

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-58-65>

Влияние твердых дисперсий с поливинилпирролидоном на растворимость ГМЛ-3

В.Б. Маркеев, С.В. Тишков, Е.В. Бlynская, К.В. Алексеев

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»; Россия, 125315 Москва, Балтийская ул., 8

Контакты: Владимир Борисович Маркеев arzilion@yandex.ru

Введение. ГМЛ-3 обладает одновременно анксиолитическим и антидепрессивным эффектом. Однако, как и примерно 70 % разрабатываемых в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС), ГМЛ-3 практически нерастворим в воде, что может негативно сказываться на его биодоступности. Создание твердых дисперсий (ТД) путем кристаллизации с эвтектикой или переводом АФС в аморфное состояние является одним из перспективных методов, позволяющих добиться высокой растворимости и скорости растворения АФС.

Цель исследования – изучение кристалличности и стабильности аморфных твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (ПВП), а также высвобождения ГМЛ-3 из ТД в тесте «Растворение». В качестве объектов исследования выступали АФС ГМЛ-3, ПВП и ТД ГМЛ-3.

Материалы и методы. ТД создавали методом удаления растворителя с использованием этанола (ГМЛ-3 растворим в этаноле при соотношении 1:7) и ПВП с молекулярной массой 24–27 кДа. Кристалличность и стабильность АФС ГМЛ-3 в ТД исследовали методами дифференциально-сканирующей калориметрии и рентгенофазового анализа. Уровень высвобождения АФС ГМЛ-3 из ТД оценивали спектрофотометрически при $\lambda = 256$ нм.

Результаты. В ТД (1:5, 1:10) происходило образование очагов кристаллизации, ведущих к повторной кристаллизации АФС ГМЛ-3 во время процесса отгонки растворителя (для концентрации 1:5) или быстрой потери гомогенности ввиду образования зон повышенного содержания полимера и АФС (для концентрации 1:10). В соотношениях 1:15,20 ТД обладали высокой стабильностью (после выдерживания в течение 146,5 ч при 55 °С) и высоким уровнем высвобождения АФС ГМЛ-3 в среду воды очищенной (96 %).

Заключение. Стабильные аморфные ТД ГМЛ-3 при соотношениях АФС: полимер = 1:15,20 обеспечивают высокий уровень высвобождения ГМЛ-3 в среду воды очищенной, что позволяет сделать вывод о перспективности использования ТД ГМЛ-3 при разработке лекарственных форм (таблеток и капсул).

Ключевые слова: твердая дисперсия, растворимость, ГМЛ-3, поливинилпирролидон, кристалличность

Для цитирования: Маркеев В.Б., Тишков С.В., Бlynская Е.В., Алексеев К.В. Влияние твердых дисперсий с поливинилпирролидоном на растворимость ГМЛ-3. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(1):58–65. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-58-65>

Effect of solid dispersions with polyvinylpyrrolidone on the solubility of GML-3

Vladimir B. Markeev, Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev

Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

Contacts: Vladimir Borisovich Markeev arzilion@yandex.ru

Background. GML-3 has both anxiolytic and antidepressant effects. However, like about 70 % of active pharmaceutical ingredient (API) being developed, GML-3 is practically insoluble in water, which can negatively affect bioavailability. The creation of solid dispersions (SD) by crystallization with eutectic or the transfer of API to an amorphous state is one of the promising methods that allows to achieve high solubility and dissolution rate of API.

Aim. To study the crystallinity and stability of amorphous solid dispersions of GML-3 with polyvinylpyrrolidone (PVP), as well as the release of GML-3 from SD in the Dissolution test. The objects of the study were API GML-3, PVP and SD GML-3.

Materials and methods. SD was created by the method of “solvent removal” using ethanol (GML-3 is soluble in ethanol at a ratio of 1:7) and PVP with a molecular weight of 24–27 kDa. The crystallinity and stability of GML-3 API in SD were studied by differential scanning calorimetry and X-ray phase analysis. The level of release of API GML-3 from SD was evaluated spectrophotometrically at $\lambda = 256$ nm.

Results. In SD (1:5, 1:10), crystallization foci were formed, leading to the re-crystallization of API GML-3 during the solvent distillation process (for a concentration of 1:5) or a rapid loss of homogeneity due to the formation of zones of increased polymer content and API (for a concentration of 1:10). In ratios of 1:15.20, SD had high stability (after holding for 146.5 hours at 55 °C) and a high level of release of GML-3 API into purified water (96 %).

Conclusion. Stable amorphous TD GML-3 at API: polymer ratios = 1:15.20 provide a high level of release of GML-3 into purified water, which allows us to conclude that the use of TD GML-3 is promising in the development of dosage forms (tablets and capsules).

Keywords: solid dispersion, solubility, GML-3, polyvinylpyrrolidone, crystallinity

For citation: Markeev V.B., Tishkov S.V., Blynskaya E.V., Alekseev K.V. Effect of solid dispersions with polyvinylpyrrolidone on the solubility of GML-3. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(1):58–65. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-1-58-65>

Введение

Оригинальная молекула N-бутил-N-метил-1-фенилпирроло[1,2-a]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-3), синтезированная в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», обладает высоким сродством ($K_i = 5,3 \cdot 10^{-7}$ М) с митохондриальным транслокаторным белком 18 кДа [1, 2]. ГМЛ-3 проявляет выраженную антидепрессивную и анксиолитическую активность при тестировании на животных, однако его гидрофобность и кристалличность являются проблемами при разработке лекарственной формы для перорального применения [3]. Приблизительно 70 % новых разрабатываемых в качестве активных фармацевтических субстанций (АФС) молекул плохо растворимы в воде, что может негативно сказываться на их биодоступности [4, 5]. Создание твердых дисперсий (ТД) путем кристаллизации с эвтектикой или переводом АФС в аморфное состояние является одним из перспективных методов, позволяющих добиться высокой растворимости и скорости растворения АФС [6, 7]. Твердые дисперсии, в которых АФС полностью находится в аморфном состоянии, могут быть более стабильными во время хранения, а полное прекращение повторной кристаллизации позволяет добиться воспроизводимости результатов, большей скорости растворения АФС и снижения риска повторной кристаллизации в растворе с выпадением в осадок.

Цель исследования — изучение кристалличности и стабильности аморфных ТД ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (ПВП), а также высвобождения ГМЛ-3 из ТД в тесте «Растворение».

Растворимость ГМЛ-3 в воде составляет 1 к более чем 10 000, что согласно Фармакопее Евразийского экономического союза (Фармакопее ЕАЭС) относит данное вещество к практически нерастворимым. Поскольку предполагается, что ГМЛ-3 будет использован при создании твердой лекарственной формы (таблетки, капсулы), для получения ТД выбран часто

используемый в качестве связующего в технологии влажного гранулирования повидон (ПВП) с молекулярной массой 24–27 кДа, выпускаемый под торговым названием Kollidon® 25 (BASF, Германия). Кристалличность полученных образцов исследовали методом дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) и рентгеновской порошковой дифрактометрии. Степень высвобождения ГМЛ-3 из ТД оценивали в тесте «Растворение в среде воды очищенной». Все ТД сравнивали с исходной ГМЛ-3 и механической смесью ГМЛ-3 и ПВП.

Материалы и методы

Объект исследования — N-бутил-N-метил-1-фенилпирроло[1,2-a]пиазин-3-карбоксамид (ГМЛ-3).

При разработке ТД использовали ПВП [Kollidon® 25, BASF, Германия (USP/NF, EP, JP)] и этанол 96 %.

Технология приготовления твердых дисперсий. Исходя из высокой температуры плавления ПВП (примерно 159 °C) по сравнению с ГМЛ-3 (приблизительно 88 °C) и хорошей растворимости ГМЛ-3 в этаноле (1:7) в качестве технологии получения ТД выбрали метод удаления растворителя. ГМЛ-3 и Kollidon® 25

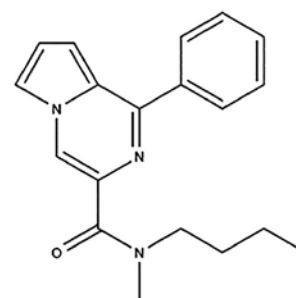


Рис. 1. Структурная формула ГМЛ-3

Fig. 1. Structural formula of GML-3

совместно растворяют в 96 % этиловом спирте с последующим удалением этанола при температуре 55–57 °C в течение 6–8 ч.

Технология получения механической смеси. Смеси ГМЛ-3 и ПВП готовили совместным измельчением в агатовой ступке в течение 10 мин в тех же пропорциях, что и при изготовлении ТД.

Изучение фазовых переходов ГМЛ-3 и твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном методом дифференциально-сканирующей калориметрии. Измерение образцов методом ДСК проводили с использованием дифференциально-сканирующего калориметра Netzsch STA 449 F1 (Netzsch, Германия), совмещенного с термогравиметрией QMS 403 C. Измерения проводили согласно требованиям общей статьи Фармакопеи ЕАЭС 2.1.2.46. Термический анализ (201020046–2022). Приблизительно 5 мг образца взвешивали и запечатывали в алюминиевую емкость с отверстием в крышке. Образцы нагревали до температуры 160 °C со скоростью нагрева 5 °C/мин. В качестве продувочного газа использовали воздух.

Измерение методом рентгенофазового анализа кристаллической структуры ГМЛ-3 и твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном. Спектры рентгенофазового анализа регистрировали с помощью настольного рентгеновского дифрактометра MiniFlex 600 Rigaku (Rigaku Corporation, Япония) согласно общей статье Фармакопеи ЕАЭС 2.1.10.5. «Определение кристалличности твердых веществ методом рентгеновской порошковой дифрактометрии». Измерения проводили на базе ЦКП ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН излучением Cu Ka при 40 кВ и 40 мА в диапазоне 2–60° со скоростью сканирования 4°/мин и размером шага 0,02°.

Испытание на растворение. Проводили согласно требованиям общей статьи Фармакопеи ЕАЭС 2.1.9.3 «Испытание на растворение твердых дозированных лекарственных форм». Среда растворения – 900 мл воды очищенной; устройство – лопастная мешалка, скорость вращения лопастей – 50 об/мин; температура среды растворения – $37,0 \pm 0,5$ °C; время отбора проб – на 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45 и 60 мин. После каждого отбора проб проводили пополнение среды (10 мл). Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при длине волны 256 ± 2 нм.

Испытания стабильности твердых дисперсий ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (1:15) методом ускоренного старения. Образцы хранили в закрытых емкостях при температуре $55 \pm 0,5$ °C в течение 46 и 138,5 ч, что соответствует примерно 1 и 3 мес хранения при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение

Исследование кристалличности методами рентгенофазового анализа и дифференциально-сканирующей

калориметрии. Согласно проведенному исследованию ГМЛ-3 в твердом состоянии представляет собой кристаллы, которые начинают плавиться при температуре 88,48 °C с эндотермическим пиком 94,01 °C и выделением 85,54 мВт/мг энергии. Для ГМЛ-3 также характерны пики дифрактограммы при 5,7; 7,5; 12,1; 17,9; 21,1 и 22,7 °C (рис. 2).

При механическом смешивании ГМЛ-3 с ПВП в соотношении 1:10 на дифрактограмме сохранились все пики высокой интенсивности, свойственные для ГМЛ-3, а снижение их интенсивности происходит за счет измельчения кристаллов и аморфного гало, создаваемого полимером (рис. 3). При создании ТД ГМЛ-3 в соотношении 1:5 кристалличность тоже наблюдается, но она менее выраженная, так как в результате сушки раствора, полученного при совместном растворении ГМЛ-3 и Kollidon® 25 в этаноле, происходит повторная кристаллизация ГМЛ-3 (рис. 4).

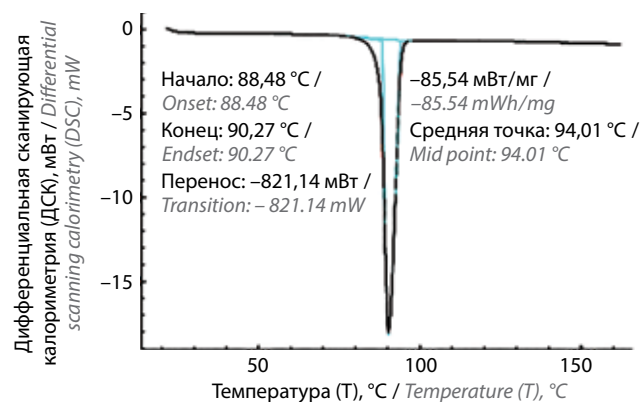


Рис. 2. Термограмма ГМЛ-3

Fig. 2. Thermogram of GML-3

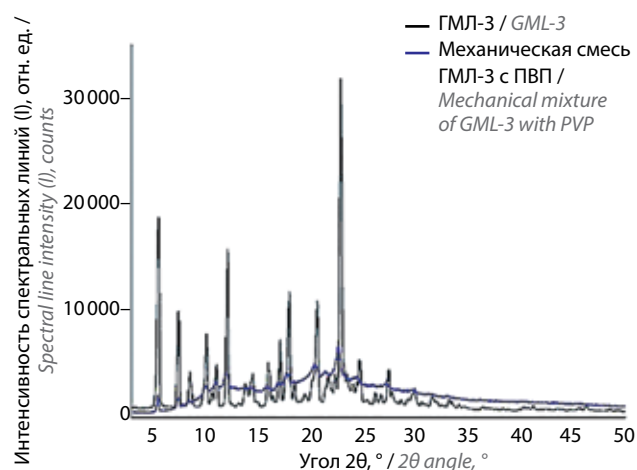


Рис. 3. Данные рентгенофазового анализа для ГМЛ-3 и механической смеси ГМЛ-3 с поливинилпирролидоном (ПВП)

Fig. 3. X-ray phase analysis data for mechanical mixture of GML-3 with polyvinylpyrrolidone (PVP)

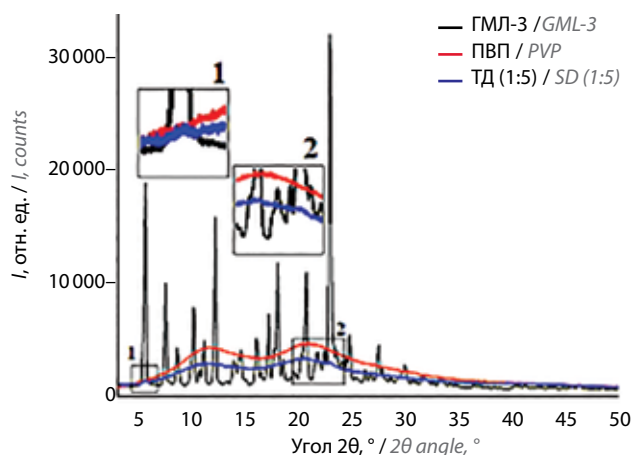


Рис. 4. Данные рентгенофазового анализа для ГМЛ-3, ПВП, твердых дисперсий (ТД) ГМЛ-3 и ПВП

Fig. 4. X-ray phase analysis data for GML-3, PVP, solid dispersions (SD) GML-3 with PVP

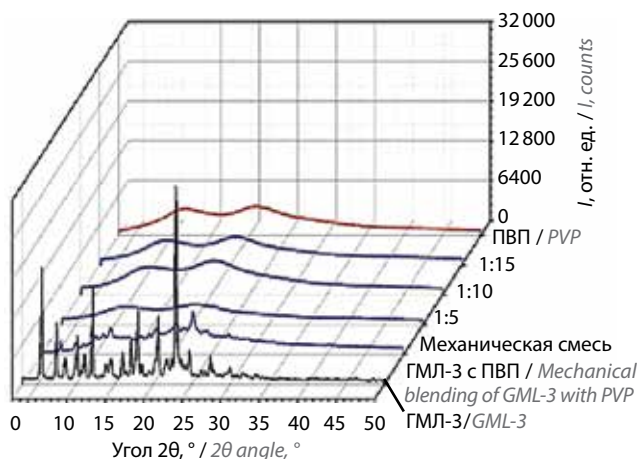


Рис. 5. Данные рентгенофазового анализа для ГМЛ-3, ПВП и ТД различной концентрации

Fig. 5. X-ray phase analysis data for GML-3, PVP, SD GML-3 with PVP at various concentrations

Другими словами, внутри образца присутствуют зоны с кристаллическим ГМЛ-3. На основании этого можно сделать вывод о том, что при соотношении ГМЛ-3 и ПВП 1:5 ГМЛ-3 находится в кристаллическом состоянии, поскольку ПВП в такой пропорции не способен ингибировать кристаллизацию в процессе сушки ТД, а при соотношениях 1:10 и более ГМЛ-3 переходит в полностью аморфное состояние (рис. 5).

При соотношении ГМЛ-3 и ПВП 1:15 наблюдали выраженное увеличение интенсивности 2-го гало, свойственного для полимера (для ПВП 2-е и 1-е гало — одинаковой интенсивности), что может свидетельствовать о слабом взаимодействии ГМЛ-3 и ПВП внутри ТД.

При многократном повторении эксперимента картина с изменением 2-го гало сохранилась, более того, наблюдали увеличение интенсивности и для соотношения компонентов 1:10. К тому же именно при таком соотношении при повторном измерении через 3 мес 2-е гало опускалось до свойственных для ПВП значений, что может свидетельствовать о нестабильности такой ТД.

Учитывая это обстоятельство, помимо обычного исследования образцов на ДСК, провели их изучение после ускоренного старения (при температуре хранения выше комнатной на 30 °С, в закрытом сосуде в течение 46 и 138,5 ч). Результаты представлены на рис. 6–8.

Непосредственно после сушки все образцы во всех исследуемых концентрациях не проявляли свойственной для кристаллов ГМЛ-3 температуры плавления.

После ускоренного старения ТД ГМЛ-3 (1:5) быстро приобрел кристалличность (рис. 6, в). Основываясь на теории Флори, можно предположить, что эндотермические процессы в ТД будут смещены (по температуре) в сторону меньших значений, т. е. от 94,01 °С в пике. Отсутствие характерного для плавления пика ГМЛ-3 обусловлено образованием ТД. Полученная ТД ведет себя на ДСК как стеклообразное вещество без признаков остаточной кристалличности. После термостатирования при температуре 55 °С в течение 46 ч произошло смещение температуры начала стеклования с 35,64 до 54,95 °С, что косвенно может свидетельствовать о появлении зон с повышенной концентрацией ПВП и ГМЛ-3 в ТД (рис. 6, б). После хранения 138,5 ч при температуре 55 °С на ДСК отчетливо наблюдается пик кристаллизации, что говорит об образовании молекулами ГМЛ-3 кристаллической решетки внутри ТД.

При соотношении 1:10 через 46 ч также произошло изменение температуры начала стеклования, однако термограмма лишена любых эндотермических скачков, свидетельствующих о плавлении, что дает основание говорить о стабильности ТД (рис. 7). Однако через 138,5 ч ТД перестала быть гомогенной, что свидетельствует об исчезновении эвтектики. Данный эффект является промежуточным перед полным возвращением ГМЛ-3 в кристаллическое состояние. При соотношении 1:15 ГМЛ-3 сохранял аморфность и проявлял достаточную стабильность (рис. 8). Таким образом, при соотношениях ГМЛ-3 и ПВП 1:5 и 1:10 достаточно быстро образуются очаги кристаллизации ГМЛ-3 или зоны повышенного содержания АФС, что позднее приводит к постепенному восстановлению кристаллической структуры ГМЛ-3. При увеличении содержания ПВП в ТД (до 1:15 и более) начало процессов, предшествующих кристаллизации АФС, не обнаружено в течение 138,5 ч ускоренного старения.

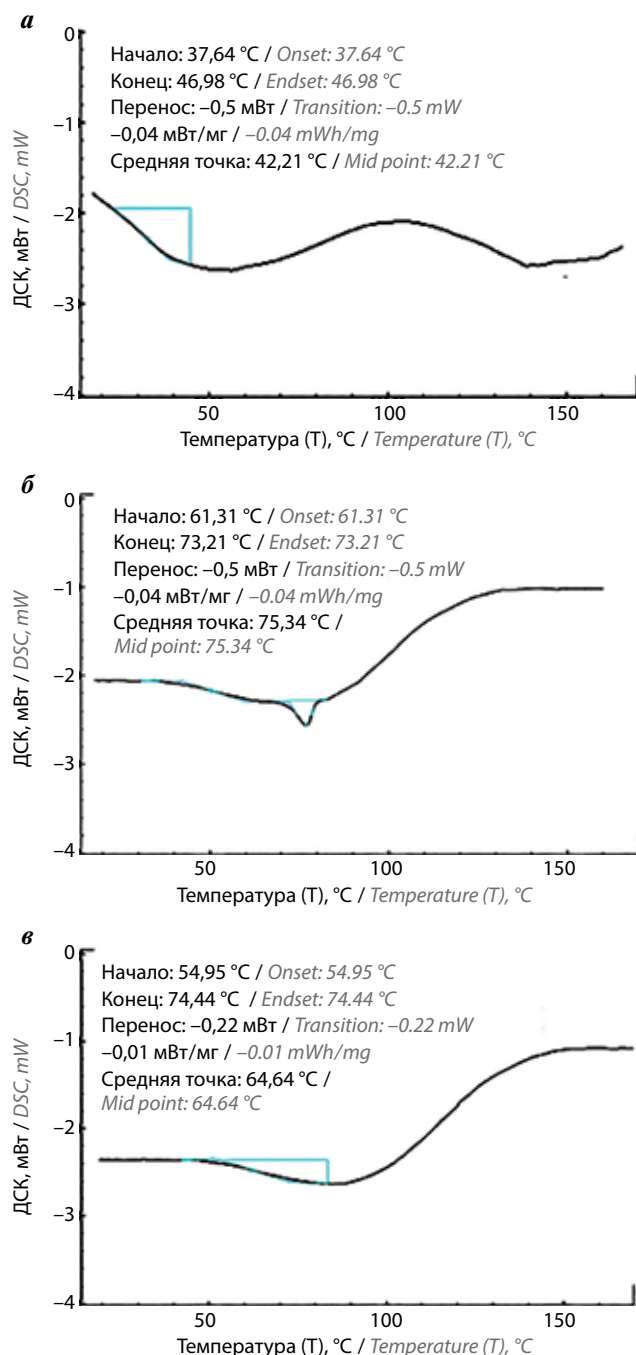


Рис. 6. Термограмма ТД ГМЛ-3 при соотношении с ГМЛ-3: полимер = 1:5 после сушки (а), через 46 (б) и 138,5 (в) ч ускоренного старения
Fig. 6. Thermogram TD GML-3 when correlated with GML-3: polymer = 1:5 after drying (a), after 46 (б) and 138.5 (в) hours of accelerated aging

Таким образом, можно говорить о стабильности полученных ТД с ПВП только при соотношении 1:15 и более.

Оценку уровня высвобождения АФС ГМЛ-3 проводили на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 256$ нм. Согласно тесту «Растворение», проведенному с ТД, наблюдается рост уровня и скорости высвобождения

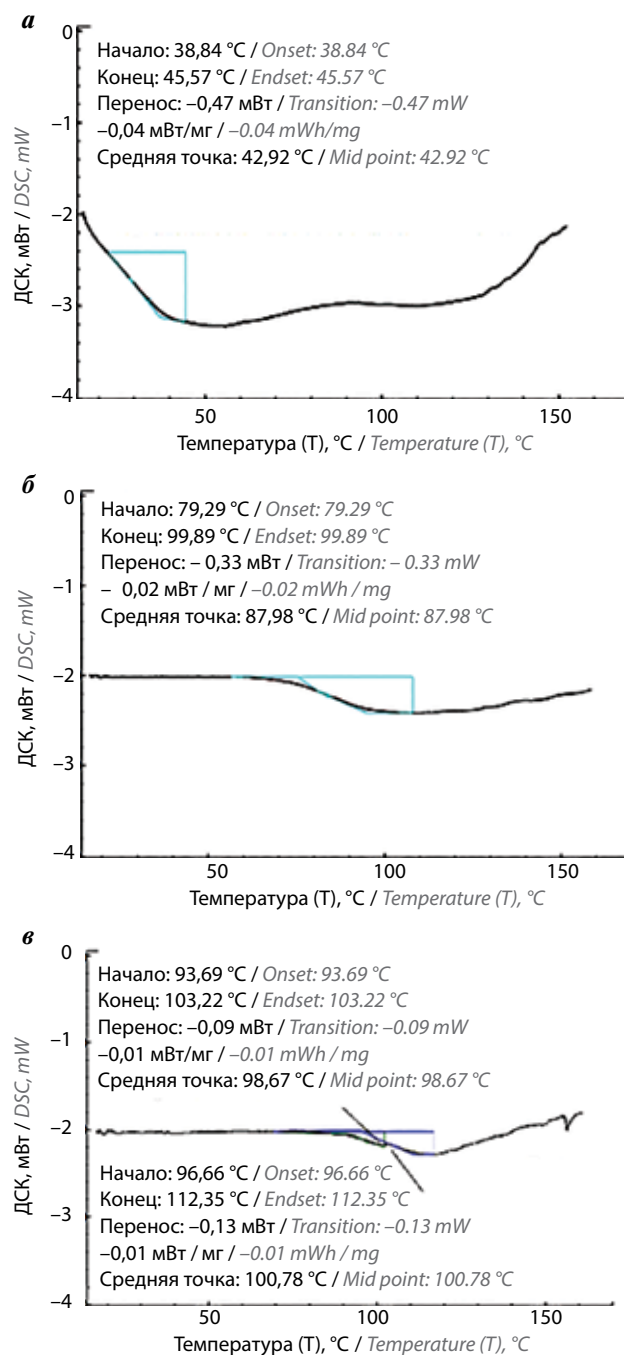


Рис. 7. Термограмма ТД ГМЛ-3 при соотношении с ГМЛ-3: полимер 1:10 после сушки (а), через 46 (б) и 138,5 (в) ч ускоренного старения
Fig. 7. Thermogram TD GML-3 when correlated with GML-3: polymer = 1:10 after drying (a), after 46 (б) and 138.5 (в) hours of accelerated aging

для ТД с ПВП по сравнению с ГМЛ-3 и механической смесью полимера с ГМЛ-3, начиная от концентрации 1:5 (рис. 9). Так, для соотношений АФС с ПВП 1:5 и 1:10 общее количество высвободившегося за 60 мин ГМЛ-3 составляло 68 и 77 % соответственно при сравнимой скорости высвобождения. При увеличении концентрации ПВП наблюдается рост высвобождения

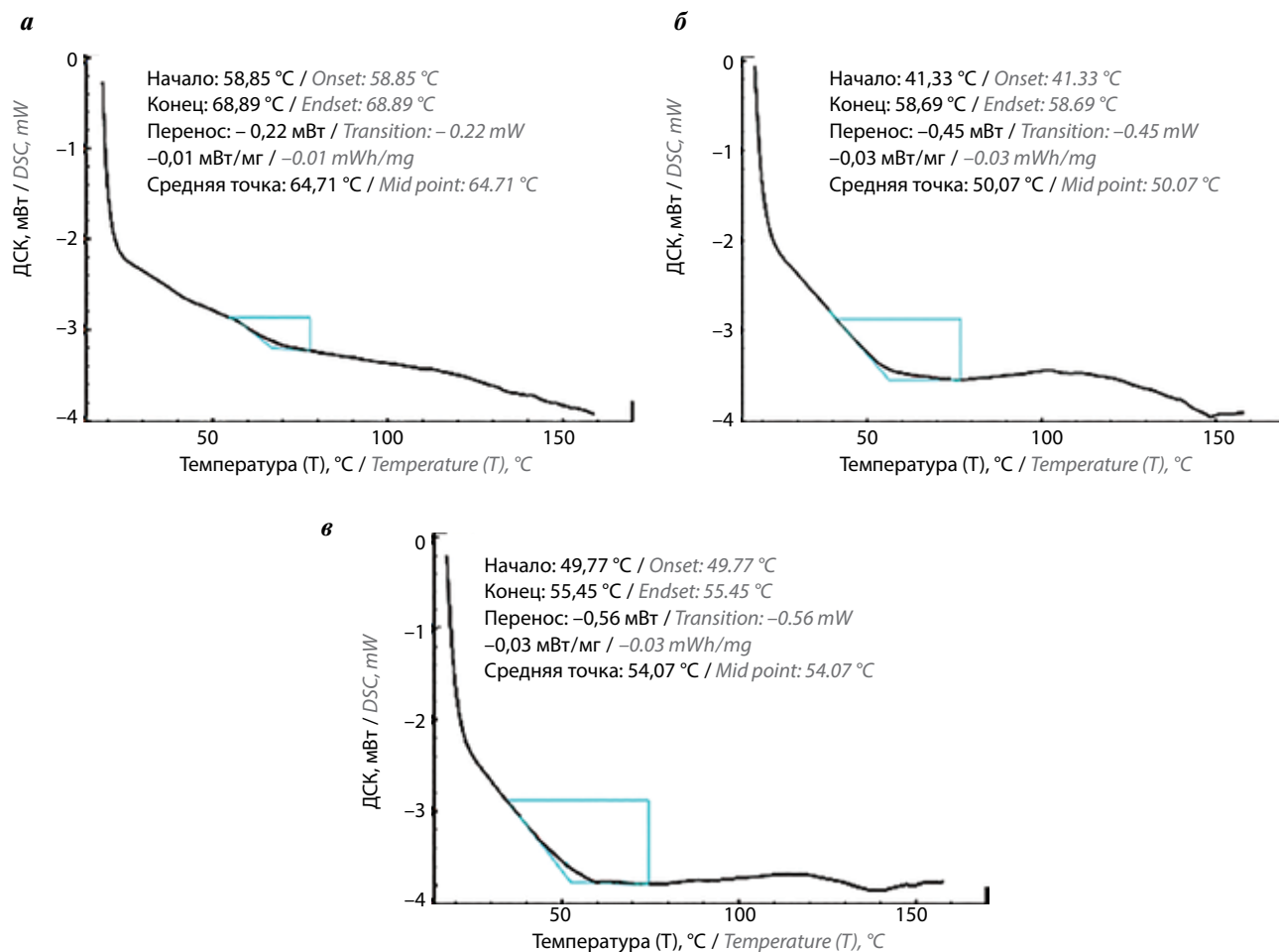


Рис. 8. Термограмма ТД ГМЛ-3 при соотношении с ГМЛ-3: полимер = 1:15 после сушки (а), через 46 (б) и 138,5 (в) ч ускоренного старения
Fig. 8. Thermogram TD GML-3 when correlated with GML-3: polymer = 1:15 after drying (a), after 46 (б) and 138.5 (в) hours of accelerated aging

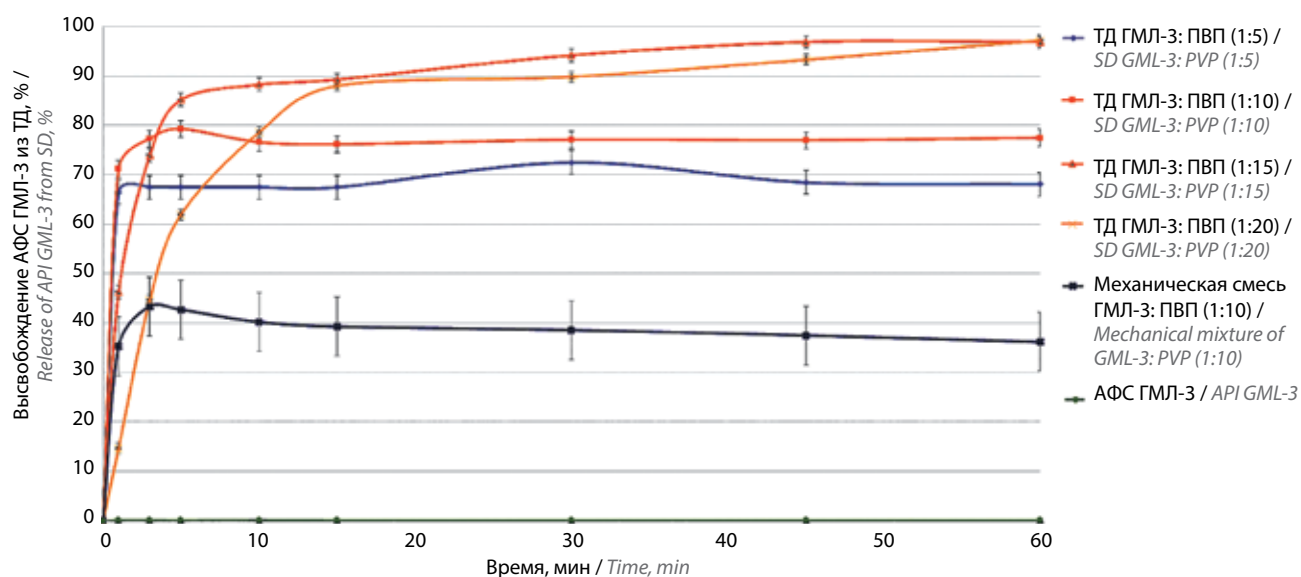


Рис. 9. Кинетика высвобождения активной фармацевтической субстанции (АФС) ГМЛ-3 из ТД в сравнении с АФС ГМЛ-3 и ее механической смесью с ПВП
Fig. 9. Kinetics of active pharmaceutical ingredient (API) GML-3 release from SD in comparison with API GML-3 and its mechanical mixture with PVP

со снижением скорости растворения. Для ТД (1:15) за 15 мин высвободилось 90 % ГМЛ-3, достигнув значения 96 % за 45 мин. Дополнительно исследованный образец с большим содержанием ПВП (1:20) не продемонстрировал увеличения общего уровня высвобождения, однако заметно снизилась скорость растворения ГМЛ-3. При повторении опыта с теми же образцами через 12 мес для ПВП наблюдали некоторое снижение уровня высвобождения для 1:5 и 1:10 (на 25–30 %), что указывает на нестабильность ТД в данных концентрациях, как ранее было продемонстрировано методом ДСК (при ускоренном старении).

Стоит отметить, что высокий уровень высвобождения ГМЛ-3 из ТД говорит о его перспективности как основы для создания пероральной лекарственной формы (таблеток, капсул), однако технология получения таблеток ГМЛ-3 на основе ТД ГМЛ-3 – ПВП требует дополнительных исследований.

Заключение

Согласно проведенному исследованию, ТД ГМЛ-3 в соотношении 1:15 к полимеру (ПВП) обладают наибольшей стабильностью (после хранения 138,5 ч при температуре 55 °С), сохраняя аморфность ГМЛ-3. Снижение концентрации полимера приводит к образованию очагов кристаллизации в течение времени ведущих к повторной кристаллизации ГМЛ-3 во время процесса отгонки растворителя (для концентрации 1:5) или быстрой потери гомогенности ввиду образования зон повышенного содержания полимера и АФС (для концентрации 1:10). Стабильные формы ТД (1:15,20) по причине своей аморфности обеспечивают высокий уровень высвобождения ГМЛ-3 в среду воды очищенной (96 %), что позволяет сделать вывод о перспективности использования ТД ГМЛ-3 при разработке лекарственных форм (таблеток и капсул).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mokrov G.V., Deeva O.A., Gudasheva T.A. et al. Design, synthesis and anxiolytic-like activity of 1-arylpyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-3-carboxamides. *Bioorg Med Chem* 2015;23(13): 3368–78. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.049
2. Yarkov S.A., Mokrov G.V., Gudasheva T.A. et al. Pharmacological study of new compounds acting as regulators of 18-kDa translocator protein ligands. *Eksp Klin Farmakol* 2016;79(1):7–11. PMID: 27159950
3. Яркова М.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Серединин С.Б. Анксиолитическое действие оригинальных производных пирроло[1,2-*a*]пиразина, лигандов TSPO, зависит от биосинтеза нейростероидов. *Химико-фармацевтический журнал* 2016;50(8):3–6. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-8-3-6 Yarkova M.A., Mokrov G.V., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Anxiolytic activity of original pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine derivatives (TSPO ligands) depends on neurosteroid biosynthesis. *Pharm Chem J* 2016;50(8):3–6. (In Russ.). DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-8-3-6
4. Davis M., Walker G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. *J Con-trolled Release* 2018;269(10):110–27. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.005
5. Khan K.U., Minhas M.U., Badshah S.F. et al. Overview of nanoparticulate strategies for solubility enhancement of poorly soluble drugs. *Life Sci* 2022;291:120301. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120301
6. Bazzo G.C., Pezzini B.R., Stulzer H.K. Eutectic mixtures as an approach to enhance solubility, dissolution rate and oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 2020;588:119741. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119741
7. Yousaf A.M., Malik U.R., Shahzad Y. et al. Silymarin-laden PVP-PEG polymeric composite for enhanced aqueous solubility and dissolution rate: Preparation and *in vitro* characterization. *J Pharm Anal* 2019;9(1):34–9. DOI: 10.1016/j.jpha.2018.09.003

Вклад авторов

В.Б. Маркеев: написание текста рукописи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

С.В. Тишков: разработка дизайна исследования;

Е.В. Блынская: анализ полученных данных;

К.В. Алексеев: написание текста рукописи.

Author's contributions

V.B. Markeev: writing the text of the manuscript, obtaining data for analysis, analysis of the data obtained;

S.V. Tishkov: research design development;

E.V. Blynskaya: analysis of the received data;

K.V. Alekseev: writing the text of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.Б. Маркеев / V.B. Markeev: <https://orcid.org/0000-0003-2930-9397>

С.В. Тишков / S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>

Е.В. Бlynская / E.V. Blynskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9494-1332>

К.В. Алексеев / K.V. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-3542-0024>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 03.10.2023. Принята в печать: 16.01.2024.

Article received: 03.10.2023. Accepted for publication: 16.01.2024.