

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 363 394**

21 Número de solicitud: 201000061

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/137** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **19.01.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2011**

Fecha de la concesión: **19.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **31.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**31.01.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
OTRI-PABELLÓN DE BRASIL, PASEO DE LAS  
DELICIAS S/N  
41013 SEVILLA, ES**

72 Inventor/es:  
**DE MIGUEL RODRIGUEZ, MANUEL y  
CORDERO MORALES, MARIO DAVID**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **USO DE AMITRIPTILINA COMO AGENTE ANTITUMORAL PARA EL TRATAMIENTO DE  
CÁNCER DE PULMÓN.**

57 Resumen:

Uso de amitriptilina como agente antitumoral para el tratamiento de cáncer de pulmón.

Composición farmacéutica que comprende el antidepresivo tricíclico amitriptilina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón. Preferiblemente dicho proceso canceroso de pulmón es no microcítico y, más preferiblemente, el proceso canceroso de pulmón no microcítico es carcinoma de pulmón de células grandes.

ES 2 363 394 B2

## DESCRIPCIÓN

Uso de amitriptilina como agente antitumoral para el tratamiento de cáncer de pulmón.

5 La presente invención se enmarca en el campo de Farmacia y Oncología y se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende el antidepresivo tricíclico amitriptilina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón. Preferiblemente dicho proceso canceroso de pulmón es no microcítico y, más preferiblemente, el proceso canceroso de pulmón no microcítico es carcinoma de pulmón de células grandes.

10

## Estado de la técnica anterior

15 Las terapias anticancerígenas, basadas en drogas citotóxicas que dañan el DNA de células tumorales y no tumorales, no son efectivas para ciertos tumores que poseen un mecanismo de reparación intrínseco del DNA altamente eficiente, como son los tumores cerebrales provenientes de células gliales, por ello se está recurriendo a otro tipo de terapias alternativas entre las que se encuentra la terapia oxidativa.

20 Esta terapia consiste en inducir altos niveles de estrés oxidativo en células tumorales aprovechando que son más susceptibles al ataque oxidativo que las células sanas por su menor número de mitocondrias y de enzimas antioxidantes. Actualmente la terapia oxidativa se realiza de dos formas independientes, aumentando la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), y por inhibición de los sistemas antioxidantes de las células tumorales. Mediante la generación de altos niveles de ROS e inhibiendo el sistema antioxidante de células tumorales se provoca la indefensión de las células tumorales frente al estrés oxidativo y la muerte apoptótica de éstas células por activación de la cascada de las caspasas.

25

En los últimos años se están desarrollando terapias anticancerígenas dirigidas hacia las mitocondrias de las células tumorales. Una droga que dañe estos orgánulos provocaría un incremento del estrés oxidativo y muerte celular.

30 Varias moléculas han sido empleadas para inducir estrés oxidativo en tejido tumoral, entre ellas encontramos glucosa oxidasa (Nathan y Cohn 1981. *J Exp Med*, 154: 1539-1553), D-amino ácido oxidasa (Fang *et al.*, 2008. *Int J Cancer*, 122: 1135-1144), elesclomol (*Synta Pharmaceutical Corp.*) y clorimipramina (Daley *et al.*, 2005. *Biochem Biophys Res Commun*, 328: 623-632).

35 La clorimipramina pertenece al grupo de medicamentos llamados antidepresivos tricíclicos. Otro compuesto que entra también en la misma categoría es la amitriptilina, fármaco ampliamente usado en clínica para el tratamiento de la depresión y como analgésico.

40 La amitriptilina tiene una amplia variedad de acciones farmacológicas. A parte de sus efectos paliativos, ha sido actualmente estudiada por sus efectos citotóxicos, así, distintos artículos evidencian los efectos adversos que este fármaco provoca en células neuronales (Weiss y Sawyer, 1993. *Toxicol. In Vitro*, 653-667), células hepáticas (Yasuhara *et al.*, 1979. *Pharmacology*, 18(2): 95-102) o células de fibroblastos (Cordero *et al.*, 2009. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235: 329-337) entre otras. A pesar de que se están estudiando los efectos citotóxicos que tiene la amitriptilina en distintos modelos celulares, el mecanismo de acción que provoca su toxicidad aún no es completamente conocido.

45

Por otra parte, aunque como hemos visto la terapia oxidativa podría ofrecer resultados esperanzadores para aquellos tumores que hoy por hoy no pueden ser eliminados mediante las terapias anticancerígenas convencionales, hasta el momento los experimentos con tratamientos oxidativos ofrecen resultados ambiguos, debido posiblemente a que los diferentes tumores difieren en sus "balances redox", es decir, en los niveles de estrés oxidativo.

50

Según las cifras del cáncer en España, entre los tumores más comunes y que más mortalidad causan en la población se encuentran el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón o el cáncer de mama entre otros.

55 El cáncer de pulmón es muy difícil de controlar con los tratamientos actuales. Por este motivo, muchos pacientes con esta enfermedad son animados a participar en ensayos clínicos. La selección de tratamiento depende principalmente del tipo de cáncer de pulmón y del estadio. El cáncer de pulmón se puede clasificar en dos grandes grupos:

- *Cáncer de pulmón de células pequeñas*, se disemina con rapidez. En muchos casos, las células cancerosas ya se han diseminado a otras partes del cuerpo cuando se diagnostica la enfermedad. Para llegar a las células cancerosas en todo el cuerpo, los médicos casi siempre usan quimioterapia. El tratamiento puede también incluir radioterapia dirigida al tumor en el pulmón o a los tumores en otras partes del cuerpo (como en el cerebro). Algunos pacientes reciben radioterapia al cerebro aun cuando no se encuentre cáncer allí. Este tratamiento, llamado irradiación craneal profiláctica, se da para prevenir que se formen tumores en el cerebro. La cirugía es parte del plan de tratamiento para un número reducido de pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas, se recurre a ella cuando el cáncer se encuentra solamente en uno de los pulmones y en ganglios linfáticos cercanos. Dado que este tipo de cáncer de pulmón, por lo general, se encuentra en ambos pulmones, la cirugía sola no se usa a menudo.

65

Otros tratamientos estándar: terapia láser, (tratamiento en el que se usa un rayo láser para destruir células cancerosas), colocación endoscópica de una derivación (se usa para abrir una vía respiratoria que está bloqueada por tejido anormal).

5 • *Cáncer de pulmón de células no pequeñas*, la selección del tratamiento depende principalmente del tamaño, sitio y grado del tumor. La cirugía es la forma más común de tratar este tipo de cáncer de pulmón. Se usan cuatro tipos de cirugía: resección en cuña (cirugía para extirpar un tumor y una pequeña cantidad del tejido normal que lo rodea), resección segmentaria (cuando se toma una porción algo mayor de tejido), lobectomía (cirugía para extirpar un lóbulo del pulmón), neumonectomía (cirugía para extirpar un pulmón), resección en manguito (cirugía para extraer una parte del bronquio), criocirugía (tratamiento que congela y destruye el tejido canceroso, puede usarse para controlar los síntomas en los estadios (etapas) últimos del cáncer de pulmón de células no pequeñas). La radioterapia y la quimioterapia pueden también usarse para hacer más lento el progreso de la enfermedad y para controlar los síntomas.

15 Otros tipos: terapia biológica (usa sustancias elaboradas por el cuerpo o sintéticas para impulsar, dirigir o restaurar las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer), terapia láser (tratamiento que usa un haz de luz láser para destruir células cancerosas), terapia fotodinámica (TFD, tratamiento que usa un medicamento y un tipo específico de rayo láser para destruir células cancerosas), electrocauterización (tratamiento para el que se usa un estilete o una aguja calentados con una corriente eléctrica para destruir tejido anormal).

20 Por tanto, debido a que la terapia oxidativa está en una etapa muy experimental ya que aún no se han encontrado agentes antioxidantes con el potencial adecuado para actuar como agentes anticancerígenos en determinados tumores en este tipo de terapia, persiste el problema de tratamiento para ciertos cánceres resistentes a drogas citotóxicas como la quimioterapia.

## 25 Explicación de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende el antidepresivo tricíclico amitriptilina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón (en adelante, para referirse al compuesto amitriptilina puede emplearse el término AMIT). Preferiblemente dicho proceso canceroso de pulmón es no microcítico y, más preferiblemente, el proceso canceroso de pulmón no microcítico es carcinoma de pulmón de células grandes.

35 La presente invención provee un nuevo agente anticancerígeno para terapia oxidativa, la amitriptilina, ya que, a pesar de que, como hemos visto, están apareciendo trabajos enfocados al uso de amitriptilina como agente citotóxico, hasta el momento no han sido desarrollados los potenciales efectos beneficiosos que este fármaco puede tener en células tumorales y, más concretamente, en cáncer de pulmón. Además, aunque ya se han estudiado varias moléculas como posibles agentes anticancerígenos enmarcados dentro de la estrategia terapia oxidativa, esta terapia, como hemos visto, depende de los balances redox de los diferentes tumores por lo que la eficacia del agente anticancerígeno depende del tumor que estamos tratando. Así, este trabajo demuestra como la amitriptilina ofrece mejores resultados en la línea tumoral de pulmón H460 cuando se compara con otros agentes ya empleados para inducir estrés oxidativo en células tumorales.

45 Por tanto, la presente invención resuelve el problema técnico que plantea el tratamiento eficaz de cáncer de pulmón, mediante terapia oxidativa con amitriptilina como agente anticancerígeno.

El tratamiento de este tipo de procesos cancerosos tiene especial relevancia debido a que los tumores pulmonares suelen adquirir una elevada resistencia frente a drogas citotóxicas como las que se emplean en quimioterapia, que dañan el DNA celular, debido a que encuentran nuevas estrategias de reparación del DNA muy eficientes.

50 En este sentido, un aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende el antidepresivo tricíclico amitriptilina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón.

55 El término "proceso canceroso de pulmón" (cáncer) tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas (también conocidas como cancerígenas o cancerosas), con rasgos típicos de comportamiento y crecimiento descontrolado (crecimiento y división más allá de los límites normales, invasión del tejido circundante y, a veces, metástasis). Dicho proceso canceroso comprende cualquier enfermedad de un órgano o tejido en un mamífero, preferiblemente el hombre, caracterizado por una multiplicación pobremente controlada, o descontrolada, de células normales o anormales en dicho tejido, y su efecto en la totalidad del cuerpo. El proceso canceroso de pulmón, dentro de esta definición, incluye las neoplasias benignas, displasias, hiperplasias, así como neoplasias que muestran metástasis, o cualquier otra transformación como por ejemplo, leucoplasias que a menudo preceden al brote del cáncer. Las células y los tejidos son cancerosos cuando crecen y se replican más rápidamente de lo normal, desplazándose o dispersándose en el tejido sano circundante o cualquier otro tejido del cuerpo, lo que se conoce como metástasis, asume formas y tamaños anormales, muestra cambios en su ratio nucleocitoplasmático, policromasia nuclear, y finalmente cesa. Las células y tejidos cancerosos pueden afectar al cuerpo como un todo causando síndromes paraneoplásicos, o si el proceso canceroso ocurre en un órgano o tejido vital, siendo interrumpida o dañada su función normal, con posibles resultados fatales.

El resultado final de la evolución de un cáncer que involucra un órgano vital, ya sea primario o metastático, es la muerte del mamífero afectado. El cáncer tiende a extenderse, y su grado de extensión se relaciona normalmente con cambios en la supervivencia a la enfermedad.

5 Generalmente se dice que el cáncer se encuentra en uno de tres estados de crecimiento: temprano o localizado, cuando el tumor aún se encuentra confinado en el tejido de origen, o en su localización primaria; extensión directa, cuando las células cancerígenas del tumor han invadido el tejido adyacente o se ha extendido únicamente a los nódulos linfáticos regionales; o metástasis, cuando las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde la localización primaria, por medio del sistema circulatorio o linfático, y se ha establecido en localizaciones secundarias.

10 Se dice que un cáncer es maligno por su tendencia a causar la muerte si no es tratado. Los tumores benignos, usualmente no causan la muerte, aunque pueden hacerlo si interfieren con la función normal del cuerpo por sus características o localización, tamaño o efectos paraneoplásicos. Aquí los tumores benignos de pulmón caen dentro de la definición de proceso canceroso o cáncer de pulmón. En general, las células cancerosas se dividen a una tasa mayor que las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de los tejidos cancerosos y normales no es tanto que la división celular sea mucho más rápido, como la pérdida parcial o completa de detener su crecimiento y de diferenciarse en un tejido útil y limitado, del tipo que caracteriza el equilibrio funcional de crecimiento del tejido normal. El tejido canceroso puede expresar ciertas moléculas receptoras y probablemente están influenciadas por la susceptibilidad e inmunidad. El término “cáncer” comprende neoplasias benignas, o malignas como: carcinoma pulmonar de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma bronquioloalveolar, carcinoma adenoescamoso, adenocarcinoma papilar, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoide cístico, carcinoma de células grandes o carcinoma de células gigantes y estrelladas.

25 Atendiendo a su localización, el cáncer de pulmón puede localizarse en los lóbulos superiores y, especialmente en el segmento anterior; en los lóbulos inferiores; en el lóbulo medio y llingula. El tumor de Pancoast es el tumor maligno situado en el ápex pulmonar. Los cánceres de pulmón se clasifican en:

- Cáncer de pulmón central: aparece a nivel de bronquios principales, lobares y segmentarios. La variedad epidermoide (células escamosas) es un tipo de cáncer de pulmón central.
- Cáncer de pulmón periférico: aparece a partir de los bronquios de quinta generación. El adenocarcinoma es un tipo de cáncer periférico. Rara vez llegan a localizarse en áreas muy alejadas, junto a la pleura.

35 La amitriptilina, compuesto hasta ahora comercializado como fármaco antidepresivo, se utiliza dentro de la estrategia anticancerígena denominada terapia oxidativa, terapia que consiste en inducir altos niveles de estrés oxidativo en células tumorales aprovechando que son más susceptibles al ataque oxidativo que las células sanas. Mediante la generación de altos niveles de ROS e inhibiendo el sistema antioxidante de células tumorales, provocan la indefensión de las células tumorales frente al estrés oxidativo y la muerte apoptótica de éstas células por activación de la cascada de las caspasas.

40 Por otro lado, uno de los órganos preferentes donde se acumula la amitriptilina cuando es administrada en humanos es el pulmón, por lo que a lo largo de este estudio se demuestra cómo la amitriptilina posee las características necesarias para ser usada como agente anticancerígeno en terapia oxidativa para el tratamiento del cáncer de pulmón.

45 Los ensayos realizados en la línea celular neoplásica H460 (línea tumoral de pulmón perteneciente a células no microcíticas) revelan que no sólo aumenta los niveles de ROS, debido a que provoca un aumento importante en la producción de ROS intramitocondrial, sino que también produce una bajada significativa de los sistemas antioxidantes de las células limitando la respuesta de las células frente al estrés oxidativo y, por tanto, haciéndolas más sensibles al daño oxidativo. También induce apoptosis produciendo una disminución acusada de la población celular.

Se ha visto además que la citotoxicidad de la amitriptilina es superior a la de otras drogas antitumorales usadas con frecuencia en oncología como la camptotecina (CPT), doxorubicina (DOXO) y el metotrexato (METO).

55 Las formas más comunes de cáncer de pulmón reciben nombres que dependen de las características de las células de las cuales derivan, distinguiéndose dos grandes grupos:

- *Carcinomas de células pequeñas o microcíticos*: su nombre deriva del tamaño de sus células (microcítico: células muy pequeñas). Aproximadamente un 20% de los cánceres de pulmón son de este tipo. Se localiza preferentemente en la zona central de los pulmones.

- *Carcinomas no microcíticos*: representan aproximadamente el 80% restante de los cánceres de pulmón. Los tipos más frecuentes son:

- Carcinoma escamoso o epidermoide: suele localizarse en la parte central de los pulmones, tiene un crecimiento relativamente lento.

- Adenocarcinoma: suele localizarse en zonas más periféricas de los pulmones por lo que frecuentemente afectan a la pleura y pared torácica.
- Carcinoma de células grandes: se denomina así por el tamaño de las células que lo componen.

5

Debido a que la línea celular que se usa a lo largo de la invención, H460, corresponde a células tumorales no microcíticas de carcinoma de pulmón de células grandes, una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica para el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón donde dicho proceso es cáncer de pulmón no microcítico. Según una realización más preferida, el proceso canceroso de pulmón no microcítico es preferentemente carcinoma de pulmón de células grandes.

10

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica donde el medicamento comprende además, un excipiente farmacológicamente aceptable.

15

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la amitriptilina, estabiliza dicho compuesto o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

20

El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

25

Otra realización preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica donde el medicamento comprende además un vehículo farmacológicamente aceptable. Además, el vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las secuencias de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de la amitriptilina así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente.

30

35

Una realización más preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica donde el vehículo farmacológicamente aceptable es al menos una nanopartícula, un liposoma, o micelas o microemulsiones.

40

La amitriptilina puede ir asociada, por ejemplo, pero sin limitarse, con nanopartículas, liposomas, micelas o microemulsiones. Una nanopartícula es una partícula microscópica con una dimensión menor que 100 nm. Actualmente las nanopartículas son un área de intensa investigación científica, debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en diversos campos entre los que se encuentran el campo biomédico. Un liposoma es una vesícula esférica con una membrana fosfolipídica. El liposoma contiene un núcleo de solución acuosa. La micela es un lípido esférico que contiene material no acuoso. Tanto los liposomas como las micelas pueden utilizarse como transportadores de diversas sustancias entre el exterior y el interior de la célula. Por su parte, las microemulsiones son definidas como un sistema de agua, aceite y por lo menos un compuesto anfifílico que se presenta como una solución líquida simple, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable. Estos sistemas también son de interés por su considerable potencial de actuar como vehículos de liberación de drogas que incorporan una amplia variedad de moléculas activas.

45

50

Así, se podría aplicar la amitriptilina incorporada a “vehículos” como nanopartículas, liposomas, micelas o microemulsiones que dirijan la droga hasta los tumores. A modo de ejemplo, actualmente se están desarrollando en humanos ensayos clínicos con nanopartículas metálicas recubiertas con polietilenglicol (PEG) (CYT-6091: Aurimmune; Cytimmune Sciences Inc.) para albergar agentes anticancerígenos (Paciotti, G.; Myer, L; Weinreich, 2004. *D. Drug Delivery* 11: 169-183.). El recubrimiento de las nanopartículas con PEG las hace más compatibles y eficientes además de “protegerlas” del sistema inmune. Estas nanopartículas pueden ser inyectadas por vía intravenosa, acumulándose preferentemente en el tejido tumoral (Hirsch, L. R., *et al.*, 2003. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13549-13545). Otras posibles vías de administración podrían ser por ejemplo, pero sin limitarse a vía intratumoral, intraperitoneal o intramuscular.

55

60

El direccionamiento que lleve el agente antitumoral conjugado a la nanopartícula hasta el tumor puede ser pasivo o activo. El primero de ellos se basa en el efecto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) de las macromoléculas en tumores sólidos: la gran permeabilidad de los vasos sanguíneos del tejido tumoral y el deficiente drenado linfático lleva a una acumulación de las macromoléculas en el tejido tumoral. Por otra parte, el direccionamiento activo se basa en ligandos dirigidos a receptores o antígenos que se sobreexpresan en células tumorales.

65

Últimamente, la terapia con anticuerpos monoclonales parece ser eficaz en una amplia variedad de tumores. Este tipo de direccionamiento se ha utilizado, por ejemplo, con liposomas (anti-ErbB2) conjugados al fármaco Doxil dirigidos contra los receptores ErbB2, que se sobreexpresan en cáncer de mama y otros adenocarcinomas.

5 Tanto la composición de la presente invención como la preparación combinada pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones o preparaciones combinadas y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de amitriptilina, profármacos, derivados o análogos de amitriptilina que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico que se desee conseguir.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral y otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

El término “forma adaptada” hace referencia al modo de adecuar el medicamento de la presente invención para que pueda ser administrado vía parenteral o vía oral.

La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jara-be, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

La forma adaptada a la administración parenteral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración inyectable, es decir, preferiblemente en estado líquido. La administración parenteral se puede llevar a cabo por vía de administración intramuscular, intraarterial, intravenosa, intradérmica, subcutánea o intraósea pero sin limitarse únicamente a estos tipos de vías de administración parenteral.

Otra posibilidad es que el medicamento se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada. La forma adaptada a la administración rectal se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, supositorio, cápsula rectal, dispersión rectal o pomada rectal. La forma adaptada a la administración transdérmica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, parche transdérmico o iontoforesis.

Una realización más preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral vía intratumoral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. Esta droga puede ser aplicada directamente por inyección por cualquier vía eficiente como por ejemplo, pero sin limitarse a, vía intratumoral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular, sin esperar *a priori* efectos secundarios importantes. Según ensayos preliminares realizados en ratones, no se encuentra daño histológico ni bioquímico significativo cuando la AMIT se inyecta vía intratumoral.

Todos los medicamentos tienen unas características concretas referentes a su, liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Cuando se introduce un fármaco en el organismo debe superar numerosas barreras biológicas antes de llegar al receptor que dependen de la vía de administración. Para que un fármaco pueda ejercer su acción debe alcanzar una concentración adecuada y en el lugar adecuado en el cual un fármaco está en posición de interactuar con sus receptores para realizar su efecto biológico sin que intervengan barreras de difusión.

Para alcanzar esta concentración adecuada en el lugar de acción es preciso que el fármaco pueda penetrar en el organismo a favor de los procesos de absorción, llegar al plasma y, por medio de él, distribuirse por los tejidos a favor de los procesos de distribución. Pero el fármaco, tan pronto como penetra en el organismo, está sometido a los procesos de eliminación que comprenden esencialmente dos subtipos de mecanismos: eliminación por las vías naturales (orina, bilis, saliva, etc.) y metabolismo o biotransformación enzimática.

Por tanto, puesto que en la práctica va a suponer mucha dificultad la medida de la concentración de la amitriptilina en el lugar de acción, se suele medir la concentración de dicho fármaco en el suero del individuo tratado. Además, hay que tener en cuenta que la concentración en suero experimenta variaciones, dependiendo de mecanismos farmacocinéticos como por ejemplo la curva de niveles plasmáticos que describe las variaciones sufridas por la concentración de un fármaco en el suero (o plasma), desde su administración hasta su desaparición del organismo.

Por ejemplo, a rasgos generales, tras la administración oral de un fármaco, su concentración en el plasma aumenta inicialmente, alcanza un máximo y luego desciende: al principio predomina la velocidad de absorción sobre la distribución y la eliminación y, por ello, la curva de niveles plasmáticos asciende; cuando la intensidad de la eliminación supera a la de absorción, la curva desciende. En esta curva de niveles en suero se aprecian varios parámetros importantes:

- Concentración mínima eficaz o terapéutica: aquella a partir de la cual se inicia el efecto farmacológico.
- Concentración mínima tóxica: aquella a partir de la cual se inicia un efecto tóxico.
- Período de latencia: tiempo que transcurre desde el momento de administración hasta que se inicia el efecto farmacológico.
- Intensidad del efecto: suele guardar relación con la concentración alcanzada por el fármaco en el suero. Dependiendo, por tanto, de la altura de la curva; a mayor altura, mayor efecto.
- Duración de la acción o efecto: tiempo transcurrido entre el momento en que se alcanza la concentración mínima eficaz en el momento en que desciende por debajo de dicha concentración.

Teniendo en cuenta que la amitriptilina es una droga que ya está comercializada como antidepresivo, su farmacocinética es conocida. Así, se sabe que se absorbe muy bien por el tracto digestivo y, aunque existen considerables variaciones interindividuales, los efectos máximos se consiguen después de varias semanas de tratamiento, aunque los efectos adversos pueden manifestarse a partir de la primera dosis. La AMIT se une fuertemente a las proteínas del plasma y de los tejidos. La vida media es de 10 a 50 horas para la AMIT y se distribuye en el hígado, pulmones y cerebro. Después de una dosis única, entre el 25 y 50% de la dosis se excreta en la orina y una pequeña parte en las heces (Vademécum).

A través de los distintos resultados obtenidos en cultivos *in vitro* de células tumorales H460 a distintas concentraciones de amitriptilina, y que pueden observarse en el apartado de ejemplos de la presente invención, se comprueba que actúa de manera dosis dependiente. Se observa *in vitro* que la administración de amitriptilina en el rango de dosis de entre 20  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  a células de pulmón neoplásicas H460, proporciona resultados altamente satisfactorios. Estos resultados pueden extrapolarse a la aplicación de la amitriptilina en el ser humano, considerando el umbral en el que el compuesto es farmacológicamente efectivo, de acuerdo con modelos de extrapolación de resultados *in vitro* a *in vivo* conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un modelo de extrapolación considera la distribución de los compuestos químicos entre el agua, lípidos y albúmina del suero de la sangre de un individuo. Más concretamente, para dicha extrapolación puede usarse un algoritmo basado en la distribución equilibrada que requiere datos de la unión de la albúmina, el coeficiente de partición octanol-agua (Kow), y la concentración de albúmina así como la fracción de volumen de lípidos, tanto *in vitro* como en el suero de un individuo (Gülden y Seibert, 2003. Toxicology, 189: 211-222).

En la presente invención se administra el compuesto amitriptilina en diversas concentraciones a un cultivo de células tumorales H460 (*non-small cell lung cancer*). A dichas concentraciones, la amitriptilina no sólo aumenta los niveles de ROS sino que también produce una bajada significativa de los sistemas antioxidantes de las células haciéndolas más sensibles al daño oxidativo e induce la apoptosis disminuyendo la población celular. Una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de amitriptilina equivale a 13,85  $\mu\text{g/ml}$ . Asumiendo que la densidad de un cuerpo humano es, por ejemplo, de 950  $\text{Kg/m}^3$  (0,95  $\text{g/mL}$ ), para mantener una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de amitriptilina en un Kg de "cuerpo" serían necesarios 1,46 mg es decir, la administración de una cantidad de 1,46 mg de amitriptilina por Kg de peso corporal, que en un individuo con un peso medio de 75 Kg correspondería a la administración diaria de 109,5 mg de amitriptilina.

Este cálculo aproximado de la extrapolación de la cantidad administrada a células cultivadas *in vitro* se lleva a cabo para justificar la elección del rango de concentraciones administrada a un individuo (25 a 250 mg/día), de forma aproximada, pero en ningún caso se pretende que suponga el único medio para calcular la cantidad que debería ser administrada de amitriptilina.

En humanos, después de una sola dosis oral de 75 mg de amitriptilina, la máxima concentración de amitriptilina en plasma se estima en unos 40 ng/ml, alcanzándose en 4 horas. Si se reciben 150 mg de esta droga diariamente durante un mes, las concentraciones estables en plasma se alcanzan usualmente para el día 14, siendo los niveles en plasma de unos 80 ng/ml. La aparente vida media promedio de eliminación de amitriptilina es de 22,4 horas. La dosis media recomendable de administración de amitriptilina estaría entre 25 y 250 mg/día, lo que se reflejaría en una cantidad de amitriptilina en plasma de unos 13 ng/ml y 133 ng/ml, respectivamente (Vademécum).

Así, otra realización preferida de la invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención donde el medicamento tiene una cantidad de amitriptilina capaz de alcanzar una concentración en suero de entre 13 y 133 ng/ml.

5 Además del rango que va desde 13 a 133 ng/ml de amitriptilina, que corresponde como hemos dicho a una dosis de amitriptilina de entre 25 y 250 mg/día, también pueden emplearse los rangos de 15 a 130 ng/ml, de 23 a 115 ng/ml, de 25 a 98 ng/ml, de 32 a 90 ng/ml, de 37 a 71 ng/ml o el rango de 45 a 62 ng/ml.

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

## 15 Descripción de las figuras

Fig. 1. *Estudio de supervivencia.*

20 Muestra el número de células vivas en la línea tumoral H460 tras 24 h con el tratamiento de las distintas drogas a concentraciones decrecientes (100, 50, 20  $\mu$ M).

AMIT: amitriptilina. CPT: camptotecina. DOXO: doxorubicina. METO: metotrexato.

25  $t_0$ : estado de los cultivos justo antes de iniciar los tratamientos. 24 h.: cultivo control sin tratamiento a las 24 h.

Fig. 2. *Porcentaje de células apoptóticas.*

30 Muestra el porcentaje de núcleos apoptóticos en la línea tumoral H460 tras el tratamiento con distintas dosis de las diferentes drogas.

AMIT: amitriptilina. CPT: camptotecina. DOXO: doxorubicina. METO: metotrexato.

35 Fig. 3. *Niveles de ROS.*

Muestra los niveles de ROS en unidades arbitrarias en la línea tumoral H460 tras el tratamiento con las distintas drogas a 50  $\mu$ M.

40 AMIT: amitriptilina. CPT: camptotecina. DOXO: doxorubicina. METO: metotrexato.

Fig. 4. *Niveles de CoQ10 (antioxidante).*

45 Muestra los niveles de CoQ10 en pmol/mg. de proteína en la línea tumoral H460, tras el tratamiento con las distintas drogas a 50  $\mu$ M.

AMIT: amitriptilina. CPT: camptotecina. DOXO: doxorubicina. METO: metotrexato.

50 Fig. 5. *Niveles de catalasa (antioxidante).*

Muestra los niveles de catalasa en U/mg. de proteína en la línea tumoral H460, tras el tratamiento con las distintas drogas a 50  $\mu$ M.

55 AMIT: amitriptilina. CPT: camptotecina. DOXO: doxorubicina. METO: metotrexato.

Fig. 6. *Niveles de potencial de membrana mitocondrial.*

60 Muestra los niveles del potencial de membrana mitocondrial en unidades arbitrarias en la línea tumoral H460, tras el tratamiento con amitriptilina (AMIT) 50  $\mu$ M con y sin inhibidor de caspasas (ZVAD).

65 Fig. 7. *Actividad del Complejo I+III de la cadena respiratoria.*

Muestra la actividad específica del complejo I+III en la línea tumoral H460 tras tratamiento con amitriptilina (AMIT) y camptotecina (CPT) a 50  $\mu$ M.

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen cómo las células procedentes de la línea tumoral de pulmón H460 responden favorablemente cuando se les aplica amitriptilina, una droga con propiedades antitumorales que se enmarcaría dentro de la estrategia anticancerígena denominada terapia oxidativa por inducción de estrés oxidativo o autofagia. Así mismo, se muestra que la citotoxicidad de la amitriptilina es superior a la de otras drogas antitumorales usadas con frecuencia en oncología como la camptotecina (CPT), doxorubicina (DOXO) y el metotrexato (METO).

### Ejemplo 1

#### *Ensayos in vitro*

Los ensayos que se estudian a continuación sirvieron para dilucidar las consecuencias que el compuesto de la invención, amitriptilina (AMIT), provoca en la línea celular tumoral H460 (*non-small cell lung cancer*).

#### 1.1 *Ensayo de citotoxicidad dosis-dependiente*

En el ensayo *in vitro* de citotoxicidad dosis-dependiente en células tumorales se observó una bajada significativa del número de células tras el tratamiento con AMIT y las otras drogas quimioterápicas. No obstante, la AMIT es la que ofreció menor supervivencia a todas las concentraciones, especialmente notoria a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 1). El porcentaje de núcleos apoptóticos después de 24 h de tratamiento con distintas concentraciones de AMIT y las otras drogas, se representa en la Figura 2. Puede observarse como la AMIT provoca más apoptosis que el resto de las drogas.

#### 1.2 *Niveles de ROS*

Los niveles de ROS provocados por la AMIT y las otras drogas a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  se determinaron por citometría de flujo, observándose para la AMIT un incremento del doble respecto a los controles y un incremento menor para el resto de drogas (Figura 3).

#### 1.3 *Niveles de antioxidantes*

Para estudiar el nivel de antioxidantes, se tuvieron en cuenta dos factores:

- el coenzima Q10 (CoQ10), mostró una bajada drástica en los cultivos de células tumorales H460 tratados con AMIT 50  $\mu\text{M}$ , sin embargo, en los cultivos tratados con CPT, DOXO o METO no se observó disminución de este antioxidante de membrana, más bien se apreció una pequeña subida para contrarrestar los aumentos de ROS (Figura 4).
- la catalasa, los niveles de catalasa se midieron espectrofotométricamente y en las células tratadas con AMIT resultaron ser muy inferiores al de los controles y al de los cultivos tratados con las otras drogas (Figura 5).

Es importante recalcar que el papel de los antioxidantes es muy importante para las células como defensa frente al estrés oxidativo.

Este efecto de AMIT sobre los niveles de antioxidantes le aporta una característica muy interesante en su papel como agente antitumoral en terapia oxidativa, no demostrada en otras drogas inductoras de estrés oxidativo.

#### 1.4 *Ensayo del daño mitocondrial*

Para ver el daño mitocondrial se analizó el potencial de membrana por citometría de flujo para determinar el estado de las membranas mitocondriales. Se vio que este parámetro disminuía cuando se trataban a las células con AMIT (Figura 6).

Además, un estudio de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mostró una disminución significativa de la actividad del complejo I+III tras el tratamiento con AMIT 50  $\mu\text{M}$ , cosa que no ocurría cuando se trataban las células con CPT (Figura 7).

Todos estos datos hacen preveer que el mecanismo de acción de la AMIT en la inducción del daño mitocondrial viene caracterizado por una disminución en los niveles de expresión de los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial así como del citocromo C y de los niveles de Coenzima Q, lo que sugiere una alteración en la

actividad, organización y ensamblaje de los complejos mitocondriales, reflejándose esto en una bajada del flujo de electrones así como del potencial de membrana mitocondrial y por lo tanto en un aumento en la producción de ROS intramitocondrial.

5 El daño provocado por el aumento de ROS mitocondrial induce la apertura del poro de transición mitocondrial (MPT), aumentando así la permeabilidad de la mitocondria con la consecuente salida de proteínas proapoptóticas al citosol tales como citocromo *c*, smac/diablo, etc., iniciándose la vía intrínseca de apoptosis caspasa-3 dependiente.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una composición farmacéutica que comprende el antidepresivo tricíclico amitriptilina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón.
2. Uso de la composición según la reivindicación 1, donde el proceso canceroso de pulmón es no microcítico.
- 10 3. Uso de la composición según la reivindicación 2 donde el proceso canceroso de pulmón no microcítico es carcinoma de pulmón de células grandes.
4. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el medicamento comprende además un excipiente farmacológicamente aceptable.
- 15 5. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el medicamento comprende además un vehículo farmacológicamente aceptable.
6. Uso de la composición según la reivindicación 5 donde el vehículo es al menos una nanopartícula, un liposoma, o micelas o microemulsiones.
- 20 7. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral.
8. Uso de la composición según la reivindicación 7, donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral vía intratumoral, intravenosa, intraperitoneal o intramuscular.
- 25 9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral.
- 30 10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el medicamento tiene una cantidad de amitriptilina capaz de alcanzar una concentración en suero de entre 13 y 133 ng/ml.

35

40

45

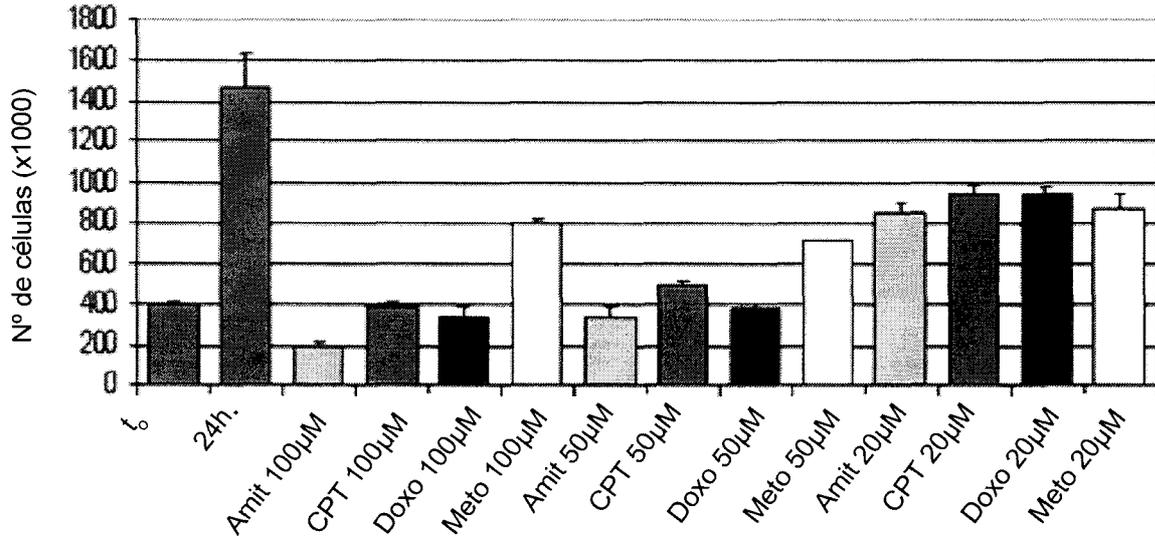
50

55

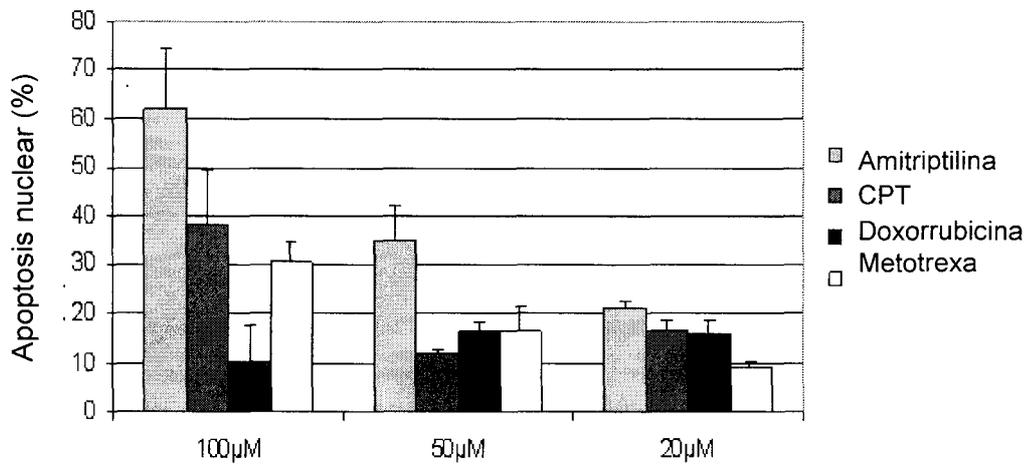
60

65

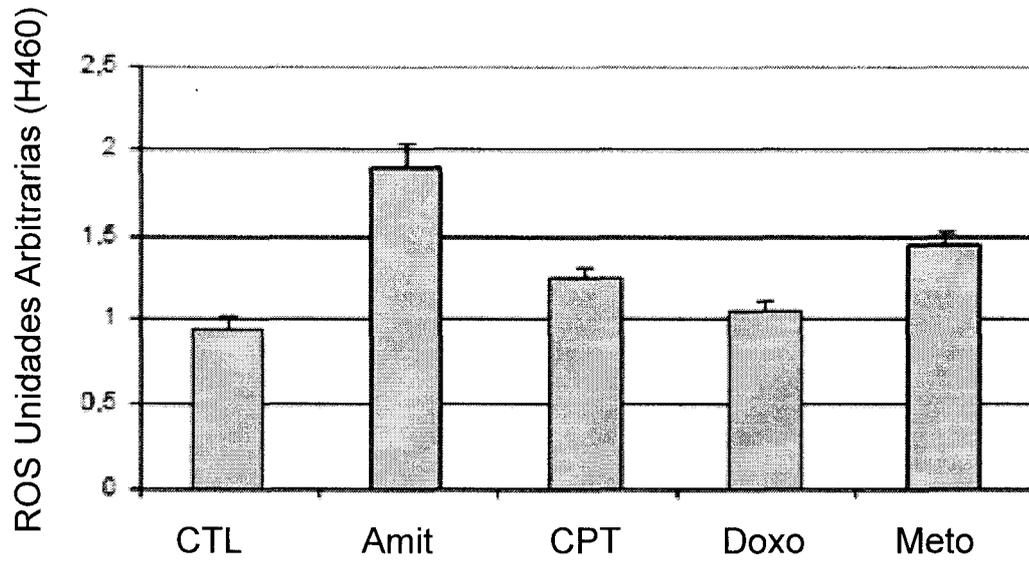
**FIG. 1**



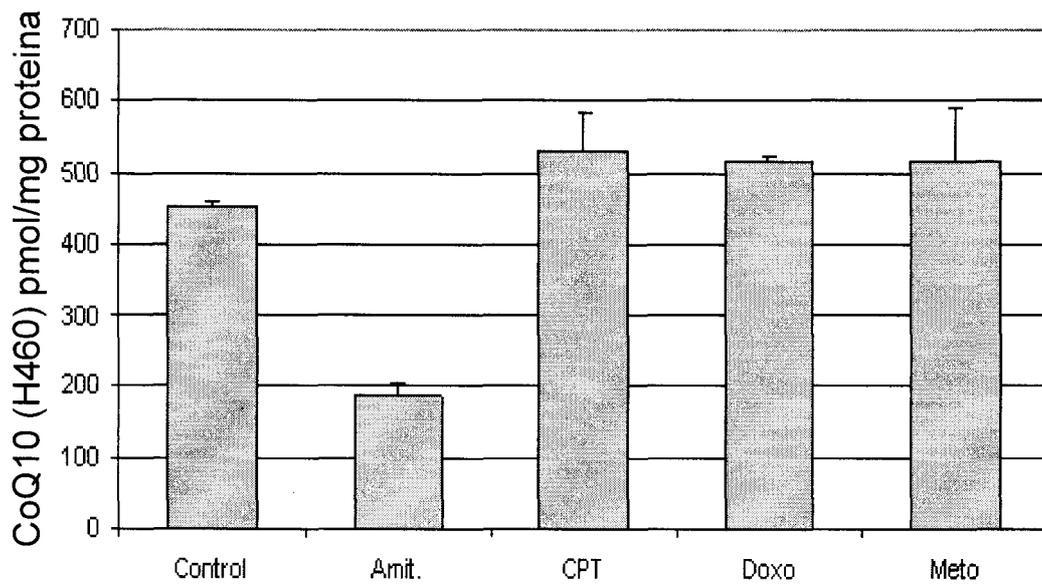
**FIG. 2**



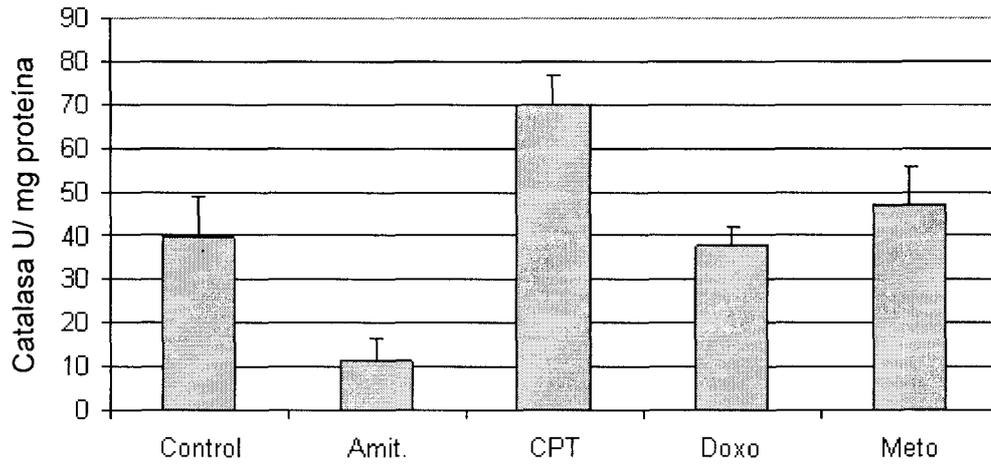
**FIG. 3**



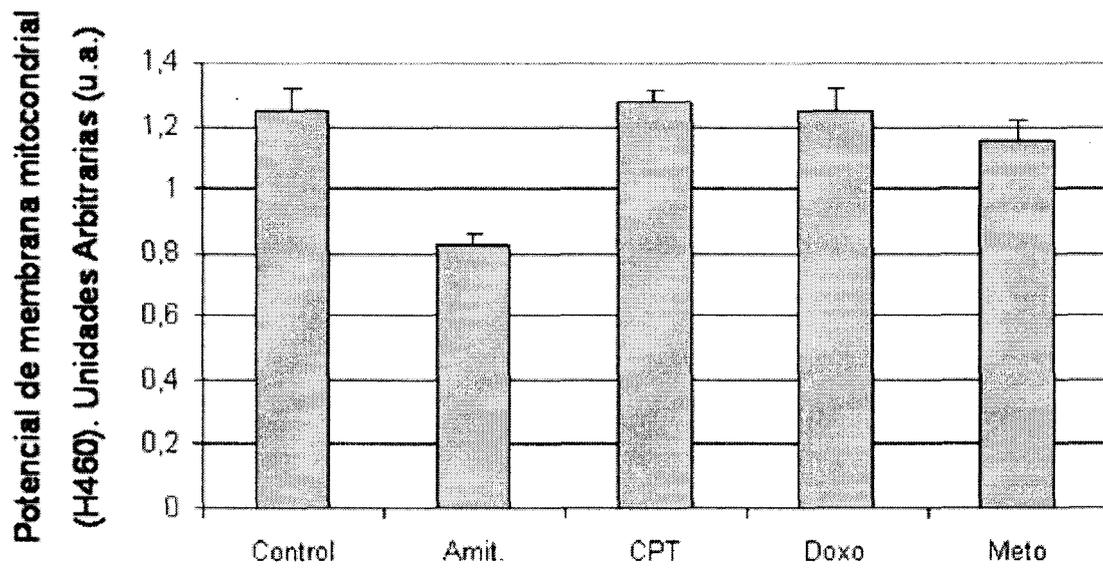
**FIG. 4**



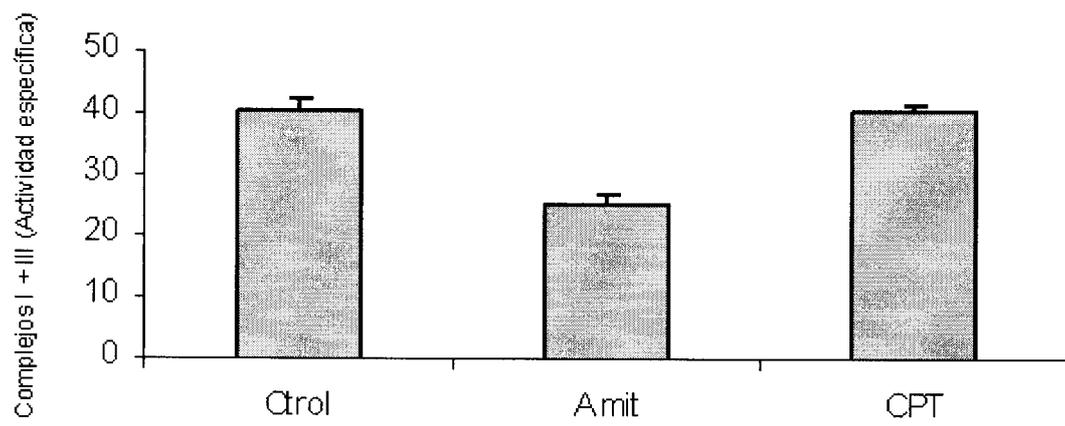
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000061

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.01.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K31/137** (01.01.2006)  
**A61P35/00** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0243652 A2 (RAMOT UNIVERSITY AUTHORITY FOR APPLIED RESEARCH & INDUSTRIAL DEVELOPMENT LTD.) 06.06.2002, página 4, líneas 15-19; página 5, líneas 17-21; Tabla 1B.	1-10
A	WO 2008112297 A2 (YALE UNIVERSITY; NEVADA CANCER) 18.09.2008, página 6, último párrafo – página 8, párrafo 1; página 9, último párrafo – página 10, párrafo 1; página 15, párrafos 3,4; página 39, párrafo 4; ejemplos 1,12; reivindicaciones 1,2,15,16,50,51,62,63.	1-10
A	DeBONIS, SALVATORE et al.; <i>In vitro</i> screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimitotic and antitumor activities; Molecular Cancer Therapeutics, 2004, 3(9), 1079-1090; página1087, columna derecha.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
11.03.2011

Examinador  
N. Vera Gutiérrez

Página  
1/4

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, REGISTRY, CAS, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Numero Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 0243652 A2	06.06.2002
D02	WO 2008112297 A2	18.09.2008
D03	DeBONIS, SALVATORE et al.; In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimetabolic and antitumor activities; Molecular Cancer Therapeutics, 2004, 3(9), 1079-1090; página1087, columna derecha.	2004

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

La invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende el antidepresivo tricíclico amitriptilina para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón.

El documento D01 divulga métodos para el tratamiento de enfermedades asociadas a la hiperproliferación celular, que consisten en la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un agente psicotrópico. Entre las enfermedades proliferativas se cita el cáncer de pulmón, entre otros, y entre los agentes psicotrópicos figuran los antidepresivos tricíclicos como la amitriptilina (página 4, líneas 15-19; página 5, líneas 17-21). En las tablas 1A, 1B se recogen los resultados obtenidos en los ensayos, mostrando la efectividad de ciertos agentes psicotrópicos en la inhibición de la proliferación de células cancerígenas. Entre otros, se ha ensayado la amitriptilina en casos de melanoma, pero no en cáncer de pulmón.

El documento D02 se refiere a métodos para el tratamiento de cáncer por interferencia con la señalización del receptor IGF-I. El sistema de señalización de IGF-IR se ha asociado a diversos tipos de cáncer, entre ellos, el cáncer de pulmón (página 7, párrafo 2). Para interferir en la señalización de IGF-IR se utiliza un inhibidor de ASM, seleccionado de una relación en la que figura la amitriptilina (página 7, párrafo 3; reivindicaciones 1 y 2). No existen ejemplos de ensayos con este principio activo.

En el documento D03 se describe la actividad antitumoral y antimetabólica de compuestos inhibidores de Eg5 kinesina mitótica humana. Entre los compuestos ensayados como inhibidores de dicha proteína se encuentra la amitriptilina (compuesto NSC 104210, página 1087, columna derecha). En el documento se hace referencia a la actividad antitumoral, pero no específicamente en el cáncer de pulmón.

A la vista de los documentos D01-D03, se considera que no resulta obvio para el experto en la materia el empleo de amitriptilina en el tratamiento y/o profilaxis de un proceso canceroso de pulmón.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-10 de la solicitud son nuevas e implican actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 Ley de Patentes).