

Obtención de fármacos antitumorales a partir de organismos de origen marino: Jaspamida, un péptido procedente de la esponja *Jaspis sp.*

Virginia Bousoño Rubio^{1,2}

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2 Departamento de Química de Productos Naturales, PharmaMar S.A., 28770 Colmenar Viejo, Madrid, España.

Resumen

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en Europa y Estados Unidos. Aunque el índice de supervivencia ha mejorado en los últimos años, muchas de las variantes de esta enfermedad aún no tienen cura, por lo que es necesario el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para combatirla. En la actualidad existe un creciente interés en la búsqueda de moléculas de potencial actividad procedentes del mar, ya que la gran diversidad química y biológica del medio marino es un amplio recurso para la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales. El hecho de que el número de fármacos de origen marino descubiertos vaya en aumento se debe a la producción de metabolitos secundarios por parte de los organismos, los cuales han demostrado tener gran valor como agentes citotóxicos. Entre los distintos grupos taxonómicos marinos destaca el de las esponjas (filo *Porifera*), en el que se han centrado la mayoría de los estudios hasta la actualidad, por su elevada producción de metabolitos secundarios. En el presente estudio se describe el proceso de aislamiento y purificación mediante técnicas cromatográficas, valoración de actividad antitumoral y elucidación estructural mediante resonancia magnética nuclear de la jaspamida a partir de una muestra de *Jaspis sp.* tomada en Tomori. Son muchos los estudios que avalan el potencial antitumoral de la jaspamida en numerosas líneas celulares de cáncer. El proceso se llevó a cabo en el Departamento de Química de Productos Naturales de PharmaMar, compañía farmacéutica líder en el descubrimiento de tratamientos de origen marino contra el cáncer.

Palabras clave: Actividad citotóxica; *Jaspis sp.*; Jaspamida; HPLC; NMR; Elucidación estructural.

Cita: Beusoño V (2013) Obtención de fármacos antitumorales a partir de organismos de origen marino: Jaspamida, un péptido procedente de la esponja *Jaspis sp.* *Dianas* 2(2): e20130901. ISSN 1886-8746 journal.dianas.20130901 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 24 de junio de 2013

Copyright: © 2013 Beusoño. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

***E-mail:** virginia.bousono@gmail.com



Introducción

Más del 60% de los agentes antitumorales utilizados contra el cáncer son productos naturales o moléculas pequeñas basadas en estos [1]. El mar cubre más del 70% de la superficie terrestre, lo que implica una mayor biodiversidad que la encontrada en tierra firme. En el ambiente marino se encuentran el 75% de los organismos vivos: más de diez millones de especies de las que sólo se conoce una pequeña parte. Este hecho supone una gran fuente de compuestos con potencial terapéutico como medicamentos, tratamientos innovadores y herramientas de diagnóstico, pero sólo una pequeña fracción de los mismos ha sido estudiada con fines de actividad biológica [2]. Actualmente existen más de 20 fármacos de origen marino en distintos niveles de desarrollo clínico, la mayoría en el área de oncología [3]. La razón por la que se haya descubierto una gran cantidad de productos naturales citotóxicos procedentes de plantas, microbios e invertebrados marinos es la presión evolutiva ecológica del medio marino, lo que favorece la producción de mecanismos químicos de defensa [4,5]. Los ecosistemas marinos suelen estar muy densamente poblados, con escasa o nula movilidad y con un sistema inmunológico muy primitivo, por lo que la evolución se ha dirigido hacia la producción de compuestos derivados de su metabolismo secundario para defenderse de sus competidores y depredadores [6].

Las esponjas son los organismos que abarcan un mayor número de estudios químicos. Son organismos pluricelulares sencillos que carecen de órganos y tejidos, estando únicamente compuestos por células con

funciones diferenciadas. A pesar de esto, son capaces de producir un gran número de metabolitos secundarios en comparación con otros organismos marinos [7].

La jaspamida o jasplaquinolida es un ciclodepsipéptido aislado por primera vez en 1986 a partir de la esponja *Jaspis sp.* (orden *Astrophorida*, familia *Ancorinidae*). Contiene tres aminoácidos: L-alanina, N-metil-2-bromotriptófano y β -tirosina [8]. Se le han atribuido diversas actividades biológicas, como antifúngico [9], antihelmíntico, insecticida [10] y citotóxico [11]. Se ha observado que, a baja concentración (nM), induce la polimerización de actina, estabilizando los filamentos (F-actina) [12]. Su amplio espectro de acción hace de la jaspamida una molécula de gran interés en el desarrollo de nuevos estudios.

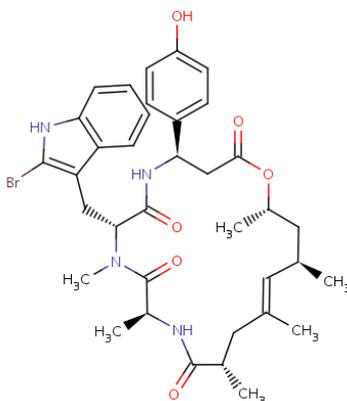


Figura 1.- Estructura química de la jaspamida.

Materiales y Métodos

Recolección de la muestra animal

La muestra de *Jaspis sp.* fue recolectada en Tomori (Indonesia) en junio del 2012 mediante la técnica *Rebreather P*. La identificación de la muestra se llevó a cabo en el departamento de Colección. Se obtuvieron 156g, de los cuales 136g se remitieron al Departamento de Química de Productos Naturales.



Figura 2. - Fotografía tomada de la muestra de *Jaspis sp.* en el lugar de recolección (Tomori).

Extracción de los compuestos de la muestra

Después de cortar la muestra en pequeños fragmentos, se puso en agitación con MeOH-DCM (1:1, 400 ml). La solución fue concentrada filtrándose bajo vacío y evaporándola. El proceso se realizó tres veces para obtener la fracción orgánica. Se repitió el proceso una vez con H₂O (400ml), obteniéndose la fracción acuosa.

Fraccionamiento mediante VLC-RP (Vacuum Liquid Chromatography-Reverse Phase)

Con la fracción orgánica se realizó una cromatografía en fase reversa en placa abierta de vidrio (6cm de diámetro) con sílica RP18. Se obtuvieron siete fracciones mediante el uso de un gradiente con H₂O, MeOH y DCM (Tabla 1).

Análisis mediante HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry)

Se realizó HPLC-MS en fase reversa en columna Symmetry C18 (3.5 μ m, 4.6x150mm), usando un gradiente de H₂O y CH₃CN con TFA al 0.04% (5 min al 5% de CH₃CN+0.04%TFA, gradiente hasta el 100% de CH₃CN+0.04%TFA en 30 min, 5 min al 100% de CH₃CN+0.04%TFA).

Purificación mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Para la purificación se realizó HPLC en fase reversa en columna XBridge C18 (5 μ m, 10x150mm), usando un gradiente de H₂O y CH₃CN con FA al 0.04% (3 min al 20% de CH₃CN+0.04%FA, gradiente hasta el 100% de CH₃CN+0.04%FA en 17 min, 3 min al 100% de CH₃CN+0.04%FA). Se seleccionó la muestra, procedente de VLC-RP, tras evaluar su actividad. Se resuspendió en 1ml de MeOH y se centrifugó, recogiendo el sobrenadante en tres viales de HPLC. El volumen de inyección fue de 50 μ l/ciclo, hasta agotar todo el volumen de la muestra.

Ensayo de actividad antitumoral en fracciones

Se envían 0.15 mg de cada fracción generada al Departamento de Screening para determinar su actividad, tras realizar cada una de las fases de extracción y purificación de la muestra. El procedimiento se lleva a cabo según el protocolo de ensayo colorimétrico de Sulforodamina B [13]. Las líneas celulares usadas son: HT29 (colon), A549 (pulmón), MDA-MB-231 (mama), y PSN1 (páncreas). Se usan tres concentraciones para cada línea celular (1:1, 1:5 y 1:25) a partir de una concentración de 1 μ g/ml. Para valorar la actividad al menos tiene que cumplir uno de los dos criterios de selección: a) Al menos tres de las líneas celulares con crecimiento de <-25%, <25% y <100% respecto a un ensayo control para cada una de las respectivas concentraciones; b) Una línea celular con crecimiento de <-50% respecto a un ensayo control para las tres concentraciones.

Elucidación estructural mediante NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

Se resuspendió la muestra de interés en 600 μ l de MeOH deuterado (CD₃OD) para obtener el espectro monodimensional de ¹³C y ¹H, y el espectro bidimensional de HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), COSY (CORrelation SpectroscopY) y TOCSY (TOtal CORrelation SpectroscopY). Se analizaron los espectros con el software MestReNova para su elucidación estructural.

Análisis del compuesto puro mediante TOF-MS (Time Of Flight-Mass Spectrometry)

Se realizó TOF-MS en columna Vanguard BEH C18 (1.7 μ m) usando un gradiente de H₂O y CH₃CN con TFA al 0.04% (1 min al 5% de CH₃CN+0.04%TFA, gradiente hasta el 100% de CH₃CN+0.04%TFA en 9.5 min, 3 min al 100% de CH₃CN+0.04%TFA).

Ensayo de actividad antitumoral en compuestos puros

Se enviaron 0.30 mg del compuesto puro para valorar su actividad. El procedimiento se lleva a cabo según el protocolo de ensayo colorimétrico de Sulforodamina B [13]. Las líneas celulares usadas son: HT29 (colon), A549 (pulmón), MDA-MB-231 (mama), y PSN1 (páncreas). Se realizan 10 diluciones seriadas (1:2.5) a partir de una concentración de 10 μ g/ml. Para valorar la actividad, el criterio de selección positivo es la obtención de un GI50<1.0⁻⁶ M.

Resultados y Discusión

Tras la extracción inicial, se obtuvieron dos fracciones: orgánica (5.0g) y acuosa (0.3g). La cromatografía en fase reversa realizada a partir de la fracción orgánica generó siete fracciones (Tabla 1).

Fracción	Eluyente	Volumen	Peso
1	H ₂ O	100 ml	2.95mg
2	H ₂ O:MeOH (3:1)	100 ml	1.46g
3	H ₂ O:MeOH (1:1)	100 ml	154mg
4	H ₂ O:MeOH (1:3)	100 ml	56.4mg
5	MeOH	300 ml	68.7mg
6	MeOH:DCM (1:1)	300 ml	199.5mg
7	DCM	250 ml	41.5mg

Tabla 1.- Fracciones generadas por VLC-RP a partir de la fracción orgánica procedente de la extracción.

En el ensayo de actividad antitumoral de estas fracciones, junto con las dos generadas inicialmente en la extracción (Figura 3) se observa que cumplen los criterios de actividad las fracciones generadas por VLC-RP 4 y 5, las cuales fueron eluidas con una mayor concentración de MeOH (Tabla 1). Al ser estas dos

fracciones de interés, se procede a su purificación. En el presente estudio se muestra el procesamiento de la fracción 5 al ser la que presenta una mayor actividad.

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Assay	Sel	Colon			Lung-NSCLC			Breast			Pancreas		
								HT29			A549			MDA-MB-231			PSN1		
								25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1
DP1FR/002480																			
26	ORMA116204	A	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/A/001	Jaspis	AT-SC 09/04/2013		92.7	95.8	105.8	80.2	97.4	100	94.3	92.1	97.4	102.1	100.8	100.4
27	ORMA116204	DM.M	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001	Jaspis	AT-SC 09/04/2013		-45.6	5.6	55.8	-69.1	58.3	101.9	-44	62.9	99.1	-41.4	20.4	69.8
28	ORMA116204	RP	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/FP/001	Jaspis	AT-SC 09/04/2013		106.2	102.3	103.1	96.9	99.9	95.2	92.9	85.4	86.1	99.7	98	104.4
29	ORMA116204	RP	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/FP/002	Jaspis	AT-SC 09/04/2013		104.9	101.9	113.5	99.4	106.3	107.4	103.6	79.8	83.8	98.2	92.5	96.3
30	ORMA116204	RP	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/FP/003	Jaspis	AT-SC 09/04/2013		11.3	-45.5	89.6	-22.2	31.6	86.6	-3.1	21.8	64.6	-22.2	34.3	98.2
31	ORMA116204	RP	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/FP/004	Jaspis	AT-SC 09/04/2013	Active	-74.9	2.5	18.4	-92.1	-44.3	52.8	-91	9.5	74.8	-81.2	-14.6	23.7
32	ORMA116204	RP	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/FP/005	Jaspis	AT-SC 09/04/2013	Active	-92.9	-65.7	-38.9	-88.3	-84.3	-40.6	-86.6	-88	-68.5	-95	-84.3	-61.2
33	ORMA116204	RP	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/FP/006	Jaspis	AT-SC 09/04/2013		-82.5	29.2	90.8	-77.5	26.8	71	-44.9	75.3	101.3	-16.9	52	77.1
34	ORMA116204	RP	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/FP/007	Jaspis	AT-SC 09/04/2013		75.7	84.9	99.2	88.5	94.2	96.7	96.4	94.4	100.8	78.7	90.1	97.1

Figura 3.- Ensayo de actividad antitumoral en fracciones acuosa (A), orgánica (DM) y las siete fracciones generadas por VLC-RP. Se muestran los datos en tanto por ciento de variación de crecimiento celular respecto a un ensayo control. La concentración utilizada en las tres diluciones se expresa en µg/ml.

A continuación, con la fracción 5 de VLC-RP se realiza un análisis mediante HPLC-MS (Figura 4). El alto tiempo de retención en el cromatograma de los compuestos de interés indica su naturaleza apolar, lo que sirve de guía para la elección del método de trabajo para su purificación mediante HPLC. Su distribución isotópica indica que el compuesto está halogenado, observándose dos picos iónicos separados por dos unidades de m/z (709, 711) que se corresponden con los dos isótopos del compuesto bromado: ⁷⁹Br y ⁸¹Br. Se asigna 709 como pico base [M+H]⁺. El pico 731 se corresponde con [M+Na]⁺.

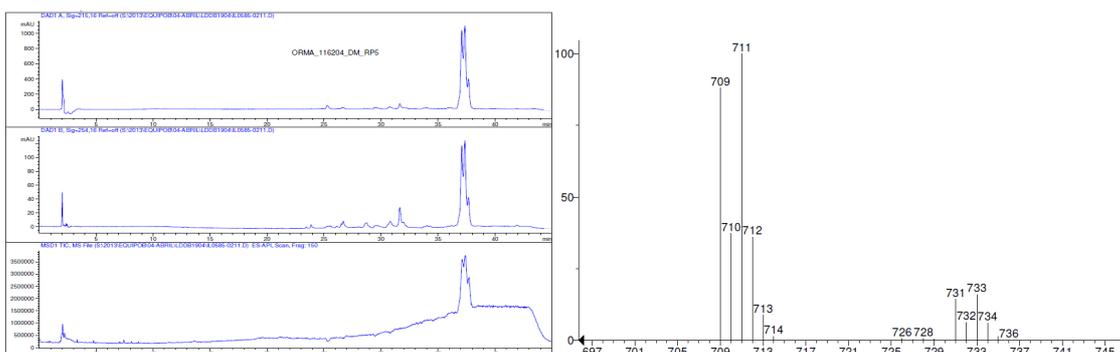


Figura 4.- Cromatograma (λ: 215 y 254nm)(izquierda) y distribución isotópica (derecha) de la fracción 5, obtenido mediante HPLC-MS.

Tras la realización de HPLC (Figura 5), se observa una distribución de compuestos con una serie de espectros de absorción característicos que se dividen en diez fracciones (H1-10) con el fin de purificar y aislar los distintos compuestos y valorar su actividad antitumoral individualmente.

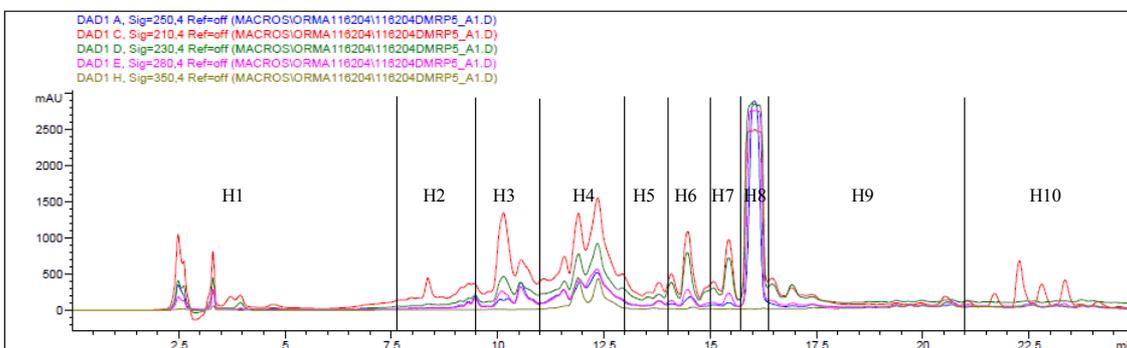


Figura 5.- Cromatograma de la fracción 5 obtenida por VLC-RP mediante HPLC (λ: 210, 230, 250, 280 y 350nm). Se muestra el fraccionamiento posterior de la muestra (H1-10) para su purificación.

En el ensayo de actividad antitumoral de las diez fracciones generadas por HPLC se observa actividad en seis de las mismas (Figura 6).

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Assay	Sel	Colon			Lung-NSCLC			Breast			Pancreas		
								HT29			A549			MDA-MB-231			PSM1		
								25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1
DP1FR/002508																			
45	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC001	Jaapia	AT-SC 23/04/2013	Active	-64.9	-47.6	-14.1	-81.1	-77.4	-43.5	-82.5	-84.7	-68.5	-73.9	-76.1	-60
46	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC002	Jaapia	AT-SC 23/04/2013		-9.4	22.7	97.3	-57.6	74.9	87.9	-71.5	65.3	99	-40.8	6	56.4
47	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC003	Jaapia	AT-SC 23/04/2013	Active	-92.2	-66.6	-89.2	-67.3	-89.7	-92.3	-95.8	-94.4	-83.1	-85	-92.1	-88.1
48	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC004	Jaapia	AT-SC 23/04/2013	Active	-89.3	-10.6	80	-82	0.1	56.4	-78.8	23.2	92	-60.9	18.9	95.4
49	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC005	Jaapia	AT-SC 23/04/2013		-65.9	40	85.1	-68.9	59.3	70.4	-82	65.3	68.7	-86	34.1	56.1
50	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC006	Jaapia	AT-SC 23/04/2013		-0.6	-19.4	26.1	-20.1	47	56.7	-64.2	-15.1	92.8	-3.7	6.3	7.2
51	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC007	Jaapia	AT-SC 23/04/2013	Active	-16.2	-21.3	-5.3	-62.8	-36.5	-6.8	-77.1	-83.1	-83.9	-43.9	-46	-20.9
52	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC008	Jaapia	AT-SC 23/04/2013	Active	-10.3	-18.4	-11.2	-61.1	-63.9	-32.1	-89.3	-83.9	-84.7	-61.9	-67	-63
53	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC009	Jaapia	AT-SC 23/04/2013	Active	-43.5	-19.4	-13.1	-76.8	-49.5	-38.2	-91.7	-77.4	-75.8	-83	-44	-29.9
54	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP1905#HPLC010	Jaapia	AT-SC 23/04/2013		14.1	97.8	114.5	49.5	108.7	73.5	54.3	74.7	93.2	21.9	89.7	66.1

Figura 6.- Ensayo de actividad antitumoral en las diez fracciones resultantes del HPLC realizado sobre la fracción 5 obtenida por VLC-RP. Se muestran los datos en tanto por ciento de variación de crecimiento celular respecto de un ensayo control. La concentración utilizada en las tres diluciones se expresa en µg/ml.

Una vez seleccionadas las muestras activas, se analiza mediante HPLC-MS su distribución isotópica. El compuesto mayoritario observado en el estudio inicial de HPLC-MS de la fracción 5 de VLC-RP se identifica en las fracciones 7, 8 y 9. Las fracciones 1, 3 y 4 se corresponden con un compuesto diferente no contemplado en este estudio. Como se observa en el cromatograma de HPLC (Figura 5), el pico mayoritario corresponde a la fracción 8. Las fracciones 7 y 9 contienen restos del compuesto.

Para la elucidación estructural de la molécula con actividad biológica se realizan experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN), obteniéndose los espectros monodimensionales de ¹³C y ¹H y los espectros bidimensionales HSQC, COSY, HMBC y TOCSY (Tabla 2).

Átomo	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm, J en Hz)	COSY	HMBC	TOCSY
1 C	177.85			3a, 3b, 18, 19	
2 C	40.58	2.66 (1H, m)	3a, 3b, 21	3a, 3b, 21	3a, 3b, 21
3 C	42.58	2.20 (1H, m) 1.96 (1H, m)	2, 3b, 5 2, 3a, 5	1, 2, 4, 5, 21, 22	2, 5, 21
4 C	134.01			3a, 3b, 22	
5 C	130.48	4.85 (1H, s)	6, 3a, 3b	3a, 3b, 6, 7a, 7b, 22, 23	3a, 3b, 6, 7a, 7b, 22, 23, 24
6 C	30.44	2.31 (1H, m)	5, 7a, 7b, 23	5, 7a, 7b, 8, 23	5, 7a, 7b, 8, 23
7 C	44.07	1.51 (1H, m) 1.21 (1H, m)	6, 7b, 8 6, 7a, 8	5, 6, 8, 23, 24	5, 6, 8, 23, 24
8 C	71.61	4.70 (1H, m)	7a, 7b, 24	6, 7a, 7b, 10, 24	6, 7a, 7b, 23, 24
10 C	172.19			8, 11a, 11b	
11 C	41.87	2.76 (1H, m) 2.63 (1H, m)	11b, 12 11a, 12	10, 12, 26	12, 13
12 C	50.52	5.27 (1H, d, 4.1)	11a, 11b, 13, 27, 31	11a, 11b, 26, 27, 31	11a, 11b, 13
13 N		8.23 (1H, d, 8.7)	12	14	11a, 11b, 12
14 C	170.99			13, 15, 34	
15 C	56.96	5.67 (1H, dd, 6.9, 9.5)	34	14, 17, 34, 37, 45	34
17 C	174.91			15, 18, 19, 45, 47	
18 C	47.03	4.70 (1H, m)	19, 47	1, 17, 19, 47	19, 47
19 N		7.64 (1H, d, 7.2)	18	1, 17, 18	18, 19, 47
21 C	19.63	1.08 (3H, d, 2.8)	2	2, 3	2, 3a, 3b
22 C	18.37	1.59 (3H, s, 1.4)		5, 3a, 3b, 4, 5, 23	5
23 C	22.02	0.85 (3H, d, 6.6)	6	5, 6, 7a, 7b, 22	5, 6, 7a, 7b, 8
24 C	19.67	1.06 (3H, d, 6.6)	8	7a, 7b, 8	5, 7a, 7b, 8
26 C	132.74			11a, 11b, 12, 28, 30	
27 C	128.18	6.95 (1H, d, 8.5)	12, 28	12, 28, 29, 31	28
28 C	116.23	6.68 (1H, d, 8.5)	27	26, 27, 29, 30	27
29 C	157.70			27, 28, 30, 31	
30 C	116.23	6.68 (1H, d, 8.5)	31	26, 28, 29, 31	31
31 C	128.18	6.95 (1H, d, 8.5)	12, 30	12, 27, 29, 30	30
34 C	25.10	3.21 (2H, m)	15	14, 15, 36, 37, 38	15
36 C	110.52			34	
37 C	110.12			15, 34, 39	
38 C	128.58			34, 39, 41, 42	
39 C	119.15	7.54 (1H, d, 7.9)	40	37, 38, 41, 43	40, 41, 42
40 C	120.51	7.00 (1H, dd, 7.5)	39, 41	41, 42	39, 41, 42
41 C	122.84	7.08 (1H, dd, 7.5)	40, 42	38, 39, 40, 42, 43	39, 40, 42
42 C	111.40	7.25 (1H, d, 7.9)	41	38, 40, 41	39, 40, 41
43 C	137.96			39, 41	
45 C	31.66	3.10 (3H, s)		15, 17	
47 C	18.07	0.73 (3H, d, 6.7)	18	17, 18	18, 19

Tabla 2.- Datos de NMR para la jaspamida en CD₃OD.

El espectro de ^{13}C NMR revela la existencia de 36 carbonos en la molécula, de los cuales cuatro son característicos de grupos carbonilo (δ_{C} 170.99, 172.19, 174.91 y 177.85 ppm). También se observan señales correspondientes a un anillo fenólico-p-sustituído (δ_{C} 116.23, 128.18, 132.74 y 157.70 ppm). Las señales de ^{13}C NMR a δ_{C} 110.12 y 110.52 ppm junto con los protones observados en el experimento ^1H NMR a δ_{H} 7.00, 7.08, 7.25 y 7.54 Hz indican la presencia de un grupo indol-2,3-disustituído.

El estudio del HSQC (correlación heteronuclear entre protón y carbono), COSY (correlación homonuclear entre protones vecinales) y TOCSY (correlación homonuclear entre protones dentro de un mismo sistema de spin, útil en la resolución de aminoácidos) revela la existencia de cuatro subestructuras dentro de la molécula. Tres de los fragmentos se corresponden con aminoácidos: alanina, N-metil-2-bromotriptófano y tirosina. La cuarta subestructura es una cadena que contiene cuatro grupos metilo, característico de una unidad de polipropionato. Con el HMBC (correlación heteronuclear entre protones y carbonos a una distancia de 2-3 enlaces) finalmente se establecen las conexiones entre las cuatro unidades, quedando finalmente elucidada la estructura completa, siendo concordante con el ciclodepsipéptido jaspamida ya descrito en estudios anteriores.

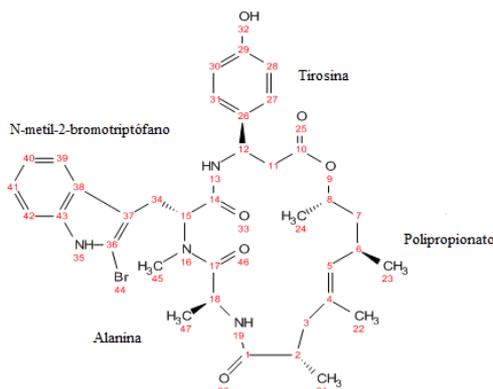


Figura 7.- Estructura de la jaspamida. Se muestra la numeración asignada según la Tabla 2 y la disposición de las cuatro subunidades.

Adicionalmente se comprueba mediante un experimento TOF-MS la concordancia entre el pico base de la muestra ($[\text{M}+\text{H}]^+$: 709.2587) y el de la jaspamida ($\text{C}_{36}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_6\text{Br}$) ya descrito, siendo consistentes los datos obtenidos.

Tras realizar el ensayo de actividad antitumoral en el compuesto ya purificado, se observa que la jaspamida presenta actividad frente a las cuatro líneas celulares ensayadas (Figura 8).

Pos	Compound	Shipment	Dil	External Ref	Aliquot	Assay	Lung-NSCLC		Colon		Breast		Pancreas		
							AS49	HT29	MDA-MB-231	PSN1					
	Batch num			Project			ug/mL	Molar	ug/mL	Molar	ug/mL	Molar	ug/mL	Molar	
	DP1CP/000952														
27	PM021130 (RF0085)	Tomori 06-2012	1:1	ORMA116204/CP01 (Drug Discovery)	DP1/0435265/13	AT-CP 21/06/2013	GI50	1.6E-02	2.25E-08	7.7E-03	1.09E-08	4.3E-02	6.06E-08	1.4E-02	1.97E-08
							TGI	3.5E-02	4.93E-08	1.9E-02	2.68E-08	6.8E-02	9.58E-08	2.4E-02	3.38E-08
							LC50	8.8E-02	1.24E-07	1.1E-01	1.55E-07	1.1E-01	1.55E-07	4.2E-02	5.92E-08

Figura 8.- Ensayo de actividad antitumoral del compuesto puro jaspamida. Se muestran los datos correspondientes a GI50 (Growth Inhibition, 50%), TGI (Total Growth Inhibition) y LC50 (Lethal Concentration, 50%) para cada una de las líneas celulares en $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Molar.

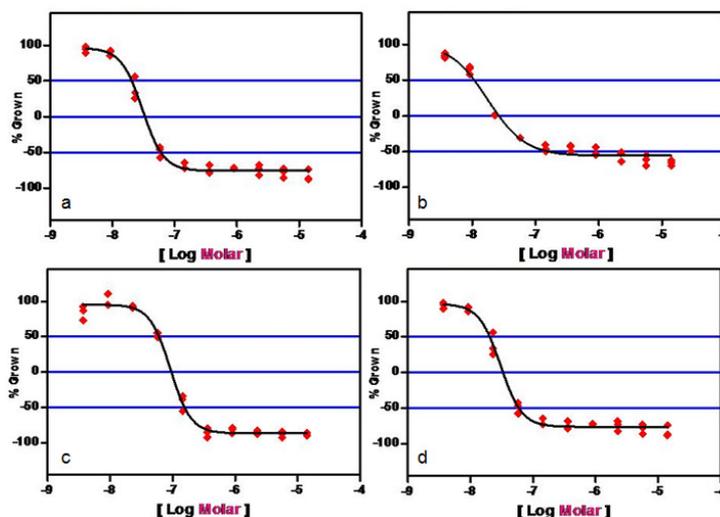


Figura 9.- Curvas dosis-respuesta de jaspamida frente a las líneas celulares ensayadas. a) A549 (pulmón), b) HT29 (colon), c) MDA-MB-231 (mama), d) PSN1 (páncreas).

Como se observa en las curvas dosis-respuesta, el compuesto puro presenta una elevada actividad a bajas concentraciones (Figura 9), especialmente en la línea HT29 de colon. Para un mejor ajuste de las curvas dosis-respuesta se repite el ensayo a una dilución 1:10 (No se muestran los datos). El compuesto puro tiene un efecto citotóxico sobre las líneas celulares ensayadas, ya que se observa un crecimiento negativo en las curvas dosis-respuesta a altas concentraciones.

Conclusiones

El descubrimiento de compuestos marinos con actividad antitumoral es sólo la primera etapa en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. El largo recorrido hasta su comercialización pasa por la superación de estudios preclínicos y clínicos, así como su aprobación por parte de las autoridades regulatorias. Desafortunadamente es muy escasa la proporción de compuestos activos candidatos que consiguen finalizar todas las etapas. Es de esperar que en el futuro, con la llegada de nuevos avances tecnológicos como técnicas de exploración submarina que permitan la recolección de muestras a mayores profundidades, el desarrollo y optimización de nuevas herramientas de análisis, y un mejor conocimiento de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de metabolitos secundarios permitan ampliar el conocimiento de la biodiversidad marina, de la que actualmente sólo se conoce una mínima parte y, en consecuencia, se produzca un aumento significativo en la aparición de nuevas moléculas útiles en el área de oncología.

Agradecimientos

Quiero mostrar mi gratitud a todo el Departamento de Química de Productos Naturales por el trato recibido al haberme acogido como una más del grupo. Y especialmente a mi tutor, Guillermo Tarazona, por haberme enseñado y guiado durante la estancia, más allá del ámbito profesional.

Referencias

1. Nagle, D.G., Zhou, Y., Mora, F., Mohammed, K.A. and Kim, Y. 2004. Mechanism Targeted Discovery of Antitumor Marine Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*. 11:1725-1756.
2. Zheng, L. H., Wang, Y. J., Sheng, J., Wang, F., Zheng, Y., Lin, X. K., Sun, M. 2011. Antitumor peptides from marine organisms. *Marine Drugs*. 9:1840–1859.
3. De la Calle, F. 2009. Marine Genetic Resources. A Source of New Drugs. The Experience of the Biotechnology Sector. *The International Journal of Marine and Coastal Law*. 24(2):209–220.
4. McClintock, J.B. and Baker, B.J. 2001. *Marine Chemical Ecology*. CRC Press, New York.
5. Paul, V.J. 1992. *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Cornell University Press, Ithica.
6. Swearingen, D. C. and Pawlik, J. R. 1998. Marine invertebrate defenses. *Marine Biology*. 131:619-627.
7. Rodríguez González, J. 2003. Mirando a nuestro entorno. Productos naturales de origen marino, una perspectiva en el descubrimiento de nuevos fármacos. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 99(1):5-13.
8. Crews, P., Manes, L.V. and Boehler, M. 1986. Jaspilakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* sp. *Tetrahedron Letters*. 27:2797–2800.
9. Scott, V.R., Boehme, R. and Matthews, T.R. 1988. New class of antifungal agents: Jaspilakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 32:1154–1157.
10. Zabriskie, T.E., Klocke, J.A., Ireland, C.M., Marcus, A.H., Molinski, T.F., Faulkner, D.J., Xu, C. and Clardy, J.C. 1986. Jaspamide, a modified peptide from a *Jaspis* sponge, with insecticidal and antifungal activity. *Journal of the American Chemical Society*. 108:3123–3124.
11. Inman, W. and Crews, P. 1989. Novel marine sponge derived amino acids, conformational analysis of jaspilakinolide. *Journal of the American Chemical Society*. 111:2822–2829.
12. Bubb, M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L. and Korn, E.D. 1994. Jaspilakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *Journal of Biological Chemistry*. 269(21):14869–14871.
13. Vichai V. and Kirtikara K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. 1(3):1112-1116.