

FÁRMACOS DE ORIGEN MARINO

FERNANDO DE LA CALLE

PharmaMar SAU.

Dirección para la correspondencia: Fernando de la Calle. PharmaMar SAU.

Avda. Los Reyes, 1. 28770 Colmenar (Madrid).

Correo electrónico: fdelacalle@pharmamar.com.

RESUM

Els primers éssers vivents van aparèixer al mar fa més de 3.500 milions d'anys i el seu desenvolupament evolutiu ha proveït molts d'aquests organismes amb els mecanismes apropiats per sobreviure, alguns de gran complexitat per a la defensa, l'atac, la senyalització i altres propòsits encara desconeguts, que representen potents armes químiques amb modes d'acció nous per a nosaltres, i obren el potencial per a noves vies de tractament del càncer i altres malalties. Tant des del punt de vista científic i acadèmic, com des del de les indústries farmacèutiques biotecnològiques, ha estat reconeguda aquesta oportunitat i milers de compostos bioactius han estat descoberts, i alguns estan sent provats en assaigs clínics, principalment en oncologia.

La visió clàssica de la biotecnologia marina ha canviat radicalment amb l'arribada de les eines moleculars. En aquests moments el concepte de diversitat biològica està basat en l'enorme univers de les seqüències de DNA, tenint en compte que la majoria de les formes de vida no poden ser cultivades en el laboratori. Això obre la possibilitat d'analitzar tot aquest contingut genòmic com a gens amb potencial per produir compostos farmacèutics innovadors i enzims.

Paraules clau: biotecnologia marina, productes naturals, descobriment de drogues, PKS NRPS, metagenomes.

SEA DRUGS

SUMMARY

The first living organisms appeared in the sea more than 3,500 million years ago and evolutionary development has equipped many marine organisms with the appropriate mechanisms to survive, developing exquisitely complex biological and chemical mechanisms for defence, attack, signalization and other still unknown purposes. These biologi-

cal capabilities are clearly revealed by their ability to biosynthesize and release potent chemical weapons that are active per se. Such novel chemical structures often result in new modes of action and open up the potential of new ways to treat cancer and other diseases. The current scientific, academic and biotech-pharmaceutical industries have recognized this opportunity and thousands of bioactive compounds are being discovered and some of them are being testing in clinical trials, mainly in oncology.

The classical view of marine biotechnology has been radically changed with the advent of molecular tools. Now, the concept of biological diversity is based on an enormous universe of DNA sequences, where the majority of the life forms cannot be cultivated in the laboratory. It opens up the possibility of analyzing all this genomic content as potential genes able to produce innovative pharmaceutical compounds and enzymes.

Key words: marine biotechnology, natural products, drug discovery, PKS NRPS, megagenomes.

INTRODUCCIÓN

La historia de la humanidad está condicionada a la utilización de ciertos productos naturales como remedios para paliar enfermedades. Por citar algunos, la aspirina, la morfina o la penicilina han marcado un antes y un después en expectativas y calidad de vida. Incluso en el ámbito del cáncer, productos como la adriamicina o el paclitaxel (taxol) se emplean a diario como tratamiento de ciertos tumores.

Estos compuestos, junto con otros miles, han sido fruto de la exploración de plantas y microorganismos obtenidos de muestras del suelo como fuentes de potenciales moléculas de aplicación en medicina. Las grandes compañías farmacéuticas han ido posicionándose en estas estrategias de descubrimiento de compuestos durante los últimos setenta años, y han llenado sus carteras de productos con nuevos medicamentos.

El avance del conocimiento científico a escala molecular y celular ha ido variando esas estrategias hacia una búsqueda más competitiva, con el desarrollo de plataformas de alto rendimiento *high throughput screening* y sistemas *in vitro* que permiten cribar miles de compuestos sintéticos en cuestión de horas atendiendo a la baja pro-

babilidad de encontrar sustancias activas. Este cambio de actitud puso en entredicho la obsoleta disciplina de cribar organismos del suelo de forma empírica que tantos éxitos reportó en el pasado. Muchos autores calificaron de «casi exhausto» el arsenal de productos naturales.

Sin embargo, pocas novedades se han reportado en los últimos años en cuanto a nuevos mecanismos de acción en antibióticos, por ejemplo. La combinatoria química, por sí sola, no ha sido capaz de suplir la extraordinaria versatilidad estructural que ofrecen los compuestos naturales. Esas enormes expectativas de modernidad han sucumbido a los hechos (Payne *et al.*, 2007).

Durante los últimos años, la revolución científica surgida de la genómica y la proteómica ha variado sustancialmente el escenario de búsqueda de nuevos medicamentos. Conociendo mejor el ciclo celular se pueden describir reacciones bioquímicas claves para ser modificadas, obteniendo dianas o *targets* específicos en que se reduce enormemente los efectos secundarios. Se diseñan métodos de cribado basados en células, en que se realizan construcciones genóticas y fenotípicas que destacan los efectos sobre dianas celulares específicamente. Se utilizan modelos animales transgénicos de validación de tales dianas que

incrementan las opciones de confirmación de que las moléculas *bioactivas* puedan llegar a convertirse en fármacos. Las técnicas analíticas de determinación estructural permiten la identificación de estructuras atendiendo a su estereoquímica. Los sistemas de simulación virtual entre estructura química y actividad biológica o de acople espacial entre la sustancia y el centro activo de la diana permiten el diseño de estructuras más optimizadas.

Hemos pasado de la búsqueda de nuevos antibióticos que mermaban la población mundial a nuevas necesidades terapéuticas del siglo XXI: cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, obesidad, enfermedades coronarias, antivirales y cáncer.

Aunque los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, su exploración desde el punto de vista de búsqueda de nuevos compuestos químicos apenas se ha iniciado, y se conocen en la actualidad «únicamente» unos quince mil productos naturales de origen marino, una décima parte de los terrestres. La revisión del grupo neozelandés liderado por M. Munro (Blunt *et al.*, 2007) recopila las nuevas moléculas aisladas de organismos marinos. Este potencial se basa en que los océanos abarcan el 70 % de la extensión del globo y su diversidad biológica el 95 % de la biosfera. Un dato muy interesante aportado por el National Cancer Institute es que el porcentaje de extractos activos de origen marino es muy superior al terrestre.

A pesar de su reciente exploración, ya hay productos naturales marinos que han mostrado actividad en la mayoría de las dianas celulares y moleculares. La evolución ha definido y seleccionado diversas estrategias de supervivencia, defensa, ataque y comunicación entre organismos marinos que componen un verdadero arsenal de diversas moléculas (metabolitos) que podemos emplear en salud humana.

Si observamos dos esponjas compitiendo

por un sustrato de fijación, o el empleo de defensas químicas en seres inmóviles para no ser depredados, nos daremos cuenta de que la estrategia evolutiva las ha dotado de sustancias capaces de detener el crecimiento de los rivales y ello puede aplicarse al cáncer, donde la división celular juega un papel determinante. Sin duda, es en el área del cáncer donde el arsenal metabólico marino juega el papel más determinante, pero no es el único. La supervivencia a grandes profundidades conlleva estructuras capaces de resistir más de cien atmósferas de presión conservando su capacidad vital, como el caso de ciertas esponjas y gorgonias, y podemos utilizar esos biomateriales en trasplantes óseos por su exquisita resistividad y flexibilidad. Las neurotoxinas de dinoflagelados y moluscos juegan un papel determinante como venenos paralizantes de vertebrados y hoy en día ya se han comercializados ciertos péptidos de origen marino para el tratamiento del dolor.

Existe un extenso listado de medicamentos de origen marino en fases clínicas a punto de ser comercializados. Uno de los principales retos está en diseñar sistemas de producción a escala industrial de sustancias que se encuentran en partes por millón en las muestras biológicas estudiadas. La biotecnología marina tiene mucho que aportar al respecto cuando la síntesis química no es eficiente. Ya tenemos varios ejemplos con compuestos encontrados inicialmente en esponjas, tunicados o briozoos, incluso en bacterias marinas de difícil industrialización.

El futuro de las medicinas marinas debe venir del empleo de técnicas moleculares o genómicas y celulares, de la robótica y de la bioinformática. Los avances en biología molecular de la última década han pulverizado el concepto clásico de biodiversidad marina, entendida hasta ahora como mera clasificación de especies atendiendo a morfología. Se calculan en 3×10^{28} el número

de formas de vida microscópicas existentes globalmente en océanos; para que lo entendamos, ello supone que hay cien millones de veces más microorganismos que estrellas en el universo visible. Pero el reto está en como poder cultivarlos en el laboratorio, pues más del 99 % de ellos sólo se conocen por técnicas moleculares (Zengler *et al.*, 2006). Además, estos organismos unicelulares son máquinas de expresar genes. Algunos de estos productos de expresión son los llamados metabolitos secundarios, que han sido seleccionados durante millones de años de evolución para ser útiles como defensa o ataque de depredadores. Por otro lado, la extremada promiscuidad (entendida como mezcla confusa o indiferente) de los microorganismos marinos para intercambiar genes está rompiendo el paradigma de relacionar taxonomía con diversidad metabólica.

Además de lo anterior, los recientes progresos en el conocimiento de genes encargados de producir metabolitos secundarios como péptidos o poliquétidos (llamados *clusters* génicos NRPS y PKS) (Donadio *et al.*, 2007) sólo han conseguido demostrar su funcionalidad en microorganismos. Si a esto le añadimos el gran contenido de simbioses marinos (microorganismos que viven en estrecha relación con invertebrados marinos) se abren eficaces vías de estudio para identificar nuevas moléculas con actividad en salud humana, además de atribuir a estos «invisibles» habitantes marinos la propiedad de producción de *biocompuestos*,

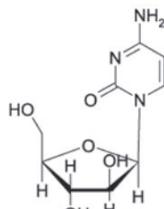


FIGURA 1. Esponja *Cryptotethya crypta* y estructura química de Ara-C (arabinosilcitosina).

que hasta ahora sólo se achacaban a invertebrados. A modo de ejemplo, una esponja marina puede contener más de un millón de genes bacterianos capaces de producir sustancias tóxicas.

Finalmente, gracias a técnicas de microbiología molecular, sistemas de alta rapidez en secuenciación de DNA y con métodos de predicción secuencia nucleótido-enzima-metabolito, es posible plantearse nuevos retos de cribado basados en la exploración de millones y millones de genes aunque no sea posible cultivar a sus dueños. Es la llamada *era de los metagenomas*.

En conclusión, ese universo de moléculas pequeñas, pero de extremada sutileza estructural, encontradas en muestras marinas, forman un armamento tan fascinante que no es de extrañar que sean calificadas como las medicinas del futuro. Pero la mejor noticia es que la comunidad científica sólo ha explorado la punta del iceberg del potencial existente en la biodiversidad marina. Seguro que lo mejor está por llegar.

FÁRMACOS DE ORIGEN MARINO

Historia de la exploración de recursos marinos en salud humana

No es muy frecuente encontrar referencias en etnofarmacología sobre medicamentos de origen marino, aunque desde hace miles de años se hayan empleado ungüentos, brebajes y cataplasmas de algas y lodos marinos para un sinnúmero de dolencias (desparasitación intestinal, regulaciones hormonales, efectos antiinflamatorios o antibióticos, tratamientos de estados anímicos, etc).

Algunas fórmulas, como el Noni, bebida elaborada a partir de extractos de algas y fruta fermentada, empleada para afecciones varias en archipiélagos del Pacífico o

las algas marinas *limu*, *kelp* y *wakame*, que la medicina tradicional china y nipona considera tónicos revitalizantes, aún se pueden encontrar en tiendas especializadas. Plinio el Viejo describió en su *Naturalis Historia* la utilización de una absenta marina (*Seriphum*) en el Antiguo Egipto para alteraciones gastrointestinales.

En 1900 se comercializó el primer producto marino *sensu stricto*, el ácido kaínico, obtenido de extractos de algas pardas y empleado como insecticida y antihelmíntico. Pero no fue hasta cincuenta años más tarde cuando empezaron a identificarse los primeros fármacos encontrados en esponjas y microorganismos marinos.

La AZT (zidovudina), que marcó un hito en la lucha contra el sida, fue inspirado a partir de los nucleósidos *espongouridina*, también conocida como Ara-C y *espongotimidina* o Ara-A, antivirales aislados de la esponja *Cryptotethya cripta* (véase la figura 1). También sirvió como molde para desarrollar análogos para el tratamiento de leucemias (Scheuer, 1996).

También a mediados de los años cincuenta, se descubrió la *cefalosporina C* a partir de un microorganismo marino, el hongo *Cephalosporium*, que actualmente sigue siendo muy utilizado como antibiótico. En 1966 se publicó otro antibiótico, la *pentabromopseudilina*, producido por una bacteria aislada del mar.

Otro hecho significativo de aquella época fue el descubrimiento en grandes cantidades de *prostaglandinas* en el coral *Plexauria homomalla*. Estos compuestos son importantes mediadores en afecciones inflamatorias, fiebre y dolor, e incluso están descritos como anticonceptivos; se descubrieron en semen de carnero, y de ahí su nombre, al ser provenientes de líquidos prostáticos.

Desde entonces hasta nuestros días, se han descrito más de quince mil compuestos marinos; aunque la mayoría tienen su aplicación en el área del cáncer, es de destacar

la reciente aprobación por parte de la FDA del Prialt (ziconotida), péptido neuroparalizante con aplicación en anestesia y que debe ser empleado a dosis mucho más bajas que la morfina. Fue aislado inicialmente del molusco *Conus magnus* (Olivera *et al.*, 1985). De crustáceos planctónicos (*neptune krill oil*) una empresa canadiense está comprobando sus efectos en fase clínica II como atenuantes del ciclo menstrual. Otros metabolitos obtenidos de esponjas y corales están siendo probados como antiinflamatorios. Incluso el fármaco *GTS21* de un gusano nemertino está mostrando potencialidad en el tratamiento del Alzheimer y la esquizofrenia.

En julio de 2007, la agencia europea de medicamentos EMEA emitió el visto bueno para la futura comercialización de *Yondelis* (trabectedina o ET-743), convirtiéndose así en el primer compuesto natural marino aprobado para el tratamiento del cáncer.

Proceso de descubrimiento de fármacos (*drug discovery*)

La mortalidad a causa de enfermedades infecciosas a principio del siglo XX, como gripe, neumonías, tuberculosis y gastroenteritis, ha dejado de ser el gran reto de la medicina actual; ahora las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las afecciones neurodegenerativas, los moduladores del sistema inmunitario y los nuevos tratamientos frente a cepas resistentes a antibióticos conllevan un nuevo mercado global farmacéutico que mueve quinientos mil millones de euros al año.

Frente a tales enfermedades, se están seleccionando dianas moleculares específicas para basar los ensayos de búsqueda de actividades biológicas. Sin embargo, una vez encontradas moléculas que puedan interactuar con ellas selectivamente, es necesario aplicar tecnologías de optimización quí-

mica e innovadores formas de aplicación o *drug delivery* para hacer frente a los efectos tóxicos que conllevan. El objetivo de la I+D actual es doble: ser más eficaces y reducir los efectos colaterales que conllevan las terapias basadas en sustancias tóxicas.

Las tres cuestiones que subyacen a la hora de diseñar este proceso son:

a) *¿Qué queremos encontrar y cómo vamos a hacerlo?*

b) *¿De qué muestras partimos?*

c) *¿Qué tipo de información vamos a obtener del cribado?, ¿cómo podemos encontrar la sustancia responsable de la actividad y cómo la podemos convertir en fármaco?*

Esta aproximación tan simplista se complica atendiendo a varios factores, entre ellos la disponibilidad económica existente, el grado de automatización, la probabilidad de éxito que auguremos, el estado de la técnica existente, el tiempo empleado en el desarrollo, etc. El esquema general más simplificado queda reflejado en la figura 2.

Este esquema se complica atendiendo al área antiinfectiva, antitumoral, antiviral o al empleo de la genómica en la búsqueda de actividades enzimáticas.

Paul Ehrlich (Drews, 2000) postuló en 1957 que ciertos quimiorreceptores en bacterias, parásitos y células cancerosas podrían ser explotados terapéuticamente. El primer paso del diseño del cribado (*screening*) es la *selección de la diana (target) adecuada*. Puede ser a nivel de célula o de estructura molecular, normalmente proteica (receptor o enzima).

Una vez identificada dicha reacción, es necesario *validarlo*. Este concepto conlleva dos objetivos: que la diana sea lo más específica posible (máxima actividad en células tumorales y no en sanas, o actividad frente a microorganismos resistentes a determinados antibióticos e inocuos al resto de células) y que pueda ser indicio de éxito en las pruebas de eficacia que se realizarán en sistemas animales o tejidos como paso previo a su aplicación en el paciente final.

El segundo paso es el diseño del proceso propiamente definido como *cribado*, que permita el procesado de muestras de forma rápida y certera. La evolución en sistemas de placa Microtiter ha pasado de las ancestrales placas de Petri a las actuales Microtiter de 96, 384 o 1.536 pocillos, y permite el desarrollo de plataformas de alto rendimiento (HTS) o sistemas automatizados. Los tipos de cribado los dividiremos en celulares, moleculares y virtuales (*in silico*).

La función de dicho cribado puede ser triple:

- Seleccionar muestras iniciales de interés.

- Servir como referencia en el proceso de purificación del compuesto activo (*bioensayo*).

Aportar datos suficientemente específicos y concisos que permitan aumentar el éxito en la conversión de la sustancia activa o *hit* al producto de uso industrial o *lead*.

Normalmente, se definen cribados pri-

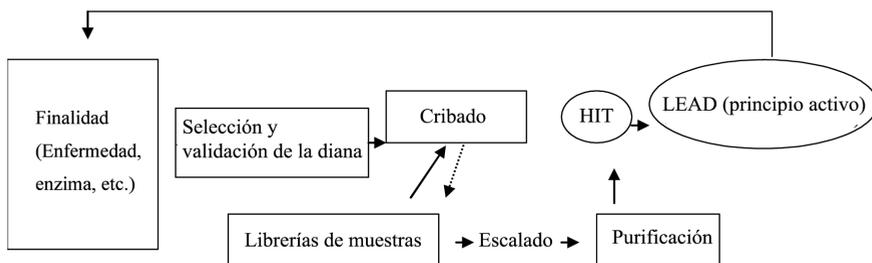


FIGURA 2. Proceso general de descubrimiento de fármacos (*drug discovery*).

marios, como aquellos que se utilizan para seleccionar poblaciones de interés, que suelen estar basados en el empleo de células. En el cribado secundario, habitualmente mucho más específico, el objetivo básico es el estudio de la especificidad del modo de acción.

Una vez seleccionadas las muestras activas por cribado primario, comenzará el aislamiento del compuesto responsable de actividad mediante el empleo de técnicas analíticas, hasta llegar a la elucidación estructural. Cada paso de purificación (fracciones) será guiado por la actividad, en lo que se conoce como *bioensayo*.

Si la estructura responsable de la actividad permite su desarrollo al aportar estructura química novedosa, potencia (medida habitualmente como molar) interesante y específica y posibilidad real de suministro a escala industrial (por fermentación directa del productor o indirecta por clonaje y expresión heteróloga o síntesis química), comenzarán los estudios de síntesis química, dirigida o combinatorial, para encontrar la mejor variante atendiendo a su formulación, estabilidad, actividad o solubilidad. Es lo que se conoce como *optimización del lead* o de *hit a lead*.

Respecto a la definición de *muestras* y en el caso concreto de organismos marinos, podemos agruparlas en tres grandes grupos:

- Invertebrados y algas marinas.
- Microorganismos cultivables (bacterias, hongos, fotosintéticos unicelulares).
- DNA medioambiental o metagenomas.

Este proceso conlleva grandes inversiones de recursos económicos, humanos y tecnológicos. La figura 3 resume los tiempos medios empleados y las probabilidades de éxito del descubrimiento de fármacos.

Moléculas bioactivas marinas frente a dianas actuales

Como se ha comentado anteriormente, los avances en biología molecular y celular junto con plataformas robotizadas y perfeccionamiento en análisis estructural junto con modelos espaciales de unión entre moléculas y centros activos de enzimas claves, han revitalizado el descubrimiento de fármacos de productos naturales marinos (PNM).

Existe un largo listado de PNM de novedosas estructuras activas sobre dianas específicas (Nagle *et al.*, 2004).

La mayoría de las aplicaciones tiene que ver con la oncología. Repasaremos las familias más relevantes en ensayos clínicos en el siguiente apartado. Fuera del área de cáncer destacan las siguientes familias de metabolitos con aplicación en salud humana:

Conotoxinas (ziconotida, MVIIA o Prialt).

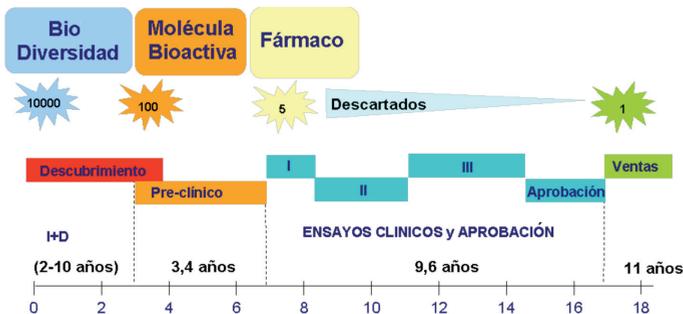


FIGURA 3. Tiempos de desarrollo medio desde el inicio del descubrimiento de fármacos hasta la comercialización.

nascidia turbinata (véase la figura 6) y en la actualidad producido por semisíntesis a partir de un metabolito microbiano (Cuevas *et al.*, 2000). La figura 7 muestra la similitud estructural entre el metabolito microbiano *safracina B*, producido por fermentación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* A2-2, y la ecteinascidina ET-743.

Desarrollado por PharmaMar, recibió en julio de 2007 el visto bueno de la EMEA para su comercialización en Europa para sarcomas de tejido blando, y actualmente está llevándose a cabo un estudio en fase III para su aplicación en cáncer de ovario junto con la compañía norteamericana Johnson & Johnson PRD. El tunicado marino productor puede localizarse muy extendido por aguas del Mediterráneo (Formentera, Mallorca, Túnez) y del Caribe. Durante los primeros años de exploración en fases clínicas, PharmaMar llevó a cabo cultivos marinos de la ascidia para la extracción y obtención del producto. (Carballo *et al.*, 2000). Por otro lado, Yondelis está designado como *medicamento huérfano* (*orphan drug*) en sarcomas de tejido blando (STS) y ovario en la UE y los EEUU.

Este compuesto se une al surco menor del DNA interfiriendo en los procesos de división celular, de transcripción genética y en los sistemas de reparación del ácido nucleico.

Recientemente, científicos de PharmaMar han publicado la existencia de un simbiote, aunque no se ha conseguido todavía relacionarlo con la biosíntesis.

Como se verá más adelante, la extraor-

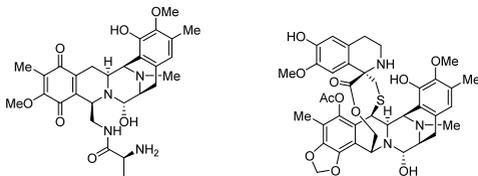


FIGURA 7. Similitud estructural entre la safracina B y ET-743. La primera se utiliza como material de partida de la actual ruta de fabricación de Yondelis.

dinaria similitud estructural de este compuesto con estructuras bacterianas como safracinas o saframincinas así lo sugieren.

Didemninas (*deshidrodidemmina B*, *aplidina* o *Aplidin*). Familia de péptidos cíclicos aislados de tunicados. La didemmina B fue aislada de la ascidia *Trididemnum solidum* y fue el primer fármaco marino en entrar en fases clínicas, aunque fue paralizada su aplicación en fase II debido a la alta toxicidad (Vries y Beart, 1995). Como en el caso anterior, fueron científicos de PharmaMar, junto con K. L. Rinehart, de la Universidad de Illinois, quienes aislaron la deshidrodidemmina B (*aplidina* o *Aplidin*) de otra ascidia, *Aplidium albicans* (véase la figura 8) en aguas del Mediterráneo. Esta ascidia vive a más de 50 m de profundidad.

Aplidin se encuentra en fase II frente a tumores sólidos y hematológicos, sólo y en combinación con otros agentes, y su mecanismo de acción está basado en la inducción rápida y persistente de la apoptosis, inhibe la secreción del factor 1 de crecimiento del endotelio vascular VEGF1 y bloquea el ciclo celular. Le fue concedido el estatus de medicamento huérfano frente a leucemia linfoblástica y mieloma múltiple por las autoridades regulatorias europeas en la UE y los EEUU en 2003 y 2004, respectivamente. Su producción se realiza por síntesis química total.

Kahaladidos (*kahaladido F* o *KF*). El kahaladido F (KF) es la estructura más estudiada dentro de la familia de los kahaladidos. Como en los dos casos anteriores, PharmaMar posee la exclusividad de desarrollo. Su pro-

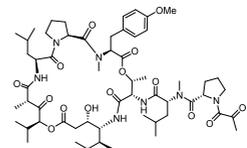
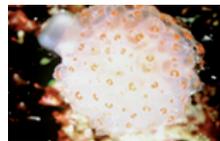


FIGURA 8. Tunicado *Aplidium albicans* y estructura de Aplidin.

ducción industrial está prevista realizarla por síntesis química. Este compuesto de naturaleza peptídica con cadenas de ácidos grasos fue descubierto por el profesor Scheuer, de la Universidad de Hawaii en la bahía de Kahala, de ahí su nombre. Los kahaladidos se aislaron del extracto de un molusco marino, *Elysia rufescens* (véase la figura 9), aunque años más tarde también se aisló KF del alga *Bryopsis* sp., que forma parte de la dieta del nudibranquio. En 2005, M. Hamman, de Universidad de Misisipí y R. Hill, de la Universidad de Maryland (WO2005/042720) patentaron la producción bacteriana de KF. Se trata de dos especies de *Vibrio*, bacteria muy habitual en los mares.

KF se encuentra en ensayos clínicos de fase II para carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y melanoma. También se está evaluando para el tratamiento de psoriasis severa.

Su mecanismo de acción apunta a la alteración de las membranas lisosomáticas e induce la muerte celular mediante oncosis. Se ha comprobado que la actividad antitumoral es independiente de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) y del estado de la p53.

Briostatinas (Briostatina 1). Las briostatinas son lactonas macrocíclicas aisladas originariamente del briozoo *Bugula neritina* (véase la figura 10). Este organismo es muy abundante en todos los océanos y, como veremos más adelante, se ha intentado su cultivo en

condiciones controladas. Sin embargo, es muy probable que el verdadero productor sea una bacteria simbiote y pueda en un futuro ser fermentada. La briostatina 1 está siendo desarrollada en ensayos clínicos en fase II por el NCI en licencia con Bristol-Myers. Parece que no es efectiva sin combinación, lo que hace que se valore su efecto sinérgico con taxol para la aplicación en cáncer de pulmón, mama y ovario (Wang *et al.*, 1998). Este compuesto se une con gran afinidad a la proteína C quinasa, lo que se traduce en efectos antitumorales e inmunostimulantes.

Dolastatinas (dolastatina 10). Péptidos aislados de la liebre marina o nudibranquio *Dollabela auriculata*, que producen una inhibición de la polimerización de los microtúbulos, lo que se traduce en la inhibición de la división celular y la apoptosis posterior. La dolastatina 10 está siendo probada en ensayos en fase II en combinación con vinblastina, e incluso se ha probado con briostatina 1. Sus posibles aplicaciones futuras serían para tumores de mama, próstata y colon.

Hay investigadores que atribuyen su biosíntesis a cianobacterias asociadas (Harrigan y Gotees, 2002).

Discodermólidos. Macrólidos aislados de la esponja caribeña *Discodermia dissoluta* (Gunasekera *et al.*, 1990), con mecanismo de acción muy similar a las dolastatinas, presentan actividad incluso en células tumorales resistentes a taxol y epotilonas. Están

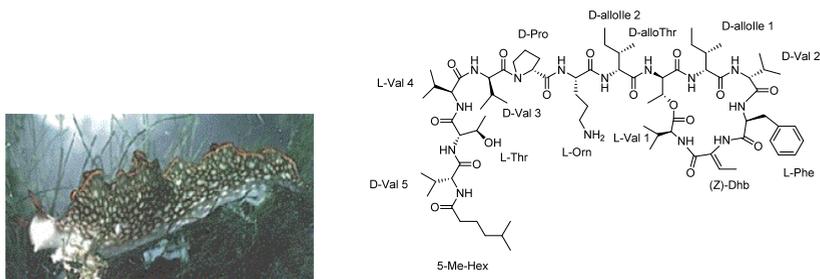


FIGURA 9. Nudibranquio *Elysia rufescens* y estructura del kahaladido F.

siendo ensayados en combinación con taxol en fase I. Novartis ha conseguido publicar su síntesis química en treinta y nueve pasos.

Aminoesteroles de tiburón (escualamina y Neovastat). Estas sustancias han sido extraídas del cartílago de tiburón (Moore *et al.*, 1993), sobre todo de especies de *Squalus acanthus*, muy común en las costas este de los EEUU. Sus mecanismos de acción se basan en efectos antiangiogénicos o inhibidores de la formación de capilares sanguíneos que irrigan los tumores.

Halicondrinas (halicondrina E7389). De varias esponjas del océano Índico y preferentemente de la esponja de grandes profundidades neocelandesa, *Lyssodendoryx* sp. y de la más extendida *Halichondria okadai*, pueden obtenerse halicondrinas, siendo la más activa la isohomohalicondrina B (Litaudon *et al.*, 1994) y la halicondrina B. Su enorme potencial radica en las actividades antitumorales inferiores al nanomolar. Debido a la escasa productividad de dichas esponjas y después de varios intentos fallidos de cultivo de *Lyssodendoryx* en condiciones controladas, se consiguió la síntesis química del fragmento más activo de la halicondrina B, y dicho compuesto, E7389, se encuentra actualmente en ensayos clínicos al demostrar producir arresto del ciclo celular en G2/M debido a su efecto sobre el citoesqueleto (microtúbulos).

Salinosporamidas (salinosporamida A). Comenzó su desarrollo en ensayos clínicos en 2006 por la compañía norteamericana Neureus Pharmaceuticals, liderada científica-

mente por William Fenical. Este compuesto fue aislado de los caldos de fermentación de un nuevo grupo de actinomicetos marinos, conocido como *Salinospora* (Fenical y Jensen, 2006). Estos microorganismos se encuentran en grandes profundidades y están revolucionando el concepto de diversidad química asociada a nuevos géneros en bacterias.

Las salinosporamidas, obtenidas de este nuevo grupo taxonómico, presentan inhibición específica sobre proteasoma (Groll *et al.*, 2006) y presentaron prometedores resultados en preclínica frente a cáncer de colon, mama y pulmón no microcítico.

Fármacos de grandes profundidades

Actualmente, la necesidad de exploración a grandes profundidades supone un importante reto tecnológico, ya que es posible que la diversidad química que pueda encontrarse presente la ventaja de la adaptación bioquímica a grandes presiones.

El cuadro 1 resume los productos marinos de aplicación en salud humana obtenido por medios diferentes al buceo clásico, cuya limitación fisiológica sitúa la bioprospección hasta 40-60 metros.

Es de destacar la lección de bioingeniería y su posible aplicación en ingeniería ósea que obtenemos de las estructuras calcáreas de ciertos corales (*Keratoisis* e *Isidella*), en que científicos alemanes (Ehrlich *et al.*, 2003) están examinando la enorme flexibilidad y, a la vez, dureza, que confieren una proteínas llamadas *gorgoninas*, que se sitúan en ángulos precisos de las estructuras calcáreas de



FIGURA 10. Briozoo *Bugula neritina* y estructura de la briostatina I.

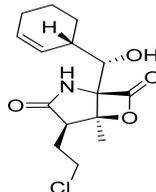
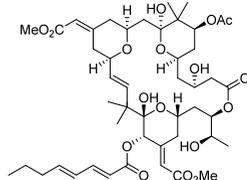


FIGURA 11. Estructura química de la salinosporamida A.

CUADRO 1. Productos marinos de aplicación en salud humana

Compuesto	Aplicación	Fuente	Profundidad	Localización	Comentario
Isohomo Halicondrina B	Cáncer	Esponja <i>Lyssodendoryx</i>	> 100m	Nueva Zelanda	Véase 2.4
Discodermólido	Cáncer	Esponja <i>D. dissoluta</i>	140 m	Bahamas	Véase 2.4
Dictiostatina 1	Cáncer	Esponja no identificada Fam. <i>Corallistadae</i>	442 m	Jamaica	Toxicidad similar a taxol
Sarcodictina	Cáncer	Coral <i>Sarcodictyon roseum</i>	100 m	Mediterráneo	Toxicidad similar a taxol
Salinosporamida A	Cáncer	Bacteria <i>Salinospora tropica</i>	> 1.000 m	Pacífico norte	Véase 2.4
Topsentina	Antiinflamatorio Alzheimer	Esponja <i>Spongosporites ruetzeri</i>	300-600 m	Bahamas	Desarrollo pre-clínico iniciado
Gorgoninas	Implantes óseos	Corales, fam. <i>Isididae</i>	> 1.000 m	Pacífico norte	Bioingeniería

dichos corales que viven a más de 1.000 m de profundidad.

Aplicación de la biotecnología en productos naturales marinos (PNM)

Como se ha indicado anteriormente, el empleo de herramientas moleculares no sólo ha revolucionado el concepto de biodiversidad marina, sino que puede suponer un nuevo enfoque en la búsqueda de nuevas medicinas.

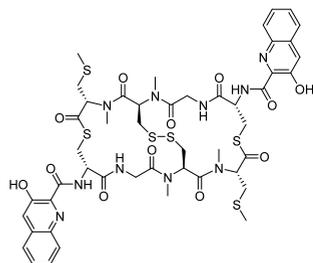


FIGURA 12. Caldo de fermentación de *Micromonospora marina* y tiocoralina, depsipéptido obtenido por expresión heteróloga en varias especies de *Streptomyces* industriales mediante ingeniería molecular del cluster NRPS responsable de la biosíntesis.

Los análisis de la riqueza cuantitativa y cualitativa microbiana asociados a muestras marinas (y terrestres) revelan que la ciencia sólo es capaz de cultivar en laboratorio menos del 1 % del total de formas vivas que se encuentran allí (Kellenberger, 2001).

El conocimiento molecular de los genes responsables de la biosíntesis de metabolitos secundarios, especialmente relacionados con péptidos (*non ribosomal peptide synthetases*, o NRPS) y macrólidos policétidos (*poliketide synthetases* o PKS) y la posibilidad de silenciarlos o combinar distintos módulos para alterar estructuras definidas suponen un salto significativo en el actual descubrimiento de drogas a partir de productos marinos. Un ejemplo práctico del empleo de la biotecnología aplicada a solventar el problema que supone el diseño de la producción industrial de estos PNM ha sido publicado por investigadores de PharmaMar en colaboración con científicos de la Universidad de León (Lombó *et al.*, 2006): la producción heteróloga del antitumoral marino *tiocoralina* (véase la figura 12).

Este depsipéptido, perteneciente a la fa-

milia de las equinomicinas y los antibióticos quinoxalínicos, fue aislado del actinomiceto marino *Micromonospora marina* que, a su vez, fue aislado de un molusco en costas mozambiqueñas. Debido a la necesidad de cultivo en agua de mar de la bacteria productora, su posible industrialización se llevará a cabo mediante la expresión de los genes responsables en otro actinomiceto de carácter más industrial, como son especies de *Streptomyces*.

Este mismo grupo de investigadores de PharmaMar también publicó la caracterización, *knock-out* y expresión heteróloga de los genes relacionados con la biosíntesis de la safracina B que, como se indicó anteriormente, es la fuente de partida de la fabricación de Yondelis (Velasco *et al.*, 2005).

En los EEUU, y gracias al grupo de M. Haygood, se identificó un simbiote en *Bugula neritina* de cuyo extracto se aísla la briostanina 1, descrita anteriormente. Este interesante compuesto podrá ser igualmente obtenido en cantidades industriales gracias al descubrimiento del material genómico de *Candidatus endobugula sertula*, simbiote que lleva las secuencias nucleótidas del PKS responsable de la biosíntesis de tal compuesto (Davidson *et al.*, 2001). Ello demuestra el gran potencial de las herramientas moleculares en las investigaciones sobre simbioses marinas, cada vez con mayor relevancia como posibles productores de compuestos marinos que se creían producidos por esponjas, tunicados y otros invertebrados (Woyke *et al.*, 2006).

Hay una enorme biodiversidad microbiana asociada a muestras marinas, y las formas procariotas llegan a suponer hasta el 60 % del peso de algunas esponjas. Esta microflora, detectada por tecnologías moleculares, apenas puede ser estudiada empleando conceptos clásicos de microbiología, ya que la inmensa mayoría de microbios no pueden ser llevados en condiciones

de cultivos puros al laboratorio (Taylor *et al.*, 2007).

Ante estas enormes expectativas, surge el concepto de *metagenomas*, con multitud de aplicaciones y que, en un futuro cercano, será el centro de la investigación marina en productos naturales. Esta tecnología se basa en la exploración de genes del DNA sin necesidad de cultivar a sus «dueños». Básicamente, se trata de:

a) Recolectar muestras medioambientales como unos pocos gramos de esponjas, sedimentos marinos o agua de mar.

b) Concentrar y limpiar el DNA que allí se encuentre.

c) Cortarlo mediante enzimas de restricción a tamaños adecuados. Los tamaños vendrán determinados por el vector, siendo desde 5 kb hasta más de 100 kb en el caso de los cromosomas bacterianos artificiales (BAC).

d) Insertarlo en vectores de clonaje, como fósmidos, cósmidos, BAC, etc.

e) Transformar bacterias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, etc.) o levaduras (*Pischia pastoris*) mediante la inclusión del vector con la porción de DNA medioambiental a explorar. Podemos estar hablando de miles o millones de clones, dependiendo de la cantidad de DNA que se encuentre en la muestra.

f) Cribado o búsqueda de clones activos. Esto puede realizarse de varias formas atendiendo al fin que se persiga:

– Cribado de secuencias de interés: Mediante hibridación con secuencias homólogas de búsqueda.

– Cribado por actividades. Ello implica la expresión del gen o los genes en los microorganismos transformados. Utilizado en la búsqueda de actividades enzimáticas o antimicrobianas, al poder rastrear miles de clones a la vez sobre medios de cultivo con el sustrato o germen problema y detectar los productos producidos por las porciones del DNA clonado.

— Cribado por *trampa genética* o *sustrato inducido* (Ferrer *et al.*, 2005). Esta tecnología se basa en la detección de clones de interés por cambios del fenotipo (morfología) de los clones. Estos cambios (son las llamadas *blue colonies*) se producen cuando el gen externo clonado expresa algún producto que sirva como inducción de operones (tipo *lacZ*) que produzcan esas variaciones.

g) Seleccionar el clon o clones de interés y secuenciar el fragmento que ha dado actividad para conocer la secuencia entera y poder utilizarla industrialmente.

El desarrollo de la metagenómica marina ya está dando sus frutos en el descubrimiento de nuevas o mejoradas actividades enzimáticas y está comenzando a utilizarse en la búsqueda de metabolitos novedosos (DeLong, 2005).

En conclusión, la bioprospección marina está reportando multitud de pequeñas moléculas que pueden ser aplicadas en la salud humana. Entre los quince mil metabolitos marinos conocidos, una treintena de ellos está siendo probado en fases clínicas, principalmente en oncología, y algunos ya han sido aprobados para su comercialización. Diversas estrategias biotecnológicas han resuelto el complicado reto de conseguir un suministro recurrente de algunos de estos metabolitos, que se encuentran en cantidades ínfimas en invertebrados marinos. Sin embargo, gracias a la aplicación de nuevas herramientas moleculares que nos están mostrando que la biodiversidad marina va más allá de lo imaginable, al conocimiento de rutas bioquímicas relacionadas con ciclos celulares y biosíntesis de metabolitos secundarios, y a innovadoras estrategias de exploración como la metagenómica, podemos esperar en el futuro cercano un incremento significativo de nuevas e innovadoras moléculas.

BIBLIOGRAFÍA

- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W.; MUNRO, M. G.; NORTHCOLE, P. T.; PRINSEP, M. R. (2007). «Marine Natural Products». *Nat. Prod. Rev.*, 24: 81-86.
- CARBALLO, J. L.; NARANJO, S.; KUKURTCU, B.; CALLE, F. DE LA (2000). «Production of *Ecteinascidia turbinata* for obtaining antitumor compounds». *Journal of the World Aquaculture Society.*, 31: 481-491.
- CUEVAS, C.; PÉREZ, M.; MARTÍN, M. J.; CHICHARRO, J. L.; FERNÁNDEZ-RIVAS, C.; FLORES, M.; FRANCESCH, A.; GALLEGO, P.; ZARZUELO, M.; CALLE, F. DE LA; GARCÍA, J.; POLANCO, C.; RODRÍGUEZ, I.; MANZANARES, I. (2000). «Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafraicin B». *Org. Lett.*, 2: 2545-2548.
- DAVIDSON, S. K.; ALLEN, S. W.; LIM, G. E.; ANDERSON, C. M.; HAYGOOD, M. G. (2001). «Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont candidate *Endobugula sertula* of the Bryozoan *Bugula neritina*». *Applied and Environmental Microbiology* (octubre): 4531-4537.
- DELONG, E. (2005). «Microbial community genomics in the ocean». *Nature Reviews* (juny) 3: 459-469.
- DONADIO, S.; MONCARDINI, P.; SOSIO, M. (2007). «Polyketide synthetases and non ribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics». *Nat. Prod. Rev.*, DOI: 10.1039/b514050c.
- DREWS, J. (2000). «Drug discovery: a historical perspective». *Science*, 287: 1960-1964.
- EHRlich, H.; ETNOYER, P.; MEISSNER, H.; HANKE, T.; BORN, R.; SCHARNWEBER, D.; WORCH. (2003). «Nanoimage and biomimetic potential of same Isididae corals». *Erlanger Geol. Abh.*, 4: 34.
- FENICAL, W.; JENSEN P. R. (2006). «Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria». *Nature chemical biology*, 2: 666-673.
- FERRER, M.; MARTÍNEZ-ABARCA, F.; GOLYSHIN, P. (2005). «Mining genomes and metagenomes for novel catalysts». *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 588-593.
- GROLL, M.; HUBER, R.; POTTS, B. C. (2006). «Crystal structure of salinosporamide A (NPI-0052) and B (NPI-0047) in complex with the 20S proteasome reveal important consequences of beta-lactone ring opening and a mechanism for irreversible binding». *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 5136-5141.
- GUNASEKERA, S. P.; GUNASEKERA, M.; LONGLEY, R. E.; SCHULTE, G. K. (1990). «Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissolute*». *J. Org. Chem.*, 55: 4912-4915.
- HARRIGAN, G.; GOETZ, G. (2002). «Symbiotic and dietary marine microalgae as source of bioactive mole-

- cules: experience from natural products research». *Journal of Applied Phycology*, 14: 103-108.
- KELLENBERGER, E. (2001). «Exploring the unknown: the silent revolution of microbiology». *EMBO Rep.*, 2: 5-7.
- LITAUDON, M.; HART, J. B.; BLUNT, J.; LAKE, R. J.; MUNRO, M. H. G. (1994). «Alkaloids from the Antarctic sponge *Kirkpatrickia varialosa*. Part 2: Variolin A and N(3')-methyl tetrahydrovariolin B». *Tetrahedron letters*, 35: 943.
- LOMBÓ, F.; VELASCO, A.; CASTRO, A.; CALLE, F. DE LA; BRAÑA, A. F.; SANCHEZ-PUELLES, J. M.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. (2006). «Deciphering the biosynthesis pathway of the antitumor thiocoraline from a marine Actinomycete and Its expression in two *Streptomyces* species». *ChemBioChem*, 7: 366-378.
- NAGLE, D. G.; ZHOU, Y.; MORA, F.; MOHAMMED, K. A.; KIM, Y. (2004). «Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products». *Current Medicinal Chemistry*, 11: 1725-1756.
- OLIVERA, B. M.; GRAY, W. R.; ZEIKUS, R.; MCINTOSH, J. M.; VARGA, J.; REVER, J.; DE SANTOS, W.; CRUZ, L. J.; (1985). «Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails». *Science*, 230: 1338-1343.
- PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO, D. (2007). «Antibacterial discovery. Drugs for bad bugs». *Nature Reviews. DrugDiscovery*, 16: 29-40.
- ROUHI, A. M. (1995). «Supply issues complicate trek of chemicals from the sea». *C&EN* (20 de novembre): 42-44.
- SCHEUER, P. J. (1996). «Marine metabolites as drug leads-retrospect and prospect: in biochemical aspects of marine pharmacology». A: LAZAROVIVI, P.; SPIRA, M. E.; ZLOTKIN, E. [ed.]. Fort Collins: Alaken: 1-12.
- TAYLOR, M. W.; RADAX, R.; STEGER, D.; WAGNER, M. (2007). «Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology and biotechnological potential». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (juny): 295-347.
- VELASCO, A.; ACEBO, P.; GOMEZ, A.; SCHLEISSNER, C.; RODRÍGUEZ, P.; APARICIO, T.; CONDE, S.; MUÑOZ, R.; CALLE, F. DE LA; GARCÍA, J. L.; SANCHEZ-PUELLES, J. M. (2005). «Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *Pseudomonas fluorescens* A2-2: Designing new cytotoxic compounds». *Mol. Microbiol.*, 56: 144-154.
- VRIES, D. J. DE; BEART, P. M. (1995). «Fishing for drugs from the sea: status and strategies». *TiPS*, 16: 275-279.
- WANG, S.; GUO, C. Y.; CASTILLO, A.; DENT, P.; GRANT, S. (1998). «Effect of bryostatin 1 on taxol-induced apoptosis and cytotoxicity in human leukemia cells». *Biochem. Pharmacol.*, 56: 635.
- WOYKE, T.; TEELING, H.; IVANOVA, N. N.; HUNTEMAN, M.; RICHTER, M.; GLOECKER, F. O.; BOFFELLI, D.; DUBILIER, N. (2006). «Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium». *Nature*, DOI: 10.1038/nature05192.
- ZENGLER, K.; TOLEDO, G.; RAPPÉ, M.; ELKINS, J.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; KELLER, M. (2002). «Culturing the uncultured». *PNAS*, 99: 15681-15689.