

• 实验研究 •

## 在体单向肠灌注模型研究帕拉米韦拟肽类衍生物的大鼠小肠吸收特性

孙勇兵<sup>1</sup>, 涂亮星<sup>1</sup>, 甘薇<sup>1</sup>, 金一<sup>1</sup>, 胡律江<sup>2\*</sup>

1. 江西中医药大学 中药制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医药大学附属中医院, 江西 南昌 330004

**摘要:** **目的** 研究帕拉米韦及其拟肽类衍生物的大鼠小肠吸收机制, 筛选出膜渗透性最大的衍生物。**方法** 采用大鼠在体单向灌注法研究帕拉米韦拟肽类衍生物的小肠吸收, 采用高效液相色谱法测定药物和酚红的浓度。建立  $\lg D$  预测值和  $\lg P$  之间的关系。**结果** 帕拉米韦拟肽类衍生物的膜渗透系数都比帕拉米韦高, 其中帕拉米韦 *L*-异亮氨酸衍生物具有最高的膜渗透性; 寡肽转运蛋白 (PEPT1) 典型底物甘氨酸肌氨酸能显著降低帕拉米韦拟肽类衍生物的小肠吸收, 而 *L*-缬氨酸不具有这种能力。**结论** 帕拉米韦拟肽类衍生物是 PEPT1 的底物, 它们在大鼠小肠内的吸收是 PEPT1 介导的主动转运过程。

**关键词:** 帕拉米韦; 拟肽类衍生物; 在体单向灌注, 寡肽转运蛋白

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)11-2763-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.11.001

## Intestinal absorption characteristics of amino acid derivatives of peramivir in rats *in vivo* by single pass perfusion model

SUN Yong-bing<sup>1</sup>, TU Liang-xing<sup>1</sup>, GAN wei<sup>1</sup>, JIN Yi<sup>1</sup>, HU LÜ-jiang<sup>2</sup>

1. National Engineering Research Center for Solid Preparation Technology of Chinese Medicines, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicines, Nanchang 330006, China

2. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicines, Nanchang 330004, China

**Abstract: Objective** To study intestinal absorption mechanism in rats of amino acid derivatives of peramivir, and to screen the lead compound with the highest permeability. **Methods** Single pass perfusion model was applied to study the absorption of these derivatives in the absence or presence of PEPT1 inhibitors; and concentrations of these derivatives and phenol red were determined by HPLC method. The correlation between  $\lg D$  and  $\lg P$  was also constructed. **Results** Amino acid derivatives of peramivir had higher permeability than peramivir, and peramivir-*L*-Ile had the highest permeability. The absorption of all derivatives could be inhibited by Gly-sar, a typical substrates of PEPT1, not by *L*-valine. **Conclusion** Amino acid derivatives of peramivir are the substrates of PEPT1, and their permeation across the intestinal epithelium is a PEPT1-mediated process.

**Key words:** peramivir; amino acid derivative; single pass perfusion; PEPT1

口服给药简单方便, 患者的顺应性高, 是药物最常用的给药方式, 在美国和欧洲市场上最受欢迎的前 50 种药品中口服制剂占 84%<sup>[1]</sup>。帕拉米韦是由美国 BioCryst 制药公司开发的治疗禽流感的药物, 它和奥司他韦、扎那米韦一起, 是高致病性禽流感预防和治疗的一线药物<sup>[2-3]</sup>。由于帕拉米韦分子结构

中含有胍基和羧基, 分子的极性很大, 口服生物利用度仅 4%, 临床上只能以注射的方式给药, 这大大降低了患者使用帕拉米韦的顺应性<sup>[4-5]</sup>, 同时提高了患者的使用成本, 因此开发帕拉米韦口服给药形式具有非常重要的临床意义。

寡肽转运蛋白 (PEPT1) 是一类表达在人和哺

收稿日期: 2018-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360485, 81560577)

作者简介: 孙勇兵 (1980—), 男, 安徽池州人, 副教授, 博士, 主要从事药剂学的研究。E-mail: yongbing\_sun@hotmail.com

\*通信作者 胡律江 (1986—), 男, 江西南昌人, 副教授, 博士, 主要从事中药制剂的研究。E-mail: hulvjiangmail@hotmail.com

乳动物小肠上皮细胞刷状缘侧的主动转运蛋白，能介导二肽、三肽和一些拟肽类药物的口服吸收<sup>[6-7]</sup>。PEPT1 广泛的底物专属性和较大的转运能力使得以 PEPT1 为靶点来提高一些难吸收药物的口服生物利用度成为一种非常有效的策略<sup>[8-9]</sup>，最经典的例子就是伐昔洛韦<sup>[10-11]</sup>。

为了提高帕拉米韦的口服生物利用度和开发帕拉米韦的口服给药形式，本课题在前期研究中以 PEPT1 为靶点对帕拉米韦的羧基进行改造，设计和合成了 6 个帕拉米韦的氨基酸衍生物 *L*-异亮氨酰帕拉米韦、*D*-亮氨酰帕拉米韦、*L*-亮氨酰帕拉米韦、*D*-苯丙氨酰帕拉米韦、*L*-苯丙氨酰帕拉米韦和 *L*-缬氨酰帕拉米韦。为了筛选出具有最大小肠膜渗透性的帕拉米韦衍生物，探索衍生物和 PEPT1 之间的相互作用，本文以大鼠在体单向灌流为模型，在加入和不加入 PEPT1 抑制剂的情况下，研究了帕拉米韦及其衍生物的小肠吸收机制，同时利用 SYBYL 软件预测帕拉米韦系列衍生物 *lgD* 值，通过 *lgD* 和空

肠膜渗透率 (*lgP*) 之间是否存在线性关系，进一步研究帕拉米韦衍生物的小肠吸收机制。

### 1 仪器和材料

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪，SPD-M20A DAD 检测器，SIL-20A 自动进样器，LabSolution 色谱工作站（日本岛津公司）；HL-2 恒流泵（上海精科实业有限公司）。

帕拉米韦（湖北信康医药化工有限公司），*L*-缬氨酸（上海吉尔生化有限公司），酚红（上海恒远生物科技有限公司），甘氨酰肌氨酸（Gly-sar, Sigma 公司），甲醇和乙腈（Thermo fisher 公司），其他试剂均为分析纯或色谱纯。帕拉米韦系列衍生物包括 *L*-异亮氨酰帕拉米韦、*D*-亮氨酰帕拉米韦、*L*-亮氨酰帕拉米韦、*D*-苯丙氨酰帕拉米韦、*L*-苯丙氨酰帕拉米韦和 *L*-缬氨酰帕拉米韦，见图 1，由中药固体制剂制造技术国家工程研究中心合成，所有化合物的结构经过质谱和核磁确证，与目标结构一致，质量分数均大于 98.0%。

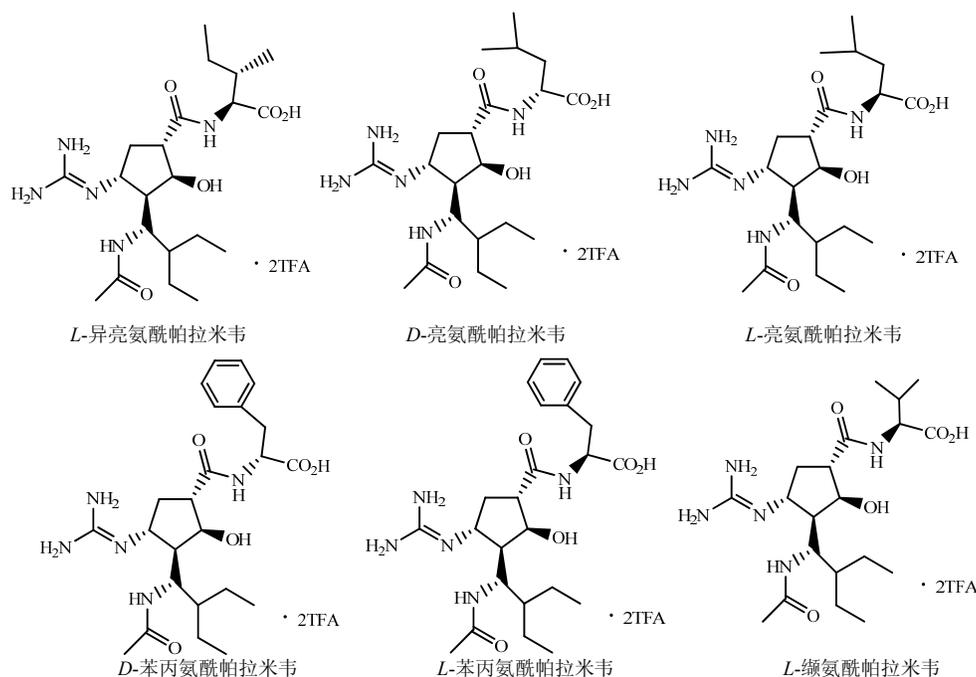


图 1 帕拉米韦拟肽类衍生物的结构

Fig. 1 Structures of amino acid derivatives of peramivir

Kreb-Ringer's 液 (K-R 液) 配制：氯化镁 0.02 g，氯化钠 7.80 g，氯化钾 0.35 g，碳酸氢钠 1.37 g，磷酸二氢钠 0.32 g，葡萄糖 1.40 g，加水至 1 000 mL，调 pH 值至 5.5。

SD 大鼠，雄性，体质量 (200±20) g，许可

证号 SCXK (湘) 2016-0002，湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

### 2 方法和结果

#### 2.1 帕拉米韦及其衍生物的 HPLC 测定方法

2.1.1 色谱条件 Welch ODS C<sub>18</sub> 色谱柱 (250

mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水(含0.1%冰醋酸)-乙腈, 梯度洗脱: 3%~50%乙腈(0~5.0 min), 50%~3%乙腈(5.0~7.5 min), 3%乙腈(7.5~10.0 min); 检测波长: 210 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

**2.1.2 标准曲线的制备** 用空白 K-R 液分别制备 5 μmol/L 帕拉米韦及其衍生物溶液, 利用 K-R 液稀释成 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、2.0 μmol/L 帕拉米韦及

其衍生物溶液, 进样测定。以峰面积对浓度进行线性回归, 见表 1。结果表明, 在 0.1~2.0 μmol/L 时帕拉米韦及其衍生物峰面积与浓度线性关系良好。

**2.1.3 专属性试验** 利用空白 K-R 液分别制备 0.5 μmol/L 帕拉米韦及其衍生物溶液, 分别进样空白 K-R 液和 0.5 μmol/L 帕拉米韦及其衍生物溶液, 见图 2。可见 K-R 液中的成分不影响帕拉米韦及其衍生物的检测。

表 1 帕拉米韦及其衍生物的标准曲线方程

Table 1 Linear equations of peramivir and its derivatives

化合物	标准曲线	r	线性范围/(μmol·L <sup>-1</sup> )
帕拉米韦	$Y=3.232 \times 10^6 X+4.12 \times 10^4$	0.999 1	0.1~2.0
L-异亮氨酰帕拉米韦	$Y=4.245 \times 10^6 X+3.89 \times 10^4$	0.999 2	0.1~2.0
D-亮氨酰帕拉米韦	$Y=2.356 \times 10^6 X+3.21 \times 10^4$	0.999 7	0.1~2.0
L-亮氨酰帕拉米韦	$Y=5.781 \times 10^6 X+1.34 \times 10^4$	0.999 3	0.1~2.0
D-苯丙氨酰帕拉米韦	$Y=4.542 \times 10^6 X+1.67 \times 10^4$	0.999 5	0.1~2.0
L-苯丙氨酰帕拉米韦	$Y=3.997 \times 10^6 X+9.45 \times 10^4$	0.999 0	0.1~2.0
L-缬氨酰帕拉米韦	$Y=5.012 \times 10^6 X+8.04 \times 10^4$	0.999 2	0.1~2.0

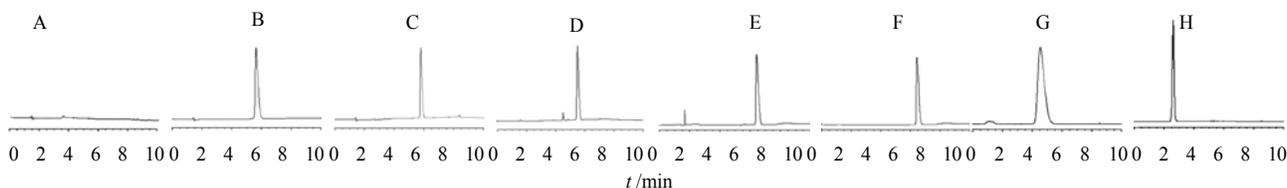


图 2 空白样品(A)、L-异亮氨酰帕拉米韦(B)、D-亮氨酰帕拉米韦(C)、L-亮氨酰帕拉米韦(D)、D-苯丙氨酰帕拉米韦(E)、L-苯丙氨酰帕拉米韦(F)、L-缬氨酰帕拉米韦(G)和帕拉米韦(H)的HPLC图谱

Fig.1 HPLC chromatograms of blank sample (A), peramivir-L-Ile (B), peramivir-D-Ile (C), peramivir-L-Leu (D), peramivir-D-Phe (E), peramivir-L-Phe (F), peramivir-L-Val (G), and peramivir (E)

**2.1.4 精密度和准确度试验** 取 0.2、0.8、2.0 μmol/L 帕拉米韦及其系列衍生物溶液, 分别进样 10 μL, 记录色谱图, 连续测定 3 d。以标准溶液作为对照, 考察精密度和准确度, 见表 2。结果表明, 精密度试验 RSD 值在 1.4%~2.1%, 准确度试验的 RSD 值在-1.4%~1.5%。

**2.2 酚红的 HPLC 测定方法**

**2.2.1 色谱条件** Welch ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.4%磷酸水溶液-乙腈(70:30); 检测波长: 280 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

**2.2.2 专属性试验** 利用空白 K-R 液制备酚红质量浓度是 20 μg/mL 的空白灌流液, 分别进样空白 K-R 液和含有酚红的空白灌流液, 见图 3。K-R 液中的

成分不影响酚红的测定。

表 2 准确度和精密度试验结果

Table 2 Results of accuracy and precision test

化合物	RSD 值/%	
	精密度试验	准确度试验
帕拉米韦	1.4	1.4
L-异亮氨酰帕拉米韦	1.8	1.5
D-亮氨酰帕拉米韦	1.7	-0.5
L-亮氨酰帕拉米韦	2.0	-0.9
D-苯丙氨酰帕拉米韦	2.1	0.7
L-苯丙氨酰帕拉米韦	1.5	0.8
L-缬氨酰帕拉米韦	1.9	-1.4

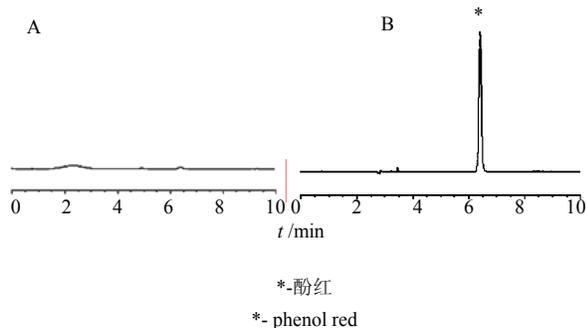


图3 空白溶液(A)和含有酚红的空白灌流液(B)的HPLC图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of blank solution (A) and blank perfusion fluid containing phenol red (B)

**2.2.3 标准曲线的制备** 用空白 K-R 液 40  $\mu\text{g/mL}$  的酚红储备溶液, 利用 K-R 液稀释成 2.0、8.0、12.0、16.0、20.0、25.0、32.0  $\mu\text{g/mL}$  系列酚红溶液, 分别进样测定。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得酚红的标准曲线  $Y=9.563 \times 10^6 X+0.43 \times 10^5$ ,  $r=0.9994$ 。结果表明, 在 2.0~32.0  $\mu\text{g/mL}$  酚红具有很好的线性关系。

**2.2.4 精密度和准确度试验** 取 8.0、16.0、32.0  $\mu\text{g/mL}$  酚红溶液, 分别进样 10  $\mu\text{L}$ , 连续测定 3d, 记录色谱图, 以标准溶液作为对照, 考察精密度和准确度。结果表明, 精密度在 1.7~2.9%, 准确度在 -1.2%~2.2%。

### 2.3 大鼠在体单向灌流实验

**2.3.1 供试品溶液的配制** 精密称取酚红 20 mg, 置 1 000 mL 量瓶中, 加入 K-R 液溶解, 并加至刻度, 配制成 20  $\mu\text{g/mL}$  的酚红空白灌流液。取 2.43 mg/mL 帕拉米韦水溶液 1 mL, 置 200 mL 量瓶中, 用 K-R 液溶解, 并加至刻度, 得 0.05  $\mu\text{mol/L}$  帕拉米韦溶液。分别取 6 个帕拉米韦衍生物适量, 用 K-R 液溶解, 并加至刻度, 制备 0.05  $\mu\text{mol/L}$  帕拉米韦衍生物溶液。

**2.3.2 稳定性试验** 取帕拉米韦和衍生物适量, 分别用空白灌流液制备成 250 mL 的溶液, 浓度均为 0.05  $\mu\text{mol/L}$ , 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中, 分别于 0、1、2、3、4、5 h 取样, 用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过, 取续滤液, 测定溶液中药物的浓度。结果表明, 5 h 内帕拉米韦及其系列衍生物的浓度没有发生明显变化。帕拉米韦浓度的 RSD 值为 0.95%, 不同系列衍生物浓度的 RSD 值在 0.78%~1.03%, 因此帕拉米韦及其衍生物在灌流液中 5 h 内是稳定的。

**2.3.3 吸附试验** 用蒸馏水分别配制 100  $\mu\text{g/mL}$  帕拉米韦和系列衍生物的溶液, 加入灌流实验用的插管, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中, 分别于 0、15、30、60、90、120 min 取样, 测定溶液中药物的浓度, 考察灌流过程中插管对药物的吸附作用。结果表明, 2 h 内帕拉米韦及其系列衍生物的浓度没有变化。帕拉米韦及其系列衍生物的浓度的 RSD 值在 1.14%~1.33%, 说明管路对药物没有吸附作用。

**2.3.4 灌流试验** 将实验前禁食 20 h 的大鼠称定质量后, ip 20%乌拉坦溶液 10 mL/kg, 将麻醉后的大鼠固定在手术台板上, 沿腹中线切开腹部约 3 cm, 取 10 cm 空肠, 在两端剪切后插管, 结扎, 将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿, 于红外灯下保温, 先用 30~40 mL、37  $^{\circ}\text{C}$  的生理盐水清洗空肠, 将小肠内容物充分洗净后, 换成 37  $^{\circ}\text{C}$  的 K-R 溶液冲洗 20 min, 再以空气排出 K-R 液。将 37  $^{\circ}\text{C}$  的灌流液以 0.2 mL/min 的速度灌流, 大约 30 min 后达到稳态, 开始搜集 30~45、45~60、60~75、75~90 min 时间段内的灌流样品, 测定样品中的酚红和药物的浓度。在帕拉米韦衍生物的灌流液加入甘氨酸肌氨酸 (Gly-sar) 和 L-缬氨酸作为抑制剂, 两者的浓度都是 10 mmol/L, 利用吸收抑制实验考察不同抑制剂对帕拉米韦衍生物的吸收抑制作用。在实验过程中, 空肠不但摄取药物, 而且还会吸收水分, 因此在处理数据的时候需要关注水分的吸收情况。稳态时净水透过量 (net water flux, NMF) 可以使用公式 (1) 计算, 单向灌流达到稳定时, 药物的小肠膜渗透系数 ( $P_{\text{eff}}$ ) 用公式 (2) 计算。

$$\text{NMF} = Q[1 - \text{Ph.red (out)} / \text{Ph.red (in)}] / l \quad (1)$$

$$P_{\text{eff}} = Q (C_{\text{in}} / C_{\text{out}} - 1) / 2\pi r l \quad (2)$$

$Q$ : 灌流速度,  $C_{\text{in}}$ 、 $C_{\text{out}}$  分别是进口和出口的浓度, 其中  $C_{\text{out}}$  是根据净水流量调整后的值;  $r$ 、 $l$  表示回肠的半径、长度; Ph.red (in) 和 Ph.red (out) 表示灌流液中酚红的进口和出口浓度。

在不加入和加入抑制剂的情况下, 帕拉米韦及其系列衍生物在大鼠空肠的膜渗透系数见表 3。可以看出, 6 个帕拉米韦衍生物的小肠膜渗透系数都比帕拉米韦高, 其中 L-异亮氨酸帕拉米韦是最高的。Gly-sar 是 PEPT1 的典型底物, Gly-sar 能够显著降低帕拉米韦衍生物的膜渗透系数, 说明 Gly-sar 与帕拉米韦衍生物竞争性结合 PEPT1, 因此, 帕拉米韦衍生物是在 PEPT1 的介导下被小肠上皮细胞吸收的。由于 L-缬氨酸不是 PEPT1 的底物, 它的加

表3 帕拉米韦及其衍生物在大鼠空肠的膜渗透系数 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Membrane permeability coefficient of peramivir and its derivatives in jejunum of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

化合物	$P_{eff}(\times 10^{-5} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$		
	不加入抑制剂	加入 L-valine	加入 Gly-sar
帕拉米韦	1.4 ± 0.38	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.2
L-异亮氨酰帕拉米韦	8.4 ± 2.4	8.6 ± 2.8	4.5 ± 1.1*
D-亮氨酰帕拉米韦	4.4 ± 3.1	4.7 ± 2.9	2.4 ± 0.7*
L-亮氨酰帕拉米韦	5.2 ± 1.7	4.8 ± 1.4	3.4 ± 1.2*
D-苯丙氨酰帕拉米韦	3.1 ± 0.9	3.4 ± 1.3	1.1 ± 0.6*
L-苯丙氨酰帕拉米韦	4.2 ± 1.2	4.6 ± 1.6	2.2 ± 0.9*
L-缬氨酰帕拉米韦	7.3 ± 2.2	6.9 ± 2.6	3.7 ± 1.3*

与不加入抑制剂组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs not add inhibitors group

入对衍生物的膜渗透系数没有影响, 这进一步说明了帕拉米韦衍生物是 PEPT1 的底物。

#### 2.4 帕拉米韦氨基酸衍生物的 lgD 预测值

SYBYL 软件能够结合计算化学和分子模拟的环境, 提供分子结构和性质的基量, 特别是新的化学实体的性质。本实验利用 SYBYL 软件对帕拉米韦氨基酸衍生物的 lgD 值进行预测, 将此数值和空肠膜渗透率 (lgP) 进行线性拟合, 判断 lgD 与 lgP 之间是否存在一定的相关性。结果见表 4。

表4 利用 SYBYL 软件预测的帕拉米韦系列衍生物 lgD 值  
Table 4 LgD value of peramivir derivatives predicted by SYBYL software

化合物	lgD	lgP
L-异亮氨酰帕拉米韦	0.049	0.92
D-亮氨酰帕拉米韦	0.049	0.64
L-亮氨酰帕拉米韦	0.049	0.72
D-苯丙氨酰帕拉米韦	0.450	0.49
L-苯丙氨酰帕拉米韦	0.450	0.62
L-缬氨酰帕拉米韦	-0.040	0.86

可以看出, 帕拉米韦衍生物的 lgD 和 lgP 之间没有相关性。且结构相近的衍生物之间的膜渗透性之间相差很大, 因此衍生物的油水分分配系数 lgD 不是决定膜渗透性的因素, 帕拉米韦衍生物的小肠吸收是一个主动转运的过程, 这与灌流实验中加入吸收抑制剂的结果是一致的。

### 3 讨论

在体单向灌流法能保证肠道神经和内分泌输入的完好无损, 同时也保证了血液和淋巴的正常供应,

是一个非常好的模拟药物吸收的模型, 因此本研究选择了在体单向灌流模型考察衍生物的吸收情况。

从实验结果来看, 帕拉米韦 L-异亮氨酸衍生物和 L-缬氨酸衍生物具有最好的膜渗透性, 可能会最大程度地提高帕拉米韦的口服生物利用度。抑制实验表明, 帕拉米韦衍生物可能是 PEPT1 的底物。在后续的研究中, 本课题组会考察大鼠灌胃 L-异亮氨酸衍生物和 L-缬氨酸衍生物后帕拉米韦的生物利用度, 验证前体药物设计的合理性。

#### 参考文献

- [1] 何仲贵, 钟大放. 药物生物利用度 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 134-147.
- [2] Babu Y S, Chand P, Bantia S, et al. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(19): 3482-3486.
- [3] Mc Mahon A, Martin-Loeches I. The pharmacological management of severe influenza infection - 'existing and emerging therapies' [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2017, 10(1): 81-95.
- [4] Barroso L, Treanor J, Gubareva L, et al. Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment [J]. *Antivir Ther*, 2005, 10(8): 901-910.
- [5] Gubareva L V, Kaiser L, Hayden F G. Influenza virvs neuramindas einhibitors [J]. *Lancet*, 2000, 355 (9206): 827-835.
- [6] Liang R, Fei Y J, Prasad P D, et al. Human intestinal

- H<sup>+</sup>/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(12): 6456-6463.
- [7] Sai Y, Tsuji A. Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches [J]. *Drug Discov Today*, 2004, 9(16): 712-20.
- [8] Tao W H, Zhao D Y, Sun M C, *et al*. Intestinal absorption and activation of decitabine amino acid ester prodrugs mediated by peptide transporter PEPT1 and enterocyte enzymes [J]. *Int J Pharm*, 2018, 541(1-2): 64-71.
- [9] Incecayir T, Sun J, Tsume Y, *et al*. Carrier-mediated prodrug uptake to improve the oral bioavailability of polar drugs: an application to an oseltamivir analogue [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2): 925-934.
- [10] Balimane P V, Tamai I, Guo A, *et al*. Direct evidence for peptide transporter (PepT1)-mediated uptake of a nonpeptide prodrug, valacyclovir [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250(2): 246-251.
- [11] Epling D, Hu Y, Smith D E. Evaluating the intestinal and oral absorption of the prodrug valacyclovir in wildtype and huPepT1 transgenic mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 155: 1-7.