

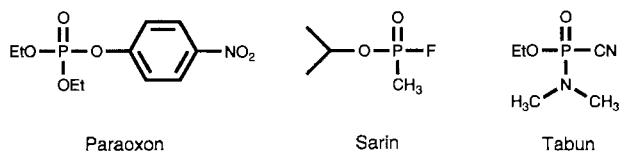
- [9] Versuche, die Produkte als Silylenolether in reiner Form zu isolieren, schlugen fehl, da ein beträchtlicher Teil der Ketone (>20%) immer schon vor dem Abbrechen der Reaktion gebildet wurde.
- [10] I. Kuwajima, E. Nakamura, M. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1025–1030.
- [11] a) J. E. Audia, L. Boisvert, A. D. Patten, A. Villalobos, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3738–3740; b) M. C. Carreno, J. L. Ruano, M. Garrido, M. P. Ruiz, G. Solladie, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6653–6656.
- [12] Vgl. S. Takano, K. Inomata, K. Ogasawara, *Chem. Lett.* **1989**, 359–362.
- [13] Y. Ito, T. Hirao, T. Saegusa, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1011–1013.
- [14] R. F. Newton, D. P. Reynolds, M. A. Finch, F. D. Kelly, S. M. Roberts, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3981–3982.
- [15] Vgl. R. Noyori, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4259–4292.

## Antikörper-katalysierte Hydrolyse von Phosphorsäuretriestern\*\*

Jonathan S. Rosenblum, Lee-Chiang Lo, Tingyu Li,  
Kim D. Janda\* und Richard A. Lerner\*

In memoriam James D. Bain

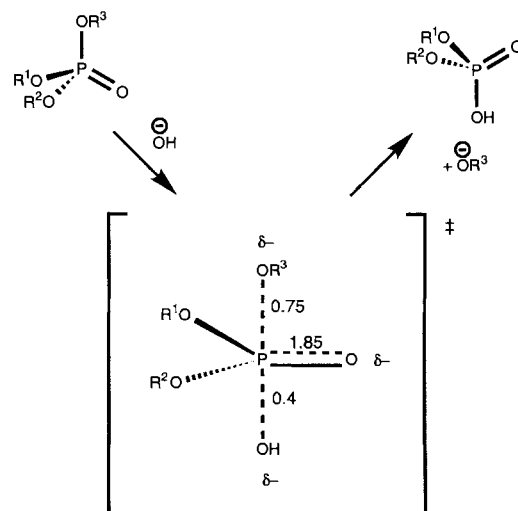
Die Hydrolyse von Phosphorsäureestern ist seit vielen Jahren eine Herausforderung für Biologen und Chemiker. Die Aufmerksamkeit konzentrierte sich bislang hauptsächlich auf Phosphorsäuremono- und -diester, da deren biologische Eigenschaften am besten bekannt sind. Doch auch die Triester sind von biologischer Bedeutung. Sie spielen eine essentielle Rolle bei der Adaptation von *E. coli* an mutagene Reagentien<sup>[1]</sup> und sind Vorstufen für medizinisch wichtige Nucleosid-Analoga<sup>[2, 3]</sup>. Derivate von Phosphorsäuretriestern werden als Insektizide eingesetzt, andere sind wirkungsvolle chemische Waffen. Zu dieser Verbindungsklasse gehört auch Sarin (Isopropyl(methyl)-phosphonofluoridat), das kürzlich bei einem verheerenden Bombenanschlag in einer japanischen U-Bahn verwendet wurde<sup>[4]</sup>. Obwohl es in der Natur Phosphotriesterasen gibt, sind deren physiologische Substrate nicht bekannt<sup>[5]</sup>.



Neben ihrer biologischen Bedeutung werfen Phosphorsäureester auch grundlegende chemische Fragestellungen hinsichtlich ihrer einzigartigen Hydrolysebeständigkeit<sup>[6]</sup> und der Beteiligung eines Übergangszustandes mit einem fünffach koordinierten Phosphoratom an der Hydrolyse auf. Antikörper, die die Hydrolyse von Phosphorsäuretriestern katalysieren, sind daher aus biologischer und aus chemischer Sicht interessant. Mit sol-

chen Antikörpern könnte man in die Antwort von *E. coli* auf mutagene methylierende Agentien eingreifen, Vorstufen von Wirkstoffen aktivieren (inaktive Carbonsäureester wurden bereits durch Antikörper-katalysierte Hydrolyse aktiviert<sup>[7, 8]</sup>) und Vergiftungen mit Nervengiften auf Organophosphatbasis behandeln oder gar vorbeugend verhindern<sup>[9, 10]</sup>. Diese Antikörper sollten auch hilfreich sein, um die Erfordernisse des Übergangszustandes hinsichtlich seiner Struktur und seiner elektrostatischen Eigenschaften für die Phosphorsäureester-Hydrolyse zu definieren. Im folgenden beschreiben wir einen derartigen, Phosphorsäuretriestere hydrolysierenden Antikörper.

Bei der basenkatalysierten Phosphorsäuredi- und -triestere-Hydrolyse wird ein Übergangszustand mit fünffach koordiniertem Phosphoratom durchlaufen, wobei beim Angriff des Hydroxidions gleichzeitig die Abgangsgruppe entlang der apikalen Achse verdrängt wird (Schema 1). Während der tetraedrischen



Schema 1. Mechanismus der Phosphorsäuretriestere-Hydrolyse unter Berücksichtigung der Struktur und der elektrostatischen Verhältnisse des Übergangszustandes. Angegeben sind die Bindungsordnungen bei der basenkatalysierten Hydrolyse von Paraaxon [27].

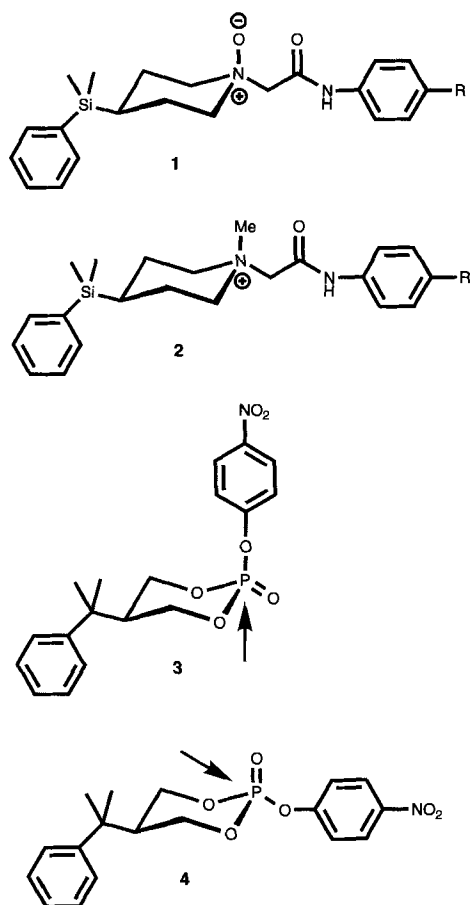
Übergangszustand bei der Carbonsäureester-Hydrolyse durch viele funktionelle Gruppen exakt nachgebildet werden kann<sup>[11, 12]</sup>, sind fünffach koordinierte Zentren in der Organischen Chemie selten (zu Ausnahmen siehe Lit.<sup>[13, 14]</sup>). Außerdem sind viele der Verbindungen mit fünffach koordinierten Zentren giftig oder instabil, was ihre Brauchbarkeit als Hapten für eine Immunisierung beeinträchtigt. Im Vergleich dazu lassen sich die besonderen elektrostatischen Eigenschaften des Übergangszustandes, die im Verlauf der Reaktion wahrscheinlich von Bedeutung sind, einfacher imitieren. Daher ist von Interesse, ob das Hapten notwendigerweise ein fünffach koordiniertes Zentrum aufweisen muß oder ob es genügt, die elektrostatischen Eigenschaften des Übergangszustandes zu berücksichtigen, um einen effektiven Katalysator zu erhalten.

Um zwischen diesen Möglichkeiten zu entscheiden, haben wir Antikörper mit Phosphotriesterase-Aktivität gesucht, die entweder ein Hapten mit einer Aminoxidgruppe oder eines mit einem quartären Amin erkennen. Geladene Haptene sollten Antikörper induzieren, deren katalytische Wirkung entweder auf der Stabilisierung eines polaren Übergangszustandes oder auf der Bereitstellung einer reaktiven Seitenkette besteht, die als allgemeine Base wirkt<sup>[15–17]</sup>. Das Hapten 1 enthält eine Aminoxidgruppe, deren dative Bindung der zu brechenden Bindung

[\*] Prof. Dr. K. D. Janda, Prof. Dr. R. A. Lerner, J. S. Rosenblum, Dr. L.-C. Lo, Dr. T. Li  
The Scripps Research Institute  
Department of Chemistry and Molecular Biology  
10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Telefax: Int. + 619/554-6068

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Alfred P. Sloan Foundation (K. D. J., Grant GM48351) und von der National Science Foundation, National Institutes of Health (J. S. R.) gefördert. Wir danken Ping Fan und Tami Danon für technische Unterstützung und Dr. Dee-Hua Huang für die Aufnahme der <sup>31</sup>P-NMR-Spektren.

in **3** sowie der P=O-Bindung in **4** entspricht. Jede positive Ladung, die am Phosphorzentrum entsteht, sollte durch anionische funktionelle Gruppen in der Bindungsstelle des Antikörpers stabilisiert werden; diese anionischen Gruppen werden durch den positiven Pol der Aminoxidgruppe in **1** induziert. Der negative Pol der Aminoxidgruppe entspricht entweder der entstehenden negativen Ladung am Sauerstoffatom der Abgangsgruppe im Übergangszustand der Hydrolyse von **3** oder der negativen Partialladung am P=O-Sauerstoffatom im Übergangszustand der Hydrolyse von **4** (Schema 2). Als Resultat der regiospezifischen Induktion von entgegengesetzten Ladungen sollte es möglich sein, durch Vergleich der durch Antikörper gegen **1** katalysierten Hydrolyse von **3** mit der von **4** zu bestimmen, welche der negativen Partialladungen des Übergangszustandes stabilisiert werden müssen.



Schema 2. Strukturformeln der Haptene **1** und **2** und der Substrate **3** und **4**. Die Pfeile geben die Angriffsrichtung des Hydroxidions beim Angriff auf den Triester entlang der apikalen Achse an. R = Brücke zum Protein (bei der Immunisierung), R = NHCOCH<sub>3</sub> (bei Inhibitionsversuchen).

Das zu **1** analoge Hapten **2** weist statt einer Aminoxid- eine Methylammoniumgruppe auf<sup>[18]</sup>. Es sollte in der Bindungsstelle des Antikörpers nur anionische und keine kationischen Aminosäuren induzieren, so daß es möglich sein sollte, die für die Stabilisierung des Übergangszustandes wichtigen Ladungsparameter in ihre Anteile zu zerlegen.

Von 25 Antikörpern gegen **1** und 17 Antikörpern gegen **2**<sup>[19]</sup>, die auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, die Hydrolyse von **3** und **4** zu katalysieren, waren jeweils fünf katalytisch aktiv. Ein Antikörper gegen **1**, Tx1-4C6<sup>[19]</sup>, war besonders effizient und wurde weiter getestet. Die Reaktionen von Tx1-4C6 mit **3** und

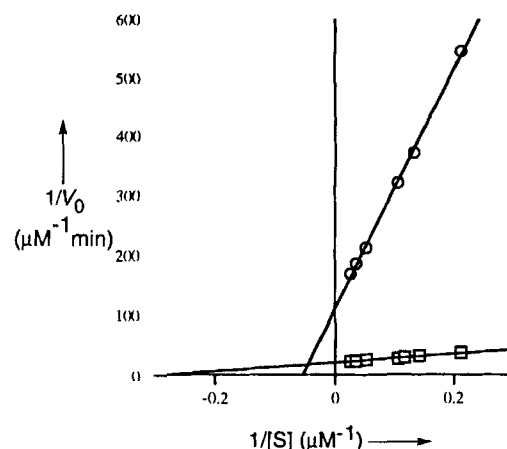


Abb. 1. Lineweaver-Burk-Diagramm der Hydrolyse von **3** (□) und **4** (○) durch den Antikörper Tx1-4C6. S = Substrat,  $V_0$  = Reaktionsgrenzgeschwindigkeit.

**4** folgen einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 1, Tabelle 1); sie werden durch stöchiometrische Mengen an **1** inhibiert und weisen eine Sättigungskinetik hinsichtlich des Substrats auf. Der Antikörper Tx1-4C6 bindet das Hapten **1** mit einer Dissoziationskonstanten  $K_D$  von 0.67 μM, wie durch die Löschung der Eigen-Fluoreszenz des Antikörpers bei Zugabe des Haptens bestimmt wurde.

Tabelle 1. Kinetische Parameter für die durch den Antikörper Tx1-4C6 katalysierte Hydrolyse von **3** und **4**.

Substrat	$k_{\text{unkat}} [\text{min}^{-1}]$	$k_{\text{kat}} [\text{min}^{-1}]$	$K_M [\mu\text{M}]$
<b>3</b>	$2.77 \times 10^{-5}$	$1.01 \times 10^{-2}$	3.57
<b>4</b>	$8.77 \times 10^{-5}$	$1.85 \times 10^{-3}$	18.7

Die Geschwindigkeit der unkatalysierten Hydrolyse von **3** ist kleiner als die von **4**, da **3** durch den verallgemeinerten anomeren Effekt stabilisiert wird<sup>[20]</sup>. Interessanterweise war Tx1-4C6 in der Lage, die Eigen-Reaktivität umzukehren, also die Hydrolyse von **3** stärker zu katalysieren als die von **4** ( $k_{\text{unkat}}(\textbf{3})/k_{\text{unkat}}(\textbf{4}) = 0.316$ ;  $k_{\text{kat}}(\textbf{3})/k_{\text{kat}}(\textbf{4}) = 5.46$ ). Diese Umkehr kann entweder von einer unterschiedlich starken Stabilisierung der Grundzustände herrühren<sup>[21]</sup> oder von einer besseren geometrischen Paßform des Übergangszustandes der Hydrolyse von **3** gegenüber der des Übergangszustandes ausgehend von **4**. Diese unterschiedliche Bindung läßt sich mit Blick auf das induzierende Hapten **1** verstehen (Schema 2). Beim Übergangszustand ausgehend vom Substrat **3** entspricht die apikale Achse des fünfbindigen Phosphoratoms der axialen Orientierung der N-O-Bindung in **1**<sup>[19]</sup> und begünstigt so einen Mechanismus, bei dem die Abgangsgruppe unter einem Winkel von 180° zwischen den drei wechselwirkenden Atomen austritt. Im Unterschied dazu sollten Antikörper gegen das Aminoxid **1** in Substrat **4** die P=O-Bindung polarisieren. Da **3** das bessere Substrat für den Antikörper Tx1-4C6 ist, vermuten wir, daß die Polarisierung der zu brechenden Bindung bei einer konzertierten Reaktion günstiger ist als die der P=O-Bindung, wodurch eine zweistufige Reaktion mit Pseudorotation begünstigt werden sollte<sup>[22]</sup>.

Der Antikörper Tx1-4C6 hat ein begrenztes Substratspektrum. Er bindet Paraoxon nicht und hydrolysiert es demnach auch nicht. Auch werden Carbonsäureester, die mit **3** und **4** verwandt sind, nicht durch Tx1-4C6 hydrolysiert.

Einer der wichtigsten Aspekte der Katalyse durch Antikörper besteht in der Möglichkeit, ausgewählte Eigenschaften des Übergangszustandes jeder chemischen Reaktion zu untersuchen. Hier haben wir dieses Prinzip am Beispiel der erfolgreichen Hydrolyse von Phosphorsäureestern durch einen Antikörper demonstriert, der nur im Hinblick auf die elektrostatischen Gegebenheiten des Übergangszustandes der Reaktion selektiert worden war. Die besten katalytischen Antikörper wurden durch das Aminoxid **1** induziert. Aber auch **2** induzierte einige wirksame Katalysatoren, was darauf hindeutet, daß auch allein die Erniedrigung der Energie, die zur Bildung der positiven Ladung im Übergangszustand notwendig ist, ausreicht, um eine Katalyse zu erreichen. Erwartungsgemäß ist die Katalyse allerdings effektiver, wenn zusätzliche Eigenschaften des Übergangszustandes, wie die Bildung der negativen Ladung am Sauerstoffatom der Abgangsgruppe, berücksichtigt werden. Um noch effektivere Katalysatoren zu erhalten, muß man nun unter Beibehaltung der elektrostatischen Eigenschaften des Antikörpers dessen schwieriger zu beeinflussenden geometrischen Eigenschaften angehen. Indem wir ein Enzym schrittweise aufbauen, können wir so unser Wissen über die Katalyse vertiefen. Darüberhinaus könnten wir durch die Entwicklung geeigneter Antikörper die Frage beantworten, ob die Hydrolyse von Phosphorsäurediestern durch einen der Triester-Hydrolyse ähnlichen Mechanismus<sup>[23, 24]</sup> erleichtert werden kann, bei dem der einleitende Schritt die Protonierung des Sauerstoffatoms des Phosphations ist.

### Experimentelles

**3, 4: Alkylierung von Diethylisopropylidenmalonat**[25]: Zu einer Lösung von 10.0 g (50 mmol) Diethylisopropylidenmalonat in 20 mL wasserfreiem Ether wurden langsam 50 mmol Phenylmagnesiumbromid (50 mL, 1.0 M in THF) bei 0 °C zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 0 °C gerührt und dann 1 h unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde anschließend eingeeengt, in eisgekühlte verdünnte Schwefelsäure gegeben und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten EtOAc-Extrakte wurden eingeeengt und das 1,4-Additionsprodukt durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/EtOAc 8/1) gereinigt (Ausbeute 3.8 g, 28 %).

**Reduktion des Diesters**: 1.34 g des erhaltenen Diesters wurden in 42 mL wasserfreiem Ether gelöst und langsam 0.37 g LiAlH<sub>4</sub> hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die übliche Aufarbeitung ergab das Diol in 35 % Ausbeute. <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.34–7.27 (m, 4H; arom.), 7.21–7.16 (m, 1H; arom.), 3.78 (dd, J = 10.4, 3.7 Hz, 2H), 3.70 (dd, J = 10.4, 9.8 Hz, 2H), 2.15 (m, 1H), 2.00 (br. s, 2H; OH).

**Phosphorylierung des Diols**: Eine Lösung von 145 mg des Diols in 2 mL THF wurde zu einer Lösung von 133 µL Pyridin und 210 mg *p*-Nitrophenylphosphorsäuredichlorid in 5 mL THF getropft. Die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt und dann eingeeengt. Die gewünschten Produkte **3** (70 mg, 25 %) und **4** (72 mg, 26 %) wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Hexan/EtOAc 2/1) getrennt. – **3**: R<sub>f</sub> = 0.27; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.22 (d, J = 9.2 Hz, 2H; arom.), 7.39–7.24 (m, 7H; arom.), 4.32 (dd, J = 10.9, 4.9 Hz, 2H), 4.26 (dd, J = 10.9, 4.9 Hz, 2H), 2.68 (m, 1H), 1.38 (s, 6H; CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, heteronuclear entkoppelt): δ = –13.37. – **4**: R<sub>f</sub> = 0.20; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.22 (d, J = 9.2 Hz, 2H; arom.), 7.38–7.22 (m, 7H; arom.), 4.48–4.36 (m, 4H), 2.31 (m, 1H), 1.47 (s, 6H; CH<sub>3</sub>); <sup>31</sup>P-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, heteronuclear entkoppelt): δ = –12.29. – Die Konfigurationen von **3** und **4** wurden durch Vergleich ihrer R<sub>f</sub>-Werte sowie <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektren mit denen bekannter ähnlicher Verbindungen [26] bestimmt.

**Assays**: Alle Reaktionen wurden bei 30 °C anhand der Bildung von *p*-Nitrophenol photometrisch (402 nm) verfolgt. Der Extinktionskoeffizient unter diesen Reaktionsbedingungen wurde zu 1.80 × 10<sup>4</sup> m<sup>–1</sup> cm<sup>–1</sup> bestimmt. Typischerweise wurde eine 50 mM Bicinlösung (pH = 8.5; Bicin = *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)glycin) mit 5 µM Tx1-4C6 30 min unter den Reaktionsbedingungen inkubiert (Kontrollversuch ohne Antikörper). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates in unterschiedlichen Konzentrationen in einem konstanten Volumen DMSO gestartet (die DMSO-Endkonzentration betrug 0.375 %). Die Reaktion wurde etwa 2 h verfolgt, wonach weniger als 10 % des Substrates umgesetzt worden waren.

Eingegangen am 2. Mai,  
veränderte Fassung am 24. Juli 1995 [Z 7949]

**Stichworte**: Elektrostatische Wechselwirkungen • Katalytische Antikörper • Phosphorsäureester • Hydrolysen • Übergangszustände

- [1] B. M. Saget, G. C. Walker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9730–9734.
- [2] C. Perigaud, A. M. Aubertin, S. Benzaria, H. Pelicano, J. L. Girardet, G. Maury, G. Gosselin, A. Kirn, J. L. Imbach, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 11–14.
- [3] A. Namane, C. Gouyette, M. P. Fillion, G. Fillion, T. Huynh-Dinh, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3039–3044.
- [4] N. D. Kristof, *The New York Times*, **1995**, A1, A6.
- [5] S. R. Caldwell, J. R. Newcomb, K. A. Schlecht, F. M. Raushel, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7438–7444.
- [6] F. H. Westheimer, *Science* **1987**, *235*, 1173–1178.
- [7] H. Miyashita, Y. Karaki, M. Kikuchi, I. Fujii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5337–5340.
- [8] D. A. Campbell, B. Gong, L. M. Kochersperger, S. Yonkovich, M. A. Gallop, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2165–2166.
- [9] Y. Ashani, N. Rothschild, Y. Segall, D. Levanon, L. Raveh, *Life Sciences* **1991**, *49*, 367–374.
- [10] E. Kaliste-Korhonen, P. Ylitalo, O. Hanninen, F. M. Raushel, *Toxicol. Appl. Pharm.* **1993**, *121*, 275–278.
- [11] R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* **1991**, *252*, 659–667.
- [12] K. D. Janda, Y.-C. J. Chen, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Springer, Berlin, **1994**, S. 209–241.
- [13] R. M. Moriarty, J. Hiratake, K. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8575–8577.
- [14] Y.-C. J. Chen, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1488–1489.
- [15] K. D. Janda, *Abstr. Pap. 198th National Meeting Am. Chem. Soc.*, American Chemical Society, Washington, DC, **1987**; ORGN 196.
- [16] K. M. Shokat, C. J. Leumann, R. Sugawara, P. G. Schultz, *Nature* **1989**, *338*, 269–271.
- [17] K. D. Janda, M. J. Weinhouse, T. Dannon, K. A. Pacelli, D. M. Schloeder, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5427–5434.
- [18] T. Li, S. Hilton, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3308–3309.
- [19] Haptensynthese und Antikörperproduktion sind im Detail beschrieben in T. Li, K. D. Janda, J. A. Ashley, R. A. Lerner, *Science* **1994**, *264*, 1289–1293.
- [20] A. J. Kirby, *The Anomeric Effect and Related Stereoelectronic Effects at Oxygen*, Springer, Berlin, **1983**, S. 20–32.
- [21] W. P. Jencks, *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover, New York, **1987**, S. 51.
- [22] J. R. Knowles, *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 877–919; C. R. Hall, T. D. Finch, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2059–2095.
- [23] R. Breslow, R. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1201–1207.
- [24] D. Herschlag, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11631–11635.
- [25] F. S. Prout, E. P.-Y. Huang, R. J. Hartman, C. J. Korpics, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 1911–1913.
- [26] L. D. Hall, R. B. Malcolm, *Can. J. Chem.* **1972**, *50*, 2102–2110.
- [27] S. R. Caldwell, F. M. Raushel, P. M. Weiss, W. W. Cleland, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7444–7450.

## Molekulare Erkennung zwischen chemisch modifiziertem β-Cyclodextrin und 1-Decen: Zweiphasen-Hydroformylierung von wasserunlöslichen Olefinen\*\*

Eric Monflier\*, Georges Fremy, Yves Castanet und André Mortreux

Die Entwicklung von wasserlöslichen Katalysatoren für die Hydroformylierung von Olefinen in einem Zweiphasensystem hat während der letzten Jahre beträchtliche Aufmerksamkeit auf sich gezogen. So wurde bei der Hoechst AG ein Verfahren zur industriellen Hydroformylierung von Propylen mit einem wasserlöslichen Rhodiumkatalysator mit sulfoniertem Triphenylphosphan als Ligand entwickelt<sup>[1]</sup>. Zwar werden bei der Hydroformylierung von langkettigen Olefinen in Gegenwart eines

[\*] Dr. E. Monflier  
Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin  
Rue Jean Souvraz, Sac postal 18, F-62307 Lens (Frankreich)  
Telefax: Int. + 21791717  
Dipl.-Chem. G. Fremy, Prof. Dr. Y. Castanet, Prof. Dr. A. Mortreux  
Laboratoire de Catalyse Hétérogène et Homogène  
URACNRS 402, Villeneuve d'Ascq Cedex (Frankreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Centre National de la Recherche Scientifique gefördert.