラン吸引麻酔下 (1.5 %, 2.0 L/min) で、大腿動脈へカニューレ (polyethylene tube, I.D. 0.5 mm, O.D. 0.8 mm) を挿入した後、[¹⁸F]pitavastatin (6.0 - 10.0 MBq/100 µL) をラット尾静脈より投与した。投与直後より PET/CT 装置 (Triumph, TriFoil Imaging Inc., Chatsworth) を用いて血液を採取 (投与後 10, 20, 30, 40, 50 秒及び 1, 2, 5, 10, 20, 30 分) しながら 60 分間撮像した。画像再構成は 3D ordered subset expectation maximization method (OSEM) を用いて行った。血液の放射能量は µFMPC システム (Shimadzu 社製) により測定した。PET 撮像終了後、ペントバルビタール水溶液により屠殺し、CT 撮像を行った。

リファンピシン阻害実験については、反対側の大腿動脈よりカニューレを挿入し、撮像 90 分前よりリファンピシン水溶液 (2M NaOH 水溶液により溶解) を 1.5 µmol/min/kg の速度で持続静注を行い、さらに持続静注しながら上記と同様な撮像を行った。

PET 解析

肝臓の関心領域 (ROIs) は Pmod ver. 3.3 を用いて指定し、すべての ROI を結合させ、容積関心領域を決定し、投与量に対する肝臓の放射能割合を算出した。

ラット肝臓における取込み速度は integration plot 法と肝臓からの代謝及び胆汁排泄が無視できる投与後 5 分までの計算結果を用いて算出した。[¹⁸F]pitavastatin の肝取込みクリアランスは以下の計算式に基づいて算出した。

$$\frac{X_{t,liver}}{C_{t,blood}} = CL_{uptake,liver} \times \frac{AUC_{0-t,blood}}{C_{t,blood}} + V_E$$

$X_{t,liver}$: PET画像解析より算出した時間 t における肝臓の ^{18}F 放射エネルギー

$C_{t,blood}$: 大腿動脈より採血して求めた血液中の ^{18}F 放射能濃度

$CL_{uptake,liver}$: 肝臓における取込みクリアランス

$AUC_{0-t,blood}$: 時間0から t における血液の濃度曲線下面積

V_E : integration plotのy切片より求めた時間0における肝臓での初期分配量

統計解析

2 群間については対応のない t 検定により統計的な差を確認した。3 群以上の群間に関しては Bonferroni test による一元配置分散分析を用いて確認した。 $P < 0.05$ で有意であるとした。

第 2 章

肝臓の有機アニオントランスポーター機能のインビボ評価のための核医学分子イメージングプローブとしての ^{18}F 標識 pitavastatin 誘導体の開発

第 1 章では ^{18}F FIB を用いた鈴木カップリング反応によって ^{18}F pitavastatin の合成に成功した。しかし、 ^{18}F pitavastatin の合成は自動合成において十分な量を安定して合成することは難しいと予想された。そのため、さらなる合成法の改善が必要であると考えられた。

臨床試験を行うための自動合成の条件としては、①反応は 2 段階以内 (1 段階が望ましい)、②反応がワンポットで可能、③精製操作は 1 回の 3 つが挙げられる¹⁹。そこで本研究では、上記の条件を考慮して、合成法を改善するために pitavastatin の誘導化を検討し、肝臓の有機アニオントランスポーター機能のインビボ評価のための核医学分子イメージングプローブとして pitavastatin 誘導体 (3*R*,5*S*,*E*)-7-[2-cyclopropyl-4-{4-(2-fluoroethoxy)phenyl}quinolin-3-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-enoic acid (PTV-F1) を開発し、その有用性について評価することを計画した。

pitavastatin 誘導体 PTV-F1 の薬剤設計

pitavastatin の誘導化を行う際に基質特異性や代謝安定性に影響が少ない位置を構造修飾する必要がある。さらに ^{18}F 標識合成の容易さを考慮すると 1 級アルキルに対する ^{18}F -の求核反応を用いることが理想である。また、報告されている pitavastatin の代謝経路²⁰から、キノリン側鎖部分が主に代謝を受け、ラクトン体やグルクロン酸などの抱合体が得られるのに対し、フルオロアリアル基は代謝による影響が少ないことが予想された。そこで、基質特異性に関係のあるカルボキシル基を有し、代謝安定性に影響が出やすいキノリン側鎖部分は維持し、影響が少ないフルオロアリアル基のフッ素原子部分をフルオロエトキシ基に変換した pitavastatin 誘導体 PTV-F1 を設計した (Figure 2-1)。

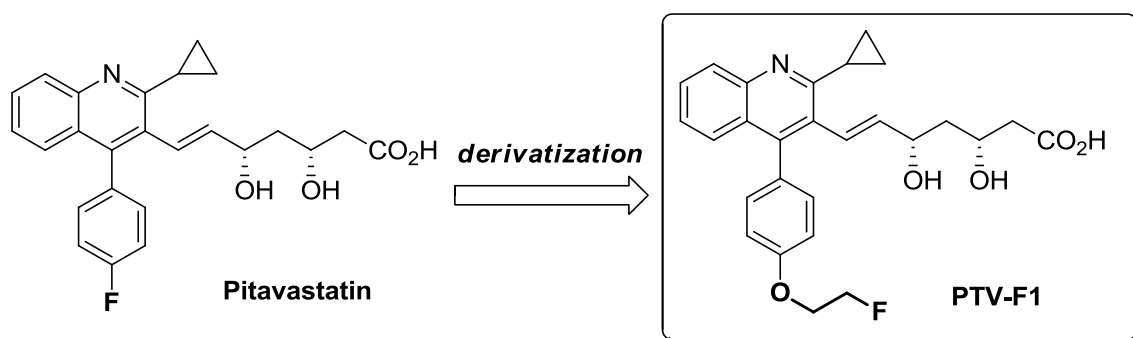
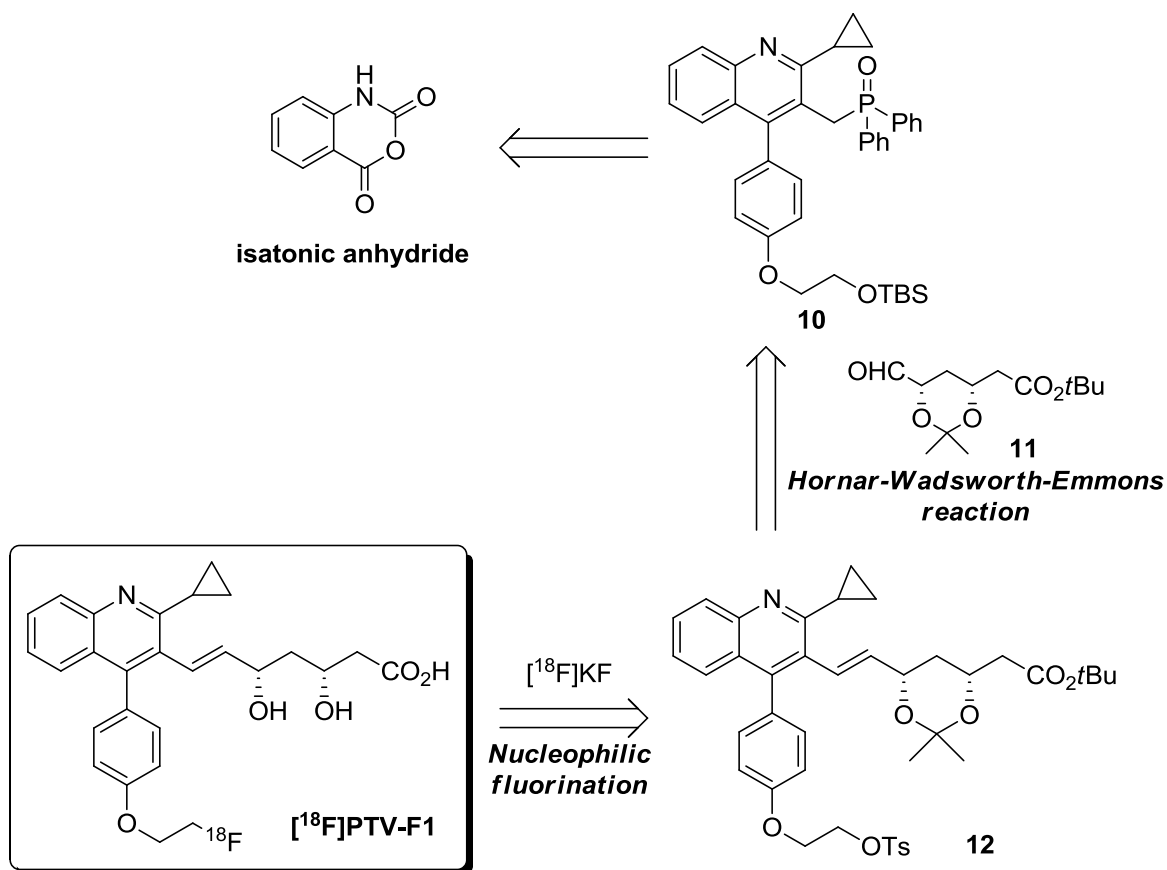


Figure 2-1. Derivatization of pitavastatin

結果

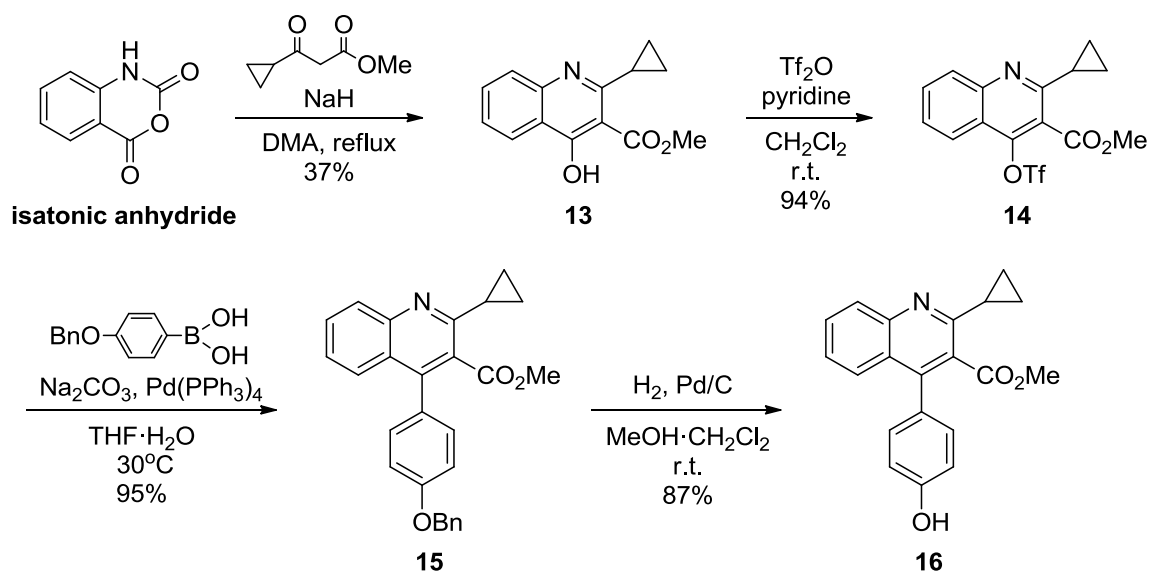
1. pitavastatin 誘導体 PTV-F1 の合成

[¹⁸F]PTV-F1 はスルホン酸エステル **12** より [¹⁸F]KF を用いた求核的フッ素化反応によって合成することを計画した (Scheme 2-1)。スルホン酸エステル **12** の側鎖部分は光学活性アルデヒド **11** との Horner-Wadsworth-Emmons 反応によって導入し⁵⁶、非標識体及び前駆体を合成するためのキノリン誘導体はイサト酸無水物より誘導することとした。



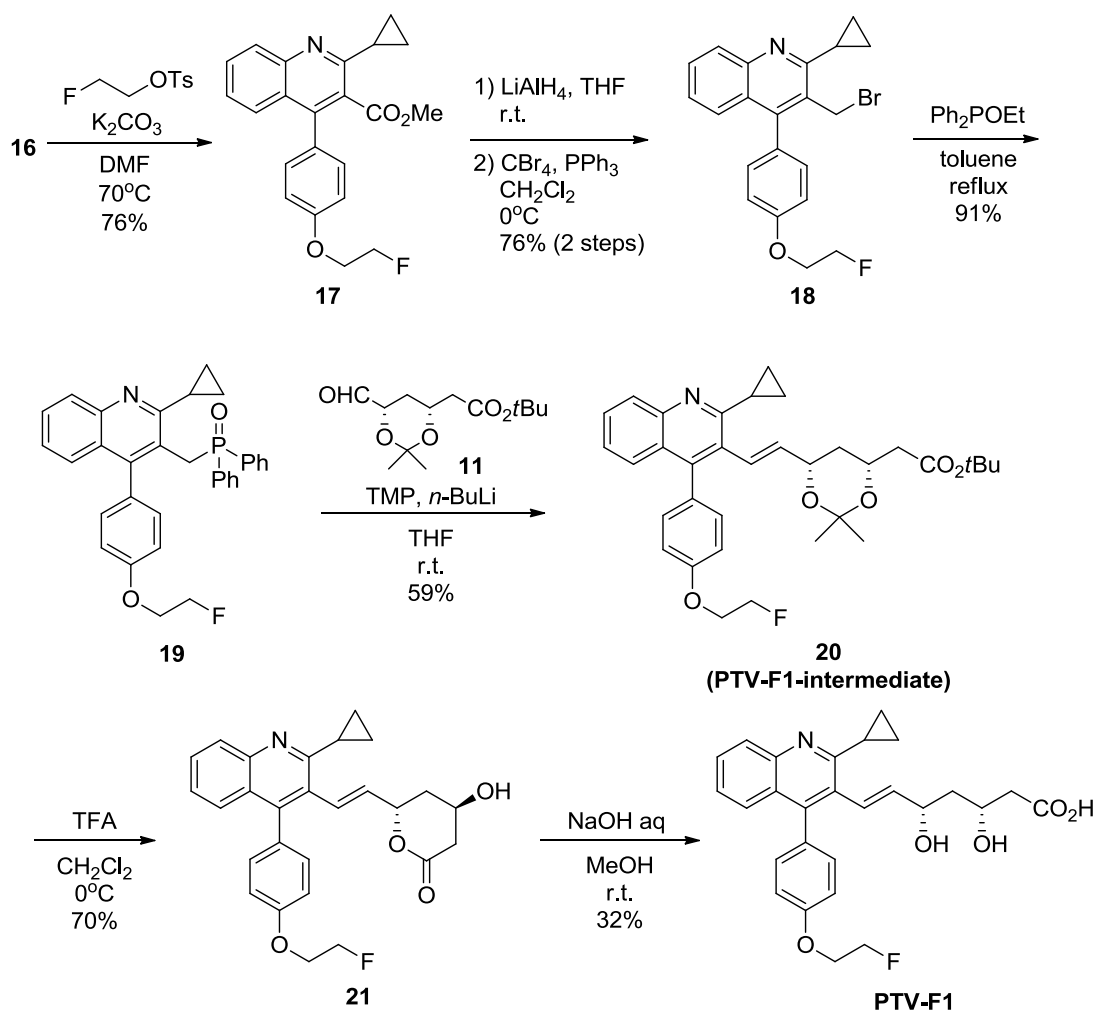
Scheme 2-1. Synthetic plan of [¹⁸F]PTV-F1

まず、出発原料であるイサト酸無水物よりフェノール中間体 **16** へと誘導した (Scheme 2-2)。メトキシカルボニルキノリン **13** はイサト酸無水物とシクロプロピルプロピオン酸メチルとのキノリン骨格形成反応によって合成し、フェノール性水酸基をトリフルオロスルホン酸無水物によってトリフラート基へと変換した。続いてベンジロキシフェニルボロン酸とのカップリング反応により、高収率でアリールキノリン **15** を得た。保護基であるベンジル基は水素と Pd/C を用いた接触還元条件によって除去し、フェノール中間体 **16** を得た。



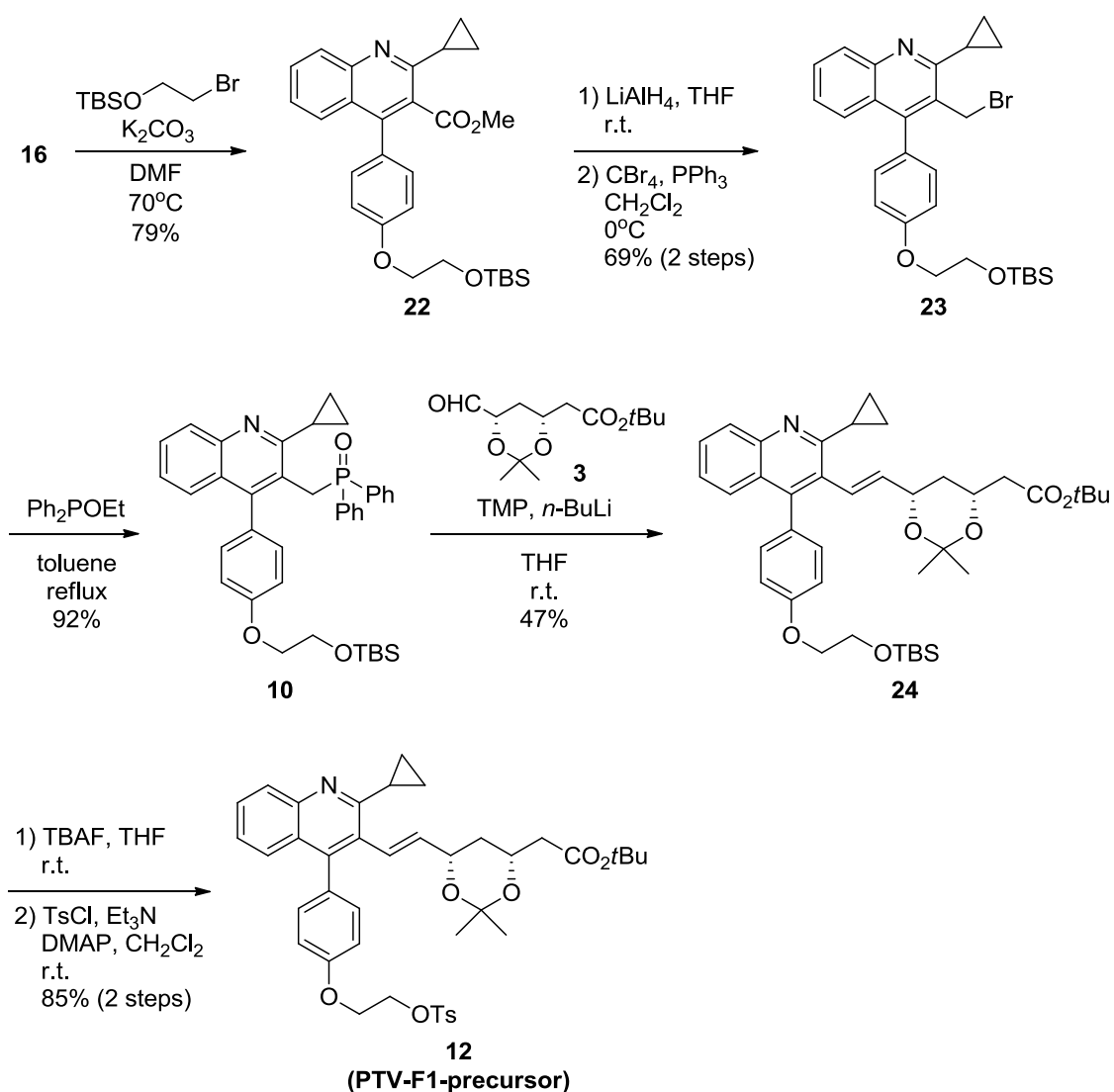
Scheme 2-2. Synthesis of phenol intermediate **16**

次に、非標識体 PTV-F1 の合成を行った (Scheme 2-3)。PTV-F1 のフルオロエチル基の導入を 2-fluoroethyl *p*-toluenesulfonate を用いて行うことで、フルオロエトキシフェノール **17** を得た。続いてエステル基の還元、臭素化を経て、ブロモベンジルキノリン **18** へと誘導した後、亜リン酸ジエチルで処理し、リン酸エステル **19** を高収率で得ることができた。Hornar-Wadsworth-Emmons 反応において、求電子剤である光学活性アルデヒド **11** を共沸脱水することで収率が 59 %まで向上した。そして、アセトナイド基及びエステル基の脱保護するために、トリフルオロ酢酸で処理してラクトン **21** を得た。最後に、ラクトン **21** を加水分解し、逆相カラムを用いた HPLC によって粗精製物を精製し、最終的に 11 工程、総収率 8 %で非標識体 PTV-F1 を得た。



Scheme 2-3. Synthesis of PTV-F1

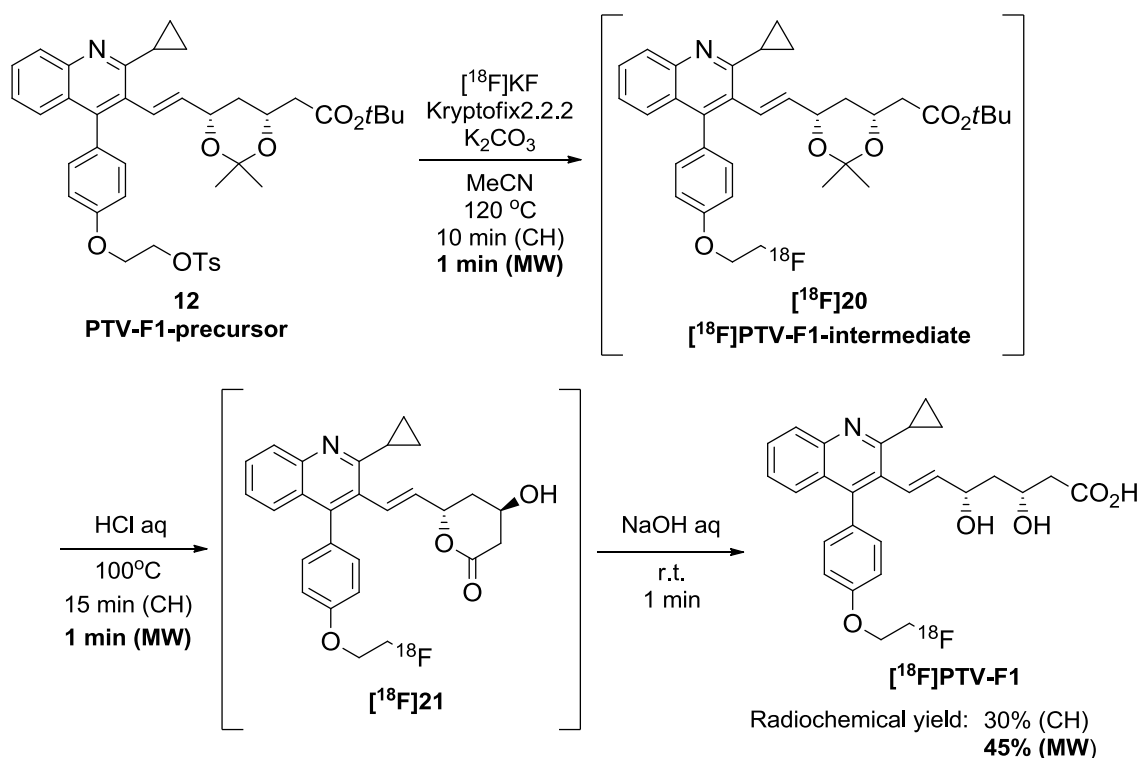
PTV-F1 前駆体であるスルホン酸エステル **12** は PTV-F1 と同様な合成経路で合成した (Scheme 2-4)。 ^{18}F 標識部位として利用するために、まず 2-*tert*-butyldimethylsilyloxy ethylbromide を用いて *tert*-ブチルシロキシエトキシフェノール **22** へと誘導した。PTV-F1 合成と同様にエステル基の還元、臭素化、リン酸エステル化を経て、高収率でリン酸エステル **10** を得た。続く、Hornar-Wadsworth-Emmons 反応においても、47 %の収率でオレフィン **24** が得られた。最終的に、TBS 基を脱保護した後、 ^{18}F 標識のためにトルエンスルホン酸エステル基へと変換し、結果として 11 工程、総収率 10 %で PTV-F1 前駆体スルホン酸エステル **12** を得ることができた。



Scheme 2-4. Synthesis of PTV-F1-precursor **12**

2. [¹⁸F]PTV-F1 の合成

[¹⁸F]PTV-F1 は [¹⁸F]KF 及び Kryptofix2.2.2 によるフッ素化、酸性条件下における脱保護そしてラクトンの加水分解の 3 工程を経て合成した (Scheme 2-5)。 [¹⁸F]KF は Kryptofix2.2.2 を添加し、アルゴン気流下にて MeCN を用いて共沸脱水させたものを使用した。フッ素化反応は密封したバイアルにおいてスルホン酸エステル **12** を溶解させた MeCN を加え、120°C において 10 分間の加熱により、反応が 95 %以上進行することが radio-TLC で確認できた。次に、酸性条件下で 15 分間加熱することでアセトナイド基及びエステル基が脱保護され、ラクトン [¹⁸F]**21** を経た後、さらに水酸化ナトリウム水溶液で処理することで、 [¹⁸F]PTV-F1 を放射化学的収率 30 %、放射化学的純度 99 %以上で得ることができた。さらに新規マイクロ波反応装置を用いて合成を行ったところ、フッ素化及び脱保護の反応がそれぞれ 1 分で完了し、放射化学的収率も 45 %まで向上した。結果として、 [¹⁸F]pitavastatin と比較して、 [¹⁸F]PTV-F1 は約 4 倍の収率を示し、さらにワンポットでかつ短時間で合成可能であり、自動合成の条件を満たすことが示された。



Scheme 2-5. Synthesis of [¹⁸F]PTV-F1 from tosylate precursor **12**

3. [¹⁸F]PTV-F1 の肝臓 OATP 機能のインビボ評価用プローブとしての評価

3-1. [¹⁸F]PTV-F1 の分配係数 (LogP) 評価

1-オクタノール/水分配係数 (LogP) は 1.26 ± 0.04 となった。

3-2. PTV-F1 及び [¹⁸F]PTV-F1 の細胞取り込み評価

OATP1B1 を過剰発現させた HEK293 細胞⁸ 及び対照群として pcDNA3.1 ベクターを導入した同細胞⁸ を用いて非標識体 PTV-F1 の細胞取り込み実験を行ったところ、pitavastatin と同程度の取り込み量を示し、過剰量の化合物の添加により取り込み量が低下していることが示された。結果として pitavastatin とほぼ同様な取り込み結果を示すことがわかった (Figure 2-2)。

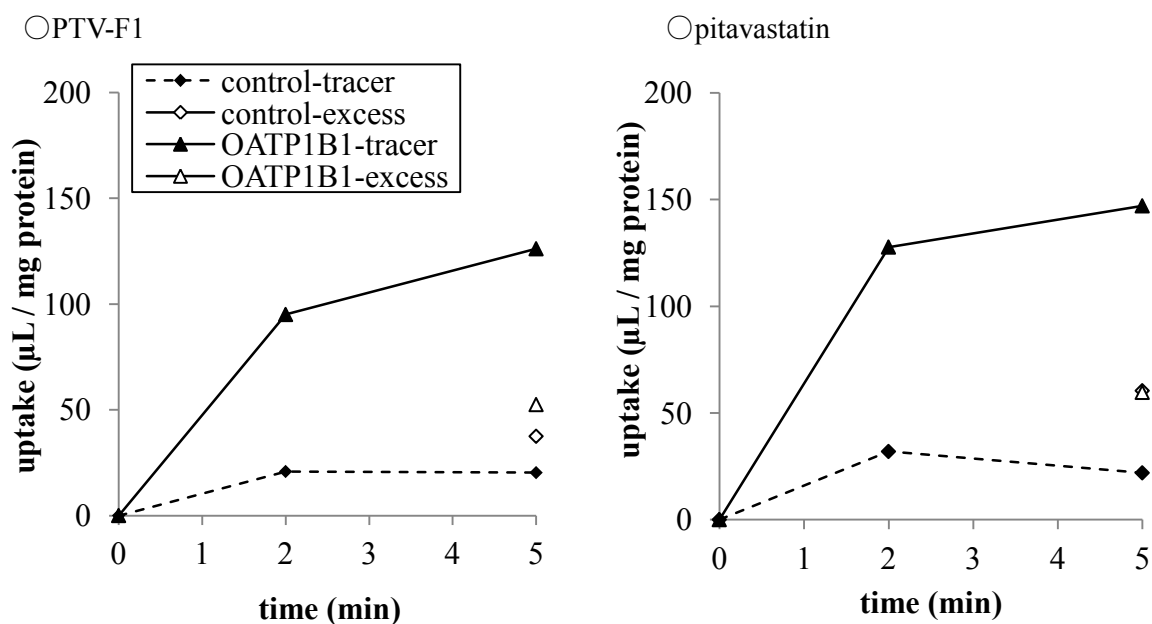


Figure 2-2. Time profiles of the uptake of PTV-F1 (concentration: 0.1 μ M (tracer) or 100 μ M (excess)) by HEK293 cells expressing OATP1B1 (OATP1B1) and HEK293 cells transfected the control pcDNA3.1 vector (control)⁸. The values represent the mean \pm SD (n = 3).

標識体 $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ においても同様な実験を行った。OATP1B1 過剰発現細胞において $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ 添加 1 分後から対照群と比べ有意な集積の差がみられ、添加 2 分後以降も集積は経時的に増加し、10 分後においてそれぞれ対照群と比較して大きな取り込みの差が見られた。

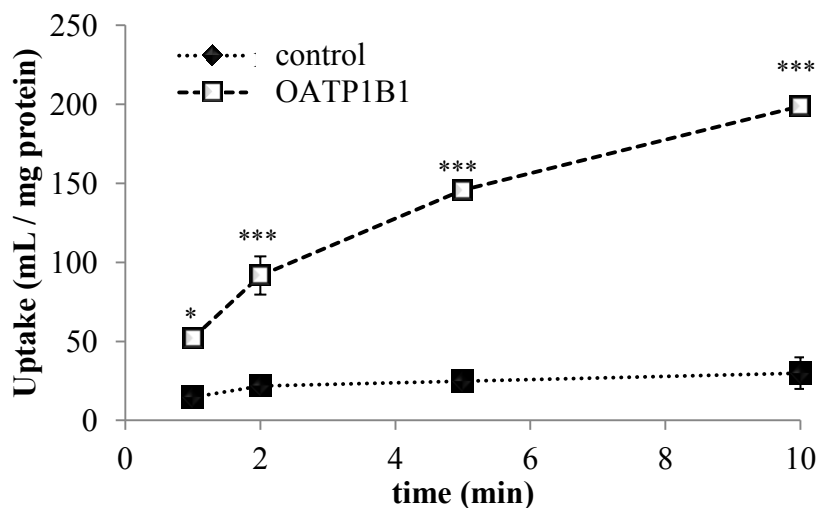


Figure 2-2. Time profiles of the uptake of $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ ($0.03 \mu\text{Ci}$) by HEK293 cells expressing OATP1B1 (OATP1B1) and HEK293 cells transfected the control pcDNA3.1 vector (control)⁸. The values represent the mean \pm SD ($n = 3$). A statistically significant difference was observed compared with mock (Bonferroni test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

3-3. [¹⁸F]PTV-F1 の生体内安定性評価

[¹⁸F]PTV-F1 投与後の生体内放射能（血液、肝臓、胆汁）について正常ラットを用いて逆相 TLC を用いたオートラジオグラフィーにより分析を行った (Figure 2-3)。血液において代謝物は確認されなかった。胆汁及び肝臓においては多少の代謝物は確認されたが、肝臓において 95 %以上、胆汁では 80 %以上が未変化体で存在していることを認めた。

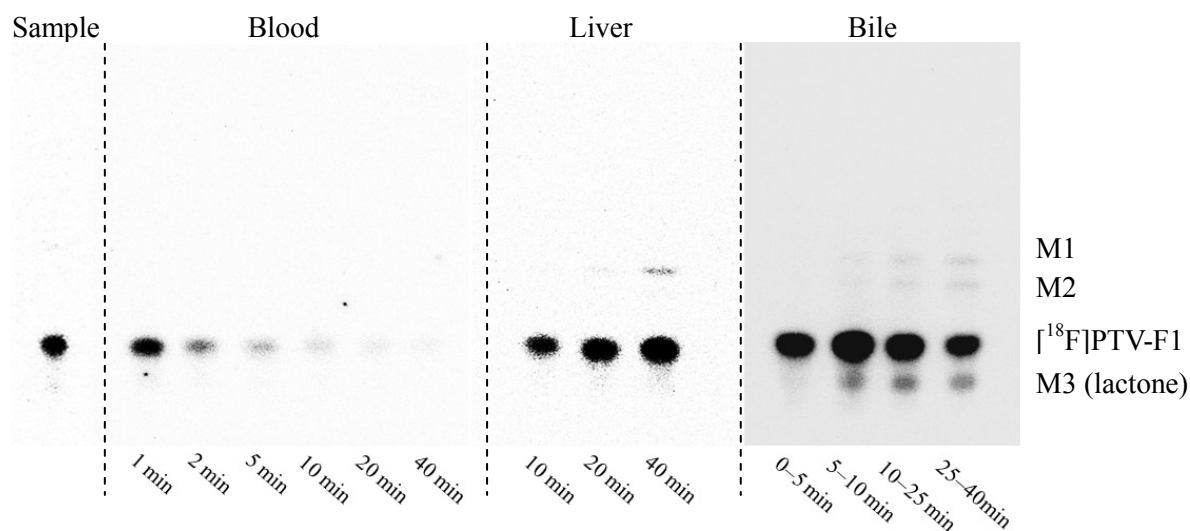


Figure 2-3. Representative TLC autoradiograms and HPLC radiochromatograms on the radio metabolite analysis after intravenous administration of [¹⁸F]PTV-F1 in SD rat.

3-4. [¹⁸F]PTV-F1 を用いた正常ラットの体内動態評価

正常ラット (SD ラット、8 週齢、雄性) を用いて [¹⁸F]PTV-F1 の体内動態を調べた (Table 2-3)。無麻酔下において [¹⁸F]PTV-F1 (148 - 396 kBq/100 μL) をそれぞれ尾静脈より投与し、投与後 2, 5, 10, 15, 30, 60 分にて屠殺後各臓器を摘出した。各臓器の放射能の測定結果より集積量 (%ID/organ) を算出した。その結果、投与後早期から肝臓における放射能が高く、2 分後において最大値 (32.9 %ID/organ) を示した。時間の経過に伴い、肝臓の放射能の低下及び腸の放射能の上昇が確認され、60 分後において最大値 (61.9 %ID/organ) を示した。

Table 2-3. Biodistribution of [¹⁸F]PTV-F1 in SD rat.

	%ID/organ ± SD (n = 4)					
	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
Blood*	14.70±2.17	6.56±0.81	2.75±0.21	1.60±0.17	0.90±0.10	0.36±0.12
Heart	0.25±0.05	0.11±0.02	0.05±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
Lung	0.63±0.14	0.29±0.04	0.14±0.06	0.07±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01
Liver	32.89±2.46	31.90±0.52	26.41±4.65	21.38±6.68	7.09±3.55	3.34±1.96
Pancreas	0.22±0.01	0.20±0.10	0.08±0.06	0.04±0.03	0.03±0.01	0.08±0.04
Spleen	0.09±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
Stomach	0.20±0.02	0.45±0.34	0.68±0.88	0.68±1.10	0.54±0.88	0.17±0.19
Intestine	7.68±1.89	18.20±6.44	28.33±2.51	42.39±6.29	57.98±2.46	61.91±8.40
Kidney	9.60±1.65	6.48±2.44	1.57±1.00	0.75±0.10	0.27±0.02	0.09±0.03
Bone	0.07±0.04	0.06±0.02	0.09±0.06	0.11±0.08	0.14±0.02	0.12±0.07

* Supposing that weight of blood in SD rat was 10 % of total body weight.

3-5. [¹⁸F]PTV-F1 を用いた正常ラットにおける PET 撮像及び解析

正常ラット (SD ラット、8 週齢、雄性) において PET 撮像を行った (Figure 2-4)。 [¹⁸F]PTV-F1 (5 - 10 MBq/100 μL) をイソフルラン麻酔下 (1.5 %, 2.0 L/min) のラットに尾静脈投与し、投与後 60 分間血液採取しながら、経時的に撮像した。また、OATP 阻害剤であるリファンピシン (1.5 μmol/min/kg) を持続静注しながら同様に撮像した。その結果、両群ともに集積量の絶対量は異なるが、投与後早期から放射能が肝臓及び腎臓へ集積し、他臓器における放射能集積は見られなかった。時間の経過に伴い、肝臓及び腎臓の集積は消失し、小腸の放射能集積量が増加していることが確認された。

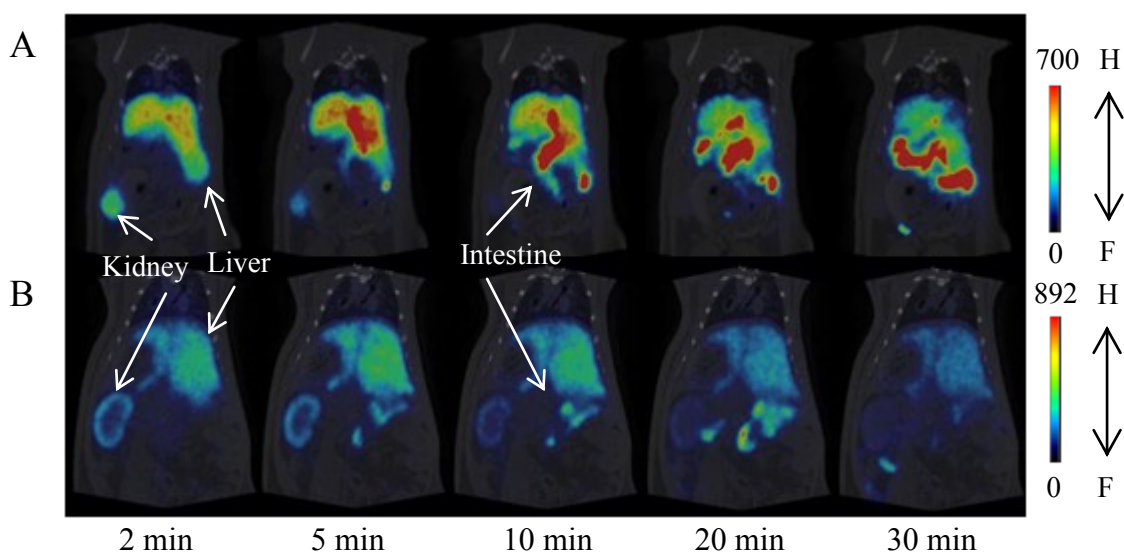


Figure 2-4. PET images of rat abdominal regions taken after intravenous administration of [¹⁸F]PTV-F1. Colonal maximum intensity projecting PET images of radioactivity in the abdominal region were captured at 2, 5, 10, 20 and 30 min in control rats (A), rifampicin-treated rats at an infusion rate of 1.5 μmol/min/kg (B).

PET 画像は解析ソフト PMOD を、血液データは μ FmPC システムを用いて解析した (Figure 2-5)。血液中の放射能は両群ともに投与後 5 分で急速に低下し、30 分後には放射能がほとんどない状態となった。さらにリファンピシン処置群において血液の放射能の滞留が見られた。肝臓において、非処置群では投与後 2 分に最大 36 % の集積を示し、それ以降は徐々に低下した。一方、リファンピシン処置群では投与後 5 分において最大値を示したが、21 % にとどまった。以降、集積量は低下したが、その減少率は非処置群に比べてかなりゆるやかで投与後 30 分では非処置群に比べ、集積量が大きくなった。

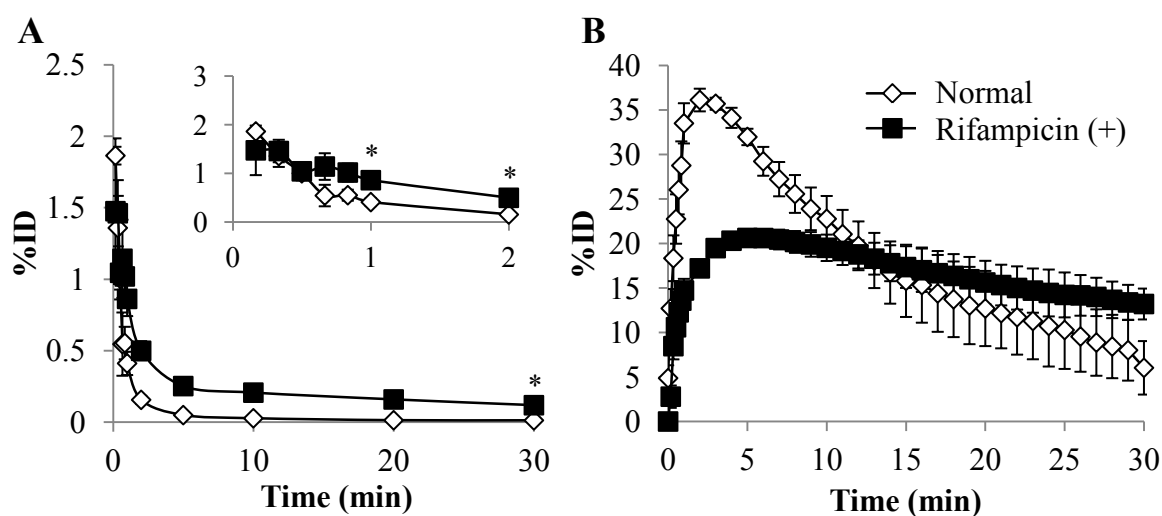


Figure 2-5. Time profiles of the radioactivity in blood from the μ FmPC system (A). liver quantified by PET imaging analysis 30 minutes after intravenous administration of [18 F]PTV-F1 (B). Each symbol represents control rats and rifampicin-treated rats (1.5 mmol/min/kg for at least a 90-minute PET scan), with the bar of mean \pm SE (n = 3). Inset figures show the data points within 2 minutes. (*t*-test, * *p* < 0.05)

AUC 及び integration plot 法により肝取込みクリアランスを算出し、比較した (Figure 2-6, Table 2-5)。その結果、AUC はリファンピシン非処置群に比べ、リファンピシン処置群において大きくなった。また、代謝及び胆汁排泄が無視できると考えられる投与後 5 分までの集積結果より得られた肝取込みクリアランスはそれぞれ 11.0 ± 2.0 、 2.40 ± 0.15 (mL/min/kg) となり、リファンピシン処置群において肝取込みクリアランスが約 20 %にまで有意に低下した。さらに、初期分布容積はそれぞれ 11.7 ± 3.1 、 2.17 ± 0.14 (mL/kg) となった。

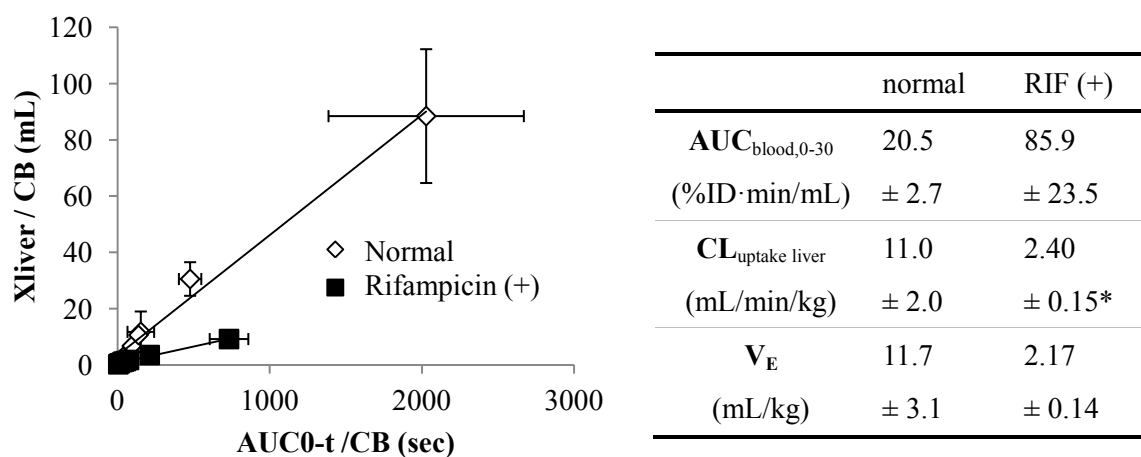


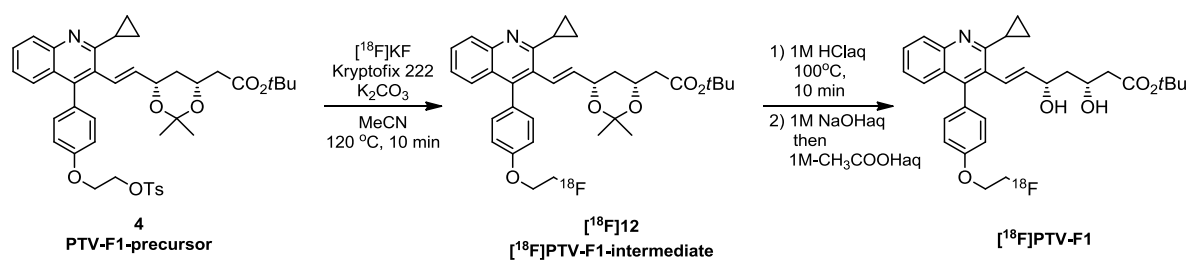
Figure 2-6. Integration plots were drawn for the calculation of hepatic uptake of total radioactivity in control rats and rifampicin-treated rats. The data represent the mean \pm SE (n = 3).

Table 2-4. Pharmacokinetic parameters of [^{18}F]PTV-F1 after its intravenous administration in rats. The values represent the mean \pm SE (n = 3). (t-test, * $p < 0.05$).

4. [¹⁸F]PTV-F1 の臨床研究にむけた検討

[¹⁸F]PTV-F1 の自動合成化検討

自動合成検討は外部加熱条件による [¹⁸F]PTV-F1 の合成法を用いた (Scheme 2-6)。



Scheme 2-6 Synthesis of [¹⁸F]PTV-F1 for a clinical study

まず、非標識体を用いて HPLC における精製条件及び分析条件の最適化を行った (Table 2-5)。基本的に、¹⁸F の半減期 (109.7 分) を考慮し、4 種類の化合物 (PTV-F1、Lactone、中間体 12、前駆体 4) の分析及び目的物の分取が 20 分以内で完了することが理想である。

水系溶媒にはヒトに投与する際の毒性を考慮し、毒性の低い酢酸緩衝液及びリン酸緩衝液を選択した¹⁹。一方、有機溶媒系が MeOH の場合では中間体及び前駆体が 20 分以内に溶出せず、MeCN では PTV-F1 が逆相カラムへ保持されなかった。そこでグラジエント溶離条件を検討し、最終的に「MeCN : 10 mM NaH₂PO₄ (pH = 4) = 40 : 60 (MeCN: 5 min 40 %, 10 min 80 %, 20 min 80 %)」という条件が最適となった。

しかし、この条件では、分取条件として目的物を単離することはできなかった。そこで、緩衝能の高い酢酸緩衝液 (pH = 4) とリン酸緩衝液 (pH = 2.5) を選択し、最適化を行った (Table 2-6)。自動合成を行った際に、再現性や薬剤の pH 調製の容易さを考慮し、「MeOH: 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 60 : 40」という分取条件を採用した。

次に、炭酸水素ナトリウム水溶液 (メイロン 8.4 %[®]) により pH を 6~8 へ調節した後、乾固させた。最後に、生理食塩水で実際に投与するための薬剤として液量を調整し、フィルターろ過 (MILLEX GV) した後に PTV-F1 製剤とした。

結果として、初めに示した条件¹⁹である①2 段階以内の反応、②ワンポット反応、③1 回の精製操作というすべての条件を満たし、合成時間 80 分、合成量 200 mCi 以上、放射化学的収率 25 %、放射化学的純度 98 %以上で安定して得られる自動合成条件を見出し、健常ボランティアに対する臨床試験を実施することができた。

Table 2-5. Optimization of HPLC analysis condition

Condition (A: MeOH, B: MeCN)	Retention time (min)			
	PTV-F1	Lactone	20	12
Column: AR-II 4.6 x 150 mm				
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 50 : 50, 1.5 mL/min	8.4	17.5	-	-
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 50 : 50, 2.0 mL/min	6.5	-	-	-
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 60 : 40, 2.0 mL/min	3.5	6.5	14.4	28.3
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 70 : 30, 1.0 mL/min	4.1	6.1	-	-
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 70 : 30, 1.5 mL/min	2.8	4.2	-	-
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 70 : 30, 2.0 mL/min	2.1	3.2	37.0	72.0
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 80 : 20, 2.0 mL/min	1.4	1.7	8.4	11.3
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 60 : 40 (A: 8 min 60 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 1.5 mL/min	4.6	8.4	15.3	15.7
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 60 : 40 (A: 8 min 60 %, 13 min 80 %, 20 min 80 %), 1.5 mL/min	4.6	8.4	22	23.1
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 60 : 40 (A: 10 min 60 %, 15 min 90 %, 20 min 90 %), 1.5 mL/min	4.6	8.4	17.3	17.7
A : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 70 : 30 (A: 8 min 70 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 1.5 mL/min	2.9	5.4	14.9	15.3
A : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 65 : 35 (A: 8 min 65 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 1.5 mL/min	4.4	9.3	15.3	15.7
A : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 62.5 : 37.5 (A: 8 min 62.5 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 1.5 mL/min	5.8	11.1	15.4	15.8
A : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 62 : 38 (A: 8 min 62 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 1.5 mL/min	6	11.3	15.5	15.8
A : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 60 : 40 (A: 8 min 60 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 1.5 mL/min	8.7	12	15.6	15.9
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 30 : 70, 2.0 mL/min	3.2	9.9	>60	>60
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 35 : 65, 2.0 mL/min	2.0	5.7	-	-
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 40 : 60, 2.0 mL/min	1.5	3.8	-	-
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 50 : 50, 2.0 mL/min	1.2	2.3	-	-
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 70 : 30, 2.0 mL/min	1.0	1.4	9.1	14.8

B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 80 : 20, 2.0 mL/min	-	-	-	14.8
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 40 : 60 (B: 5 min 40 %, 10 min 80 %, 20 min 80 %), 2.0 mL/min	1.5	3.8	13.2	15.3
B : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 35 : 65 (B: 5 min 35 %, 10 min 80 %, 20 min 80 %), 2.0 mL/min	7.3	9.3	14.5	16.5
B : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 35 : 65 (B: 8 min 65 %, 13 min 10 %, 20 min 10 %), 2.0 mL/min	9.1	11.8	14.7	15.2
B : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 40 : 60 (B: 5 min 40 %, 10 min 80 %, 20 min 80 %), 2.0 mL/min	4.8	8.7	14.4	16.4
B : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 45 : 55 (B: 8 min 45 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 2.0 mL/min	2.8	9.6	14.5	15
B : 10 mM NaH ₂ PO ₄ aq = 65 : 35 (B: 8 min 65 %, 13 min 90 %, 20 min 90 %), 2.0 mL/min	1.2	2.2	12.9	13.9
B : 10 mM CH ₃ COONH ₄ aq = 40 : 60 (B:5 min 40 %, 10 min 80 %, 20 min 80 %), 2.0 mL/min	1.5	8.8	14.3	16.3
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 40 : 60 (B: 5 min 40 %, 20 min 80 %), 2.0 mL/min	1.5	3.8	19.9	20 >

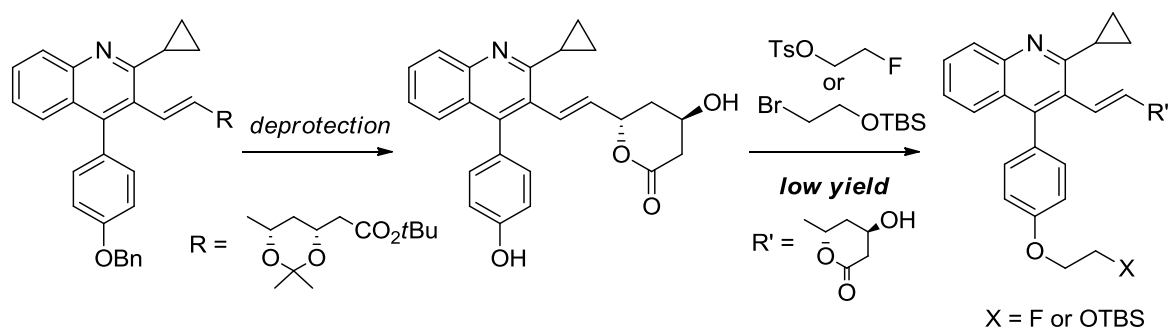
Table 2-6 Optimization of HPLC purification condition

Column: AR-II 10 x 250 mm, Flow: 5.0 mL/min, 1 mL inject	Rt (min)
(A: MeOH, B: MeCN)	PTV-F1
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 35 : 65	5.7
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 40 : 60	4.3
B : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 30:70→40:60	9.3
B : 10mM NaH ₂ PO ₄ aq = 40 : 60	15.8
B : 10mM NaH ₂ PO ₄ aq = 42.5 : 57.5	12.4
B : 10mM NaH ₂ PO ₄ aq = 45 : 55	10.1
B : 10mM NaH ₂ PO ₄ aq = 50 : 50	6.8
B : 10mM NaH ₂ PO ₄ aq = 60 : 40	4.6
B : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 40 : 60	13.6
B : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 45 : 55	8.2
B : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 50 : 50	5.7
B : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 55 : 45	4.4
B : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 40 : 60	>20
B : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 45 : 55	9.5
B : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 50 : 50	5.5
A: 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 60 : 40	9.5
A : 20 mM phosphate buffer (pH=2.5) = 70 : 30	6.4
A : 10mM NaH ₂ PO ₄ aq = 65 : 35	12.7
A : 10mM NaH ₂ PO ₄ aq = 70 : 30	8.2
A : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 60 : 40	22.1
A : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 65 : 35	8.6
A : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 70 : 30	5.7
A : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 75 : 25	4.9
A : 20 mM H ₃ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ buffer (pH=4) = 80 : 20	3.7
A : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 60 : 40	>20
A : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 65 : 35	13.1
A : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 70 : 30	8.0
A : 20 mM CH ₃ COOH buffer (pH=4) = 75 : 25	5.6

考察

本章では、肝臓の有機アニオントランスポーター機能のインビボ評価のための核医学分子イメージングプローブとしての ^{18}F 標識 pitavastatin 誘導体の開発について検討した。

当初、効率的に非標識体及び前駆体を合成するために、側鎖に光学活性エステルを結合させた後にフェノール性水酸基の脱保護及びフルオロエチル基 (または *tert*-ブチルジメチルシロキシエチル基) の導入を試みた (Scheme 2-7)。しかし、ベンジル基の脱保護において化合物自体にオレフィンを有するため、接触還元処理は使用できないことから、強酸条件下におけるチオアニソールで処理していたが、その場合、副生成物が多く、反応進行率も悪いため精製が困難であった。また、次段階のフェノール性水酸基に対するエーテル化においても、収率は 20 %にとどまった。これはエーテル化反応において塩基性条件下なため、ラクトンの開環がおこり、カルボキシル基やジオール基が生成することによる反応点の増加や立体障害の増大が起こることが予想された。そのため、フェノール水酸基の求核攻撃が起こりにくくなり、収率が低下したと考えた。そこで著者は、側鎖導入前に脱保護、フェノール性水酸基の修飾を行うことを計画した。その結果、脱保護反応として接触還元処理することで、脱ベンジル化は素早く進行し、ほぼ単一で目的物が得られた。結果として、エーテル化の収率も大きく向上し、70%以上と高収率で目的物が得られた。



Scheme 2-7. Primary synthetic route of PTV-F1

PTV-F1 の側鎖である光学活性エステルを導入する Horner-Wadsworth-Emmons 反応において、検討当初は、収率は 30 %が限度であった (Scheme 2-3)。これは、リン酸エステルと LiTMP より導かれる反応中間体が系中で非常に不安定で、微量な水分でも分解するためと考えた。そこで、水分を除去するために、器具をデシケーターで反応を開始する直前

まで乾燥し、オイル状物質である光学活性エステル **11** に対しトルエンとの共沸脱水を行った。さらに厳格な脱水条件下で行うことで、収率が約 2 倍の 59 %まで向上させることに成功した。

新規マイクロ波反応装置を用いて $[^{18}\text{F}]$ PTV-F1 の合成を検討し、収率の向上及び合成時間の短縮を図った (Scheme 2-6)。結果として、合成時間が大幅に短縮でき、そして収率も 15 %向上した。これも内部加熱が外部加熱条件より効率よく反応を進行させたと考えられる。また、マイクロ波加熱が急速に溶液温度を上昇させたため、副反応が抑制され、収率が向上したと考えられる。

$[^{18}\text{F}]$ PTV-F1 の 1-オクタノール/水分配係数を測定したところ、 1.26 ± 0.04 となり、pitavastatin (1.49) に比べて、若干の脂溶性の低下が見られた。フッ素原子に比べ、フルオロエチル基は化合物の脂溶性を低下させることが報告されていることから⁵⁷、PTV-F1 における脂溶性の低下はフッ素導入部位の構造変換によって起こったものと考えられる。

PTV-F1 の OATP 認識性と基質特異性を確認するために、HEK293 細胞に OATP1B1 を過剰発現させた細胞⁸を用いて、各細胞への取り込み評価を行った。PTV-F1 は pitavastatin と比較し、ほぼ同等な取込みを示した。標識体である $[^{18}\text{F}]$ PTV-F1 も同様に細胞取込み評価を行った (Figure 2-2)。対照群に比べ、OATP1B1 を過剰発現させた細胞では、経時的に取り込み量が有意に増加した。これらの結果から、PTV-F1 は pitavastatin の有する OATP 認識性、基質特異性を維持していることが示された。

正常ラットにおいて、 $[^{18}\text{F}]$ PTV-F1 の代謝物を分析し、生体内安定性の評価を行った (Figure 2-3)。投与後 40 分において胆汁中及び肝臓中に代謝物が確認されたが、80 %以上は未変化体で存在しており、特に肝臓中では 95 %も存在し、生体内において安定であることが示唆された。また代謝物として 3 種類の化合物が確認されたが、pitavastatin に関する知見¹⁶より、PTV-F1 より極性の高い化合物は側鎖の β 酸化や水酸化を受けた代謝物がさらにタウリンやグルクロン酸によって抱合された化合物と予想される。また、PTV-F1 より極性の低い化合物は ^{18}F 標識したラクトン体である $[^{18}\text{F}]$ **21** と同じ Rf 値を示したことからラクトン体であると予想される。

正常ラットを用いて $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ の体内動態評価を行った (Table 2-3)。放射能は主に肝臓、腸、血液そして腎臓において確認され、他臓器への分布は見られなかった。結果として、PTV-F1 は pitavastatin とほぼ同様の体内動態を示した。さらに、脱フッ素化の指標となる骨への集積は低いため、フッ素原子からフルオロエトキシ基への変換によって ^{18}F 標識体の安定性は低下しないことを認めた。

正常ラットを用いて経時的に PET 撮像を行った。また OATP 阻害剤であるリファンピシンを持続静注しながら同様な実験を行った (Figure 2-4)。非処置群では投与後早期に肝臓や腎臓へ放射能集積が見られ、時間の経過に伴い、腸への移行が見られた。これは体内動態評価の結果と一致しており、胆汁排泄されることを示している。

PET 画像と血中のデータより解析を行った (Figure 2-5)。リファンピシン処置群では非処置群に比べ、肝臓への集積が低下した。このことよりリファンピシンによって OATP が阻害され、 $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ の肝臓への取込みが低下したことが示唆された。さらに投与後 30 分後の血中の放射能は非処置群に比べリファンピシン処置群において有意に増加し、AUC も阻害群では非処置群と比較して約 4 倍まで上昇した。この結果から OATP が阻害され、 $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ が肝臓に取り込まれなかったことが示唆された。以上の結果から、 $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ が OATP 特異的に取り込まれていることが示唆された。

排泄のパラメータを無視できると考えられる投与後 0-5 分間における解析結果より、肝取込みクリアランスを算出した (Figure 2-6, Table 2-4)。それぞれ 11.0 ± 2.0 、 2.40 ± 0.15 (mL/min/kg) となり、 $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ の肝取込みクリアランスは肝血流速度に近い値を示す $[^{11}\text{C}]\text{TIC}$ (55 mL/min/kg)⁵、 $[^{11}\text{C}]\text{Telmisartan}$ (63 mL/min/kg)⁶ よりも半分以下の値を示し、これらの化合物より $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ は肝取込み能評価に適していると考えられる。さらに OATP 阻害群において肝取込みクリアランスが約 20 %まで低下した。以上の結果より、 $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ は既存の PET プローブに比べても、より OATP 機能評価に適した性質を有することが示された。

さらに $[^{18}\text{F}]\text{PTV-F1}$ の臨床利用に向けて、HPLC 分析条件及び精製条件の最適化を行った。(Table 2-5, 2-6) 臨床に用いる HPLC 精製条件として有機溶媒は粘度、溶出力そして毒性の観点から MeCN が第一選択となる¹⁹。多くの溶媒条件を検討したところ、まず HPLC 分析は MeCN 「MeCN : 10 mM NaH_2PO_4 (pH = 4) = 40 : 60 (MeCN: 5 min 40 %, 10 min 80 %, 20 min 80 %)」という条件が最適となった。これは pitavastatin の pKa が 4.2¹⁶ であることから、pH = 4 である NaH_2PO_4 水溶液を用いると、上記の条件において保持され、適当な保持時

間が得られた。しかし、反応中間体と前駆体は高脂溶性なため、定組成では溶出せず、グラジエント溶離条件が必要となった。

しかし、装置や再現性の問題から HPLC 精製条件として定組成条件が必要なため、分析条件をそのまま適用できなかった。そこで、第一選択である MeCN を用いた条件で、「20 mM CH₃COOH buffer (pH=4) = 45 : 55」という条件を採用したが、放射化学的純度にバラつきが生じた。これは、HPLC への導入量が 3~4 mL と非常に多いため、移動相の組成変化が起こったためと考えられた。そこで、リン酸緩衝液 (pH = 2.5) と MeOH を用いた精製条件で検討し、十分な放射化学的純度を有した [¹⁸F]PTV-F1 を再現性よく得ることができた。この HPLC 条件では、有機溶媒が多い組成で溶出でき、さらにリン酸緩衝液 (pH = 2.5) の緩衝能が高いため、導入量による組成変化の影響が小さくなったと予想される。結果として、臨床に必要な量を安定して得られる自動合成条件を見出し、健常ボランティアに対する臨床試験を実施することに成功した。

上記の結果より、[¹⁸F]PTV-F1 が臨床応用可能な OATP 機能評価のための核医学分子イメージングプローブとなりうることを見出した。

実験の部

試薬・機器

$^1\text{H-NMR}$ は JEOL JNM-AL400, JEOL JNM-LA500 を用い、内部標準物質として Tetramethylsilane (TMS)、測定溶媒として CDCl_3 、 $\text{DMSO-}d_6$ を用いて測定した。IR は島津社製 Shimadzu FTIR-8300 を用いて測定した。液体クロマトグラム質量分析計 (LC-MS) は定速ポンプ (LC-10AP, 島津製作所) に分光光度検出器 (SPD-10AP, 島津製作所) および MS 検出器 (MS-2010, 島津製作所) を用いて測定した。MS は Shimadzu GC-MS-QP Plus を用いて測定した。比旋光度は堀場製作所社製 Horiba SEPA-500 を用いて測定した。フラッシュカラムクロマトグラフィーは関東化学社製 Silica Gel 60N を用いた。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck 社製 Kieselgel 60 F-254 plates を用いた。分取用 TLC (PTLC) は Merck 社製 Silica gel 60 F-254 plate (0.5 mm) を用いた。分取用 HPLC は JAI LC-908 を用い、GPC カラムは JAIGEL 1H と 2H を用いた。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は定速ポンプ (LC-8A or LC-20A, 島津製作所) に分光光度検出器 (SPD-20A, 島津製作所) およびオンライン RI 検出器 (US-3000 radioHPLC detector, ユニバーサル技研社) を接続した系を用いた。反応に用いた無水溶媒は、常法に従い無水としたものを用いた。試薬の多くは、Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Nacalai Tesque, Inc., Aldrich Chemical Inc. から購入した。また、kanekasynton は日産化学株式会社及び興和株式会社より提供していただいたものを使用した。

^{18}F は京都大学医学部附属病院設置の住友重機械工業社製超小型サイクロトロン CYPRIS HM-18 及び太陽日酸製 ^{18}O]H $_2\text{O}$ を用いて製造した。放射能は ALOKA 社製キュリーメーター (IGC-7)、PerkinElmer 社製オートウェルガンマカウンター (Wallac 1480 WIZARD 3) を用いて測定した。イメージングプレート及びその解析は富士フイルム社製 BAS SR2040、BAS-5000、MultiGauge image analysis program を使用し行った。Radio-TLC 分析は (miniGITA Star g-radioactivity TLC scanner, RAYTEST 社) を用いて行った。

PET 装置による画像の収集は、Triumph (TriFoil Imaging Inc., Chatsworth, CA, USA) を用いて行った。

PTV-F1 の合成

Methyl (2-cyclopropyl-4-hydroxyquinoline-3-yl)carboxylate (13)

アルゴン雰囲気下、水素化ナトリウム (11 g, 0.27 mol, 60 % dispersion in oil) の dimethylacetamide (650 mL) 溶液に methyl 3-cyclopropyl-3-oxopropanoate (100 g, 0.70 mol) を室温下において滴下した。同温度にて 10 分間攪拌した後、イサト酸無水物 (20 g, 0.12 mol) の dimethylacetamide 溶液 (150 mL) を室温下にて滴下し、50 分間還流した。反応後、溶媒を減圧下で留去した後、水 (400 mL) 及び hexane (400 mL) を加え、室温で終夜攪拌した。析出した固体をろ取り、蒸留水とジイソプロピルエーテルで洗浄した。減圧下で乾燥し、淡黄色固体 **13** (11 g, 37 % yield) を得た。MS (EI): m/z : 244 (M^+); HRMS calcd for $C_{14}H_{13}NO_3$ (M^+): 244.15, found 243.09.

Methyl {2-cyclopropyl-4-(trifluoromethanesulfonyloxy)quinoline-3-yl}carboxylate (14)

アルゴン雰囲気下、**13** (1.7 g, 6.7 mmol) の CH_2Cl_2 (18 mL) 溶液に pyridine (830 mg, 11 mmol) を加えた。Trifluoromethanesulfonic anhydride (2.4 g, 8.4 mmol) を $-20^\circ C$ において滴下し、室温にて 50 分間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL) を加え、反応液を $CHCl_3$ によって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: $CHCl_3$) にて精製し、淡黄色油状物 **14** (2.5 g, 94 % yield) を得た。

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.02 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.76 (td, $J = 6.0$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 4.07 (s, 3H), 2.16 (tt, $J = 4.6$ Hz, 3.4 Hz, 1H), 1.36 (tt, $J = 4.6$ Hz, 1.4 Hz, 2H), 1.11 (dq, $J = 3.4$ Hz, 1.4 Hz, 2H); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 164.8, 161.4, 149.8, 131.8, 129.1, 127.5, 122.3, 121.6, 119.7, 119.2, 118.4 (q, $J_F = 320.3$ Hz), 53.1, 15.6, 11.7 (2); MS (EI $^+$, 70 eV): m/z : 375 (M^+ , 22), 347 (47), 242 (58), 214 (100), 210 (70), 183 (38), 154 (64); HRMS calcd for $C_{15}H_{12}F_3NO_5S$ (M^+): 375.0388, found 375.0380.

Methyl {2-cyclopropyl-4-(4-benzyloxyphenyl)quinoline-3-yl}carboxylate (15)

アルゴン雰囲気下、**14** (2.5 g, 6.6 mmol) の THF (16 mL) 及び水 (4 mL) 溶液に 4-benzyloxybenzeneboronic acid (2.0 g, 8.8 mmol)、炭酸カリウム (2.0 g, 18.5 mmol)、tetrakis(triphenylphosphine)palladium (381 mg, 0.33 mmol) をそれぞれ室温下で加えた。30 $^\circ C$ にて 3 時間攪拌した後、蒸留水 (200 mL) を加え、反応液を $CHCl_3$ によって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去する

ことで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: CHCl_3) にて精製し、無色固体 **15** (2.6 g, 95 % yield) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.66 (br t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.58 (br d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.48 (br d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 7.41 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.36 (br td, $J = 6.6$ Hz, 1.7 Hz, 2H), 7.30 (br d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.09 (br d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 3.61 (s, 3H), 2.18 (dq, $J = 8.3$ Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.36 (dq, $J = 4.6$ Hz, 2.2 Hz, 2H), 1.04 (dq, $J = 8.3$ Hz, 2.2 Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 169.4, 158.8, 158.1, 148.0, 145.3, 136.7, 130.6 (2), 129.9, 129.0, 128.6 (2), 128.2, 128.1, 127.7, 127.6 (2), 126.4, 125.8, 125.2, 114.6 (2), 70.1, 52.2, 15.5, 10.3 (2); MS (EI^+ , 70 eV): m/z : 409 (M^+ , 20), 381 (16), 91 (100); HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ (M^+): 409.1678, found 409.1684.

Methyl {2-cyclopropyl-4-(4-hydroxyphenyl)quinoline-3-yl}carboxylate (16)

アルゴン雰囲気下、**15** (2.2 g, 5.4 mmol) の CH_2Cl_2 (20 mL) 及び MeOH (20 mL) 混合溶液に Pd/C (2.2 g) を室温下に加え、慎重に容器内を水素ガスで置換した。室温にて1時間激しく攪拌した後、セライトろ過により不溶物を除去し、酢酸エチルで洗浄した。溶媒を留去することで得られた油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 4/1) にて精製し、無色固体 **16** (1.5 g, 87 % yield) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.96 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.35 (br dd, $J = 8.0$ Hz, 7.4 Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.06 (brs, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.16 (tt, $J = 8.0$ Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.33 (ddd, $J = 4.6$ Hz, 4.6 Hz, 1.7 Hz, 2H), 1.03 (ddd, $J = 6.3$ Hz, 6.3 Hz, 2.9 Hz, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 169.8, 158.2, 156.1, 148.0, 145.6, 130.7 (2), 128.8, 127.8, 127.7, 126.5, 125.9, 125.3, 115.3 (2), 52.3, 29.7, 15.6, 10.2 (2); MS (EI^+ , 70 eV): m/z : 319 (M^+ , 68), 293 (100), 260 (81), 234 (36); HRMS calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ (M^+): 319.1208, found 319.1200.

Methyl [2-cyclopropyl-4-{4-(2-fluoroethoxy)phenyl}quinoline-3-yl]carboxylate (17)

アルゴン雰囲気下、**16** (1.5 g, 4.7 mmol) 及び 2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (986 μL , 5.6 mmol) の DMF (15 mL) 溶液に炭酸カリウム (2.0 g, 18.5 mmol) を室温下に加えた。70°Cにて20時間攪拌した後、蒸留水 (200 mL) を加え、反応液を Et_2O によって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 5/1) にて精製し、淡黄色固体 **17** (1.3 g, 76 % yield) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.36 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.81 (dt, $J_{\text{F}} = 47.3$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 2H), 4.30 (dt, $J_{\text{F}} = 27.6$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 2H), 3.64 (s, 3H), 2.18 (tt, $J = 8.2$ Hz, 4.6 Hz, 2H), 1.36 (ddd, $J = 4.6$ Hz, 3.4 Hz, 2.9 Hz, 2H), 1.05 (ddd, $J = 8.2$ Hz, 3.4 Hz, 2.9 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 169.3, 158.4, 158.1, 156.1, 148.0, 145.0, 130.6 (2), 129.9, 129.0, 128.5, 127.6, 125.8, 125.1, 114.3 (2), 81.8 (d, $J_{\text{F}} = 170.3$ Hz), 67.1 (d, $J_{\text{F}} = 20.4$ Hz), 52.1, 15.4, 10.3 (2); MS (EI^+ , 70 eV): m/z : 365 (M^+ , 99), 337 (100), 322 (34), 306 (57), 269 (22); HRMS calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{FNO}_3$ (M^+): 365.1427, found 365.1424

3-(bromomethyl)-2-cyclopropyl-4-{4-(2-fluoroethoxy)phenyl}quinoline (18)

アルゴン雰囲気下、lithium aluminum hydride (270 mg, 7.1 mol, 98 %) の THF (15 mL) 懸濁液に **17** (1.3 g, 3.55 mmol) の THF (10 mL) を氷浴下において滴下した。室温にて 2 時間攪拌した後、 Et_2O (150 mL) で希釈し、飽和硫酸ナトリウム水溶液で試薬を不活化した。硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下で留去して無色固体 **17a** (1.2 g) を得た。

HRMS (EI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FNO}_2$ (M^+): 337.1478, found 337.1484

アルゴン雰囲気下、**17a** (1.2 g) 及び四臭化炭素 (2.4 g, 7.1 mmol) の CH_2Cl_2 (6.0 mL) 溶液に triphenylphosphine (1.9 g, 7.1 mmol) を氷浴下で加えた。同温度にて 30 分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、反応液を CHCl_3 によって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) にて精製し、淡黄色固体 **18** (1.1 g, 76 % yield, 2 steps) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.95 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.65 - 7.59 (m, 1H), 7.37 - 7.30 (m, 4H), 7.11 (dd, $J = 8.8$ Hz, 2.7 Hz, 2H), 4.84 (dt, $J_{\text{F}} = 47.3$ Hz, $J = 3.9$ Hz, 2H), 4.71 (s, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.34 (dt, $J_{\text{F}} = 27.8$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 2H), 2.52 (tt, $J = 8.0$ Hz, 4.0 Hz, 1H), 1.38 - 1.37 (m, 2H), 1.15 - 1.05 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 161.4, 158.4, 147.3, 145.0, 130.4 (2), 129.4, 128.8, 128.5, 127.4, 126.7, 125.5, 114.5 (2), 81.8 (d, $J_{\text{F}} = 170.9$ Hz), 67.1 (d, $J_{\text{F}} = 20.4$ Hz), 41.7, 29.6, 14.5, 9.7 (2); MS (EI^+ , 70 eV): m/z : 399 (M^+ , 5.7), 355 (26), 320 (100), 273 (17), 244 (21); HRMS calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrFNO}$ (M^+): 399.0634, found 399.0637

2-cyclopropyl-3-(diphenylphosphorylmethyl)-4-{4-(2-fluoroethoxy)phenyl}quinoline (19)

アルゴン雰囲気下、**18** (1.1 g, 2.7 mmol) の toluene (20 mL) 溶液に ethoxydiphenylphosphine (2.9 mL, 14 mmol) を室温下で加えた。120 °C にて 20 時間攪拌し

た後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物へ Et₂O を加え、終夜攪拌した。析出した結晶を減圧下で乾燥し、無色結晶 **19** (1.3 g, 91 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.46 (qt, *J* = 7.0 Hz, 1.5 Hz, 1H), 7.40 - 7.30 (m, 8H), 7.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.83 (dt, *J*_F = 47.3 Hz, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.28 (dt, *J*_F = 27.9 Hz, *J* = 4.1 Hz, 2H), 4.08 (d, *J* = 14.1 Hz, 2H), 2.64 (tt, *J* = 8.0 Hz, 4.0 Hz, 1H), 1.23 - 1.20 (m, 2H), 0.93 - 0.90 (m, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 162.2, 157.9, 133.3, 132.5, 131.7 (2), 131.2 (2), 131.1 (2), 130.9, 129.6, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4 (3), 128.3 (3), 126.7, 126.3, 125.1, 114.6 (2), 81.8 (d, *J*_F = 170.3 Hz), 67.2 (d, *J*_F = 20.4 Hz), 33.7, 33.2, 16.1, 10.1 (2); MS (EI⁺, 70 eV): *m/z*: 521 (M⁺, 50), 396 (100), 320 (41), 280 (23), 244 (21), 201 (37); HRMS calcd for C₃₃H₂₉FNO₂P (M⁺): 521.1920, found 521.1927

tert-butyl 2-((4*R*,6*S*)-6-formyl-2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)acetate (11**)**

アルゴン雰囲気下、kanekasynton (1.1 g, 4.35 mmol) の CH₂Cl₂ (10 mL) 溶液に Dess-Martin reagent (2.2 g, 5.2 mmol) 及び NaHCO₃ (730 mg, 8.7 mmol) を氷浴下において加えた。室温にて 7 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL) を加えた。酢酸エチルによって 3 回抽出した後、合わせた有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液及び飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた無色油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) にて精製し、無色固体 **11** (822 mg, 73 % yield) を得た。

tert-butyl 2-[(4*R*,6*S*)-6-((*E*)-2-(2-cyclopropyl-4-(4-(2-fluoroethoxy)phenyl)quinolin-3-yl)ethenyl)-2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl)acetate (PTV-F1-intermediate, **20)**

アルゴン雰囲気下、2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TMP) (210 μl, 1.2 mmol) の THF (4.0 mL) 溶液に *n*-butyllithium (2.69 M in hexane, 2.2 mmol, 820 μl) を -78°C で滴下した。氷浴下にて 1 時間攪拌した後、**19** (500 mg, 0.96 mmol) の THF (15 mL) 溶液を -78°C で 20 分間かけて滴下し、同温度で 30 分攪拌した。攪拌後、**11** (350 mg, 1.4 mmol) の THF (4 mL) を同温度で滴下し、そのまま自然昇温させながら 24 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、反応液を酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) にて精製し、無色アモルファス固体 PTV-F1-intermediate (**20**) (320 mg, 59 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ; 7.94 (brs, 1H), 7.57 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.29 (brt, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.15 (ddd, *J* = 22.5 Hz, 8.2 Hz, 1.4 Hz, 2H), 7.02 (ddd, *J* = 9.7 Hz, 7.4 Hz, 2.6 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 5.64 (dd, *J* = 16.3 Hz, 6.0 Hz, 1H), 4.82 (dt, *J*_F = 47.3 Hz, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.37 - 4.21 (m, 3H), 2.45 (sep, *J* = 4.6 Hz, 1H), 2.40 (dd, *J* = 15.2 Hz, 7.2 Hz, 1H), 2.26 (dd, *J* = 15.2 Hz, 6.0 Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.41 - 1.29 (m, 6H), 1.04 (brq, *J* = 12.0 Hz, 3H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 160.6, 157.9, 146.7, 145.0, 137.5, 131.6, 131.2, 129.1, 128.8, 128.7, 128.5, 126.3 (2), 125.1, 114.5, 114.1, 98.8, 81.9 (d, *J*_F = 170.9 Hz), 80.5, 70.0, 67.2 (d, *J*_F = 20.4 Hz), 65.8, 42.6, 36.4, 30.0, 28.0 (3), 19.7, 16.0, 15.2, 10.4, 10.1; MS (EI⁺, 70 eV): *m/z*: 561 (M⁺, 6.7), 490 (17), 430 (36), 388 (31), 332 (100), 319 (82); HRMS calcd for C₃₄H₄₀FNO₅ (M⁺): 561.2890, found 561.2882; [α]_D²⁰ -3.63 (*c* 0.8, MeOH);

(4*R*,6*S*)-6-[(*E*)-2-[2-cyclopropyl-4-{4-(2-fluoroethoxy)phenyl}quinolin-3-yl]ethenyl]-4-hydroxytetrahydro-[2*H*]pyran-2-one (21)

アルゴン雰囲気下、**20** (80 mg, 0.14 mmol) の CH₂Cl₂ (2 mL) 溶液にトリフルオロ酢酸 (1 mL) を氷浴下において加えた。室温にて 1 時間攪拌した後、冷却した飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) へ注ぎ込んだ。酢酸エチルによって 3 回抽出した後、合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた無色油状物を分取薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: toluene/酢酸エチル = 1/4) にて精製し、淡黄色油状物 **21** (45 mg, 70 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ; 7.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 6.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.31 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 6.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 9.2 Hz, 1.4 Hz, 2H), 7.05 (dd, *J* = 6.3 Hz, 2.3 Hz, 2H), 6.71 (dd, *J* = 16.0 Hz, 1.1 Hz, 1H), 5.63 (dd, *J* = 16.0 Hz, 6.0 Hz, 1H), 5.20 - 5.14 (m, 1H), 4.82 (dt, *J*_F = 47.3 Hz, *J* = 4.1 Hz, 2H), 4.3 (dt, *J*_F = 28.1 Hz, *J* = 4.1 Hz, 2H), 4.12 (dt, *J* = 7.2 Hz, 3.4 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 17.7 Hz, 4.9 Hz, 1H), 2.55 (dd, *J* = 17.7 Hz, 4.9 Hz, 1H), 2.39 - 2.36 (m, 1H), 1.80 (dt, *J* = 14.0 Hz, 3.8 Hz, 2H), 1.65 (ddd, *J* = 13.2 Hz, 9.4 Hz, 3.2 Hz, 1H), 1.36 - 1.30 (m, 2H), 1.04 (dt, *J* = 8.0 Hz, 2.6 Hz, 2H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 169.5, 160.5, 158.0, 147.0, 145.2, 134.6, 131.4, 131.3, 130.2, 128.9 (2), 128.6, 126.3, 126.2, 125.4, 114.5 (2), 82.0 (d, *J*_F = 170.4 Hz), 75.9, 67.3 (d, *J*_F = 20.4 Hz), 62.4, 38.8, 36.1, 15.9, 10.3, 10.2; MS (EI⁺, 70 eV): *m/z*: 447 (M⁺, 40), 385 (48), 358 (95), 344 (42), 332 (100), 318 (53), 254 (32), 242 (35), 149 (21), 57 (18); HRMS calcd for C₂₇H₂₆FNO₄ (M⁺): 447.1846, found 447.1844; [α]_D²⁰ : -14.00 (*c* 0.45, MeOH);

(3R,5S,E)-7-[2-cyclopropyl-4-{4-(2-fluoroethoxy)phenyl}quinolin-3-yl]-3,5-dihydroxyhept-6-enoic acid (PTV-F1)

アルゴン雰囲気下、**21** (30 mg, 0.043 mmol) の MeOH (1 mL) 溶液に水酸化ナトリウム水溶液 (2.0M, 1 mL) を室温にて加え、30 分攪拌した。溶媒を減圧下で留去し、得られた残渣を逆相 HPLC (Cosmosil AR-II 10 x 250 mm, MeOH/10 mM HCOOH aq = 70/30, flow rate = 5.0 mL/min) によって精製して無色油状物 **PTV-F1** (10 mg, 32 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.95 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.59 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 6.9 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.41 (brd, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.30 (ddd, *J* = 8.2 Hz, 6.9 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.15 (brt, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.03 (ddd, *J* = 7.4 Hz, 4.0 Hz, 2.6 Hz, 2H), 6.46 (dd, *J* = 16.1 Hz, 1.1 Hz, 1H), 5.60 (dd, *J* = 16.1 Hz, 6.6 Hz, 1H), 4.83 (dt, *J_F* = 47.5 Hz, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.43 (brsep, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.32 (dt, *J_F* = 28.1 Hz, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.14 (qdd, *J* = 7.2 Hz, 4.9 Hz, 2.3 Hz, 1H), 3.65 (m, 3H), 2.51 (dd, *J* = 7.4 Hz, 4.3 Hz, 2H), 2.37 (brsep, *J* = 4.6 Hz, 1H), 1.54 (dt, *J* = 14.2 Hz, 9.7 Hz, 1H), 1.39 (dt, *J* = 14.2 Hz, 3.0 Hz, 1H), 1.34 (brs, 2H), 1.03 (dd, *J* = 7.4 Hz, 2.3 Hz, 2H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 184.5, 160.5, 157.9, 146.8, 139.0, 131.5, 131.3, 130.4, 129.2, 128.8, 128.6, 126.3 (2), 125.3, 114.5, 114.4, 82.2 (d, *J_F* = 170.1 Hz), 73.0, 68.0, 67.2 (d, *J_F* = 20.1 Hz), 41.9, 40.9, 38.9, 36.1, 16.0, 10.2 (2); MS (EI⁺, 20 eV): *m/z*: 465 (M⁺, 0.3), 447 (48), 429 (14), 401 (12), 385 (27), 359 (35), 332 (100), 318 (23), 307 (69), 83 (70); HRMS calcd for C₂₇H₂₈FNO₅ (M⁺): 465.1951, found 465.1956; [α]_D²⁰: 7.64 (*c* 0.23, MeOH);

PTV-F1-precursor の合成

Methyl [2-cyclopropyl-4-[4-{2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)ethoxy}phenyl]quinoline-3-yl]carboxylate (22**)**

アルゴン雰囲気下、**16** (2.1 g, 6.6 mmol) 及び (2-bromoethoxy)-*tert*-butyldimethylsilane (1.7 mL, 7.9 mmol) の DMF (30 mL) 溶液に K₂CO₃ (1.8 g, 13.1 mmol) を室温下で加えた。70 °C にて 13 時間攪拌した後、蒸留水 (250 mL) を加え、反応液を酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) にて精製し、無色油状物 **22** (2.5 g, 79 % yield) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.65 (brt, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.36 (brt, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.12 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.02 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.18 (tt, *J* = 8.0 Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.35 (ddd, *J* =

4.6 Hz, 3.7 Hz, 3.4 Hz, 2H), 1.05 (ddd, $J = 8.0$ Hz, 3.7 Hz, 3.4 Hz, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.13 (s, 6H); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 169.4, 159.0, 158.2, 148.1, 145.3, 130.6 (2), 129.9, 129.0, 127.9, 127.7, 126.4, 125.2, 114.3 (2), 69.3, 62.0, 52.2, 25.9 (3), 18.4, 15.5, 10.3 (2), -5.18 (2); MS (EI^+ , 20 eV): m/z : 477 (M^+ , 0.4), 420 (100), 388 (41); HRMS calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{NO}_4\text{Si}$ (M^+): 477.2335, found 477.2328

3-(bromomethyl)-2-cyclopropyl-4-[4-{2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)ethoxy}phenyl]quinoline (23)

アルゴン雰囲気下、lithium aluminum hydride (400 mg, 10 mol, 98 %) の THF (25 mL) 懸濁液に **22** (2.5 g, 5.2 mmol) の THF (15 mL) 溶液を氷浴下において滴下した。室温にて 5 時間攪拌した後、 Et_2O (200 mL) で希釈し、飽和硫酸ナトリウム水溶液で試薬を不活化した。硫酸ナトリウムにて乾燥し、溶媒を減圧下で留去して無色固体 **22a** (2.4 g) を得た。

HRMS (EI) calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_3\text{Si}$ (M^+): 449.2386, found 449.2380.

アルゴン雰囲気下、**22a** (2.4 g) 及び carbon tetrabromide (3.6 g, 11 mmol) の CH_2Cl_2 (20 mL) 溶液に triphenylphosphine (2.9 g, 11 mmol) を氷浴下で加えた。同温度にて 25 分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、反応液を CHCl_3 によって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 15/1) にて精製し、淡黄色固体 **23** (1.9 g, 69 % yield, 2 steps) を得た。

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.95 (dd, $J = 8.3$ Hz, 4.0 Hz, 1H), 7.62 - 7.58 (m, 1H), 7.38 - 7.25 (m, 4H), 7.08 (dd, $J = 8.8$ Hz, 3.2 Hz, 2H), 4.63 (s, 2H), 4.15 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 4.04 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H), 2.52 (tt, $J = 8.0$ Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.38 (brs, 2H), 1.12 (ddd, $J = 8.0$ Hz, 3.1 Hz, 2.9 Hz, 2H), 0.95 (s, 9H), 0.15 (s, 6H); ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 161.6, 159.0, 147.7, 147.4, 130.4 (2), 129.4, 128.9, 128.0, 127.5, 126.8, 126.6, 125.5, 114.5 (2), 69.3, 62.0, 41.8, 25.9 (3), 18.4, 14.7, 9.6 (2), -5.18 (2); MS (EI^+ , 15 eV): m/z : 511 (M^+ , 0.2), 456 (100), 410 (66), 374 (8.5), 300 (9.2); HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{BrNO}_2\text{Si}$ (M^+): 511.1542, found 511.1547.

2-cyclopropyl-3-(diphenylphosphorylmethyl)-4-[4-{2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)ethoxy}phenyl]quinoline (10)

アルゴン雰囲気下、**23** (1.9 g, 3.8 mmol) の toluene (35 mL) 溶液に ethoxydiphenylphosphine (4.1 mL, 19.9 mmol) を室温下で加えた。120°C にて 4.5 時間攪拌した後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物へ Et_2O を加え、終夜攪拌した。析出し

た結晶を減圧下で乾燥し、無色結晶 **10** (1.3 g, 92 % yield) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.93 (brd, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.38 - 7.28 (m, 8H), 7.22 (dd, $J = 8.0$ Hz, 7.2 Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.12 - 4.04 (m, 6H), 2.69 (tt, $J = 8.0$ Hz, 4.6 Hz, 1H), 1.23 (brs, 2H), 0.97 (s, 9H), 0.95 (brd, $J = 8.3$ Hz, 2H), 0.17 (s, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 162.2, 158.5, 133.2, 132.5, 131.6 (2), 131.2 (2), 131.1 (2), 130.8 (2), 129.0, 128.8, 128.6, 128.5, 128.4 (2), 128.3 (2), 126.7 (2), 126.2, 125.1, 123.6, 114.6 (2), 69.5, 62.0, 33.5 (d, $J_p = 64.8$ Hz), 25.9 (3), 18.4, 16.1, 10.1 (2), -5.13 (2); MS (EI^+ , 70 eV): m/z : 633 (M^+ , 100), 576 (39), 508 (93), 432 (15), 394 (8.8); HRMS calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{44}\text{NO}_3\text{PSi}$ (M^+): 633.2825, found 633.2828.

***tert*-butyl 2-[(4*R*,6*S*)-6-[(*E*)-2-[2-cyclopropyl-4-[4-{2-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)ethoxy}phenyl]quinolin-3-yl]ethenyl]-2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl]acetate (**24**)**

アルゴン雰囲気下、2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TMP) (698 μl , 4.1 mmol) の THF (20 mL) 溶液に *n*-butyllithium (2.69 M in hexane, 7.3 mmol, 2.7 mL) を -78°C で滴下した。氷浴下にて 1 時間攪拌した後、**10** (4.2 g, 19 mmol) の THF (50 mL) 溶液を -78°C で 15 分間かけて滴下し、同温度で 45 分攪拌した。攪拌後、**11** (1.4 g, 5.4 mmol) の THF (15 mL) 溶液を同温度で滴下し、そのまま自然昇温させながら 12 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、反応液を酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸マグネシウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 2/1) にて精製し、無色アモルファス固体 **24** (1.0 g, 47 % yield) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) (major : minor = 9 : 1) δ : 8.35 (dd, $J = 8.3$ Hz, 7.4 Hz, 0.2H), 7.86 (dd, $J = 30.5$ Hz, 8.6 Hz, 0.2H), 7.60 (brt, $J = 7.4$ Hz, 0.1H), 7.56 (brt, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 7.7$ Hz, 1.1H), 7.28 (brt, $J = 7.7$ Hz, 1.1H), 7.13 (ddd, $J = 16.9$ Hz, 6.3 Hz, 2.0 Hz, 2.2H), 7.02 - 6.95 (m, 2.2H), 6.55 (dd, $J = 16.3$ Hz, 1.1 Hz, 1H), 6.42 (d, $J = 11.5$ Hz, 0.1H), 5.66 (dd, $J = 16.3$ Hz, 6.0 Hz, 1H), 5.61 (dd, $J = 13.4$ Hz, 8.3 Hz, 0.1H), 4.35 (brq, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.25 (qd, $J = 8.0$ Hz, 2.3 Hz, 1H), 4.12 (t, $J = 5.2$ Hz, 3H), 4.03 (t, $J = 5.2$ Hz, 3H), 2.46 (sep, $J = 4.9$ Hz, 1H), 2.42 - 2.18 (m, 3.3H), 1.45 (s, 12H), 1.38 (d, $J = 6.6$ Hz, 7H), 0.94 (s, 14H), 0.14 (s, 8H); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170.1, 160.5, 158.4, 137.5, 131.5, 131.1, 129.4, 129.1, 128.6, 126.3 (2), 125.2, 114.4, 114.1, 98.7 (2), 80.5, 70.0, 69.4, 65.9, 62.0 (2), 42.6, 36.4, 30.0, (2), 28.1 (3), 25.9 (3), 19.8 (2), 18.4, 16.0, 10.4, -5.18 (2); MS (EI^+ , 70 eV): m/z : 673 (M^+ , 8.9), 602 (16), 560 (15), 542 (20), 502 (100), 484 (53), 444 (30), 431 (38), 173 (42), 73 (44), 57 (78); HRMS calcd for

C₄₀H₅₅NO₆Si (M⁺): 673.3798, found 673.3806; [α]_D²⁰ -8.684 (c 0.98, MeOH);

***tert*-butyl 2-[(4*R*,6*S*)-6-{(*E*)-2-(2-cyclopropyl-4-(4-(2-tosyloxyethoxy)phenyl)quinolin-3-yl)ethenyl}-2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4-yl]acetate (PTV-F1-precursor, 12)**

アルゴン雰囲気下、**24** (1.0 g, 1.5 mmol) の THF (15 mL) 溶液に tetrabutylammonium fluoride (1.0 M in THF, 1.8 mL, 1.8 mmol) を氷浴下で加えた。室温にて 1.5 時間攪拌した後、反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、反応液を酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸マグネシウムによって乾燥後、溶媒を留去することで油状物 **24a** を得た。

HRMS(EI) calcd for C₃₄H₄₁NO₆ (M⁺): 559.2934, found 559.2925

アルゴン雰囲気下、**24a** (827 mg, 1.5 mmol) 及びトリエチルアミン (414 μ l, 3.0 mmol) の CH₂Cl₂ (15 mL) 溶液に *p*-toluenesulfonylchloride (169 mg, 0.89 mmol) 及び *N,N*-Dimethylaminopyridine (18 mg, 0.15 mmol) を氷浴下で加えた。室温にて 18 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、反応液を酢酸エチルによって抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水にて洗浄し、硫酸ナトリウムによって乾燥後、溶媒を留去することで得られた褐色油状物をシリカゲルカラム (展開溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) にて精製し、無色油状物 **PTV-F1-precursor (12)** (900 mg, 85 % yield, 2 steps) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.57 (brt, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.12 (ddd, *J* = 16.9 Hz, 8.8 Hz, 3.4 Hz, 2H), 6.89 (td, *J* = 6.0 Hz, 2.6 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 5.65 (dd, *J* = 16.3 Hz, 6.0 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 4.8 Hz, 4.3 Hz, 2H), 4.35 (brq, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.25 (dd, *J* = 4.8 Hz, 4.3 Hz, 1H), 4.23 (brq, *J* = 6.0 Hz, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.45 (sep, *J* = 4.9 Hz, 1H), 2.39 (dd, *J* = 15.2 Hz, 7.2 Hz, 1H), 2.26 (dd, *J* = 15.2 Hz, 6.0 Hz, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.41 - 1.25 (m, 6H), 1.08 - 0.93 (m, 3H); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 160.6, 157.5, 146.7, 145.0, 144.9, 137.5, 132.9, 131.6, 131.2, 130.3, 129.9 (2), 129.0, 128.8, 128.6, 128.0 (2), 126.3, 126.2 (2), 125.2, 114.4, 114.1, 98.8, 80.6, 70.0, 68.1, 65.9, 65.5, 42.6, 36.4, 30.0, 28.1 (3), 21.7, 19.8, 16.0, 10.5, 10.1; MS (EI⁺, 70 eV): *m/z*: 713 (M⁺, 0.2), 511 (3.1), 484 (2.8), 471 (1.7), 312 (2.8), 173 (8.5), 149 (14), 113 (20), 91 (33), 57 (100), 43 (61); HRMS calcd for C₄₁H₄₇NO₈S (M⁺): 713.3022, found 713.3029; [α]_D²⁰ -12.727 (c 0.22, MeOH);

[¹⁸F]PTV-F1 の合成

¹⁸F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge に保持させた後、K₂CO₃ 水溶液 (33 mM, 300 μL) により溶出させた。Kryptofix2.2.2 (5 mg, 13.3 μmol)、MeCN (500 μL、Merck) に、¹⁸F 含有 K₂CO₃ 水溶液 (3.7 GBq) を加え、アルゴン気流下で 120°C に加熱し共沸脱水した。さらに MeCN (1.0 mL) を 2 回に分けて追加しさらに共沸脱水した。ここに PTV-F1 前駆体 **12** (2.0 mg) の MeCN 溶液 (200 μL) を加え、マイクロ波照射下 120°C で 1 分間加熱した。次に、塩酸 (1.0 M, 200 μL) を加え、さらにマイクロ波照射下 100°C で 1 分間加熱した。反応後、水酸化ナトリウム水溶液 (2.0 M, 120 μL) を加えて塩基性化し、さらに酢酸水溶液 (1.0 M, 160 μL) を加えて溶液を中性にした。混合液を分取 HPLC (Cosmosil 5C₁₈-AR-II 10 x 250 mm, MeOH/20 mM phosphate buffer (pH 2.5) = 7/3, flow rate = 5.0 mL/min) で精製し、[¹⁸F]PTV-F1 を放射化学的収率 45 %、放射化学的純度 99 %以上で得た。

[¹⁸F]PTV-F1 の肝臓 OATP 機能のインビボ評価用プローブとしての評価

分配係数 (LogP) 評価

1-オクタノール (3.0 mL) と水 (3.0 mL) の混合溶液を攪拌後、[¹⁸F]PTV-F1 の水溶液 (10μL) を添加した。Vortex 後、遠心分離 (1000 g, 15 分)、有機相、水相それぞれから 0.5 mL 採取し、放射能を測定した。操作を 3 回繰り返して行い、分配係数は下記の式に従って算出した。LogP = log (有機相の放射能/水相の放射能)

細胞培養

HEK293 細胞 (OATP1B1 発現細胞及び pcDNA3.1 vector を導入した細胞)⁸ は東京大学薬学研究科分子薬物動態学教室より提供していただいた。HEK293 細胞は 10 % Fetal Bovine Serum 含有低グルコース Dulbecco's modified Eagle's 培地を用いて、それぞれ、37 °C、5 %CO₂ 条件下にて培養した。また、細胞実験を行う際には文献⁸に従って培地を PBS に変えて 24 時間培養した後を使用した。

細胞取込み実験

細胞取込み実験は文献⁸に従って行った。12-well plates に HEK293 細胞 (1.5 × 10⁵ cells) を播種し、培地を PBS に変え、37 °C、5 %CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、Krebs-Henseleit 緩衝液 (1 mL/well) で 2 回洗浄後、37°C、15 分間インキュベートした。PTV-F1 (tracer: 0.1

μM , excess: $100 \mu\text{M}$) または [^{18}F]PTV-F1 ($0.03 \mu\text{Ci}$) 含有 Krebs-Henseleit 緩衝液 ($600 \mu\text{L}/\text{well}$) を加え、取り込みを開始させ、添加 1, 2, 5, 10 分後に冷却した Krebs-Henseleit 緩衝液 ($1 \text{ mL}/\text{well}$) を加えた。緩衝液を除去し、細胞を冷却した同液で 2 回洗浄した後、 1.0 M NaOH aq ($400 \mu\text{L}$) 含有 Krebs-Henseleit 緩衝液 ($1 \text{ mL}/\text{well}$) を加えた。細胞溶解液の放射能を測定し、溶解液 ($50 \mu\text{L}$) より FBS を標準物質として Lowry 法から蛋白濃度を測定した。

動物

Sprague-Dawley (SD) 雄ラット ($222\text{-}333 \text{ g}$, 8-10 週齢) は日本 SLC 株式会社より購入した。室温及び照明管理下において飼育し、適宜給餌及び給水した。動物実験は京都大学動物実験委員会の指針を遵守して行った。

生体内安定性評価

SD ラット (8-10 週齢、雄性) に対し、イソフルラン吸引麻酔下 (1.5% , $2.0 \text{ L}/\text{min}$) で大腿動脈及び胆管へカニューレ (polyethylene tube, I.D. 0.5 mm , O.D. 0.8 mm) を挿入し、[^{18}F]PTV-F1 ($37 \text{ MBq}/100 \mu\text{L}$) を尾静脈より投与した。投与後、1, 2, 10, 20, 40 分後に血液を、0-5, 5-10, 10-25, 25-40 分後に胆汁を採取した。肝組織はラット肝臓を 10, 20, 40 分後に腹部大動脈を切断した後、摘出、ホモジナイズすることにより得た。血液、胆汁、肝組織のサンプルに MeCN を加え、遠心後 (12000 rpm , 0°C) その上清を逆相薄層クロマトグラフィに添加した。室温下で展開し (MeCN/water/acetic acid= $50/50/0.75$)、イメージングプレート BAS SR2040 imaging plates に 90-360 分間露光させ、読み取り (Fuji BAS-5000 analyzer) 及び解析 (The MultiGauge image analysis program) を行った。

体内動態評価

SD ラット (8 週齢、雄性) へ [^{18}F]PTV-F1 ($0.15\text{-}0.22 \text{ MBq}/100 \mu\text{L}$) をラット尾静脈より投与した。投与後、2, 5, 10, 15, 30, 60 分に各臓器 (血液、心臓、肺、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、骨) を摘出した ($n=4$)。各臓器の重量と放射能を測定し、単位重量あたりの放射能から集積量 (%ID/organ) を算出した。

PET/CT 撮像

SD ラット (8 週齢、雄性) に対し、イソフルラン吸引麻酔下 (1.5% , $2.0 \text{ L}/\text{min}$) で、大腿動脈へカニューレ (polyethylene tube, I.D. 0.5 mm , O.D. 0.8 mm) を挿入した後、

[¹⁸F]PTV-F1 (6.0-10.0 MBq/100 μL) をラット尾静脈より投与した。投与直後より PET/CT 装置 (Triumph, TriFoil Imaging Inc., Chatsworth) を用いて血液を採取 (投与後 10, 20, 30, 40, 50 秒及び 1, 2, 5, 10, 20, 30 分) しながら 60 分間撮像した。画像再構成は及び 3D ordered subset expectation maximization method (OSEM) を用いて行った。血液の放射能は μFMPC システム (Shimadzu) により測定した。PET 撮像終了後、ペントバルビタール水溶液により屠殺し、CT 撮像を行った。

リファンピシン阻害実験については、反対側の大腿動脈よりカニューレを挿入し、撮像 90 分前よりリファンピシン水溶液 (2.0 M NaOH aq により溶解) を 1.5 μmol/min/kg の速度で持続静注を行い、さらに持続静注しながら上記と同様な撮像を行った。

PET 解析

肝臓の関心領域 (ROIs) は PMOD ver. 3.3 を用いて指定し、すべての ROI を結合させ、容積関心領域を決定し、投与量に対する肝臓の放射能割合を算出した。

ラット肝臓における取込み速度は integration plot 法と肝臓からの代謝及び胆汁排泄が無視できる投与後 5 分までの計算結果を用いて算出した。[¹⁸F]PTV-F1 の肝取込みクリアランスは以下の計算式に基づいて算出した。

$$\frac{X_{t,liver}}{C_{t,blood}} = CL_{uptake,liver} \times \frac{AUC_{0-t,blood}}{C_{t,blood}} + V_E$$

$X_{t,liver}$: PET画像解析より算出した時間tにおける肝臓の¹⁸F放射能

$C_{t,blood}$: 大腿動脈より採血して求めた血液中の¹⁸F放射能濃度

$CL_{uptake,liver}$: 肝臓における取込みクリアランス

$AUC_{0-t,blood}$: 時間0からtにおける血液の濃度曲線下面積

V_E : integration plotのy切片より求めた時間0における肝臓での初期分配量

統計解析

2 群間については対応のない t 検定により統計的な差を確認した。3 群以上の群間に関しては Bonferroni test による一元配置分散分析を用いて確認した。P < 0.05 で有意であるとした。

[¹⁸F]PTV-F1 の自動合成化検討

滋賀県成人病センター研究所において、JFE テクノス社製キット式多目的合成装置を用いて検討を行った。

結語

本研究では、肝臓の有機アニオントランスポーター機能のインビボ評価のための核医学分子イメージングプローブの開発を行う上で、以下の知見を得た。

1. 鈴木カップリング反応を用いた pitavastatin の新規合成経路を開発し、10 工程、総収率 1 % で合成することに成功し、マイクロ波加熱により鈴木カップリング反応の促進が確認された。新規マイクロ波反応装置を開発し評価した結果、少量の溶媒に対しても優れた加熱効果を示した。¹⁸F 標識化合物合成検討においてもマイクロ波加熱により反応効率及び収率の向上が見られ、さらに前駆体量の低減が可能であることを示した。Iodophenyldiphenyl triflate より得られた [¹⁸F]FIB との鈴木カップリング反応検討の結果、新規マイクロ波反応装置を用いることで放射化学的収率 12 %、放射化学的純度 99 % 以上で [¹⁸F]pitavastatin の合成に成功した。しかし、臨床応用での利用に必要な量を安定して自動合成することは難しいと予想され、合成法の改善の必要性が示唆された。
2. 臨床応用を目指し、pitavastatin 誘導体 PTV-F1 を新たに開発し、非標識体及び前駆体をそれぞれ 11 工程で総収率 8 %、10 % で合成することに成功した。新規マイクロ波反応装置を用いて、放射化学的収率 45 %、放射化学的純度 99 % 以上で [¹⁸F]PTV-F1 の合成に成功し、[¹⁸F]pitavastatin に比べ約 4 倍以上収率を改善できた。OATP 過剰発現細胞を用いて取込み評価を行った結果、基質特異性は維持されることが示された。安定性評価を行った結果、生体内において安定であった。放射能体内分布実験の結果、肝臓、腸への高い集積が見られた。PET 撮像及び解析を行った結果、[¹⁸F]PTV-F1 は OATP 特異的に肝臓へ取り込まれ、OATP 機能評価に利用できる可能性が示された。臨床応用に向けた自動合成化検討し、健常ボランティアによる臨床試験を行うことに成功した。結果として、[¹⁸F]PTV-F1 は臨床応用可能な OATP 機能評価のための核医学分子イメージングプローブとなりうることを見出した。

以上、本研究は肝臓における有機アニオントランスポーター (OATP) のインビボ評価のための核医学分子イメージングプローブの開発に関する基礎的成果をおさめたものであり、今後の OATP 機能に関する研究や医薬品体内動態の最適化に有益な情報を提供するものと考えられる。

引用文献

1. Hsiang B., Zhu Y., Wang Z., Wu Y., Sasseville V., Yang W. P. and Kirchgessner T. G. *et al.* A Novel Human Hepatic Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP2). *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 37161-37168
2. König J., Cui Y., Nies A. and Keppler D. Localization and Genomic Organization of a New Hepatocellular Organic Anion Transporting Polypeptide. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 23161-23168.
3. Maeda K. and Sugiyama Y. Impact of Genetic Polymorphisms of Transporters on the Pharmacokinetic, Pharmacodynamic and Toxicological Properties of Anionic Drugs. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2008**, *23*, 223–235.
4. Shitara Y. and Sugiyama Y. Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2005**, *45*, 689–723.
5. Takashima T., Nagata H., Nakae T., Cui Y., Wada Y., Kitamura S., Doi H., Suzuki M., Maeda K., Kusuhara H., Sugiyama Y. and Watanabe Y., Positron Emission Tomography Studies Using (15R)-16-m-[¹¹C]tolyl-17,18,19,20-tetranorisocarbacyclin Methyl Ester for the Evaluation of Hepatobiliary Transport. *J. Pharmacokinet. Exp. Ther.* **2010**, *335*, 314–323
6. Takashima T., Hashizume Y., Katayama Y., Murai M., Wada Y., Maeda K., Sugiyama Y. and Watanabe Y., The Involvement of Organic Anion Transporting Polypeptide in the Hepatic Uptake of Telmisartan in Rats: PET Studies with [¹¹C]Telmisartan. *Mol. Pharmaceutics*, **2011**, *8*, 1789–1798
7. Ijuin R., Takashima T., Watanabe Y., Sugiyama Y., Suzuki M., Synthesis of [¹¹C]dehydropravastatin, a PET probe potentially useful for studying OATP1B1 and MRP2 transporters in the liver, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, *20*, 3703-3709
8. Hirano M., Maeda K., Shitara Y. and Sugiyama Y. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the Hepatic Uptake of pitavastatin in Humans. *J. Pharmacokinet. Exp. Ther.*, **2004**, *311*, 139–146.
9. Fujino H., Yamada I., Kojima J., Hirano M., Matsumoto H. and Yoneda M. Studies on the Metabolic Fate of NK-104, a New Inhibitor of HMG-CoA Reductase (5): In Vitro Metabolism and Plasma Protein Binding in Animals and Human. *Xenobio. Metabol. And Dispos.*, **1999**, *14*, 415–424.
10. Suzuki M., Iwasaki H., Fujikawa Y., Kitahara M., Sakashita M. and Sakoda R. Synthesis and

- Biological Evaluations of Quinoline-based HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2727
11. Acemoglu M., Brodbeck A., Garcia A., Grimler D., Hassel M., Riss B. and Schreiber R. A New and Efficient Synthesis of the HMG-CoA Reductase Inhibitor pitavastatin. *Helvetica Chimica Acta*, **2007**, *90*, 1069
 12. Miyachi N., Yanagawa Y., Iwasaki H., Ohara Y. and Hiyama T. A Novel Synthetic Method of HMG-CoA Reductase Inhibitor NK-104 via A Hydroboration-Cross Coupling Sequence. *Tetrahedron Letters*, **1993**, *34*, 8267
 13. Suzuki M., Yanagawa Y., Iwasaki H., Kanda H., Yanagihara K., Matsumoto H., Ohara Y., Yazaki Y. and Sakoda R. First Systematic Chiral Syntheses of Two Pairs of Enantiomers With 3, 5-Dihydroxyheptenoic Acid Chain, Associated With A Potent Synthetic Statin NK-104. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2977
 14. Mu L., Fischer C. R., Holland J. P., Becaud J., Schubiger P. A., Schibli R., Ametamey S. M., Graham K., Stellfeld T., Dinkelborg L. M. and Lehmann L. ¹⁸F-Radiolabeling of Aromatic Compounds Using Triarylsulfonium Salts, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 889–892
 15. Kallmerten A. E., Alexander A., Wager K. M. and Jones G. B. Synthesis of 4-[¹⁸F]fluorohalobenzenes and Palladium-mediated Cross-coupling Reactions for the Synthesis of ¹⁸F-labeled Radiotracers. *Curr. Radiopharm.* **2011**, *4*, 343
 16. Miyaura N. and Suzuki A., Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483
 17. Gedye R., Smith F., Westaway K., Ali H., Baldisera L., Laberge L. and Rousell J., The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279
 18. Giguere R. J., Bray T. L., Duncan S. M. and Majetich G., Application of Commercial Microwave Ovens to Organic Synthesis, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4945
 19. PET 化学ワークショップ、「PET 用放射性薬剤の製造および品質管理—合成と臨床使用へのてびき—」第4版
 20. 興和株式会社『医薬品インタビューフォーム HMG-CoA 還元酵素阻害剤 リバロ®錠』2012年11月(改訂第11版)
 21. Kim D.C., Sugiyama Y. Satoh H., Fuwa T., Iga T., Hanano M., Kinetic analysis of *in vivo* receptor-dependent binding of human epidermal growth factor by rat tissues. *J. Pharm. Sci.*, **1988**, *77*, 200–207
 22. Treiber A., Schneiter R., Häusler S. and Stieger B. Bosentan Is a Substrate of Human

- OATP1B1 and OATP1B3: Inhibition of Hepatic Uptake as the Common Mechanism of Its Interactions with Cyclosporin A, Rifampicin, and Sildenafil, *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35* (8), 1400-1407
23. Brix G., Lechel U., Glatting G., Ziegler S. I., Münzing W, Müller S. P. and Thomas Beyer, Radiation Exposure of Patients Undergoing Whole-Body Dual-Modality ¹⁸F-FDG PET/CT Examinations, *J. Nucl. Med.*, **2005**, *46*, 608
 24. Ametamey S. M., Honer M. and Schubiger P. A. Molecular Imaging with PET, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 1501
 25. Cai L., Lu S. and Pike V. W. Chemistry with [¹⁸F]Fluoride Ion, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2853
 26. Acemoglu M., Brodbeck A., Garcia A., Grimler D., Hassel M., Riss B. and Schreiber R. A New and Efficient Synthesis of the HMG-CoA Reductase Inhibitor pitavastatin. *Helvetica Chimica Acta*, **2007**, *90*, 1069
 27. Bergstrom, F. W. Heterocyclic Nitrogen Compounds. *Chem. Rev.*, **1944**, *35* (2), 77–277
 28. Marco-Contelles J., Pérez-Mayoral E., Samadi A., María do C. Carreiras and Soriano E. Recent Advances in the Friedländer Reaction. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2652–2671
 29. Van der Eycken E., Appukkuttan P., De Borggraeve W., Dehaen W., Dallinger D. and Kappe C. O. High-Speed Microwave-Promoted Hetero-Diels-Alder Reactions of 2(1*H*)-Pyrazinones in Ionic Liquid Doped Solvents, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 7904
 30. Zhao Z., Wisnoski D. D., Wolkenberg S. E., Leister W. H., Wang Y. and Lindsley C. W. General microwave-assisted protocols for the expedient synthesis of quinoxalines and heterocyclic pyrazines *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 4873
 31. Chebanov V. A., Saraev V. E., Desenko S. M., Chernenko V. N., Shishkina S. V., Shishkin O. V., Kobzar K. M. and Kappe C. O. Efficient and Divergent Synthesis of Fully Substituted 1*H*-Pyrazoles and Isoxazoles from Cyclopropyl Oximes *Org. Lett.*, **2007**, *10*, 1691
 32. Kappe C. O. Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 1127
 33. Sharma A., Appukkuttan P. and Van der Eycken E. Microwave-assisted synthesis of medium-sized heterocycles, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 1623
 34. Kingston HM, Haswell SJ. *Microwave-enhanced chemistry, Fundamentals, sample preparation and applications*, American Chemical Society, Washington, D.C., **1997**.
 35. Stone-Elander S. and Elander N. Microwave applications in radiolabelling with short-lived

- positron-emitting radionuclides. *J. Label Compd. Radiopharm.* **2002**, *45*, 715
36. Kallmerten A. E., Alexander A., Wager K. M. and Jones G. B. Synthesis of 4-[¹⁸F]fluorohalobenzenes and Palladium-mediated Cross-coupling Reactions for the Synthesis of ¹⁸F-labeled Radiotracers. *Curr. Radiopharm.* **2011**, *4*, 343
 37. Belanger A. P., Pandey M. K. and DeGrado T. R. Microwave-assisted radiosynthesis of [¹⁸F]fluorinated fatty acid analogs. *Nuclear Medicine and Biology*, **2011**, *38*, 435
 38. Loones K. T. J., Maes B. U. W., Rombouts G., Hostyn S. and Diels G. Microwave-assisted organic synthesis: scale-up of palladium-catalyzed aminations using single-mode and multi-mode microwave equipment. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10338
 39. Lim J. K., Zheng L., Berridge M. S., Tewson T. J., The Use of 3-Methoxymethyl-16 β , 17 β -Epiesteriol-O-Cyclic Sulfone as the Precursor in the Synthesis of F-18 16 α -Fluoroestradiol, *Nuclear Medicine & Biology*, **1996**, *23*, 911-915
 40. Römer J., Füchtner F., Steinbach J. and Rossendorf B. J. F. Automated Production of 16 α -[¹⁸F]Fluoroestradiol for Breast Cancer Imaging *Nuclear Medicine & Biology*, **1999**, *26*, 473
 41. Le Bars D., Lemaire C., Ginovart N., Plenevaux A., Aerts J., Brihaye C., Hassoun W., Leviel V., Mekhsian P., Weissmann D., Pujol J. F., Luxen A. and Comar D. High-Yield Radiosynthesis and Preliminary *In Vivo* Evaluation of *p*-[¹⁸F]MPPF, a Fluoro Analog of WAY-100635. *Nuclear Medicine & Biology*, **1998**, *25*, 343
 42. Teija Koivula, Jaana Laine, Tiina Lipponen, Outi Perhola, Eeva-Liisa Kämäräinen, Kim Bergström, Olof Solin, Assessment of labelled products with different radioanalytical methods: study on ¹⁸F-fluorination reaction of 4-[¹⁸F]fluoro-N-[2-[1-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl-N-2-pyridinylbenzamide (*p*-[¹⁸F]MPPF), *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2010**, *286*, 841–846
 43. Ackermann U., Yeoh S. D., Sachinidis J. I., Poniger S. S., Scott A. M. and Tochon-Danguy Henri J. A simplified protocol for the automated production of succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate on an IBA Synthera module. *J. Label Compd. Radiopharm.* **2011**, *54*, 671
 44. Scott Peter J. H. and Shao X. Fully automated, high yielding production of *N*-succinimidyl 4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB), and its use in microwave-enhanced radiochemical coupling reactions. *J. Label Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 586
 45. Tredwell M. and Gouverneur V. ¹⁸F Labeling of Arenes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 11426-11437

46. Bielawski M. and Olofsson B. High-yielding one-pot synthesis of diaryliodonium triflates from arenes and iodine or aryl iodides. *Chem. Commun.*, **2007**, 2521–2523
47. 堀越 智、篠原真毅、滝澤博胤、福島 潤、「マイクロ波化学－反応、プロセスと光学応用－」三共出版、2013年10月
48. Herrero M. A., Kremsner J. M. and Kappe C. O. Nonthermal Microwave Effects Revisited: On the Importance of Internal Temperature Monitoring and Agitation in Microwave Chemistry. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 36-47
49. Nushiro K., Kikuchi S. and Yamada T. Extraordinary Microwave Effect on atropo-Enantioselective Catalytic Reduction of Biaryl Lactones. *Chem. Lett.*, **2013**, *42*, 165-167
50. Dudley G. B., Albert E. Stiegman and Michael R. Rosana. Correspondence on Microwave Effects in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 7918–7923
51. Kappe. C. O. Reply to the Correspondence on Microwave Effects in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 7924 – 7928
52. Suzuki A. Cross-coupling reactions via organoboranes. *Journal of Organometallic Chemistry*, **2002**, *653*, 83-90
53. Leadbeater N. E. and Marco M. Transition-Metal-Free Suzuki-Type Coupling Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1407-1409
54. Leadbeater N. E. and Marco M. Transition-Metal-Free Suzuki-Type Coupling Reactions: Scope and Limitations of the Methodology. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 5660-5667
55. Arvela R. K., Leadbeater N. E., Sangi M. S., Williams V. A., Granados P. and Singer R. D. A Reassessment of the Transition-Metal Free Suzuki-Type Coupling Methodology. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 161-168
56. Zhaoa S, Zhoua W and liu J. Synthesis and HMG-CoA Reductase Inhibition of 2-cyclopropyl-4-thiophenyl-quinoline mevalonolactones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*, 7915–7923
57. Böhm Hans-J., Banner D., Bendels S., Kansy M., Kuhn B., Müller K., Obst-Sander U. and Stahl M. Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem.*, **2004**, *5*, 637-643