

Moléculas híbridas. Construcción de una inmunotoxina por acoplamiento de una toxina hemolítica y un anticuerpo monoclonal antilinfocitos T inmaduros

Recibido en junio de 1987

A. D. AVILA, C. MATEO DE ACOSTA y A. LAGE

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, MINSAP, 29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

RESUMEN

Las moléculas híbridas construidas mediante la conjugación de anticuerpos monoclonales y toxinas están siendo probadas experimentalmente en la actualidad como nuevos agentes potenciales contra el cáncer. Estas inmunotoxinas han utilizado fundamentalmente como componente tóxico la ricina (obtenida de la planta *Ricinus communis*), la cual inhibe la síntesis de proteína en los ribosomas por internalización a las células.

En este artículo presentamos una variante para obviar este requerimiento utilizando una toxina hemolítica de acción citolítica sobre componentes de la membrana plasmática, debido a su actividad de fosfolipasa.

La toxina hemolítica (HT) (aislada de la anémona de mar *Stoichactis helianthus*), fue conjugada al anticuerpo monoclonal IOR-T6 (que reconoce un antígeno expresado en linfocitos T inmaduros), mediante un enlace disulfuro. La inmunotoxina IOR-T6-HT no presenta actividad hemolítica en condiciones no reductoras. Es tóxica para las células CEM, que expresan el antígeno del IOR-T6 y no tóxica para las células K562 que no expresan el antígeno. Un exceso del anticuerpo no conjugado protege a las células contra la toxicidad de la inmunotoxina.

Las inmunotoxinas basadas en toxinas hemolíticas activas en membranas, constituyen una variante útil cuando están orientadas hacia antígenos que no requieren internalización, como es el caso de la mayoría de los antígenos de carcinomas.

SUMMARY

Hybrid molecules built by conjugation between monoclonal antibodies and toxins are currently being experimentally tested as potential new anticancer agents. These immunotoxins have mainly used the plant toxin Ricin as toxic component, which inhibits protein synthesis at ribosome level. In this paper we present an alternative for toxic components using an hemolytic toxin acting at membrane level, due to its phospholipase activity.

The hemolytic toxin (HT) (isolated from the sea anemone *Stoichactis helianthus*), has been conjugated to an antibody towards an antigen expressed on immature T lymphocytes (IOR-T6); by means of an artificial disulphide bridge.

The hybrid IOR-T6-HT has not hemolytic activity unless reduced. It is toxic for cells (CEM) expressed the IOR-T6 antigen and nontoxic for cells (K562) not bearing the antigen. An excess of unconjugated antibody reverts the toxicity.

Immunotoxins based on membrane active, hemolytic toxins can be a useful alternative when directed towards antigens which do not mediate internalization, as is the case in most carcinoma antigens.

INTRODUCCION

Las investigaciones en la rama de la Oncología experimental, van dirigidas a la búsqueda de tratamientos más eficaces y específicos para las neoplasias malignas, que los citostáticos actuales. De ahí que en los últimos años se observe un cambio cualitativo en el enfoque de la biología y terapéutica del cáncer, con la aparición de agentes moduladores de las respuestas biológicas, tales como: interferones, linfoquinas, antígenos tumorales y los anticuerpos monoclonales (Oldham, 1982).

La idea de utilizar anticuerpos como vía para provocar la muerte de células neoplásicas de forma específica, fue formulada por Paul Ehrlich, quien pensó en la utilización de anticuerpos como portadores de agentes farmacológicos (Ehrlich, 1906).

Con el desarrollo de la tecnología de hibridomas es posible producir cantidades suficientes de anticuerpos homogéneos, específicos para un mismo determinante antigénico (Gavilondo, 1984).

Algunos de estos anticuerpos son citotóxicos, pero otros no, e independientemente de las investigaciones clínico-terapéuticas que ya se realizan con anticuerpos monoclonales (Bankert, 1984), varios laboratorios han acometido la tarea de acoplar citostáticos o toxinas a los anticuerpos para así construir moléculas híbridas de especificidad dirigida (Olness, 1982; Thorpe, 1982).

Algunas moléculas híbridas se han construido utilizando citostáticos como componente tóxico (Page, 1984; Kanellos, 1985), pero en este campo las toxinas naturales han recibido una atención especial, pues ellas actúan en muchas menores concentraciones por su efecto catalítico (Tamkun, 1981; Beress, 1975).

La toxina más empleada ha sido la ricina, obtenida de la planta *Ricinus communis*. Esta tiene dos subunidades, una subunidad tóxica (cadena A) y otra que porta el sitio de reconocimiento de carbohidratos (cadena B) (Olness, 1973). Así, la separación de la cadena A y su unión a un anticuerpo, tendría la ventaja de modificar la capacidad de reconocimiento y producir una toxina específica (Myers, 1984; Jansen, 1985; Vitteta, 1985).

Las inmunotoxinas de ricina, por otra parte, tienen la desventaja de requerir la internalización, ya que la cadena A actúa sobre los ribosomas (Poncelet, 1984).

En este artículo presentamos una variante para obviar este requerimiento mediante la utilización de una toxina de acción catalítica sobre los componentes de la membrana plasmática (Bernheimer *et al.*, 1976). Se utiliza la toxina hemolítica de la anémona de mar *Stoichactis helianthus* y el anticuerpo monoclonal IOR-T6 dirigido contra antígenos de linfocitos T inmaduros.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpo monoclonal (AcM)

El AcM IOR-T6 fue generado en el Departamento de Biología Tumoral del Instituto de Oncología y Radiobiología, por fusión de la línea de mieloma murino X63 Ag8-6,5.3 con esplenocitos de ratones

inmunizados con células CEM, una línea celular establecida *in vitro* previamente de una leucemia linfoblástica aguda humana de origen T, que fue suministrada por J.C. Chermann, del Instituto Pasteur (París).

El IOR-T6 es una subclase IgG2a; reconoce *in vitro* las células CEM que fueron utilizadas como inmunógeno y no reconoce en absoluto las células K562 de origen eritroblastoide (Hermida y col., 1986).

Toxina hemolítica (HT)

La toxina hemolítica se obtuvo a partir de extractos acuosos de la anémona de mar *Stoichactis helianthus*. Es un polipéptido de cadena única y peso molecular de 18 000, que tiene actividad de fosfolipasa y produce hemólisis total a concentraciones mayores de 0,6 µg/ml. Fue purificada a homogeneidad (con criterios de electroforesis y HPLC) a partir de 200 g del animal, mediante un procedimiento de precipitación con acetona, cromatografía en gel (Sephadex G-50) e intercambio catiónico en CM-Sephadex, que es una modificación diseñada por nosotros (Avila y col., 1986) del procedimiento previamente descrito por Devlin (1974).

Reacción de acoplamiento

Para la reacción de acoplamiento entre la toxina y el anticuerpo monoclonal IOR-T6, se utilizó el agente heterobifuncional N-succinimidyl 3-(2 piridilditio) propionato (SPDP), que introduce grupos sulfidrilos adicionales en cada molécula y permite la generación de un puente disulfuro para el acoplamiento (Carlsson, et al., 1978).

La toxina y el IOR-T6 se tiolaron con un exceso molar de SPDP de 1,5 y 10, respectivamente. El tiempo de la reacción de tiolación fue de 30 minutos, deteniéndose por una cromatografía en una columna de Sephadex G-25 (1 x 24 cm) utilizando buffer fosfato 0,1 M pH 7,5 como eluyente.

Se midió el grado de tiolación de ambas moléculas por reducción con ditioneitol 50 mM (DTT) y medición de la variación de la absorbancia a 343 nm por la liberación de los grupos 2-piridina tiona.

Para la reacción de acoplamiento se utilizó una relación molar 1:1 entre la toxina tiolada y reducida y el IOR-T6 tiolado. Al cabo de 72 horas fue detenida por cromatografía en una columna de Ultrogel AcA44 (1,5 x 30 cm) utilizando buffer fosfato 0,1 M pH=7,5 como eluyente. La reacción de acoplamiento se continuó por la variación de la absorbancia a 343 nm, ocasionada por la liberación de los grupos 2-piridina tiona.

La cantidad de moléculas de toxina acopladas por moléculas de inmunoglobulina se determinó también a través de la actividad hemolítica liberada por la reducción del puente disulfuro.

Actividad hemolítica

Para la localización cualitativa de las fracciones hemolíticas se utilizaron eritrocitos humanos lavados tres veces con solución salina fisiológica, centrifugando a 200 g por 10 minutos a 4°C. Los eritrocitos provenientes de 2,5 ml de sangre total se resuspendieron en 50 ml de NaCl 9 g/l.

Para realizar el experimento, se añadió a 100 µl de la suspensión de eritrocitos, 50 µl de la muestra, y después de 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó (200 g, 10 min., 4°C).

Para la determinación cuantitativa de la actividad hemolítica, se siguió la cinética de reducción de la absorbancia a 700 nm, según lo descrito por Macek y Lebez, 1981. Se definió una unidad de hemólisis como la cantidad de toxina que en las condiciones del ensayo produce una disminución de la absorbancia de 0,01 unidades de densidad óptica por segundo.

Toxicidad específica *in vitro*

Se realizaron experimentos de citotoxicidad utilizando células de leucemia linfoblástica aguda de origen T (CEM) y células de origen eritroblastoide (K562). Ambas células se utilizaron en medio de cultivo RPMI-1640 libre de suero.

La citotoxicidad específica fue determinada estimando muerte celular por inclusión de tripán azul al 0,8 por ciento. En una placa Costar 3524 se distribuyeron 10^5 células por pozo y se incubaron a temperatura ambiente en presencia de la muestra a analizar, después de lo cual se estimó en cámara de Neubauer la cantidad de células que incluyen o excluyen el tripán azul. En otros experimentos fue determinada la citotoxicidad por la liberación de ^{51}Cr . Las células fueron lavadas tres veces con medio RPMI-1640, centrifugando a 500 rpm durante 7 minutos; seguidamente $3 \cdot 10^6$ células se marcaron con 200 µCi de ^{51}Cr incubando en atmósfera de CO_2 (g) durante una hora; después se lavaron tres veces con medio RPMI-1640 libre de suero, centrifugando a 500 rpm durante 7 minutos a 4°C.

En una placa de 96 pozos se distribuyeron $2 \cdot 10^4$ células por pozo y se añadió 100 μ l de la muestra, incubándose 4 horas. La reacción fue detenida por centrifugación de la placa con posterior conteo de radiactividad a 100 μ l del sobrenadante. Cada experimento fue realizado por triplicado.

RESULTADOS

Reacción de acoplamiento

Con la tiolación del anticuerpo monoclonal IOR-T6 y la toxina hemolítica, se introdujo un grupo funcional por molécula de toxina y 12 grupos funcionales por moléculas de anticuerpo, manteniendo ambos sus propiedades biológicas.

Durante la reacción de acoplamiento se obtuvo un aumento de la absorbencia a 343 nm de 0,28 unidades, lo que indica el acoplamiento de 12 moléculas de toxina por molécula de anticuerpo.

Después de la separación por filtración en gel, el material excluido de Ultrogel AcA44 que contiene las moléculas híbridas no mostró actividad hemolítica, sin embargo, aparece en esta fracción después de reducir con ditioneitol (50 mM, 40 minutos).

La determinación cuantitativa de la actividad hemolítica después de la reducción de la inmunotoxina, permite estimar la presencia de 9,4 moléculas de toxina por molécula de anticuerpo (tabla 1).

Tabla 1

RECUPERACION DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE LA INMUNOTOXINA POR REDUCCION DEL PUENTE DISULFURO INTERMOLECULAS

Muestra	Concentración proteína (mg/ml)	Actividad hemolítica (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Moles de toxina/mol
Toxina purificada	9,3	16,8	1,81	1,0
Inmunotoxina (excluido de gelfiltración)	14	0	0	-
Inmunotoxina (después de reducción con DTT)	14	13,4	0,96	9,4

Nota: Después de la reacción de acoplamiento intermolecular, la mezcla reaccionante se depositó en una columna de Ultrogel AcA44. El pico excluido de esta cromatografía, que contiene las moléculas híbridas, se utilizó para evaluar actividad hemolítica cuantitativa, antes y después de la reducción con ditioneitol 50 mM.

Especificidad de la toxicidad *in vitro*

La inmunotoxina obtenida resultó citotóxica sobre las células CEM, que expresan el antígeno del monoclonal IOR-T6, e inactiva sobre las células K562 que no expresan este antígeno, como

se muestra en los resultados de la prueba de supervivencia por exclusión de tripán azul (figura 1).

Este experimento muestra, además, dos criterios de especificidad: el primero es que la diferencia en la sensibilidad de las células CEM y las células K562 desaparece después de reducir la inmunotoxina, liberando la toxina hemolítica, y el segundo es que la adición de un exceso (20x) del IOR-T6 protege parcialmente las células CEM del efecto tóxico de la inmunotoxina.

El experimento de liberación de ^{51}Cr (figura 2) produjo resultados similares. La inmunotoxina resultó ser tóxica para las células CEM e inocua a concentraciones similares para las células K562. El AcM IOR-T6 no fue tóxico para ninguna de las dos líneas celulares y la toxina libre fue tóxica para ambas.

El efecto tóxico de la inmunotoxina se produce a concentraciones entre 10^{-9} y 10^{-8} (ED50= $5 \cdot 10^{-9}$ M) para 4 horas de incubación. Los experimentos de liberación de ^{51}Cr también confirman que el exceso del anticuerpo IOR-T6 protege a las células CEM del efecto tóxico de la inmunotoxina (figura 3).

La citotoxicidad resulta, además, ser dependiente del tiempo de incubación (figura 4). La cinética del efecto mostró una tendencia log-lineal sugestiva de cinética de primer orden.

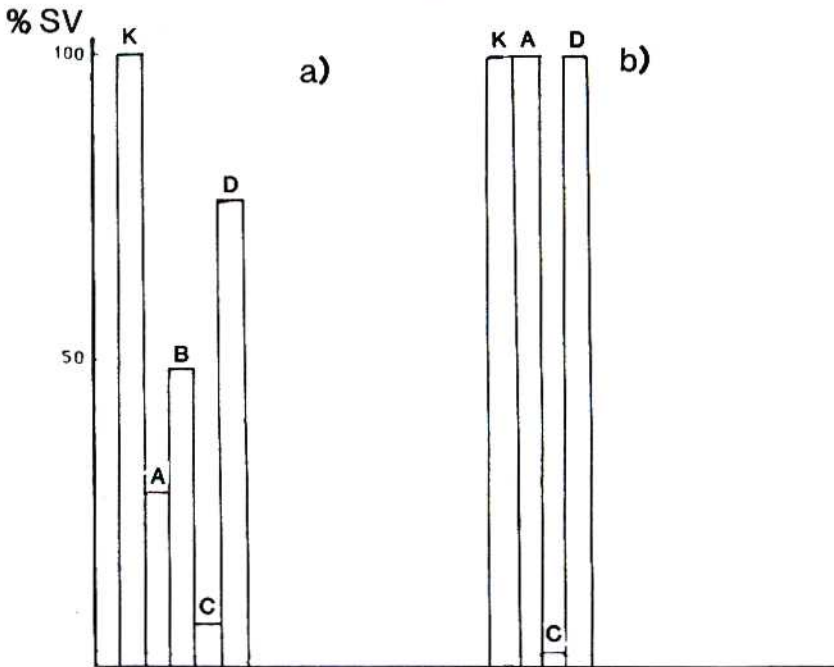


FIG. 1. Citotoxicidad de la inmunotoxina. Prueba de exclusión de tripán azul.

Las células (CEM o K562) fueron depositadas en placas de 24 pozos (10^5 células/pozo) e incubadas en medio RPMI-1640 sin suero con:

K: ningún aditivo

A: IT $5,7 \mu\text{g/ml}$

B: IT $5,7 \mu\text{g/ml}$ más el AcM IOR-T6 ($120 \mu\text{g/ml}$)

C: IT $5,7 \mu\text{g/ml}$ previamente reducida con DTT

D: AcM IOR-T6 ($10 \mu\text{g/ml}$)

Después de cuatro horas de incubación se contaron las células vivas y muertas en cámara de Neubauer.

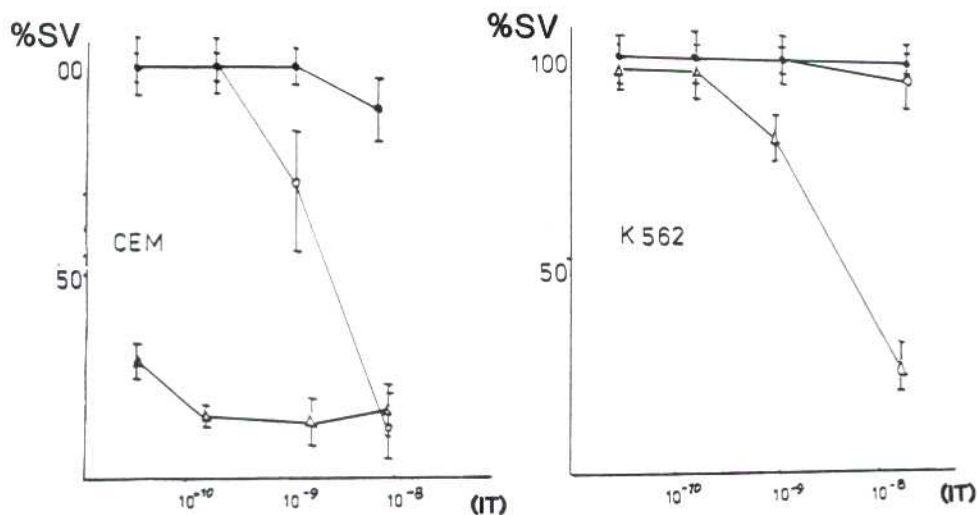


FIG. 2. Citotoxicidad de la inmunotoxina. Prueba de liberación de ⁵¹Cr.

Las células CEM(A) y K562(B) fueron cargadas con ⁵¹Cr, mediante incubación de una hora a 37°C en presencia de 400 μCi/ml, lavadas y distribuidas en placas de 96 pozos, 2 · 10⁴ células/pozo, luego de lo cual fueron incubadas a 37°C en medio RPMI-1640, en presencia de IT (○-○-○) a diferentes concentraciones de toxina libre (△-△-△) o de AcM IOR-T6 (●-●-●), estos dos a concentraciones equivalentes a las de la inmunotoxina. Después de cuatro horas, las células fueron centrifugadas y se contó la radiactividad de los sobrenadantes.

La ordenada es el porcentaje de supervivencia calculado con relación a la liberación de ⁵¹Cr en células de pozos controles en medio RPMI-1640. Cada punto es la media de tres réplicas.

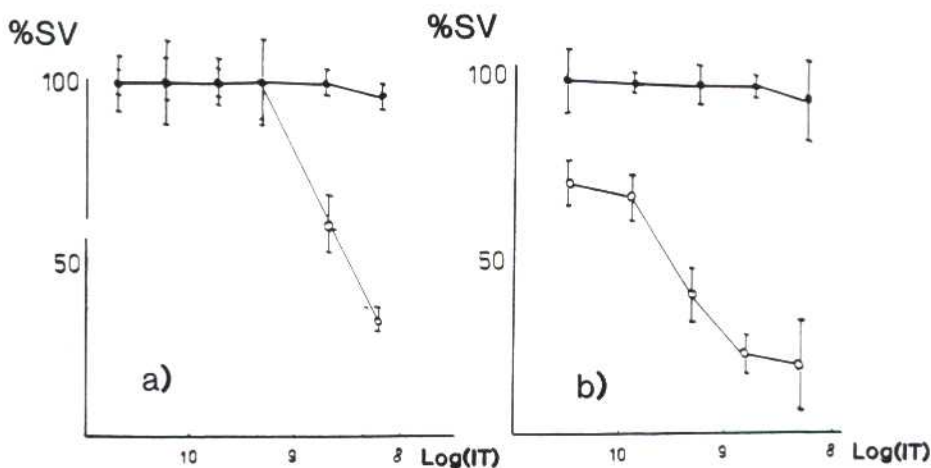


FIG. 3. Protección de las células CEM por exceso de anticuerpo.

Las células CEM fueron cargadas con ⁵¹Cr, lavadas y distribuidas en placas a razón de 2 · 10⁴ células/pozo, luego de lo cual fueron incubadas en medio RPMI-1640 conteniendo diferentes concentraciones de la inmunotoxina (abscisa ○-○-○) solamente, o de la inmunotoxina con un exceso del anticuerpo monoclonal IOR-T6 (●-●-●). Después de incubar durante cuatro horas (A) y 6 horas (B), las células fueron centrifugadas y se contó la radiactividad del sobrenadante.

La ordenada es el porcentaje de supervivencia de las células calculado en relación con la liberación de ⁵¹Cr, de pozos controles incubados con medio RPMI-1640. Cada punto es la media de tres réplicas.

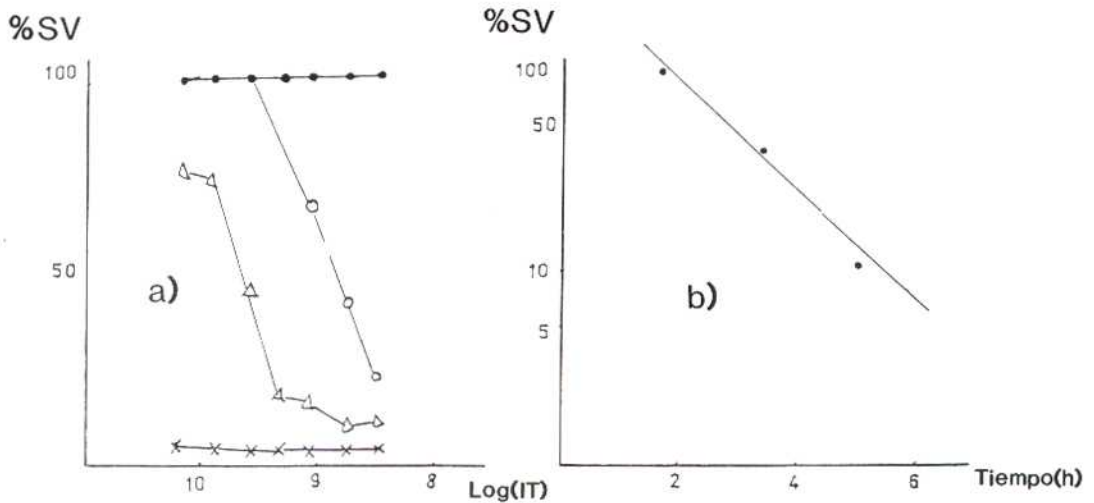


FIG. 4. Dependencia del tiempo del efecto tóxico.

(A): Las células fueron cargadas con ^{51}Cr , lavadas y distribuidas en placas a razón de $2 \cdot 10^4$ células/pozo, luego de lo cual fueron incubadas en medio RPMI-1640 en presencia de diferentes concentraciones de la inmunotoxina (abscisa). Después de incubar durante dos horas (●-●-●-), cuatro horas (○-○-○-), seis horas (-△-△-) y ocho horas (x-x-x-x), las células fueron centrifugadas y se contó la radiactividad del sobrenadante. La ordenada es el porcentaje de supervivencia de las células calculado en relación a la liberación de ^{51}Cr de pozos controles incubados con medio RPMI-1640. Cada punto es la media de tres réplicas.

(B): Gráfica del efecto de la concentración de inmunotoxina a $5 \cdot 10^{-9}$ M.

La ordenada es el porcentaje de supervivencia en escala logarítmica. La abscisa es el tiempo en horas en escala lineal.

DISCUSION

Los resultados experimentales demuestran que es posible construir una molécula híbrida por acoplamiento por puentes disulfuros entre un anticuerpo monoclonal y la toxina hemolítica de la anémona de mar *Stoichactis helianthus*.

La propiedad más interesante del híbrido es que no tiene actividad hemolítica, lo cual facilitaría su uso *in vivo*, y que esta actividad hemolítica se recupera después de la reducción y la liberación de la toxina.

El acoplamiento con el anticuerpo monoclonal genera una molécula cuya especificidad es la misma del anticuerpo, como indica el hecho de que la inmunotoxina es tóxica sobre las células CEM y no tóxica sobre las células K562; la diferencia en la sensibilidad de ambas células desaparece después de la reducción, y finalmente, la toxicidad de la inmunotoxina sobre las células CEM se suprime parcialmente por el exceso del anticuerpo.

Estos resultados indican que el reconocimiento de las células, y por tanto, el efecto tóxico, se produce a través de la interacción del anticuerpo monoclonal y el antígeno correspondiente.

La literatura reciente sobre inmunotoxinas reporta la producción y ensayo *in vitro* de varias de estas moléculas híbridas, utilizando como componente de especificidad diversos anticuerpos y como componente tóxico principalmente la toxina vegetal ricina (Thorpe, 1984), la cadena A de la ricina (Bjorn, 1985), la toxina diftérica (Sundan *et al.*, 1982) y otras. Estas toxinas tienen en común su efecto sobre la síntesis de proteína intracelular.

Según la información de que disponemos, este es el primer reporte en la literatura de una toxina hemolítica, activa sobre componentes de membrana, para la construcción de moléculas híbridas de especificidad dirigida.

Esta estrategia permitiría obviar algunos de los inconvenientes de las inmunotoxinas de la ricina que derivan de la necesidad de internalización y procesamiento celular (Carriere *et al.*, 1985).

La molécula híbrida IOR-T6:HT debe ser ahora evaluada en experimentos *in vivo*.

REFERENCIAS

- AVILA, A. D.; C. MATEO DE ACOSTA y A. LAGE (1986). *Purificación de una toxina a partir de la anémone de mar *Stoichactis helianthus**. Rev. Cub. Onc. En prensa.
- BANKERT, R. B. (1984). *Development and use of monoclonal antibodies in the treatment of cancer*. Cancer Drug Delivery **1** (3): 251-267.
- BERNHEIMER, A. W. y L. S. AVIGAD (1976). *Properties of a toxin from the sea anemone *Stoichactis helianthus* including specific binding to sphingomyelin*. Proc. Nat. Acad. Sci. **73**: 467.
- BERESS AND BERESS (1975). *Purification of three polypeptides with neurocardiotoxic activity from the sea anemone. *Anemone sulcata**. Toxicon **13**: 359.
- BJORN, M. J.; D. RING y A. FRANKEL (1985). *Evaluation of monoclonal antibodies for the development of breast cancer immunotoxins*. Cancer Research, **45**: 1214-1221.
- CARLSSON, J.; H. DREVIN y R. AXEN (1978). *Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. *N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent**. Biochem. J. **173**: 723-737.
- CARRIERE, D.; P. CASELLAS; G. RICHER; P. GROS y F. K. JANSEN (1985). *Endocytosis of an antibody ricin-A chain conjugate (Immuno-A-toxin) adsorbed in Colloidal Gold. Effects of ammonium chloride and monensin*. Experimental Cell Research **156**: 327-340.
- DEVLIN, J. P. (1974). *Isolation and partial purification of hemolytic toxin from sea anemone *Stoichactis helianthus**. J. Pharm. Sci., **63**: 1478.
- EHRlich, P. (1906). *Collected studies of immunology*. Vol. II, New York., John Wiley ed., pp. 442-447.
- GAVILONDO, C. J. (1984). *"Anticuerpos monoclonales. Producción y aplicaciones"*. Rev. Cub. Inv. Biom. **3**: 98-111.
- HERMIDA, C.; A. VAZQUEZ; K. TORRES; J. GAVILONDO y E. RENGIFO (1986). *Anticuerpo monoclonal de diferenciación presente en timocitos humanos*. Proc. II. Simposium de Interferón y Biotecnología. En prensa.
- JANSEN, F. K.; D. CARRIERE; O. GROS; P. GROS y B. RICHER (1985). *Efficiency and tolerance of the treatment with Immuno-A-chains toxins in human bone marrow transplantations*. Acad. Press. Inc. London Ltd. Chapter II: 223-248.
- KANELLOS, J.; G. A. PIETERSZ y I.F.C. Mc. KENZIE (1985). *Studies of methotrexate-monoclonal antibody conjugates for immunotherapy*. J.N.C.I. **75** (2): 319-329.
- MACEK y D. LEBEZ (1981). *Kinetics of hemolysis induced by equinatoxin, a cytolytic toxin from the sea anemone. *Actinia equina*. Effect of some ions and pH*. Toxicon **19**: 233.
- MYERS, C.D. y P. E. THORPE (1984). *An immunotoxin with therapeutic potential in T cell leukemia WTI-Ricin-A*. Blood, **63**(5): 1178-1185.
- OLDHAM, R. (1982). *Biological response modifiers program*. Journal of Biological **1**: 81-100.
- OLNES, S. y A. PEHL (1982). *"Chimeric toxins"*, En: *Pharmacology of bacterial toxins*. Ed. J. Brew. and F. Forner, Pergamon Press **15**: 335.
- OLNES, S. y A. PEHL (1973). *Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis*. Biochemistry, **12**(16): 3121-26.
- PAGE, M.; F. DELORME; F. LAFONTAINE y L. DUMAS (1984). *Chemotherapy with daunorubicin-anti CEA conjugates in human colon adenocarcinoma grafted in nude mice*. Seminars in Oncology, **11** (4) Suppl 3: 56-58.
- PONCELET, P.; H. E. BLYTHMAN; D. CARRIERE; P. CASELLAS; D. DUSSOSSOY; O. GROS; P. GROS; F. K. JANSEN; J. C. LAURENT; M. C. LLIANCE; H. VIDAL y G. A. VOISIN (1984). *Present potential of immunotoxins*. Behring Inst. Mitt., **74**: 94-100.

- SUNDAN, A.; S. OLNES; K. SANDVIG y A. PIHL (1982). *Preparation and properties of chimeric toxins prepared from the constituent polypeptides of diphtheria toxin and ricin*. Journal of Biological Chemistry, 16: 9733-9739.
- TAMKUM, M. M. y D. A. HESSINGER (1981). *Isolation and partial characterization of hemolytic toxin and toxic protein from the nematocyst venom of the Portuguese Man of War, Physalia physalis*. Biochimica et Biophysica Acta: 667-687.
- THORPE, P.; D.C. EDWARDS; A. DAVIES y W. ROSS (1982). *Monoclonal antibody-toxin conjugates aiming the magic bullets*. En: *Monoclonal antibodies in Clinical Medicine*. Academic Press. London: 168-190.
- THORPE, P.; D. C. EDWARDS; A. DAVIES y W. ROSS (1984). *Blockade of the galactose-binding sites of ricin by its linkage to antibody. Specific cytotoxic effects of the conjugates*. Eur. J. Biochem., 140: 63-71.
- VITTETA, E. S. y J. W. UHR (1985). *Immunotoxins*. Ann. Rev. Immunol., 3: 197-212.