

血栓靶向尿激酶脂质体的制备及其体内溶栓效果

王向涛, 李 沙, 张小滨, 侯新朴*

(北京大学 药学院 药剂系, 北京 100083)

摘要: 目的 制备血栓靶向的尿激酶脂质体,并在大鼠颈总动脉血栓模型上考察其溶栓情况。方法 通过液相合成法合成出靶向于血栓的特异性配体 H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH (RGDS),并将其与 monocarboxyl poly(ethylene glycol) 3 500 distearoyl phosphatidylethanolamine (DSPE-PEG_{3 500}-COOH) 偶联后插入到脂质体双层膜中得到血栓靶向尿激酶脂质体;通过制备方法的改进,以氢化豆磷脂在室温下制备尿激酶脂质体;在大鼠颈总动脉血栓模型上,考察了血栓靶向脂质体的体内溶栓效果。结果 所得的尿激酶脂质体封装率高,粒径小,稳定性好;与空白对照组的栓重相比,在相同剂量(60 kU·kg⁻¹,小剂量)下,游离尿激酶组几乎无任何改变,尿激酶脂质体组血栓重量稍有减轻但无显著性差异,血栓靶向尿激酶脂质体组血栓重量明显减轻($P < 0.001$);干重时的情况略有不同。与同剂量的普通脂质体相比,血栓靶向尿激酶脂质体溶栓效果显著改善(湿重时 $P < 0.01$,干重时 $P < 0.05$),表现出明显的靶向溶栓能力。结论 所制备的血栓靶向尿激酶脂质体具有靶向溶栓的效果。

关键词: 血栓靶向; RGDS; 尿激酶; 脂质体; 颈总动脉血栓模型

中图分类号: R943.42; R945.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2003)03-0231-05

Preparation of thrombus-targeted urokinase liposomes and its thrombolytic effect in model rats

WANG Xiang-tao, LI Sha, ZHANG Xiao-bin, HOU Xin-pu

(Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Aim** To prepare thrombus-targeted urokinase liposomes and observe its improved thrombolytic efficacy on thrombus model rats. **Methods** The ligand H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH (RGDS) which has specific affinity to thrombus was synthesized by liquid phase method and anchored on the surface of liposomes by incorporating its conjugate with DSPE-PEG_{3 500}-COOH into liposomal lipid bilayers, thus thrombus-targeted liposomes were produced. Urokinase (UK) liposomes were prepared at room temperature through method modification using hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC); the *in vivo* thrombolysis of the obtained thrombus-targeted UK liposomes and its comparison with TBS (Tris-HCl buffered solution) control, free UK and UK liposomes were assessed on common carotid artery model rats. **Results** The obtained liposomes were characteristic of high UK entrapment efficiency, small mean diameter and good storage stability. At the same dose (60 000 U·kg⁻¹), compared to the wet thrombi weights of TBS control group, those of free UK group and UK liposome group showed no statistical difference, while those of targeted UK liposomes group were significantly decreased ($P < 0.001$); when evaluated in term of dry thrombi weights the result was slightly different. Compared to UK liposomes of the same dose, the targeted UK liposomes showed significantly improved thrombolytic efficacy ($P < 0.01$ in wet weights decrease and $P < 0.05$ in dry weights decrease respectively). **Conclusion** The targeted UK liposomes displayed good targeted thrombolytic effect.

Key words: thrombus-targeted; RGDS; urokinase; liposomes; common carotid artery thrombus model

心脑血管疾病中冠脉梗塞和脑血管栓塞是引起人类死亡的最常见疾病,目前多用溶栓剂(尿激酶、链激酶和组织纤溶酶原激活物)进行治疗。但这些药物不仅价格昂贵,而且体内半衰期短,缺乏组织特异性,不能选择性地作用于病变部位。临床需要大剂量连续用药,极易出现出血等严重并发症,从而限制了临床应用。增强溶栓剂的特异靶向性,是减少药物用量、延长药物在体内作用时间和避免血栓再形成等的关键措施。

国内外关于血栓靶向药物的研究主要是以基因工程技术改造溶栓药,使溶栓药和血栓靶向的抗体蛋白在细胞株或菌株中共同表达^[1,2]。但这类药物成本过于高昂,故人们将注意力又转向了血栓靶向制剂的研究。目前,国外的研究主要以抗血小板抗体或纤溶酶原为导向,以脂质体为溶栓药的载体^[3-5]。国内的研究较少,只有凌世长等^[6]RGDS修饰的尿激酶脂质体(第一代靶向脂质体,即导向弹头直接连在脂质体表面)。RGDS肽是血小板膜上GP IIb/IIIa受体的拮抗剂,具有对血栓部位活化血小板的趋向性,能与血小板Fg片断特异性结合,可望作为血栓靶向制剂的导向弹头。本文通过液相合成法合成RGDS,与连接臂DSPE-PEG₅₀₀-COOH偶联后,插入脂质体双层膜中制备得到第三代血栓靶向性脂质体(导向弹头通过PEG连接臂与脂质体相连,同时起到长循环和主动寻靶两方面的作用),在大鼠颈总动脉血栓模型上考察了尿激酶靶向溶栓脂质体的溶栓效果。该项研究国内外未见报道。

材料与方法

试剂 Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Asp(OcHex)-Ser(OBzl)-Bzl, Boc-Gly-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Advanced Chem Tech; 二环己基碳二亚胺(DCC), 中国上海余山化工厂; N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 中国科学院上海药物研究所; 三氟甲磺酸, 二甲硫醚, MERK-Schuchardt; 三氟乙酸, 进口分装, 北京化学试剂公司; 茚三酮(Ninhydrin), Fluka; PEG双酸, 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE), Sigma; 色谱用硅胶GF₂₅₄, 青岛海洋化工厂。各种无水溶剂均为自制。

尿激酶(urokinase, UK, 批号20010718, 效价48 kU·mg⁻¹), 南京南大药业生物化学有限公司; 氢化大豆磷脂(HSPC), 德国Lucas Meyer GmbH, PC > 98%; 胆固醇(Chol), 北京化学试剂公司, 乙醇中重结晶; DSPE-PEG₅₀₀, Shearwater Polymers, Inc; 异硫氰酸荧光黄(FITC), 北京欣经可生物技术有限公司;

Sepharose CL-4B, Pharmacia; Triton X100, Farco Chemical Supplies; 其他试剂均为分析纯。

仪器 CX100型超声波清洗机, 北京医疗设备二厂; RF-5301荧光分光光度计, 日本岛津; Hitachi-500型透射电子显微镜, 日本Hitachi公司; Nicomp 370型激光散射粒度分析仪, 美国Brookhaven Instrument Corp; 电子微量泵WLB-78-A型, 浙江新昌国泰仪器厂; 日立835-50型氨基酸自动分析仪, 日本。

动物 Sprague-Dawley, δ大鼠, 北京威通利华实验动物中心。

Ser(Bzl)-OBzl的制备 取Boc-Ser(Bzl)-OH(6 mmol), 适量无水乙醇溶解, 加入碳酸铯(3 mmol), 搅拌下逐滴加入去离子水使溶, 室温搅拌4 h, 减压旋转蒸发除去溶剂得铯盐。以适量N,N-二甲基甲酰胺溶解铯盐, 精密加入无水溴苄6 mmol, 40℃恒温反应12 h。向反应系统中倾入大量乙酸乙酯, 依次以饱和NaHCO₃、饱和NaCl、饱和柠檬酸钠、饱和NaCl溶液洗涤。分离有机层, 无水硫酸钠干燥, 减压蒸除溶剂得无色透明的固体产物Boc-Ser(Bzl)-OBzl(产率90.4%)。

将Boc-Ser(Bzl)-OBzl以适量6 mol·L⁻¹无水HCl/乙酸乙酯溶解, 室温反应4 h, TLC检识[氯仿-甲醇(30:1)为展开剂, GF₂₅₄薄层板]反应物斑点消失。反应液室温减压浓缩至干, 如此反复数次, 直至除净游离的HCl, 得目标产物Ser(Bzl)-OBzl。

四肽RGDS的合成^[7] 参考文献[7]所示的方法略有改动。与精氨酸连接时, 先将三肽精氨酸和NHS以四氢呋喃溶解, 冰洗搅拌下逐滴加入DCC的四氢呋喃溶液, 其余同文献。

连接臂DSPE-PEG-COOH的合成^[8,9] 参考文献[8,9], 略有改动。得到的粗品上硅胶柱(而非Sephadex柱)纯化, 先以氯仿洗脱除去残留在样品中的DCU(dicyclohexylurea, DCC的水解产物), 再依次用氯仿-甲醇(30:1)、氯仿-甲醇(20:1)、氯仿-甲醇(13:1)洗脱, TLC检识[氯仿-甲醇(13:1)展开, 以碘蒸气、茚三酮、钼蓝、溴酚蓝显色], 合并目标产物所在的流分, 减压回收溶剂。

四肽RGDS与连接臂的偶联 取合成的DSPE-PEG₅₀₀-COOH(约0.1 mmol), 适量无水四氢呋喃溶解, 冰浴上搅拌使达到平衡。精密加入NHS(0.102 mmol)和DCC(0.102 mmol), 冰浴上反应24 h。滤除沉淀, 25℃水浴上N₂吹干。

另取RGDS(0.1 mmol)以少量无水N,N-二甲基

甲酰胺短时间超声溶解,将上面得到的活泼酯定量加入,室温下反应 12 h 后,以 *N*-甲基吗啉调 pH 7.5 ~ 8,继续反应 12 h。反应液凉风吹干,氯仿溶解后过滤,滤液回收溶剂得偶联产物 DSPE-PEG-RGDS。

脂质体的制备 取 HSPC 和 Chol 适量(物质的量比 5:3),加入 DSPE-PEG₂₀₀₀(占磷脂用量的 1%,物质的量比),以氯仿-正己烷(1:1)10 mL 溶解。加入含尿激酶 TBS 2 mL,浴式超声 1.5 min 成乳。25 °C 减压旋转蒸发成胶态,补加 TBS 3 mL 旋涡振荡 2 min,浴式超声 1 min,得尿激酶脂质体。继续减压旋转蒸发除去残余有机溶剂。

取 HSPC 和 Chol 适量(物质的量比 5:3),加入 DSPE-PEG-RGDS(占磷脂用量的 8%,物质的量比)和 DSPE-PEG₂₀₀₀(占磷脂用量的 1%,物质的量比),同上操作得到血栓靶向的尿激酶脂质体。

尿激酶脂质体的形态和大小 将所得的尿激酶脂质体取少许,以激光散射粒度分布仪测定粒径大小。另取适量稀释 8 倍,滴加到敷有 Formva 膜的铜网上,滴加 2% 的磷钨酸负染,自然干燥后以透射电镜观察并照相。

尿激酶的荧光标记^[10]及标准曲线的制作 称取尿激酶 10 mg,以 pH 7.1 的 10 mmol·L⁻¹ PBS 1 mL 溶解。另取异硫氰酸荧光黄(FITC) 2.6 mg,加入 0.5 mol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲液(pH 9.5) 100 μL 溶解。将 FITC 滴入到尿激酶溶液中,室温下密闭搅拌 4 h。反应液 2 500 r·min⁻¹ 离心 25 min,取上清液在 pH 8.0 的 10 mmol·L⁻¹ PBS 中透析(每 0.5 h 更换 1 次外液)。过 Sephadex G-50 柱分离,以 pH 7.1 的 10 mmol·L⁻¹ PBS 洗脱(流速 1 mL·min⁻¹),收集最先出柱的色带流分,即为标记的尿激酶。

配制 100, 50, 30, 10, 6, 3, 1, 0.6, 0.3 和 0.1 mg·L⁻¹ 荧光标记的尿激酶溶液,在激发波长(λ_{ex}) 493.0 nm 发射波长(λ_{em}) 518.0 nm 处测量荧光值,以荧光值对相应的浓度线性回归,得工作方程。

尿激酶包封率的测定 按照上述脂质体的制备方法,以荧光标记的尿激酶代替未标记的尿激酶溶液,同法得到荧光标记的尿激酶脂质体。精密移取 1 mL 过 Sepharose CL-4B 柱分离(pH 7.4 的 TBS 洗脱,流速 1 mL·min⁻¹),收集脂质体流分,加入 10% 的 Triton X-100 2 mL 摇匀,60 °C 加热 10 min 使溶,测定荧光值(条件同工作曲线),计算尿激酶含量。另取标记尿激酶脂质体 1 mL 直接溶解后测定尿激酶含量。两者相除得包封率。

体内溶栓实验 取 SD 大鼠 35 只(♂,体重 290

~ 340 g),随机分为 5 组,每组 7 只,分别为 TBS 空白对照组、大剂量尿激酶组(300 kU·kg⁻¹)、小剂量尿激酶组(60 kU·kg⁻¹)、尿激酶脂质体组(60 kU·kg⁻¹)、血栓靶向尿激酶脂质体组(60 kU·kg⁻¹),实验前禁食 12 h。将动物以 1.5% 戊巴比妥钠麻醉(15 mg·kg⁻¹),手术分离左侧颈总动脉,隔离血管和周围组织,以 5 mm×6 mm 的浸蘸了 20% FeCl₃ 的滤纸条包裹血管 10 min。刺激完毕,取下滤纸条,立即以电子恒流泵舌静脉输注相应的药物溶液,10 min 输完。自刺激结束之时起,30 min 后剪取血栓段血管,准确切取长 5 mm 的血栓段,取出血栓称量湿重,室温下放置 24 h 后称量干重。

结果

1 四肽 RGDS 的合成

在四肽 RGDS 的合成过程中,所用氨基酸均为 *L*-构型,中间体均经硅胶柱色谱纯化,纯度为 TLC 色谱纯。所得四肽脱保护前 FAB-MS(*m/z*)为 951[*M*+*H*]⁺,碎片峰符合裂解规律。脱保护后终产物 RGDS 的 MS(*m/z*)为 434.6[*M*+*H*]⁺,与文献^[7]一致。终产物经 HPLC 测定[220 nm 检测,流动相为水-甲醇(3:7)],纯度为 92.3%。

2 连接臂 DSPE-PEG₃₅₀₀-COOH 的合成

所得的产物在薄层板上呈现长椭圆形的斑点,位置高于 DSPE 和 HOOC-PEG₃₅₀₀-COOH,遇碘蒸气显棕黄色,遇钼蓝显蓝色(示含有磷酸基团),遇茚三酮不显色(示无游离的氨基),遇溴酚蓝显浅棕黄色(示含游离羧基),证明是目标产物,收率为 60.7%。

3 四肽与连接臂的偶联

所得产物在 TLC 检识时遇碘蒸气显棕黄色,但遇茚三酮显色不明显。氨基酸分析结果示 4 种氨基酸 R,G,D,S 的物质的量比为 0.86:0.99:0.76:0.98,初步表明连接臂上已经偶联了四肽。

4 尿激酶脂质体的制备

所得尿激酶脂质体平均粒径为(81±43) nm(两个分布),电镜照片示脂质体形态圆整。

所得荧光标记尿激酶的回归方程为 $C = 0.0807A - 1.57$, $r = 0.9982$,线性范围 0.1 ~ 100 mg·L⁻¹。空白的 HSPC 脂质体经 Triton X-100 加热溶解后在相同条件下的荧光值为零,示脂质成分对荧光测定没有干扰。荧光标记的尿激酶在 60 °C 加热 10 min,前后的荧光值也无改变。说明荧光标记测含量的方法灵敏度高,不受磷脂成分和 60 °C 加热的干扰,适合于 HSPC 脂质体中蛋白类药物的含量

测定。

经对 3 份平行制备的尿激酶脂质体进行测定, 对尿激酶的包封率为(65.4 ± 2.6) %。

5 颈总动脉血栓模型大鼠上的溶栓实验

各组模型大鼠给药后的血栓湿重及统计分析结果如表 1 所示。可知, 在相同剂量(60 kU·kg⁻¹) 下,

与 TBS 对照组的血栓湿重相比, 游离尿激酶组和尿激酶脂质体组没有差异(P > 0.05), 而靶向尿激酶脂质体组表现出显著性差异(P < 0.001); 与普通脂质体组相比, 靶向脂质体组血栓显著减少(P < 0.01)。与 5 倍剂量(30 kU·kg⁻¹) 游离尿激酶组相比, 靶向脂质体组血栓仍然偏重(P < 0.05)。

Table 1 Wet weights of thrombi in rats of different groups and their statistical analysis (n = 7)

Group	Dose/ kU·kg ⁻¹	Mean wet thrombus weight/ mg	P(vs TBS)	P(vs UK targeted liposome)
TBS	0	3.0 ± 0.3		
Free UK(large dose)	300	2.06 ± 0.11	0.0002 ^{***}	0.02989 [△]
Free UK(small dose)	60	3.05 ± 0.29	0.9939	0.00035 ^{△△△}
UK liposome	60	2.75 ± 0.20	0.0835	0.0039 ^{△△}
UK targeted liposome	60	2.32 ± 0.21	0.0008 ^{***}	

^{***} P < 0.001 vs TBS; [△] P < 0.05, ^{△△} P < 0.01, ^{△△△} P < 0.001 vs UK targeted liposome. TBS: Tris- HCl buffered solution; UK: Urokinase

血栓干重及统计分析结果如表 2 所示。与湿重情况有所不同, 和 TBS 对照组血栓干重相比, 在相同剂量(60 kU·kg⁻¹) 下, 尿激酶脂质体组表现为有

差异(P < 0.05); 与 5 倍剂量(300 kU·kg⁻¹) 的游离尿激酶组相比, 靶向脂质体组在溶栓效果方面没有差异(P > 0.05)。

Table 2 Dry weights of thrombosis in rats of different groups and their statistical analysis (n = 7)

Group	Dose/ U·kg ⁻¹	Mean dry weight of thrombosis/ mg	P(vs TBS)	P(vs UK targeted liposome)
TBS	0	0.89 ± 0.10		
Free UK(large dose)	300 000	0.65 ± 0.10	0.0120 [*]	0.53701
Free UK(small dose)	60 000	0.90 ± 0.10	0.8812	0.00045 ^{△△△}
UK liposome	60 000	0.77 ± 0.08	0.0462 [*]	0.04136 [△]
UK targeted liposome	60 000	0.68 ± 0.05	0.0005 ^{***}	

^{*} P < 0.05, ^{***} P < 0.001 vs TBS; [△] P < 0.05, ^{△△△} P < 0.001 vs UK targeted liposome

综合溶栓实验结果, 无论是在血栓湿重还是干重情况下, 靶向脂质体组的溶栓效果都比同剂量的普通脂质体组要好(分别为 P < 0.01 和 P < 0.05), 证明所得靶向脂质体具有较好的靶向溶栓作用。

讨论

由于聚合物原料 HOOC-PEG-COOH 的分子量分布很宽(约 2 600 ~ 5 800), 给偶联产物 DSPE-PEG-COOH 和 DSPE-PEG-RGDS 的鉴定带来了困难。如 TLC 检识时某些显色反应不明显, 且斑点拉长; 常规的波谱解析(尤其是质谱) 无法得到明确的结论。

对于导向脂质衍生物 DSPE-PEG-RGDS, 氨基酸分析表明含有 R, G, D, S 4 种氨基酸, 初步说明偶联反应是成功的。但 4 种氨基酸的物质的量比与理论值有一定差异。本文以溶栓实验的结果, 证明所得的靶向溶栓脂质体确实具有血栓靶向作用, 间接证

明了 DSPE-PEG-COOH 与 RGDS 的成功偶联。为得到直观的化学证据, 可以在偶联时参入同位素标记的 RGDS, 然后检测产物中是否有相应量的同位素。

尿激酶是一种高分子量(54 ku) 的蛋白质, 现有的测定方法很少, 成熟的方法是通过试剂盒测定效价来间接评价。但溶解氢化豆磷脂脂质体以释放封装药物的操作(表面活性剂和 60 °C 的加热) 会使尿激酶失活。预试验尝试了多种方法, 均由于磷脂成分的干扰而无法应用于包封率的测定。最后, 通过对尿激酶进行荧光标记才解决了这一难题。标记物羧基荧光黄分子量只有 390, 对尿激酶的包封情况影响很小。本文只在测定包封率时使用荧光标记的尿激酶, 其他所有实验使用的均为尿激酶。

为对脂质体进行靶向修饰, 本文将导向脂质衍生物直接参入处方中制备脂质体。结果 DSPE 插在脂质双层中, 大部分 PEG-RGDS 朝向脂质体外面, 少

量朝向脂质体的内水相,造成寻靶能力的部分丧失。具体有多少比例的 PEG-RGDS 被“包裹”在脂质体里面,目前尚无法确证。由于包封的是蛋白类药物,在脂质体的外面有游离的尿激酶存在,故只能选择这种靶向修饰方式。如果采取先制备 DSPE-PEG-COOH 修饰的尿激酶脂质体,再和导向分子 RGDS 偶联,则溶液中共存的尿激酶会和 RGDS 竞争,影响对脂质体的靶向修饰。

曾有文献^[6]报道在同样的溶栓效果下, RGDS 修饰的尿激酶脂质体可以将用药剂量降低到原来的 1/10,而本文却只能降到不到 1/5,分析认为原因如下: ① 血栓取材方法不同。文献中是取整段血栓称重,而本实验是切取其中长 5 mm 的血栓部分称重。相比较而言,相同的血栓样品,前者的方法容易得到较高的差异显著性水平。② 脂质体上导向弹头 RGDS 的数目不同。众所周知,第 3 代靶向脂质体要求将导向分子偶联在 PEG 长链的末端,而 PEG 用量占脂质成分的 6%~10%(物质的量比)。通常导向分子与 DSPE-PEG-COOH 偶联的产率较低(约 30%),这使得第 3 代靶向脂质体上能够连接上的导向弹头的数目有限(约占磷脂物质的量比的 3%)。照此估计,本文脂质体每 10 kU 的尿激酶平均只有 35 μg 的 RGDS,而文献报道中每 10 kU 的尿激酶平均有 83 μg 的 RGDS。

本文首次制备得到了第 3 代靶向溶栓的脂质体,并且用饱和磷脂为材料,为解决脂质体的稳定性和实现工业化生产奠定了基础。

References:

- [1] Xia L, Gu J, Zhang X, *et al.* Preparation of an antifibrin thrombus-specific murine/human chimeric monoclonal antibody Fab fragment in *Escherichia coli* [J]. *Thromb Res*, 1996, **81**(4):477-484.
- [2] Schneider J, Hauser R, Hennies HH, *et al.* A novel chimeric derivative of streptokinase, rscu-PA-40 kDa/Hir, binds to thrombin and exerts thrombus-specific fibrinolysis in arterial and venous thrombosis in dogs [J]. *Thromb Haemost*, 1997, **77**(3):535-539.
- [3] Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH, *et al.* *In vitro* studies of a new thrombus-specific ultrasound contrast agent [J]. *Am J Cardiol*, 1998, **81**(12A):58G-61G.
- [4] Heermans JL, Los P, Prevost R, *et al.* Fibrin binding of plasminogen coated liposomes *in vitro* [J]. *Thromb Haemost*, 1996, **75**(1):134-139.
- [5] Heermans JL, Prevost R, Feitsma H, *et al.* Clot accumulation characteristics of plasminogen-bearing liposomes in a flow-system. Groningen-utrecht institute for drug exploration [J]. *Thromb Haemost*, 1998, **79**(1):144-149.
- [6] Ling SC, Zhang LZ, Zhao J. Experimental study on treatment of cardio-cerebral diseases by liposomes directed drug delivery (II) [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1994, **26**(Suppl):153-159.
- [7] Zhao M, Peng SQ, Dilinuer S, *et al.* Studies on the synthesis and activities of RGD related peptides [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1997, **32**(4):271-277.
- [8] Kung VT, Redemann CT. Synthesis of carboxylic derivatives of PE and use as an efficient method for conjugation of protein to liposomes [J]. *BBA*, 1986, **862**:435.
- [9] Blume G, Cevc G. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo* [J]. *BBA*, 1993, **1146**:157-168.
- [10] Zhu LQ, Chen XQ. *Experimental Methodology Frequently Used in Immunology* (免疫学常用实验方法) [M]. Shanghai: People's Military Medical Press, 2000.365-366.