

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 696**

21 Número de solicitud: 201231398

51 Int. Cl.:

**A61K 31/352** (2006.01)

**C07D 313/20** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**07.09.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.12.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

**27.12.2012**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA**

**Centro de Innovación e Transferencia de  
Tecnoloxía - Edf. Emprendia Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es:

**BOTANA LÓPEZ, Luis M. y  
RUBIOLLO, Juan Andrés**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Uso de la Yessotoxina y sus derivados para el tratamiento de gliomas**

57 Resumen:

Uso de la Yessotoxina y sus derivados para el tratamiento de gliomas.

La presente invención se refiere al uso de la yessotoxina y sus derivados para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de gliomas y mas preferiblemente gliomas u otras enfermedades tumorales en los que se presenta resistencia a apoptosis.

ES 2 393 696 A1

## DESCRIPCION

5 Uso de la Yessotoxina y sus derivados para el tratamiento de gliomas

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente se refiere al uso de la yessotoxina y sus derivados para la elaboración de un medicamento, preferiblemente para el tratamiento de gliomas humanos, más preferiblemente de gliomas que presentan resistencia a inducción de apoptosis terapéutica.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Los gliomas malignos están entre los cánceres más complicados de tratar exitosamente. Se caracterizan no sólo por la proliferación agresiva y la expansión, sino porque también invaden inexorablemente tejido cerebral distante. La clasificación y el establecimiento de los subtipos de glioma se realiza basándose en sus características histopatológicas y presentación clínica. El más común y más agresivo de éstos es el glioblastoma (Organización Mundial de la Salud (OMS); grado IV) y está caracterizado por una proliferación celular descontrolada, infiltración difusa, propensión a la necrosis, angiogénesis robusta, intensa resistencia a la apoptosis, y una alta inestabilidad genética. Una de las características más destacadas de las células malignas de glioma es su intensa resistencia a los estímulos inductores de muerte como la radioterapia y la quimioterapia. Esta propiedad ha sido ligada a alteraciones genéticas de moléculas regulatorias clave en la señalización mitogénica, entre las que se encuentran más prominentemente los receptores tirosin-quinasa y el eje PI3K-PTEN-Akt, así como también moléculas reguladoras y efectoras pertenecientes a redes metabólicas involucradas en la muerte celular por apoptosis tanto intrínseca (dependiente de la mitocondria) como extrínseca (mediada por receptores inductores de muerte, TNFR1, TRAIL, CD95). Paradójicamente, aunque presentan esta resistencia al estímulo apoptótico terapéutico, las células malignas de glioma exhiben una propensión a la necrosis extensiva. En efecto, la necrosis es la forma más prominente de muerte celular espontánea en este tipo de células.

La autofagia se ha convertido en un mecanismo atractivo de inducción terapéutica de muerte celular, debido a que en muchas células cancerosas, como se ha mencionado en el caso de los gliomas, las cascadas apoptóticas canónicas están inactivadas con la subyacente resistencia a fármacos. A este respecto, la inducción de autofagia en el cáncer se ha convertido en un paradigma para el desarrollo de terapias contra esta enfermedad. En muchos tumores malignos en humanos se observa la supresión de varios genes específicos de la autofagia. Por lo tanto, la autofagia puede ser una ruta supresora de tumores, y la disminución de su actividad puede contribuir al desarrollo de cáncer en humanos. Consistente con esto, los genes supresores de tumores que se encuentran frecuentemente mutados en cánceres humanos (p53, PTEN), son activadores de la autofagia, mientras que los genes que se encuentran activados (PI3K, AKT) la inactivan.

En células de glioma se ha demostrado que es posible inducir su muerte y diferenciación a través de la inducción de autofagia. En estos estudios la inducción de autofagia se observó como consecuencia de inhibición de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Por ejemplo, se ha observado que la rapamicina produce su efecto antitumoral en células malignas de glioma a través de la inducción de autofagia. Esto indica de manera directa que la inducción de autofagia puede ser una aproximación terapéutica útil de cara a desarrollar fármacos para el tratamiento de este tipo de cáncer. También se ha demostrado que la inducción de autofagia, *in vitro* así como *in vivo*, a través de adenovirus con replicación condicional, es efectivo para el tratamiento de gliomas en ratones. En gliomas humanos uno de los problemas que surgen en el momento de tratar terapéuticamente es la resistencia a apoptosis, por lo que la inducción de muerte celular por autofagia es una alternativa atractiva para el tratamiento de este tipo de tumores.

Referencias anteriores indican que la autofagia promueve la diferenciación de las células iniciadoras de gliomas y su radio-sensibilización (Zhuang, Li et al. 2011; Int J Cancer 129(11): 2720-2731). Debido a que las células de glioma suelen ser resistentes a la radio terapia, la sensibilización a ésta, conseguida con los inductores de autofagia, se propone como una alternativa terapéutica prometedora. Hoy se sabe que muchas de las terapias que se utilizan en el tratamiento del cáncer inducen autofagia, como el tamoxifen o la temozolomida.

60 Actualmente, una de las fuentes más importantes de compuestos que pueden resultar útiles para la producción de fármacos es el medio marino. Allí se han encontrado multitud de recursos bioquímicos que han demostrado ser de gran utilidad sanitaria como por ejemplo fármacos con actividad antitumoral.

Dentro de estos compuestos, las ficotoxinas marinas pueden tener una gran aplicabilidad clínica debido a su gran diversidad y, por tanto, a los múltiples mecanismos de acción y respuestas celulares que desencadenan. Uno de estos compuestos aislado de organismos de origen marino es la yessotoxina. Se aisló por primera vez a partir de vieiras contaminadas, *Pectinopecten yessoensis*, en Japón. Posteriormente se descubrió dicha toxina en cultivos de los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum*, *Lingulodinium polyedrum* y *Gonyaulax spinifera*. Hasta el momento se han descrito más de treinta análogos de esta molécula obtenidos a partir de marisco contaminado o de cultivos de dinoflagelados, aunque la estructura de algunos de ellos todavía se desconoce. Habitualmente el peso molecular de las yessotoxinas se encuentra entre 955 y 1551 unidades de masa.

En el documento ES2259894 se describe el efecto citoplásico de la yessotoxina sobre células neoplásicas de hepatocarcinoma, y por tanto su utilidad como antitumoral. En el artículo de Leira et al. (*Toxicol. In Vitro* 2002; 16 (1): 23-31), se describen los efectos citotóxicos y proapoptóticos inducidos por la yessotoxina en células de neuroblastoma. Sin embargo, en ninguno de estos dos documentos se hace referencia explícita a que esta molécula tenga efectos citotóxicos sobre gliomas. Existen diferencias importantes entre gliomas y neuroblastomas: un glioma es un tumor que se produce en el cerebro o la médula espinal y que surge a partir de células gliares, mientras que un neuroblastoma es un tipo de cáncer infantil que se desarrolla en el tejido nervioso y que se suele originar en las glándulas suprarrenales. Si bien ambos son tumores que tienen su origen en el tejido nervioso, los gliomas se desarrollan a partir de células gliares, mientras que los neuroblastomas se originan a partir de células nerviosas primitivas remanentes de la fase embrionaria o neuroblastos, y por tanto, se trata de tumores distintos originados a partir de tipos celulares distintos.

Los gliomas malignos son el tipo de neoplasma más común del sistema nervioso central. La expectativa de vida promedio de los pacientes diagnosticados de glioblastoma multiforme, el glioma más maligno, después del tratamiento convencional con cirugía, irradiación y quimioterapia es de menos de un año. Aunque se han hecho considerables progresos en el tratamiento de estos tumores con combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia, estos esfuerzos no han sido curativos. Por esto hay una necesidad urgente de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

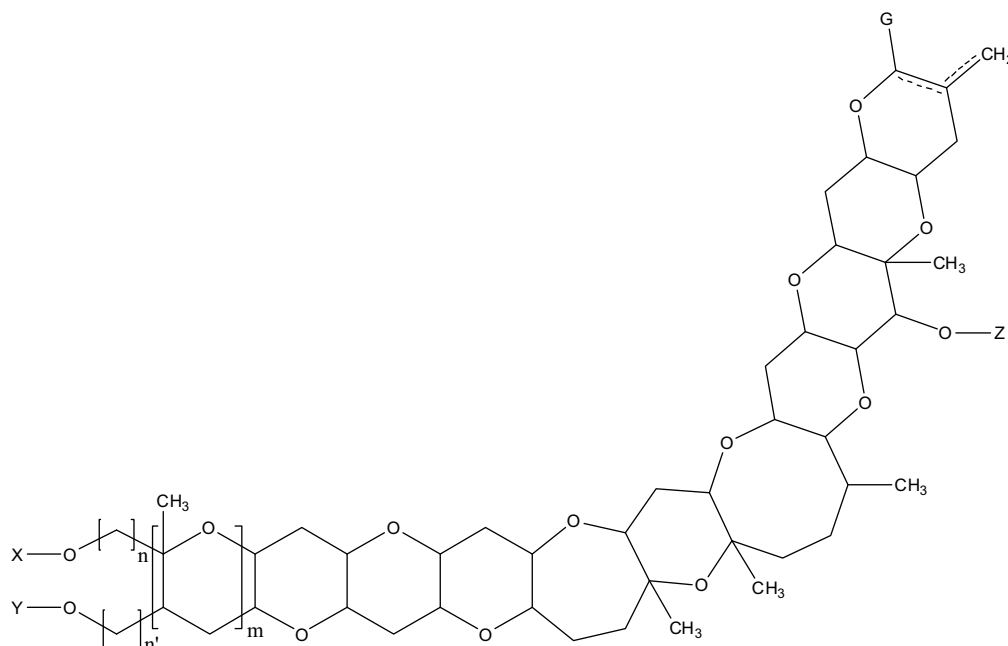
La presente invención se refiere a la utilización de la ficotoxina marina, yessotoxina o sus derivados con propiedades farmacológicas y bioactivas, para el tratamiento de gliomas.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que la YTX presenta una elevada capacidad para inhibir el crecimiento de células provenientes de tumores cerebrales malignos. Como muestran los resultados experimentales expuestos a continuación, a concentraciones de 30 a 250 nM, se produce una inhibición de aproximadamente el 65% del crecimiento del glioma. Es de destacar que evidencias anteriores del uso de la YTX como antitumoral, como la patente ES2259894, mostraban una inhibición del crecimiento del 82% tan sólo en hepatocarcinoma, y a una concentración de YTX de 10 µM, que es muy superior a la empleada en los ejemplos de la presente invención.

En la presente invención se demuestra que la yessotoxina induce muerte celular en tres líneas celulares derivadas de gliomas humanos (SF295, SR539 y SNB75). Inicialmente se demuestra que el compuesto produce la detención del ciclo celular en G0/G1, produciendo estrés en el retículo endoplásmico, y autofagia. También se demuestra que la inhibición de esta última a través del inhibidor de PI3K, 3-metil adenina y por interferencia de ARN produce una disminución de la toxicidad observada para la yessotoxina en las tres líneas celulares. Esto relaciona la autofagia inducida por la toxina con la muerte celular. En los ejemplos de la presente invención se observa que la toxina induce la activación transcripcional de varios marcadores de estrés involucrados con la inducción de muerte celular.

Adicionalmente, en la presente invención también se demuestra que la yessotoxina induce muerte en células de gliomas a concentraciones mucho menores (en el rango nano molar). También cabe destacar que en el caso de gliomas, como se demuestra en la presente invención, la yessotoxina induce autofagia en células obtenidas de este tipo de tumor, siendo ésta la ventaja terapéutica, debido a que en estos tumores se observa una resistencia a la apoptosis como consecuencia de la inactivación o atenuación de las cascadas de señalización apoptóticas.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o sus isómeros, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de gliomas:



(I)

donde:

X e Y se seleccionan independientemente entre H o -SO<sub>3</sub>H,

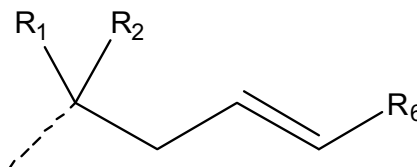
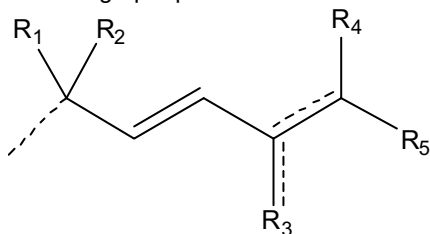
m puede ser 0 ó 1,

n y n' se seleccionan independientemente entre 0 y 5,

Z se selecciona entre H, un monosacárido u oligosacárido,

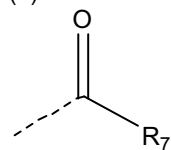
----- representa un enlace sencillo o doble,

G es un grupo que se selecciona de entre los grupos de fórmula (II) a (IV):



(II)

(III)



(IV)

donde:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre -OH o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -OH, -COOH, =O;

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o amida, preferiblemente R<sub>6</sub> se selecciona de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o amida y R<sub>7</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>

----- representa un enlace sencillo o doble.

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, sustituidas o no sustituidas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 5, y más preferiblemente de 1 a 4 y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcóxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

5 El término "alquenilo" se refiere en la presente invención a un radical alquilo, descrito anteriormente, y que tiene uno o más enlaces insaturados, concretamente tiene al menos un enlace doble, aunque también puede tener al menos un enlace triple, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo etc. Los radicales alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcóxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

10 El término "amida" se refiere en la presente invención, a un radical de fórmula RCONR'R'' siendo R, R' y R'' radicales alquilo, alquenilo, como los definidos anteriormente, o átomos de hidrógeno.

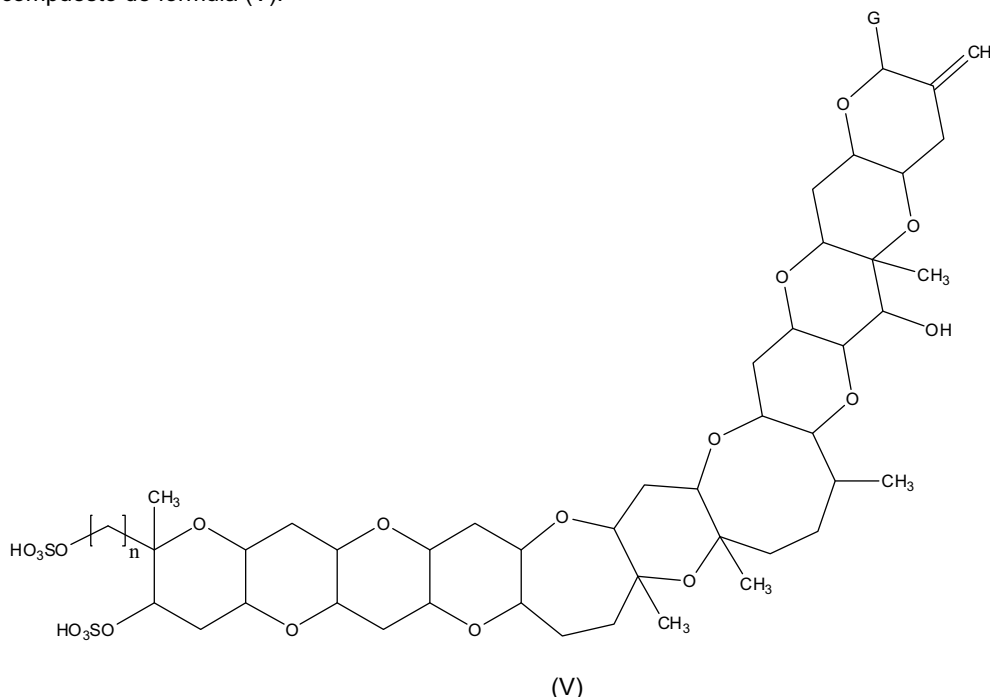
En una realización preferida X e Y son -SO<sub>3</sub>H. En otra realización preferida X es H e Y es -SO<sub>3</sub>H. En otra realización preferida X es -SO<sub>3</sub>H e Y es H.

15 En una realización preferida m es 1. En otra realización preferida m es 0. En otra realización preferida n es 1, 2 ó 3 y/o n' es 0. En otra realización preferida n es 0 y/o n' es 1, 2 ó 3.

En otra realización preferida R<sub>1</sub> es metilo y R<sub>2</sub> es -OH.

20 En otra realización preferida, G es el grupo de fórmula (II). En una realización aún más preferida R<sub>3</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o -COOH. En una realización aún más preferida R<sub>4</sub> se selecciona entre H, -OH ú =O. En otra realización R<sub>5</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o -OH.

25 En otra realización preferida X e Y son -SO<sub>3</sub>H, Z es H, n' es 0 y m es 1, y se representa por del compuesto de fórmula (V):



30 donde:  
n se selecciona entre 1, 2 ó 3, y  
G es como se ha definido anteriormente.

35 Más preferiblemente G es el grupo de fórmula (II), más preferiblemente R<sub>1</sub> es metilo y R<sub>2</sub> es -OH. En una realización más preferida R<sub>3</sub> es un grupo =CH<sub>2</sub>. En otra realización más preferida R<sub>4</sub> es H. En otra realización aún más preferida R<sub>5</sub> es un etileno (-CH<sub>2</sub>=CH<sub>2</sub>).

40 Cualquiera de los compuestos descritos anteriormente de fórmula general (I) o (V) pueden estar en forma de sal. Más preferiblemente la sal es de un alcalino o alcalinotérreo. Y aún más preferiblemente la sal es de sodio.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) o (V) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

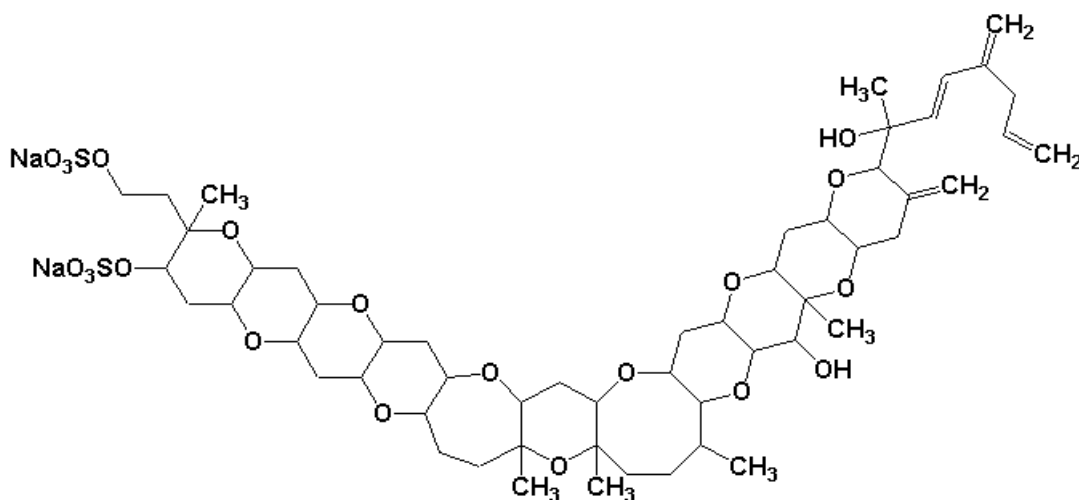
El término "análogo" tal y como aquí se utiliza, se refiere a una sustancia química similar a otra sustancia química en estructura y/o función. Por ejemplo, pueden considerarse análogos de la yessotoxina (YTX), aunque sin limitarse, la 45-hidroxi-YTX, la 45, 46,47-Trinor-YTX, la 45, 46, 47-Trinorhomo-YTX, la Homo-YTX, la 45OH-Homo-YTX, la Carboxi-YTX, la Carboxihomo-YTX, la 45OH-Carboxi-YTX, la Noroxo-YTX (41-keto-YTX), la Noroxohomo-YTX (41-ketohomo-YTX), la 40-epi-41-Keto-YTX, la 41-Keto-YTX-1,3-enona, la 41a-Homo-YTX, la 41a-Homo-YTXamida, la 44,45-diOH-YTX, la 44,45-diOH-41a-Homo-YTX, la 45-OH-dinor-YTX, la 44-Oxotrinor-YTX y la 41a-Homo-44-oxotrinor-YTX .

En la presente invención se entiende por "derivado", aquel compuesto que se produce a partir de otro mediante modificaciones del mismo, y que presenta una funcionalidad similar. Estas modificaciones se pueden realizar por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante métodos químicos, físicos, microbiológicos o farmacológicos. Pueden considerarse derivados de la yessotoxina aunque sin limitarse, los siguientes:

- Desulfoderivados: 1-Desulfo-YTX, 1-desulfocarboxihomo-YTX y 4-Desulfocarboxihomo-YTX
- Los derivados 9-metilo: 9-metil-41-keto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41a-homo-YTXamida y 44,45-diOH-9-metil-41<sup>a</sup>-homoYTX.
- Los derivados sin anillo A: Nor-ring-A-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX y nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona.
- Los 32-glicosilderivados: glicosiyessotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yessotoxina 32-O-[β-L-arabinofuranosyl-(5'→1'')-β-L-arabinofuranosido, Protoceratina II, Tri-glicosilyessotoxina y Protoceratina IV.

Por tanto, en una realización preferida de la presente invención el compuesto de fórmula (I) se selecciona de la lista que comprende: yessotoxina (YTX), 45-hidroxi-YTX, 45, 46, 47-trinor-YTX, 45, 46, 47-trinorhomo- YTX, Homo-YTX, 45OH-homo-YTX, Carboxi-YTX, Carboxihomo-YTX, 45OH-carboxi-YTX, noroxo-YTX, noroxohomo-YTX, 40-epi-41-keto-YTX, 41-keto-YTX-1,3-enona, 41a-homo-YTX, 41a-homo-YTXamida, 44, 55-doOH-41a-homo-YTX, 45-OH-dinor-YTX, 44-oxotrinor-YTX, 41a-homo-44-oxotrinor-YTX, 1-desulfo-YTX, 1-desulfocarboxihomo-YTX, 4-desulfocarboxihomo-YTX, 9-metil-41-ceto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41a-homo-YTXamida, 44, 55-diOH-9-metil-41a-homo-YTX, Nor-ring-A-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona, glicosiyessotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yessotoxina 32-O-[β-L-arabinofuranosyl-(5'→1'')-β-L-arabinofuranosido, Protoceratin II, Tri-glicosilyessotoxina y Protoceratin IV.

En una realización más preferida el compuesto de fórmula (I) es yessotoxina o sus isómeros, que se representa por la siguiente fórmula:



5 La yessotoxina produce una importante disminución en la viabilidad de las líneas celulares derivadas de glioma SF295, SF539 y SNB75. Este efecto está mediado por inducción de estrés en el retículo endoplásmico, con la consecuente inhibición de la progresión del ciclo celular y de la síntesis de proteínas. Se observa que el compuesto de fórmula (I) induce autofagia, y que este proceso está involucrado en la muerte celular inducida.

10 El compuesto de fórmula (I) puede utilizarse también para sensibilizar a las células tumorales para mejorar la respuesta a tratamientos en uso actualmente. Por tanto, en una realización preferida, el uso del compuesto de fórmula (I) se realiza en conjunción con otros agentes terapéuticos antitumorales como la radioterapia y la quimioterapia para actuar como coadyuvante en el tratamiento de gliomas.

15 En otra realización preferida, el uso del compuesto de fórmula (I) es para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de gliomas con resistencia a apoptosis, más preferiblemente el glioma es seleccionado del grupo que comprende: glioblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, oligo-astrocitomas, ependimomas y meduloblastomas.

20 En la presente invención, se demuestra que el compuesto (I) induce estrés en el retículo endoplásmico en las tres líneas celulares derivadas de glioma utilizadas. Se observa un incremento en la expresión de moléculas en respuesta al estrés en esta organela (BNIP3, DDIT3, EIF2AK3, NDRG1, PHLDA1, TNFRSF10B, TRIB3), así como la activación de cascadas de fosforilación del retículo endoplásmico en respuesta al estrés. Se muestra que el eje gobernado por IRE1 se encuentra activado ya que el compuesto (I) induce la aparición de XBP1s. También se encuentra activado PERK debido a que se observa un aumento en su fosforilación y en la del factor corriente abajo de éste, eIF2, con la consecuente inhibición de la traducción y del ciclo celular en G1. La activación de ATF6 se demuestra por el incremento en la transcripción de XBP1.

30 Adicionalmente, también se demuestra que el compuesto (I) induce autofagia en las células SF295, SF539 y SNB75. La autofagia involucra la formación de vesículas rodeadas de doble membrana, que encapsulan porciones del citoplasma y organelas para después fusionarse con lisosomas, y de esta manera degradar el contenido de la vesícula. Una de las proteínas asociadas a la autofagia es LC3, que tiene 2 isoformas, la tipo I que es citosólica (mayoritaria cuando no hay autofagia) y la tipo II que se une a membrana (aumenta en presencia de autofagia). Durante la autofagia, la LC3 tipo II aumenta a partir de la conversión de LC3 tipo I en II por lo tanto, la detección de LC3 tipo II es un indicativo de autofagia.

35 En los ejemplos de la presente invención se muestra que el compuesto de fórmula (I) induce autofagia con el consecuente aumento en la expresión de LC3 I y la aparición de LC3 II. La inducción de autofagia también se demuestra a través de microscopía electrónica en donde se puede ver la aparición de autofagosomas que contienen diversas organelas, incluidas mitocondrias y peroxisomas, y a través de la demostración de una disminución en la fosforilación de mTOR en el residuo SER2448. Se muestra también que el proceso de autofagia está involucrado en la citotoxicidad de (I), utilizando factor de crecimiento epitelial, el que a través de la inducción de fosforilación de mTOR en SER2448 previene parcialmente el efecto citotóxico de compuesto de fórmula (I). Se demuestra que inhibiendo la autofagia utilizando el inhibidor de PI3K, 3-metil adenina, también se rescata parcialmente a las células tratadas con el compuesto de fórmula (I).

45 En la presente invención se demuestra que el compuesto de fórmula (I) induce un aumento en la expresión de BNIP3 en las tres líneas celulares de glioma utilizadas. La disminución de ésta, utilizando interferencia de ARN, produce una disminución en la autofagia que se observa como una disminución en LC3 II en las células tratadas con ARN de interferencia para BNIP3 y posteriormente expuestas al compuesto de fórmula (I), en comparación con las células sólo tratadas con el compuesto de fórmula (I). Esta disminución en la autofagia hace que la viabilidad de las células con menores niveles de BNIP3 (células tratadas con ARN de interferencia para BNIP3 y el compuesto de fórmula (I)) sea mayor que la de las que poseen altos niveles de esta proteína (células tratadas con el compuesto de fórmula (I)).

55 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de gliomas que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de fórmula (I). El compuesto de fórmula (I) puede administrarse en forma de composición farmacéutica junto a excipientes, adyuvantes y otros componentes habitualmente utilizados en galénica.

60 Para su uso en el tratamiento de gliomas, la yessotoxina y sus derivados pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo,

pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas o minerales. Alternativamente, la yessotoxina y sus derivados pueden prepararse para su administración en forma sólida, y puede combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo. La yessotoxina y sus derivados en forma de tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, a parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía rectal, vía vaginal o uretral, mediante la administración de un supositorio, percutánea, aerosol nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva de esta composición depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de la composición farmacéutica de la invención que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** (A) Viabilidad de las tres líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 en presencia de distintas concentraciones de yessotoxina durante 24 hs, determinada por el método del MTT. (B) Viabilidad de las tres líneas en presencia de distintas concentraciones de yessotoxina durante 48 hs, determinada por el método del MTT. (C) Viabilidad de las tres líneas en presencia de distintas concentraciones de yessotoxina durante 72 hs, determinada por el método del MTT. (D) Viabilidad determinada por el método del MTT en las tres líneas celulares tratadas con yessotoxina 30 y 250 nM. (E) Microscopía de campo claro en la que se muestran campos representativos de cultivos de las tres líneas celulares utilizadas tratadas con yessotoxina 30 y 250 nM.

**Figura 2.** (A) Análisis por western blot de niveles de las formas fosforiladas de eIF2 $\alpha$  y PERK así como de DDIT3 y tubulina en cultivos tratados con yessotoxina y cultivos control. (B) Análisis densitométrico de los western blots que se muestran en el apartado anterior. (C) Análisis por electroforesis de agarosa de los productos de PCR generados para la amplificación de XBP1 en cultivos de las tres líneas celulares tratadas con yessotoxina y cultivos control.

**Figura 3.** (A) Determinación, por microarrays, de la variación en la expresión de genes involucrados en la regulación del estrés en el retículo endoplásmico y en la respuesta a proteínas mal plegadas. Aparecen sombreados los genes involucrados en la inducción de muerte celular. (B) Gráficos en los que se muestra la variación en la expresión de los genes que se mencionan en el apartado A de esta figura a las 6 y 24 hs. También se pueden ver los gráficos del centroide para la expresión de estos genes.

**Figura 4.** (A) Poblaciones en las distintas fases del ciclo celular determinadas por citometría de flujo (B) Síntesis de proteínas determinada por incorporación de leucina tritiada (C) Expresión de las ciclinas en los cultivos de células de glioma.

**Figura 5.** (A) Determinación de autofagia en células SF295, SF539 y SNB75 por microscopía electrónica. (B) Splicing de LC-3 por inducción de autofagia en las 3 líneas estudiadas después del tratamiento con



yessotoxina determinado por western blot. (C) Determinación de fosforilación de mTOR en el residuo SER2448 por western blot.

5 **Figura 6.** (A) Viabilidad de las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75, determinada por el método del MTT (B) Análisis por western blot de la expresión y el splicing de LC3 en las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 tratadas con EGF y yessotoxina. (C) Análisis por western blot del estado de fosforilación de mTOR en las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 tratadas con EGF y yessotoxina. (D) Viabilidad de las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75, determinada por el método del MTT.

10 **Figura 7.** (A) Viabilidad de las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75, determinada por el método del MTT (B) Determinación por PCR en tiempo real del ARNm codificante para BNIP3. (C) Determinación por western blot de la expresión de LC3 en cultivos de células SF295, SF539 y SNB75 en los que se realizó interferencia de ARN para BNIP3 y posteriormente se incubó en presencia de yessotoxina durante 24 hs. \* Diferencia significativa con respecto a las células tratadas con BNIP-iRNA y yessotoxina (n = 5, p<0.01).  
15  $\Delta$  Diferencia significativa con respecto a los controles (n = 5, p<0.01).

## EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### EJEMPLO 1. EFECTO DE LA YESSOTOXINA EN LA VIABILIDAD DE CULTIVOS DE CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

25 Las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 se cultivaron en placas de 96 pocillos en medio RPMI suplementado con penicilina 14285 U/ml, estreptomicina 28 mg/ml, y suero 10 %, y se mantuvieron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se sembraron 20000 células por pocillo y 24 hs después se trataron con yessotoxina disuelta en DMSO, en un rango de concentraciones de 1-250 nM. Las células control fueron tratadas con vehículo. Cuatro horas antes de terminar los tiempos de incubación en estudio, 24, 48 y 72 hs, se agregó el reactivo MTT 5 mg/ml diluido en PBS. Al finalizar los respectivos tiempos de incubación, se midió la cantidad de MTT reducido por las mitocondrias celulares, como medida de viabilidad, diluyéndolo en DMSO y midiendo absorbancia a 570 nm, utilizando una longitud de onda de referencia de 670 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se transformaron en porcentaje, estableciendo 100 % de viabilidad para los cultivos control. Los resultados muestran que la línea más sensible a yessotoxina es la SF295. La línea SF539 presenta una sensibilidad intermedia, mientras que la SNB75 es resistente a la toxina durante las primeras 48 hs pero no a las 72 hs en donde se observa una pronunciada disminución de la viabilidad (Figura 1A).

40 A partir de los experimentos anteriores se seleccionaron 2 concentraciones de yessotoxina para realizar los experimentos que se muestran en los siguientes ejemplos. Estas concentraciones fueron 30 y 250 nM. Para confirmar la efectividad de estas concentraciones de yessotoxina, se realizaron nuevos experimentos de determinación de viabilidad, por el método del MTT, en las 3 líneas tratadas con yessotoxina 30 y 250 nM durante 24, 48 y 72 hs. Se determinó que la yessotoxina induce una disminución en la viabilidad de aproximadamente un 50 % en las células SF295 después de 48 hs, mientras que la misma disminución en la viabilidad se observa en células SF539 después de 48 hs pero con yessotoxina 250 nM. Las células SNB75 no mostraron variaciones en la viabilidad para estas dos concentraciones de yessotoxina después de 24 y 48 hs, mientras que presentaron una importante disminución en la viabilidad de aproximadamente un 40% y un 70% para la yessotoxina 30 y 250 nM respectivamente después de 72 hs (Figura 1B).

55 Las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 se cultivaron en una placa de 12 pocillos en las mismas condiciones que se describen arriba. Cuando las células alcanzaron un 80 % de confluencia, se trataron con yessotoxina 30 y 250 nM. Después de 24, 48 y 72 hs de incubación, se analizó por microscopía de campo claro. Se fotografiaron campos representativos de los cultivos tratados con yessotoxina o control. Se puede observar que las células SF295 empiezan a verse afectadas a partir de las 24 hs, siendo la muerte celular progresiva hasta las 72 hs, tiempo en el que casi no se observan células con fenotipo normal. En el caso de las células SF539, después de 24 hs en presencia de toxina no se observan alteraciones importantes en los cultivos, mientras que estas se hacen evidentes a las 48 y 72 hs. No se observan alteraciones fenotípicas evidentes en los cultivos de células SNB75 tratados con yessotoxina hasta las 48 hs, mientras que después de 72 hs de tratamiento los cultivos se ven afectados, presentando menores cantidades de células (Figura 1C).

EJEMPLO 2. EFECTO DE LA YESSOTOXINA EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DE CULTIVOS DE CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

5 Las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 se cultivaron en placas de 6 pocillos en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1. Las células al 80 % de confluencia fueron tratadas con yessotoxina 30 nM para los cultivos de SF295 y 250 nM para los cultivos de células SF539 y SNB75. Después de 24 hs se lisaron los cultivos con el tampón RIPA (NaCl 150 mM, Triton X100 1 %, Iodo Deoxicolato 0,5 %, SDS 0,1 %, Tris 50 mM, pH 8) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (SIGMA). Los lisados fueron centrifugados y posteriormente se determinó la concentración de proteínas en la fracción soluble por el método de Bradford. Se analizó la variación en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y PERK y el nivel de expresión de DDIT3 por western blot. Para esto, cantidades iguales de proteínas para los distintos tratamientos se sembraron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se corrieron a 50 V durante 2 hs. Posteriormente se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF a 100 V durante 1 h. Las membranas se incubaron durante 3 hs con anticuerpos primarios anti-phospho eIF2 $\alpha$ , -phospho PERK, -DDIT3 y -tubulina disueltos 1:300 (anti-phospho eIF2 $\alpha$  y -phospho PERK), 1:500, 1:5000 respectivamente en leche desnatada 3 % suplementada con TWEEN 20 0,1 %. Al finalizar la incubación con los anticuerpos primarios, se lavaron las membranas 3 veces con PBS suplementado con TWEEN 20 0,1 % durante 15 min con agitación. Posteriormente se incubaron las membranas con anticuerpo secundario 1:5000 disuelto en leche desnatada 3 % suplementada con TWEEN 20 0,1 %, durante 1 h. Las membranas se revelaron utilizando el reactivo Supersignal West Pico (FISHER) detectando quimioluminiscencia con el sistema DYVERSITY de SYNGENE. Se observó un aumento en la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y PERK en las células, de las 3 líneas, tratadas con yessotoxina. Esto indica la activación de PERK, uno de los sensores de estrés en el retículo endoplásmico. También se observó un aumento en los niveles de DDIT3 en las células tratadas con yessotoxina. Esto es indicativo de estrés en el retículo endoplásmico (Figura 2A).

Las bandas obtenidas por western blot fueron cuantificadas por densitometría utilizando la señal de la tubulina para normalizar la concentración de las proteínas en estudio. Para esto se utilizó el software de análisis de imagen GENETOOLS de SYNGENE. El aumento de fosfo-eIF2, fosfo-PERK y DDIT3 es significativo con una  $p < 0.01$  (\*) (Figura 2B).

Se utilizaron los oligonucleótidos hXBP1.3S (SEQ ID NO: 1) y hXBP1.12AS (SEQ ID NO: 2) para amplificar XBP1 a fin de detectar splicing alternativo inducido por estrés en el retículo endoplásmico. Estos oligonucleótidos hibridan en posiciones flanqueantes a la zona en la que se produce el splicing de XBP1 por parte de IRE1, lo que permite identificar ambas especies (uXBP1 y sXBP1) por electroforesis después de su amplificación por PCR. Las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 se cultivaron en placas de 12 pocillos en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1. Las células al 80 % de confluencia fueron tratadas con yessotoxina 30 nM para los cultivos de SF295 y 250 nM para los cultivos de células SF539 y SNB75. Se purificó ARN total de las células 24 o 48 hs después de agregada la yessotoxina, utilizando PureZol (BIORAD), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN, después de ser tratado con ADNasa, fue utilizado para reacciones de transcripción reversa, con un oligo-dT, utilizando la enzima RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV reverse transcriptase (FISHER) y siguiendo las instrucciones del fabricante, a fin de generar ADNc a partir del ARNm. El ADNc se amplificó por PCR, con la DNA polimerasa DreamTaq DNA polymerase (FISHER) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando los oligonucleótidos para XBP1 que se describen arriba. Se realizaron 25 ciclos de amplificación con temperaturas de hibridación, amplificación y desnaturalización de 55, 72 y 95°C respectivamente. Al mismo tiempo se amplificó en las mismas muestras tubulina utilizando en mismo programa de amplificación, a fin de establecer la igualdad de carga de ADNc para las distintas reacciones de amplificación. Los productos de PCR se separaron, por electroforesis, en un gel de agarosa 1,8 % suplementado con bromuro de etidio. Se analizaron los geles utilizando el sistema DYVERSITY de SYNGENE. Se observó un aumento de uXBP1 (unspliced XBP1) y la aparición de sXBP1 (spliced XBP1) en las células de las 3 líneas tratadas con yessotoxina. En el caso de las líneas SF, esto se observó a las 24 hs mientras que en la línea SNB75 no se observó hasta las 48 hs (Figura 2C). El incremento en uXBP1 es indicativo de la activación de ATF6, mientras que la aparición de sXBP1 confirma la activación de IRE1, ambos componentes del sistema que censa el estrés en el retículo endoplásmico.

EJEMPLO 3. EFECTO DE LA YESSOTOXINA EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DE CULTIVOS DE CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

60 En este ejemplo se muestra la variación de expresión de los genes relacionados con el estrés en el retículo endoplásmico en células tratadas con yessotoxina. Cultivos de células SF295 se trataron con yessotoxina 30 nM y cultivos de células SF539 y SNB75 se trataron con yessotoxina 250 nM. Las células

se incubaron en estas condiciones durante 6 y 24 hs. Luego de los respectivos períodos de incubación las células se lavaron con PBS y se extrajo ARN total utilizando el kit comercial RNeasy Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ARN extraído se determinó espectrofotométricamente utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). La integridad y pureza del ARN se determinó utilizando un bioanalizador (Bioanalyzer 2100-Applied Biosystems) junto con el kit comercial RNA 6000 Nano Reagents (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se sintetizó el ARN marcado fluorescentemente para analizar expresión diferencial utilizando los kits comerciales Low RNA Input Linear Amp Kit (Agilent Technologies) y Quick-Amp Labeling Kit (Agilent Technologies). El RNA fluorescente se hibridó en microarrays para detección de expresión diferencial de ARN en genoma humano (Whole Human Genome (4x44) Oligo Microarray Kit, Agilent Technologies). Luego de lavar los microarrays se determinó la fluorescencia con un scanner G2505 (Agilent Technologies). Los resultados se normalizaron y posteriormente se analizaron a fin de determinar expresión diferencial entre cultivos control y tratados con yessotoxina utilizando el software MeV, parte de TM4 (Microarray Software Suite). Aparecen sombreados los genes que están involucrados en procesos de muerte celular (Figura 3A).

La tabla 1 muestra los niveles de expresión de BNIP3, BNIP3L, DDIT3, EIF2AK3, NDRG1, PHLDA1, TNFRSF10A, TRIB3 en cultivos de células SF295, SF539 y SNB75 tratados con YTX durante 24 h. Todos los incrementos que se muestran en la tabla 1 son estadísticamente significativos cuando se comparó con los valores de expresión obtenidos en cultivos control. Se utilizaron las pruebas de *Significance analysis of Microarrays* y *Rank Products* a fin de establecer que las variaciones observadas eran significativas con una  $p < 0.01$ .

	SF295	SF539	SNB75
BNIP3	2.6±0.1	1.3±0.01	1.3±0.1
BNIP3L	2.5±0.1	1.4±0.1	1.5±0.1
BNIP3L	2.5±0.1	1.5±0.1	1.6±0.1
DDIT3	3.5±0.2	1.8±0.3	2.3±0.1
EIF2AK3	2.7±0.03	0.8±0.2	1.3±0.1
NDRG1	4.0±0.2	2.2±0.1	1.7±0.2
NDRG1	4.3±0.1	2.4±0.1	2.0±0.2
PHLDA1	0.4±0.1	2.7±0.03	1.5±0.01
PHLDA1	0.8±0.1	2.8±0.02	1.8±0.08
PHLDA1	0.7±0.03	3.0±0.2	2.5±0.1
PHLDA1	0.8±0.1	1.9±0.03	2.3±0.1
TNFRSF10B	1.0±0.1	1.1±0.01	0.3±0.01
TNFRSF10B	1.4±0.04	1.1±0.06	0.5±0.07
TRIB3	2.7±0.1	1.8±0.02	2.2±0.2
TRIB3	3.3±0.03	2.4±0.1	2.0±0.2

Tabla 1

A partir de los datos obtenidos como se describe en el párrafo anterior, se generaron gráficos de expresión y del centroide para los genes relacionados con la muerte celular que se expresan en respuesta al estrés en el retículo endoplásmico. Se puede observar que existe un importante aumento en la expresión de estos genes entre las 6 y 24 hs de tratamiento con yessotoxina (Figura 3B).

EJEMPLO 4. EFECTO DE LA YESSOTOXINA SOBRE EL CICLO CELULAR Y LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN CULTIVOS DE CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75.

5 La inhibición del ciclo celular en células SF295, SF539 y SNB75 se analizó por citometría de flujo. Para esto, cultivos de células al 80 % de confluencia se trataron con yessotoxina 30 o 250 nM durante 24 y 48 hs. Posteriormente, se levantaron las células con tripsina 0,25 % y EDTA 0,2 %. Las células se lavaron 3 veces con PBS suplementado con BSA 0,1 %. Posteriormente se fijaron en etanol 70 % a -20°C durante 30 min. Después de la fijación, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron en presencia de yoduro de propidio 100 µg/ml y ARNasa 10 mg/ml. Se analizaron las células en un citómetro de flujo 10 AMNIS, capturando 10000 eventos de cada tratamiento. Se puede observar que la yessotoxina inhibe el ciclo celular en G0/G1, de manera significativa con una  $p < 0.01$ , en las 3 líneas estudiadas. No se detectó un aumento significativo en la población subG0 después del tratamiento con yessotoxina (Figura 4A).

15 El efecto de la yessotoxina sobre la síntesis de proteínas se estudió por cuantificación de L-Leucina tritiada ( $^3\text{H}$ -L-Leucina) que se incorporó a las proteínas en un determinado periodo de tiempo, comparando los controles, los cultivos tratados, y las células tratadas con cicloheximida 10 µM (empleada como control positivo de inhibición de síntesis proteica). Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron con yessotoxina 30 nM, para la línea SF295, o 250 nM, para las líneas SF539 y SNB75, durante 6 y 24 hs. Cinco horas antes de que el periodo de incubación se completase, se añadió a los cultivos [ $^3\text{H}$ ]-L-Leucina (140Ci/mmol) (Hartmann Analytic) a una concentración de 5 µCi/ml. Transcurridas 20 las 5 h, las células se lavaron una vez con HBSS (Gibco) y después 2 veces con ácido tricloroacético (ATC) 10% a 0°C. Por último, para lisar la monocapa se agregaron 150 µl de NaOH 0,3 M en cada pocillo. El contenido de cada pocillo se transfirió a tubos eppendorf en donde la digestión se completó durante 1 h. Cien microlitros de cada lisado se añadieron a 2 ml de líquido de centelleo Ultima Gold™ (Perkin Elmer), y éstas muestras se contaron durante 5 min en un contador de centelleo Beckman LS6500. Para poder relacionar la tasa de síntesis proteica con la cantidad total de células presentes en cada muestra, se incubaron 5 µl de cada lisado y diluciones seriadas (de 0 a 800 ng) de ADN de esperma de salmón (Sigma) en una solución de Tris 0,2M, NaCl 0,2M, EDTA 1mM y Hoechst 33258 (Sigma) 4µg/ml, pH=7,4. Después se determinó la fluorescencia de cada muestra con un espectrofluorímetro Bio-Tek FL600, empleando unas longitudes de onda de excitación y emisión de 356 y 458nm respectivamente. La concentración de proteína radiactiva se corrigió referenciando cada muestra a la concentración de DNA presente en cada lisado. Ésta se obtuvo por extrapolación de la curva patrón de ADN generada con las diluciones del ADN de esperma de salmón. En el ejemplo se muestra que la yessotoxina inhibe la síntesis de proteínas de manera progresiva en células SF295 desde las 6 a las 24 hs. Lo mismo sucede con la línea SF539 pero en menor magnitud a las 6 hs. En la línea SNB75 se observa inhibición de síntesis de proteína a las 24 hs sin observarse cambios significativos a las 6hs (Figura 4B).

El efecto de la yessotoxina sobre la expresión de las ciclinas que controlan el ciclo celular se determinó por análisis de experimentos de microarrays, como se describe en el Ejemplo 3. Se validaron los resultados obtenidos por microarrays por PCR en tiempo real utilizando oligonucleótidos específicos para ciclina A, B, D, E y F (CCNA, CCNB, CCND, CCNE y CCNF). Para esto el ARN extraído de las células tratadas con yessotoxina y control fue procesado como se describe en el ejemplo 2 a fin de obtener el ADNc y posteriormente cuantificar las ciclinas arriba mencionadas por esta técnica. Se utilizó un equipo de PCR en tiempo real StepOne (Applied Biosystems) y el kit de amplificación FastStart Universal SYBR Green Master (ROCHE). Se puede observar que por ambas técnicas experimentales se obtienen resultados similares que muestran un aumento en la expresión de los ARNm analizados. En el ejemplo, se muestra que hay una disminución en la expresión de ciclinas en las 3 líneas celulares tratadas con yessotoxina (Figura 4C). Cabe destacar que ante el estrés en el retículo endoplásmico, PERK a través de eIF2α detiene el ciclo celular produciendo una disminución de ciclina D, que es precisamente lo que se describe en este ejemplo. 50

EJEMPLO 5. INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA EN CULTIVOS DE CÉLULAS SF295, SF539 Y SNB75 TRATADAS CON YESSOTOXINA.

55 Cultivos de células SF295, SF539 y SNB75 tratadas durante 24 o 48 hs con yessotoxina o vehículo se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las monocapas celulares se fijaron con glutaraldehído 2,5 %, se lavaron con tampón cacodilato 0,025 M pH 7,4 y se fijaron nuevamente con OsO<sub>4</sub> 1 % en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4. Después de la fijación, se deshidrataron las muestras con etanol y se incluyeron en resina epoxi (TED-PELLA, Inc.). Se obtuvieron secciones ultra finas con un ultramicrotomo UltraCut R (Leica GMBH). Las secciones se analizaron por TEM (JEOL JEM-1011) y las micrografías se obtuvieron utilizando una cámara MegaView II. En las células tratadas con yessotoxina se observa la aparición de vesículas autofágicas con distintas organelas en su interior. Entre éstas se 60

encuentran peroxisomas y mitocondrias (Figura 5A). Esto demuestra que la yessotoxina induce autofagia en las 3 líneas celulares.

5 Se cultivaron células SF295, SF539 y SNB75 en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1. Se trataron con yessotoxina 30 nM (en el caso de SF295) y 250 nM (en el caso de SF539 y SNB75) durante 24 hs. Posteriormente se lisaron las células y las proteínas solubles se analizaron por western blot como se describe en el ejemplo 2 utilizando anti-LC3 como anticuerpo primario. Este anticuerpo se utilizó en una concentración 1:3000, mientras que el anticuerpo secundario se utilizó en una concentración 1:5000. Los tiempos de incubación con estos anticuerpos y el revelado de las membranas se hicieron de igual manera que se describe en el ejemplo 2. Se utilizó un anticuerpo primario anti-tubulina para demostrar que cantidades equivalente de proteína se cargaron en las calles de gel para electroforesis. Se observó la aparición de LC3 II y un aumento en LC I en las células tratadas con yessotoxina (Figura 5B). Esto es indicativo de inducción de autofagia.

15 Se cultivaron células SF295, SF539 y SNB75 en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1. Se trataron con yessotoxina como se describe en el párrafo anterior y las proteínas se analizaron por western blot como se describe en el ejemplo 2 utilizando un anti fosfo-mTOR (que reconoce mTOR fosforilado en SER2448) como anticuerpo primario. Este anticuerpo se utilizó en una concentración 1:1000, mientras que el anticuerpo secundario se utilizó en una concentración 1:5000. Los tiempos de incubación con estos anticuerpos y el revelado de las membranas se hicieron de igual manera que se describe en el ejemplo 2. Se utilizó un anticuerpo primario anti-tubulina para demostrar que cantidades equivalente de proteína se cargaron en las calles de gel para electroforesis. Se puede observar que la yessotoxina induce una disminución en la fosforilación de mTOR en SER2448 (Figura 5C). La inactivación de mTOR por desfosforilación en SER2448 induce autofagia.

25 EJEMPLO 6. LA INHIBICIÓN DE AUTOFAGIA REDUCE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LA YESSOTOXINA.

30 Las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 se cultivaron en placas de 96 pocillos en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1. Las células fueron tratadas con yessotoxina 30 o 250 nM, factor de crecimiento epitelial (EGF) y vehículo durante 48 hs. Se determinó viabilidad por el método de MTT como se describe en el ejemplo 1. El EGF, cuyo receptor activa mTOR, rescató parcialmente a las células tratadas con yessotoxina, lo que indica que la inhibición de mTOR por parte de la yessotoxina está involucrada en muerte celular (Figura 6A).

35 En extractos proteicos obtenidos de cultivos tratados como se describe arriba, se analizó la variación de expresión y splicing de LC3 por western blot de la misma manera que se describe en el ejemplo 5. En los cultivos tratados con EGF y yessotoxina se puede observar que la inducción de autofagia es menor que en los cultivos tratados solo con yessotoxina ya que en éstos últimos hay una mayor cantidad de LC3 I y II (Figura 6B). Esto indica que el EGF contrarresta parcialmente la inhibición de mTOR por parte de la yessotoxina.

40 En extractos proteicos obtenidos de cultivos tratados como se describe arriba, se analizó la variación en la fosforilación de mTOR en SER2448 por western blot como se describe en el ejemplo 5. En los cultivos tratados con EGF y yessotoxina se puede observar una mayor cantidad de mTOR fosforilado que en los extractos proteicos provenientes de cultivos tratados sólo con yessotoxina (Figura 6C). Esto indica que el aumento de fosfo-mTOR inducido por el EGF reduce la autofagia y consecuentemente la muerte por este mecanismo en las células de glioma.

45 Las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 se cultivaron en placas de 96 pocillos en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1. Las células fueron tratadas con yessotoxina 30 o 250 nM, 3-metil adenina y vehículo durante 24 y 48 hs. Se determinó viabilidad por el método de MTT como describe en el ejemplo 1. El inhibidor de autofagia 3-metil adenina (3MA), disminuyó la muerte celular inducida por la yessotoxina en las 3 líneas celulares analizadas (Figura 6D). Esto indica que la autofagia está involucrada en la muerte celular inducida por la yessotoxina.

55 EJEMPLO 7. LA YESSOTOXINA INDUCE UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE BNIP3 QUE ESTÁ INVOLUCRADA EN LA INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR POR AUTOFAGIA.

60 Las líneas celulares SF295, SF539 y SNB75 se cultivaron en placas de 96 pocillos en las mismas condiciones que se describen en el ejemplo 1. Al alcanzar un 60 % de confluencia, se realizó la interferencia de ARN para BNIP3 y con ARN no interferente como control negativo (*scrambled* ARN, indicado como SCRAM en la figura 7). Para esto se utilizó el reactivo GeneSilencer (Genlantis) y se

5 siguieron las instrucciones del fabricante. El RNA de interferencia utilizado proviene de Santa Cruz Biotechnology. Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 5 hs en medio sin suero y posteriormente hasta las 24 hs en medio con suero. Luego de la transfección las células fueron tratadas con yessotoxina 30 o 250 nM durante 24 o 48 hs y se analizó la viabilidad por el método del MTT como se describe en el ejemplo 1. Los resultados demuestran que el silenciamiento de BNIP3 induce citoprotección total, después de 24 hs en las líneas SF, o parcial, después de 48 o 72 hs en las 3 líneas celulares, ante la yessotoxina (Figura 7A). Esto implica a esta proteína, que está involucrada en la inducción de autofagia, en la muerte celular inducida por la yessotoxina.

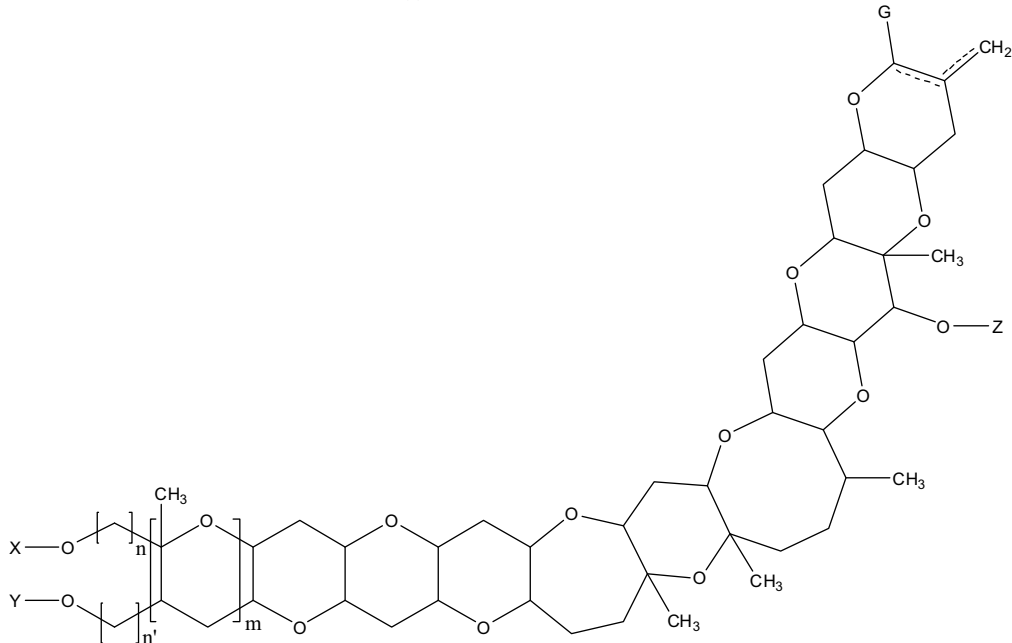
10 La disminución del ARNm para BNIP3 después de la interferencia se comprobó por PCR en tiempo real de la misma manera que se describe en el ejemplo 4. Se puede observar la disminución del mensajero para BNIP3 después del silenciamiento y posterior tratamiento con yessotoxina, cuando se compara con los resultados obtenidos para los cultivos tratados sólo con yessotoxina (Figura 7B).

15 A fin de establecer si el silenciamiento de BNIP3 produce una disminución de la autofagia se determinó la expresión y splicing de LC3, por western blot, en cultivos de células SF295, SF539 y SNB75 después de hacer el silenciamiento de BNIP3 como se describe arriba en este ejemplo y tratando con yessotoxina 30 o 250 nM durante 24 hs. Los experimentos de western blot se realizaron de la misma manera que se describe en los ejemplos 2 y 5. La expresión de LC3 I y II disminuye en los cultivos en que se silenció el  
20 ARNm de BNIP3 y posteriormente se trató con yessotoxina, cuando se compara con los cultivos tratados con yessotoxina (Figura 7C). Esto indica que la autofagia inducida por la yessotoxina está controlada por BNIP3.

25

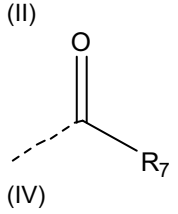
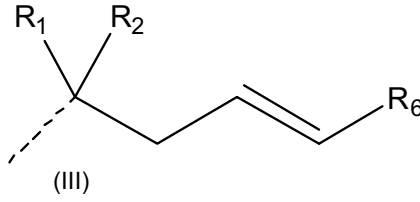
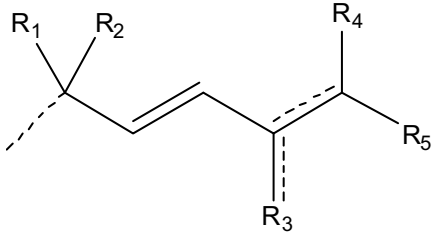
REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula (I) o sus isómeros:



5  
10

(I)  
donde:  
X e Y se seleccionan independientemente entre H o -SO<sub>3</sub>H,  
m es 0 ó 1,  
n y n' se seleccionan independientemente de un valor entre 0 a 5,  
Z se selecciona entre H, un monosacárido u oligosacárido,  
----- representa un enlace sencillo o doble,  
G es un grupo que se selecciona de entre los grupos de fórmula (II) a (IV):



15

(II)  
donde:  
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de entre -OH o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>;  
R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente de entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -OH, -COOH,  
=O;  
R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> se seleccionan independientemente de entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o amida,  
----- representa un enlace sencillo o doble,

25

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de gliomas.

2.-Uso según la reivindicación 1, donde X e Y son -SO<sub>3</sub>H.

3.-Uso según la reivindicación 1, donde X es H e Y es -SO<sub>3</sub>H.

4.-Uso según la reivindicación 1, donde X es -SO<sub>3</sub>H e Y es H.

5 5.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde m es 1.

6.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde m es 0.

7.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde n se selecciona de entre 1, 2 ó 3 y n' es 0.

10 8.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde n es 0 y n' se selecciona de entre 1, 2 ó 3.

9.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R<sub>1</sub> es metilo y R<sub>2</sub> es -OH.

15 10.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde G es el grupo de fórmula (II).

11.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, donde R<sub>3</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o -COOH.

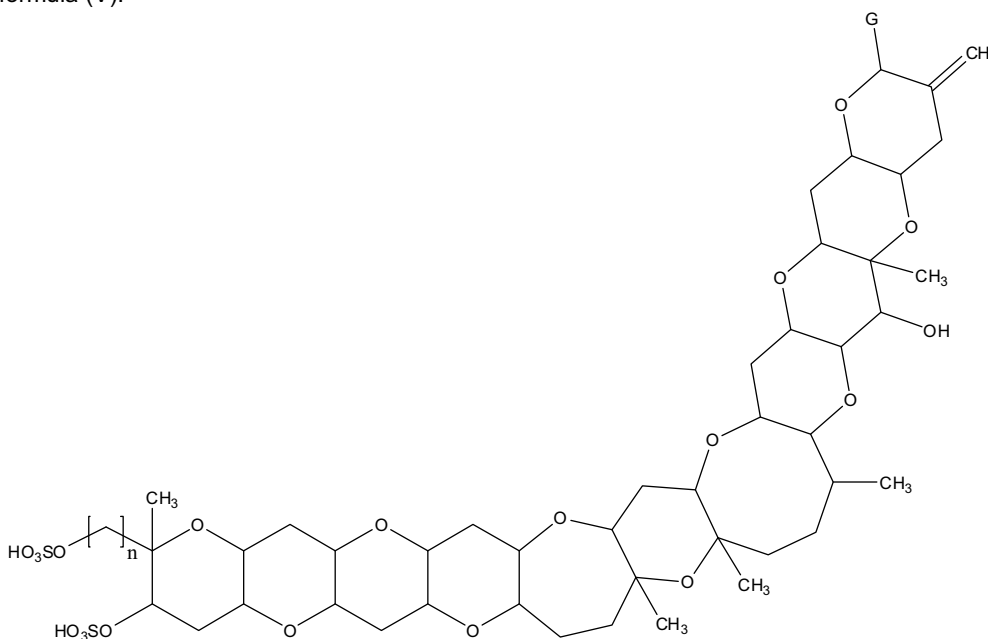
20 12.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 donde R<sub>4</sub> se selecciona entre H, -OH ó =O.

13.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 donde R<sub>5</sub> se selecciona entre H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o -OH.

25 14.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde R<sub>6</sub> se selecciona entre alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, alquenilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o amida.

15.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde R<sub>7</sub> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>.

30 16.-Uso según la reivindicación 1, donde X e Y son -SO<sub>3</sub>H, Z es H, n' es 0, m es 1 y se representa por la fórmula (V):



(V)

35

donde:

n se selecciona de entre 1, 2 ó 3,

G se define en las reivindicaciones anteriores.

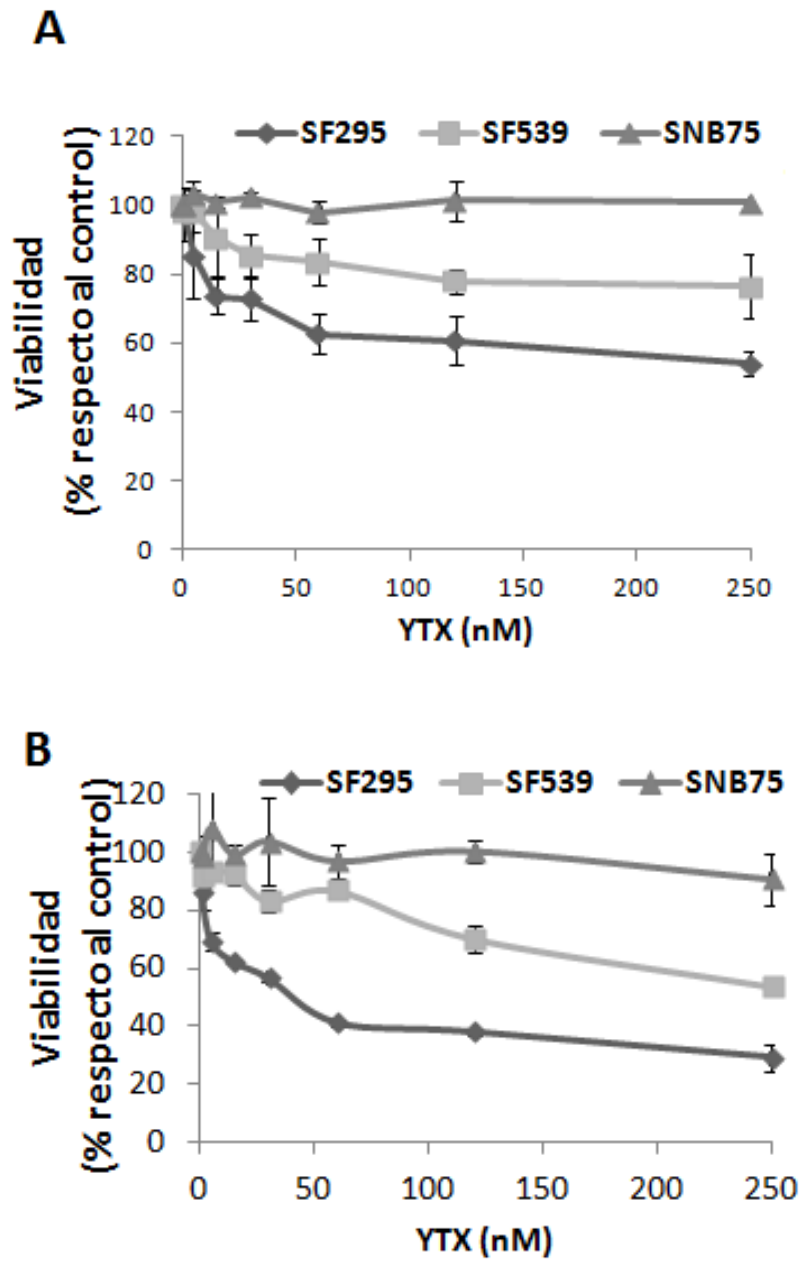
40

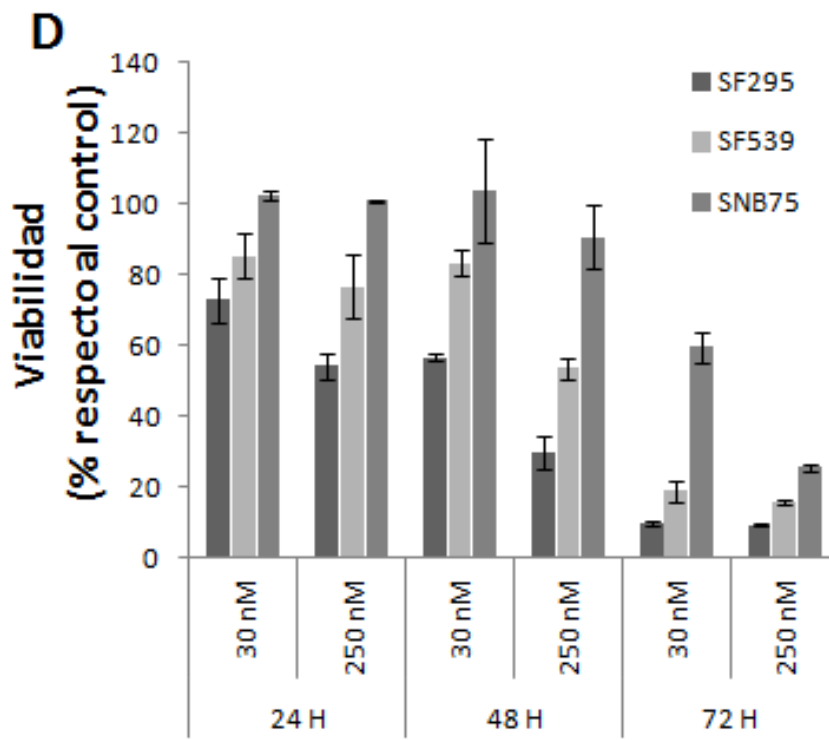
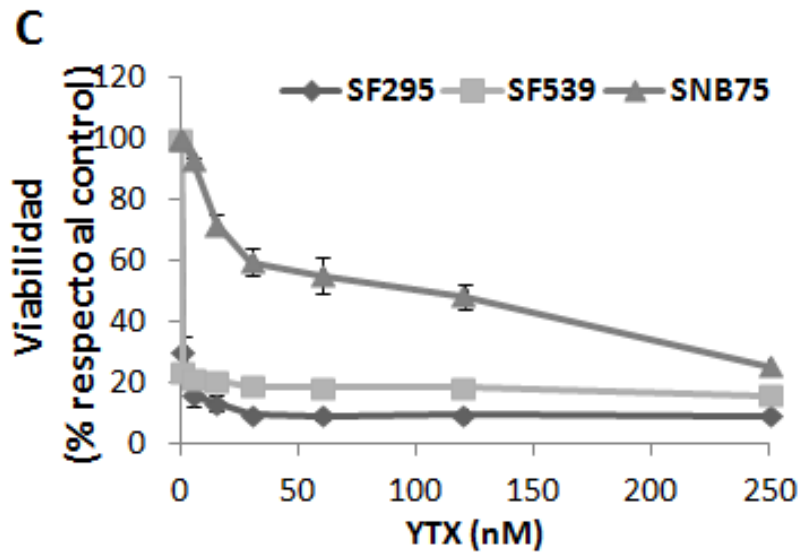
17.-Uso según la reivindicación 16, donde G es el grupo de fórmula (II).



- 18.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde R<sub>1</sub> es metilo y R<sub>2</sub> es -OH.
- 19.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde R<sub>3</sub> es un grupo =CH<sub>2</sub>.
- 5 20.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde R<sub>4</sub> es H.
- 21.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, donde R<sub>5</sub> es un etileno.
- 22.-Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el compuesto está en forma de sal.
- 10 23.-Uso según la reivindicación anterior, donde la sal es de un alcalino o alcalinotérreo.
- 24.-Uso según la reivindicación anterior, donde la sal es de sodio.
- 15 25.-Uso según la reivindicación 1, donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de la lista que comprende: yessotoxina (YTX), 45-hidroxi-YTX, 45, 46, 47-trinor-YTX, 45, 46, 47- trinorhormo- YTX, Homo-YTX, 45OH-homo-YTX, Carboxi-YTX, Carboxihomo-YTX, 45OH-carboxi-YTX, noroxo-YTX, noroxohomo-YTX, 40-epi-41-keto-YTX, 41-keto-YTX-1,3-enona, 41a-homo-YTX, 41a-homo-YTXamida, 44, 55-doOH-41a-homo-YTX, 45-OH-dinor-YTX, 44-oxotrinor-YTX, 41a-homo-44-oxotrinor-YTX, 1-desulfo-YTX, 1-desulfocarboxihomo-YTX, 4-desulfocarboxihomo-YTX, 9-metil-41-ceto-YTX-1,3-enona, 9-metil-41a-homo-YTX, 9-metil-41a-homo-YTXamida, 44, 55-diOH-9-metil-41a-homo-YTX, Nor-ring-A-YTX, 20 nor-ring-A-41-keto-YTX, nor-ring-A-40-epi-41-keto-YTX, nor-ring-A-41-keto-YTX-1,3-enona, glicosiyessotoxina A (GYTX-A), Protoceratina III, Yessotoxina 32-O-[[β-L-arabinofuranosyl-(5'→1'')-β-L-arabinofuranosido, Protoceratin II, Tri-glicosiyessotoxina y Protoceratin IV.
- 25 26.- Uso según la reivindicación anterior, donde el compuesto es yessotoxina.
- 27.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el glioma es un glioma con resistencia a apoptosis.
- 30 28.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el glioma es seleccionado del grupo que comprende: glioblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, oligo-astrocitomas, ependimomas y meduloblastomas.
- 35 29.- Uso del compuesto de fórmula general (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, como adyuvante en la terapia para el tratamiento del glioma.

FIG. 1





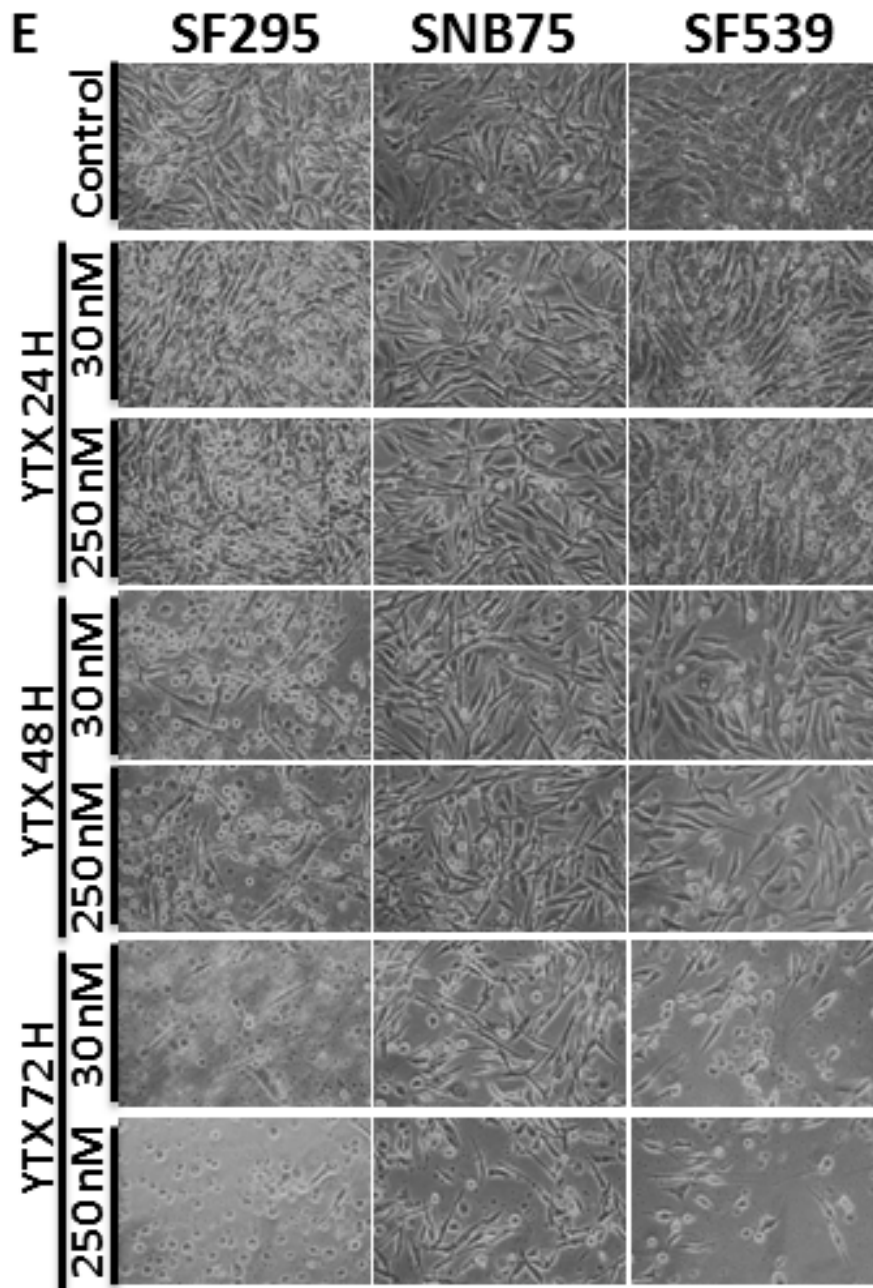
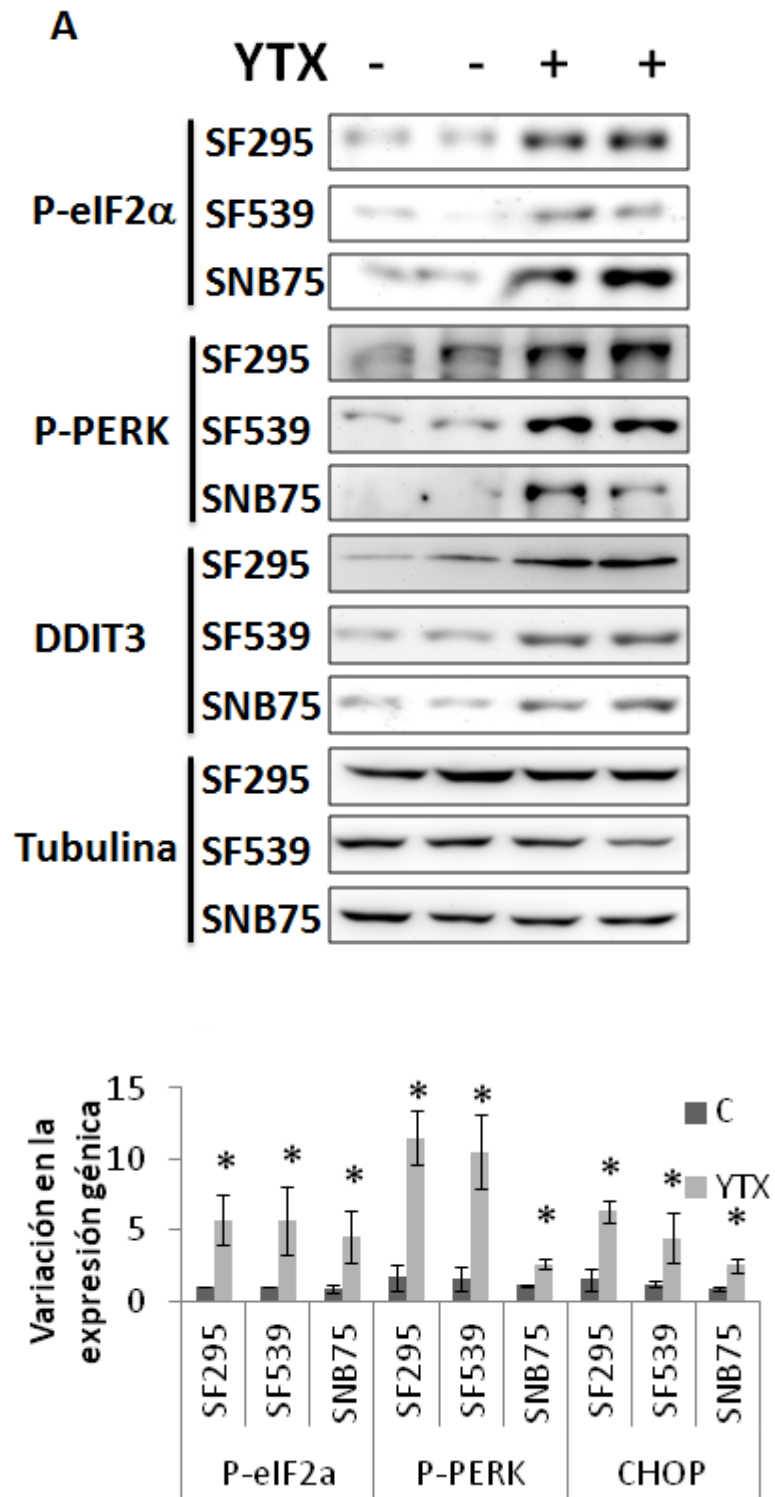


FIG. 2



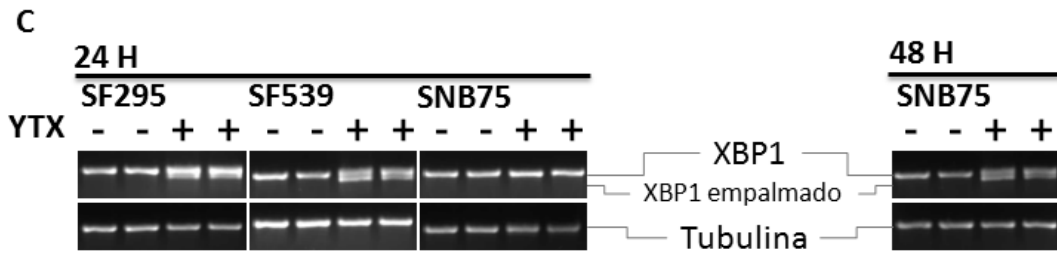


FIG. 3

**A**

ATF1	EDEM1	<b>PHLDA1</b>
ATF2	EIF2A	PPP1R15A
ATF3	EIF2AK3	SEL1L
ATF4	<b>ERN1</b>	SELS
<b>BNIP3</b>	ERO1LB	SREBF1
<b>BNIP3L</b>	HERPUD1	SREBF2
CEBPB	INSIG1	SYVN1
<b>DDIT3</b>	INSIG2	<b>TNFRSF10B</b>
DNAJB2	<b>MT3</b>	<b>TOR1A</b>
DNAJB9	NDRG1	TRIB3
		XBP1

FIG. 3A (continúa)



FIG 3A (continúa)

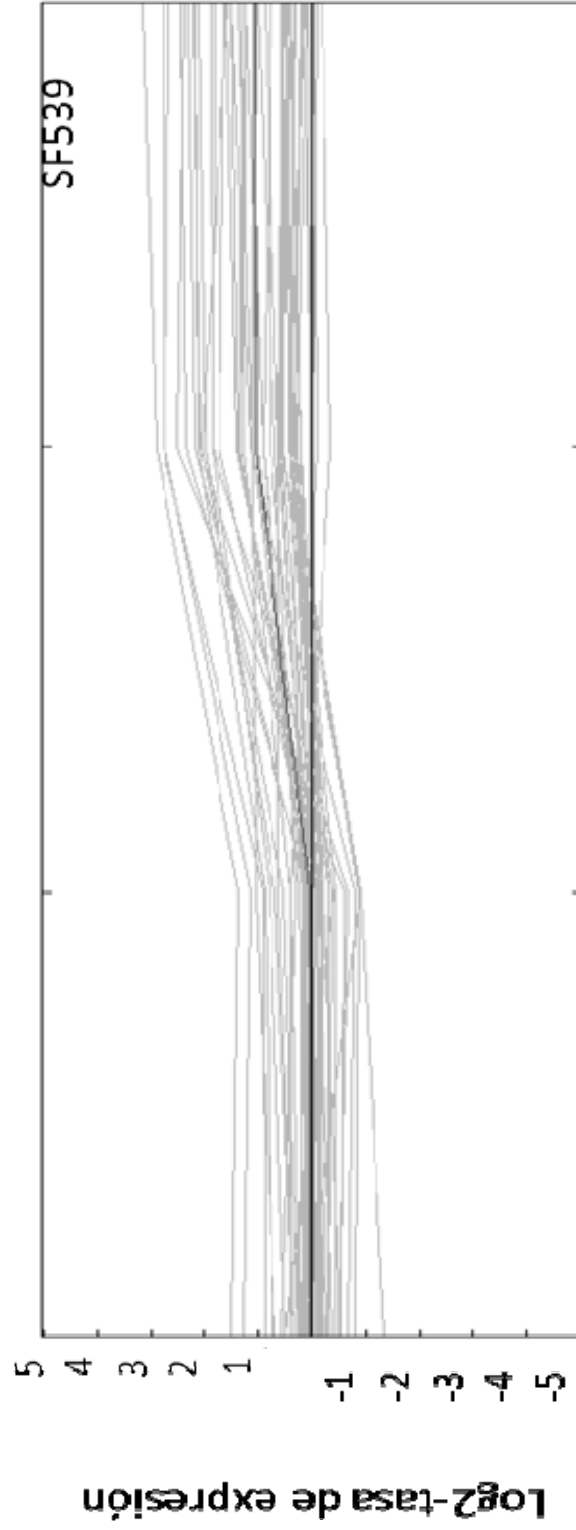
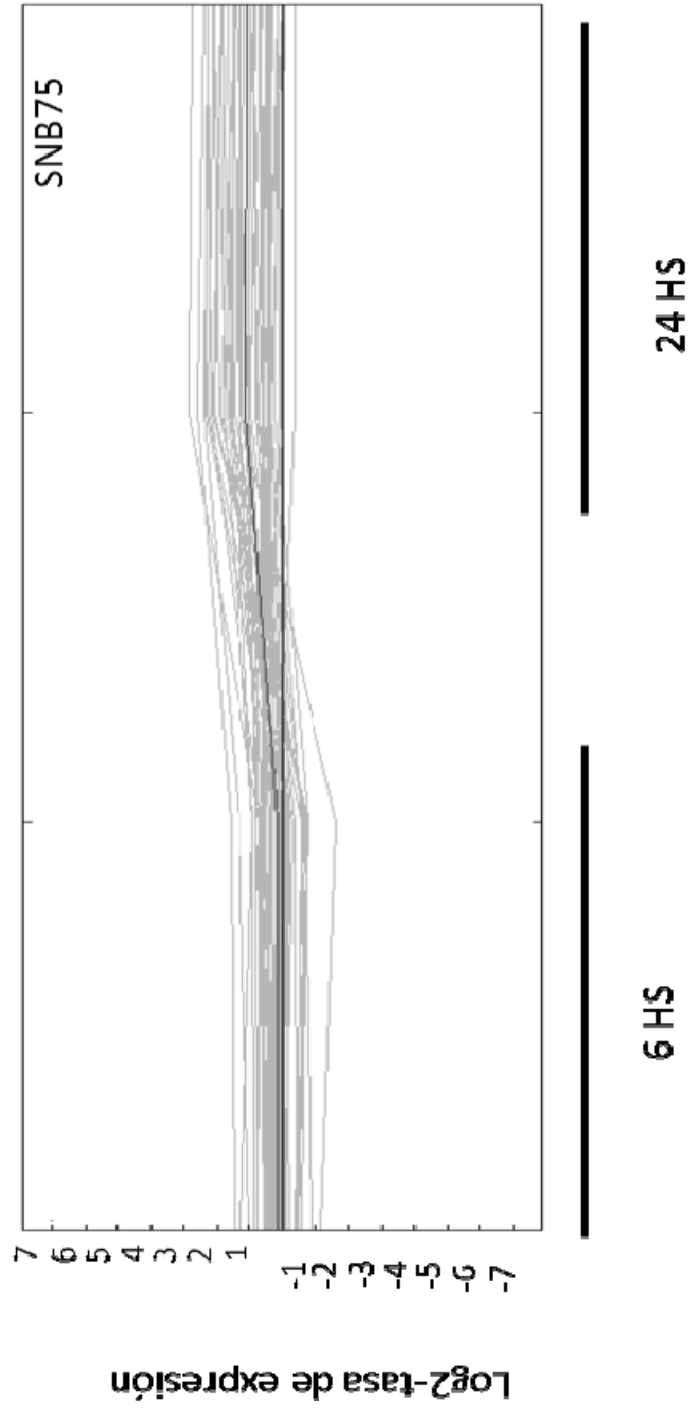




FIG. 3A (continúa)



B

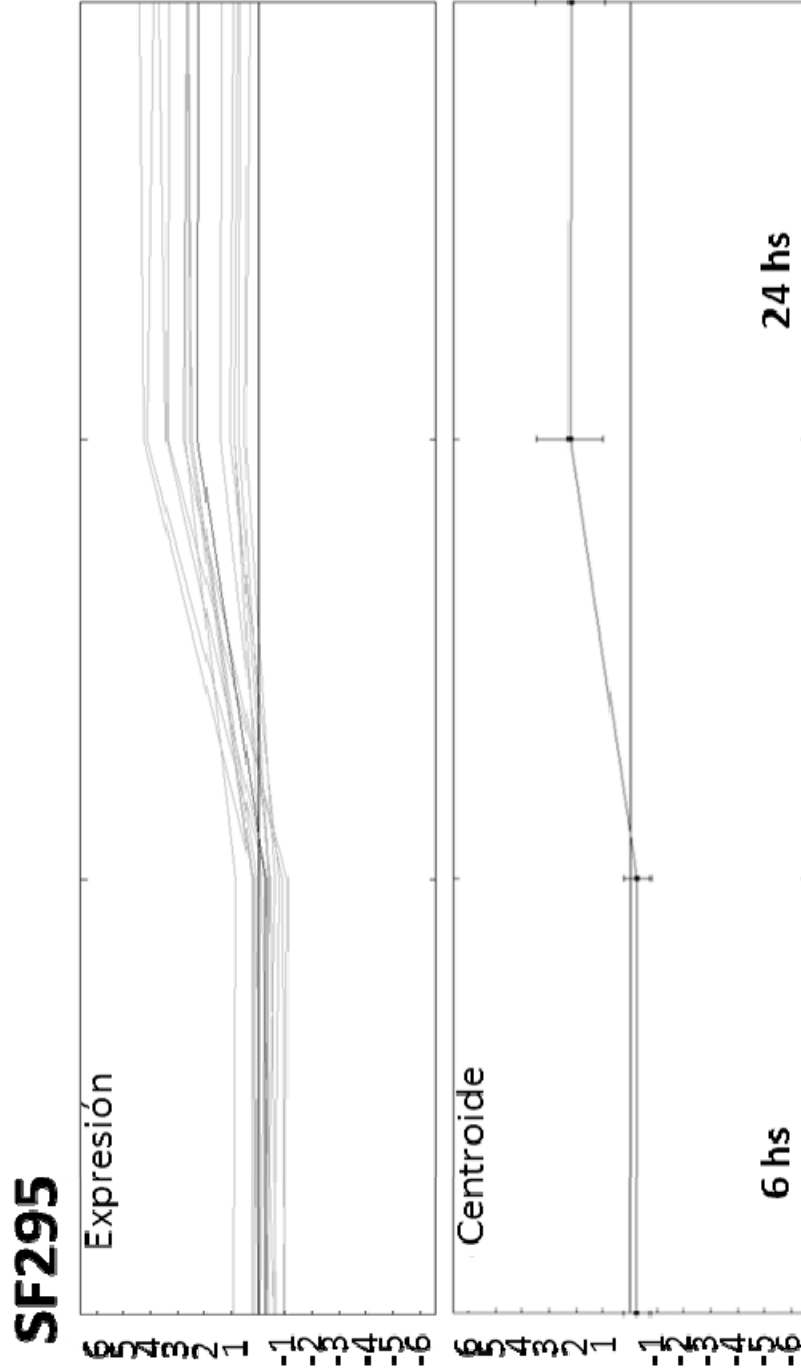


FIG. 3B (continúa)

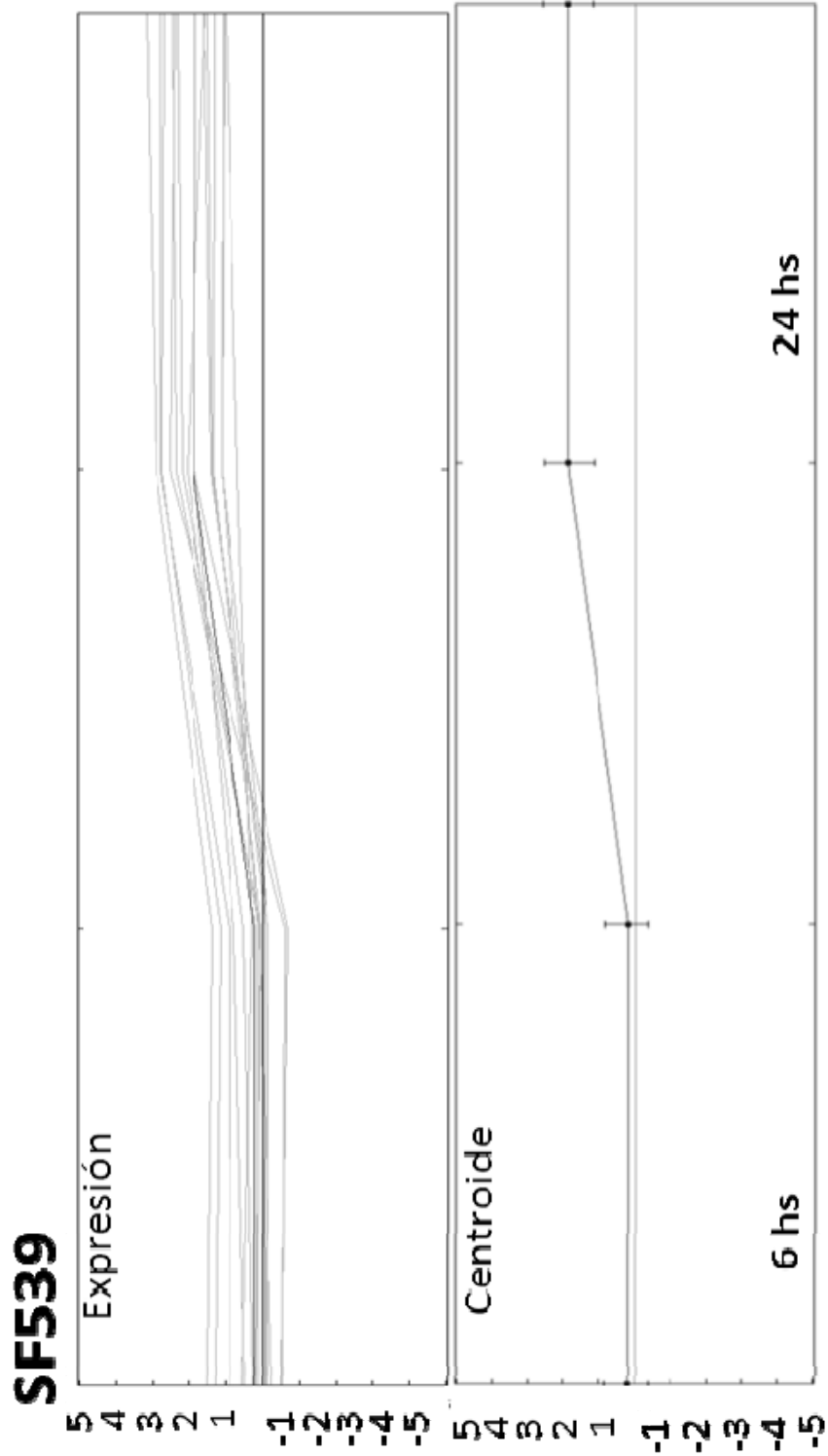


FIG. 3B (continúa)

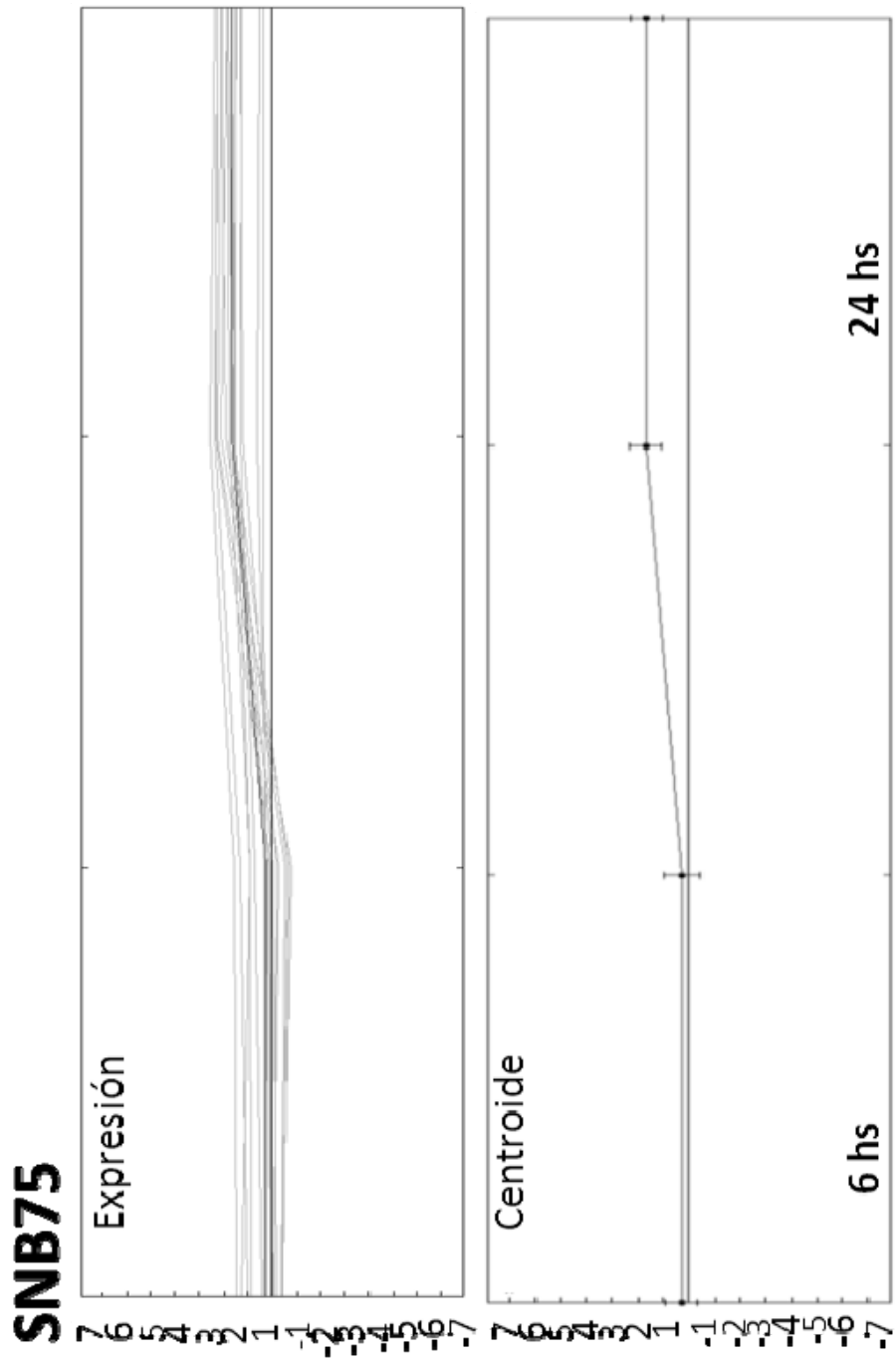


FIG. 4

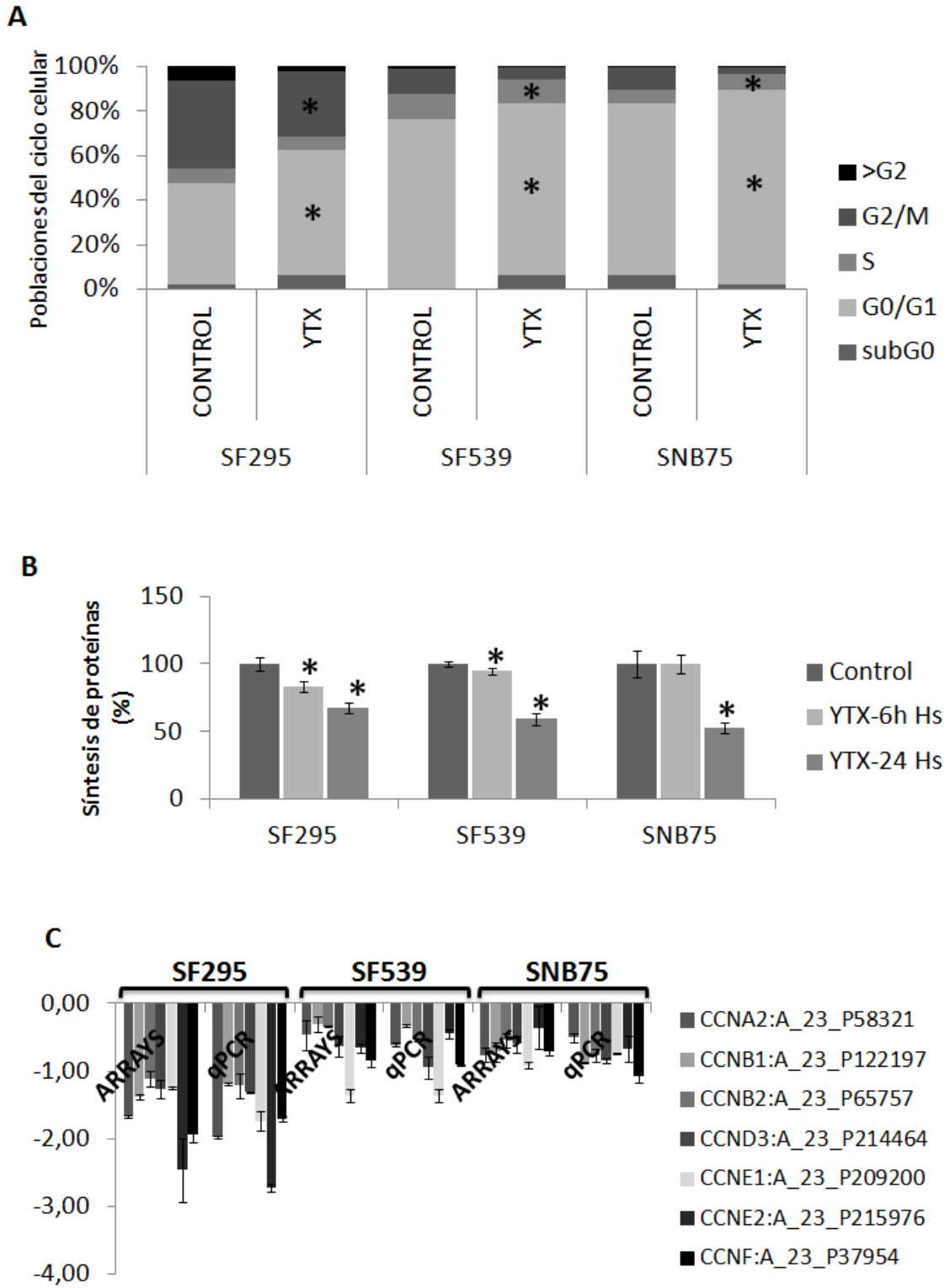
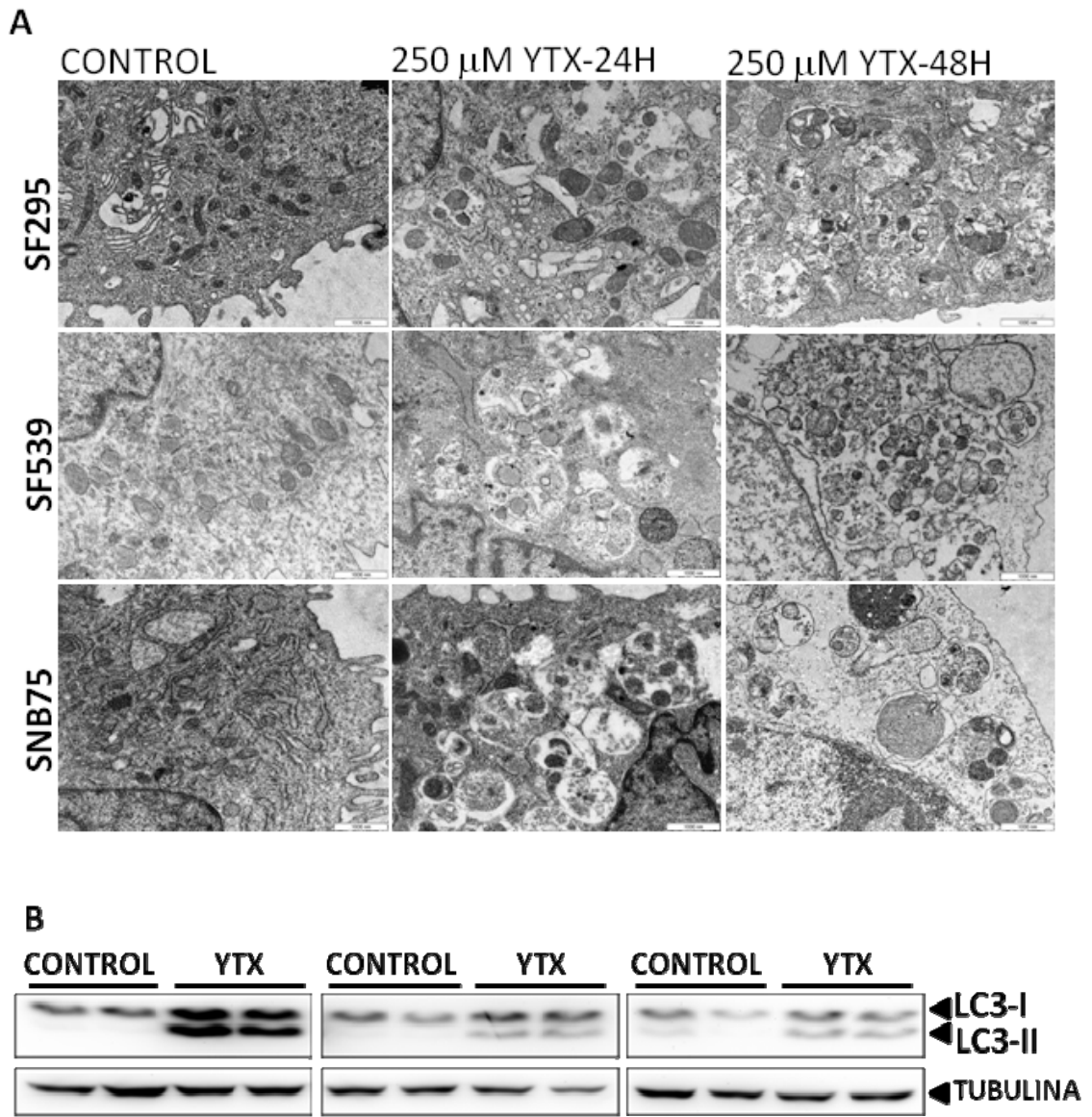


FIG. 5



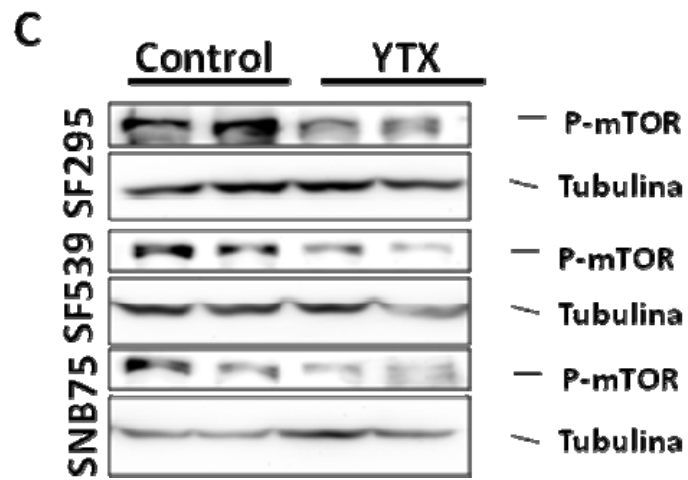
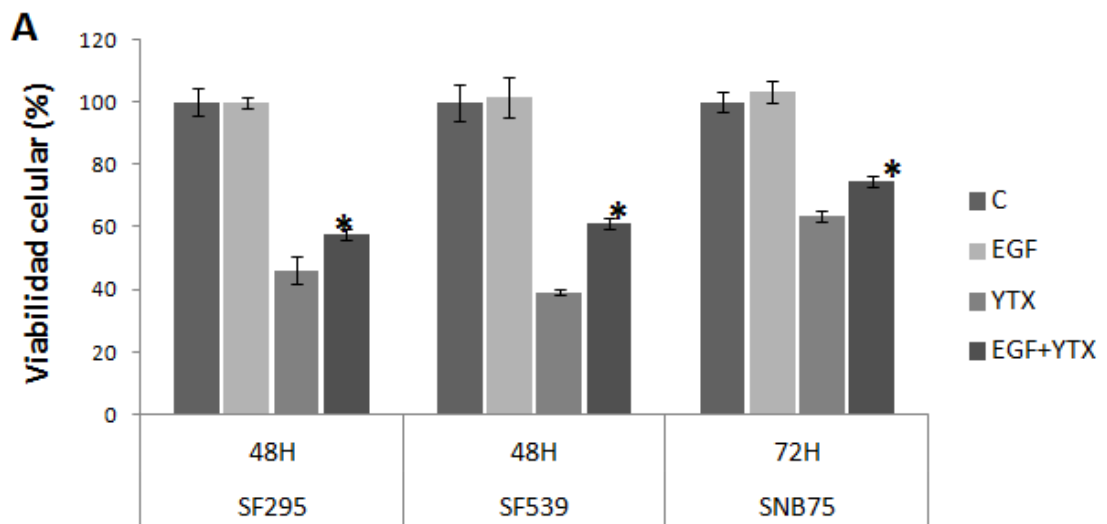
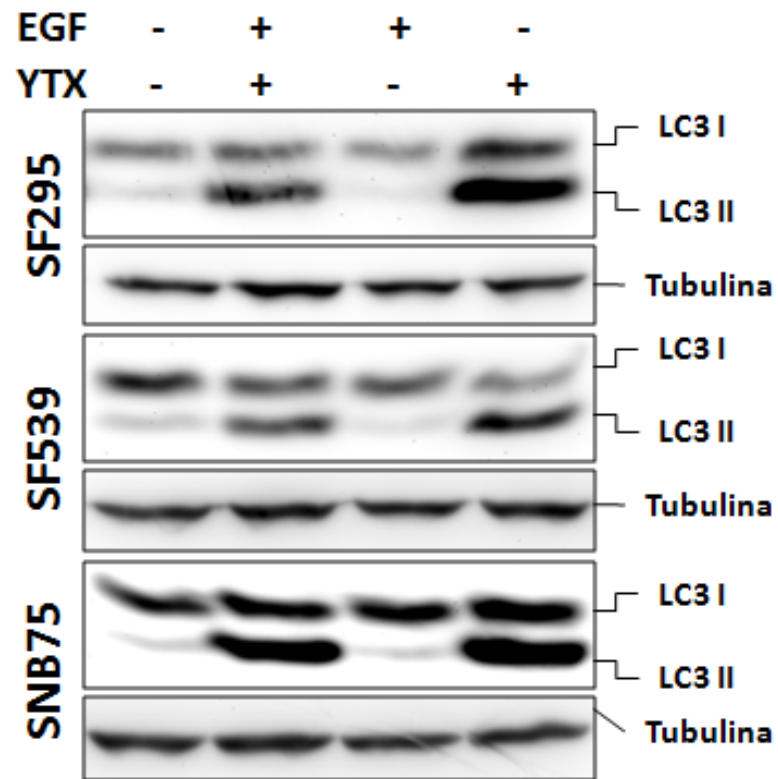


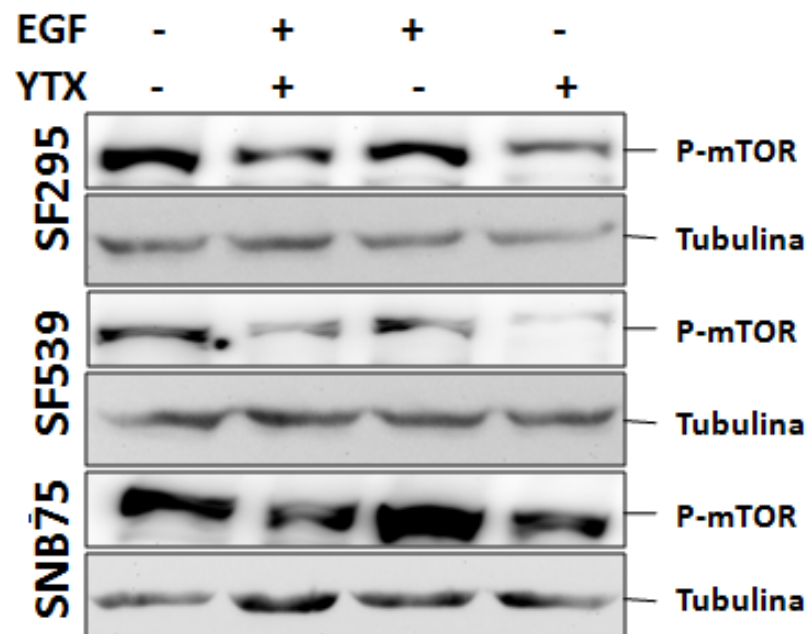
FIG. 6



**B**



**C**





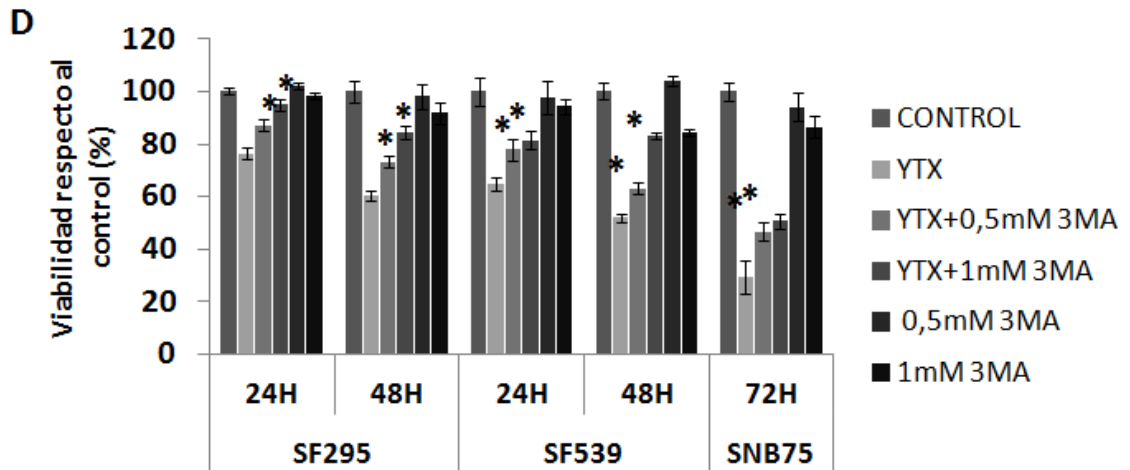
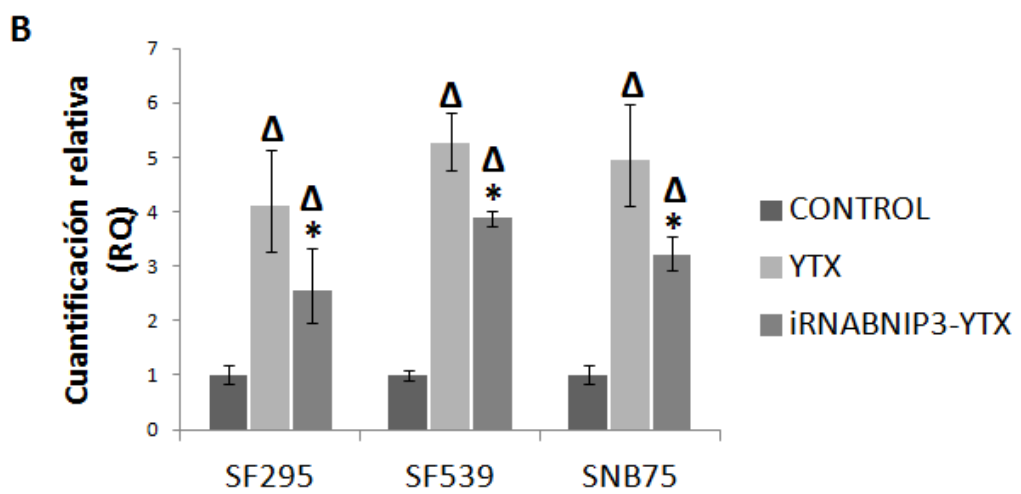
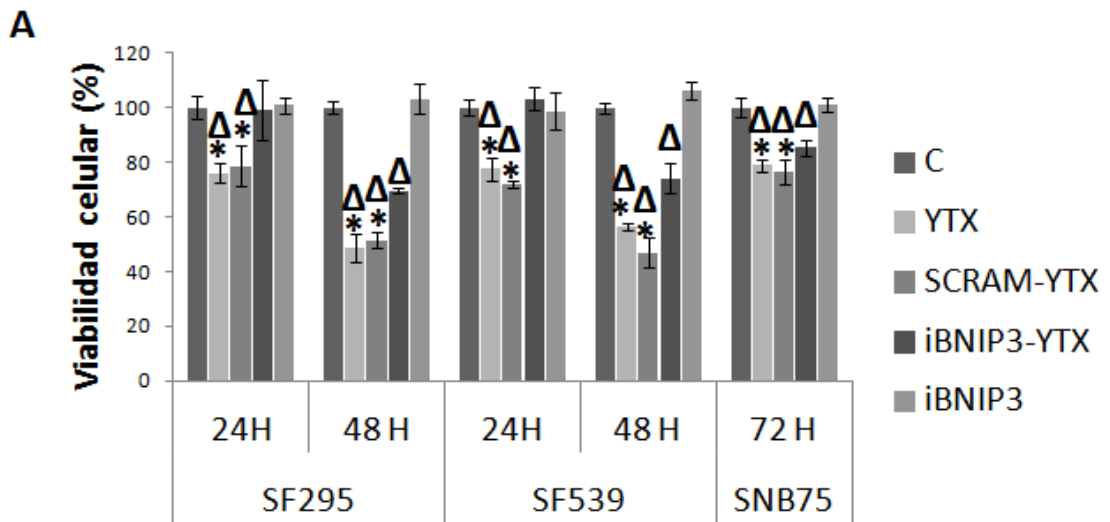
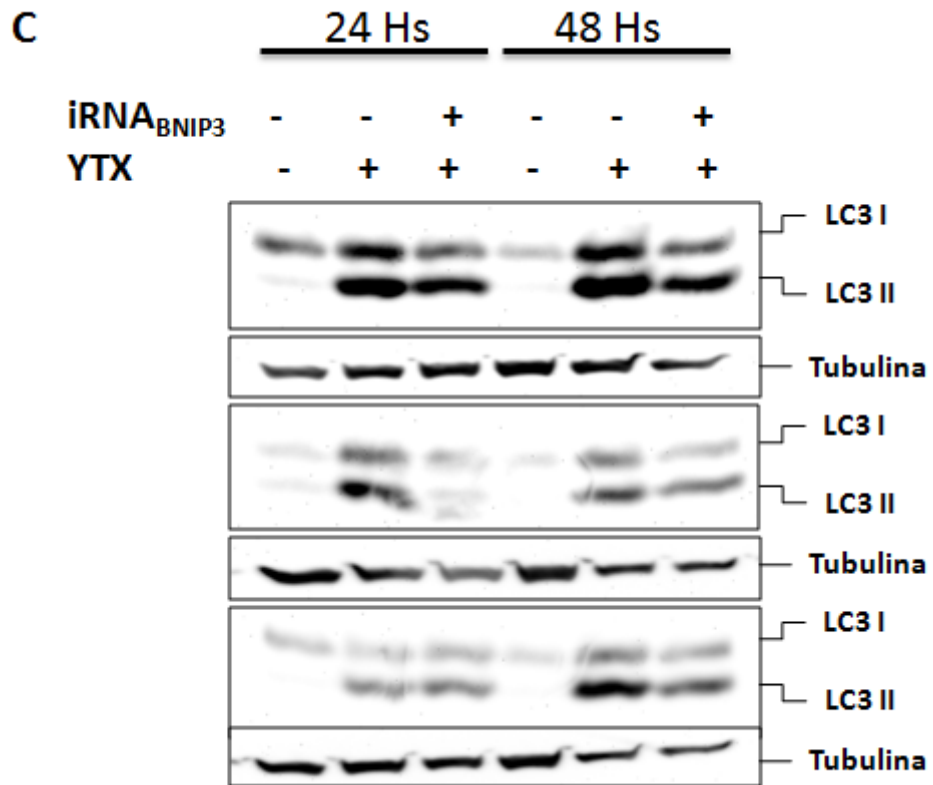


FIG. 7





# ES 2 393 696 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela

<120> Uso de la Yessotoxina y sus derivados para el tratamiento de gliomas

<130> 1596.42

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del oligonucleótido hXBP1.3S

<400> 1  
aaacagagta gcagctcaga ctgc 24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia del oligonucleótido hXBP1.12AS

<400> 2  
tccttctggg tagacctctg ggag 24



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201231398

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.09.2012

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2005012543 A2 (UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 10.02.2005, página 9, líneas 22-33.	1-29
A	OGINO, H. et al. "Toxicologic Evaluation of Yessotoxin". Natural Toxins 1997, Volumen 5, páginas 255-259. Ver página 255, resumen; página 256, columna 2, párrafo 4; página 258, columna 2, párrafo 1.	1-29
A	ALEXANDER, J. et al. "Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2006-065D)". The European Food Safety Authority (EFSA) Journal 2008, Volumen 907, páginas 1-62. Ver páginas 35-38, apartado 10.1; página 36, tabla 9.	1-29
A	LEIRA, F. et al. "Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line". Toxicology in Vitro 2002, Volumen 23, páginas 23-31. Ver página 23, resumen.	1-29
A	CAÑETE, E. & DIOGÈNE, J. "Improvements in the use of neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins". Toxicon 2010, Volumen 55, páginas 381-389. [Disponible en línea el 03.09.2009]. Ver página 381, resumen e introducción.	1-29
A	PANG, M. et al "Characterization of apoptotic changes induced by yessotoxin in the Bel7402 human hepatoma cell line". Molecular Medicine Reports 2011, Volumen 4, páginas 547-552. Ver página 547, resumen; columna 2, párrafo 2.	1-29

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
29.11.2012

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/352** (2006.01)

**C07D313/20** (2006.01)

**A61P35/00** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, EMBASE, NPL, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.11.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-29	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-29	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005012543 A2	10.02.2005
D02	OGINO, H. et al. Natural Toxins 1997, Vol. 5, pp. 255-259	1997
D03	ALEXANDER, J. et al. EFSA Journal 2008, Vol. 907, pp. 1-62	2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula (I), que incluye la **yessotoxina** y sus derivados, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de **gliomas**.

El documento D01 divulga el uso de la yessotoxina como inhibidor de la proliferación de **células neoplásicas**, lo que constituye un indicador de actividad antitumoral ampliamente utilizado para describir propiedades antitumorales de fármacos. En concreto, la yessotoxina resulta citotóxica para células de carcinoma hepatocelular humano, además de inducir apoptosis en células de **neuroblastoma**, lo que la hace susceptible de ser utilizada como fármaco antitumoral (ver página 9, líneas 22-33).

El documento D02 divulga un estudio sobre la toxicidad de la yessotoxina (ver página 255, resumen), que incluye los ensayos de citotoxicidad realizados utilizando **células de glioma de rata** (ver página 256, columna 2, párrafo 4; página 258, columna 2, párrafo 1).

El documento D03 divulga una serie de datos sobre la toxicidad de las biotoxinas marinas del grupo de la yessotoxina, lo que incluye la apoptosis como uno de los procesos moleculares implicados en el mecanismo de acción de estos compuestos (ver páginas 35-38, apartado 10.1). El documento enumera las líneas celulares sobre las que la yessotoxina induce **apoptosis** y **muerte celular**, entre las que se encuentran las **células de glioma de rata** (ver página 36, tabla 9).

Los documentos citados no se consideran lo suficientemente relevantes como para afectar a la novedad y a la actividad inventiva de la invención, sino que tan sólo muestran el estado de la técnica del campo al que pertenece dicha invención. Ninguno de ellos, tomado solo o en combinación con los otros, divulga ni contiene sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia el uso de los compuestos de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de gliomas.

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-29** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.