

TRH의 대량합성 제조법 개발

김동현 · 프리탐다빠 · 라다갈끼 · 장영동 · 이웅석*

영남대학교 약학대학

(Received October 12, 2007; Revised November 6, 2007)

Process Development for Large Scale Synthesis of TRH

Dong Hyeon Kim, Pritam Thapa, Radha Karki, Yurndong Jahng and Eung-Seok Lee*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract — TRH (thyrotropin-releasing hormone) was chemically synthesized utilizing solution phase peptide chemistry for the process development of large scaled synthesis. All the synthetic steps performed in relatively mild conditions, higher yields, easier preparations, minimum racemizations, and separation and purification by recrystallizations.

Keywords □ TRH (thyrotropin-releasing hormone), process development, peptide synthesis

목 부위에 자리잡은 갑상선(thyroid gland)은 우리 몸의 성장과 대사활동에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 갑상선자극호르몬(thyroid stimulating hormone; TSH)에 의하여 갑상선호르몬을 방출한다. 갑상선자극호르몬은 시상하부(hypothalamus)에서 만들어지는 펩티드 성분의 신경호르몬인 갑상선자극호르몬방출호르몬(thyrotropin-releasing hormone; TRH)의 자극을 받아서 분비된다. 주요 성분이 당단백질(glycoprotein)로 이루어진 갑상선자극호르몬은 뇌하수체전엽(anterior pituitary)에서 분비되며, 갑상선에 작용하여 갑상선호르몬의 생성과 분비를 유도하며 갑상선 여포(follicle)를 둘러싼 상피세포가 자라게 하여 갑상선 발육을 촉진시키며, 갑상선 조직과 혈장 사이의 요오드이온 농도 차를 만들어, 상피세포로 요오드 이온이 잘 들어오도록 한다. 요오드는 갑상선호르몬을 만드는데 사용된다. 또한 갑상선호르몬인 삼요오드화티로닌(3,5,3'-triiodothyronine; T3)과 티록신(thyroxine; T4)의 합성을 도우며, 갑상선호르몬이 혈액으로 방출되는 것을 촉진시키는 등의 역할을 담당한다. TRH(갑상선자극호르몬방출호르몬)는 시상하부에서 분비되는 3개의 아미노산(p-Glu, His 및 Pro-NH₂)으로 구성된 펩티드로 뇌하수체의 TSH(갑상선자극호르몬) 분비를 자극한다(Fig. 1). 따라서 TRH를 투여한 후 TSH의 분비 양상을 검토하면 시상하부 뇌하수체-갑상선 축을 평

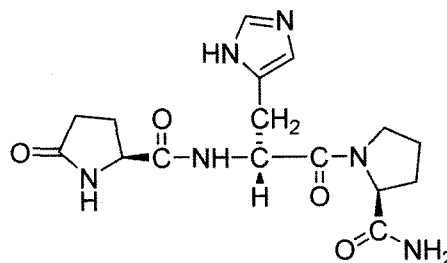


Fig. 1 – Structure of TRH.

가할 수 있어 뇌하수체성 갑상선기능저하증, 갑상선기능항진증 및 고프로락틴혈증(hyperprolactinemia)의 감별과 프로락틴 분비 예비능을 평가하는데도 TRH 자극 검사가 이용된다.¹⁻⁵⁾

1970년대에 TRH가 처음으로 화학적으로 합성된 이후 TRH 및 유사체의 합성에 관련된 다수의 논문이 보고되었다.⁶⁻¹³⁾ 그러나 기존에 알려진 합성법은 각 합성단계마다 크로마토그래피를 이용하여 분리하거나, 상대적으로 낮은 수율 및 펩티드합성에 상대적으로 고가의 시약을 사용하거나 경우에 따라 사용된 아미노산에 racemization이 발생하는 등의 단점에 의하여 제품화에 적용할 수 있는 대량의 제조법 확립에 대한 필요성이 제기 되었다.

본 연구는 갑상선기능의 평가에 중요한 진단의약품으로 사용되는 TRH의 대량합성제조법을 개발하는 것을 목표로 하고, 제품화를 위한 대량합성을 위하여는 다음과 같은 사항이 고려되었다.

- 1) 상대적으로 저렴한 시약 및 원료
- 2) 합성과정 중 발생할 수 있는 racemization의 최소화
- 3) 시간, 노력과 경제적 부담을 최

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-810-2827 (팩스) 053-810-4654
(E-mail) eslee@yu.ac.kr

소화하기 위하여 매 단계마다 재결정을 통한 중간체 및 최종물질의 분리, 정제 4) 상대적으로 간단하며 높은 수득율을 얻을 수 있는 반응 적용 5) 적절한 용매의 선택

본 연구진은 위의 조건을 충족시키며 상대적으로 용이한 TRH의 대량합성 제조법을 개발하여 이에 보고한다.

실험 방법

시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 Sigma와 Aldrich Chemical Co. 등의 전문 시약 회사 제품을 사용하였다. 무수 상태에서 실험해야 할 경우, 반응 용기는 110°C에서 건조하여 사용하였고, argon gas로 치환된 상태에서 반응하였으며 액체 시료는 syringe를 이용하여 적가하고, 용매는 실험하기 바로 전에 CaH₂로 증류하여 사용하였다. Thin layer chromatography(TLC)는 Merck사의 Kieselgel 60 F₂₅₄를 이용하였고, TLC 용매는 *n*-BuOH : HOAc : EtOAc : H₂O = 1 : 1 : 1 : 1 (v : v : v : v)과 CH₂Cl₂ : MeOH : HOAc = 90 : 10 : 1 (v : v : v)과 *i*-Propanol : HOAc : H₂O : ammonia = 1 : 0.02 : 0.5 : 0.03 (v : v : v : v)으로 하였고 spot은 UV, I₂, ninhydrin 발색시약 및 Cl₂로 발색 후 1% KI starch로 확인하였다. NMR (nuclear magnetic resonance) spectra는 tetramethylsilane을 내부 표준 물질로 하여 별도의 언급이 없는 경우에는 CDCl₃ 및 DMSO-*d*₆를 용매로 하여 Bruker ARX 300(300 MHz, FT)으로 측정하였다.

합성방법

1-Benzyl 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) 5-oxopyrrolidine-1,2-dicarboxylate(Z-pGlu-ONSu, 3) - 1-(Benzyloxycarbonyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxylic acid(Z-pGlu, **1**, 6.00 g, 22.80 mmole)¹⁴와 *N*-hydroxysuccinimide(HONSu, **2**, 2.76 g, 23.94 mmole)를 무수 1,4-dioxane(30 ml)에 녹이고 0°C에서 1,3-dicyclohexylcarbodiimide(DCC, 4.94 g, 23.94 mmole)를 가한 후 온도를 점차 상온으로 올리며 교반하고 20°C에서 16시간 교반하였다. 반응액을 여과하여 잔류물을 제거하고 감압농축하여 용매를 제거한 후 잔사를 ethanol(60 ml)로 재결정하여 95.3% 수율(7.83 g, 21.73 mmol)로 무색결정을 얻었다.

TLC(*n*-BuOH : HOAc : EtOAc : H₂O = 1 : 1 : 1 : 1, v : v : v : v) R_f = 0.84,

TLC(CH₂Cl₂ : MeOH : HOAc = 90 : 10 : 1, v : v : v) R_f = 0.72
mp = 135.6~136.2°C

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.44(2 H, m, phenylic H), 7.37(3 H, m, phenylic H), 5.38(1 H, d, J = 12.15 Hz, benzylic H), 5.26(1 H, d, J = 12.15 Hz, benzylic H), 4.98(1 H, m, Z-pGlu의 α-CH), 2.87(4 H, s, succinimide), 2.74(1 H, m, Z-

pGlu), 2.64~2.39(3 H, m, Z-pGlu).

Sodium 2-(1-(benzyloxycarbonyl)-5-oxopyrrolidine-2-carboxamido)-3-(1H-imidazol-5-yl)propanoate(Z-pGlu-His-ONa, 6) - Histidine(4, 2.15 g, 13.88 mmole)과 NaHCO₃(1.17 g, 13.88 mmole)를 물(54 ml)에 완전히 녹이고, Z-pGlu-ONSu (**3**, 5.00 g, 13.88 mmole)를 1,4-dioxane(27 ml)에 녹인 후 20°C에서 histidine·NaHCO₃ 용액에 한 번에 가하였다. 반응액이 뿌옇게 되다가 다시 투명하게 되며 무색의 침전물이 다량 생성되며 20°C에서 4시간 교반하였다. 반응액을 여과하여 여액을 제거하고 생성된 침전물을 1,4-dioxane(10 ml)으로 세척하였다. 침전물을 취하고 methanol에서 재결정하여 구상 혹은 침상의 무색결정을 70.4% 수율(4.13 g, 9.77 mmol)로 얻었다.

TLC(*n*-BuOH : HOAc : EtOAc : H₂O = 1 : 1 : 1 : 1, v : v : v : v) R_f = 0.59,

TLC(*iso*-propanol : H₂O : HOAc : NH₄OH = 1 : 0.5 : 0.02 : 0.03, v : v : v : v) R_f = 0.39

mp = 143.1°C(decomposed)

¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.54(1 H, d, J = 7.71 Hz, CONH-), 7.59(1 H, d, J = 0.71 Hz, imidazole H), 7.34(5 H, m, phenylic H), 6.83(1 H, s, imidazole H), 5.16(1 H, d, J = 12.8 Hz, benzylic H), 5.09(1 H, d, J = 12.8 Hz, benzylic H), 4.67(1 H, dd, J = 8.72 Hz, J = 9.08 Hz, Z-pGlu의 α-CH), 4.42(1 H, m, α-CH-His), 2.93(1 H, dd, J = 15.00 Hz, J = 5.64 Hz, CH₂-imidazole), 2.84(1 H, dd, J = 15.00 Hz, J = 7.93 Hz, CH₂-imidazole), 2.39(2 H, m, Z-pGlu), 2.27(1 H, m, Z-pGlu), 1.86(1H, m, Z-pGlu).

Benzyl 2-(1-(2-carbamoylpyrrolidin-1-yl)-3-(1H-imidazol-5-yl)-1-oxopropan-2-ylcarbamoyl)-5-oxopyrrolidine-1-carboxylate (Z-pGlu-His-Pro-NH₂, 8) - Z-pGlu-His-ONa(**6**, 5.00 g, 11.80 mmole)와 HONSu(**2**, 1.36 g, 11.80 mmole)를 DMF(25 ml)에 녹이고 0°C에서 DCC(2.44 g, 11.80 mmole)를 가한 후 온도를 점차 20°C로 올리며 1시간 동안 교반하였다. 1당량의 prolinamide(**7**, 1.35 g, 11.80 mmole)를 가하고 20°C에서 16시간 동안 교반하였다. 반응액을 여과한 후 여액에 diethyl ether(50 ml)를 가하여 crude oil을 얻었다. 얻어진 crude oil을 gram당 60 ml의 acetonitrile과 10 ml의 ethanol로 재결정을 하여 74.3% 수율(4.35 g, 8.77 mmol)로 무색결정을 얻었다.

TLC(*iso*-propanol : H₂O : HOAc : NH₄OH = 1 : 0.5 : 0.02 : 0.03, v : v : v : v) R_f = 0.47

¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.60(1 H, d, J = 7.30 Hz, CONH-), 8.10(1 H, s, imidazole-NH), 7.53(1 H, d, J = 0.62 Hz, imidazole H), 7.64(6 H, m, phenylic H, Pro-NH₂), 6.98(1 H, s, Pro-NH₂), 6.89(1 H, s, imidazole H), 5.16(2 H, s, benzylic H), 4.70(1 H, dd, Z-pGlu의 α-CH), 4.55(1 H, m,

α -CH-His), 4.18(1 H, m, Pro의 α -CH), 3.50(1 H, m, Prolinamide), 3.11(1 H, m, Prolinamide), 2.89(1 H, dd, CH₂-imidazole), 2.74(1 H, dd, CH₂-imidazole), 2.39(2 H, m), 2.25(1 H, m), 1.97(1 H, m), 1.81(4 H, m).

TRH(pGlu-His-Pro-NH₂, 9) - Z-pGlu-His-Pro-NH₂(8, 2.77 g, 5.58 mmole)를 무수 MeOH(20 ml)에 용해하고 10% Pd/C(80 mg)과 H₂ 존재 하에서 상온, 상압에서 3시간 동안 hydrogenolysis 반응을 하였다. 반응액을 celite로 여과하고 여액을 감압농축하고 methanol-ether로 재결정하여 95.1% 수율(1.92 g, 5.31 mmol)로 무색결정을 얻었다.

TLC(*n*-BuOH : HOAc : EtOAc : H₂O=1 : 1 : 1 : 1, v : v : v : v) R_f=0.23,

TLC(*iso*-propanol : H₂O : HOAc : NH₄OH=1 : 0.5 : 0.02 : 0.03, v : v : v : v) R_f=0.30

¹H NMR(300 MHz, D₂O) δ 8.64(1 H, s, imidazole H), 7.35(1 H, s, imidazole H), 4.32(1 H, dd, pGlu의 α -CH), 3.76(1 H, m, α -CH-His), 3.59(1 H, m, Pro의 α -CH), 3.27(1 H, m, Prolinamide), 3.17(1 H, m, Prolinamide), 2.89(1 H, dd, CH₂-imidazole), 2.74(1 H, dd, CH₂-imidazole), 2.39(2 H, m), 2.25(1 H, m), 1.97(1 H, m), 1.81(4 H, m)

¹³C NMR(75 MHz, D₂O) δ 21.8, 24.5, 25.6, 29.2, 29.5, 31.4, 47.1, 47.9, 51.8, 56.7, 60.5, 117.4, 132.8, 136.5, 171.6, 174.5, 176.8, 182.1.

결과 및 고찰

Amide bond를 형성하기 위한 일반적인 합성 방법으로는 acid chloride를 이용하는 방법, DCC를 이용하는 방법, symmetric anhydride 법과 active ester 법 및 mixed anhydride법 등이 있으며,^{7,8,15} 본 연구의 경우 racemization의 발생을 최소화할 수 있는 active ester법을 사용하고자 하였으며 동시에 시약이 상대적으로 저렴한 mixed anhydride법도 시도하였다.

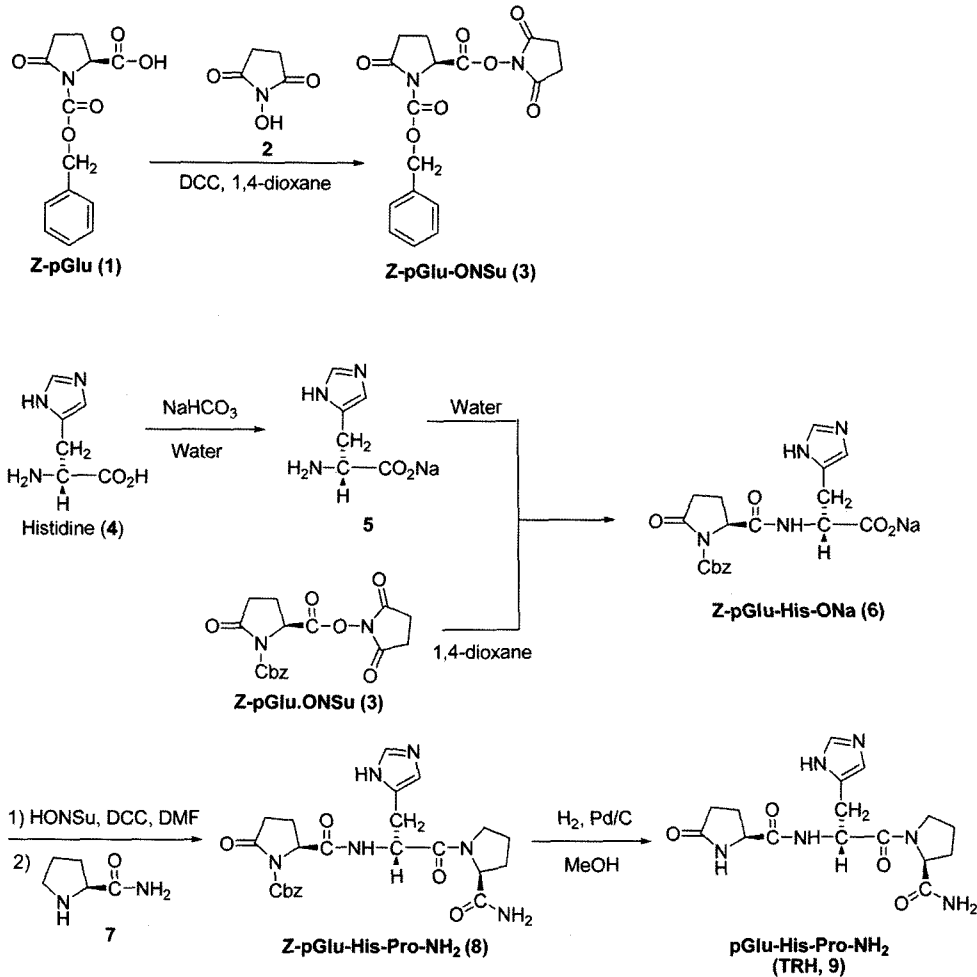
합성방법은 일반적으로 많이 사용되는 N C로의 방법을 시도하였으며 pyroglutamic acid(pGlu)의 경우 amide group의 질소를 benzyloxycarbonyl(Cbz or Z) group으로 protection한 경우와 protection하지 않고 바로 반응에 사용하는 두 가지 방법으로 시도하였다.

Pyroglutamic acid(pGlu)의 N-terminal을 보호하지 않고 직접 pGlu에 1-hydroxybenzotriazole hydrate(HOBT)를 이용한 active ester 반응법과 isobutylchloroformate(BCF)를 이용한 mixed anhydride법을 시도하였으나, 확인되지 않은 부산물이 상대적으로 다량 생성되었으며 수율도 낮아 적절하지 않았다. 또한 histidine이 용매인 DMF 및 THF에 거의 녹지 않아 반응의 진행이 느리고 낮은 수율을 기록하였다.

pGlu의 N-terminal을 benzyloxycarbonyl(Cbz)로 보호한 화합물 1과 HOBT, N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide(HONB) 및 N-hydroxysuccinimide(HONSu)를 이용한 active ester 반응법과 isobutylchloroformate(BCF)를 이용한 mixed anhydride법을 시도하였다. HOBT를 이용한 반응의 경우 부산물이 다량 생성되었으며 수율이 낮아 이 방법을 이용하는 것이 적절하지 않았으며, BCF를 이용한 mixed anhydride 반응의 경우 역시 부산물이 다량 생성되었으며 수율이 낮았다. 위 두 가지 반응의 경우 histidine의 유기용매에 대한 용해도가 낮아 반응이 적절히 진행되지 않은 것으로 사료되었다. Histidine은 물에는 잘 용해하나 유기용매에는 거의 용해가 되지 않으므로, histidine의 용매에 대한 용해도를 개선하기 위하여 물에서 합성이 가능한 active ester인 HONB와 HONSu를 이용하여 각각 반응을 시도하였다. HONB 반응의 경우 목적화합물은 상대적으로 높은 수율로 얻었으나, 화합물의 분리 및 재결정이 용이하지 않아 적절하지 않았다. HONSu를 이용한 반응의 경우 부산물이 생성되지 않고 라세미화 없이 반응이 용이하게 진행되었으며 재결정이 용이하여 산물의 분리, 정제가 쉬웠으며 상대적으로 높은 수율로 산물을 얻었다. 즉, 무수 1,4-dioxane에 Z-pGlu(1)과 HONSu(2) 및 DCC와 반응하여 생성된 active ester인 Z-pGlu-ONSu(3)를 ethanol로 재결정하여 95.3%의 수율로 얻었으며, 이를 NaHCO₃ 존재 하에 histidine(4)과 수용액(물 : 1,4-dioxane=54 : 27, v : v)에서 반응하여 생성된 침전물을 methanol로 재결정하여 70.4%의 수율로 Z-pGlu-His-ONa(6)를 얻었다(Scheme 1). 침전물을 methanol에서 오랫동안 방치할 경우 Z-pGlu의 고리구조가 깨진 화합물이 나타났고 침전물을 그대로 취하여 TLC 및 ¹H NMR을 측정하였을 경우 순수한 spectra를 얻을 수 있었으므로 오히려 재결정과정 없이 여과한 침전물을 다음 반응에 사용하는 것이 수득율을 높일 수 있는 방법으로 사료되었다.

Z-pGlu-His-Pro-NH₂(8)의 적절한 합성법을 찾기 위하여 HOBT 및 HONSu를 이용한 active ester법과 DCC를 이용한 반응을 시도하였다.

HOBT를 이용한 반응의 경우 상대적으로 반응이 잘 진행되지 않았고 부산물의 생성이 많았으며, 생성된 산물(오일상)의 재결정이 용이하지 않았다. DCC를 이용한 반응의 경우도 상대적으로 낮은 수율과 재결정이 용이하지 않아서 적절한 합성법이 아니었으며, 반면에 HONSu를 이용한 합성법이 높은 수율과 적은 부산물의 생성 및 용이한 재결정 등의 이유로 가장 적절하였다. Z-pGlu-His-ONa(6)와 1 당량의 HONSu(2)를 DMF에 녹인 후 1 당량의 DCC와 1 당량의 prolinamide(7)를 가하여 생성된 산물을 acetonitrile과 ethanol(6 : 1, v : v)로 재결정하여 Z-pGlu-His-Pro-NH₂(8)을 74.3% 수율로 얻었다. 위 반응에서 사용된 중간체 및 시약의 비율을 정확히 1 당량을 유지하는 것이 중요하며, 당량이 증감하였을 경우 부산물이 다량 생성되며 낮은 수율과 재



Scheme 1 - Synthesis of TRH.

결정이 용이하지 않은 점 등이 관찰되었다. 최종적으로 Z-pGlu-His-Pro-NH₂(8)을 10% Pd/C와 수소 존재 하에 hydrogenolysis 반응을 하여 생성된 물질을 methanol-ether로 결정화하여 95.1%의 수율로 목적물질인 TRH를 합성하였다.

결론

다양한 조건하에서 합성을 시도한 결과, TRH를 화학적으로 합성하기 위한 가장 적합한 방법은 Z-pGlu(1)와 HONSu(2)를 사용하여 active ester인 Z-pGlu-ONSu(3)를 형성하고, 1 당량의 histidine(4)을 가하여 Z-pGlu-His-ONa(6)를 합성한 뒤 1 당량의 HONSu(2)와 prolinamide(7)를 가하여 Z-pGlu-His-Pro-NH₂(8)를 합성하고 이를 hydrogenolysis하는 방법으로 나타났다.

Z-pGlu-ONSu는 합성 후 EtOH로 쉽게 재결정하여 무색결정을 95.3% 수율로 얻었다. Z-pGlu-ONSu를 1,4-dioxane에 녹인 후 물에 녹인 histidine과 혼합하여 교반하고 생성된 무색의 침전물이 Z-pGlu-His-ONa이며 이를 여과한 후 methanol로 재결정하

여 무색 결정을 70.4%의 수율로 얻었다. 그러나 침전물이 TLC 및 ¹H NMR 분석에 의하면 매우 순수하였으므로 재결정과정 없이 다음 반응에 사용하여도 무방하며 따라서 수득율은 증가하였다.

Z-pGlu-His-ONa에 HONSu와 DCC를 가한 후 prolinamide를 가하여 Z-pGlu-His-Pro-NH₂를 얻었으며, 최종적으로 hydrogenolysis 반응에 의하여 TRH를 얻었다.

본 연구에 의하여 TRH를 비교적 용이하게 대량합성을 할 수 있는 합성법을 개발하였으며 향후 제품화에도 기여하리라 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R11-2007-040-02004-0).

문헌

- 1) Mutschler, E. and Derendorf, H. : *Drug Actions; Basic*

- Principles and Therapeutic Aspects*, CRC Press, Stuttgart, Germany, p. 255 (1995).
- 2) Studer, R. O. : Chemistry of TRH [thyrotrophin releasing hormone]. *Front. Horm. Res.* **1**, 4 (1971).
 - 3) Hoyt, R. F., Jr. and Tashjian, A. H. Jr. : Immunocytochemical analysis of prolactin production by monolayer cultures of GH3 rat anterior pituitary tumor cells. I. Long-term effects of stimulation with thyrotrophin-releasing hormone (TRH). *Ana. Rec.* **197**, 153 (1980).
 - 4) Taylor, T., Scouten, C. W. Jacobowitz, D. M. and Weintraub, B. D. : The effects of anterior hypothalamic deafferentation on thyrotrophin (TSH) biosynthesis and response to TSH-releasing hormone. *Endocrinology* **118**, 2417 (1986).
 - 5) Sertedaki, A., Voutetakis, A. and Dacou-Voutetakis, C. : Molecular defects in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis leading to congenital hypothyroidism. *Curr. Pediatric Rev.* **1**, 225 (2005).
 - 6) Loffet, A. : Synthesis of TRH (author's transl). *Annales d'endocrinologie* **37**, 213 (1976).
 - 7) Nishiuchi, Y., Nishio, H. and Sakakibara, S. : *Peptide Chemistry*, Pept. Inst. Inc., Minoh, Japan, pp. 137-142 (1985).
 - 8) Matsuda, F., Itoh, S., Hattori, N., Yanagiya, M. and Matsumoto, T. : A simple method for synthesis of amides and peptides through chlorides. A rapid synthesis of thyrotrophin releasing hormone. *Tetrahedron* **41**, 3625 (1985).
 - 9) Stavropoulos, G., Karagiannis, K., Vynios, D., Papaioannou, D., Aksnes, D., Froeystein, N. A. and Francis, G. W. : Solid-phase synthesis and spectroscopic studies of TRH analogs incorporating cis- and trans-4-hydroxy-L-proline. *Acta Chem. Scand.* **45**, 1047 (1991).
 - 10) Papaioannou, D., Athanassopoulos, C., Magafa, V., Karigiannis, G., Karamanos, N., Stavropoulos, G., Napoli, A., Sindona, G. and Aksnes, D. W. : Facile preparation of the 1-hydroxybenzotriazolyl ester of N-tritylpyroglutamic acid and its application to the synthesis of TRH, [D-His2]TRH and analogs incorporating cis- and trans-4-hydroxy-L-proline. *Acta Chem. Scand.* **49**, 103 (1995).
 - 11) Mizuno, M., Goto, K., Miura, T. and Inazu, T. : Thyrotrophin-releasing hormone (TRH). Peptide synthesis on a fluorous support. *Handbook of Fluorous Chemistry* **416** (2004).
 - 12) Meng, R., Becker, J., Lin, F. T., Saxena, S. and Weber S. G. : Binding of copper (II) to thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and its analogs. *Inorg. Chim. Acta* **358**, 2933 (2005).
 - 13) Kaur, N., Lu, X., Gershengorn, M. C. and Jain, R. : Thyrotrophin-releasing hormone (TRH) analogues that exhibit selectivity to TRH receptor subtype 2. *J. Med. Chem.* **48**, 6162 (2005).
 - 14) Atwell, G. J. and Denny, W. A. : Monoprotection of α,ω -alkanediamines with the *N*-benzyloxycarbonyl group. *Synthesis* 1032 (1984).
 - 15) Stewart, J. M. and Young, J. D. : *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co., Rockford (1984).