

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung substituierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline, einer neuen Klasse von EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren.

Aufgrund der Erkenntnisse von *Albuschat*, die eine Steigerung der EGFR-TK inhibierenden Aktivitäten durch die bioisostere Umwandlung von Salicyloyl-Teilstrukturen in Chinazolingrundkörper belegen, sollte versucht werden, die von *Witzel* und *Albuschat* synthetisierten Salicyloylindole in die bioisosteren 4-(Indol-3-yl)-chinazoline umzuwandeln.

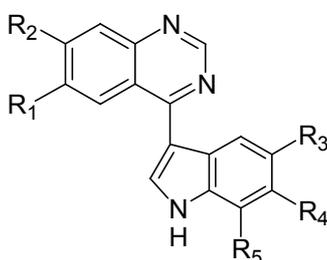


Abb. 132: Zielstruktur der 4-(Indol-3-yl)chinazoline

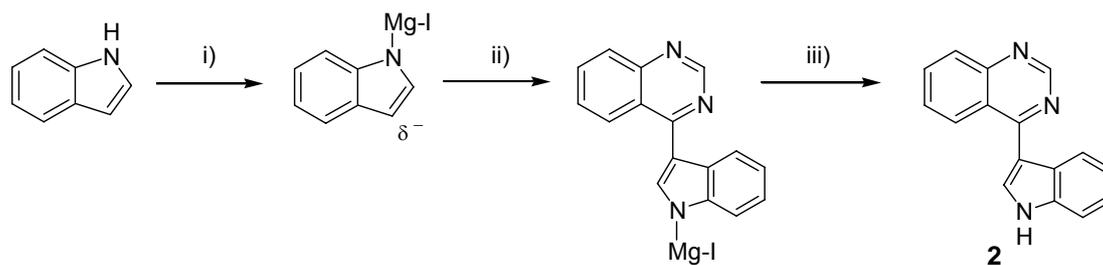
Im ersten Teil der Arbeit wurden 4-(Indol-3-yl)chinazoline mit **konstanter Chinazolin- und variabler Indolsubstitution** synthetisiert.

Dazu musste ein Hetarylierungsverfahren ausgewählt werden, durch das Chinazoline in Position 4 und halogensubstituierte Indole in Position 3 C-C-verbrückt werden können.

Bei dem zunächst angedachten Verfahren mithilfe zinnorganischer Verbindungen kann entweder der Chinazolinteil oder der Indolteil nach vorheriger Halogenierung mit Chlor oder Iod metalliert und im Anschluss daran mit dem entsprechenden Indol bzw. Chinazolin verknüpft werden. Da hier aber unterschiedlich halogenierte Indole zum Einsatz kommen sollten, war ein Erhalt des Halogenmusters nicht garantiert. Außerdem kann es zu Mehrfach-Arylierungen kommen. Daher ist diese Cross-coupling-Methode zur Hetarylierung von Chinazolinen mit halogensubstituierten Indolen ungeeignet.

Auf der Suche nach anderen Cross-coupling-Verfahren wurde ein interessanter Syntheseweg entdeckt, der Hetarylierungen mithilfe von Grignard-Verbindungen zulässt.

Dabei wird zunächst eine Indolyl-Magnesium-Verbindung hergestellt, die anschließend mit einem 4-Chlorchinazolin umgesetzt wird. Durch die nachfolgende Hydrolyse wird das Magnesiumhalogenid wieder abgespalten, sodass das gewünschte Endprodukt erhalten wird (**Abb. 133**).



i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) 4-Chlorchinazolin (1), ΔT ; iii) Wasser, RT

Abb. 133: Herstellung von Modellverbindung **2**

Nachdem dieses Cross-coupling Verfahren zur Herstellung der Modellverbindung 4-(Indol-3-yl)chinazolin (**2**) erfolgreich war, wurde geprüft, ob sich das Halogenmuster halogener Indole unter dieser Hetarylierungsreaktion beständig zeigt.

Zu diesem Zweck wurde die Verbindung **5** aus 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) und käuflich erworbenem 5-Bromindol synthetisiert (**Abb. 134**).

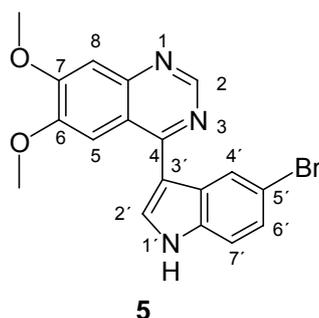
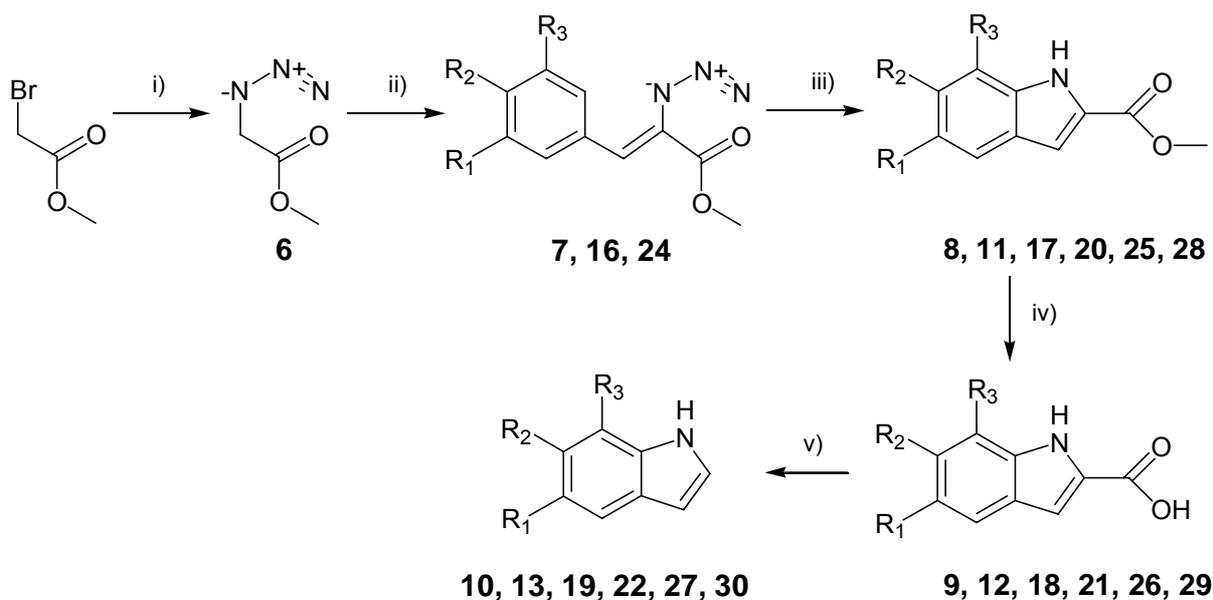


Abb. 134: 4-(5-Brom-1H-indol-3-yl)-6,7-dimethoxychinazolin (**5**)

Da die angefertigten Protonenresonanzspektren eindeutig die Struktur des Wunschproduktes **5** belegen, wurden im Folgenden die variabel substituierten Indolbausteine **10**, **13**, **19**, **22**, **27** und **30** hergestellt, die in einer Cross-coupling-Reaktion jeweils mit 4-Chlor-6,7-dimethoxychinazolin (**4**) umgesetzt wurden (**Abb. 135**).



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
7, 8, 9, 10	Cl	F	H
11, 12, 13	H	F	Cl
16, 17, 18, 19	F	Cl	H
20, 21, 22	H	Cl	F
24, 25, 26, 27	CH ₃	F	H
28, 29, 30	H	F	CH ₃

i) Natriumazid, *N,N*-Dimethylformamid, RT ; ii) Natriummethanolat, entsprechend substituierter Benzaldehyd, RT ;
 iii) Xylol, ΔT ; iv) Natronlauge, Ethanol, RT ; v) Diphenylether, ΔT

Abb. 135: Syntheseweg zur Herstellung von variabel substituierten Indolen

Dieses Verfahren startet mit Methylbromacetat, das zunächst zum Methylazidoacetat (**6**) umgesetzt wird. Die anschließende Reaktion nach Hemetsberger-Knittel vereinigt die basenkatalysierte Kondensation eines entsprechend substituierten Benzaldehyds mit Methylazidoacetat (**6**) und die nachfolgende thermische intramolekulare Cyclisierung der dabei entstehenden α,β -ungesättigten Zimtsäureester **7**, **16** und **24** zu den korrespondierenden Indol-2-carbonsäureestern **8**, **11**, **17**, **20**, **25** und **28**. Im Verlauf der Reaktion ergab sich die Schwierigkeit, dass die intramolekulare Cyclisierung der Zimtsäureester nicht regioselektiv in Position 6 des Benzenringes, sondern auch in Position 2 stattgefunden hatte (**Abb. 136**). Die dadurch entstandenen beiden Isomere ließen sich erst auf der Stufe des Indols voneinander trennen.

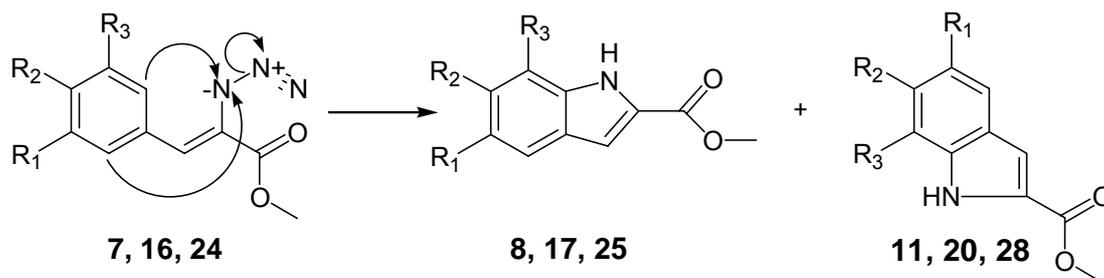
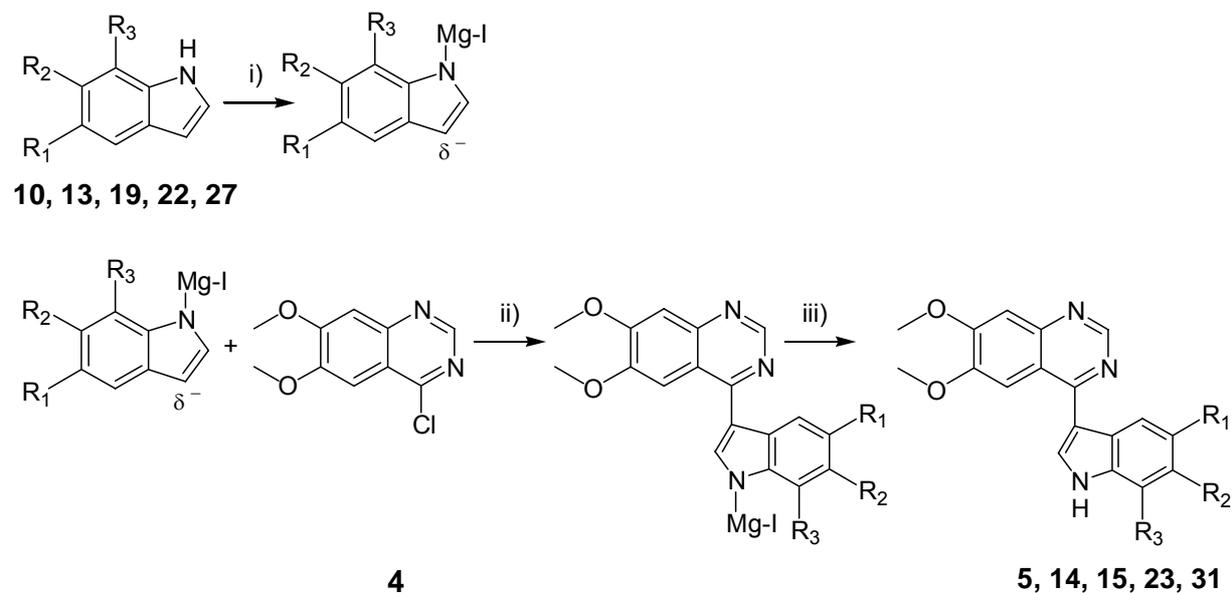


Abb. 136: Unselektive intramolekulare Cyclisierung des Azidozimsäureesters zu den Indolcarbonsäureestern

Nach der Verseifung der Ester wurden die Indolcarbonsäuren **9**, **12**, **18**, **21**, **26** und **29** zu den entsprechenden Indolen **10**, **13**, **19**, **22**, **27** und **30** decarboxyliert.

Die Hetarylierung erfolgte wiederum unter Einsatz eines Grignard-Reagenzes (**Abb. 137**).



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃
5	Br	H	H
14	Cl	F	H
15	H	F	Cl
23	F	Cl	H
31	CH ₃	F	H

i) Methylmagnesiumiodid, Diethylether, Eiskühlung; ii) Δ T; iii) Wasser, RT

Abb. 137: Cross-coupling-Reaktion zur Herstellung von 4-(Indol-3-yl)chinazolinen mit konstantem Chinazolin- und variablem Indolteil

Nach der geglückten Synthese wurden mit den Verbindungen **5**, **14**, **15**, **23** und **31** Tests auf EGFR-TK-inhibitorische Aktivitäten hin durchgeführt (**Tabelle 17**).

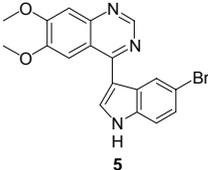
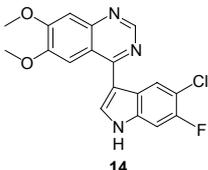
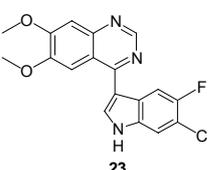
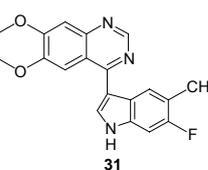
Substanz	EGFR-TK-Inhibition [%] bei einer Konzentration von 100 nM
 <p style="text-align: center;">5</p>	81
 <p style="text-align: center;">14</p>	62
 <p style="text-align: center;">15</p>	4
 <p style="text-align: center;">23</p>	14
 <p style="text-align: center;">31</p>	-9

Tabelle 17: EGFR-TK-Inhibition synthetisierter 4-(Indol-3-yl)chinazolinen mit variabler Indolsubstitution

Dabei war die Hemmung der Tyrosinkinase überraschenderweise deutlich abhängig von der Substitution des Indols. Schon kleine Abänderungen, wie z. B. der Positionstausch zweier Substituenten, führten zu großen Aktivitätsunterschieden. Im Fall der Verbindung **31** kam es sogar zu einer Stimulation der EGFR-TK.

Außerdem wurden die Zytotoxizitäten der Substanzen **5** und **14** an der MCF-7-Zelllinie überprüft. Dabei weist besonders die Verbindung **14** exzellente zytotoxische Eigenschaften auf, die die des als Vergleich getesteten Cisplatin deutlich übertreffen.

Die Verbindung **14** mit ihrer 5-Chlor-6-fluorindol-Teilstruktur weist in ihrer Gesamtheit pharmakologisch die besten Ergebnisse auf. Deswegen wurde das 5-Chlor-6-fluorindol im folgenden Teil der Arbeit als konstante Hetarylierungskomponente verwendet.

Der zweite Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von 4-(Indol-3-yl)chinazolinen, die bei **konstanter Indolsubstitution unterschiedliche Chinazolinsubstituenten** aufweisen.

Dabei wurde zunächst auf das Substitutionsmuster bekannter 4-Anilinochinazoline zurückgegriffen.

Zu diesem Zweck wurde die Verbindung **39** synthetisiert, deren Struktur sich an die des Arzneistoffes Erlotinib (Tarceva[®]) anlehnt (**Abb. 138**).

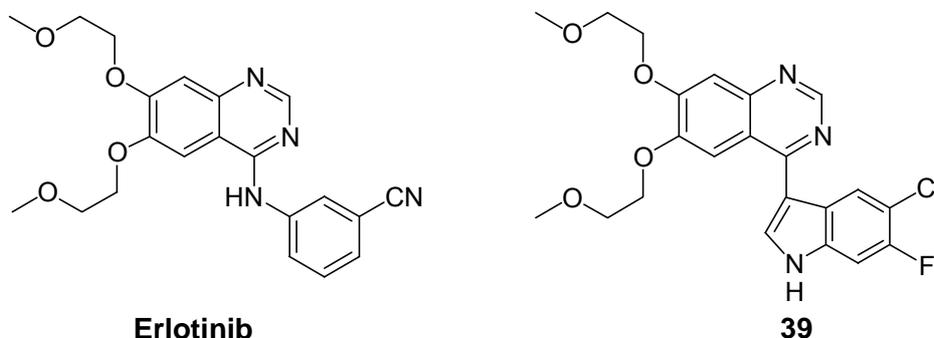
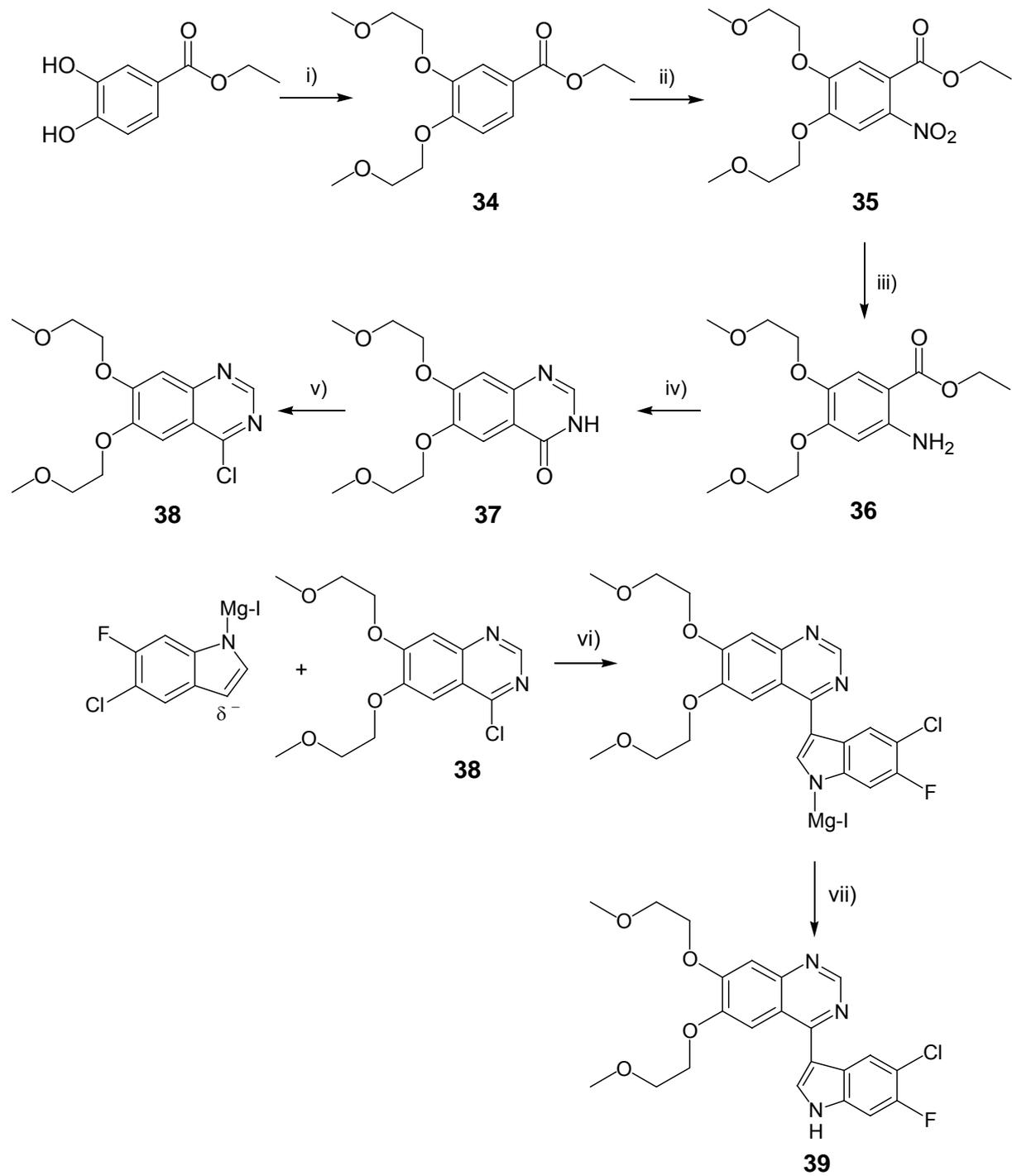


Abb. 138: Erlotinib und 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-6,7-di-(2-methoxyethoxy)chinazolin (**39**)

Auch in diesem Fall wurde die Chinazolinkomponente vor der Hetarylierung komplett aufgebaut, sodass bereits nach der Cross-coupling-Reaktion die fertige Wunschverbindung **39** isoliert werden konnte. Dieser Syntheseweg ist im Einzelnen im Formelschema in Abbildung 139 dargestellt.



i) 2-Bromethylmethylether, Kaliumcarbonat, Aceton, ΔT ; ii) Salpetersäure, Eiskühlung, iii) Palladium/Kohle 10 %, Cyclohexen, Methanol, ΔT ; iv) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT ; v) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid, ΔT ; vi) ΔT ; vii) Wasser, RT

Abb. 139: Herstellung der Verbindung 39

Nach der Isolierung der Verbindung **39** stellte sich die interessante Frage, wie sich eine veränderte Seitenkette in Position 7 des Chinazolins auf die EGFR-TK-Inhibition auswirken würde. Dazu sollte die Verbindung **47** hergestellt werden (**Abb. 140**).

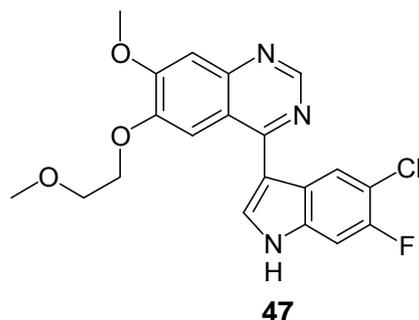


Abb. 140: 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-7-methoxy-6-(2-methoxyethoxy)chinazolin (**47**)

Eine zweite Verbindung **51**, deren Struktur sich an der des Arzneistoffes Gefitinib (Iressa[®]) orientiert, ist auf einem vergleichbaren Syntheseweg zugänglich.

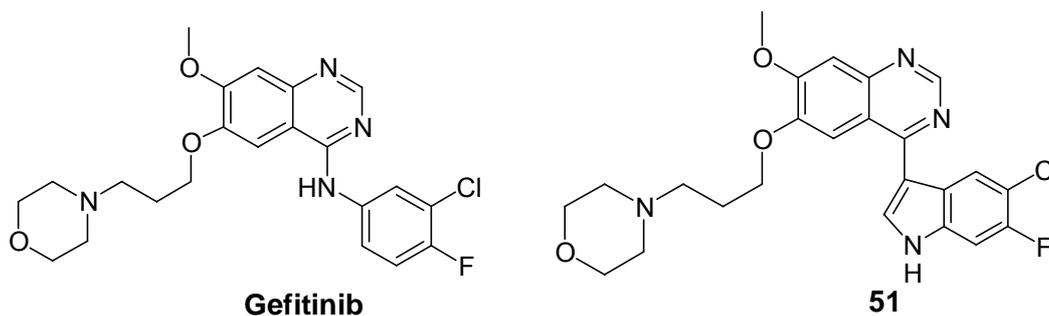
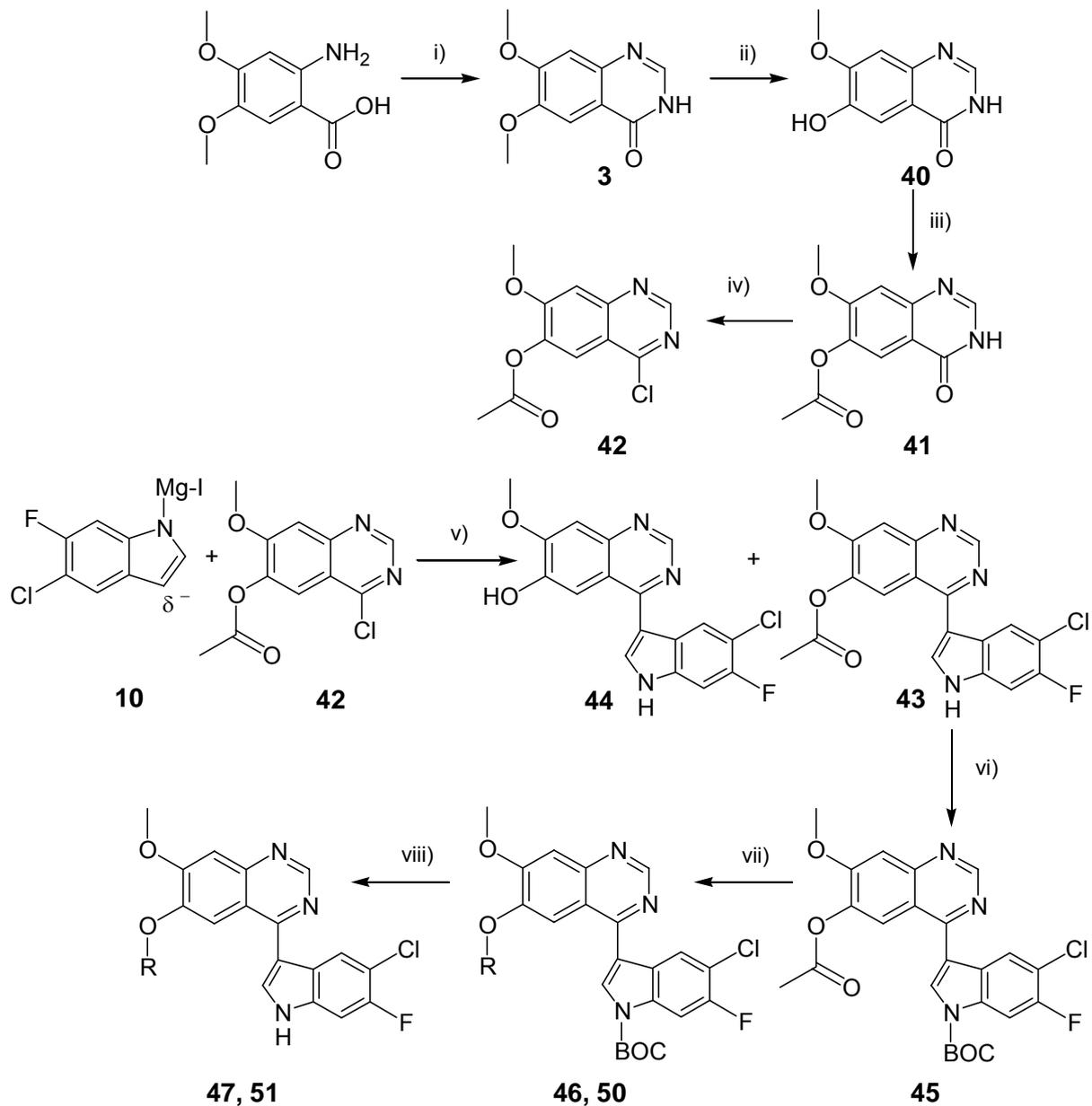


Abb. 141: Gefitinib und 4-(5-Chlor-6-fluorindol-3-yl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)chinazolin (**51**)

Im Unterschied zu den bisher synthetisierten Verbindungen konnte bei der Synthese dieser beiden Substanzen **47** und **51** die Chinazolin-Seitenkette in Position 6 erst nach der Hetarylierung auf der Stufe von **45** eingeführt werden (**Abb. 142**).



Verbindung	R
46, 47	
50, 51	

i) Formamidinacetat, 2-Methoxyethanol, ΔT ; ii) Methansulfonsäure, Methionin, ΔT ; iii) Acetanhydrid, Pyridin, ΔT ; iv) Thionylchlorid, *N,N*-Dimethylformamid, ΔT , v) ΔT ; vi) BOC, 4-Dimethylaminopyridin, Acetonitril, RT; vii) 2-Brommethylethylether (für 47) bzw. 4-(3-Chlorpropyl)morpholin (für 51), Kaliumcarbonat, 18-Krone-6, Acetonitril; viii) Ameisensäure, Triton B

Abb. 142: Herstellung der Verbindungen 47 und 51

Unter den Bedingungen der Hetarylierung entstand allerdings nicht nur die Substanz **43**, sondern zusätzlich noch die entsprechende Verbindung **44** mit einer 6-Hydroxy-7-methoxychinazolin-Teilstruktur. Nach der Separierung dieser beiden Produkte wurde mit **43** weitergearbeitet, da durch die Acetoxy-Gruppe eine zusätzliche Einführung der BOC-Schutzgruppe auch in Position 6 des Chinazolins verhindert und somit **45** selektiv erhalten wird.

Die Veretherung mit der entsprechenden Seitenkette wird unter basischen Bedingungen durchgeführt, da so der BOC-Schutz des Indol-NHs aufrechterhalten werden kann. Abschließend wird die Schutzgruppe mit Ameisensäure und Triton B abgespalten.

Der Reaktionsweg war vom Zeitpunkt der Hetarylierung an mit Schwierigkeiten behaftet. Alle Verbindungen können durch ihre Podand-artige Struktur Ionen, Moleküle und Lösungsmittel einschließen, sodass nur durch vielfältige Variationen der Standardsynthesevorschriften das analysenreine Endprodukt isoliert werden konnte. Zur abschließenden Reinigung wurde zusätzlich eine Umkristallisation aus Ethylacetat/n-Hexan vorgenommen. Mit einigen der erhaltenen Kristalle von **51** wurde eine Röntgenkristallanalyse durchgeführt, durch die der bereits angenommene Hohlraum bewiesen werden konnte. Dieser hat nicht nur, wie vermutet, eine Taschenform, sondern durch die Zusammenlagerung zweier Moleküle entsteht ein realer Hohlraum, der dafür prädestiniert ist, kleinere Ionen und Moleküle einzuschließen.

Dem Ziel dieser Arbeit entsprechend wurden auch hier die EGFR-TK-inhibitorischen Aktivitäten der 4-(Indol-3-yl)chinazoline **39**, **47** und **51** mit konstanter Indolsubstitution geprüft. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 18** dargestellt.

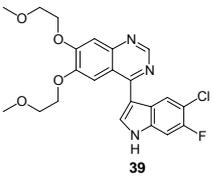
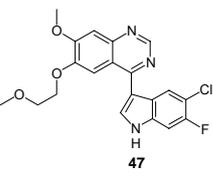
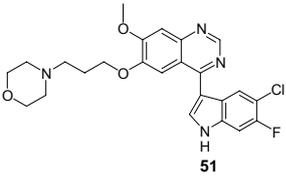
Substanz	EGFR-TK-Inhibition [%] bei einer Konzentration von 100 nM
 <p style="text-align: center;">39</p>	43
 <p style="text-align: center;">47</p>	1
 <p style="text-align: center;">51</p>	61

Tabelle 18: EGFR-TK-Inhibition synthetisierter 4-(Indol-3-yl)chinazoline **39**, **47** und **51** mit variabler Chinazolinsubstitution

Dabei weist die Verbindung **51** die stärkste EGFR-TK-Inhibition auf. Außerdem ist erkennbar, dass die Abänderung der Seitenkette der Substanz **39** in Position 7 zu **47** keinen Gewinn an inhibitorischer Aktivität liefert. Es wird im Gegenteil beobachtet, dass die Wirksamkeit der Substanz drastisch sinkt.

Bei der Überprüfung der Zytotoxizität der Substanzen **39** und **41** an der MCF-7-Zelllinie zeigte die Verbindung **51** eindeutig die besseren Ergebnisse.

Eine signifikante Eigenschaft der Substanzklasse der 4-(Indol-3-yl)chinazoline ist die starke Fluoreszenz der Verbindungen, die im ultravioletten Licht bei 254 und 366 nm auftritt und in der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung eine ähnliche Stärke wie das als Vergleich ebenfalls vermessene Chininsulfat zeigte.

Das Zusammenspiel der EGFR-Inhibition, der Zytotoxizität und der Fluoreszenz machen diese neue Substanzklasse zu einer sehr interessanten Option in der Diagnostik und der Behandlung EGFR-abhängiger Tumoren. So könnte die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von Zellpräparationen nach Substanzzugabe die Zahl der EGF-Rezeptoren *In vitro* erkennen lassen. Daraufhin könnte eine entsprechende Therapie eingeleitet werden.

Die unterschiedlich starke EGFR-TK-Inhibition der 4-(Indol-3-yl)chinazoline könnte in ihrer Rezeptoraffinität begründet sein. Für eine Bindung sind die beiden Stickstoffe des Chinazolins essenziell. Die neueren Bindungsmodelle für den EGF-Rezeptor weisen eine gewisse Flexibilität bezüglich des N3 des Chinazolins auf. Nach den Erkenntnissen von *Wood et al.* kann das N3 der 4-Anilinochinazoline mit kleinem 4-Anilino-Rest (Gefitinib, Erlotinib) über ein Wassermolekül mit der Hydroxylgruppe von Threonin 766 wechselwirken, während das N3 des Lapatinibs mit seinem voluminösen 4-Anilino-Rest über ein Wassermolekül an Threonin 830 bindet [85].

Ein interessantes Modell hat auch die Biotechnologiefirma Axxima Pharmaceuticals entwickelt. Werden die 4-(Indol-3-yl)chinazoline in das Modell eingepasst, könnte sich vom Indol-NH eine Wasserstoffbrücke zu einer Carbonylgruppe des Rezeptor-Backbones ausbilden [90]. Dafür müsste für die Substanz allerdings eine *s-cis*-Anordnung einnehmen, die aber sterisch und energetisch relativ unwahrscheinlich ist und aufgrund der Röntgenkristallanalyse von **51** nahezu ausgeschlossen werden kann (**Abb. 143**).

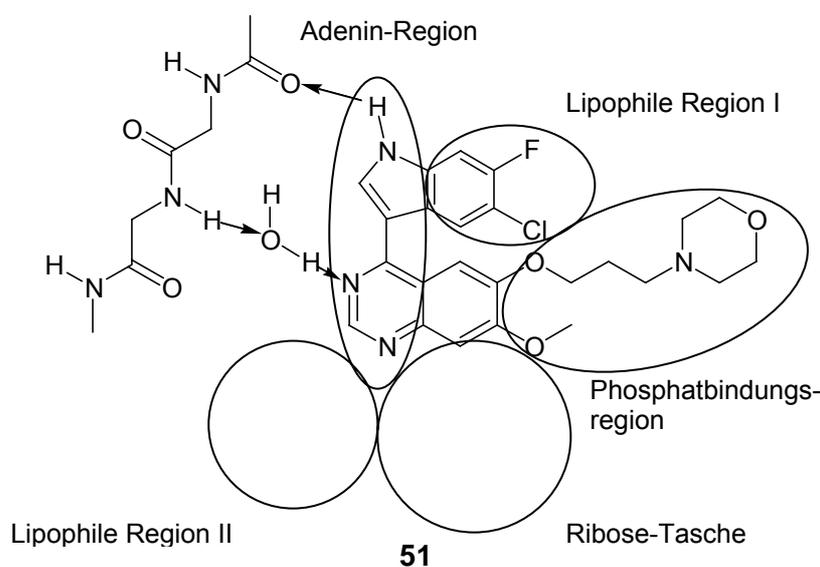


Abb. 145: Simulation für die Bindung der *s-cis* angeordneten 4-(Indol-3-yl)chinazoline an die Hinge-Region des EGFR in Anlehnung an das Bindungsmodell der Firma Axxima Pharmaceuticals

Die s-trans angeordneten 4-(Indol-3-yl)chinazoline könnten aber trotzdem in dieses Modell eingepasst werden. Dies wird durch einen Nachbau der Verbindung **51** und der Hinge-Region des Rezeptors in **Abb. 146** verdeutlicht, bei dem von einer nicht planaren Anordnung zwischen Rezeptor und Verbindung **51** ausgegangen wird.

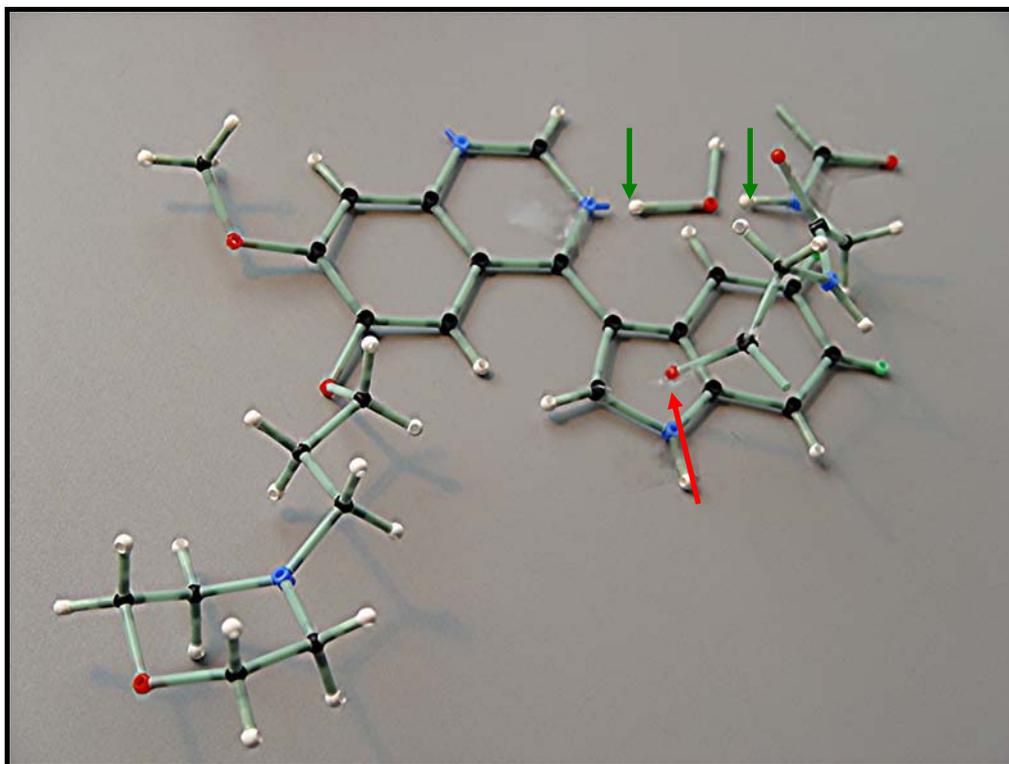


Abb. 146: Gebautes Modell zur Simulation der Bindung zwischen Verbindung **51** und dem EGFR

Hier wird ersichtlich, dass sich die Aminosäure-Kette in Form eines Bügels über die Verbindung **51** legen kann. Dabei könnte sich eine Wasserstoffbrücke vom Indol-NH zu einer Carbonylgruppe des Rezeptors, die mittig über dem Indol-Ring steht, ausbilden. Durch den Anisotropie-Effekt der Carbonylgruppe wird dieser Effekt noch verstärkt.

Damit erscheint der EGF-Rezeptor flexibler, als bisher angenommen. Durch diese Erkenntnis wären Strukturvarianten in Position 4 der Chinazoline, die unterschiedliche Wasserstoffbrücken zu Carbonylen des Peptid-backbones ausbilden können, denkbar. Damit eröffnen sich vielfältige Möglichkeiten zur Substitution in dieser Position, wodurch ganz neue Strukturen moderner und innovativer EGFR-TK-Inhibitoren möglich werden.

5.2 English summary

*For figures and schemes, please see **chapter 5.1***

The aim of this present thesis was the development of substituted 4-(indol-3-yl)quinazolines, a new class of EGFR-tyrosine-kinase-inhibitors.

The first part of this thesis deals with the preparation of 4-(indol-3-yl)quinazolines with **constant quinazoline-** and **variable indole-substitution**.

The synthesis required a hetarylation method to connect quinazolines at position 4 and halogen-substituted indoles at position 3 (**figure 132**).

Searching for cross-coupling processes, an interesting pathway was discovered, including hetarylations with help of Grignard compounds. In the main step prepared indolyl-magnesium compounds were converted with 4-chloroquinazolines to give 4-(indol-3-yl)quinazolines (**figure 133**).

After a successful production of the model 4-(indol-3-yl)quinazoline (**2**) it was proved, whether indoles with halogen substitution retain its halogen-pattern permanently under the hetarylation conditions.

Therefore compound **5** was synthesized from 4-chloro-6,7-dimethoxyquinazoline (**4**) and from commercially available 5-bromoindole (**figure 134**).

The preparation of other variable substituted indoles followed the method of Hemetsberger-Knittel, starting with methylazidoacetate (**6**) and accordingly substituted benzaldehydes to give α,β -unsaturated cinnamic acid esters. By the following thermal cyclization the corresponding indole-2-carboxylic acid esters could be isolated. After the hydrolysis of the esters, the indole-carboxylic acids were decarboxylated to give the desired indoles (**figure 135**).

The intramolecular cyclization of the cinnamic acid esters was difficult, because it had not taken place regiospecifically at position 6 of the benzene ring but also at position 2 (**figure 136**). The resulting indole isomers were separated only after decarboxylation.

In the next step the desired 4-(indol-3-yl)quinazolines were isolated by Grignard-reagent induced hetarylation (**figure 137**).

The synthesized compounds were tested for their *In-vitro* EGFR-tyrosine-kinase-inhibition and their cytotoxicity at the MCF-7-cell line. Particularly **14** shows an excellent inhibition of the EGFR-tyrosine-kinase and outstanding cytotoxic qualities (**table 17**).

Surprisingly the inhibition of the tyrosine kinase was clearly dependent from the substitution of the indole system. Already small alterations like a position-exchange of two substituents led to big inhibition differences. In the case of compound **31** a stimulation of the EGFR-TK even occurred.

Because of the excellent pharmacologically profile of **14** the indole with 5-chloro-6-fluoro-pattern (**10**) was used as constant element of hetarylations in the next part of the work.

Therefore the second section of the work describes the synthesis of 4-(indol-3-yl)quinazolines, showing **different quinazoline-** and **constant indole-substitution** pattern.

At first, compound **39** was synthesized, whose structure follows Erlotinib (Tarceva[®]) (**figure 140**). Like the preparations of **2**, **5**, **14**, **15**, **23** and **31** the quinazoline component was completely synthesized before hetarylation. In the final step the desired compound **39** was separated after the cross-coupling reaction (**figure 141**).

After the successful isolation of **39** it was proved, which effect has a changed side-chain at position 7 of the quinazolines at EGFR-TK-inhibition. Therefore compound **47** was produced (**figure 142**).

Substance **51**, whose structure is comparable with the formula of Gefitinib (Iressa[®]), is accessible by a similar pathway (**figure 143**). In difference to the until now synthesized compounds **2**, **5**, **14**, **15**, **23** and **31** the hetarylations were not the final step of the syntheses. The quinazoline side-chains at position 6 of **39** and **51** were introduced only after cross-coupling reactions (**figure 144**).

The pathways of **39** and **51** following the hetarylation reaction showed some difficulties. Because of their podand-like structures the compounds include ions, molecules and solvents. As a result a pure product can be obtained only by changing the synthesis-rules. After an additionally recrystallisation from ethylacetate/n-hexane some of the grown crystals of **51** were examined by x-ray-crystal-analysis. In this case the suspected cavity was detected.

The EGFR-TK inhibition activities of the 4-(indol-3-yl)quinazolines with constant indole substitution are represented in **table 18**. Compound **51** shows the strongest EGFR-TK-inhibition. The change of the side-chain of **39** in position 7 does not increase the inhibition activity, curiously the effectiveness of substance **47** sinks drastically.

The cytotoxic activities at the MCF-7-cell-line of compound **39** and **47** are not remarkable, but **51** demonstrates a very good cytotoxicity.

Furthermore 4-(indol-3-yl)quinazolines show strong fluorescences in the ultraviolet light of 254 and 366 nm, comparable with quinine-sulphate.

The results of the EGFR-TK-inhibition, cytotoxicity and fluorescence give this new substance-class a very interesting option in diagnostic fields and in treatment of EGFR-dependent tumors.

The reason for the differently EGFR-TK-inhibition of the 4-(indol-3-yl)quinazolines is the receptor-binding relationship. For binding, the two quinazoline nitrogens are essential. The newer binding-models for the EGF-receptor show a flexibility at the N3 of the quinazoline. After the realizations of *Wood et al.* the N3 of 4-anilinoquinazolines with a small 4-anilino-residue (Gefitinib, Erlotinib) can interact with the hydroxy-group of threonine 766 using a molecule of water. The N3 of Lapatinib with its voluminous 4-anilino-residue binds at threonine 830 in the same way [85].

An interesting model was also developed by the biotechnology-company Axxima Pharmaceuticals. If the 4-(indol-3-yl)quinazolines are fitted into this model, a hydrogen-bridge could be created from the indole-NH to a carbonyl group of the receptor-backbone [90]. Due to this model the compounds show a s-cis-arrangement, which is sterically and energetically relatively unlikely and can be excluded on the basis of the x-ray-crystal-analysis of **51** (**figure 145**). Nevertheless the s-trans configured 4-(indol-3-yl)quinazolines could be fitted into this model. This will be explained by a reproduction of compound **51** and the hinge-region of the EGF-receptor in **figure 146**, which is not planar.

Here it is recognizable that the amino acid-chain can lie down like a clip over **51**. Therefore a hydrogen-bridge could be built from the indole-NH to a carbonyl group of the receptor. By the anisotropy effect of the carbonyl group this binding is still reinforced.

The EGF-receptor appears more flexible, as assumed until now. Therefore more structure-variations in position 4 of the quinazolines are possible to yield quite new structures of modern and innovative EGFR-TK-inhibitors.

