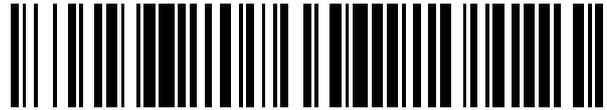


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 498**

51 Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/196 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2012 E 12705971 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2668274**

54 Título: **Inhibidores de aminotransferasa-1 de cadena ramificada (BCAT1) para el tratamiento de tumores cerebrales**

30 Prioridad:

28.01.2011 EP 11000720

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.04.2016

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**RADLWIMMER, BERNHARD;
TÖNJES, MARTJE;
BARBUS, SEBASTIAN y
LICHTER, PETER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 565 498 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de aminotransferasa-1 de cadena ramificada (BCAT1) para el tratamiento de tumores cerebrales

La presente invención proporciona un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de la aminotransferasa-1 de cadena ramificada (BCAT1) o (b) la expresión del gen que codifica BCAT1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor cerebral, en el que el tumor cerebral es un glioma o glioblastoma.

Los glioblastomas humanos malignos representan la mayoría de los tumores cerebrales humanos malignos. Hasta ahora, el tratamiento de los gliomas incluye técnicas neuroquirúrgicas (resección o procedimientos estereotácticos), terapia de radiación y quimioterapia. El estándar de atención actual para, por ejemplo, tumores astrocíticos, implica resección quirúrgica del tumor que puede ser seguida por quimioterapia con el agente alquilante oral Temozolamide (TMZ) y radioterapia. Sin embargo, los glioblastomas se consideran como incurables, ya que no responden a la radiación ionizante, la quimioterapia y la resección quirúrgica. En otras palabras, con estas terapias solo pueden conseguirse una prolongación muy limitada de la esperanza de vida de los pacientes. Esto significa que, a pesar de estas terapias, el promedio de esperanza de vida después del diagnóstico de cáncer es solamente de entre 12 y 16 meses. Sin embargo, algunos avances en la terapia para el glioblastoma han sido descritos por Jennifer Clarke et al. (Arch. Neurol. 2010, 67 (3), p. 279-283).

De esta manera, el problema técnico subyacente en la presente invención es el de proporcionar medios para la terapia de tumores cerebrales, glioblastomas o gliomas, que superen las desventajas de las terapias actuales y mejoren la supervivencia de los pacientes.

La solución de dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Durante los experimentos que han dado lugar a la presente invención se encontró que los inhibidores de BACT1 conocidos, tales como la gabapentina, que han sido usados hasta ahora por ejemplo como fármacos anticonvulsivos, representan una novedosa opción de tratamiento para la terapia contra el cáncer, es decir, una terapia eficaz para neoplasias en general y para el tratamiento de los tumores cerebrales, tales como tumores cerebrales astrocíticos, en particular. Potencialmente, actúan apuntando una ruta molecular que no es blanco de ninguna quimioterapia establecida.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Los gliomas astrocíticos IDH^{wt} se caracterizan por una alta expresión de BCAT1.

(a) Representación esquemática del catabolismo BCAA. BCAAs, aminoácidos de cadena ramificada. BCKAs, cetoácidos de cadena ramificada. (b, c) Expresión de ARN de BCAT1 (b) y BCAT2 (c) en 70 gliomas astrocíticos (41 IDH^{wt} y 29 IDH^{mut}) normalizada a la expresión en un cerebro normal (línea discontinua). Los datos se expresan como media \pm s. d. (test t de Student de dos colas). *, P < 0,05; *** P < 0,001. (d) Transferencia Western que muestra la expresión de la proteína BCAT1 en gliomas astrocíticos con genes IDH1 e IDH2 de tipo salvaje (carriles 1-5), diferentes mutaciones en los genes IDH2 (carriles 6-7) o TDH1 (carriles 8-12), y un cerebro normal (carril 13). AII, astrocitoma difuso grado OMS II; AAI, astrocitoma anaplásico grado OMS III; sGBIV, glioblastoma secundario grado OMS IV; pGBIV, glioblastoma primario grado OMS IV; AOIII, oligodendroglioma anaplásico grado OMS III. (e-h) tinciones inmunohistoquímicas de BCAT1 en un glioblastoma IDH^{wt} primario (e), un glioblastoma primario con mutación IDH1-R132H (f), un astrocitoma difuso con mutación IDH1-R132C (g), y un oligodendroglioma anaplásico con mutación IDH2-R172K (h). (i, j) Tinción inmunohistoquímica de IDH1-R132H en los mismos tumores que en los paneles b y c, respectivamente, que demuestra la complementariedad de la tinción BCAT1 e IDH1-R132H. Barras de escala: 50 μ m. (k) Tabla de dos por dos que muestra la correlación significativa de la expresión de la proteína BCAT1 y el estado de mutación de los genes IDH1 e IDH2 en 81 gliomas (p < 0,0001; test exacto de Fisher).

Figura 2: BCAT1 muestra una expresión dependiente de sustrato en líneas celulares de glioblastoma.

(a) Transferencia Western que muestra la expresión de proteína BCAT1 en líneas celulares de glioma IDH^{wt}. (b-d) Efectos de hipoxia y alfa-KG sobre la expresión de BCAT1. Las expresiones de ARN y de proteína se muestran en la parte inferior y la parte superior de cada panel. Los números sobre las transferencias Western indican las relaciones de multiplicación de la expresión con relación a las células control. Los valores de expresión de ARNm representan la media \pm s. d. de muestras triplicadas. (b) BCAT1 está regulada positivamente bajo condiciones hipóxicas (1% O₂). (c) La expresión de BCAT1 es inducida por la suplementación del medio de cultivo con dimetil-alfa KG permeable a las células. (d) El silenciamiento génico por dos ARNhcs diferentes del IDH1 citoplasmático productor de alfa-KG conduce a regulación negativa de la expresión de BCAT1.

Figura 3: Los niveles de expresión de los tres transcritos de BCAT1 están asociados con una diferencia de metilación de dos promotores alternativos.

(a) Dibujo esquemático de los exones 1 a 4 de BCAT1 que muestra la estructura exón de los tres transcritos T1, T4 y T6. Los dos promotores 1 y 2 alternativos se muestran en las secciones ampliadas en la parte inferior izquierda y la parte inferior derecha, respectivamente. (b) Cuantificación qRT-PCR de la expresión de ARN de los transcritos T1, T4 y T6 en gliomas astrocíticos y un conjunto de ARN a partir de tejidos cerebrales normales (n = 23). Los valores representan la media \pm s. d. de muestras triplicadas. (c) Los patrones de metilación de ADN detectados en los promotores 1 (izquierda) y 2 (derecha) mediante análisis MassArray de amplicones A1 a A8 tratados con bisulfito-PCR en el cerebro normal y gliomas astrocíticos grado OMS II-IV. *, astrocitoma anaplásico IDHwt. (d-f), Grado de metilación del ADN en el cerebro normal (Nbr), tumores IDH^{wt} y IDH^{mut} en (d) promedio de todos los CpG en el promotor 2 (prueba t de Student de dos colas, p < 0,0001) (e) CpG4,5 (P = 0,0003) y (f) CpG6 en el promotor 1 (p < 0,0001). (g) Correlación del grado de metilación de CpG6 y la expresión de BCAT1 T1. (h, i) El silenciamiento génico de HEY1 en células HEK293T (h) resulta en la regulación positiva de la expresión de BCAT1 (i). Los valores representan la media \pm s. d. (n = 3). (j, k) Ensayos ChIP que muestran la unión preferente de HEY1 a DMR (amplicón c1) en comparación con los amplicones de control en el promotor 1 (c2), aproximadamente 5 kb aguas arriba de BCAT1, y controles positivo (BHLH15) y negativo (PTPRD) no relacionados. (j) Constructo Flag-HEY1. (k) Constructo HEY1-Flag. La qRT-PCR se realizó por triplicado y las relaciones unión a entrada se muestran como promedio \pm s. d.

Figura 4: La supresión de BCAT1 reduce la liberación de glutamato por las células de glioma y afecta a las concentraciones de ácidos grasos de la membrana.

(a, b) Espectros de RMN de células U-87MG (a) y U-373MG (b) después del tratamiento con control (-) o gabapentina 20 mM (+) durante 20 horas. Los espectros de diferencia se muestran en la parte superior de los paneles. Tras un tratamiento inhibitorio, los niveles de valina (Val), leucina (Leu) e isoleucina (Ile) aumentaron en factores 1,09, 1,38, 1,19, respectivamente, en las células U-87MG y en factores de 1,83, 2,18% y 2,32, respectivamente, en células U-373MG. (c) Liberación de glutamato por las células de glioma a las 6 y 12 horas después del inicio del tratamiento con control (-) o con inhibición de BCAT1 (+) por gabapentina 20 mM (n = 3). (d) Análisis tándem-MS de las concentraciones de aminoácidos en medios de cultivo de células U-87MG con silenciamiento génico BCAT1 y control 8 días después de la transducción lentiviral. Los valores se muestran como la diferencia con las concentraciones de partida de los medios. Los valores positivos y negativos indican la liberación y la absorción de aminoácidos, respectivamente (n = 6). (e) Concentraciones de aminoácidos intracelulares de las mismas células que en (d) (n = 6). (f) Transferencia Western que muestra la regulación negativa de HADH tras el silenciamiento BCAT1. (g) Agotamiento relativo de colesterol y ácidos grasos de cadena muy larga en células U-87MG con silenciamiento génico BCAT1 vs. control (n = 3). Los datos se expresan como promedio \pm s. d. *, P < 0,05; **, P < 0,01; *** P < 0,001.

Figura 5: El silenciamiento génico BCAT1 limita el potencial de invasión de células de glioblastoma.

(a, b) marcado de inmunofluorescencia de alfa-tubulina en células U-87MG de control (a) y silenciamiento génico BCAT1 (b). azul: DAPI; barra de escala: 50 μ m. (c) Imágenes secuenciales que muestran la permeación de una célula U-87MG a través de un microcanal de 5x11x300 μ m durante un período de 9 horas; barra de escala: 50 μ m. (d) El silenciamiento BCAT1 inhibe significativamente el potencial de invasión de las células U-87MG en comparación con las células transducidas con ARNhc, no objetivo. Los resultados indican el promedio \pm s. d. de tres experimentos independientes. P = 0,0146.

Figura 6: BCAT1 es esencial para la progresión del glioblastoma.

(a-d) Análisis de proliferación celular y de ciclo celular de las células de glioma tras supresión BCAT1. La proliferación de células se examinó usando el ensayo de proliferación de células de Click-iT® EdU. El análisis de ciclo celular se llevó a cabo después de la tinción del ADN con yoduro de propidio. La distribución del ADN se muestra para las células vivas. Los valores en los gráficos representan el promedio \pm s. d. para n = 3. nt, ARNhc no objetivo. *, P < 0,05; **, P < 0,01; *** P < 0,001; en comparación con los controles respectivos. (a) El tratamiento con el inhibidor de gabapentina BCAT1 durante 20 horas suprimió la proliferación de líneas celulares de glioma de una manera dependiente de la concentración con relación a las células de control tratadas sólo con disolvente. (b) El análisis del ciclo celular de las células de glioma tratadas con gabapentina mostró una acumulación de células en fase G1. (c) El silenciamiento de BCAT1 causó una reducción significativa de la proliferación celular con relación a las muestras tratadas con ARNhc (nt) no objetivo en las tres líneas celulares de glioma y (d) resultó en la acumulación del marcador de detención G1 CDKN1B/p27^{KIP1}. El análisis del ciclo celular mostró aumentos significativos de la proporción de células en la fase G1. (e) El silenciamiento BCAT1 resulta en una menor fosforilación de AKT. (f-i) Secciones transversales de los tumores inducidos por inyección intracraneal de células de glioblastoma U-87MG en ratones atímicos CD-1. Se muestra la tinción de hematoxilina-eosina para ratones inyectados con (f) ARNhc no objetivo de control o (g) BCAT1-ARNhc. (h) Cuantificación de los volúmenes tumorales (n = 5 ratones para cada grupo, P = 0,0091).

Fig. 7: Transcritos BCAT1.

(a) Estructura génica de BCAT1 que muestra 11 exones y los tres transcritos T1 (ENST00000261192), T4

(ENST00000539282) y T6 (ENST00000538118) que se originan en dos promotores diferentes. Las regiones alrededor de los sitios de inicio de transcripción (SST) y el exón 5 están ampliadas para mostrar las ubicaciones de los cebadores. (b) Imagen en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados a partir de un glioblastoma IDH^{wt} (izquierda) y una colección de ARNs de cerebro normal de 23 individuos (derecha) usando el cebador inverso y los cebadores de exón 1 específicos de transcrito. Los tamaños de las bandas coinciden con los tamaños esperados de los ARNm empalmados respectivos.

Fig. 8: Análisis de transferencia Western

Análisis Western de la proteína total y fosforilada de la RPS6K objetivo mTOR en (a) tratamiento con gabapentina y (b) silenciamiento BCAT1 en las líneas celulares U-87MG, U-373MG y Hs683.

Fig. 9: Silenciamiento BCAT1

El silenciamiento BCAT1 causa la apoptosis en un cultivo primario de esferoides de glioblastoma. (a) Reducción de la proliferación inducida por transducción lentiviral de dos constructos ARNhc (n = 3, *** P < 0,0001). (b) Análisis del ciclo celular que muestra un fuerte aumento de la fracción subG1 después del silenciamiento BCAT1 (n = 3). LA transferencia Western en la parte superior muestra la mayor presencia del marcador CDKN1B de detención G1 en las células silenciadas. (c) Ensayo AnnexinV/7AAD que confirma la muerte apoptótica de las células esferoides con silenciamiento BCAT1.

Figura 10: Ensayo Click-iT EdU después de tratamiento con gabapentina 5 mM durante 23 h

Véase el Ejemplo 2 para los detalles experimentales.

Figura 11: Ensayo Click-iT EdU después de silenciamiento mediado por ARNhc

Véase el ejemplo 3 para los detalles experimentales

De esta manera, la presente invención se refiere a un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de aminotransferasa-1 de cadena ramificada (BCAT1) o (b) la expresión del gen que codifica BCAT1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor cerebral, en el que el tumor cerebral es un glioma o glioblastoma.

Los tumores cerebrales a ser tratados según la presente invención son aquellos que (sobre)expresan BCAT1, es decir, glioma o glioblastoma, en particular, aquellos que expresan IDH1 de tipo salvaje.

Los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) valina, leucina e isoleucina son aminoácidos esenciales que escapan al catabolismo hepático y están disponibles en la circulación general. El metabolismo BCAA proporciona un importante sistema de transporte para mover nitrógeno a través del cuerpo para la síntesis de aminoácidos no esenciales, incluyendo el neurotransmisor glutamato en el sistema nervioso central. La desregulación de las vías catabólicas BCAA resulta frecuentemente en una disfunción neuronal. La primera etapa del catabolismo BCAA implica la transferencia del grupo alfa-amino al alfa-cetoglutarato (alfa-KG) por la transaminasa citosólica de aminoácidos de cadena ramificada 1 (BCAT1) o las isoenzimas BCAT2 mitocondriales con glutamato y el respectivo cetoácido de cadena ramificada (BCKA) como productos (Ichiyama et al., J. Biochem. 59, pp. 160-169, (1966); Taylor et al., J. Biol. Chem. 241, pp. 4.396-4.405, (1966)). La expresión de BCAT2 es ubicua, mientras que la expresión de BCAT1 está limitada a un pequeño número de tejidos, incluyendo cerebro, donde los BCAAs son una fuente importante de nitrógeno para la síntesis del neurotransmisor glutamato. Después de la transaminación, los BCKAs son catabolizados adicionalmente a acetil-CoA y succinil-CoA, que entran en el ciclo del ácido tricarbónico (TCA) (Fig. 1a). NADH y FADH₂, que se generan como un subproducto del catabolismo BCKA, se usan para transferir equivalentes reductores al complejo III de la cadena respiratoria para la producción de ATP.

Las mutaciones en IDH1 (isocitrato deshidrogenasa 1), detectadas originalmente en una fracción de glioblastomas, están presentes en la gran mayoría de los gliomas de grado II y III de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y glioblastomas secundarios, pero son raras en los glioblastomas primarios (Balss et al., Acta Neuropath. 116, pp. 597-602 (2008)). También se han detectado mutaciones en IDH2, aunque con una menor frecuencia del 5-10% (Balss, Balss et al., Acta Neuropath. 116, pp. 597-602 (2008); Yan et al., N. Eng. J. Med. 360, pp. 765-773 (2009)). Las mutaciones IDH desempeñan un papel central en la patogénesis del glioma (Parsons et al, Science 321, pp. 1807-1812 (2008)) y se ha demostrado que constituyen un clasificador clave que distingue dos subgrupos principales de glioma que se identificaron inicialmente en base a la expresión del ARN y los patrones de metilación del ADN. Se ha revelado que los tumores cerebrales que muestran una mutación IDH1 (IDH^{mut}) tienen un mejor pronóstico que aquellos en los que IDH1 no está mutado (IDH^{wt}) (Hartmann et al., Acta Neuropathol. 120, pp. 707-718 (2010)).

Se ha comprobado que una diferencia entre los tumores cerebrales con IDH^{mut} (que tiene la mutación IDH1-R132H) e IDH^{wt} es que la sobreexpresión de BCAT1 es una característica altamente específica de los glioblastomas IDH^{wt}, el tumor

de cerebro adulto más común y más agresivo. La metilación específica observada del promotor 2 de BCAT12 en tumores IDH^{mut}, pero no en tumores IDH^{wt} y el cerebro normal muestra claramente que la baja expresión de BCAT1 en tumores IDH^{mut} es una consecuencia de la metilación del ADN asociada a la mutación IDH1, que se cree que está mediada mediante la inhibición de las histonas desmetilasas y la familia TET de las 5-metilcitosina hidroxilasas por el producto de enzimas IDH1 y IDH2 mutantes, el oncometabolito 2-hidroxiglutarato. Curiosamente, la regulación de la expresión de ARNm de BCAT1 originado en el promotor 1 parece conseguirse por medio de un mecanismo epigenético independiente de IDH, a través de la metilación de un sitio de unión para el represor transcripcional HEY1 en los tumores IDH^{wt} pero no en los tumores IDH^{mut}. Estos patrones de metilación del ADN diametralmente opuestos en los dos promotores dejan claro que la supresión de BCAT1 no se produce como un mero subproducto de una mutación IDH1 por medio de metilación "passenger", sino más bien que la regulación diferencial del metabolismo celular en los tumores IDH^{wt} y IDH^{mut} requiere un control estricto de la expresión de BCAT1 en cada grupo.

De manera similar a la tinción IDH1-R132H diagnóstica usada comúnmente, la tinción BCAT1 puede ayudar a distinguir entre gliomas IDH^{wt} y gliomas IDH^{mut}; sin embargo, la tinción BCAT1 ofrece la ventaja añadida de distinguir también un glioblastoma IDH^{wt} primario de cerca del 10% de los astrocitomas IDH^{mut} con mutaciones no IDH1-R132H. De manera más importante, la presente invención muestra que los metabolitos BCAT1 y BCAA proporcionan la base para el desarrollo de nuevos enfoques basados en el metabolismo en la terapia de glioma.

Esto significa que la supresión de BCAT1 en los glioblastomas IDH^{wt} tiene el potencial de obstaculizar de manera significativa el crecimiento del tumor, así como la excreción de glutamato por las células tumorales, lo que causa frecuentemente neurotoxicidad al tejido cerebral circundante y conduce a epilepsia asociada a tumor en pacientes con tumores cerebrales.

Además, los datos de la presente invención muestran que la disponibilidad de grandes cantidades de glucosa y glutamina, los dos nutrientes considerados como los más importantes para apoyar el crecimiento celular maligno, no es suficiente para apoyar un crecimiento rápido sostenido del glioblastoma IDH^{wt}.

En otras palabras, en la presente invención se ha demostrado que la sobreexpresión de BCAT1 es un rasgo altamente característico del glioblastoma, en particular del glioblastoma IDH^{wt}, y esencial para su comportamiento clínico agresivo. De esta manera, la expresión de BCAT1 y el catabolismo de BCAA son marcadores prometedores para la evaluación diagnóstica y pronóstica de gliomas y sirven como nuevas dianas terapéuticas. Además, la presente invención representa el primer ejemplo de silenciamiento de un gen metabólico que es central para el mecanismo patógeno del glioma por la metilación del ADN aberrante asociada a la mutación IDH1. El silenciamiento de BCAT1 al inicio del desarrollo de tumores prevendrá que los gliomas IDH^{mut} utilicen los BCAAs como un recurso metabólico y ofrece una explicación para el comportamiento del menor crecimiento maligno de los gliomas IDH^{mut} con relación a los glioblastomas IDH^{wt} dependientes de BCAT1.

La reducción, silenciamiento o inhibición de la actividad biológica puede realizarse mediante interacción o unión directa de un compuesto a BCAT1 o mediante interacción indirecta, por ejemplo, mediante interacción con un compuesto que está asociado con la actividad biológica de BCAT1. La reducción o inhibición de la actividad biológica puede conseguirse también mediante la aplicación de formas alteradas, por ejemplo, inactivas, de BCAT1, preferentemente en exceso.

Los ejemplos de compuestos adecuados que reducen, silencian o inhiben la actividad biológica de BCAT1 o la expresión del gen que codifica BCAT1 con el objetivo de obtener un efecto terapéutico son:

- (a) plásmidos, vectores o virus naturales/sintéticos/mutados, oligonucleótidos de diversos tipos de modificación (por ejemplo, PTO, LNA, 2'-F-ANA, complejos proteína-nucleótido, ARN_i, ARN_{ip}, micro_{mi}ARN, ARN_{hc}, Metilmetoxi-, fosforamidatos, PNA, Morfolino, Fosforamidato, Ciclohexeno (CeNA), gap-meros, ribozimas, aptámeros, CpG-oligos, ADNzimas, interruptores ribosómicos o lípidos o moléculas que contienen lípidos;
- (b) péptidos, complejos de péptidos, incluyendo todos los tipos de enlazadores,
- (c) moléculas pequeñas;
- (d) anticuerpos y sus derivados, especialmente quimeras, fragmentos Fab, fragmentos Fc, o
- (e) vehículos, liposomas, nanopartículas, complejos, o cualquier otro sistema de suministro que contiene los constructos nombrados anteriormente,
- (f) agentes oxidantes o agentes modificadores de sulfhidrilo (grupos SH).

Otros compuestos adecuados para los propósitos de la presente invención y los procedimientos para identificar/seleccionar dichos compuestos se describen más detalladamente a continuación.

Preferentemente, en una composición farmacéutica, dichos compuestos descritos anteriormente se combinan con un

vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el huésped al que se administra. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Dichos vehículos pueden ser formulados mediante procedimientos convencionales y el compuesto activo puede ser administrado al sujeto a una dosis eficaz.

Una "dosis efectiva" se refiere a una cantidad del ingrediente activo que es suficiente para afectar al curso y a la gravedad de los tumores cerebrales a tratar indicados anteriormente, que conduce a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis efectiva" útil para el tratamiento y/o la prevención de gliomas o glioblastomas puede ser determinada usando procedimientos conocidos para una persona con conocimientos en la materia (véase, por ejemplo, Fingl et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman y Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, pp. 1-46 ((1975))).

La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Por supuesto, la vía de administración depende del tipo de terapia y el tipo de compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico encargado y otros factores clínicos. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, la zona de la superficie corporal, la edad, el sexo, el compuesto particular a ser administrado, el tiempo y la vía de administración, el tipo de terapia, la salud general y otros fármacos que se administran al mismo tiempo.

La persona con conocimientos en la materia puede identificar fácilmente o generar compuestos útiles para los tratamientos de la presente invención en base al conocimiento de la secuencia de aminoácidos de BCAT1, y la secuencia de nucleótidos del gen que codifica esta proteína. Las secuencias respectivas se encuentran en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (P54687; BCAT1_HUMAN), en Genbank (secuencia de referencia NCBI: NM_005504) y la base de datos Human Genome Organization Gene Nomenclature Committee (HGNC) (HGNC ID: 976).

En una realización preferente adicional de la presente invención, el compuesto útil para reducir o inhibir la expresión del gen que codifica BCAT1 es un oligonucleótido antisentido, ARNhc o ARNip específico para BCAT1. Preferentemente, el compuesto útil para silenciar la expresión de BCAT1 son constructos de ARNhc independientes Mission® dirigidos a diferentes regiones de transcritos de ARNm de BCAT1 humana (BCAT1 shRNAI NM_005504.3-1064s1c1 y BCAT1 shRNAII NM_005504.3-751s1c1) y de IDH1 humano (IDH1 shRNAI NM_005896.2-1363s1c1 e IDH1 shRNAII NM_005896.2-292s1c1).

La generación de oligonucleótidos antisentido adecuados incluye la determinación de un sitio o sitios dentro del gen que codifica BCAT1 para que se produzca la interacción antisentido de manera que resulte el efecto deseado, por ejemplo, la inhibición de la expresión de la proteína. Un sitio intragénico preferente es (a) la región que abarca el codón de inicio o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen o (b) una región del ARNm que es un "bucle" o "bulto", es decir, que no es parte de una estructura secundaria. Si se han identificado uno o más sitios diana, se eligen oligonucleótidos que son suficientemente complementarios con relación a la diana, es decir, que se hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado. En el contexto de la presente invención, "hibridación" significa unión mediante enlace de hidrógeno, que puede ser una unión mediante enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertida, entre las bases nucleósidas o nucleótidas complementarias. "Complementario", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una posición determinada de un oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces el oligonucleótido y el ADN o ARN se consideran complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. De esta manera, "hibridable específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de manera que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ADN o ARN diana. En la técnica se entiende que no es necesario que la secuencia de un compuesto antisentido sea 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser hibridable específicamente. Un compuesto antisentido es hibridable específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para causar una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias no diana en las condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en el caso de tratamiento terapéutico.

La persona con conocimientos en la materia puede generar compuestos antisentido y ARNips o ARNhcs según la presente invención en base a la secuencia de ADN conocida para BCAT1.

"Oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o

miméticos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases de origen natural, azúcares y enlaces internucleosídicos (cadena principal) covalentes, así como oligonucleótidos que tienen partes que no son de origen natural que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente preferentes con respecto a las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una mejor captación celular, una mayor afinidad para el ácido nucleico diana y una mayor estabilidad en presencia de nucleasas. Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferente del compuesto antisentido, la presente invención abarca otros compuestos oligoméricos antisentido, incluyendo pero sin limitarse a miméticos de oligonucleótidos, tales como los descritos más adelante. Los compuestos antisentido según la presente invención comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleósidos enlazados). Los compuestos antisentido particularmente preferentes son oligonucleótidos antisentido, incluso más preferentemente aquellos que comprenden de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleobases. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, secuencias guía externas (EGS), oligonucleótidos (oligozimas), y otros ARNs catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que se hibridan con el ácido nucleico diana e inhiben su expresión.

De manera alternativa, el compuesto de la invención es un vector que permite transcribir un oligonucleótido antisentido de la invención, por ejemplo, en un huésped mamífero. Preferentemente, dicho vector es un vector útil para terapia génica. Los vectores preferentes útiles para terapia génica son vectores virales, por ejemplo, adenovirus, virus del herpes, vaccinia o, más preferentemente, un virus de ARN tal como un retrovirus. Incluso más preferentemente, el vector retroviral es un derivado de un retrovirus murino o aviar. Los ejemplos de dichos vectores retrovirales que pueden ser usados en la presente invención son: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor mamario murino (MuMTV) y virus del sarcoma de Rous (RSV). Más preferentemente, se emplea un vector retroviral de primate no humano, tal como el virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), que proporciona una gama de huéspedes más amplia en comparación con los vectores murinos. Debido a que los retrovirus recombinantes son defectuosos, se requiere asistencia con el fin de producir partículas infecciosas. Dicha asistencia puede ser proporcionada, por ejemplo, mediante el uso de líneas celulares auxiliares que contienen plásmidos que codifican todos los genes estructurales del retrovirus bajo el control de secuencias reguladoras dentro del LTR. Las líneas celulares auxiliares adecuadas son bien conocidas por las personas con conocimientos en la materia. Dichos vectores pueden contener adicionalmente un gen que codifica un marcador seleccionable de manera que las células transducidas puedan ser identificadas. Además, los vectores retrovirales pueden ser modificados de manera que se conviertan en específicos de diana. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la inserción de un polinucleótido que codifica un azúcar, un glicolípido o una proteína, preferentemente un anticuerpo. Las personas con conocimientos en la materia conocen procedimientos adicionales para generar vectores específicos de diana. Otros vectores y procedimientos adecuados para terapia génica in vitro o in vivo se describen en la literatura y son conocidos por las personas con conocimientos en la materia; véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/29469 o WO 97/00957.

Con el fin de conseguir la expresión sólo en el órgano diana, es decir, los tumores cerebrales indicados anteriormente, las secuencias de ADN para la transcripción de los oligonucleótidos antisentido pueden estar vinculadas a un promotor específico de tejido y pueden ser usadas para terapia génica. Dichos promotores son bien conocidos por las personas con conocimientos en la materia (véase, por ejemplo, Zimmermann et al., (1994) *Neuron* 12, 11-24; Vidal et al.; (1990) *EMBO J.* 9, 833-840; Mayford et al., (1995), *Cell* 81, 891-904; Pinkert et al., (1987) *Genes & Dev.* 1, 268-76).

Dentro de una estructura de oligonucleótido, se hace referencia comúnmente a los grupos fosfato como formando la cadena principal de internucleósidos del oligonucleótido. El enlace normal o cadena principal de ARN y ADN es un enlace 3' a 5' fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferentes útiles en la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Las cadenas principales de oligonucleótidos modificadas que pueden resultar en una mayor estabilidad son conocidas por la persona con conocimientos en la materia, preferentemente dicha modificación es un enlace fosforotioato.

Un mimético de oligonucleótido preferente es un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, y se conoce como un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido es reemplazada por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases están retenidas y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida de la cadena principal (véase, por ejemplo, Nielsen et al., *Science* 254 (1991), 1497-1500).

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también uno o más restos de azúcar sustituidos o modificados. Los oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo puede ser alquilo C₁ a C₁₀ o alquenilo y alquinilo C₂ a C₁₀ sustituido o no sustituido. Una fracción de azúcar modificada particularmente preferente es una fracción de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Los oligonucleótidos de la invención pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobases. Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina etc., siendo preferentes las sustituciones 5-metilcitosina ya que se ha demostrado que estas modificaciones aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química al oligonucleótido de una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Dichas fracciones incluyen fracciones lipídicas tales como una fracción colesterol, ácido cólico, un tioéter, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, una poliamina o una cadena de polietilenglicol o ácido acético adamantano, una fracción palmitilo, o una fracción octadecilamina o una fracción hexilamino-carbonil-oxicoolesterol.

La presente invención incluye también compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos "quiméricos" antisentido o "quimeras", en el contexto de la presente invención, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado para conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como un sustrato para enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, resulta en la escisión de la diana de ARN, mejorando de esta manera en gran medida la eficiencia de la inhibición de oligonucleótido de expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con fosforotioato desoxi oligonucleótidos que se hibridan a la misma región diana. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos tal como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos se han denominado también en la técnica como híbridos o gapmeros.

En una realización preferente adicional de la presente invención, los compuestos para su uso en un procedimiento de tratamiento de un glioma o glioblastoma son compuestos que reducen o inhiben la actividad biológica de BCAT1.

Dichos compuestos se describen en la técnica para diferentes indicaciones médicas que difieren de la indicación de la presente invención y, preferentemente, comprenden compuestos tales como ácido 1-(aminometil) ciclohexano acético (gabapentina) o un compuesto descrito en Goto et al., *The Journal of Biological Chemistry* 280 (44) (2005), 37246-56, Hu et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16 (2006), 2337-40, Caballero et al., *Molecular Diversity* 13 (2009), 493-500, la patente US N° 6.632.831, la patente US N° 6.809.119 y el documento EP-B1 1 157 000.

Otros ejemplos de compuestos capaces de reducir o inhibir la actividad biológica de BCAT1 son anticuerpos (neutralizantes) dirigidos contra BCAT1 o sus fragmentos que tienen sustancialmente la misma especificidad de unión. El término "anticuerpo", preferentemente, se refiere a anticuerpos que consisten esencialmente en anticuerpos monoclonales agrupados con diferentes especificidades epitópicas, así como preparaciones de anticuerpos monoclonales distintos. Los anticuerpos monoclonales se forman a partir de un antígeno que contiene, por ejemplo, un fragmento de BCAT1 mediante procedimientos bien conocidos por las personas con conocimientos en la materia (véase, por ejemplo, Köhler et al., *Nature* 256 (1975), 495). Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) pretende incluir moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')₂) que son capaz de unirse específicamente a la proteína. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener una menor unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto. (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)). De esta manera, estos fragmentos son preferentes, así como los productos de una biblioteca de expresión de FAB u otra inmunoglobulina. Además, los anticuerpos útiles para los propósitos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla, y humanizados.

De manera alternativa, los compuestos preferentes para el propósito de la invención son versiones inactivas de BCAT1 o secuencias de ácidos nucleicos que codifican versiones inactivas de BCAT1 que pueden ser introducidas según los enfoques/vectores descritos anteriormente. Dichas versiones inactivas pueden ser generadas según procedimientos de mutagénesis bien conocidos. Dichos compuestos pueden tener un efecto terapéutico en el cuerpo humano mediante el desplazamiento de su homólogo funcionalmente activo, en particular, cuando se aplican en exceso. Los análisis de versiones potencialmente inactivas de BCAT1 pueden llevarse a cabo mediante el ensayo de la transaminación (reversible) de L-aminoácidos de cadena ramificada a los alfa-cetoácidos de cadena ramificada, por ejemplo, mediante la determinación de la producción de glutamato. En la literatura se describen ensayos adecuados y, por ejemplo, en el Ejemplo 39 de la patente US N° 6.809.119, Hu et al. (2006), and el documento EP-B1 1 157 000.

En una realización preferente de la presente invención, el compuesto descrito en detalle anteriormente se usa en un procedimiento de tratamiento de un glioma o glioblastoma.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar un compuesto que reduce o inhibe la actividad biológica de BCAT1 y/o su expresión, que comprende las etapas de:

- 5 (a) incubar un compuesto candidato con un sistema de ensayo que comprende BCAT1 o su gen; y
- (b) ensayar una actividad biológica de BCAT1;

en el que una inhibición o pérdida de una actividad biológica de BCAT1, preferentemente en comparación con un sistema de ensayo en ausencia de dicho compuesto de ensayo, es indicativo de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.

- 10 La etapa (b) puede llevarse a cabo mediante el ensayo de la transaminación (reversible) de L-aminoácidos de cadena ramificada a ácidos alfa-ceto de cadena ramificada usando un ensayo según como se ha descrito anteriormente. Los ejemplos de dichas moléculas candidatas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas o moléculas pequeñas. Dichas moléculas pueden ser diseñadas racionalmente usando técnicas conocidas.

- 15 Preferentemente, dicho sistema de ensayo usado para la detección comprende sustancias de propiedades químicas y físicas similares y/o, más preferentemente, dichas sustancias son casi idénticas. Los compuestos que pueden ser preparados e identificados según un uso de la presente invención pueden ser bibliotecas de expresión, por ejemplo, bibliotecas de expresión de ADNc, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, ligandos, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o similares.

- 20 El documento WO 98/25146 describe procedimientos adicionales para la selección de bibliotecas de complejos para compuestos que tienen una propiedad deseada, especialmente, la capacidad de agonizar, unirse a, o antagonizar un polipéptido o su receptor celular. Los complejos en dichas bibliotecas comprenden un compuesto bajo ensayo, un marcador que registra al menos una etapa en la síntesis del compuesto, y un conector susceptible de modificación por una molécula informadora. La modificación del conector se usa para significar que un complejo contiene un compuesto que tiene una propiedad deseada. El marcador puede ser decodificado para revelar al menos una etapa en la síntesis de dicho un compuesto. Otros procedimientos para identificar compuestos que interaccionan con BCAT1 o moléculas de ácido nucleico que codifican tales moléculas son, por ejemplo, el cribado in vitro con el sistema de presentación de fagos así como los ensayos de unión a filtro o de medición en "tiempo real" de la interacción.

- 30 La persona con conocimientos en la materia sabe también que es posible diseñar, sintetizar y evaluar miméticos de compuestos orgánicos pequeños que, por ejemplo, pueden actuar como sustrato o ligando para BCAT1. Por ejemplo, se ha descrito que los miméticos de D-glucosa de hapalosina exhibieron una eficiencia similar a la hapalosina para antagonizar proteínas asociadas a asistencia a la resistencia a múltiples fármacos en citotoxicidad; véase Dinh, J. Med. Chem. 41 (1998), 981-987.

Todos estos procedimientos pueden ser usados según la presente invención para identificar un compuesto que reduce o inhibe la actividad biológica de BCAT1 o su expresión.

- 35 El gen que codifica BCAT1 puede servir también como una diana para la selección de inhibidores. Los inhibidores pueden comprender, por ejemplo, proteínas que se unen al ARNm de los genes que codifican BCAT1, desestabilizando de esta manera la conformación nativa del ARNm y obstaculizando la transcripción y/o traducción. Además, en la literatura se describen procedimientos para la identificación de moléculas de ácido nucleico, tales como un fragmento de ARN que imita la estructura de una molécula de ARN diana definida o no definida al cual se une un compuesto dentro de una célula resultando en el retraso del crecimiento celular o la muerte celular; véase, por ejemplo, el documento WO 98/18947 y las referencias citadas en el mismo. Estas moléculas de ácido nucleico pueden ser usadas para identificar compuestos desconocidos de interés farmacéutico, y para identificar dianas de ARN desconocidas para su uso en el tratamiento de una enfermedad. Estos procedimientos y composiciones pueden ser usados para la identificación de compuestos útiles para reducir los niveles de expresión de BCAT1.

- 45 Los compuestos que pueden ser ensayados e identificados según el procedimiento de la invención pueden ser bibliotecas de expresión, por ejemplo, bibliotecas de expresión de ADNc, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, compuestos orgánicos pequeños, hormonas, peptidomiméticos, PNAs o similares (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Gibbs, Cell 79 (1994), 193-198 y las referencias citadas supra). Además, los genes que codifican un regulador putativo de BCAT1 y/o que ejercen sus efectos aguas arriba o aguas abajo de BCAT1 pueden ser identificados usando, por ejemplo, mutagénesis de inserción usando, por ejemplo, vectores de reconocimiento génico conocidos en la técnica. Dichos compuestos pueden ser también derivados funcionales o análogos de inhibidores conocidos. Dichos compuestos útiles pueden ser por ejemplo factores transactivadores que se unen a BCAT1 o secuencias reguladoras del gen que lo codifica. La identificación de factores transactivadores puede llevarse a cabo

usando procedimientos estándar en la técnica. Para determinar si una proteína se une a la propia proteína o a secuencias reguladoras, pueden llevarse a cabo análisis estándar de desplazamiento en gel nativo. Con el fin de identificar un factor transactivador que se une a la proteína o secuencia reguladora, la proteína o secuencia reguladora puede ser usada como un reactivo de afinidad en procedimientos de purificación de proteínas estándar o como una sonda para el cribado de una biblioteca de expresión. La identificación de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos que interactúan con BCAT1 puede conseguirse también, por ejemplo, tal como se describe en Scofield (Science 274 (1996), 2063-2065) mediante el uso del denominado "sistema de dos híbridos" de levadura. En este sistema, BCAT1 es unido al dominio de unión al ADN del factor de transcripción GAL4. Una cepa de levadura que expresa este polipéptido de fusión y que comprende un gen indicador lacZ accionado por un promotor apropiado, que es reconocido por el factor de transcripción GAL4, es transformado con una biblioteca de ADNcs que expresarán las proteínas vegetales o sus péptidos fusionados a un dominio de activación. De esta manera, si un péptido codificado por uno de los ADNcs es capaz de interactuar con el péptido de fusión que comprende un péptido de BCAT1, el complejo es capaz de dirigir la expresión del gen informador. De esta manera, BCAT1 y el gen que codifica BCAT1 pueden ser usados para identificar péptidos y proteínas que interactúan con BCAT1. Es evidente para la persona con conocimientos en la materia que entonces este y otros sistemas pueden ser aprovechados adicionalmente para la identificación de inhibidores.

Los ejemplos siguientes explican la invención más detalladamente pero no deberían interpretarse como una limitación de la invención.

Ejemplo 1

Procedimientos generales

(a) Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

El ARN total se extrajo usando el Kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. ARN total de cerebro humano de referencia FirstChoice® de Ambion sirvió como conjunto de ARN de cerebro normal (n = 23 donantes). El ARN total (500 ng) fue sometido a transcripción inversa usando cebadores aleatorios y Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Cada muestra de ADN complementario se analizó por triplicado con el Sistema Applied Biosystems Prism 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), usando una mezcla Absolute SYBR Green ROX Mix (ABgene, Epsom, Reino Unido). La cantidad relativa de ARNm específico se normalizó a ARF, B2My TBP. Las secuencias de los cebadores se proporcionan en la Tabla 1A siguiente.

Tabla 1A

Cebador de expresión		
BCAT1 (todas las isoformas)	Directo	CAACTATGGAGAATGGTCTTAAGCT
	Inverso	TGTCCAGTCGCTCTCTTCTCTTC
BCAT1 T1 (ENST00000261192)	Directo	GCTACGACCCTTGGGATCT
BCAT1 T4 (ENST00000539282)	Directo	GTGCCACTGCCGCTCTCT
BCAT1 T6 (ENST00000538118)	Directo	TGGTTGTCTGAGCCTCCTTT
BCAT1 Exón 2	Inverso	AAGTCCCCACCACCTCTTTT
BCAT1 Exón 5	Inverso	CCCATTCTTGATCCAATTTCA
HEY	Directo	CGAGCTGGACGAGACCAT
	Inverso	GAGCCGAACTCAAGTTTCCA
ARF	Directo	GACCACGATCCTCTACAAGC
	Inverso	TCCCACACAGTGAAGCTGATG

30

(Cont.)

B2M	Directo	ACTGAATTCACCCCCACTGA
	Inverso	CCTCCATGATGCTGCTTACA
TBP	Directo	GAACCACGGCACTGATTTTC
	Inverso	CCCCACCATGTTCTGAATCT
	Inverso	AAATAACTTAACACCCCAATCTAAAC

(b) Análisis de transferencia Western

5 Todos los experimentos que implican el uso de tejidos humanos se llevan a cabo según las directrices de la junta de
revisión institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad Heinrich Heine de Düsseldorf. Las muestras de tejidos
tumoraes humanos frescas congeladas y una muestra de tejido cerebral no neoplásico se lisaron en solución de
isotiocianato de guanidina (4M) usando un dispositivo Ultra-Turrax (IKA, Staufen, Alemania) y se sometieron a CsCl-
ultracentrifugación. La diafiltración de las fracciones de proteína obtenidas se realizó usando los dispositivos de filtro
centrífugo 0,5 Amicon Ultra (Millipore, Schwalbach, Alemania; corte 3kDa) esencialmente tal como se describe⁴⁵. La
10 proteína total de las líneas de células se extrajo usando el kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen). Se separaron 10
µg de proteína mediante 10% SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó
en solución de bloqueo (5% de BSA en TBS, 0,1% de Tween 20) y se incubó con anticuerpos primarios durante la noche
a 4°C. Se incubaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a
temperatura ambiente antes de la detección quimioluminiscente de proteína (kit ECL; GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

15 Se usaron los anticuerpos siguientes: anticuerpo monoclonal de ratón contra α -tubulina (1:2000, #T9026, Sigma-Aldrich,
St. Louis, MO 63178, EE.UU.), anticuerpo monoclonal de ratón contra BCAT1 (1:2000, ECA39, clon 51, #611270, BD
Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.), antisuero monoclonal de rata contra IDH1 (1:1, proporcionado por A. von Deimling,
DKFZ, Heidelberg, Alemania; disponible comercialmente en Dianova, Hamburgo, Alemania), anticuerpo monoclonal de
ratón contra HADHSC (1:500, #H00003033-M01, Abnova), anticuerpo monoclonal de conejo contra CDKN1B (1:1000,
20 p27 Kip1, #3686, Cell Signaling Technology), anticuerpo monoclonal de conejo contra Akt (1:1000, #9272, Cell Signaling
Technology), anticuerpo monoclonal de conejo contra fosfo-Akt (Ser473) (1:1000, #193H12, Cell Signaling Technology),
anticuerpo policlonal de conejo contra p70 S6 quinasa (1:1000, #9202, Cell Signaling Technology), anticuerpo policlonal
de conejo contra fosfo-p70 S6 quinasa (Thr389) (1:1000, #9205, Cell Signaling Technology), IgG anti-rata conjugada con
HRP (1:10000, proporcionada por A. von Deimling, DKFZ, Heidelberg, Alemania), IgG de caballo anti-ratón conjugada con
25 HRP (1:5000, #7076, Cell Signaling Technology), IgG de cabra anti-conejo conjugada con HRP (1: 2000, # 7074, Cell
Signaling Technology).

(c) Tinción inmunohistoquímica

30 Las secciones del tumor se desparafinaron usando xilol y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol. La
recuperación de antígeno se llevó a cabo calentando durante 40 min en un vaporizador en tampón citrato de sodio 10 mM
(pH 6,0). La peroxidasa endógena se inactivó mediante la incubación de las secciones tumorales en peróxido de
hidrógeno al 3%. Las secciones se incubaron durante la noche con anticuerpo monoclonal de ratón anti-BCAT1 primario
(ECA39), clon 51 (BD Biosciences, San Jose, CA) diluido 1:500 o anticuerpo de ratón anti-IDH1 R132H humano (Dianova,
Hamburgo, Alemania) diluido 1:20 en diluyente de anticuerpo Dako REAL™ (Dako, Glostrup, Dinamarca). La tinción para
35 la detección de los anticuerpos unidos se realizó según los protocolos estándar usando el sistema de detección
EnVision™ (peroxidasa/DAB+, conejo/ratón) (Dako, Glostrup, Dinamarca), la contra-tinción posterior se realizó usando
hematoxilina.

(d) análisis de la metilación del ADN

40 La metilación de ADN se analizó mediante la técnica MassARRAY. Brevemente, 500 ng de ADN genómico se modificaron
químicamente con bisulfito de sodio usando el kit de metilación EZ (Zymo Research) según las instrucciones del
fabricante. El ADN tratado con bisulfito se amplificó mediante PCR con cebadores que generan cuatro amplicones (A1-
A4) desde -990 pb a 612 pb alrededor de TSS del transcrito 1 de BCAT1 (T1, ENST00000261192), y tres amplicones (A5-
A7) del promotor del transcrito 4 de BCAT1 (T4, ENST00000539282) y 6 (T6, ENST00000538118) desde -198 pb a +63
pb. Los amplicones fueron transcritos mediante polimerasa T7, seguido de escisión RNAasaA específica de T. Los
45 fragmentos digeridos fueron cuantificados mediante espectrometría de masas. Las secuencias de los cebadores se
proporcionan en la Tabla 1B. Se usaron estándares de metilación de ADN (ADN genómico 0%, 20%, 40%, 60%, 80% y
100% metilado) para confirmar la amplificación imparcial de los amplicones.

Tabla 1B

Cebador para el análisis de metilación		
A1 *	Directo	AAGTTTTTGTTGTGGAAGTTGTTTT
	Inverso	CACCTAACCAACAATCATTAAACACTA
A2 *	Directo	TTTGTGGGAGGGTATTGGAAGTAAT
	Inverso	TAACTCCTACCCACCTCCCTACTAT
A3 *	Directo	ATAGTAGGGAGGTGGGTAGGAGTTA
	Inverso	AAACACTAAAACACTCCCCCAAAC
A4 *	Directo	GTTTGGGGGAGTAGTTTTAGTG
	Inverso	CTCCCTACCAACTATATTTCTTA
A5 *	Directo	ATTTATGAGGGTGTTAGATTTGGGT
	Inverso	TTAAAACTCCTCCCCAAAAAATAC
A6 *	Directo	TTGTTTAGGTTTAGTATTTTTATGGG
	Inverso	ACCATTTATAAAAAAATCTCCAAAA
A7 *	Directo	AAATTATTATTAAGTAAATGTAGGTGGG

(e) Cultivo de células

5 Las líneas celulares de glioma humano U-87MG (HTB-14), LN-229 (CRL-2611), Hs683 (HTB-138) y U-373MG (HTB-17) se cultivaron en medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero bobino fetal y 1% de mezcla penicilina/estreptomicina. Las líneas celulares se autenticaron mediante análisis de repetición corta en tándem (STR). Las células madre cancerosas de cerebro NCH421k se establecieron a partir de pacientes con glioblastoma primario sometidos a resección quirúrgica según las propuestas de investigación aprobadas por la junta de revisión institucional de la Facultad de Medicina, Universidad de Heidelberg. Se caracterizaron genotípica y fenotípicamente en un estudio previo (Campos, B., et al. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. Clin Cancer Res 16, 2715-2728 (2010)). Las células NCH421k se cultivaron como agregados flotantes (neurosferas) en placas de cultivo de tejido no recubiertas en medio DMEM/F-12 que contenía 20% de suplemento libre de suero BIT, factor de crecimiento de fibroblastos básico y factor de crecimiento epidérmico a una concentración de 20 ng/ml cada uno (todos de Provitro, Berlín, Alemania). Las células HEK293T y HEK293 se mantuvieron como cultivos monocapa en DMEM que contenía suero bobino fetal al 10% sin antibióticos.

Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Para los experimentos de hipoxia, las células se cultivaron con 1% de O₂ en una incubadora de hipoxia C16 suministrada con nitrógeno (Labotect, Goettingen, Alemania).

(f) Immunoprecipitación de cromatina (ChIP)

20 La ChIP se realizó en células HEK293 que sobreexpresan HEY1 marcado con Flag, ya que los anticuerpos disponibles en la actualidad contra HEY1 no eran específicos para los ensayos ChIP. Los constructos para la sobreexpresión HEY1 se prepararon usando vectores "Gateway compatible" marcados con FLAG; pDest26 (etiqueta C-terminal) y pDest11 (etiqueta N-terminal). 1 µg del vector de control o los vectores de expresión HEY1 se transfectaron en 2,5x10⁶ células HEK293 por placa de 15 cm usando TransIT®-LT1 (Mirus Bio LLC, Madison, WI 53711, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante ligeramente modificadas. Las células de dos placas se recogieron 48 horas después de la transfección. La cromatina se preparó usando tampones de cizallamiento no iónicos con Covaris S2, según el protocolo del fabricante (Covaris Inc.). La ChIP se llevó a cabo usando anticuerpos anti-FLAG (Cell Signaling #2368). El ADN se recuperó después de la ChIP se usó para qRT-PCR con cromatina de entrada e inmunoprecipitación "mock" (anticuerpo anti-IgG, Diagenode, Kch-803-015) que sirve como control. La qRT-PCR se realizó por triplicado con detección SYBR verde usando los cebadores indicados en la Tabla 2. Se indican las relaciones de las señales de unión y de entrada.

Tabla 2

Cebador promotor		
PTPRD	Directo	GAGGAGGAGGAGAAAGAGCA
	Inverso	GACAGAGCCTCGCCTCCT
BCAT1_neg	Directo	TCCCTAGTCCTCCGTTCTGA
	Inverso	ATTCCAAGGAGCATTGTGC
BCAT1_DMR(c1)	Directo	GAGGGTGA CTAAGGAACTCTGG
	Inverso	ATTGCCATTCCGTCATCACT
BCAT1_c2	Directo	GCTACGACCCTTGGGATCT
	Inverso	TCGATTACGCACACATTTT
BHLHA15	Directo	CCGAGGGCTCATTGTCAT
	Inverso	CACCCGAGTTCCCAGCTC

(g) Transfección transitoria de ARNip

5 Las células HEK293T fueron transfectadas con dúplex de ARNip de Ambion (HEY1: s23868-70) o Dharmacon (control no diana: D-001810-10) usando DhamaFect1 siguiendo pequeñas modificaciones a las instrucciones del fabricante (Dharmacon). En pocas palabras, cada grupo de ARNip se diluyó en tampón 1X ARNip (Dharmacon), se mezcló con RPMI y, a continuación, se distribuyó en 6 pocillos de placas de 96 pocillos. Se sembraron $1,2 \times 10^4$ células HEK293 o 9×10^3 células HEK293T en la parte superior de la mezcla ARNip/DharmaFECT (el volumen era de 150 μ l/pocillo y 20 nM de ARNips al final). Después de 48 horas de incubación a 37°C, se aislaron los ARNs de los pocillos para su posterior análisis.

(h) La producción y transducción de virus

15 Los vectores lentivirales se produjeron mediante co-transfección de células HEK293T con el psPAX2 (Addgene 12260, Didier Trono, vector de empaquetamiento), PMD2.G (Addgene 12259, Didier Trono, plásmido de envoltura), y constructos pLKO.1 ARNhc (Sigma-Aldrich). Las transfecciones se llevaron a cabo usando TransIT®-LT1 (Mirus Bio LLC) y el virus se recogió a las 48 y 72 horas después de la transfección y se combinó.

20 La infección de las células de glioma con virus a una M.O. I. de 2 se llevó a cabo en presencia de 8 μ g/ml de polibreno (Chemicon, Billerica, MA, EE. UU.). El sobrenadante que contenía virus se retiró después de 24 horas y las células se dividieron en los días 3, 5 y 7 después de la transducción. Se usaron dos constructos Mission® ARNhc independientes dirigidos a diferentes regiones de las transcripciones ARNm de BCAT1 humana (BCAT1 shRNAI NM_005504.3-1064s1c1 y BCAT1 shRNAII NM_005504.3-751s1c1) e IDH1 humana (IDH1 shRNAI NM_005896.2-1363s1c1 e IDH1 shRNAII NM_005896.2-292s1c1). Se usó ARNhc no diana (Mission SHC002) como control. La cuantificación del silenciamiento BCAT1 e IDH1 se evaluó por PCR cuantitativa en tiempo real y transferencia Western.

(i) Tratamiento con dimetil-a-cetoglutarato y gabapentina

25 Se sembraron 5×10^4 células /pocillo en placas de 24 pocillos en un volumen total de 500 μ l medio de cultivo celular. El medio se retiró 16 horas después de la siembra de las células, y se reemplazó con 500 μ l de medio que contenía dimetil- α -cetoglutarato 5 mM o 10 mM (dimetil 2-oxoglutarato; Sigma-Aldrich) o gabapentina 5 mM, 10 mM o 20 mM (1 - (aminometil)-ciclohexano; Sigma-Aldrich). Los volúmenes correspondientes de tampón HEPES 200 mM (pH 7,4) se añadieron a los pocillos de control respectivos.

(j) Análisis de ciclo celular y detección de apoptosis

30 El análisis del ciclo celular se llevó a cabo 20 horas después del tratamiento con gabapentina y 6 días después de la transducción lentiviral. Se añadió tampón Nicoletti (0,1% de citrato de sodio, pH 7,4, 0,05% de Triton X-100, 50 μ g ml⁻¹ de yoduro de propidio) a los pocillos que contenían tanto células muertas como vivas. Después de 4 horas en la oscuridad a 4°C, el contenido de ADN se analizó mediante citometría de flujo usando FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.). Se usó el software Diva FACS para cuantificar la distribución de células en cada fase del ciclo celular: sub-G1

(células muertas), G1, S y G2/M. Para la investigación de la actividad apoptótica después del silenciamiento lentiviral, las células NCH421k se incubaron con anexina V-PE (ficoeritrina) y 7-AAD (7-aminoactinomicina D, BD Biosciences) durante 15 minutos en la oscuridad, seguido inmediatamente por citometría de flujo.

(k) Análisis de proliferación

5 Para evaluar la proliferación de las células de glioma después del tratamiento con gabapentina o después del silenciamiento lentiviral, se usó el ensayo de proliferación celular Click-iT® EdU (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con 10 μ M del análogo de nucleósido EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) durante 16 horas. La cuantificación de las células que incorporaron EdU se realizó usando FACS Canto II (BD Biosciences).

10 **(l) Cuantificación de glutamato**

La concentración de glutamato en el sobrenadante de células tratadas con gabapentina se determinó usando el kit de determinación de glutamina/glutamato (GLN-1; Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Los volúmenes de reacción se redujeron a 100 μ l de volumen total y la absorbancia se midió por triplicado en una microplaca (microplaca de fondo plano, transparente a UV, de 96 pocillos, Corning®) usando un lector de placas Tecan Infinite M200 (Tecan, Austria). Los datos se normalizaron para el número de células por pocillo.

(m) Tinción de inmunofluorescencia

20 Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio cinco días después de la transducción lentiviral. Las células se fijaron en formaldehído al 4%, se enjuagaron dos veces en 1 x PBS, y se permeabilizaron en PBS que contenía 0,2% de Triton. Tras el aclarado con 1 x PBS, las células se incubaron en suero de cabra al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron 1 hora con el anticuerpo primario (anticuerpo de ratón anti α -tubulina, 1:200, #T9026, Sigma-Aldrich) y 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con FITC, 1:100, ab6785, Abcam) después del montaje con medio de montaje Vectashield que contenía DAPI (vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). Para obtener imágenes de fluorescencia, se tomaron imágenes usando una lente objetivo 40 x en un microscopio Zeiss Axioplan.

25 **(n) Ensayo de migración en microcanal 3D**

Los chips de microcanales basados en Poli(dimetilsiloxano) (PDMS) fueron proporcionados amablemente por el Dr. Ralf Kemkemer Max Planck Institute for Intelligent Systems, Alemania). Las estructuras con canales microfabricados con las dimensiones de 5 x 11 x 300 μ m (Anchura x Altura x Longitud) se bio-funcionalizaron mediante incubación con una solución de 50 μ g/ml de fibronectina antes de su uso. El chip se fijó sobre un soporte de teflón y se sembraron 2x10⁵ células en el chip en estrecha proximidad a los canales. Tras fijar las células sobre el chip, se obtuvieron imágenes de las células vivas durante 25 horas. Durante los experimentos, no se aplicó ningún gradiente químico o flujo dentro de los canales. Se capturaron imágenes de contraste de fase, lapso de tiempo, de múltiples posiciones cada 10 minutos con un microscopio invertido automatizado (Zeiss Cell Observer; Carl Zeiss) equipado con una cámara de aire humidificado y calentada. Las imágenes se grabaron y procesaron con Zeiss AxioVision y el software ImageJ. Los comportamientos celulares se analizaron y se categorizaron tal como se ha indicado anteriormente (Bai, A. H., et al. MicroRNA-182 promotes leptomeningeal spread of non-sonic hedgehog-medulloblastoma. Acta Neuropathol (2011); Rolli, C.G., Seufferlein, T., Kemkemer, R. & Spatz, J.P. Impact of tumor cell cytoskeleton organization on invasiveness and migration: a microchannel-based approach. PLoS One 5, e8726 (2010)).

(o) Experimentos con animales

40 El trabajo con animales fue aprobado por las autoridades gubernamentales (Regierungspraesidium Karlsruhe, Alemania) y fue supervisado por oficiales institucionales para la protección de los animales según National Institutes of Health guidelines Guide for the Care and Use of Laboratory Animals..

(p) Modelo de tumor cerebral ortotópico

45 Un total de 2x10⁵ células U-87MG con silenciamiento shRNAI BCAT1 o ARNhc no dirigido se implantaron estereotácticamente en el cerebro de seis ratones atímicos de 7-9 semanas de edad (CD1 nu/nu; Charles River Laboratories, Wilmington, MA, EE. UU.), respectivamente. Cuatro semanas después de la implantación, se sacrificaron los animales, se retiraron los cerebros y se crío-seccionaron. Las secciones de cerebro se tiñeron con hematoxilina y eosina y el volumen del tumor se calculó usando ImageJ.

(q) Extracción de células con ácido perclórico y espectroscopía de RMN

50 Las células se recogieron mediante tripsinización, se lavaron una vez con PBS enfriado en hielo, y el sedimento celular se congeló a -80°C. Típicamente 1 x 10⁸ células recogidas se sometieron a extracción con ácido perclórico seguido de

neutralización con KOH según los protocolos publicados⁵⁰. Brevemente, se añadieron 2 ml de 1 N HClO₄ enfriado con hielo a un sedimento congelado de células recogidas. El sedimento se interrumpió usando un mortero de teflón y un homogeneizador de vidrio. Se añadió 1 ml de agua enfriada con hielo al lisado, se sometió a agitación vortical durante 90 segundos y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min a 4°C. El sedimento se volvió a extraer y se combinaron los sobrenadantes. El extracto se neutralizó con KOH y el pH se ajustó a 6,5-7,0. El KClO₄ precipitado se sedimentó a 25.000 x gramopor 20 minutos y el sobrenadante se liofilizó.

Los residuos de extracto liofilizados se disolvieron en 0,5 ml de un tampón D₂O (99,9% D) que contenía fosfato de sodio 30 mM y azida de sodio 0,1 mM (pH 7,02). Para el análisis cuantitativo, un capilar de referencia (1,5 mm OD, 0,99 mm ID) se llenó con una solución de ácido trimetilsilil-2,2,3,3-tetradeuteropropanóico (TSP, sal de sodio) 11 mM en el tampón D₂O descrito anteriormente. Posteriormente, el capilar se selló en la llama de un mechero Bunsen. Se preparó una solución de calibración colocando cantidades pesadas de glucosa y ácido cítrico en el tampón D₂O para dar las concentraciones calculadas de glucosa 10,49 mM y de glucosa 4,95 mM. Se adquirieron espectros ¹H-NMR de la solución de calibración + capilar a 600 MHz (Avance AV-600, Bruker BioSpin GmbH) usando un tubo de RMN de 5 mm estándar y una sonda inversa de triple resonancia en las mismas condiciones a ser usadas para los extractos (20°C, pre-saturación de señal HDO residual, tiempo de repetición TR = 7 s, ángulo de inclinación 30°). Las integrales de señal de citrato y glucosa se ajustaron a los valores correspondientes a las concentraciones proporcionadas anteriormente, y se encontró que la integral de la señal de metilo TSP era equivalente a 4,60 ± 0,10 mM protones. Los extractos celulares se midieron con el capilar de referencia calibrado insertado (512 transitorios en 1 hora), y las señales ¹H-RMN para los aminoácidos de cadena ramificada, varios metabolitos y la referencia TSP se integraron. La integral TSP se definió como 4,60 mM de manera que las integrales de señal de metabolito proporcionaron directamente las concentraciones de metabolito en mM (μmol/ml) de los volúmenes de 0,5 ml usados. A continuación, estos datos se convirtieron a femtomol/célula usando los recuentos de células determinados antes de la extracción.

(r) Preparación de homogeneizados de células

Los sedimentos celulares se diluyeron en 100 μl de agua y se homogeneizaron mediante tratamiento con ultrasonidos (dispositivo ultrasónico, 3-5 x 20 ciclo, salida 80%, Branson Sonifier 450, Dietzenbach, Alemania). La proteína se determinó según Lowry (Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275 (1951) con las modificaciones de Helenius y Simons (Helenius, A. y Simons, K. The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. J Biol Chem 247, 3656-3661 (1972)) usando albúmina de suero bovino como estándar. Las concentraciones de proteína final de los homogeneizados deberían estar comprendidas en un intervalo de 2-4 mg/ml. Estas diluciones se usaron para todos los análisis.

(s) Análisis estadístico

La relación entre el estado de mutación de IDH1/IDH2 y la expresión de la proteína BCAT1 (Fig. 1k) se ensayó con el test exacto de Fisher. El test t de Student (de dos colas, no emparejado) se usó para las demás comparaciones estadísticas. *, P < 0,05; **, P < 0,01; ***, P < 0,001.

Ejemplo 2

Inhibición de la proliferación celular por Gabapentina

Las líneas celulares de glioblastoma humano U87-MG (HTB-14), HS683 (HTB-138) y U373-MG (HTB-17; LGC Standards, Teddington TW11 OLY, Reino Unido) se cultivaron en medio esencial mínimo de Dulbecco suplementado con 10% suero bobino fetal y 1% de mezcla de penicilina /estreptomycin. Se sembraron 5x10⁴ células/pocillo en placas de 24 pocillos en un volumen total de 500 μl de medio de cultivo celular. El medio se retiró 4 horas después de la siembra de las células, y se reemplazó con 500 μl de medio que contenía ácido 1-(aminometil)-ciclohexano acético (Gabapentina, disuelta en tampón HEPES 200 mM a una concentración de 500 mM) a concentraciones finales de 5 mM, 10 mM y 20 mM, respectivamente. Se añadieron volúmenes correspondientes de HEPES 200 mM a los pocillos de control respectivos. 5 horas después de intercambiar el medio, se añadió 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU Carlsbad, CA 92008, EE. UU.) con el fin de medir la proliferación celular usando el kit Click-iT® de proliferación de Invitrogens (Carlsbad, CA 92008, EE. UU.). Las células se recogieron 16 horas después de la aplicación EdU y la proliferación se midió según las instrucciones del fabricante, usando un citómetro de flujo BD Biosciences FACS Canto II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ 07417 EE. UU.). Se obtuvieron tres mediciones repetidas para cada tratamiento. En todas las líneas celulares se observó una reducción significativa dependiente de la concentración de la proliferación celular de aproximadamente el 20-55% en las células tratadas con gabapentina en comparación con las células tratadas "mock". Los resultados se muestran en la Figura 10.

Ejemplo 3

Inhibición de la proliferación celular por oligonucleótidos antisentido BCAT1

Se produjeron vectores lentivirales mediante co-transfección de células HEK293T con constructos psPAX2 (Addgene 12260, Didier Trono, vector de empaquetamiento), pMD2.G (Addgene 12259, Didier Trono, plásmido de envoltura) y pLKO.1 ARNhc (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178, EE. UU.). Las transfecciones se llevaron a cabo usando TransIT®-LT1 (Mirus Bio LLC, Madison, WI 53711, EE. UU.) y el virus se recogió a las 48 y 72 horas después de la transfección. Se usaron dos constructos ARNhc independientes dirigidos a regiones diferentes del transcrito de ARNm BCAT1: MISSION shRNA TRCN0000005907 NM_005504.3-1064s1c1 (shRNA1) y TRCN0000005909 NM_005504.3-751s1c1 (shRNA2); todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178, EE. UU.. Se usó ARNhc no dirigido como control.

Las líneas celulares de glioblastoma humano U87-MG (HTB-14), HS683 (HTB-138) y U373-MG (HTB-17; LGC Standards, Teddington TW11 OLY, Reino Unido) se sembraron en placas de 24 pocillos (5×10^4 células / pocillo) en un volumen total de 500 μ l de medio de cultivo celular. Después de 24 horas, las células fueron transducidas con virus en presencia de 8 μ g/ml de polibreno. El sobrenadante que contenía virus se retiró después de 24 horas y las células se dividieron los días 3 y 5 después de la transducción. Se detectó una menor expresión de ARNm BCAT1 y de proteína usando PCR cuantitativa en tiempo real y transferencia Western (anticuerpo ECA39, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA 92121, EE. UU.). Se llevó a cabo un ensayo de proliferación en el día 6 usando el kit de proliferación celular Click-iT® EdU después de incubar las células con EdU 10 μ M durante 16 horas. En todas las células transducidas con ARNhc BCAT1 se observó una reducción de la proliferación en el intervalo 20-80% dependiendo de la línea celular. Estos resultados se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 4

Determinación de la sobreexpresión de BCAT1 en glioblastomas IDH^{wt}

Los análisis de predicción de micromatrices con relación a los datos de expresión génica de gliomas astrocíticos de grados OMS II, III y IV identificaron la BCAT1 como el mejor clasificador que distingue el glioblastoma primario de otros astrocitomas, tal como puede observarse en la Tabla 3 siguiente:

Rango	Símbolo de gen	Puntuación All_AAIII_sGBIV	Puntuación pGBIV
1	BCAT1	-0,530	0,435
2	CHI3L1	-0,503	0,413
3	TIMP1	-0,492	0,404
4	IGFBP2	-0,453	0,372
5	PDPN	-0,448	0,368
6	SERPINE1	-0,442	0,363
7	EMP3	-0,436	0,358
8	ADM	-0,413	0,338
9	PTX3	-0,403	0,331
10	COL6A2	-0,399	0,327
11	NNMT	-0,396	0,325
12	LIF	-0,393	0,323
13	STEAP3	-0,371	0,304
14	COL6A2	-0,371	0,304
15	POSTN	-0,361	0,296
16	KCNE4	-0,359	0,295
17	ABCC3	-0,348	0,286

ES 2 565 498 T3

(Cont.)

18	FABP5	-0,343	0,282
19	LOX	-0,342	0,281
20	RANBP17	0,339	-0,278
21	MOXD1	-0,337	0,276
22	ADAM12	-0,336	0,276
23	RBP1	-0,331	0,272
24	OCIAD2	-0,330	0,270
25	SAA2	-0,320	0,263
26	FMOD	-0,319	0,262
27	PBEF1	-0,317	0,260
28	ATP7B	-0,316	0,259
29	SOCS3	-0,315	0,259
30	PLAT	-0,314	0,258
31	RARRES2	-0,312	0,256
32	RAB34	-0,305	0,250
33	VEGF	-0,304	0,249
34	RBP1	-0,303	0,249
35	SAA1	-0,302	0,248
36	NA	0,300	-0,246
37	PCDH15	0,296	-0,243
38	AL354720.14	-0,293	0,240
39	PBEF1	-0,291	0,239
40	EFEMP2	-0,291	0,238
41	IL8	-0,288	0,236
42	UPP1	-0,284	0,233
43	ANXA2	-0,282	0,231
44	TNFRSF12A	-0,279	0,229
45	ANGP72	-0,273	0,224
46	ANXA2	-0,272	0,224
47	EMILIN2	-0,272	0,223
48	TMEM158	-0,268	0,220
49	VEGF	-0,262	0,215
50	PHYHIPL	0,262	-0,215

Cuando se clasificaron los tumores en base al estado de mutación IDH, los niveles de expresión de ARNm BCAT1 fueron significativamente mayores para los gliomas IDH^{wt} con relación a los gliomas IDH^{mut} (Fig. 1b; $P < 0,0001$; test t de Student de dos colas), mientras que no se observaron niveles comparativamente mejorados para la expresión de BCAT2 (Fig. 1c; $P = 0,0301$). Un análisis de vías mostró que, además de BCAT1, la expresión de ARN de diversos otros genes de la ruta catabólica BCAA se reguló positivamente en tumores IDH^{wt} en comparación con tumores IDH^{mut} (Fig. 7). En consonancia con los resultados de expresión de ARN, un análisis de transferencia Western mostró que la expresión de la proteína BCAT1 era alta en tumores IDH^{wt}, pero estaba esencialmente ausente en tumores IDH^{mut}, independientemente de la mutación específica en cualquiera de entre IDH1 e IDH2 (Fig. 1d). La secuenciación tanto de las regiones de promotor como las de codificación de para 20 gliomas no reveló mutaciones putativas sin sentido ni activadoras. La estrecha correlación observada entre la mutación IDH1o IDH2 y la expresión de BCAT1 se confirmó adicionalmente mediante tinción inmunohistoquímica de secciones de 81 gliomas humanos primarios (77 astrocitomas, 4 oligodendrogliomas), de entre los cuales 45 de 46 de tumores IDH^{wt} mostraron una fuerte tinción BCAT1 (Fig. 1e.), mientras que 35 de 35 tumores con mutaciones en IDH1 (30 R132H, 1 R132C, 1 R132S) o IDH2 (3 R172K) eran negativos para BCAT1 (Fig. 1f-h.); ($P < 0,0001$; test exacto de Fisher; Fig. 1k). Por lo tanto, el patrón de tinción BCAT1 es en gran medida complementario al patrón obtenido con el anticuerpo ampliamente usado contra la proteína mutante IDH1-R132H (Fig. 1i, j). Sin embargo, a diferencia de la tinción IDH1-R132H, el anticuerpo BCAT1 distingue también los tumores IDH1 (Fig. 1e) de los tumores con mutaciones IDH1 y IDH2 menos comunes que no son reconocidos por los anticuerpos anti-IDH1-R132H (Fig. 1g-h). Estos datos muestran que la alta expresión de BCAT1 es un rasgo característico de los gliomas IDH^{wt} que puede ser usado para identificar positivamente estos tumores en un entorno de diagnóstico.

Ejemplo 5

Determinación de la expresión dependiente de sustrato de BCAT1

Se encontró que BCAT1 se expresa fuertemente en las líneas celulares de glioblastoma LN-229, U-87MG, U-373MG y en menor medida en A172 (Fig. 2a), todas las cuales se confirmó que tenían los genes IDH1 y IDH2 de tipo salvaje. La expresión de BCAT1 se elevó también en la línea celular HS683, derivada originalmente de un oligodendroglioma, pero sin embargo muestra un genotipo IDH^{wt}. De esta manera, todas estas líneas celulares pueden considerarse como modelos adecuados para el estudio de la función de BCAT1. La expresión de ARN BCAT1 y de proteínas se reguló positivamente bajo condiciones hipóxicas, que están presente frecuentemente en el glioblastoma (Fig. 2B). La expresión de BCAT1 estaba correlacionada con la concentración del sustrato alfa-KG y se reguló positivamente después de aumentar la concentración de sustrato dimetil-alfa-KG permeable a las células en el medio de cultivo (Fig. 2c). Por el contrario, el silenciamiento de IDH1 mediado por ARNhc, una fuente importante de alfa-KG en el citoplasma, condujo a una fuerte regulación negativa de la expresión de BCAT1 (Fig. 2d).

Ejemplo 6

Expresión de BCAT1 regulada de manera diferencial mediante metilación de ADN en dos promotores alternativos

Para aclarar adicionalmente la regulación diferencial de la expresión de BCAT1 en gliomas IDH^{wt} y gliomas IDH^{mut}, se cuantificó la expresión del transcrito en muestras de pacientes. Usando RT-PCR y secuenciación, se confirmaron la expresión de tres transcritos BCAT1 codificadores de proteína que figuran en la base de datos Ensembl en tumores IDH^{wt} primarios astrocíticos, así como en un grupo de 23 tejidos de cerebros normales (Fig. 9). Estos tres transcritos (T1, T4 y T6) codifican proteínas de 386, 398, y 385 aminoácidos, la totalidad de los cuales corresponden a la banda de proteína única de 43 kD según se identifica mediante análisis de transferencia Western. Estos transcritos se originan a partir de dos promotores alternativos (Fig. 3a) y se diferencian sólo en sus primeros exones, que codifican 2, 14 y 1 aminoácidos en T1, T4 y T6, respectivamente. Una qRT-PCR específica de transcrito identificó T6 como el transcrito predominante que representa el 73% de todos los ARNm BCAT1 en tumores primarios (Fig. 3b). En particular, la expresión de todos los transcritos BCAT1 fue significativamente más alta en los tumores IDH^{wt} en comparación con los tumores IDH^{mut}.

Para investigar los posibles mecanismos de regulación transcripcional de BCAT1, se realizaron análisis cuantitativos de la metilación del ADN sobre los astrocitomas de todos los grados usando un análisis MassARRAY de productos de PCR amplificados a partir de ADN tratado con bisulfito que cubre los dos promotores alternativos (Fig. 3c). Se observaron diferentes patrones de metilación para los tumores IDH^{wt} y los tumores IDH^{mut}. El principal promotor (promotor 2) estaba hiper-metilado en los tumores IDH^{mut}, pero principalmente no metilado en los tumores IDH^{wt} y el cerebro normal (Fig. 3c, panel derecho). El grado medio de metilación de los amplicones A6 y A7 está fuertemente asociado con el estado de mutación de IDH1 (Fig. 3d). Estos datos muestran la supresión de los transcritos T4 y T6 por la metilación del promotor-2 en los tumores IDH^{mut}. El promotor 1 (Fig. 3c, panel izquierdo) estaba principalmente no metilado en todas las muestras tumorales, así como en el cerebro normal, con la excepción de un tramo de secuencias hiper-metiladas inmediatamente aguas arriba de la isla CpG. Dentro de esta región aguas arriba, se identificaron tres dinucleótidos CpG metilados de manera diferencial entre los tumores IDH^{wt} y los tumores IDH^{mut} en las posiciones -699/-697 (CpG4;5) y -660 (CpG6) en el amplicón A2. En contraste con el patrón de metilación en el promotor 2, CpG4;5 (Fig. 3e) y CpG6 (Fig. 3f) mostraron una metilación significativamente menor en los tumores IDH^{mut} que en los tumores IDH^{wt}. El grado de metilación en esta

región metilada de manera diferencial (DMR) estaba correlacionado con la expresión del transcrito T1 BCAT1 en los tumores IDH^{wt}, apoyando su relevancia funcional (Fig. 3g). El patrón de metilación específica de CpG observado es consistente con la unión del represor al DMR que conduce a la regulación negativa de T1. Los datos ChIPseq habían sugerido previamente la unión del represor HEY1 al promotor 1 BCAT1 pero no al promotor 2 (Fig. 3a). El análisis de los datos de expresión de ARN confirmó la sobreexpresión del represor HEY1 en tumores astrocíticos en comparación con el cerebro normal. De manera consistente con la actividad del represor HEY1, el silenciamiento de HEY1 mediado por ARNip en células HEK293T aumentó la expresión del transcrito T1 (Fig. 3 h,i). El análisis ChIP demostró que, en comparación con una región de control aguas arriba y una región cerca del sitio de inicio de traducción, la unión más fuerte de dos constructos HEY1 diferentes se produce en el DMR (Fig. 3j,k). En conjunto, estos datos muestran fuertemente que la expresión diferencial de transcritos BCAT1 en astrocitomas está regulada por la metilación del ADN que implica una amplia metilación del promotor 2 en los tumores IDH^{mut} y metilación específica de sitio CpG en un sitio de unión de represor HEY1 en el promotor 1 de los tumores IDH^{wt}.

Ejemplo 7

Reducción de la liberación de glutamato por las células de glioblastoma mediante la supresión de BCAT1

Para comprender mejor el papel funcional de la BCAT1 en glioblastomas, líneas celulares U-87MG y líneas celulares U-373MG se trataron con gabapentina, un análogo de leucina que inhibe específicamente BCAT1, pero no BCAT2. La espectroscopia ¹H-NMR de los extractos de células tratadas con gabapentina 20 mM durante 20 horas demostró la acumulación intracelular de BCAAs, consistente con la inhibición de BCAT1 (Fig. 4ab). El glioblastoma libera altas concentraciones de glutamato, que conduce a la muerte neuronal por un mecanismo excitotóxico. La liberación de glutamato se redujo significativamente con la inhibición de BCAT1 con gabapentina (Fig. 4c), que indica que BCAT1 es un contribuyente principal a la producción de glutamato a través de catabolismo BCAA en el glioma IDH^{wt}.

Para confirmar independientemente estos hallazgos, se llevó a cabo un silenciamiento de BCAT1 mediado por ARNhc en células U-87MG, U-373MG y HS683 usando dos ARNhcs dirigidos a los tres transcritos BCAT1. Un análisis tándem-MS de los medios de cultivo de células U-87MG después de una incubación de 24 horas reveló que la liberación de glutamato, así como la captación de BCAA, se redujeron en las células con silenciamiento BCAT1 en comparación con las células de control (Fig. 4d). También se observó un aumento significativo en la liberación de alanina, glicina y treonina. La cuantificación de las concentraciones de aminoácidos intracelulares reveló acumulaciones significativas de aspartato, glicina y treonina (Fig. 4e). Se observó también una pequeña pero significativa acumulación de glutamato después del silenciamiento de BCAT1; sin embargo, teniendo en cuenta la alta relación de volumen de los medios al volumen intracelular, la concentración total de glutamato no se ve afectada de manera significativa por esta pequeña acumulación intracelular. En los ratones con silenciamiento BCAT2, la inhibición del catabolismo de BCAA resulta en altas concentraciones de BCAA y tasas más altas de síntesis de proteínas en los tejidos periféricos actuando mecánicamente sobre la ruta de señalización de rapamicina (mTOR) y un aumento compensatorio de la degradación de proteínas (aumento del recambio de proteínas).

El silenciamiento de BCAT1 condujo a una fuerte regulación negativa de 3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa (HADH), una enzima que participa en el catabolismo de valina e isoleucina aguas abajo de BCAT1 (Fig. 4f, g). Debido a que HADH es muy importante en el metabolismo del ácido graso, el silenciamiento de BCAT1 alteraría también la síntesis o degradación de ácidos grasos esenciales para la síntesis de membrana.

Ejemplo 8

Limitación de la migración de glioblastoma en microcanales mediante el silenciamiento de BCAT1

El silenciamiento de BCAT1 afectó fuertemente a la morfología celular, resultando en una apariencia redondeada, menos extendida (Fig. 5a-b). Para probar si estos cambios de morfología podrían afectar a la capacidad de las células tumorales de invadir tejidos adyacentes, se usó un chip de migración con microcanal para simular un entorno tridimensional (Fig. 5c). Después del silenciamiento de BCAT1, la mayoría de las células U-87MG (55%) penetró distancias cortas en los microcanales, pero no fueron capaces de deformarse activamente con el fin de invadir completamente los microcanales mientras que la mayoría de las células de control (78%) invadieron completamente los canales (Fig. 5d). Esta menor invasividad de las células con silenciamiento BCAT1 podría ser debida a la composición de membrana alterada causada por la menor abundancia observada de ácidos grasos de cadena larga y las diferencias en el metabolismo del colesterol (Fig. 4g); dichos cambios podrían afectar suficientemente a la disponibilidad general de los componentes de membrana, así como a la elasticidad de la membrana para impedir la invasión de células.

Ejemplo 9

BCAT1 es esencial para el crecimiento del glioblastoma

Se llevaron a cabo experimentos para evaluar el impacto de la BCAT1 sobre la proliferación, inhibición y silenciamiento de

5 células tumorales. Se observó una reducción dependiente de la concentración de la proliferación de hasta el 56%, estimada en base a la incorporación de EdU, tras el tratamiento con el inhibidor gabapentina (Fig. 6a). Los análisis del ciclo celular sugirieron que el tratamiento con gabapentina indujo la detención parcial, indicada por un aumento de la fracción de células en la fase G1 con disminuciones concurrentes de las fracciones G2 y S (Fig. 6b). El silenciamiento de BCAT1 mediado por ARNhc provocó efectos similares (Fig. 6c, d). El silenciamiento de BCAT1 redujo la proliferación un 20-70% en las tres líneas celulares (Fig. 6c) y condujo a la detención G1 y fuertes incrementos en CDKN1B /p27^{KIP1} celular. En particular, el grado de acumulación de CDKN1B/p27^{KIP1} mostró una correlación positiva con el tamaño de la fracción G1 (Fig. 6d). La muerte celular, indicada por la fracción de células en la fase sub-G1, se mantuvo por debajo del 5%, excepto en el caso de Hs683, que mostró un aumento moderado tal como se muestra en la Tabla 4 siguiente.

Línea celular	Tratamiento	Promedio sub-G1 [%]	STDEV sub-G1
U87-MG	ARNhc nt	2,1	0,241
	ARNhcl BCAT1	1,4	0,100
	ARNhcll BCAT1	1,9	0,058
	Gabapentina 20 mM	2,4	0,354
	Control (HEPES)	1,4	0,707
U373-MG	ARNhc nt	2,4	0,283
	ARNhcl BCAT1	1,1	0,045
	ARNhcll BCAT1	2,7	0,141
	Gabapentina 20 mM	2,8	0,283
	Control (HEPES)	1,4	0,212
HS683	ARNhc nt	13,3	1,344
	ARNhcl BCAT1	21,4	0,424
	ARNhcll BCAT1	16,7	2,263
	Gabapentina 20 mM	10,1	0,849
	Control (HEPES)	2,2	0,424

10

Se observaron reducciones comparables de proliferación celular tras el silenciamiento de BCAT1 en cultivos de esferoides primarios de glioblastoma en medio libre de suero, excepto que estas células mostraron una mayor tasa de apoptosis tal como se determina mediante tinción Anexina V/7AAD (Fig. 9). De manera consistente con la reducción observada en la proliferación, el silenciamiento de BCAT1 condujo a una disminución de la fosforilación del homólogo de oncogén viral timoma murino v-akt (AKT) en células U-87MG, U-373MG y Hs683 (Fig. 6e).

15

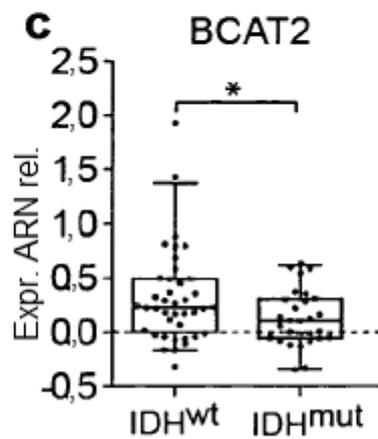
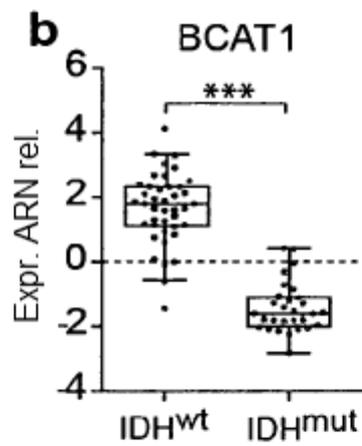
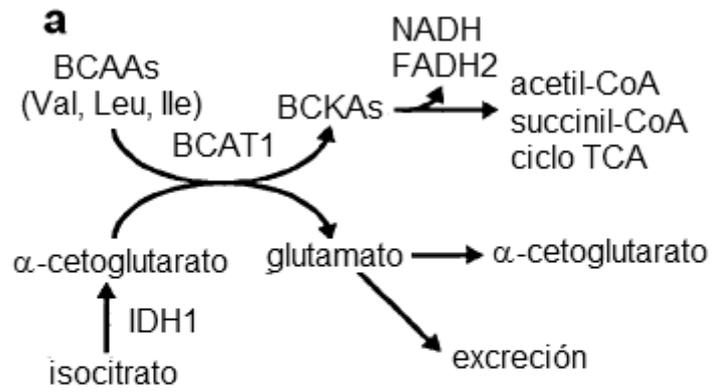
El efecto del silenciamiento de BCAT1 sobre el crecimiento tumoral en vivo se evaluó mediante un trasplante intracerebral de células U-87MG en ratones CD-1 atímicos (Fig. 6f-h). Cuatro semanas después del trasplante de igual número de células vivas, los 6 ratones de control, pero sólo 1 de 6 ratones trasplantados con células transducidas ARNhc BCAT1 mostraron síntomas neurológicos tales como letargo o actividades motoras no coordinadas. La tinción con hematoxilina y eosina de secciones de cerebro de ratón reveló grandes tumores en los ratones trasplantados con células de control (Fig. 6f) mientras que se encontraron tumores significativamente menores en los ratones trasplantados con células con silenciamiento BCAT1 (Fig. 6g). Un análisis cuantitativo confirmó diferencias significativas en el volumen del tumor entre los grupos (Fig. 6h, P = 0,0091).

20

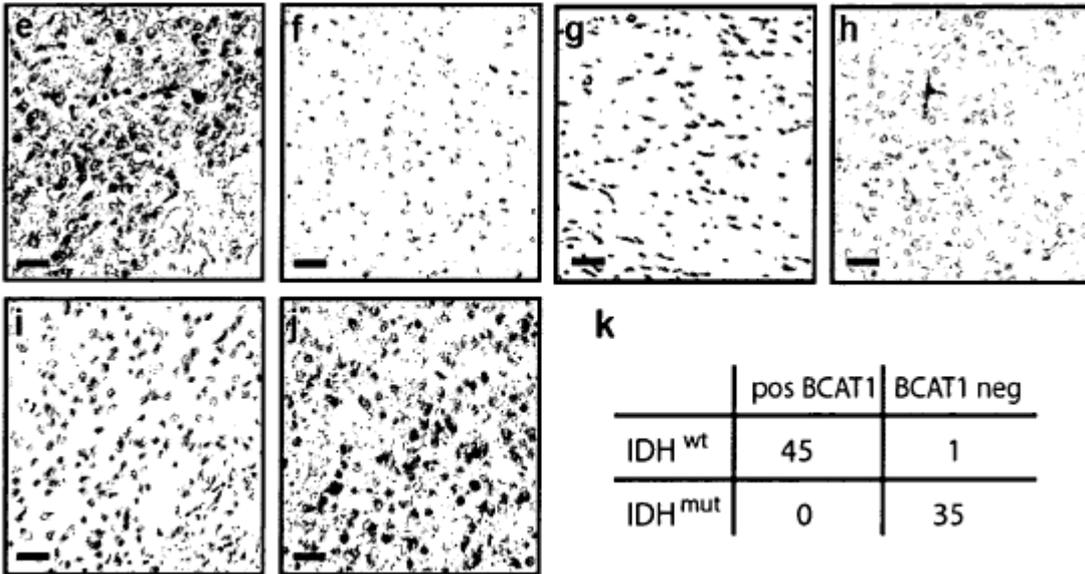
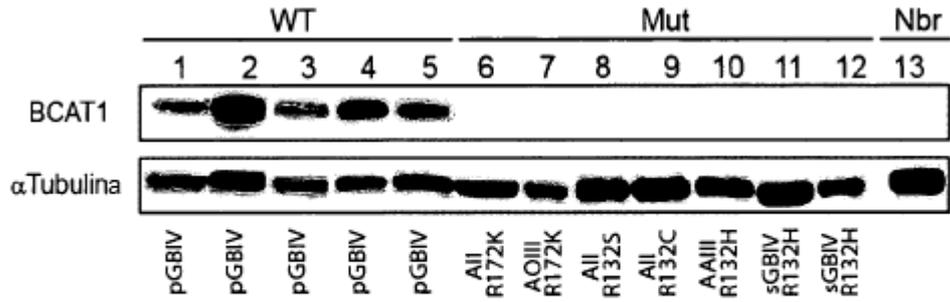
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto capaz de reducir o inhibir (a) la actividad biológica de la aminotransferasa-1 de cadena ramificada (BCAT1) o (b) la expresión del gen que codifica BCAT1 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un tumor cerebral, en el que el tumor cerebral es un glioma o glioblastoma.
- 5 2. Compuesto para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es un oligonucleótido antisentido o ARNip que reduce o inhibe la expresión del gen que codifica BCAT1.
3. Compuesto para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es un compuesto que reduce o inhibe la actividad biológica de BCAT1.
- 10 4. Compuesto para el uso según la reivindicación 3, en el que dicho compuesto es ácido 1-(aminometil) ciclohexano acético.
5. Compuesto para el uso según la reivindicación 3, en el que dicho compuesto es un anticuerpo dirigido contra BCAT1 o un fragmento de la misma.
6. Compuesto para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es una versión inactiva de BCAT1.
- 15 7. Compuesto para el uso según la reivindicación 1, en el que el tumor cerebral a tratar muestra (sobre)expresión de BCAT1.
8. Compuesto para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el tumor cerebral es un glioblastoma IDH^{wt}.
- 20 9. Un procedimiento de identificación de un compuesto que reduce o inhibe la actividad biológica de BCAT1 o la expresión del gen que codifica BCAT1 para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral, en el que el tumor cerebral es un glioma o glioblastoma, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- (a) incubar un compuesto candidato con un sistema de ensayo que comprende BCAT1 o el gen que codifica BCAT1;
y
- (b) ensayar una actividad biológica de BCAT1;
- 25 en el que una inhibición o una pérdida de la actividad biológica de BCAT1 es indicativa de la presencia de un compuesto candidato que tiene la propiedad deseada.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la inhibición o la pérdida de la actividad biológica de BCAT1 se determina mediante una comparación con un sistema de ensayo **caracterizado por** la ausencia de dicho compuesto de ensayo.

Figura 1



d



k

	pos BCAT1	BCAT1 neg
IDH ^{wt}	45	1
IDH ^{mut}	0	35

Figura 2

a

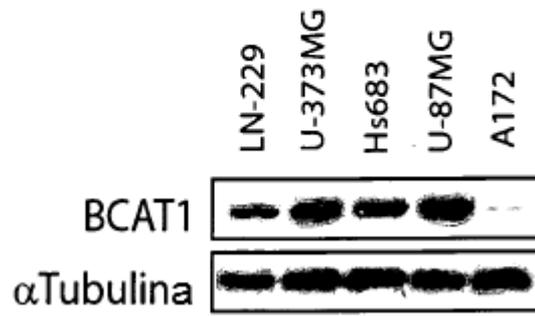


Figura 2

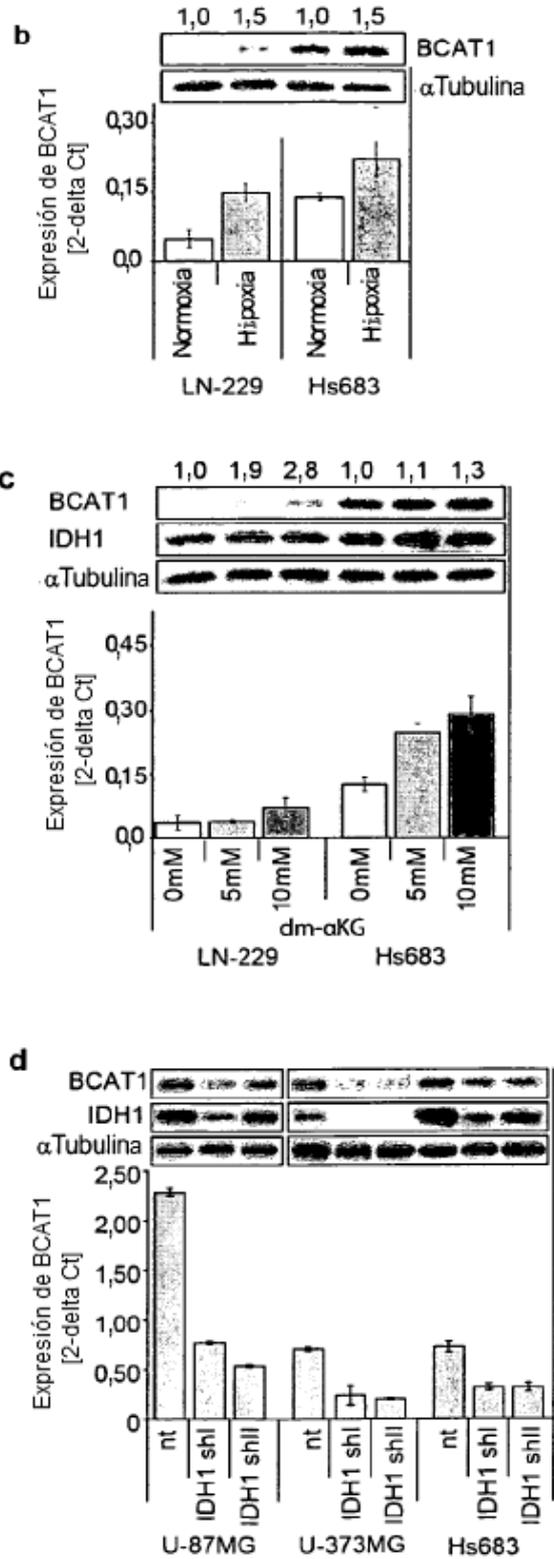
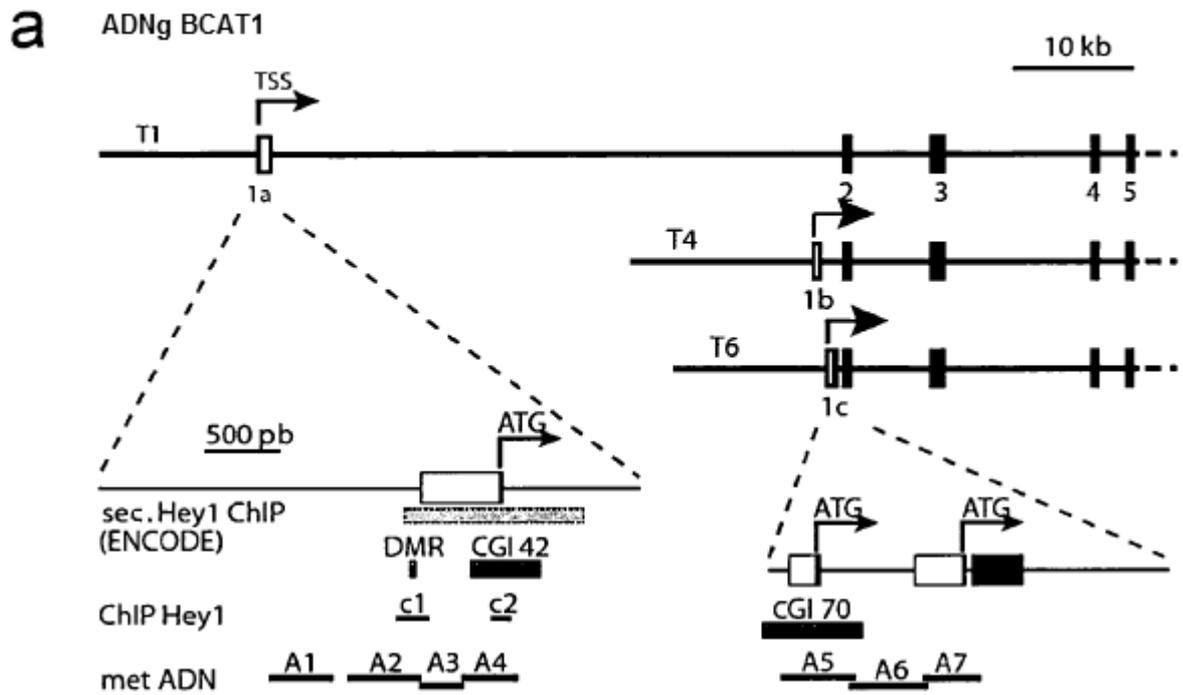


Figura 3



b

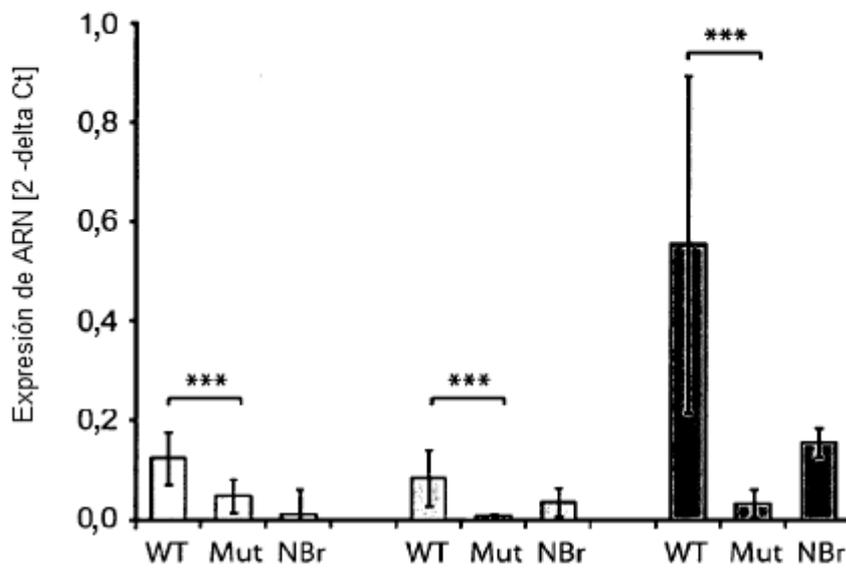


Figura 3

C

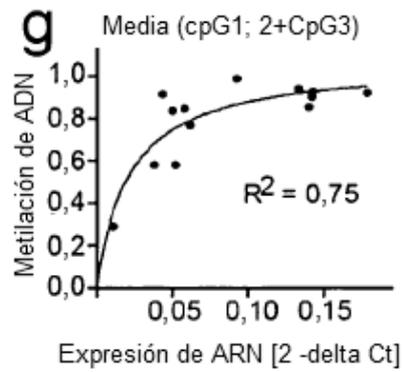
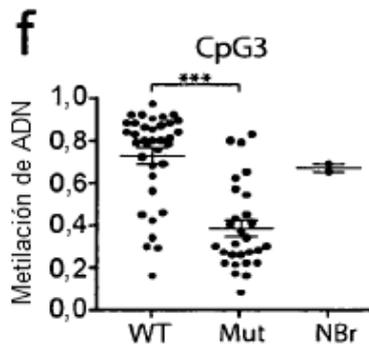
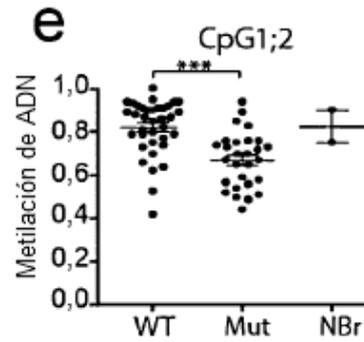
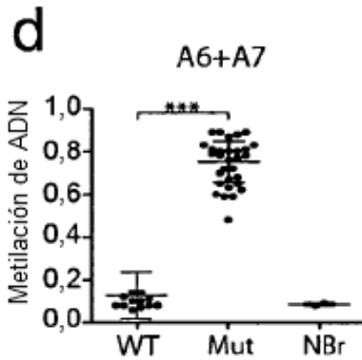
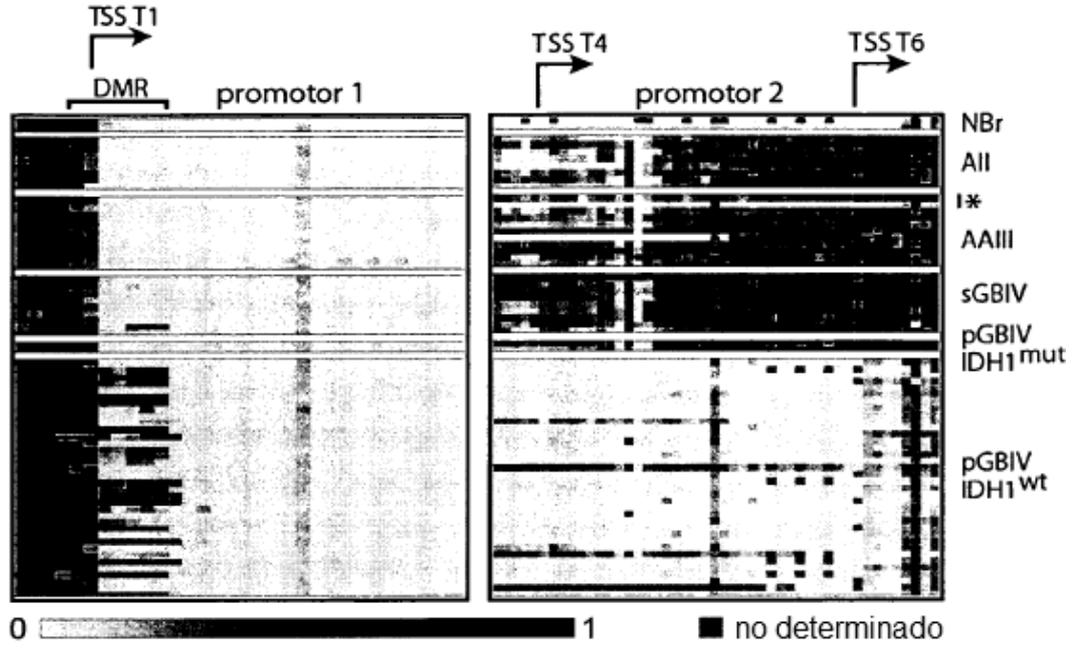


Figura 3

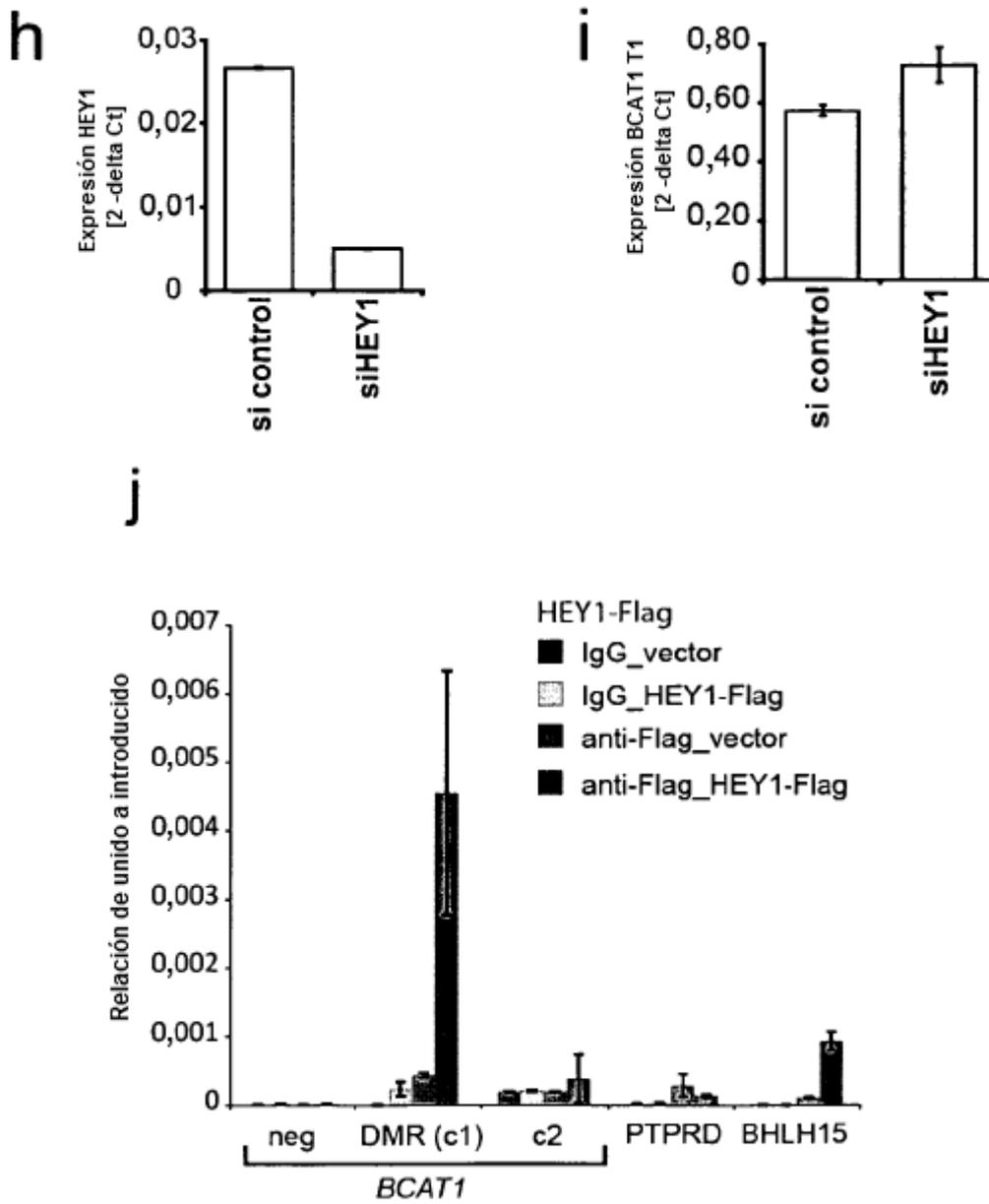


Figura 3

k

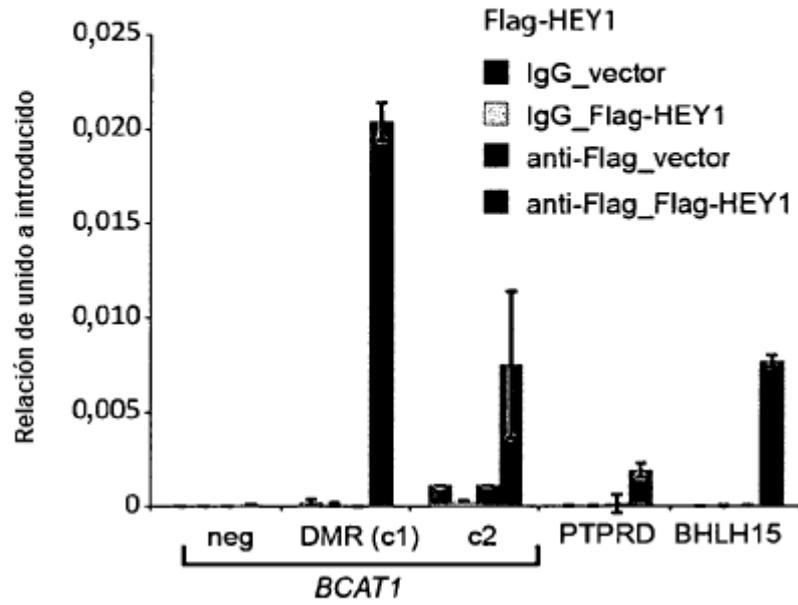


Figura 4

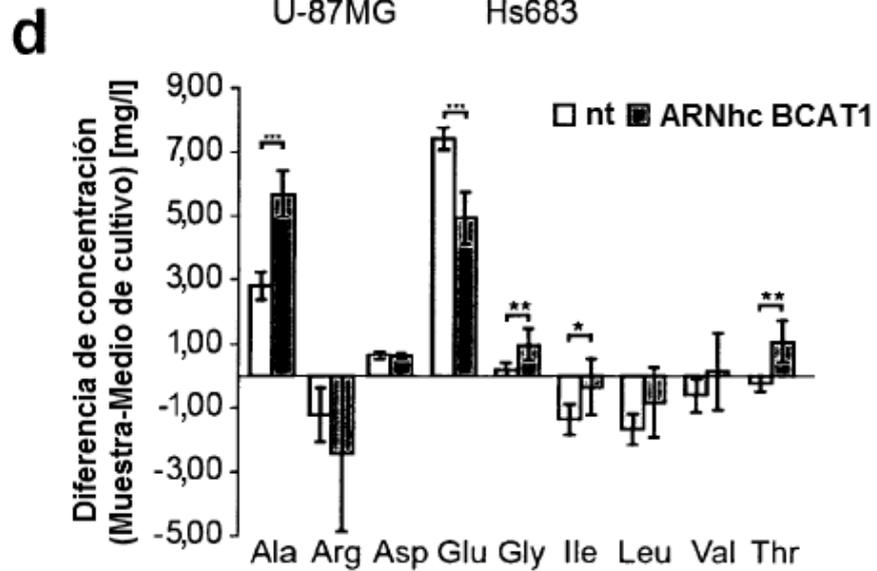
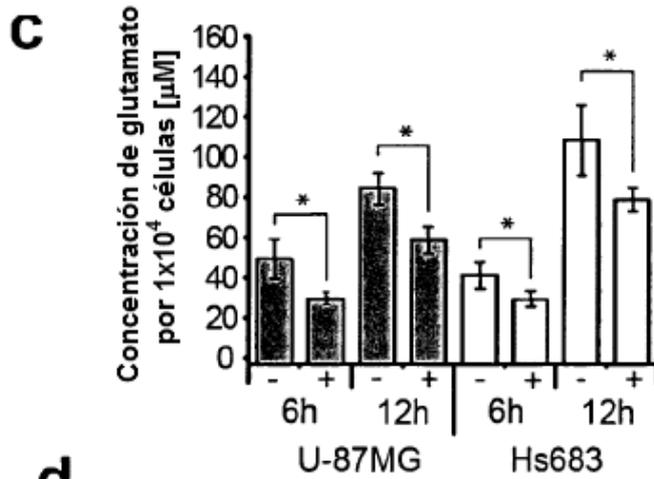
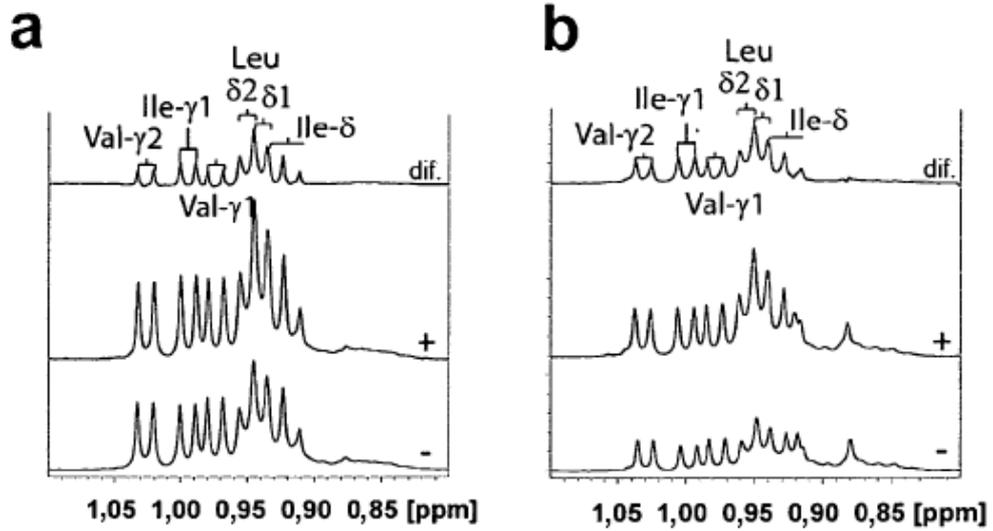
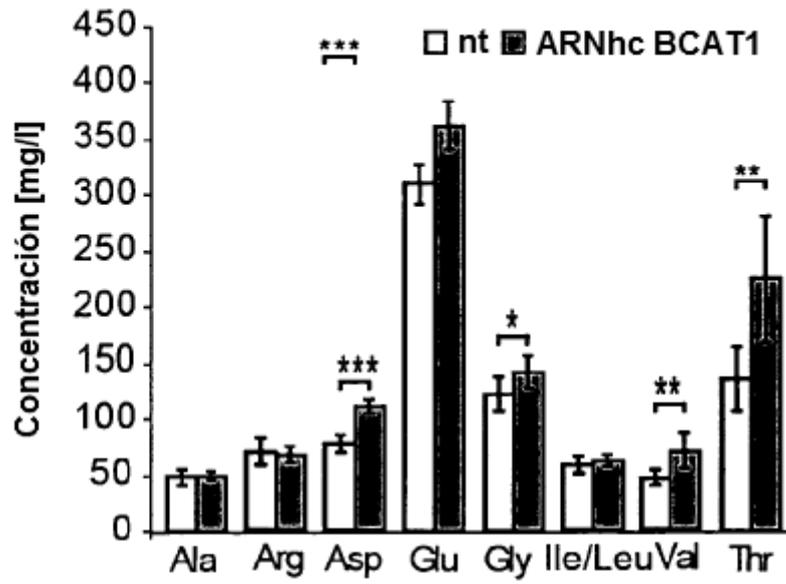


Figura 4

e



g

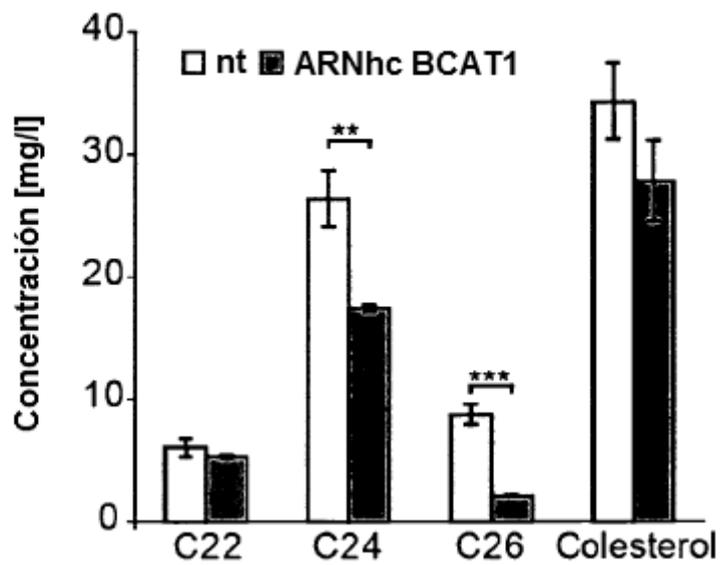


Figura 4

f

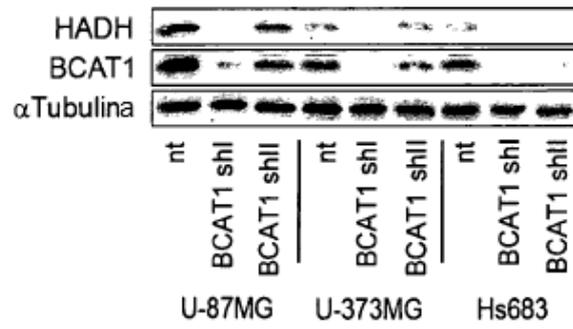


Figura 5

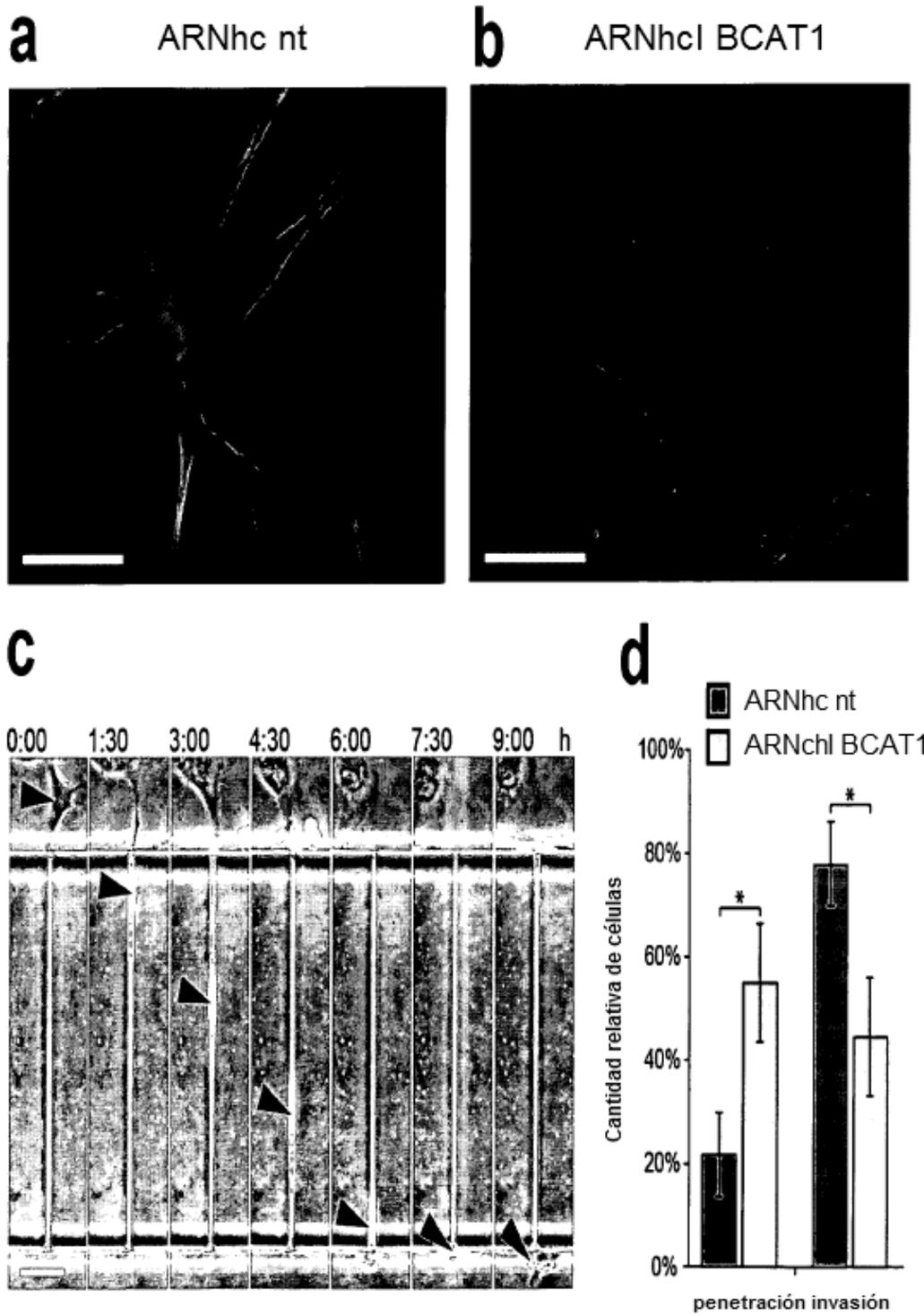


Figura 6

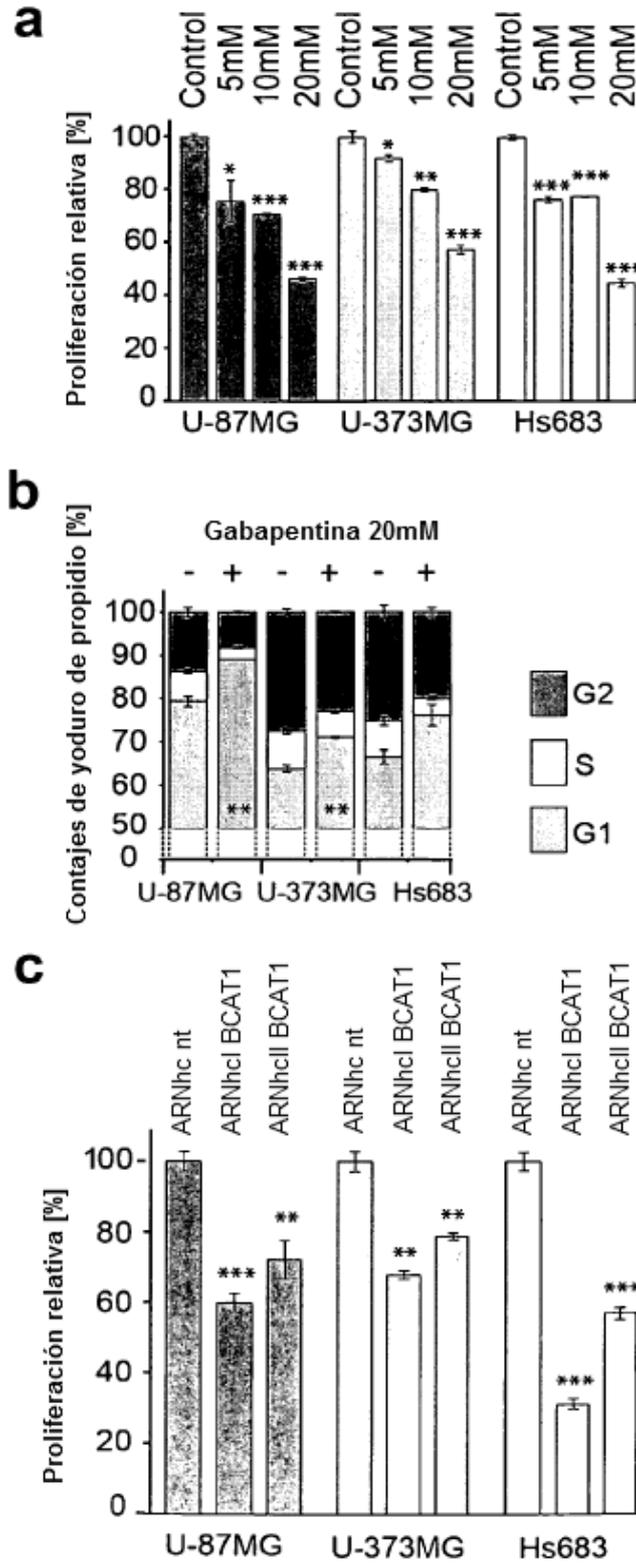


Figura 6

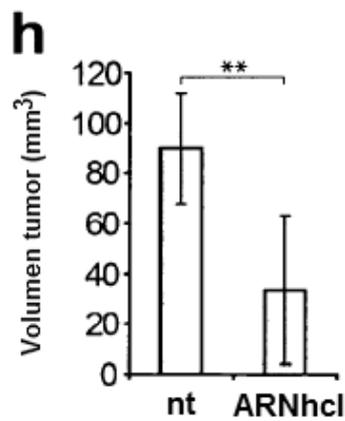
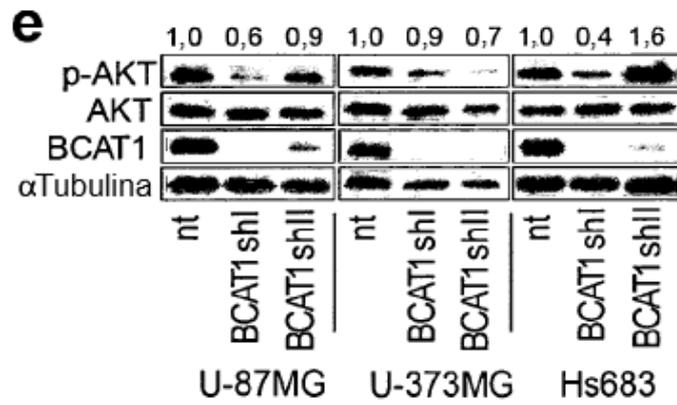
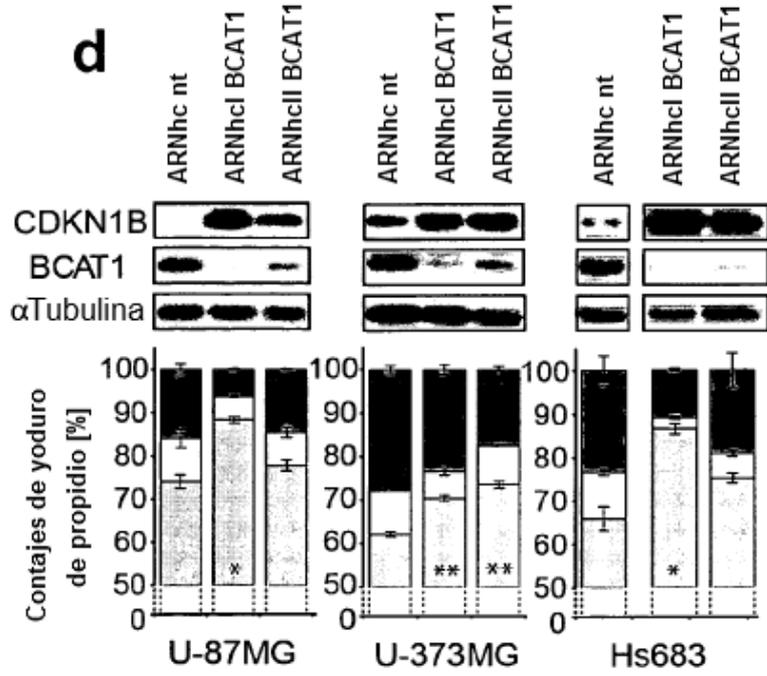


Figura 6

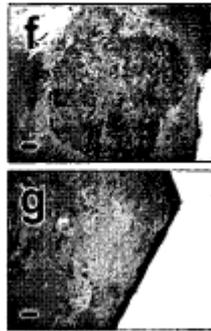
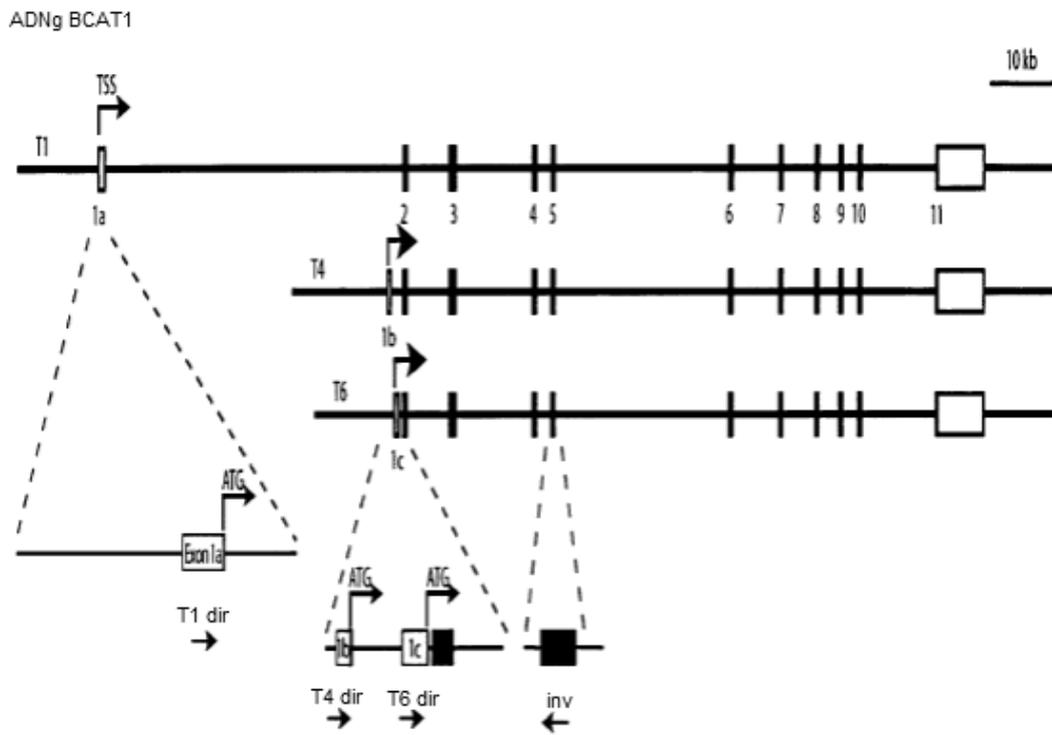


Fig. 7

a



b

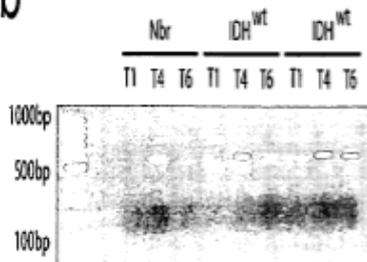
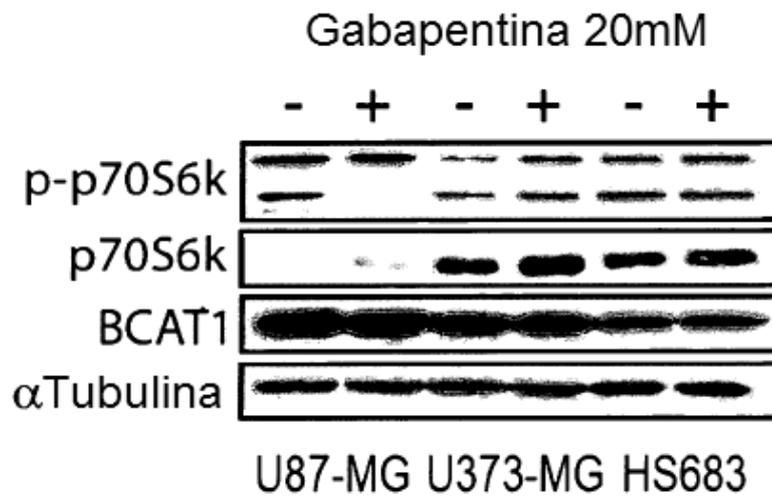


Fig. 8

a



b

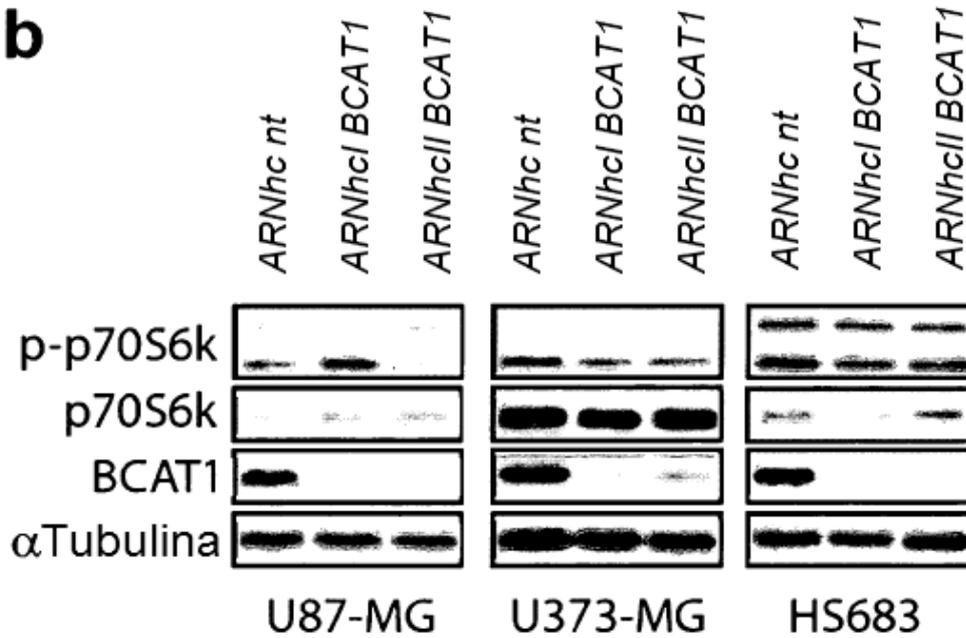


Fig. 9

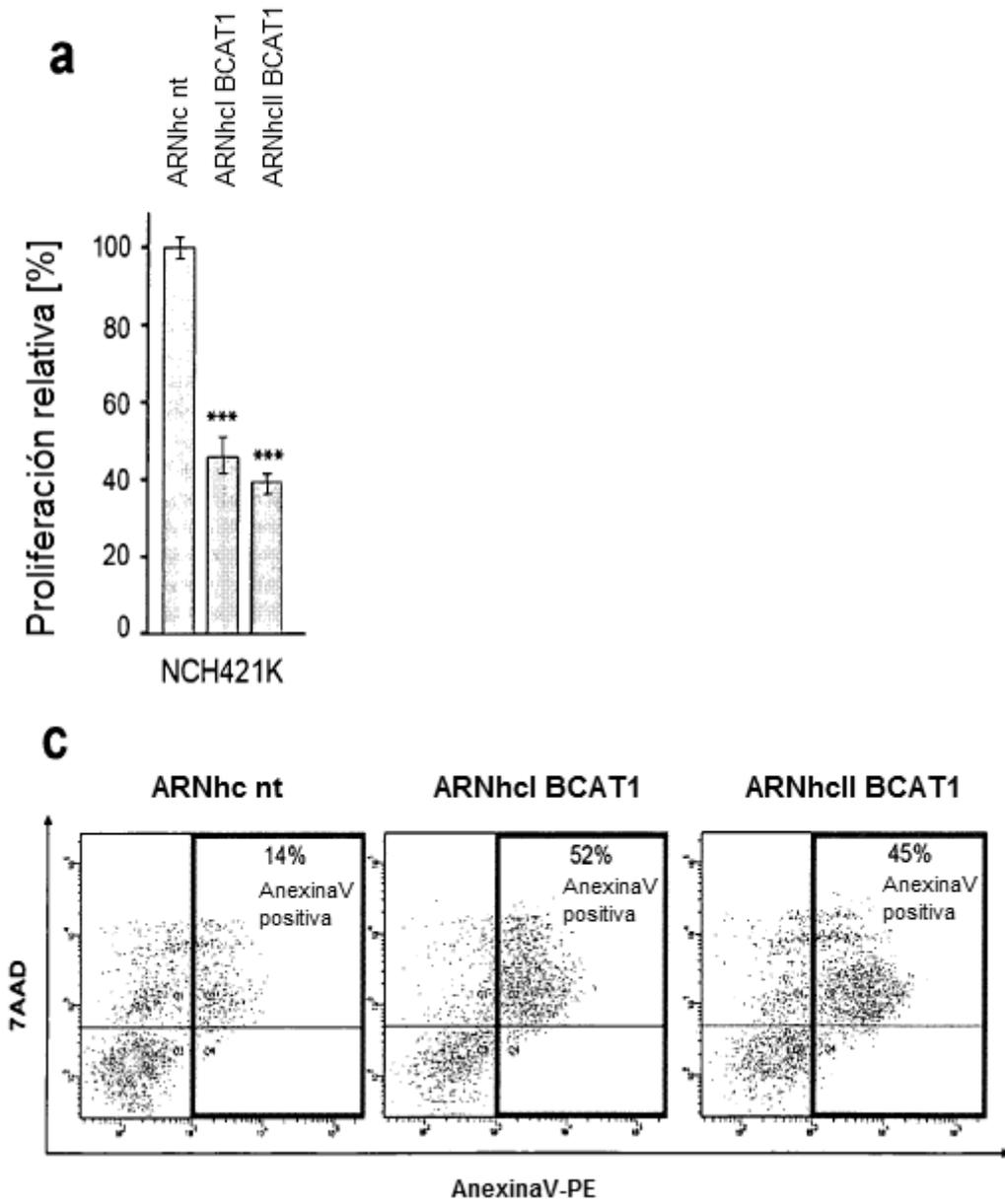


Figura 9

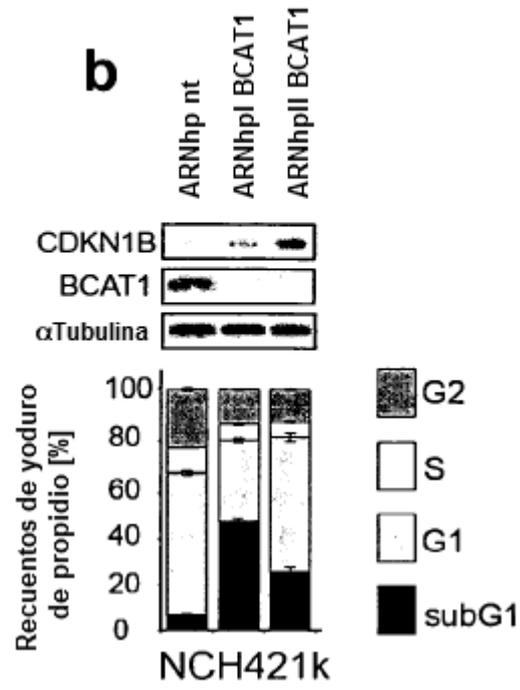


Fig. 10

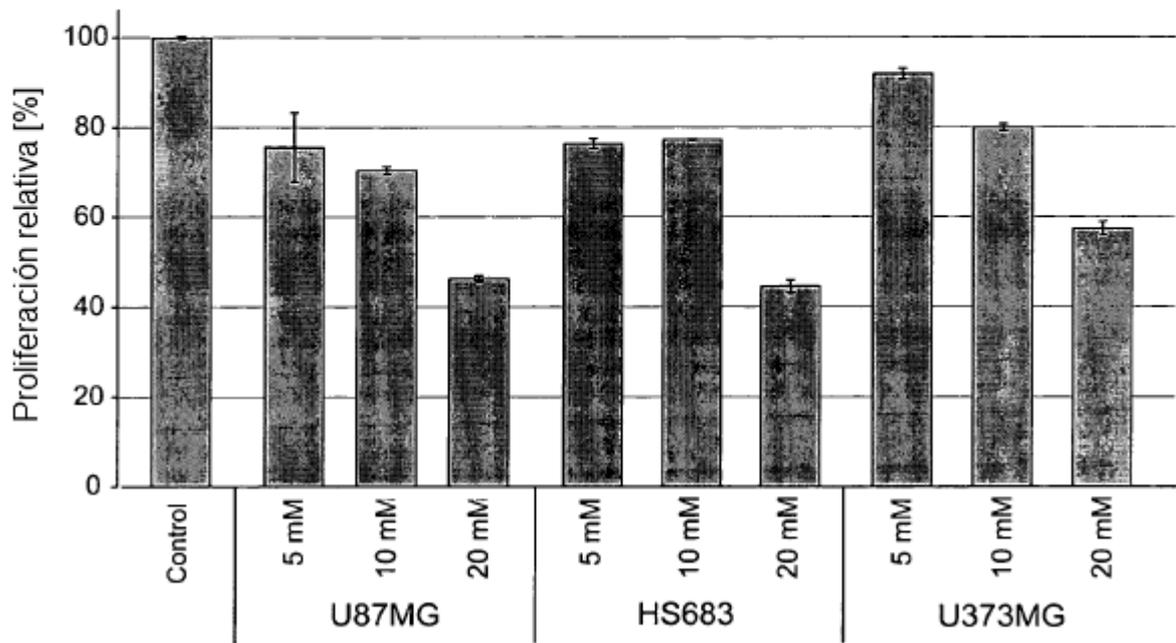


Fig. 11

