

AÑO 1958

Expediente núm.



241397

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una **PATENTE DE** INVENCIÓN por 20 años, en España

a favor de

MERCK & CO. Inc., de nacionalidad
norteamericana domiciliado en RAHWAY (New Jersey)
calle de East Lincoln Avenue núm. 126

por:

« Procedimiento para la obtención de novobiocina monósódica
cristalina ».

Nº 7156

Agente Sr. BOLIBAR,

JE.

241397



241397

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

a favor de

MERCK & CO., Inc., de nacionalidad norteamericana, domiciliada en RAHWAY (New Jersey, E.U.), 126 East Lincoln Avenue,

por:

"Procedimiento para la obtención de novobiocina monosódica cristalina".

M e m o r i a d e s c r i p t i v a.

Este invento se refiere al nuevo agente antibiótico Novobiocina, y más concretamente a un procedimiento nuevo y perfeccionado de preparar la sal monosódica de novobiocina.



- 2 ADP

241397

el nombre de "Catomicina", nombre registrado por Merck & Co., Inc., se obtiene cultivando en condiciones vigiladas una nueva especie de microorganismo que ha sido designado, en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc., Rahway, Nueva Jersey, por Streptomyces spheroides Ma-319. Un cultivo de este microorganismo se ha depositado en la Sección de Fermentación del Servicio de Investigación Utilitaria del Norte, Departamento de Agricultura de EUA, en Peoria, Illinois, y agregado a sus cultivos permanentes como NRRL 2449.

La producción de novobiocina mediante fermentación aeróbica de medios líquidos adecuados por cepas de Streptomyces spheroides, y la preparación de sales de novobiocina, han sido previamente expuestas por otros, explicando que la novobiocina es una sustancia ácida con dos grupos básicos de enlace. El primer enlace para formar una sal monosódica se produce a un pH aproximado de 7,0, y tiene un pK de 3,8 aproximadamente; el segundo enlace sobreviene a un pH de 11,0, poco más o menos, con un pK aproximado de 9,4.

La sal monosódica de novobiocina es particularmente activa contra estafilococos resistentes a la penicilina y contra estafilococos y reumococos, gérmenes responsables de la mayoría de las infecciones respiratorias bacterianas. En terapéutica humana, la sal sódica de novobiocina puede administrarse por vía bucal en forma de cápsulas que contienen, por ejemplo, unos 100 a 500 mgs. del antibiótico, a una dosis diaria que oscila entre 1 y 2 gramos. Así, una forma posológica adecuada es una cápsula de gelatina blanda núm. 1 que contiene 250 mgs. de la sal monosódica. Alternativamente, se pueden preparar tabletas



mezclando la sal monosódica en polvo con una pequeña cantidad de una solución de ftalato ácido de acetato decelulosa al 5% en metanol-acetona (50-50), granulando el material a través de una criba num. 8, desecando los gránulos resultantes, pasando los gránulos desecados por una criba núm. 12, y comprimiéndolos luego, previa adición de una pequeña cantidad de estearato magnésico, para obtener tabletas que contienen unos 250 mgs. de novobiocina sódica.

La novobiocina, y en particular su sal monosódica, son también eficaces en el tratamiento de ciertas enfermedades de plantas. Por ejemplo una solución acuosa que contenga alrededor de 100 p. por millón de la sal monosódica puede emplearse como aspersión para combatir el tizón de las judías causado por Xanthomonas phaseoli. Tales aspersiones pueden contener diversos agentes humectantes o dispersantes u otros agentes activos, y se pueden preparar de acuerdo con métodos bien conocidos en la especialidad.

Estos y otros usos de la sal monosódico de novobiocina hacen muy deseable un método económico y práctico para prepararla; y el presente invento se refiere a un método nuevo y mejor, por el que un ácido de novobiocina relativamente impuro se puede convertir directamente en la sal monosódica cristalizada de novobiocina.

El nuevo procedimiento conforme al presente invento comprende disolver ácido de novobiocina con más de un 80% de pureza en un disolvente orgánico mixto que contiene 2 a 4 volúmenes de un alcohol con 1 a 4 átomos de carbono y 1 volumen de un disolvente aromático escogido entre el grupo integrado por benceno, tolueno y xileno;



añadir a esta solución en disolvente orgánico mixto, metóxido sódico en cantidad que dé un pH aproximado de 7,2 para precipitar así directamente novobiocina monosódica cristalizada. En este procedimiento, la mezcla disolvente orgánica preferida es metanol-benceno 2:1, porque proporciona un rendimiento muy bueno (regularmente superior a 90% del teórico), y da además un producto de buen color y elevada pureza.

Al efectuar el procedimiento, el metóxido sódico se añade con preferencia disuelto en metanol. Después de añadir el metóxido sódico y de formarse en consecuencia cristales, es conveniente agregar más disolvente aromático, con amplia agitación, para aumentar el rendimiento en sal monosódica cristalina. La cantidad de disolvente aromático así agregada debe ser cinco a ocho veces mayor que la del mismo disolvente en la mezcla disolvente inicial. Empleando menos de unos 5 volúmenes de disolvente aromático suplementario no se obtiene el aumento deseado de producción de cristales, y con más de unos 8 volúmenes del mismo tiende a alterarse el color del producto.

El empleo de una mezcla disolvente de metanol-benceno 2:1 parece ser lo más eficaz para retener las impurezas coloreadas y dar una sal monosódica de novobiocina pura, cristalina y blanca. Empleando otro alcohol, como metanol o propanol, se suscita en cierto modo un problema, a causa de la solubilidad decreciente del ácido de novobiocina en mezclas disolventes con alcoholes superiores, entre C_1 y C_4 . Si bien esta menor solubilidad se puede contrarrestar empleando cantidades mayores de la mezcla disolvente, resulta claro que es preferible emplear una



mezcla disolvente que permita mantener reducido a un mínimo el volumen del disolvente que ha de manejarse.

La substitución del benceno por otros disolventes aromáticos, como tolueno o xileno, en la mezcla disolvente preferida, es satisfactoria en cuanto a rendimiento, pero el color del producto aislado no es tan bueno.

Con respecto a la mezcla disolvente preferida de metanol-benceno 2:1, la inclusión de más alcohol, hasta una relación aproximada de 4:1, no influye desfavorablemente en el producto, pero tampoco es beneficiosa, por lo que es preferible evitarla, ya que aumenta el volumen de disolvente que ha de manejarse. Por otra parte, reduciendo la proporción de metanol apreciablemente por debajo de la relación 2:1, se influye en perjuicio del procedimiento, y debe evitarse.

El método se lleva a cabo adecuadamente a temperatura ordinaria, por ejemplo, a unos 25-30°C. Después de disolver el ácido libre de novobiocina en la mezcla disolvente, la solución se pasa con preferencia por papel de filtro cubierto de coagulante de tierra de diatomeas, para eliminar cualquier material no disuelto. El metóxido de sodio en metanol recién preparado conviene filtrarlo asimismo, preservándolo de la acción del aire. La solución de metóxido sódico se agrega gradualmente a la solución ácida de novobiocina hasta un pH aproximado de 7,1 y luego se añaden con cuidado cantidades adicionales, agitando, hasta un pH de alrededor de 7,2-7,3, punto en el cual comienza la cristalización. La lechada de novobiocina monosódica cristalina se agita durante alrededor de una hora. Luego se añade benceno en cantidad aproximada

52 ABR 1956



de cinco a ocho veces, y mejor de $7\frac{1}{2}$ veces el volumen presente en la mezcla disolvente primitiva, y se continúa agitando por espacio de una hora aproximadamente. Se separa luego por filtración el producto cristalino, se lava con benceno, se limpia substancialmente de disolvente residual, cuidando de excluir toda humedad atmosférica, y la torta que resulta se deseca luego en una estufa de vacío a unos 50°C.

La novobiocina monosódica cristalina resultante se disuelve libremente en agua, es casi blanca, con más 90% de pureza, y para muchos usos se puede emplear sin ulterior purificación.

Los siguientes ejemplos servirán para mostrar como puede ponerse en práctica el método del presente invento. Sin embargo, debe advertirse que el ejemplo 1º, referente solo a la preparación del ácido de novobiocina inicial, proviene de estudios ya conocidos y no forma parte del presente invento. También ha de entenderse que la finalidad de estos ejemplos es ilustrativa, y no limitativa.

EJEMPLO 1º.

Un frasco de Blake con 25 ml. de agar acuoso estéril, compuesto de

1% de extracto de levadura
1% de dextrosa
0,12% de Na_2HPO_4
0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2% de agar,

disuelto en agua, se inoculó con un asa de tierra tomada de un cultivo de tierra de Streptomyces spheroides MA-319 (NRRL), y se incubó a 26°C durante cuatro a cinco días, hasta esporulación abundante.



Después se añadieron 20 ml. de agua esterilizada al mismo frasco, y se suspendieron las esporas por raspado. Unos 5 ml. de la suspensión de esporas resultantes se añadieron a un erlenmeyer tabicado de 2 litros que contenía 750 ml. de un medio acuoso estéril compuesto de

0,3% de extracto de carne de buey
1,0% de hidrolizado de caseína (amina NZ)
10% de dextrosa
0,5% de cloruro sódico,

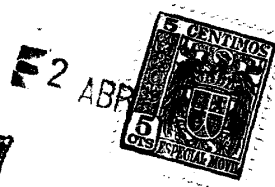
con un pH aproximado de 7,2. Luego se taponó el matraz con algodón, y su contenido se incubó a 26°C en un sacudidor giratorio, durante 48 horas.

El cultivo vegetativo así preparado se añadió luego a un fermentador de acero inoxidable de 50 galones, que contenía unos 25 a 30 galones de medio de extracto de buey esterilizado, de la composición antedicha. Después de agregar una pequeña cantidad de una solución de octadecanol al 1% en aceite mineral, como agente antiespumoso, se incubó el medio a 26°C durante 48 horas. Entretanto, el medio se estuvo agitando, y a través del mismo se hizo pasar aire esterilizado a razón de unos 3 pies cúb./minuto.

Luego se cargo un fermentador de acero inoxidable de 200 galones con unos 100 galones de un medio acuoso que contenía los siguientes ingredientes:

3% de harina de soya (Staley's Special Nutrient 4-S)
2% de dextrosa
0,75% de solubles de destilerías
0,25% de cloruro sódico.

Este medio tenía un pH aproximado de 7,1. Después de esterilizarlo con vapor a unos 120°C durante treinta minutos, y de enfriar, el fermentador se inoculó con un 8,4% de la siembra preparada en el fermentador de 50 galones según se deja descrito. El lote se incubó a continuación a 26°C, agitando y aireando a razón de 12 pies



cúb/minuto. Al cabo de 96 horas, el caldo fermentado que contenía el antibiótico novobiocina tenía una actividad aproximada de 82 mcg/ml.

Después de filtrar todo el caldo a un pH de 9,0 se añadieron 5 libras de cofiltrante de tierra de diatomeas (Hyflo Supercel) por 100 galones de caldo filtrado. El caldo se acidificó despacio hasta un pH de 2,0 con clorhídrico; tras diez minutos de agitación, la carga se filtró, y la torta se agitó con agua. En el filtrado ácido no puede descubrirse nada de antibiótico. Los sólidos precipitados, sin el cofiltrante, dieron una pureza aproximada de 0,2 a 0,3%. La torta del filtro resultante de la precipitación con ácido se extractó dos veces con metanol acuoso al 85%, a un pH de 9,0, empleando aproximadamente 1/10 del volumen de caldo primitivo para cada extracción. La recuperación total fué de un 80% de la bioactividad total existente en el caldo. La pureza de los sólidos en la solución era de 1, a 1,5%.

La solución acuosa de metanol se concentró hasta 1/10 aproximadamente del volumen de la solución metanólica primitiva. Se ajustó el pH a 9,0 con sosa cáustica, y la solución se extractó dos veces con volúmenes iguales de n-butanol. La relación de distribución aparente a un pH de 9,0 viene a ser de 40:1. Los sólidos del extracto butanólico dieron un 4-6% de pureza.

El extracto butanólico se concentró a 1/10 del volumen primitivo, y se añadió a 15 volúmenes de agua con pH de 9,0. Se agregó cofiltrante (Hyflo Supercel, alrededor de 0,5 g/ galón, a base del volumen inicial del caldo), y el pH se ajustó lentamente a 2,0 añadiendo ácido

241397



clorhídrico. Toda la bioactividad precipita en el cofiltrante, y se separa al filtrar. La pureza de los sólidos, sin el cofiltrante, era de un 1 a 12%.

5 La torta se desecó en vacío a 40°C, se molió y se trituroó con éter de petróleo (unos 180 a 400 ml. para los sólidos derivados de cada galón de caldo de fermentación), hasta que el filtrado salió incoloro. Esto elimina 20 a 25% de los sólidos presentes, y elimina productos oleosos inactivos de fermentación subsistentes de las
10 operaciones anteriores. No se perdió bioactividad alguna por esta trituration, y los sólidos remanentes dieron 12 a 15% de pureza.

La torta se extractó con etanol anhidro, hasta que los extractos etanólicos salieron de color amarillo
15 muy débil. Estos extractos se reunieron y concentraron hasta una solución de 15-20% de sólidos, con un índice biológico aproximado de 200 a 300 mcg/mg.

La solución concentrada en etanol se sometió a cromatografía en alúmina lavada con ácido. Debe emplearse
20 se una proporción de 50:1 de alúmina, a base de los sólidos totales existentes en la solución de carga, para obtener una purificación satisfactoria. El material activo pasa a través de la columna mientras queda en ella una gran cantidad del material sólido extraño presente. La
25 columna de alúmina se lavó con etanol, para recuperar la novobiocina. Aproximadamente 95% de la bioactividad estaba en 2,5 a 3 volúmenes desocupados de la columna.

241397



TABLA I

	<u>Volúmen (c.c.)</u>	<u>Índice bio- lógico (mcg/cc)</u>	<u>mg/cc</u>	<u>mcg/mg</u>	<u>Total unidades</u>
Carga col.	1000	44.000	265	166	220 x 106
Fracción I*	1000	92	2.5	37	0.46 x 106
- II	1000	8.400	19.6	428	42 x 106
- III	1000	15.200	31.3	484	76 x 106
- IV	1000	12.400	22.3	556	62 x 106
- V	1000	7.400	13.4	552	37 x 106
- VI	1000	2.600	4.5	604	13 x 106
- VII	1000	900	1.3	690	4.5 x 106
Fracciones (promedio)	7000	6.700	13.2	504	

Volumen de alúmina - 8.000 cc.

Volumen vacío en la columna - 2.600 c.c.

* (primer color)

Las lavaduras de columna de alúmina con etanol se concentraron hasta un 5% de sólidos. Se añadió agua hasta turbiedad, empleando poco más de un volúmen igual, y se dejó cristalizar el antibiótico. La cristalización fué muy lenta. Al cabo de cinco días quedaba en los líquidos sobrenadantes hasta 15% de la bioactividad primitiva. La agitación y/o los cambios de temperatura parecen influir poco en la rapidez de cristalización. Esta novobiocina cristalina tenía un índice de bioactividad aproximado de 500 a 600 mcg/mg.

El material cristalino se disolvió en acetona anhidra, para obtener una solución al 30%. Esta solución se trató con una cantidad de carbón vegetal activado (Darco O-60) igual a dos veces el peso del material cristalino disuelto. El Darco se separó por filtración y se lavó repetidamente con acetona, para diluir la solución hasta una concentración aproximada de 5% de sólidos. Se agregó éter de petróleo hasta enturbiar, y se dejó cristalizar la novobiocina. Se recuperó 90 a 95% de la bioactividad, y la novo-



biocina cristalina obtenida dió un índice de 900 a 1000 mcg/mg.

5 Existen otros métodos de recuperar el ácido de novobiocina de caldos de fermentación, y debe entenderse que puede emplearse cualquiera de ellos que proporcione ácido de novobiocina con pureza superior a un 80% para la conversión directa en la sal monosódica cristalina de novobiocina, según se expone en los ejemplos siguientes.

10 EJEMPLO 2º.

En un frasco de disolución de cinco galones se mezclaron 2350 ml. de metanol y 1175 ml. de benceno. A la mezcla se añadieron con agitación, a 25-30°C, 1175 g. de ácido libre de novobiocina de 88,5% de pureza. La solución se pasó en un embudo de Buchner por papel de filtro revestido previamente con 15 g. de cofiltrante de tierra de diatomeas (Supercel). El frasco de disolución se enjuagó con 450 ml. de una mezcla de metanol-benceno 2:1. Esta solución sirvió para lavar el filtro.

20 En 1200 ml. de metanol se disolvieron 120 g. de metóxido sódico reciente. La solución ligeramente turbia se clarificó por filtración a través de vidrio concrecionado, previamente cubierto de cofiltrante de tierra de diatomeas (Supercel). El filtrado claro se preservó de la acción del aire. La solución de metóxido sódico se añadió lentamente a la de novobiocina en un periodo de media hora, agitando, hasta alcanzar un pH de 7,1. Se agregó con cuidado más solución de metóxido sódico, hasta un pH de 7,2-7,3, al que se inició la cristalización. Se necesitaban 1150 ml. de la solución de metóxido sódico

25

30

241397



para conseguir el pH adecuado. La dispersión de novobiocina sódica se agitó durante una hora a 25-30°C; luego se añadieron 8800 ml. de benceno durante unos diez minutos, y se continuó agitando otra hora, a 25-30°C.

5 La novobiocina monosódica cristalina se separó por filtración en un filtro Lapp de porcelana armado de papel. La torta se lavó con cuatro porciones de 500 ml. de benceno, revolviéndola antes de exprimir el líquido. Después del último lavado, se aplicó un estrujador de
10 caucho y se exprimió el líquido remanente, con cuidado de evitar la humedad atmosférica. La torta se secó en una esturfa de vacío a 50°C.

$E_1\%$ 3070 Å en NaOH 0,1n = 593.

Rendimiento, 983 g. (91,4% del teórico).

15 En el ejemplo precedente, la técnica puede variarse aumentando la relación entre metanol y benceno a 4:1 aproximadamente, sin influir en perjuicio del producto o del rendimiento. Pero una disminución del metanol a bastante menos de la relación 2:1 resulta desfavorable
20 para el procedimiento, y se considera esta última prácticamente óptima.

EJEMPLO 3º.

Se repitió el procedimiento del ejemplo 2º a pequeña escala, disolviendo primero 5 g. de ácido de novobiocina en porciones de 15 c.c. de mezclas disolventes
25 de metanol-benceno 2:1, o bien de metanol-tolueno o metanol-xileno en la misma relación. Cada una de estas soluciones se trató con metóxido sódico en metanol, para obtener novobiocina monosódica cristalina, como se describe en el ejemplo 2º. Los rendimientos de estas prue-
30



bas comparativas fueron de 3,15 g. empleando benceno, 2,95 g. empleando tolueno, y 3,60 g. empleando xileno. El producto resultante de utilizar benceno era substancialmente blanco pero en cambio había bastantes impurezas de color en el producto obtenido usando tolueno, y más aún en el resultante de emplear xileno. En este ensayo comparativo, los rendimientos fueron todos relativamente bajos, comparados con los de 90% y mayores conseguidos practicando el procedimiento a mayor escala.

10 EJEMPLO 4º.

Repitiendo el procedimiento del ejemplo 2º con etanol-benceno 2:1 y con isopropanol-benceno 2:1 como disolvente mixto, fué imposible disolver la misma cantidad de ácido de novobiocina que en una cantidad equivalente de metanol-benceno 2:1. Esto puede compensarse empleando una cantidad mayor del disolvente mixto para una porción determinada de dicho ácido. Aumentando la relación alcohol/benceno de 2:1 a alrededor de 4:1, se eleva también algo la solubilidad del ácido novobiocínico. Tratando soluciones de este ácido en etanol-benceno e isopropanol-benceno con metóxido sódico en metanol, como se describe en el ejemplo 2º, se obtiene novobiocina monosódica cristalina de buen color.

2 5 Aunque la mezcla disolvente de metanol-benceno 2:1 proporciona una adaptación muy eficaz de este procedimiento en cuanto a pureza del producto y eficacia del disolvente, debe advertirse que las condiciones óptimas de cualquiera de las mezclas disolventes antes descritas se obtendrán cuando la proporción entre el ácido de novo-



biocina y el disolvente orgánico mixto en la solución inicial dé una solución substancialmente saturada de ácido novobiocínico en el disolvente mixto. Con metanol-benceno 2:1, se consigue una saturación substancial disolvente de el ácido a razón de 1 g. por 3 ml. de la mezcla disolvente. La cantidad precisa de ácido de novobiocina que ha de usarse en casos particulares dependerá en cierta medida de la pureza del ácido.

N O T A

- 10 Se reivindica como objeto de esta patente:
- 1) Procedimiento para la obtención de novobio -
cina monosódica cristalina, el cual comprende disolver
ácido novobiocínico en una mezcla de disolventes orgáni-
cos que contiene 2 a 4 volúmenes de un alcohol con 1 a 4
15 átomos de carbono, y aproximadamente, 1 volumen de un di-
solvente aromático elegido del grupo integrado por bence-
no, tolueno y xileno; tratar dicha solución con metóxido
sódico, y recuperar la novobiocina monosódica cristalina
asi formada.
 - 20 2) Procedimiento según la reivindicación 1, en
el que se emplea metóxido sódico en cantidad que propor-
cione un pH aproximado de 7,0-7,5.
 - 3) Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó
2, en el que se emplea metóxido sódico en metanol.
 - 25 4) Procedimiento según la reivindicación 1, en
el que la disolución inicial de ácido novobiocínico, la
reacción con metóxido sódico, y la cristalización de novo-
biocina monosódica, se efectúan agitando, a una tempera-
tura aproximada de 25-30°C.

241397

P 2



5) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la novobiocina monosódica cristalina se recupera separando los cristales por filtración, lavándolos con benceno, retirando la mayor parte del benceno sin exponer los cristales a la humedad atmosférica, y secando éstos en vacío a unos 50°C.

6) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cantidad de ácido de novobiocina que se disuelve en el disolvente orgánico mixto es la correspondiente para obtener una solución substancialmente saturada.

7) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que tanto la solución disolvente mixta de ácido novobiocínico como el metóxido sódico en metanol, se filtran por separado antes de combinarlos, para eliminar eventuales componentes insolubles.

8) Procedimiento según la reivindicación 7, en el que, después de añadir metóxido sódico, se agrega más disolvente aromático, en cantidad de unas cinco a ocho veces el volumen del mismo presente en el disolvente orgánico mixto.

9) Procedimiento para preparar novobiocina monosódica cristalina, el cual comprende disolver ácido novobiocínico en metanol-benceno 2:1; añadir a la solución resultante, con agitación, metóxido sódico en metanol, en cantidad que proporcione un pH aproximado de 7,2-7,3, y recuperar la novobiocina monosódica cristalina así formada.

10) Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la solución inicial de ácido novobiocínico, la reacción con metóxido sódico y la cristalización de novo-



biocina monosódica se efectúan con agitación, a una temperatura de alrededor de 25-30°C.

5 11) Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la recuperación de novobiocina monosódica cristalina se efectúa separando los cristales por filtración, lavándolos con benceno, retirando la mayor parte del benceno sin exponer los cristales a la humedad atmosférica, y secándolos en vacío a unos 50°C.

10 12) Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la cantidad de ácido novobiocínico que se disuelve en el disolvente orgánico mixto, es tal que se obtiene una solución substancialmente saturada.

15 13) Procedimiento según la reivindicación 12, en el que se obtiene una solución substancialmente saturada disolviendo ácido novobiocínico a razón de 1 g. aproximadamente por cada 3 ml. de metanol-benceno 2:1.

20 14) Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la solución de disolvente mixto del ácido novobiocínico y el metóxido sódico en metanol se filtran por separado antes de reunirlos, para eliminar cualquier componente insoluble.

25 15) Procedimiento según la reivindicación 8, en el que, después de añadir metóxido sódico en metanol, se agrega más benceno, en cantidad unas cinco a ocho veces mayor, que el volumen de benceno presente en la mezcla disolvente inicial.

16) Procedimiento para la obtención de novobiocina monosódica cristalina.

Esta memoria

241397²⁷ BR



de diez y siete páginas escritas por una sola cara.

BARCELONA, 2 de Abril de 1958.

P. A.

JOSÉ M. BOLUAR
F. P.