

새로운 β -락탐계 물질의 합성 및 그 항균력

진 정 일 · 장 민 선* · 민 신 홍*

고려대학교 화학과, 동아제약주식회사 중앙 연구소*

(Received October 25, 1986)

Synthesis and Antibacterial Activities of New β -Lactam Compounds

Jung-Il Jin, Min-Sun Chang* and Shin-Hong Min*

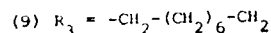
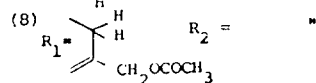
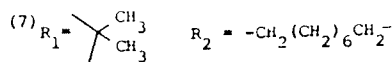
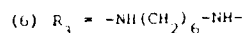
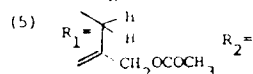
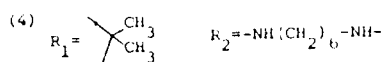
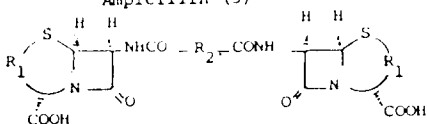
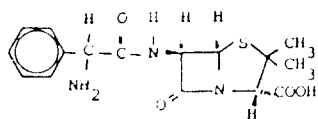
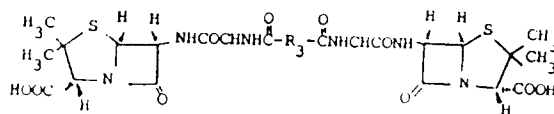
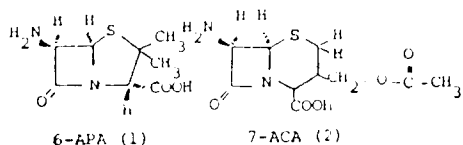
Department of Chemistry, Korea University, Seoul 132 and

*Central Research Laboratory, Dong-A Pharmaceutical Company, Seoul 131, Korea

Abstract—New antibiotics having moieties of penicillanic acid, cephalosporanic acid and ampicillin on both ends of the central polyalkylene were synthesized by reacting 6-aminopenicillanic acid (6-APA), 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) and ampicillin with hexamethylene diisocyanate and sebacyl chloride, respectively. Antibacterial activities of the compounds were also investigated.

1960년대에 들어서면서 페니실린 내성균이 급증하고 페니실린 제제의 부작용이 문제점으로 대두되면서 보다 효율적이고 안전한 새로운 β -락탐계 항생물질의 합성 및 항균력에 관한 연구가 활발히 전개 되어왔다.¹⁾ 이들에 관한 연구가 급

진전을 볼 수 있었던 것은 β -락탐계의 모핵이라 할수있는 6-aminopenicillanic acid (6-APA : 1)²⁾ 및 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA : 2)³⁾을 쉽게 얻을수 있는 방법이 발견되었기 때문이다.



현재까지 알려진 여러 모핵을 주축으로 하는 β -락탐계 항생물질 중 6-APA 및 7-ACA의 유도체의 경우는 아미노기를 아실화 시키거나 카르복실기를 에스테르화 시킨 단일체 화합물이 주종을 이루어 왔다.^{1,4,5,6)} 본 연구에서는 지속성 및 서방출 특성을 갖고 있는 항생물질의 개발에 목적을 두고 6-APA, 7-ACA 및 엠피셀린 (3) 각각을 hexamethylene diisocyanate 및 sebacoyl dichloride와 반응시켜 이들 각각의 이 합체성 화합물들(4~9)을 합성한 후 몇가지 그람양성균, 그람음성균 및 eukaryote인 *Candida albicans*에 대한 항균력을 실험했다.

실 험 방 법

기기 및 시약—IR 스펙트로포토메타는 Perkin-Elmer 599B형을 사용하였고, NMR 스펙트로메타는 TMS를 내부표준물질로 하여 Varian EM 360A(60MHz)형을 사용하였다. 합성에 사용된 hexamethylene diisocyanate, sebacoyl chloride는 미국 Aldrich사 제품을 사용했고, 출발물질인 6-APA 및 7-ACA는 각각 일본의 Meiji seika사 및 오스트리아의 Biochem사 제품을 사용했다. 무수 엠피셀린은 본 연구실에서 합성한 물질로서 영국 약전 규격에 적합한 제품을 사용했다.

그리고 미생물 감수성 테스트를 위해 Difco제품의 Müller-Hinton aga와 broth를 사용했다.

Hexane diamine 유도체 (4, 5, 6,)의 합성—6-APA, 7-ACA 및 엠피셀린과 hexamethylene diisocyanate의 반응 조건이 거의 동일 하였으므로, 여기서는 6-APA 경우를 대표적인 예로 서술하겠다.

6-APA (1) 4.33g(20m mole)을 CH_2Cl_2 90ml에 가하고 triethylamine 7.22g(71.4m mole)을 가한 후 빙냉하에서 교반, 용해시킨 뒤⁷⁾ molecular sieve, 4A. 8g을 가하여 반응물을 건조시키고 신속 여과하여 여액에 hexamethylene diisocyanate 1.65g(9.8m mole) 및 CH_2Cl_2 4ml을 혼합시킨 용액을 소량씩 가하고 4시간 동안 실온에서 반응 시켰다. 반응물을 감압, 농축시키고 증류수 60ml을 가해 미량의 불용물을 여과, 제

거 한뒤 CH_2Cl_2 로 세척하고 난 수용액을 묽은 염산으로 산성화시켜 0°C에서 30분간 교반후여과 했다. 다음에 증류수로 충분히 세척한 후 P_2O_5 상에서 건조시켜 목적하는 6-APA의 hexanediamine의 유도체 (4) 3.56g을 얻었다. (수득율 59.3%).

7-ACA(2)와 hexamethylene diisocyanate와의 반응에서 얻어진(수득율 84.2%) 생성물은 불순하였기 때문에 이를 메탄올에 분산하여 50°C로 가온후 불용물을 여과하고 여액을 냉장고에 방치시켜 순수한 7-ACA의 hexanediamine 유도체 (5)을 얻었다(수득율 61.8%).

엠피셀린(3)과의 반응에서 얻은 엠피셀린 hexanediamine 유도체(6)의 경우는 증류수로 세척하고, 최종적으로 아세톤으로 세척하여 불순물을 제거시켰다(수득율 53.1%).

Octane 유도체 (7, 8, 9)의 합성—화합물 (7, 8, 9)의 합성법은 상호 유사하므로 여기서는 6-APA (1)의 octane 유도체인 화합물(7)의 합성을 대표적인 예로 서술하겠다.

6-APA(1) 2.17g(10m mole)을 CH_2Cl_2 50ml에 분산시키고 10°C 유지하면서 triethylamine 3.6g(35.5m mole)을 가하여 용해 시키고 빙냉하에서 trimethylchlorosilane 4.03g(37.3m mole)을 서서히 가하여 실온에서 2시간 교반하였다.

반응후 반응중에 생성된 고상물질을 여과, 제거하고 여액을 0°C로 냉각시킨 뒤 imidazole 0.08g을 첨가하고¹⁰⁾ 여기에 sebacoyl chloride 1.19g(4.55m mole)을 CH_2Cl_2 5ml에 용해시킨 용액을 소량씩 첨가한 후 2.5시간 동안 교반하였다. 불용물을 걸러 제거한 후 여액을 감압농축시키고 잔 증류수 200ml를 천천히 가한 다음 진한 염산으로 반응액을 산성화시키고 30분간 교반한 후 여과했다. 다음에 증류수와 아세톤으로 각각 세척한 후 P_2O_5 상에서 건조시켜서 미황색의 목적물인 6-APA의 octane 유도체 (7)을 얻었다(수득율 58%). 7-ACA(2)와 sebacoyl chloride와의 반응에서 얻어진 생성물은 불순하였기 때문에 이를 dimethylformamide에 분산시켜 50°C로 가온 한뒤 불용물을 신속히 여과하고 여액을 0°C로 냉각시킨뒤 증류수를 가하고 trieth-

ylamine으로 반응액의 pH를 4.5 부근으로 조절해서 얻은 결정을 여과하여 증류수에 분산시키고 나서 50°C로 가열한 뒤 다시 0°C로 냉각하여 석출한 결정을 모아 증류수로 충분히 세척하고 P₂O₅ 상에서 건조시켜 미황색의 목적물인 7-ACA의 octane 유도체 (8)을 얻었다(수득율 52.1%). 엠피셀린 (3)과의 반응에서 얻은 생성물 역시 불순 하였기 때문에 이를 증류수에 분산시키고 20% NaOH용액으로 혼합물을 염기성화 시킨 뒤 0°C에서 30분간 교반하여 잔존한 불용물을 여과 제거하여 얻은 여액을 CH₂Cl₂ 20ml로 세척하고 유기층을 버린뒤 3N-염산으로 반응액을 산성화시켜 0°C에서 30분간 교반했다.

생성한 결정체를 모아 증류수로 충분히 세척한 뒤 P₂O₅상에서 충분히 건조시켜 미황색의 목적물인 엠피셀린의 옥탄유도체 (9)를 얻었다(수득율 54.0%).

항균력 실험—새로 합성한 화합물 (4~9)에 대한 미생물의 감수성을 알아보기 위해 6-APA (1), 7-ACA (2) 및 엠피셀린 (3)을 대조군으로 하여 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* (이상 그람양성균), *Alkaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (이상 그람음성균), *Candida albicans* (eukaryote) 등의 미생물을 사용하였다. 이들을 배양시키기 위한 배지로서 Müller-Hinton broth와 Müller-Hinton agar를 사용했다.¹³⁾ pH 7.5인 0.5M 인산염 완충액¹²⁾을 사용하여 화합물 (1~9)의 함량이 각각 100µg/ml되게 조절한 완충용액 100ml씩을 준비하였다. Müller-Hinton agar 용액을 cap 튜브에 8ml씩 주입한 후 121°C에서 30분간 멸균시켜 이 용액을 100 mm 페트리 접시에 깔아서 냉각시켰다. 완전 냉각 후 이 agar plate에 앞서 열거한 각 미생물을 접종하여 single colony를 분리해낸 후 여기서 1개 내지 2개의 colony를 이용하여 5ml Müller-Hinton broth에 접종한 다음 37°C에서 12시간 배양시켰다. 다음에 배양액 0.5ml와 50°C의 agar 사용액 8ml를 Vortex 믹서를 이용하여 완전히 섞은 후 이미 Müller-Hinton agar에 깔려있는 페트리 접시에 고르게 부어 넣었다. 10분간 건조시킨 뒤 위에서 만든 각 화합물의 시료 2.5µg을 함유

하는 용액 25ml을 6.5mm 크기의 디스크 위에 떨어뜨린 후 멸균핀셋을 이용하여 이들 디스크를 agar 위에 올려놓고 24시간 후 저지환의 직경을 측정하였다.¹³⁾

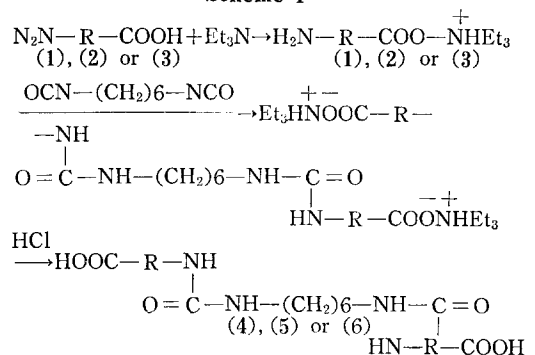
실험결과 및 고찰

합성 및 구조 확인—본 연구에서는 6-APA (1), 7-ACA (2) 및 엠피셀린 (3)의 아미노기를 diisocyanate나 diacid dichloride와 반응시켜 생성물을 얻는 것이 목적이었으므로 각각의 카르복실기는 triethylamine과 우선 반응시켜 염으로 만들거나 또는 trimethyl chlorosilane과 반응 11켜 실릴화한 후 원화는 반응을 시도하였다.¹⁴⁾ 합성된 화합물은 박층 크로마토그래피¹⁵⁾, 원소분석, IR 스펙트럼 및 H-NMR 스펙트럼에 의해 구조를 확인하였다.

6-APA, 7-ACA 및 엠피셀린과 hexamethylene diisocyanate와의 반응—화합물 (4), (5) 및 (6)의 합성—6-APA (1), 7-ACA (2) 및 엠피셀린 (3)의 카르복실기를 보호하고 동시에 용매로도 사용할 수 있는 triethylamine을 반응 매체로 사용하였다. 부반응을 최소화하기 위해 hexamethylene diisocyanate를 CH₂Cl₂ 용해 시킨 뒤 서서히 이것을 반응액에 가하였다. 반응후 염산으로 반응혼합물을 산성화시켜 목적하는 화합물 (4) (4) 및 (6)을 얻었다. 전체적 반응경로는 Scheme 1에서 보여주고 있는데 여기서 R은 6-APA (1), 7-APA (2) 및 엠피셀린 (3)에서 아미노기와 카르복실기를 제외한 모핵을 나타낸다.

이들 합성한 화합물 (4), (5) 및 (6)의 박층

Scheme 1



크로마토그래피의 Rf치, 원소분석치 및 스펙트럼 데이터는 다음과 같다.

N, N'-Bis-(6'-penicillanocarhamoyl)-1, 6-hexane diamine(4).

Rf : 0.44(출발 물질(1)의 Rf는 0.34)

전개 용매(부피비)—물 : n-부틸알콜 : 포름산 = 1 : 3 : 1

계산치 : C, 47.99; H, 6.04; N, 14.0

분석치 : C, 47.6; H, 6.12; N, 13.6

IR(KBr) : 3,300cm⁻¹(—C N—), 2,700~2,800cm⁻¹(—CH₃, —CH₂—)

1,780~1,760cm⁻¹ (β-락탐의 >C=O 및

—C N—), 1,610cm⁻¹(—C O—) ¹H-NMR (DMSO-δ₆+D₂₀) : δ_{1.3-1.8}(m, 20H, >C(CH₃)₂—CH₂)₄—) δ_{3.1-3.3} (S, 4H, —(CH₂)₄—CH₂—CH₂), δ_{3.8}(S, 2H, 3-CH), δ_{5.1-5.8}(m, 4H, β-락탐의 —CH—CH—)

N, N'-Bis-(7'-cephalosporanocarbamoyl)-1, 6-hexanediamine(5)

Rf : 0.56(출발 물질(2)의 Rf는 0.47)

전개 용매(부피비)—물 : n-부틸알콜 : 빙초산 = 1 : 3 : 1

계산치 : C, 47.18; H, 5.09; N, 11.99

분석치 : C, 47.3; H, 4.8; N, 11.3

IR(KBr) : 3,300cm⁻¹(—C N—), 2,900~2,800cm⁻¹(—CH₂—), 1,770cm⁻¹ (β-락탐의

>C=O), 1,740~1,710cm⁻¹(O C CH₃,

—C N—), 1,620cm⁻¹(—C O—).

¹H-NMR(DMSO-δc+D₂₀) : δ_{1.2~1.6}(S, 8H,

(—CH₂)₄—), δ_{2.1}(S, 6H, —OCCH₃),

δ_{2.9~3.2}(m, 4H—NH—CH₂—)

δ_{3.5~3.8} (S, 4H, | CH₂O—), δ_{4.8~4.9}

(d, 4H, >C(CH₃)₂—), δ_{5.2~5.8} (m, 4H,

β-락탐의 —CH—CH—)

재결정 용매 : CH₃OH

N, N-Bis-[(phenyl-6'-penicillanocarbamoyl) methanecarbamoyl] 1, 6-hexanediamine(6)

Rf : 0.74(출발 물질(3)의 Rf는 0.63)

전개 용매(부피비)—물 : n-부틸알콜 :

빙초산=1 : 3 : 1

계산치 : C, 55.42; H, 5.8; N, 12.93,

분석치 : C, 55.1; H, 6.0; N, 12.65

IR(KBr) : 3,300cm⁻¹(—C N—), 3,020cm⁻¹ (방향족 —C O—), 2,900~2,800cm⁻¹ (—CH₃, —CH₂—), 1,770cm⁻¹

(β-락탐의 >C=O) 1,650cm⁻¹(—C N),

1,610cm⁻¹(—C O—), 700cm⁻¹(방향족 —C C—)

¹H-NMR (DMSO-δ₆+D₂₀) :

δ_{1.0~1.8}(m, 20H, >C(CH₃)₂—, (—CH₂)₄—)

δ_{2.8~3.3}(d, 6H, 3-CH, —NH—CH₂—),

δ_{5.2~5.7}(m, OH, 2-CH, β-락탐의

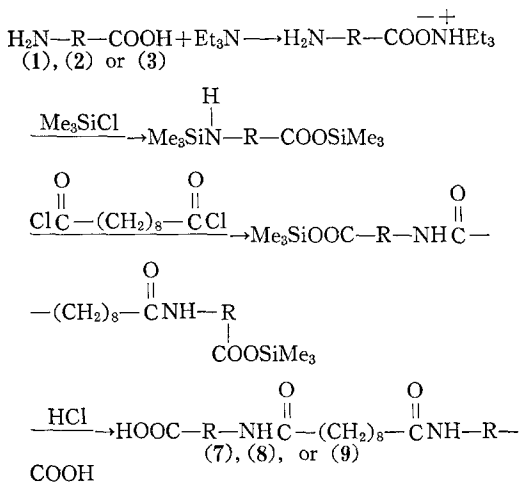
—CH—CH—), δ_{7.2~7.6}(m, 10H, | —)

6-APA, 7-ACA 및 앰피실린과 sebacyl chloride와의 반응—화합물(7), (8) 및 (9)의 합성—6-APA(1), 7-ACA(2) 및 앰피실린(3)의 카르복실기를 트리메틸실릴기로 보호한 후 아미노기를 선택적으로 sebacyl chloride와 반응시켰다. 이때 이미다졸을 아실화 반응의 촉매로 사용했다. 반응 후 묽은 염산으로 처리하여 보호기를 제거함과 동시에 pH을 조절하여 목적하는

생성물 (7), (8) 및 (9)를 얻었다.

전체 반응 경로는 Scheme 2와 같은 데 여기서도 R은 6-APA(1), 7-ACA(2) 및 엠피셀린(3)에서 아미노기와 카르복실기를 제외한 모핵을 나타낸다.

Scheme 2



이 들 합성한 화합물 (7), (8) 및 (9)의 박층 크로마토그래피의 R_f치, 원소 분석치 및 스펙트럼 데이터는 다음과 같다.

1, 8-Bis-(6'-penicillanocarbamoyl)octane (7)

R_f : 0.51(출발물질 (1)의 R_f는 0.34)

전개 용매(부피비)—물 : n-부틸알콜 :

포름산=1 : 3 : 1

계산치 : C, 52.16; H, 6.39; N, 9.36

분석치 : C, 51.8; H, 6.6; N, 9.06

IR(KBr) : 3, 200cm⁻¹($\overset{\text{OH}}{\parallel} \text{C N}$),
2, 900~2, 800cm⁻¹(—CH₃, —CH₂),
1, 790cm⁻¹ (β-락탐의 >C=O),

1, 770cm⁻¹ ($\overset{\text{OH}}{\parallel} \text{C N}$ —),

1, 610cm⁻¹ (—C—O—),

¹H-NMR(DMSO-δ₆+D₂₀) : δ1.2~2.3

(m, 28H, $\begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$, —(CH₂)₈)δ4.2

(S, 2H, 3-CH), δ4.6~5.5

(m, 4H, β-락탐의 $\begin{matrix} -\text{CH}-\text{CH}- \\ | \quad | \end{matrix}$),

1, 8-Bis-(7'-cephalosporanocarbamoyl)octane(8)

R_f : 0.60(출발 물질 (2)의 R_f는 0.47)

전개 용매(부피비)—물 : n-부틸알콜 : 빙초

산=1 : 3 : 1

계산치 : C, 50.7; H, 5.38; N, 7.88

분석치 : C, 50.3; H, 5.9; N, 7.4

IR(KBr) : 3, 300cm⁻¹($\overset{\text{OH}}{\parallel} \text{C N}$ —),
2, 900~2, 800cm⁻¹(—CH₂—),
1, 780cm⁻¹ (β-락탐의 >C=O),

1, 750cm⁻¹($\overset{\text{OH}}{\parallel} \text{C N}$ —),

1, 710cm⁻¹(—O— $\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}$ —CH₃),

1, 600cm⁻¹(—C—O—)

¹H-NMR (DMSO-δ₆+D₂₀) :

δ1.2~2.5 (m, 22H, —(CH₂)₈—,

—O— $\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C}$ —CH₃), δ3.7(S, 4H, $\begin{matrix} \text{CH}_2-\text{O}- \\ | \end{matrix}$),

δ4.7 (d, 4H, $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \end{matrix}$)

δ4.8~5.8(m, 4H, β-락탐의 $\begin{matrix} -\text{CH}-\text{CH}- \\ | \quad | \end{matrix}$),

재결정 용매 : DMF

1, 8-Bis-[(phenyl-6'-penicillanocarbamoyl) methane carbamoyl] octane(9)

R_f : 0.83(출발물질 (3)의 R_f는 0.63)

전개 용매(부피비)—물 : n-부틸알콜 : 빙초

산=1 : 3 : 1

계산치 : C, 58.32; H, 6.05; N, 9.72

분석치 : C, 58.1; H, 6.1; N, 9.34

IR(KBr) : 3, 300cm⁻¹($\overset{\text{OH}}{\parallel} \text{C N}$ —),

3, 010cm⁻¹(방향족—C—C—)

2,900~2,800cm⁻¹ (CH₃, CH₂-),

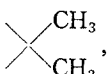
1,775cm⁻¹ (β-락탐의 >C=O),

1,710cm⁻¹ (—C(=O)N—),

1,640cm⁻¹ (—C(=O)—),

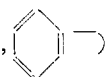
700cm⁻¹ (방향족—C—C—)

¹H-NMR (DMSO-δ₆+D₂₀) :

δ1.1~2.4(m, 28H, )

—(CH₂)₈—, δ5.3~5.8(m, 6H, 2-CH,

β-락탐의 —CH—CH—)

δ7.2~7.6(m, 10H, )

화합물의 항균력—항균력 실험에서 서술된 방법에 의거 행한 항균력 실험결과를 Table I에 요약하였다. 표에서 알 수 있듯이 출발 물질인 6-APA(1) 및 7-ACA(2) 그 자체는 항균성이 거의 없으며 앰피실린(3)의 경우는 일부 그람 양성균 및 eukaryote에 우수한 항균력을 보여주고 있다. 본 연구에서 합성한 화합물(4)는 출

Table I—Antibacterial activities of the compounds.*

Classification	Microorganism	Compounds								
		(1)	(2)	** (3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
Gram(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	‡	—	‡	—	+	—	‡
Gram(+)	<i>Bacillus subtilis</i>	—	—	—	—	+	—	—	—	—
Gram(+)	<i>Sarcina lutea</i>	+	—	‡	—	‡	+	‡	‡	‡
Gram(-)	<i>Alkaligenes faecalis</i>	—	—	—	—	—	—	—	‡	‡
Gram(-)	<i>Pseudomonas</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	‡
Eukaryote	<i>Candida albicans</i>	—	—	‡	—	—	‡	—	‡	‡

* inhibition zone; — : ≈zero, + : <12mm, ‡ : ≈12~20mm, ‡ : ≈20~30mm, ‡ : >30mm.

** Potency of ampicillin anhydrous (purity : 99.0%) was 990mcg/mg.

발물질인 6-APA(1) 처럼 아무런 항균성을 보여 주지 않았으나, 화합물(5)는 출발물질인 7-ACA(2)와는 달리 일부 그람 양성균에 항균력을 나타 내었고, 특히 화합물(8)은 출발물질(2)와는 대조적으로 일부 그람 양성균 및 음성균과 Eukaryote에 비교적 양호한 항균력을 보여주었다. 이 항균력 실험에서 가장 주목해야 될 결과는 앰피실린의 유도체(6)과(9)에서 관찰되었다. 앰피실린과 hexamethylene diisocyanate을 반응시켜 합성한 화합물(6)은 앰피실린의 항균력을 오히려 일부 상실했으나 sebacyl chloride와의 반응 생성물(9)은 그람 양성균 및 eukaryote에 대한 항균력을 그대로 유지하면서 그람 음성균에 대해서는 우수한 항균력을 보여 주어 광범위 항균제도로서의 가능성에 대한 더 많은 연구를 필요로 하고 있어 본 연구실에서는 이 점을 계속

추구하고 있다.

문 헌

- 1) Elko, J.: "Recent Advances in the Chemistry of β-Lactam Antibiotics," The chemical Society, London, pp.20 (1971).
- 2) Lednicer, D. and Mitscher L.A.: "The Organic Chemistry of Drug Synthesis," Wiley-Interscience Pub., N.Y., pp.408-420 (1977).
- 3) Flynn, E.H.: "Cephalosporins and Penicillins," Acad. Press., N.Y., pp.28 (1972).
- 4) Newton, G.G.F. and Abraham, E.P.: *Biochem, J.* 58, 103 (1954).
- 5) Sammes, P.G.: "Topics in Antibiotics Chemistry, Vol. 4," Elis Horwood Limited, pp.13-99 (1980).
- 6) Mitsuhashi, S.: "Beta-lactam Antibiotics," Scient-

- ific Societies Press, Tokyo, pp. 83-163 (1981).
- 7) Bodanszy, M., Klausner Y.S. and Ondetti, M.A.: "Peptide Synthesis," Wiley-Interscience Pub., N.Y., pp. 50 (1976).
 - 8) Ferres, H., Basker, M.J. and O'Hanlon, P.J.: *J. Antibiotics*, **27**, 922 (1974).
 - 9) British Patent 1,483,416 (Jan., 18, 1975).
 - 10) Japan Patent 79-1411 (Jan., 5, 1979).
 - 11) Wolf, Lassel and Shimoda,: "Clinical Microbiology and Micology," John Wiley, N.Y., Section II, pp.187, (1975).
 - 12) 대한약전 (제 3 개정), 대한약사회편 p.1011 (1976)
 - 13) Lorian, V.: "Antibiotics in Laboratory Medicine," Williams and Wilking, Baltimore, pp.24-54 (1980).
 - 14) Bodanszky, M., Klausner, Y.S. and Ondetti, M.A.: "Peptide Synthesis," Wiley-Interscience Pub., N.R., pp.15 (1976).
 - 15) Stahl, E.: "Thin-layer chromatography," Springer-Verley, N.Y., pp.566-577 (1969).