

De *Jaspis* sp. a la jaspamida: ciclodepsipéptido, antitumoral y herramienta farmacológica

Una historia de ida a la clínica y vuelta al laboratorio.

From *Jaspis* sp. to jaspamide: cyclodepsipeptide, antitumoral and pharmacological tool

A story of going to clinics and back to laboratory.

De *Jaspis* sp. á xaspamida: ciclodepsipéptido, antitumoral e ferramenta farmacológica

Unha historia de ida á clínica e volta ó laboratorio.



Paloma Fernández López
Febrero, 2016



De *Jaspis* sp. a la jaspamida: ciclodepsipéptido, antitumoral y herramienta farmacológica. Una historia de ida a la clínica y vuelta al laboratorio.

From *Jaspis* sp. to jaspamide: cyclodepsipeptide, antitumoral and pharmacological tool. A story of going to clinics and back to laboratory.

De *Jaspis* sp. á xaspamida: ciclodepsipéptido, antitumoral e ferramenta farmacolóxica. Unha historia de ida á clínica e volta ó laboratorio.

Un trabajo realizado por Paloma Fernández López.

Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.

En colaboración con PharmaMar S.A.

Guillermo Tarazona Ramos en calidad de tutor de este trabajo autoriza su presentación ante el Tribunal Evaluador.

Colmenar Viejo, 26 de febrero de 2016

Firma:

TRABAJO FIN DE MÁSTER

D. Manuel Becerra Fernández, como tutor académico de la alumna **Dña. Paloma Fernández López**, estudiante del Máster en Biotecnología Avanzada, autoriza la presentación del Trabajo de Fin de Máster: *De Jaspis sp. a la jaspamida: ciclodepsipéptido, antitumoral y herramienta farmacológica*, para su defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 1 de Julio de 2016



Fdo.: Manuel Becerra Fernández

CONTENIDO

ABREVIATURAS	4
1. RESUMEN.....	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 La Biotecnología Marina.....	6
2.2 El cáncer: algunos datos	7
2.3 La naturaleza: una fuente inagotable de nuevas estructuras.....	9
2.4 PharmaMar como biofarmacéutica	10
3. OBJETIVOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1 Recolección de la muestra animal	12
4.2 Extracción de los compuestos de la muestra	12
4.3 Fraccionamiento mediante VLC-RP	13
4.4 Análisis mediante HPLC-MS.....	13
4.5 Aislamiento y purificación del compuesto por HPLC	13
4.6 Determinación de la masa exacta de compuestos por UPLC-HRTOFMS	14
4.7 RMN.....	14
4.8 Ensayo de actividad citotóxica en células tumorales	14
4.9 Herramientas informáticas: Nist NS Search.....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
5.1 Extracción y fraccionamientos del total de compuestos obtenidos del organismo	16
5.2 Aislamiento y purificación del compuesto activo	17
5.3 Elucidación estructural del compuesto aislado	22
5.4 Bioanálisis de la jaspamida	32
5.5 Mecanismo de acción y aplicaciones de la jaspamida/jasplakinolida	33
6. CONCLUSIONES	38
7. AGRADECIMIENTOS	39
8. BIBLIOGRAFÍA.....	41
9. ANEXOS.....	43

ABREVIATURAS

Ala	Alanina
brd	broad doblete
CD	Cluster of Differentiation
CME	Concentración Máxima Eficaz
CMT	Concentración Mínima Tóxica
d	doblete
dd	doble doblete
ddd	doble doblete
DO	Densidad Óptica
ES	Electrospray
FAK	Focal Adhesion Kinase
gCOSY	gradient COrrrelation SpectroscopY
gHMBC	gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHSQC	gradient Heteronuclear Single Quantum COrrrelation
GI50	Growth Inhibition, 50%
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRTOFMS	High Resolution Time-Of-Flight Mass Spectrometry
LC50	Lethal Concentration, 50%
m	multiplete
MS	Mass Spectrometry
PN	Productos Naturales
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP	Reverse Phase
s	singulete
TFA	Trifluoroacético
TGI	Total Growth Inhibition
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UPLC	Ultra Performance Liquid
UV	Ultravioleta
VLC	Vacuum Liquid Chromatography

1. RESUMEN

El cáncer es a día de hoy una de las causas de muerte más frecuentes en el mundo. Es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos que sean cada vez más eficaces y seguros para tratarlo. Por otro lado, el fondo marino es un ambiente con una gran biodiversidad, donde los organismos que lo habitan han desarrollado múltiples estructuras químicas capaces de interaccionar con los biopolímeros humanos e inducir respuestas. De esta forma, a partir de una muestra de *Jaspis* sp. cuyo extracto mostró actividad antitumoral, se aísla y purifica el compuesto responsable de la citotoxicidad. Se lleva a cabo un estudio de elucidación estructural con el que se concluye que se trata de la jaspamida, un antitumoral muy eficaz (GI50 nM) capaz de unirse a la actina e inducir la formación de agregados de F-actina en el citosol, lo que en las células desemboca en apoptosis. Sin embargo, la relación entre la CME y la CMT es ínfima, haciendo de éste un fármaco poco seguro para el tratamiento en humanos. No obstante, debido a su capacidad de inducir la polimerización de la actina, la jaspamida es a día de hoy un compuesto de uso rutinario en el estudio de múltiples procesos relacionados con el citoesqueleto.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 La Biotecnología Marina

La definición más clásica de la Biotecnología la define como “la integración de Ciencias Naturales e Ingeniería para llevar a cabo la aplicación de organismos, células, partes de las mismas y análogos moleculares en productos y servicios” (FEB: federación europea de biotecnología, 1989). Hoy en día, esta definición se ha expandido hasta sus propios límites, haciendo de ésta un área dónde no sólo caben los procesos que suceden en el interior de un biorreactor, sino también el desarrollo de nuevos organismos vivos, tanto unicelulares como pluricelulares, con nuevas características introducidas en sus genes y que aportan un servicio a la sociedad o al medioambiente. De esta forma, la biotecnología se consolida como un campo multidisciplinar, integrado por ramas desde la Ingeniería Química hasta la Biomedicina.

La Biotecnología se clasifica, según el área en el que se incluyan sus servicios o fuentes, en cuatro colores:

- Roja o Biotecnología Clínica. Incluye el desarrollo de nuevos fármacos, anticuerpos monoclonales, terapia génica...
- Verde o Biotecnología Agraria y Alimentaria. En esta se inscriben los biopesticidas, biofitosanitarios, plantas modificadas genéticamente, obtención de energía a partir de fuentes biológicas, biorremediación...
- Blanca o Biotecnología Industrial. La principal diferencia con respecto a la industria química sería el uso de los biocatalizadores para la consecución de los correspondientes objetivos, ya sean enzimas o células enteras.
- Azul o Biotecnología Marina/Acuática. Servicios destinados a preservar la biodiversidad en las aguas, disminuir su contaminación, etc.

La última rama mencionada es quizás una de las áreas con mayor potencial a desarrollar. Los fondos marinos son regiones aún por conocer para el ser humano. Su gran diversidad, tanto en cuanto a seres vivos como a microambientes, lo convierte en un entorno lleno de posibilidades para nuevos descubrimientos. Sin embargo, estudiar esta gran diversidad requiere un gran esfuerzo, material y económico. En medicina, este tipo de tecnología está en el punto de mira, puesto que puede brindar multitud de nuevos compuestos terapéuticos si se dispone de los métodos adecuados de aislamiento y screening.

2.2 El cáncer: algunos datos.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el pasado 2012 murieron más de 8,2 millones de personas en todo el mundo a causa del cáncer, y otros 14 millones de casos nuevos han sido diagnosticados. Más del 70% de estas muertes se han producido en países de África, Asia, América Central y Sudamérica. En hombres, los tipos de cáncer más frecuentes son pulmón, hígado o próstata, mientras que en mujeres se encuentran el de mama, estómago y colon.

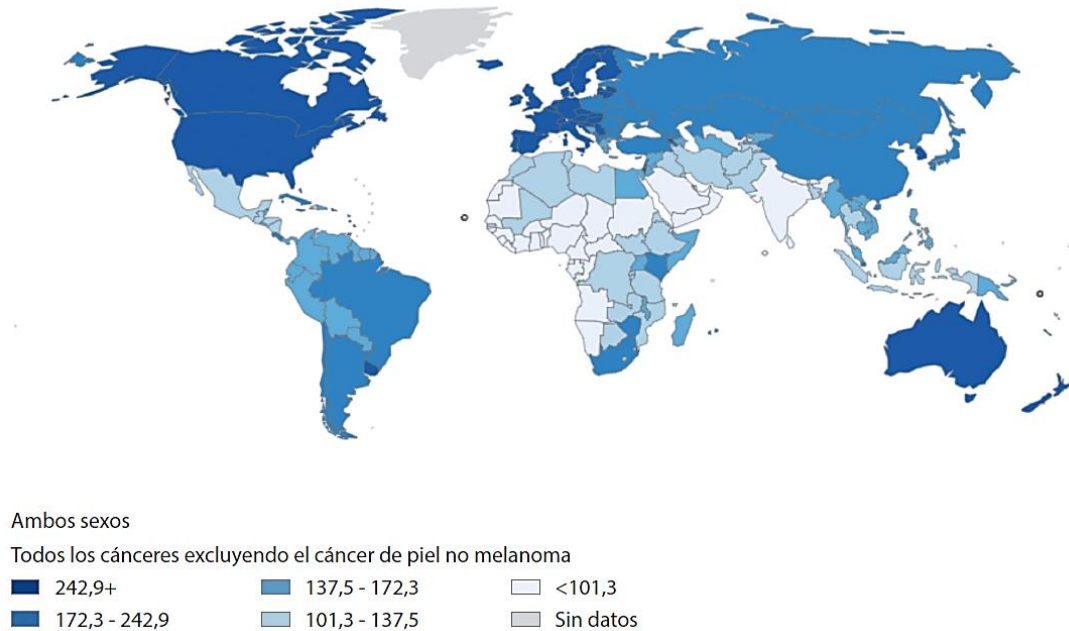


Figura 1. Tasas de incidencia relativa de cáncer en el mundo (%), ajustadas por edad. (Imagen extraída de la SEOM, Sociedad Española de Oncología Médica)

El cáncer comienza su desarrollo debido a una desregulación mitótica en una célula de cualquier tejido, multiplicándose indefinidamente. Para que una célula se divida, deben activarse genes que induzcan la entrada en el proceso de mitosis, los denominados *protooncogenes*; un ejemplo sería la proteína RAS, de la vías de las MAPK. Sin embargo, existen mecanismos de control que evitan que este proceso se produzca con regularidad cuando una célula entra en división: los denominados *genes supresores de tumores*, como es el caso de pRb, la proteína del retinoblastoma. Además, una única mutación en alguno de estos genes no es suficiente, sino que se requieren entre 3 y 7 mutaciones en el DNA de células que sean capaces de dividirse, de forma que la célula tumoral adquiriera características ventajosas para evadir los mecanismos de homeostasis celular. De esta

forma, la célula adquiriría una velocidad de crecimiento más alta y una mayor longevidad (Hanahan *et al.*, 2011, Jorde *et al.*, 2011).

Un desequilibrio entre los genes supresores y los protooncogenes - que inhibiese a los supresores o sobreactivase a los protooncogenes - sería suficiente para desencadenar una neoplasia, pero no un cáncer. Para expresar un fenotipo maligno, la célula transformada debe ser capaz de salir del tejido en el que se encuentra e invadir otros adyacentes o más alejados, dando lugar al proceso de metástasis (Hanahan *et al.*, 2011). El sistema inmunológico posee células capaces de destruir estas células tumorales, como son los linfocitos T citotóxicos o las células Natural Killer, pero suele suceder que una de las competencias adquiridas es la capacidad de “hacerse invisibles” para el sistema inmune. Además, una célula tumoral puede aprovecharse de determinados mecanismos inmunológicos, como es la inflamación, para favorecer un microambiente en el que desarrollarse (Janeway *et al.*, 2005).

A pesar de que todos los cambios que suceden a nivel nuclear para favorecer el origen y progreso de un cáncer tienen un componente hereditario, el factor ambiental es sumamente relevante para que se produzcan las mutaciones pertinentes y favorecer su microambiente de crecimiento y progresión tumoral. Así, como remarca la OMS, el tabaco es la causa del 20% de los cánceres diagnosticados a nivel mundial. Además, podrían llegar a evitarse hasta un 30% si la población general modificase muchos de sus hábitos, como la disminución del consumo de alcohol, practicar deporte o mejoras en la dieta. En países en desarrollo, infecciones crónicas por el Virus de la Hepatitis B o C o el Virus del Papiloma Humano son responsables de un 20% de las muertes por cáncer.

Asimismo, la OMS prevé que los casos de cáncer aumentarán de 14 millones a 22 en las próximas décadas. Los tipos de cáncer de mayor impacto en la salud pública son el de mama, cuello de útero y colon, y podrían evitarse con la detección precoz. Para disminuir la frecuencia de esta enfermedad se requiere de grandes esfuerzos por parte de la comunidad científica. Comprender mejor los mecanismos moleculares más profundos de la enfermedad, cómo intervienen los factores ambientales y genéticos en su desarrollo, el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevas terapias que expongan a la persona a una menor toxicidad son las principales metas de la investigación antitumoral. Y, por suerte, cada día nos encontramos un poco más cerca.

2.3 La naturaleza: una fuente inagotable de nuevas estructuras

Existe una gran necesidad de seguir desarrollando nuevos fármacos, compuestos que sean capaces de unirse a macromoléculas humanas y restauren su homeostasis. Antiguamente, los PNs eran origen de muchos fármacos, sin embargo planteaban una serie de problemas, como su forma de estudio lenta y laboriosa, la dificultad de su suministro limitaba su cantidad, menor actividad una vez aislado el compuesto debido a la presencia de sinergias en los extractos o presencia de falsos positivos (Jiménez *et al.*, 2013).

De esta forma, en la década de los 90, la Química Combinatoria con el HTS y la Bioinformática con los estudios de docking habían tomado las riendas del diseño de fármacos, ya que el impulso de la biología molecular incrementó el número de potenciales dianas, reduciendo el tiempo de desarrollo de fármacos (Koehn *et al.*, 2009). Sin embargo, esta metodología no cumplió las expectativas y la década pasada disminuyó casi la mitad la media de nuevas entidades químicas comercializadas con actividad farmacológica (Jiménez *et al.*, 2013; Atanasov *et al.*, 2015). ¿A qué se debe este efecto en el mercado si se ha simplificado el proceso de descubrimiento?

Las bibliotecas formadas construidas a base de Química Combinatoria están formadas por moléculas que simplifiquen su posterior síntesis, con una alta flexibilidad, lo que resultará en menor actividad específica. Sin embargo, la insuperable diversidad estructural de los PNs ofrece una mayor probabilidad de encontrar ligandos capaces de unirse a biomoléculas. Para las moléculas orgánicas *pequeñas* (<1000 Da) hay virtualmente un número infinito de posibles estructuras moleculares. Además, las nuevas tecnologías (cromatografía de afinidad, HPLC-MS, bases de datos computacionales y las respectivas herramientas de búsqueda apropiadas) son capaces de superar los cuellos de botella del proceso de Drug Discovery de PN (Koehn *et al.*, 2009). Además, características básicas de un fármaco para la optimización de su farmacocinética y farmacodinámica - como una masa molecular <600 Da, el coeficiente de reparto en agua/n-octanol, un adecuado número de donadores/aceptores de puentes de hidrógeno o bajo número de enlaces con capacidad de rotación, las denominadas Reglas de Lipinski - están ampliamente representadas en las bibliotecas de PNs (Koehn *et al.*, 2009).

Además de la diversidad estructural, los PNs también poseen especificidad bioquímica. Los PNs son capaces de asociarse con biopolímeros, ya que han sido

sintetizados o modificados por proteínas – biopolímeros en sí mismos -, lo que implica ya a priori una interacción enzima-sustrato, y son el resultado de un largo proceso evolutivo de perfeccionamiento. La gran efectividad que poseen los PNs para interactuar con proteínas humanas, a pesar de que hayan sido biosintetizados por organismos muy diferentes, radica en que nuestro genoma es similar al de muchos otros, quizás no en secuencia, pero sí en los dominios proteicos que codifica. Esto se debe a que, aunque la divergencia evolutiva es causa de variabilidad, la selección natural ha perfeccionado funcionalmente determinados tipos de dominios, los cuáles se mantienen conservados evolutivamente. Del mismo modo, el metabolismo energético también es muy similar tanto en organismos unicelulares como pluricelulares (Jiménez *et al.*, 2013).

Investigaciones han demostrado que compuestos procedentes del fondo marino poseen características bioactivas, como antitumorales, antimicrotúbulos, antiproliferativas, antibióticas... Los organismos marinos han tenido que optimizar sus sistemas fisiológicos y bioquímicos a través de la evolución para poder adaptarse, pues la presión selectiva es muy elevada. De esta forma, las especies que sobreviven en los ambientes marinos han desarrollado estrategias de adaptación muy refinadas, como es el desarrollo de sustancias químicas para defenderse de la depredación, o incluso desviar rutas metabólicas, de forma que incluso metabolitos secundarios posean alguna característica que les dote de ventaja evolutiva. Este es el caso de los péptidos o depsipéptidos bioactivos, como la Aplidina, con potencial anticancerígeno, extraídos de diversos animales marinos, como tunicados, esponjas o corales, y que sus mecanismos de acción son tan diversos como lo es su propia estructura (Zheng *et al.*, 2011, Suárez-Jiménez *et al.*, 2012).

2.4 PharmaMar como biofarmacéutica

Aunando el potencial farmacológico de los fondos marinos con la necesidad de encontrar nuevas estrategias de tratamiento para el cáncer, y empleando como medio la Biotecnología, surgió PharmaMar en 1986. Zeltia ya estaba interesada por los PNs desde sus principios, en 1939. Zeltia fue creciendo, cuando en 1980 decide centrar su inversión en estrategias de I+D. Así, 10 años después de fundar PharmaMar, esta misma compañía comienza el desarrollo de Yondelis®, nombre comercial de la trabectedina, cuestión que completó en once años, cuando se logró su aprobación. PharmaMar continuó su crecimiento, desarrollando en los últimos años otros dos compuestos: la Aplidina y Lurbinedina, ambos superando la fase III de ensayos clínicos. A finales del 2015, se

produjo una fusión inversa entre PharmaMar y Zeltia, convirtiendo a la primera en la matriz de las demás empresas del grupo.

La trabectedina ha sido la respuesta para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos, afección sin tratamiento eficaz hasta el momento, además de también ser efectivo contra el cáncer de ovario. Años más tarde ha seguido demostrando su eficacia, siendo PharmaMar a día de hoy la primera compañía española en contar con la aprobación de la Agencia de Alimentos y Medicamentos, o FDA, por sus siglas en inglés.

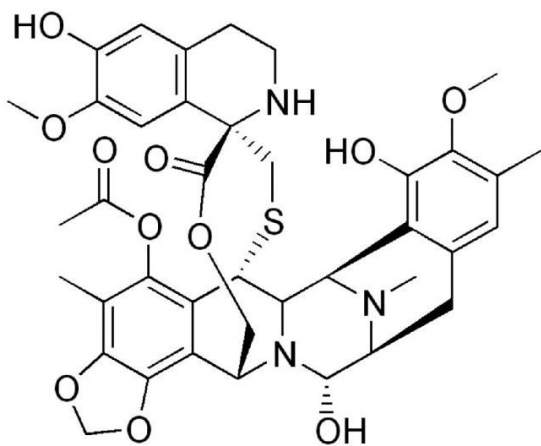


Figura 2. Imagen de la izquierda: representación de la trabectedina, principio activo de Yondelis®, producido por PharmaMar. Imagen de la derecha: representación del tunicado del que se extrae la trabectedina, *Ecteinascidia turbinata*. (Imagen extraída de archivo.panorama.it/)

3. OBJETIVOS

El cáncer se constituye como un problema de salud a nivel global. El fondo marino ofrece una gran diversidad de estructuras con potencial de interacción con los biopolímeros de los mamíferos. De esta forma, a partir de un fragmento de un organismo que ha dado resultado positivo en un screening previo, se pretende llevar a cabo un extracto del mismo seguido de diferentes procesos de fraccionamiento y selección, concentrando así la actividad antitumoral y alcanzando el mayor grado de pureza posible. Por otro lado, se identificará el compuesto responsable de la actividad observada a través del estudio de su estructura. Por último, la aportación de un nuevo fármaco anticancerígeno a la biblioteca de compuestos de PharmaMar enriquecerá y facilitará futuros procesos de aislamiento y purificación por parte de la compañía.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recolección de la muestra animal

La muestra de la esponja de procedencia, *Jaspis sp.* (Figura 3), fue recolectada en Tomori (Indonesia). La técnica de buceo que se empleó fue la de *Rebreather P*. El organismo fue identificado en el Departamento de Colección, donde se recibieron 156 g de muestra, 136 g de los cuales fueron remitidos al Departamento de Química de Productos Naturales.

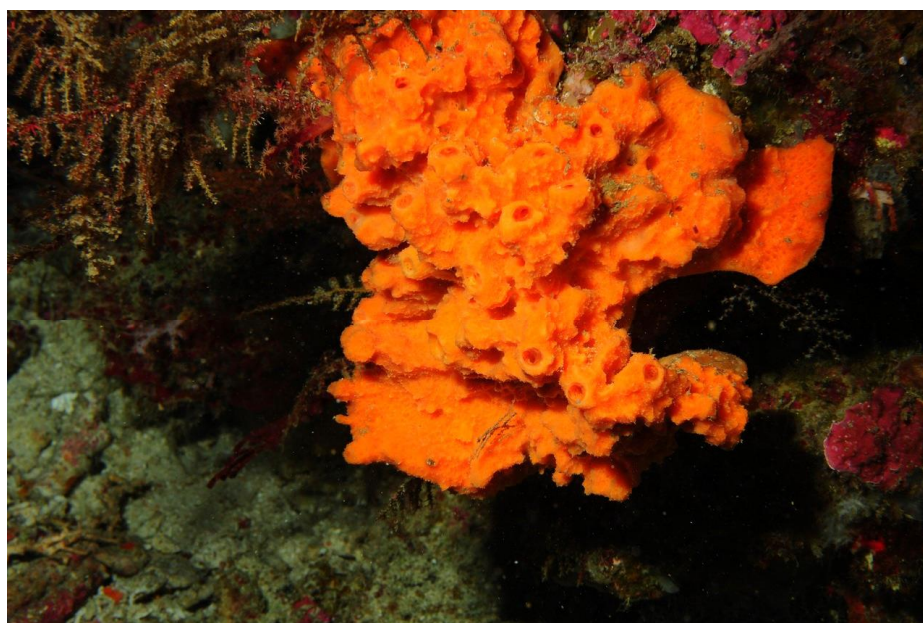


Figura 3. Fotografía subacuática de un ejemplar de *Jaspis sp.*, tomada en el mismo lugar donde se recogió (Tomori, Indonesia).

4.2 Extracción de los compuestos de la muestra

El fragmento obtenido es troceado y puesto en agitación con 400 mL de una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 durante 30 min. Se reposa 20 min, se filtra a vacío y se evapora el disolvente. Se repite la operación dos veces más, obteniéndose así la *fracción orgánica*.

Se realiza otra extracción en un único paso, con 400 mL de H_2O para obtener la *fracción acuosa*.

4.3 Fraccionamiento mediante VLC-RP

Se lleva a cabo por cromatografía en columna de sílica modificada (RP18) en placa abierta de vidrio con un diámetro de 6 cm y 4 cm de altura. La fase móvil consta de un gradiente discontinuo de disolventes, de mayor a menor polaridad, formado por diferentes proporciones de H₂O/CH₃OH/DCM (*Apartado 5.1, Tabla 1*). Se evapora el disolvente de cada fracción para obtener el peso seco.

4.4 Análisis mediante HPLC-MS

El experimento se realiza en fase reversa en columna Symmetry C18 (3.5 μ m, 4.6 x 150 mm), empleando H₂O/CH₃CN con TFA 0.04% para la fase móvil. El experimento se llevó a cabo en un gradiente compuesto (5 min al 5% de CH₃CN + 0.04% TFA – del 5% al 100% de CH₃CN + 0.04% TFA en 30 min – 5 min al 100% de CH₃CN + 0.04% TFA). Para referenciar los tiempos de retención, se emplea cafeína como patrón externo.

La lámpara UV se configura para la emisión a 215 y 254 nm. También se llevan a cabo espectros de absorbancia entre 190 y 600 nm de todos los picos eluidos del HPLC.

La salida del HPLC se encuentra acoplada a un equipo de MS. El método de entrada es un ES. El espectrómetro empleado es un equipo Agilent 1100 Series de baja resolución. Se usa en modo positivo, con una corriente de 150 V en el fragmentador.

4.5 Aislamiento y purificación del compuesto por HPLC

La muestra se prepara en 1 mL de CH₃OH y se centrifuga a V_{max} , de modo que precipiten los restos de sílice y otros fragmentos de gran tamaño que puedan atascar la columna. Se emplean insertos de 250 μ L en los viales, con el fin de aplicar la máxima cantidad de muestra.

Se inyectan 50 μ L/ciclo, hasta agotar el volumen de la muestra. La separación se lleva a cabo en fase reversa en columna XBridge C18 (5 μ m, 10 x 150 mm) con fase móvil compuesta por H₂O/CH₃CN + 0.04% TFA. El método empleado se compone de un gradiente de 3 min al 20% de CH₃CN + 0.04% TFA – incremento del 20% al 100% de CH₃CN + 0.04% TFA en 17 min – 3 min al 100% CH₃CN + 0.04% TFA.

4.6 Determinación de la masa exacta de compuestos por UPLC-HRTOFMS

Se llevan a cabo experimentos de espectrometría de masas en equipos de tipo TOF (Time Of Flight) de alta resolución acoplados a otro equipo de UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) Agilent 1290 Infinity como método de entrada. El método empleado es 1 min al 5% de CH₃CN + 0.04% TFA – del 5 al 100% de CH₃CN + 0.04% TFA en 9 min 30 s – 3 min al 100% de CH₃CN + 0.04% TFA.

El espectrómetro es un Agilent 6230. El método de ionización es ES, en modo ion positivo. El fragmentador se configura a 200 V.

4.7 RMN

La muestra a analizar se disuelve en metanol deuterado 99.8%. El equipo de ¹H-RMN es un Unity Inova de Variant, con un imán de Oxford AS500 de 500 MHz y de 125 MHz en ¹³C-RMN. Se llevan a cabo diferentes experimentos de RMN, tanto monodimensionales como bidimensionales: ¹H-RMN, ¹³C-RMN, gCOSY, gHSQC y gHMBC. Los espectros se referencian usando el metanol de la disolución (δ_H 3.31 ppm y δ_C 49.0 ppm).

4.8 Ensayo de actividad citotóxica en células tumorales

Se lleva a cabo un análisis de citotoxicidad con 0.15 mg de cada fracción generada en los pasos anteriores empleando el ensayo colorimétrico basado en el marcaje con sulforrodamina (Vichai *et al.*, 2006). Se tratan con los compuestos las líneas tumorales A549 (adenocarcinoma de células del epitelio basal alveolar del pulmón), HT29 (adenocarcinoma de células epiteliales del recto/colon), MDA-MB-231 (células de adenocarcinoma de mama) y PSN1 (células de adenocarcinoma de páncreas), tipos frecuentes de cáncer y que todavía no poseen un tratamiento efectivo. Este ensayo es llevado a cabo por el Departamento de Screening.

El compuesto se disuelve en DMSO (10 mg/mL) y se realizan diluciones. Las células se incuban con el compuesto en una placa de 96 pocillos, a una densidad celular de 1.9×10^4 células/pocillo. Tras ello, se fijan con 100 μ L ácido tricloroacético 10% (p/v) y se incuban a 4°C, 1h. Se llevan a cabo cuatro lavados con agua y se retira el agua sobrante hasta que queden secas. Tras ello, se añaden 100 μ L de sulforrodamina al 0.057% (p/v) y se dejan teñir durante 30 min a temperatura ambiente. Se llevan a cabo cuatro lavados con

ácido acético 1% (v/v) para retirar el marcaje no unido. Se añaden 200 µL de Tris 10 mM, pH 10.5 y se agitan 5 min para solubilizar el marcaje unido a las proteínas. Se determina la DO a 510 nm y se realizan los siguientes cálculos:

$$\% \text{ crecimiento del control} = \frac{OD \text{ media}_{muestra} - OD \text{ media}_0}{OD \text{ media}_{control} - OD \text{ media}_0}$$

$$\% \text{ inhibición crecimiento} = 100 - \% \text{ del crecimiento del control}$$

$$\% \text{ células muertas} = 100 - \frac{OD \text{ media}_{muestra}}{OD \text{ media}_0} \times 100$$

4.9 Herramientas informáticas: Nist NS Search

Los espectros de HPLC-MS son comparados con la base de datos de la compañía en busca de coincidencias, de forma que si algún compuesto desreplica con la base de datos, el proceso de estudio de la muestra cesa y se cierra el caso, decisión favorable tanto temporal como económicamente. Para ello, se emplea el motor de búsqueda Nist NS Search, el cual busca picos comunes en los espectros de masas y les otorga un *score*. De este modo, asigna en función de la probabilidad posibles compuestos que puedan corresponder con las señales que se observan en el espectro de la muestra de estudio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción y fraccionamientos del total de compuestos obtenidos del organismo

Se obtuvieron dos extractos diferentes tras emplear la metodología desarrollada en el *Apartado 4.2*. El peso seco de la fracción orgánica fue de 5.0 g; el obtenido de la fase acuosa, 0.3 g.

Nótese que debido a la naturaleza de los fármacos en lo que a polaridad se refiere, la fracción orgánica suele ser la responsable de la actividad de la muestra, siendo inactiva la acuosa. Por esta razón, se selecciona para ser trabajada, según lo descrito en el *apartado 4.3*. Esto se lleva a cabo previo ensayo de citotoxicidad, esperando a obtener los resultados de dicho fraccionamiento para comenzar, de forma que se estudien todas al mismo tiempo.

Se elige un fraccionamiento sólido-líquido para la fase orgánica debido a que el presente peso seco es inferior a 10 g. Tras llevar a cabo la cromatografía descrita en el *Apartado 4.3*, se obtuvieron 7 fracciones (*Tabla 1*). Todas ellas se secan y se envían al Departamento de Screening para el ensayo de actividad (*Apartado 4.6*) junto con las obtenidas en el apartado anterior.

Tabla 1. Gradiente de disolventes empleados en el fraccionamiento de la fase orgánica. Se muestra el peso seco eluido en cada paso.

FRACCIÓN	ELUYENTE	VOLUMEN	PESO
RP1	H ₂ O	100 mL	2.95 g
RP2	H ₂ O/CH ₃ OH 3:1	100 mL	1.46 g
RP3	H ₂ O/CH ₃ OH 1:1	100 mL	154.0 mg
RP4	H ₂ O/CH ₃ OH 1:3	100 mL	56.4 mg
RP5	CH ₃ OH	300 mL	68.7 mg
RP6	CH ₃ OH/CH ₂ Cl ₂ 1:1	300 mL	199.5 mg
RP7	CH ₂ Cl ₂	250 mL	41.5 mg

Estos resultados fueron enviados al Departamento de Screening y fueron analizados a través de la cuantificación de la inhibición del crecimiento celular, marcando para ello las proteínas celulares con sulforrodamina. Los resultados obtenidos se presentan en la *Tabla 2*. Cómo se puede observar, la fase acuosa no presenta actividad citotóxica, acorde con la suposición anterior.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de actividad citotóxica de las fracciones cuantificada por el método del marcaje con sulforrodamina. Las líneas celulares enfrentadas a las distintas diluciones del fármaco se muestran en la parte derecha de la tabla. Los resultados se expresan en *tanto por ciento* respecto a un control. Las concentraciones del fármaco se expresan en µg/mL.

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	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/A001	Jaspis		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	DMEM	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001	Jaspis		-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/REP001	Jaspis		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/REP002	Jaspis		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/REP003	Jaspis		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/REP004	Jaspis	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/REP005	Jaspis	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/REP006	Jaspis		-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/REP007	Jaspis		75.7	84.9	99.2	88.5	94.2	96.7	96.4	94.4	100.8	78.7	90.1	97.1

El software indica automáticamente qué muestra/s cumple/n los criterios de actividad. En este caso, son las RP4-5 las que poseen dicha característica, siendo esta última especialmente activa incluso a menor concentración. Las cuatro líneas presentan sensibilidad a las fracciones activas altamente similar entre sí.

5.2 Aislamiento y purificación del compuesto activo

Se analizan por HPLC-MS, según las especificaciones del *Apartado 4.4*, las dos fracciones activas (*Figura 4*). Se aprecian diferencias entre ambos espectros. En el min 27 se observa un pico de elución estrecho y alto en la RP5, la fracción más activa. Este pico se observa también en la RP4, mucho más bajo en el cromatograma, pero se hace más evidente a la salida del espectrómetro de masas.

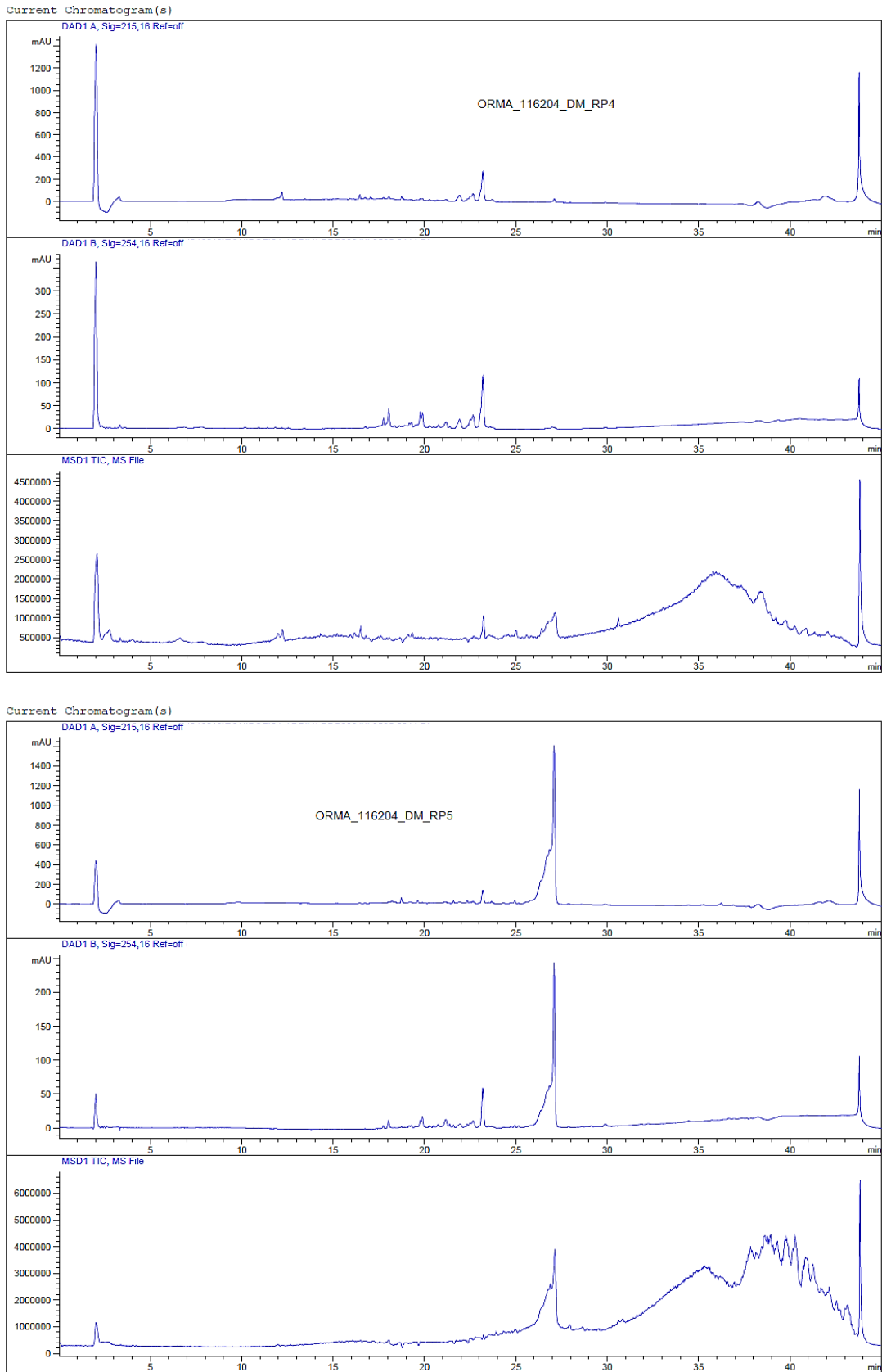


Figura 4. De arriba hacia abajo: cromatograma a $\lambda=215$ nm de la RP4 y RP5; cromatograma de las misma a $\lambda=254$ nm; espectro de detección del espectrómetro de masas a la salida del HPLC.

Se identifican los picos característicos del cromatograma y sus correspondientes espectros de masas. Los tiempos de elución y la masa más abundante detectada correspondiente a dicho tiempo se compara con las almacenadas en la base de datos de PharmaMar, empleando para ello el motor de búsqueda Nist NS Search. El pico eluido a 27 min no mostró coincidencias tras efectuar la búsqueda. De este modo, se procede al tratamiento de la muestra por HPLC, buscando purificar el pico en cuestión. De ambas fracciones, se trabajará sólo la RP5.

Se obtuvo un espectro de absorción en el UV del pico de interés para obtener más información (*Figura 5*). Se observan así 2 máximos interesantes. El más relevante es el de 280 nm, característico de las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos Tyr y Trp, de base ancha y un hombro entre los 285-290 nm; en segundo lugar, el pico localizado sobre los 200 nm, máximo de absorción característico del enlace peptídico.

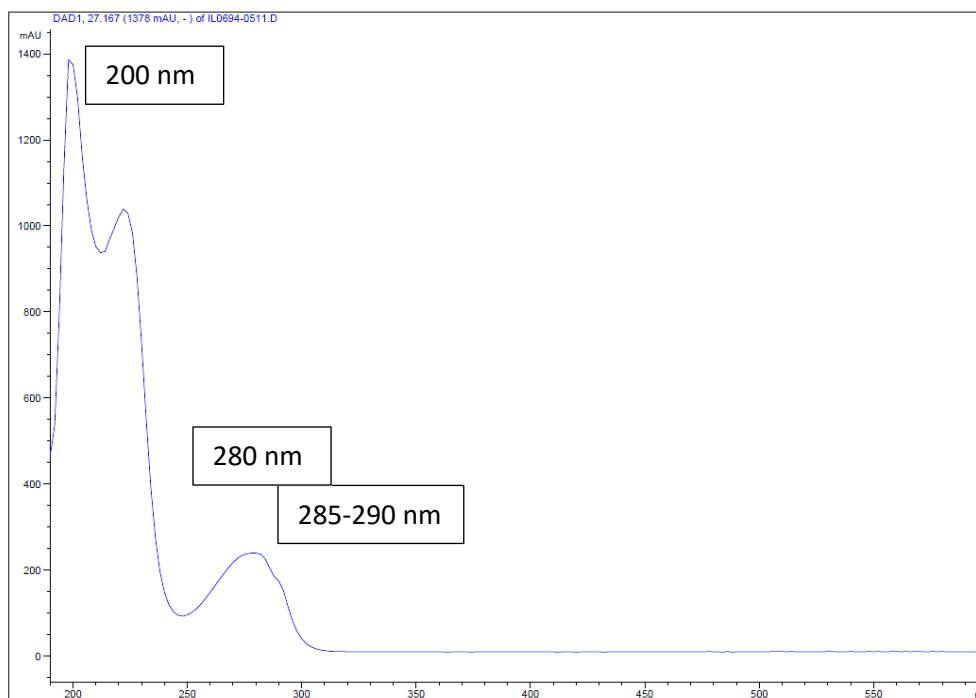


Figura 5. Espectro de absorción en el UV del pico mayoritario de la RP5 a la salida del HPLC. Se señalan los máximos característicos que muestra el compuesto.

Debido al retraso en la elución del compuesto dentro del método general empleado en el HPLC-MS (*Figura 4*), se deduce que el compuesto presenta una baja polaridad. Por este motivo se elige un método que llegue hasta altas concentraciones de CH₃CN. Por otro lado, se observa la presencia de compuestos de naturaleza similar en la muestra, pues eluyen en torno al pico. Para optimizar su separación, se extendió el gradiente desde el 20% de CH₃CN. De esta forma, se llevó a cabo la HPLC de la forma detallada en el *Apartado 4.5*.

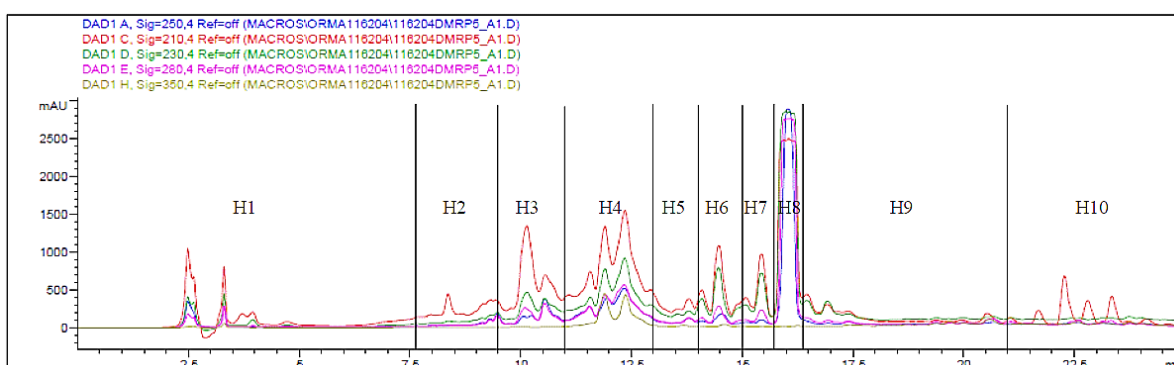


Figura 6. Cromatograma resultado del proceso de HPLC semipreparativa de la RP5 ($\lambda = 210, 230, 280, 350$ nm). Se observa una elevación acusada de la absorbancia a 280 nm en la fracción 8. Las fracciones recogidas a la salida del HPLC se representan con la letra *H*.

Con el método elegido se ha obtenido una colección de picos. La fracción H8 contiene un único pico, el cual muestra una absorbancia elevada, por lo que se sospecha que sea este el pico de interés detectado en el HPLC-MS. También muestra un pequeño hombro que eluye en el min 16.5, el cual fue recogido en la siguiente fracción, de forma que no interfiera con el grado de pureza obtenido en el proceso separación.

Tabla 3. Peso seco de cada una de las fracciones obtenidas tras la separación de la RP5 por HPLC en un gradiente del 20 al 100% de CH₃CN en 17 min.

FRACCIONES	PESO	FRACCIONES	PESO
H1	20.8 mg	H6	14.1 mg
H2	3.0 mg	H7	3.0 mg
H3	3.6 mg	H8	20.0 mg
H4	3.6 mg	H9	6.2 mg
H5	3.0 mg	H10	5.2 mg

Las fracciones obtenidas se secaron a vacío para obtener el peso seco (Tabla 3). Se enviaron 0.15 mg de cada fracción al Departamento de Screening para que se llevase a cabo, nuevamente, el ensayo de actividad citotóxica (Tabla 4). Esta tabla indica una alta actividad en las fracciones H1, H3 y H4. La H1 corresponde al eluido hasta los 7.5 min, y los picos mayoritarios que contiene proceden de los volúmenes muertos. La fracción H3, y la H4 en menor medida, posee también una alta actividad. Tras un análisis en el HPLC-MS, y volcar los resultados en el Nist NS Search, no se han encontrado coincidencias en la base de datos. Se procede a iniciar un estudio en paralelo de dichas fracciones, cuyos resultados no está permitida su publicación.

Las fracciones H7, H8 y H9 también presentan una alta actividad. Las fracciones H7 y H9 contienen trazas de H8, y de ahí su actividad. Como se ha observado, el pico presente en la fracción H8 tiene un alto grado de pureza (Figura 6), y de él se ha obtenido suficiente peso (Tabla 3) como para permitir llevar a cabo más experimentos.

Tabla 4. Resultados de los ensayos de actividad citotóxica de las fracciones cuantificada por el método del marcaje con sulforrodamina. Las líneas celulares enfrentadas a las distintas diluciones del fármaco se muestran en la parte derecha de la tabla. Los resultados se expresan en tanto por ciento respecto a un control. Las concentraciones del fármaco se expresan en µg/mL.

Pos	Sample	Extr	Description	Aliquot	Organism	Sol	Colon			Lung-NSCLC			Breast			Pancreas		
							HT29			A549			MDA-MB-231			PSN1		
							25	5	1	25	5	1	25	5	1	25	5	1
DP1FR/002508																		
45	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP/005/HPLC001	Jaspis	Active	-64.9	-47.6	-14.1	-81.1	-77.4	-43.5	-92.5	-84.7	-68.5	-73.9	-76.1	-60
46	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP/005/HPLC002	Jaspis		-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/RP/005/HPLC003	Jaspis	Active	-92.2	-86.6	-89.2	-87.3	-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/RP/005/HPLC004	Jaspis	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/RP/005/HPLC005	Jaspis		-65.9	40	85.1	-88.9	59.3	70.4	-82	65.3	68.7	-86	34.1	56.1
50	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP/005/HPLC006	Jaspis		-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/RP/005/HPLC007	Jaspis	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/RP/005/HPLC008	Jaspis	Active	-10.3	-18.4	-11.2	-61.1	-53.9	-32.1	-89.3	-83.9	-84.7	-61.9	-67	-63
53	ORMA116204	HPLC	TOMO-159	ORMA116204-QUI-01/DM/001/RP/005/HPLC009	Jaspis	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/RP/005/HPLC010	Jaspis		14.1	97.8	114.5	49.5	108.7	73.5	54.3	74.7	93.2	21.9	89.7	66.1

También se calcula el rendimiento obtenido des la masa de la esponja y de la fase orgánica. El peso obtenido corresponde a un 0.015% del inicial, y a un 0.4% del peso seco extraído con disolventes orgánicos.

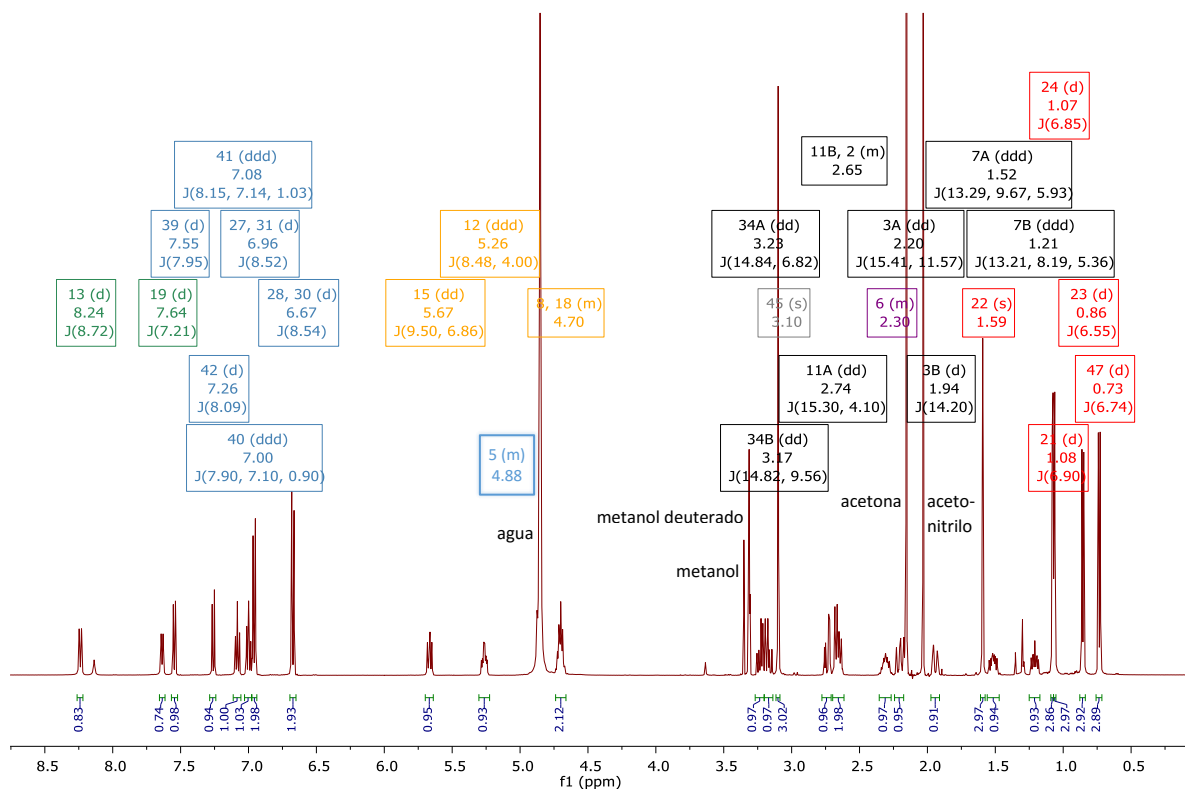


Figura 8. Espectro de ¹H-RMN de la fracción H8 en metanol deuterado. Las etiquetas situadas sobre cada señal indican el nombre, multiplicidad, desplazamiento (ppm) y el valor de las *J* (Hz). Los colores hacen referencia a los diferentes tipos de núcleos presentes: -NH-, verde; aromático, azul; -CH-N/O, naranja; CH₃-O/N, gris; -CH₂-, negro; -CH- alifático, violeta; CH₃-, rojo. Junto a la señal se indican directamente los disolventes presentes en la muestra.

Se han llevado a cabo diversos estudios de espectroscopía por RMN para conocer la estructura de la molécula. Para ello, se realizaron espectros homonucleares, tanto unidimensionales como bidimensionales, y heteronucleares. Para extraer conclusiones de los datos se empleó el libro *Structure determination of organic compounds* (Pretsch *et al.*, 2009).

En el espectro de RMN de ¹H (Figura 8) se puede señalar la presencia de múltiples grupos en la estructura de la molécula. La Tabla 5 muestra los datos obtenidos de los experimentos ¹H-RMN, ¹³C-RMN y gHSQC. La presencia de los dos -NH- (δ_H : 8.24 y 7.64 ppm) se confirma por las señales a campo bajo y la ausencia de señal en el espectro de gHSQC (Anexo, Figura 22).

Tabla 5. Resultado de los experimentos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y gHSQC de la muestra H8. Se muestra el desplazamiento (ppm) de cada una de las señales observadas en el espectro que pertenecen a la molécula de estudio. Se especifica, en la columna de ^1H -RMN, la multiplicidad y las constantes de acoplamiento (Hz).

Nº	δ_{C}	δ_{H} , mult (J Hz)	Nº	δ_{C}	δ_{H} , mult (J Hz)
1	177.9		22	18.4	1.59 (s)
2	40.6	2.65 (m)	23	22.0	0.86 (d, 6.6)
3	42.6	(A) 2.20 (dd, 11.6, 15.4) (B) 1.94 (brd, 14.2)	24	19.6	1.07 (d, 6.9)
4	134.1		26	132.7	
5	130.5	4.88 (m)	27	128.2	6.96 (d, 8.5)
6	30.4	2.30 (m)	28	116.2	6.67 (d, 8.5)
7	44.1	(A) 1.52 (ddd, 5.9, 9.7, 13.3) (B) 1.21 (ddd, 5.4, 8.2, 13.2)	29	157.7	
8	71.6	4.70 (m)	30	116.2	6.67 (d, 8.5)
10	172.2		31	128.2	6.96 (d, 8.5)
11	41.9	(A) 2.74 (dd, 4.1, 15.3) (B) 2.65 (m)	34	25.1	(A) 3.23 (dd, 6.8, 14.8) (B) 3.17 (dd, 9.6, 14.8)
12	50.5	5.26 (ddd, 4.0, 8.5, 8.5)	36	110.5	
13 (N)		8.24 (d, 8.7)	37	110.1	
14	171.0		38	128.6	
15	57.0	5.67 (dd, 6.9, 9.5)	39	119.2	7.55 (d, 8.0)
17	175.0		40	120.5	7.00 (ddd, 0.9, 7.1, 7.9)
18	47.0	4.70 (m)	41	122.8	7.08 (ddd, 1.0, 7.1, 8.2)
19 (N)		7.64 (d, 7.6)	42	111.6	7.26 (d, 8.1)
21	20.0	1.08 (d, 6.9)	43	138.0	
			45	31.7	3.10 (s)
			47	18.1	0.73 (d, 6.7)

El espectro de la *Figura 9* muestra 3 grupos metilo (H21, 23 y 47) en regiones altas del campo (δ_{H} : 1.08, 0.86 y 0.73 ppm, respectivamente). El bajo desplazamiento indica que se encuentran sobre la cadena alifática, fuera de la influencia de grupos que puedan desproteger los núcleos. Se observa un cuarto metilo, en campos más bajos (1.59 ppm), indicando que se encuentra posicionado sobre un Csp^2 . Se encuentra un quinto metilo a δ_{H} 3.10 ppm y δ_{C} 31.7 ppm, siendo el alto campo un indicio que lo localiza sobre un heteroátomo como el N o el O.

De forma característica se observa que las señales 12, 15, 18 (*Figura 9*) del espectro de ^1H -RMN se detectan en torno a 4.5 – 6.0 ppm, y sobre 47.0 – 57.0 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN (*Anexo, Figura 21*), una zona característica de protones

posicionados sobre C unidos a heteroátomos, como el O o el N, que desprotegen los núcleos, haciendo que aparezcan a campos más bajos. Los C α de los péptidos se encuentran en dicho entorno en la cadena peptídica, alojados entre enlaces amida. Los espectros también muestran un δ_c entre 170 - 175 ppm para C1, 10, 14 y 17, propio de un grupo carbonilo asociado a dicho enlace amida. Este tipo de enlace se establece entre los aminoácidos para formar los polipéptidos, adquiriendo el nombre de *enlace peptídico* (Lehninger *et al.*, 2009). Estas observaciones apoyan la hipótesis que la molécula de estudio pudiera ser de naturaleza peptídica.

La región 7.5 – 6.7 ppm del espectro de RMN de ^1H es característica de señales de protones de anillos aromáticos. A 6.96 y 6.67 ppm se observan dos señales, las cuales integran por dos protones cada una. Se trata de dos dobletes, cuyas J tienen valores 8.5 Hz, y que correlacionan entre sí en el espectro obtenido del gCOSY (*Anexo, Figura 22; Figura 10*). Todo esto indica que ambas señales pertenecen a protones procedentes de un anillo de cuyos sustituyentes se encuentran en posición *para*. El menor desplazamiento de H28 y 30, así como de sus carbonos (*Tabla 5*), es signo de que sobre el C32 se localiza un sustituyente oxigenado (*Figura 9, Apartado A*).

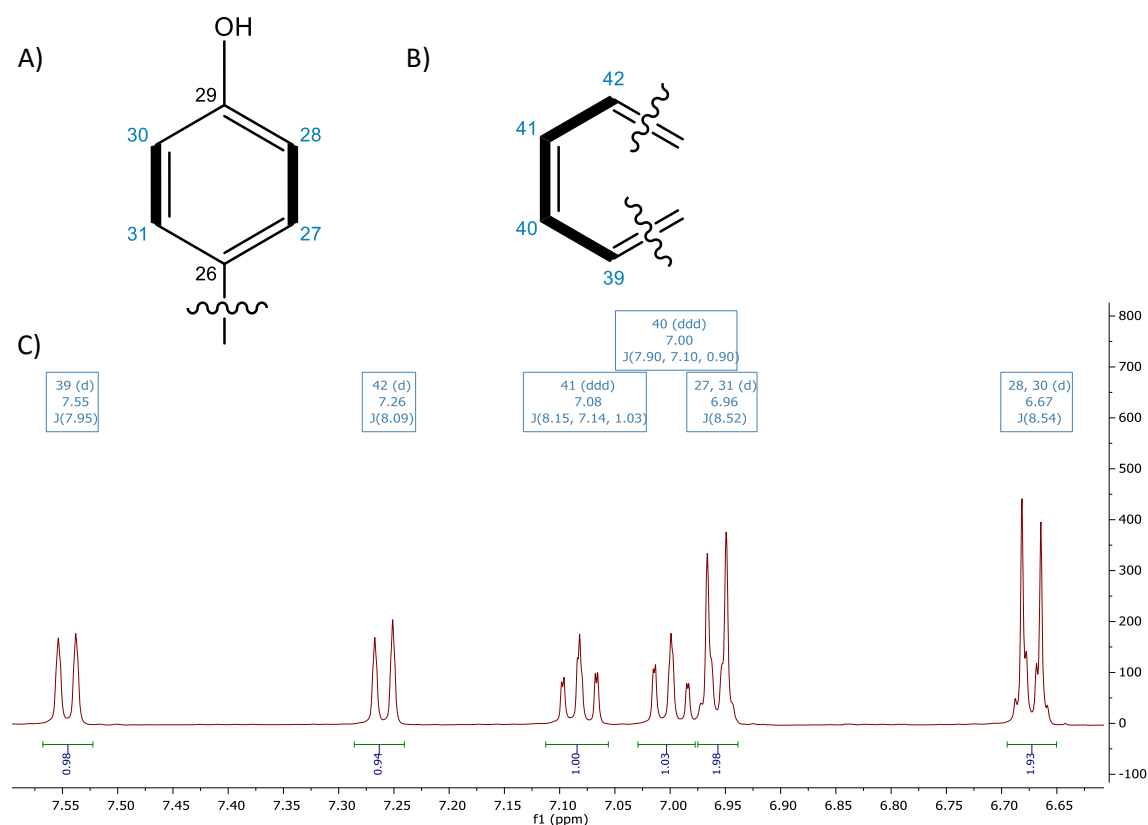


Figura 9. Estructuras de mayor complejidad obtenidas a partir de los resultados de los experimentos ¹H-RMN, ¹³C-RMN y gCOSY. A) Anillo fenólico disustituido en posición *para*. B) Anillo aromático disustituido en *posiciones orto*. C) Ampliación de la zona del espectro de ¹H-RMN que incluye las señales asociadas con los anillos aromáticos deducidos. Las posiciones de los átomos hacen referencia a la posición en la molécula completa; los colores se corresponden a los empleados en la Figura 8.

En la misma región descrita, de protones de anillos aromáticos, aparecen también las señales emitidas por los protones sobre los C39 - 42 (Figura 8). Las señales H40 y 41 presentan dos *J* grandes (7.1 y 7.9, 7.1 y 8.2 Hz, respectivamente) y una pequeña cada una (0.9 y 1.0 Hz), además de correlacionar entre sí (Anexo, Figura 22). Respecto a H39 y 42, manifiestan una única *J* de en torno a 8 Hz. Las cuatro señales mencionadas se muestran en un δ_H en torno al 7.0 – 7.6 ppm y un δ_C alrededor de 120 ppm, y sumando las evidencias observadas, se deben a protones localizados en un anillo de benceno sustituido en *orto* (Apartado B, Figura 10). Al observar los desplazamientos obtenidos en el espectro del ¹³C-RMN (C39: 119.2 ppm; C40: 120.5 ppm; C41: 122.8 ppm; C42: 111.6 ppm), se puede tratar de un anillo imidazol (Anexo, Figura 20).

El experimento gCOSY también ha permitido obtener información estructural sobre otros fragmentos. Todos ellos se muestran en la Figura 10. Muchos de ellos son de pequeño tamaño, constituidos por 2 – 3 eslabones. También aporta en este caso información sobre otro fragmento de gran tamaño, el correspondiente a las posiciones 5, 6,

7, 8, 22, 23 y 24, indicadas en el fragmento 2. El gCOSY indica que los protones correspondientes al metilo 22 correlacionan con H5, pero se acoplan con una J de pequeño valor, observándose un singulete. Se observa también, en la posición C8 del mismo fragmento, el mismo desplazamiento que los H próximos a heteroátomos desapantalladores (4.7 ppm, coincidente con la señal H18), sin embargo, el δ_c de 71.6 ppm es más elevada que la de este (47.0 ppm), indicando diferentes entornos moleculares.

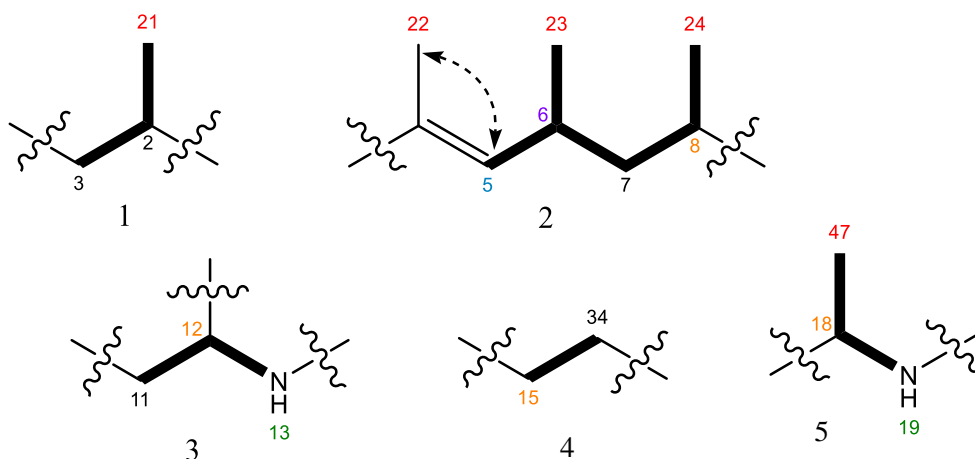


Figura 10. Fragmentos de la estructura molecular obtenidos mediante experimentos de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y gCOSY. Los acoplamientos entre protones contiguos se indican con línea gruesa; los acoplamientos a dos enlaces de distancia de indican con línea de puntos. La posición en la cadena completa de cada uno de los átomos viene indicada; los colores corresponden a los empleados en la Figura 8.

La estructura de la molécula se completa con un experimento bidimensional de tipo gHMBC (Anexo, Figura 24), obteniendo las correlaciones entre H y C a larga distancia. De esta forma se deduce que el fragmento 3 se encuentra unido al grupo fenol correspondiente al Apartado A de la Figura 9, el cual se asocia al fragmento por el C12. Esta unión se deduce por la correlación existente entre el C12 y el H31 y 27. Asimismo, H11, cuyo desplazamiento elevado (2.74 y 2.65 ppm) indica proximidad a un grupo desapantallador, correlaciona con C10, comentado anteriormente. Esta estructura constituye un aminoácido no proteico, β -Tyr (Figura 11), donde el grupo amina se encuentra en el tercer carbono con respecto al grupo ácido. Esta cualidad le hace inservible para formar parte de una cadena polipeptídica sintetizada vía ribosomal, y es una característica típica de los péptidos sintéticos (Lehninger *et al.*, 2009).

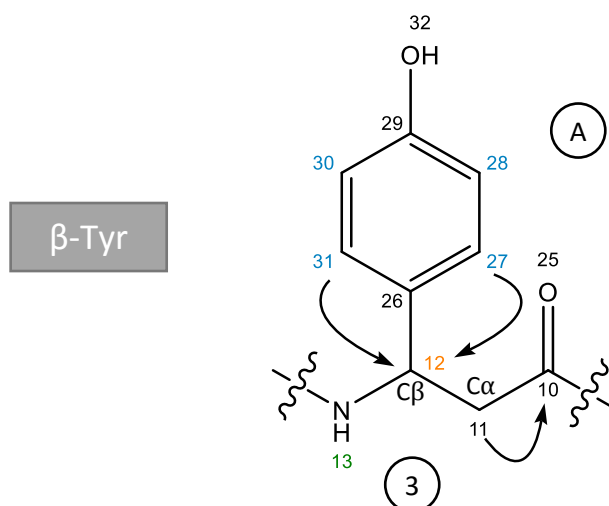


Figura 11. Primeras asociaciones entre los fragmentos obtenidos por gCOSY mediante la información obtenida del gHMBC, constituyendo una β -Tyr en el extremo N-terminal. Las flechas indican las correlaciones a larga distancia (correlación H \rightarrow C). La numeración se corresponde con las posiciones en la molécula completa; se ha usado el sistema de colores de la *Figura 8*.

En vista de la naturaleza proteica de al menos una parte de la molécula, el siguiente fragmento a analizar es uno de los portadores de un grupo amina. El protón 15, del fragmento 4 (*Figura 12*) presenta correlación en el gHMBC con el C en posición 14, correspondiente a un carbonilo, constituyendo así un nuevo enlace amida. Por otro lado, la señal de los protones del metilo 45 correlaciona con C15, y el alto δ_H (3.10 ppm) indica que se encuentra sobre un heteroátomo. Cómo se comentó anteriormente, la señal del C17 posee el desplazamiento característico de un carbonilo asociado a una amida (175.0 ppm), indicando que la cadena continúa con un enlace amida N-metilado. Respecto al C34 del *Fragmento 4*, al encontrarse posicionado sobre el C α 15, la cadena lateral continúa en esa dirección. Estudiando el espectro de gHMBC se observa una correlación H34 con el C38, el cual a su vez correlaciona con el protón 42, el cual forma parte del anillo sustituido en posición *orto* (*Figura 12, Fragmento B*). Se confirma que se trata de un anillo imidazol observando las correlaciones H39 con C43 y con C37 y el H34 con el C19. Este último tiene un enlace libre y un desplazamiento menor al que cabría esperar en dicha posición del anillo (110.5 ppm frente a 124.1 ppm en la literatura). De esta forma, se deduce que el átomo de Br podría hallarse enlazado C19. Así, se configura la estructura de un segundo aminoácido no natural basado en la estructura del triptófano (*Figura 12*). Este análogo consta una posición bromada en el anillo y de una metilación en el grupo amina del C α .

Esta segunda característica, como en el caso de la β -Tyr, también lo hace inservible para la síntesis ribosomal de proteínas (Lehninger *et al.*, 2009).

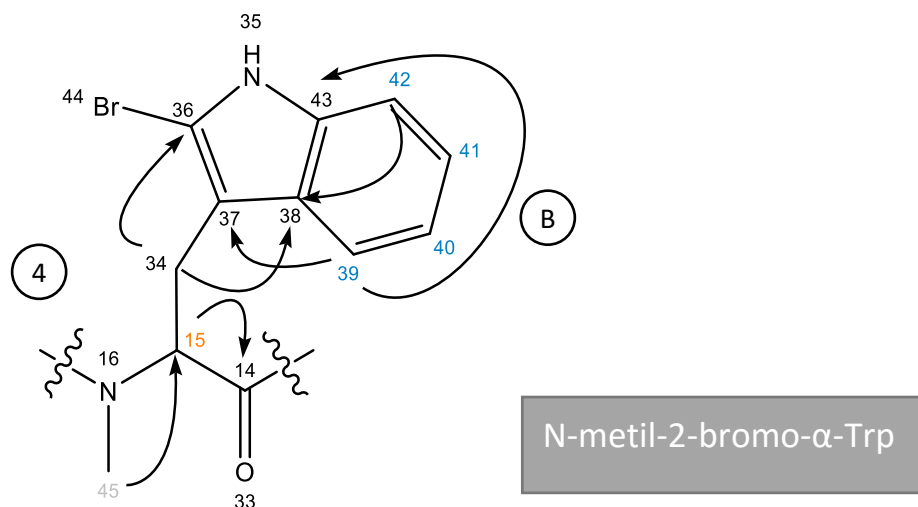


Figura 12. Representación de otro aminoácido no natural (N-metil-2-bromo- α -Trp) perteneciente a la estructura molecular del compuesto de estudio. La información obtenida en los experimentos anteriores se ha completado con la del gHMBC. Las correlaciones a larga distancia se representan con flechas (H \rightarrow C). La numeración se corresponde con las posiciones en la molécula completa; se ha usado el código de colores de la Figura 8.

A continuación, se lleva a cabo la elucidación del último fragmento portador de un grupo amina (Figura 13, Fragmento 5). En el espectro de gHMBC se observa una correlación entre los protones del metilo 37 con C17, cuyo desplazamiento se corresponde con el de un C carbonílico. De esta forma, C18 se encontraría en una posición contigua al carbonilo y al grupo amina, correspondiendo con el C α . El grupo metilo asociado al C18 mencionado es el que caracteriza esta estructura como una α -alanina (Figura 13), aminoácido natural.

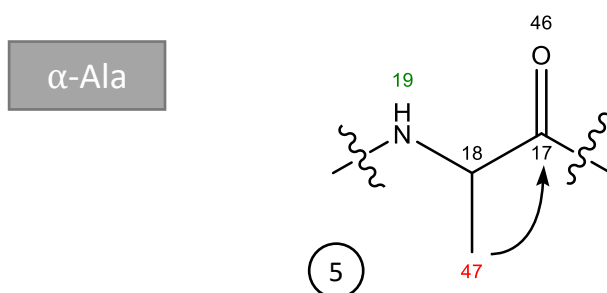


Figura 13. Representación del aminoácido natural α -Ala, hallado en la estructura del compuesto aislado. La información obtenida en los experimentos anteriores se ha completado con la del gHMBC. Las correlaciones a larga distancia se representan con flechas (H \rightarrow C). La numeración se corresponde con las posiciones en la molécula completa; se ha usado el código de colores de la Figura 8.

Se estudian los fragmentos 1 y 2, los restantes obtenidos por el experimento gCOSY. De este modo, los protones del metilo 21 se correlacionan con el C1 descrito en la página 17, indicando que el fragmento contiene un grupo carbonilo a uno de los lados. Por su lado, C3 correlaciona con H22, señal emitida por el grupo metilo situado sobre un C_{sp^2} en el fragmento 2. Así, se forma la estructura de un derivado insaturado del polipropionato (*Figura 14*).

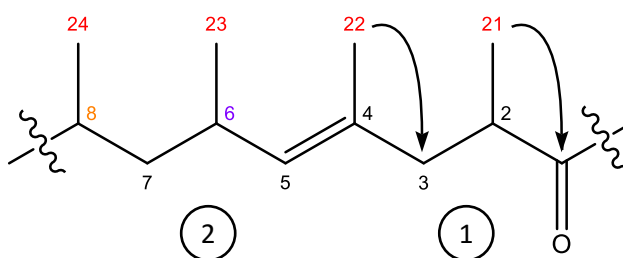


Figura 14. Representación de una molécula de polipropionato insaturado, hallado en la estructura del compuesto aislado. La información obtenida en los experimentos anteriores se ha completado con la del gHMBC. Las correlaciones a larga distancia se representan con flechas ($H \rightarrow C$). La numeración se corresponde con las posiciones en la molécula completa; se ha usado el código de colores de la *Figura 8*.

Por último, se trabajan las correlaciones a larga distancia entre los diferentes fragmentos obtenidos por gCOSY. Así, se observa que con el carbonilo C10 correlaciona H8, relacionando de este modo el análogo de Tyr con el polipropionato. El δC de C8 indica su interacción directa con un átomo de oxígeno, implicando un enlace éster en la conjunción entre ambos fragmentos. Este hecho también indica que la molécula de polipropionato, además de insaturada, también se encuentra hidroxilada. Por otro lado, en el extremo N-terminal, se observa la correlación entre H13 y C14, formando así un enlace amida entre la β -Tyr y el derivado del Trp. Del mismo modo se enlazan el grupo amino metilado del Trp con el grupo carbonilo de la Ala (H29 y C17, respectivamente), dando lugar a otro enlace amida. La molécula se cierra al concluir otro enlace amida por la señal obtenida entre H19 y C1, obteniendo un ciclo (*Figura 15*).

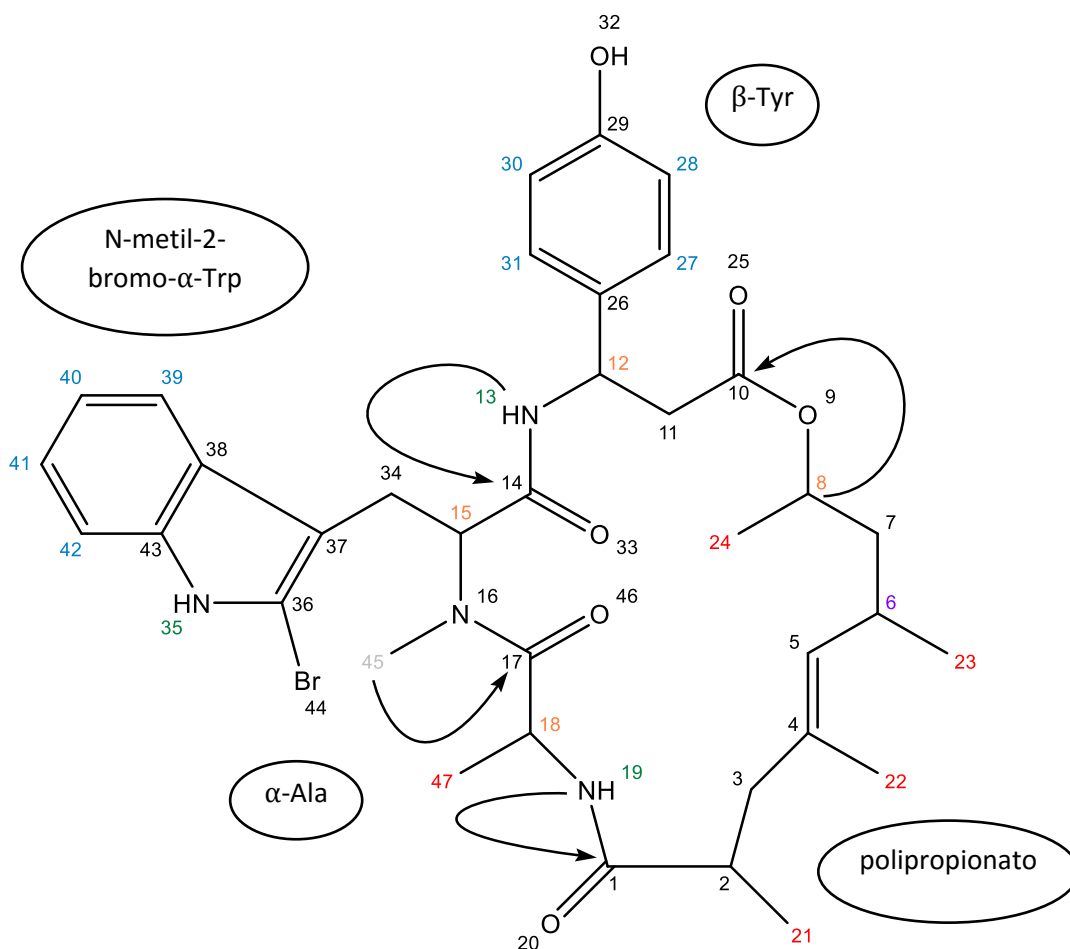


Figura 15. Estructura completa de la jaspamida. Las correlaciones a larga distancia se representan con flechas (H → C). La numeración se corresponde con las posiciones en la molécula completa; se ha usado el código de colores de la Figura 8.

Finalmente, el proceso de elucidación se concluye al contrastar la estructura elucidada en la base de datos de productos naturales de origen marino MarinLit (<http://pubs.rsc.org/marinlit/>). Efectivamente, la web proporcionó una coincidencia que se correspondía con la molécula de estudio. Se trata de la jaspamida o jasplakinolida, descubierta en 1986 simultáneamente por dos laboratorios diferentes – de ahí sus dos calificaciones -: se trata del grupo de Faulkner y Clardy (Zabriskie *et al.*, 1986), en Irlanda, para el primer nombre, y del equipo de Crews (Crews *et al.*, 1986), de la Universidad de California Santa Cruz, para el segundo. De esta forma, se confirmó la estructura discutida a través de los espectros. Por otro lado, hallar la estructura en MarinLit proporcionó la información sobre la estereoquímica de todos los C quirales del compuesto (Figura 16).

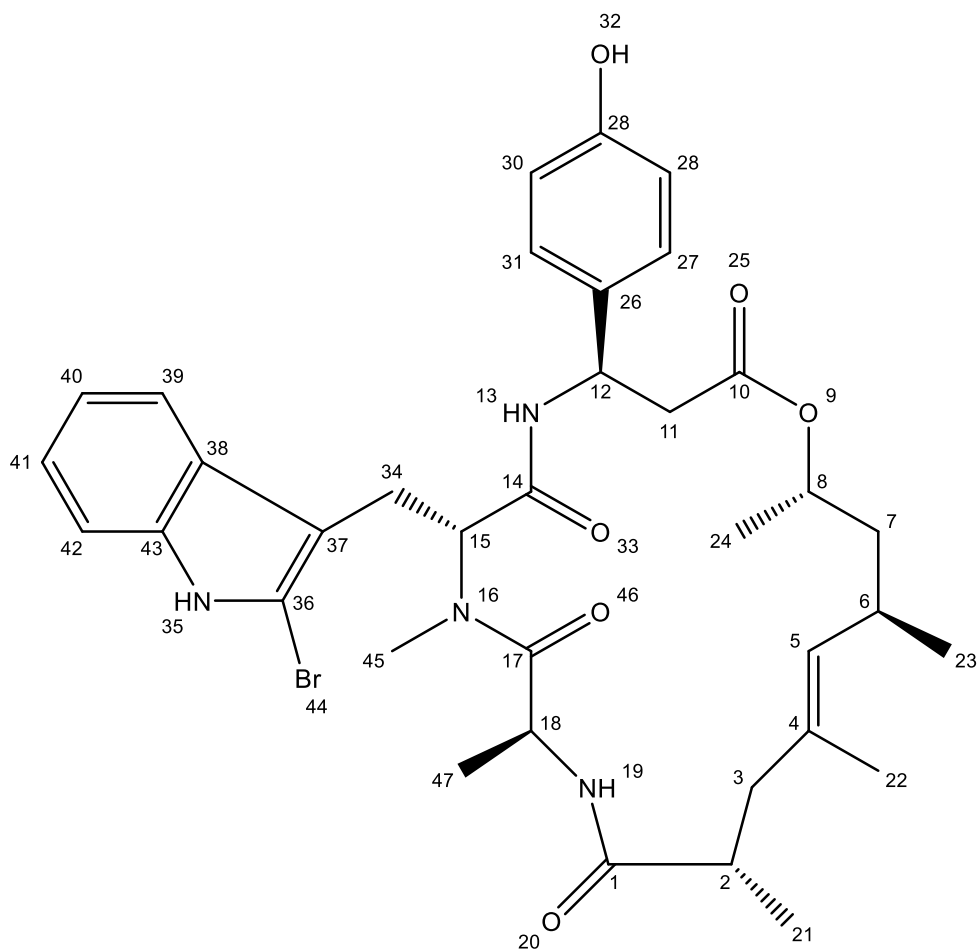


Figura 16. Estructura completa de la jaspamida/jasplakinolida, un ciclodepsipéptido-poliketido de origen marino. La representación incluye la estereoquímica de los centros quirales. La numeración corresponde a la referenciada en la bibliografía.

Se trata de un depsipéptido cíclico, ya que posee aminoácidos que alternan los ácidos carboxílicos enlazados vía éster o vía amida. El fragmento L- α -Ala-D- α -N-Me-2-BrTrp-L- β -Tyr se halla unido a un ω -hidroxiácido de origen poliketido, metilado en cuatro posiciones en C alternados 1-3, así como un doble enlace trisustituido (Gowri *et al.*, 2010).

5.4 Bioanálisis de la jaspamida

Tras la caracterización del compuesto activo de muestra H8, el compuesto puro se somete a un ensayo de inhibición del crecimiento. Se estudió la viabilidad celular tras el tratamiento con la jaspamida en cuatro líneas tumorales: A549, HT29, MDA-MB-231 y PSN1. Para ello, se calculan tres parámetros: GI₅₀, TGI y LC₅₀. Los resultados se muestran en la *Tabla 6*. De esta forma se cuantifica la efectividad citotóxica del fármaco. Las líneas han mostrado una GI₅₀ de 2.25×10^{-8} M en pulmón, 1.09×10^{-8} M en colon, 6.06×10^{-8} M en mama y 1.97×10^{-8} M en páncreas.

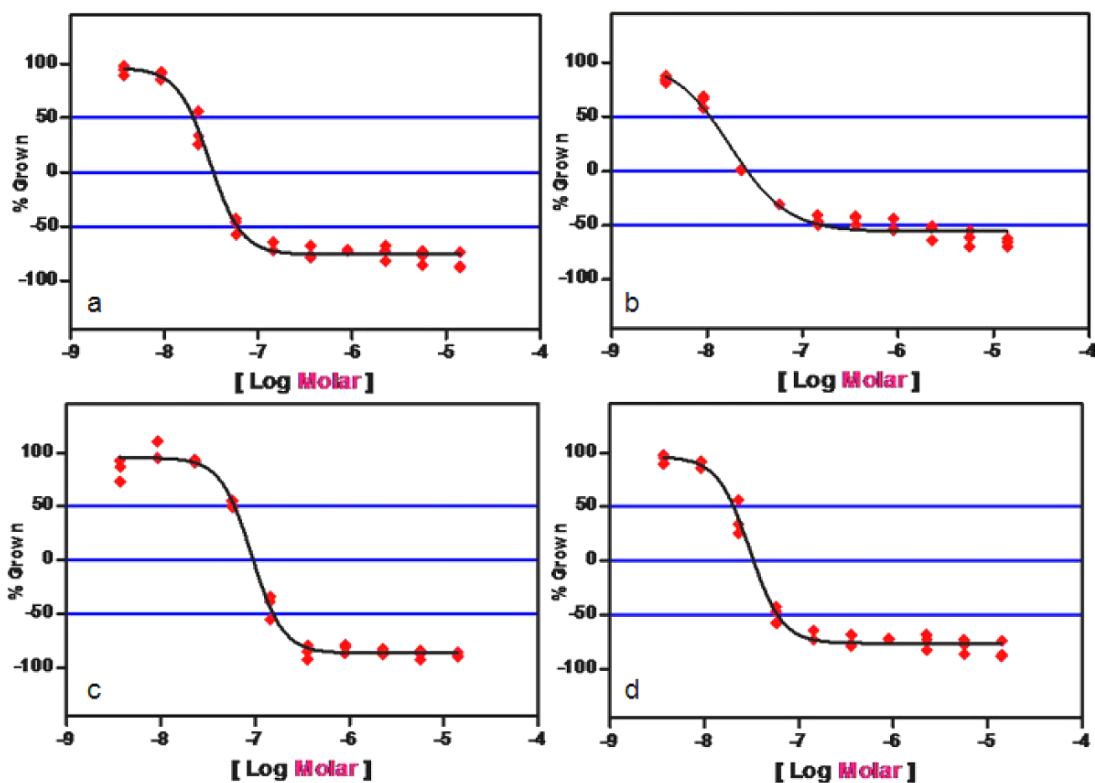


Figura 17. Curvas dosis-respuesta de la jaspamida en cuatro líneas tumorales: a. A549; b. HT29; c. MDA-MB-231; d. PSN1.

Tabla 6. Cálculo de los parámetros GI_{50} , TGI y LG_{50} para la jaspamida en cuatro líneas tumorales, a partir de los datos obtenidos en las curvas dosis-respuesta de la Figura 16. Se proporcionan los resultados numéricos en $\mu\text{g/mL}$ y en molaridad.

LÍNEA	PULMÓN	COLON	MAMA	PÁNCREAS
	A549	HT29	MDA-MB-231	PSN1
GI_{50}	$2.25 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1.09 \times 10^{-8} \text{ M}$	$6.06 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1.97 \times 10^{-8} \text{ M}$
TGI	$4.93 \times 10^{-8} \text{ M}$	$2.68 \times 10^{-8} \text{ M}$	$9.58 \times 10^{-8} \text{ M}$	$3.38 \times 10^{-8} \text{ M}$
LG_{50}	$1.24 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1.55 \times 10^{-7} \text{ M}$	$1.55 \times 10^{-8} \text{ M}$	$5.92 \times 10^{-8} \text{ M}$

Las cuatro líneas presentan una sensibilidad de similar magnitud hacia el fármaco, con una GI_{50} de 10^{-8} M . Se trata de un compuesto muy efectivo que manifiesta actividad citotóxica, ya que se cumple que $LC_{50} > 0$.

5.5 Mecanismo de acción y aplicaciones de la jaspamida/jasplakinolida

Se ha demostrado la capacidad de la jaspamida de interactuar con especies cargadas positivamente, como iones metálicos o aminoácidos cargados de estructuras proteicas, para lo cual es importante el fragmento tripeptídico unido a la cadena

hidrocarbonada así como los electrones aromáticos de la β -Tyr (Gowri *et al.*, 2010). Previamente investigaciones han señalado un papel cooperativo entre la estructura peptídica y el poliketido para lograr la conformación bioactiva (Shankar *et al.*, 2010). Sin embargo, el mecanismo de acción, desde un punto de vista de la interacción molecular con su diana, sigue sin estar claro.

En 1995, Fabian *et al.* quisieron testar *in vitro* el potencial antitumoral de la jaspamida en células humanas. Se probó en células tumorales de tres pacientes con Leucemia Mieloide Aguda, donde se vio que impedía la autorrenovación de células clonogénicas y disminuía la expresión en superficie del CD34, incrementando la del CD14 y CD11. Es decir, este compuesto era capaz de disminuir el índice de crecimiento y además potenciaba la diferenciación de las células (Fabian *et al.*, 1995). Ese mismo año, Senderowicz A.M. *et al.* decidieron ampliar el estudio del compuesto, tratando células de cáncer de próstata y midiendo el efecto inhibitor del crecimiento, que también se había observado en células de cáncer de mama. Tras 48 h de incubación con la jaspamida, el valor GI₅₀ en tres líneas diferentes se mantuvo en el orden nanomolar; sin embargo, sus estudios metabólicos no apreciaron cambios en la síntesis de DNA, RNA, proteínas o en los niveles intracelulares de ATP. Lo que sí observaron, por microscopía confocal con anticuerpos marcados y con Rh-faloidina, fueron cambios morfológicos. Se formaron células multinucleadas y una desconstrucción temprana del citoesqueleto de actina, impidiendo la unión de la faloidina (Senderowicz *et al.*, 1995).

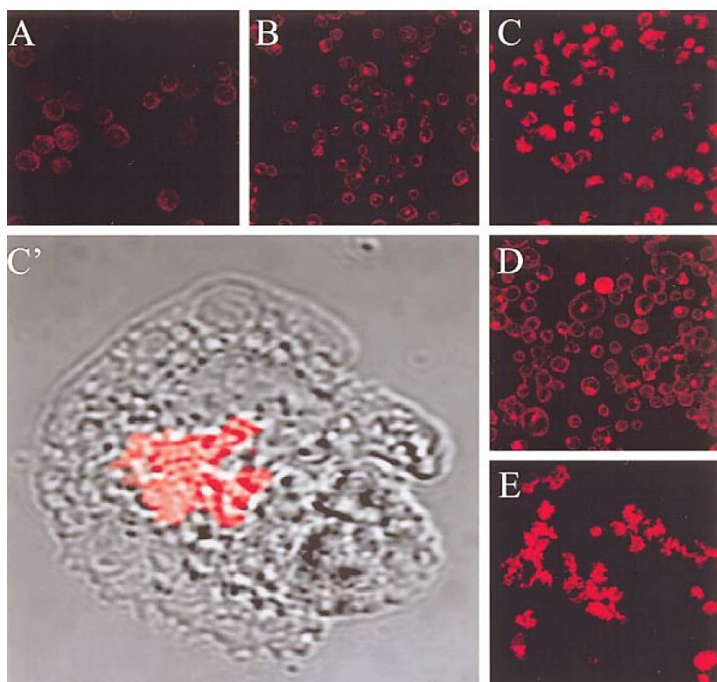


Figura 18. Formación de agregados en células HL-60 por acción de la jaspamida de manera dependiente del tiempo y la dosis. Las células se trataron con jaspamida y se marcaron con un MoAb anti-actina conjugado con rodamina. A) Células no tratadas; B) 24 h de tratamiento, 10^{-8} M jaspamida; C y C') 24 h, 10^{-7} M jaspamida; D) 48 h, 10^{-8} M jaspamida; E) 48 h, 10^{-7} M jaspamida. (Imagen extraída de Fabian *et al.*, 1999)

Este efecto estructural es sumamente interesante. Anteriormente ya se había observado *in vitro* que la jaspamida es un inductor de la polimerización de la actina (Bubb *et al.*, 1994). Al contrario que los microtúbulos - otro de los constituyentes estructurales del citoesqueleto - pocos son los antitumorales cuya diana sea la actina. Así, en 1999, el laboratorio de Ina Fabian continuó las investigaciones sobre la jaspamida, esta vez empleando la línea celular HL-

60, células de leucemia promielocítica aguda. Observaron que además de promover la diferenciación a granulocitos y monocitos - al incrementarse la expresión del CD16 y CD14B, respectivamente -, también había una reorganización acusada del citoesqueleto de actina dosis-dependiente, siendo detectables agregados desde concentraciones del orden nanomolar (Figura 18). Estudios de competición con la faloidina indicaron que la jaspamida incrementa la fracción insoluble de la actina, ya sea induciendo la polimerización de la G-actina (soluble) y/o impidiendo la despolimerización de la F-actina. Sin embargo, no está claro si el efecto citotóxico que induce la jaspamida se debe directamente al reordenamiento del citoesqueleto de actina o si se debe a algún otro factor dependiente de dicha estructura (Fabian *et al.*, 1999). Poco antes se vio en células de cáncer de próstata que la actividad bombesina se veía influida por la reorganización de la actina inducida por la jaspamida, lo cual conlleva una disminución en el nivel de fosforilación de FAK (Focal Adhesion Kinase). De esta forma se dedujo que el bloqueo de la cascada de FAK inhibiría el crecimiento de las células tumorales, apoyando la hipótesis de que la citotoxicidad es un efecto indirecto de la agregación de la actina (Duncan *et al.*, 1996).

Tal cómo se ha visto en células Jurkat T, la jaspamida es capaz de inducir apoptosis (Figura 19) y elevar la actividad caspasa-3 al tratar las células con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del fármaco (Odaka *et al.*, 2000). Sin embargo, la actividad de esta vía depende de la línea tumoral, como es el caso de las HL-60, donde la apoptosis es caspasa-3-independiente (Cioca *et al.*, 2002). Para comprobar la especificidad del compuesto, trataron también timocitos, células T procedentes del bazo de ratones y células T periféricas de ratones – todas ellas no transformadas - con hasta 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de compuesto, y no observaron diferencias significativas respecto al control con DMSO (0,1 %) (Odaka *et al.*, 2000), postulando que las células tumorales serían más sensibles que las no transformadas a la citotoxicidad de la jaspamida. De esta forma, el ciclodepsipéptido se presentaba como un buen candidato para el tratamiento de leucemias, ya que las células inmunitarias suelen verse castigadas en los tratamientos oncológicos, pues también impiden la expansión clonal.

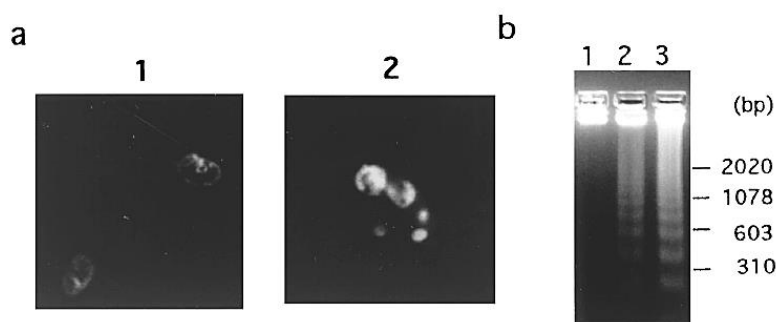


Figura 19. Núcleos apoptóticos en células Jurkat tratadas con jaspamida (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 48 h. A) Análisis morfológico. 1: 0.02% DMSO; 2: células tratadas, se detectan cuerpos apoptóticos. B) Estudio de fragmentación del DNA nuclear (ensayo escalera); electroforesis en gel al 1.5% de agarosa, 2 μg DNA/pocillo. 1: 0.02% DMSO; 2: células tratadas durante 24 h; 3: células tratadas durante 48 h. (Imagen extraída de Odaka *et al.*, 2000)

La jaspamida se probó en estudios preclínicos. Un estudio llevado a cabo con ratas Fischer 344 y con perros de raza Beagle mostró que el margen entre CME y CMT era muy estrecho – 12.5% y un 15.4%, respectivamente -, insuficiente para considerarse un fármaco seguro. Además, en ambos casos, los efectos tóxicos observados en los individuos muertos fueron edema pulmonar y hemorragia y congestión cardíaca (Schindler-Horvat *et al.*, 1998). Cuando se estudiaron *in vitro* estos efectos, se observó por ensayos de patch clamp una inhibición del 98% de los canales de potasio Kv1.5 en altas concentraciones (10 μM); incluso a menor concentración, en cardiomiocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas, aparecía una disminución del índice celular y de la amplitud del latido (Schweikart *et al.*, 2013).

Debido a la influencia sobre la polimerización de actina, y a que su uso en laboratorio es muy sencillo gracias a su capacidad de atravesar la membrana plasmática sin para ello llevar a cabo una etapa de permeabilización (Senderowicz *et al.*, 1995), la jaspamida se ha empleado en laboratorios de investigación de todo el mundo para estudiar procesos relacionados con la dinámica de la actina. El complejo de Golgi se ve influido por el estado de polimerización de actina, de modo que cuando se trata con jaspamida se bloquean los cambios morfológicos en sus cisternas (Di Campli *et al.*, 1999). Los miocitos poseen también funciones muy relacionadas con el mantenimiento de su citoesqueleto, validando el empleo de la jaspamida en el estudio de enfermedades vasculares al llevar a cabo un microarray con mRNA de células tratadas con dicho fármaco. Se vio que estaban sobreexpresadas la distrofina y la sinaptopodina 2, las cuales se desregulaban en aquellos casos en los que el tejido ha sido dañado (Turczyńska *et al.*, 2015). En la neuroquímica tiene gran relevancia el citoesqueleto de actina. Por ejemplo, la redistribución de actina en grandes agregados estimula la formación de nuevas neuritas en dichos puntos; los agregados de la jaspamida, sin embargo, no poseen las características adecuadas, e impiden la formación de dichas ramificaciones (Zhang *et al.*, 2016).

6. CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se ha desarrollado un proceso de aislamiento de un compuesto altamente activo capaz de inducir muerte celular en células cancerígenas, la jaspamida o jasplakinolida. Además, el producto se ha podido obtener en un alto grado de pureza, permitiendo llevar a cabo el proceso de elucidación estructural que llevó a su identificación.

Por otro lado, a pesar del alto valor del compuesto, en lo que a actividad se refiere, no ha sido una aportación novedosa para la comunidad científica, por lo que no ha permitido abrir una nueva puerta hacia un tratamiento eficaz y seguro contra el cáncer. Como se ha visto, la jaspamida es capaz de inducir apoptosis en células de múltiples líneas celulares, preservando, en mayor medida, la viabilidad de las células inmunitarias no transformadas, como los timocitos o los linfocitos T periféricos. Sin embargo, produce graves efectos secundarios *in vivo* al aumentar levemente la dosis. Para lo que sí ha mostrado este fármaco es su capacidad de interactuar con la actina y derivar su fracción soluble a un estado insoluble, siendo éste un mecanismo novedoso, con múltiples aplicaciones en el laboratorio para facilitar los estudios de procesos directa o indirectamente relacionados con el citoesqueleto de actina o los microfilamentos.

La jaspamida tiene una alta complejidad estructural, combinación de dos tipos de moléculas: depsipéptido y polikétido. A pesar de ello, la metodología de aislamiento ha permitido finalizar con éxito el proceso, demostrando la eficacia del experimento y verificándolo para el aislamiento de una gran heterogeneidad de moléculas orgánicas. De esta forma, se ha logrado enriquecer la base de datos de compuestos con actividad antitumoral de PharmaMar. Este hecho simplificará directamente a los procesos de *Drug Discovery*, pues es un paso más en el aprendizaje de la mecanística farmacológica, retroalimentando así al ciclo de ensayo-error y optimizándolo, lo cual beneficiará entonces a toda la comunidad.

7. AGRADECIMIENTOS

Aunque este trabajo no sea un doctorado, hay mucho trabajo de muchas personas detrás. Esta es vuestra página:

A mis padres, que con vuestro esfuerzo tuve la oportunidad de sumergirme en este maravilloso mundo que es la ciencia y poder practicarlo en el sitio que yo misma decidí. Y a mi hermano, por pensar que soy una *científica*.

A mis compañeras vividoras de Madrid. Porque no siempre he sido la mejor compañera de piso, pero siempre habéis sido la mejor familia en esta inmensa ciudad – otro año más - y aún me seguís dando credibilidad para vuestras cuestiones de salud (aunque a veces no entendáis en qué idioma os hablo).

A mi compañero, por luchador, por estar cerca, por entenderme, por hacerme reír, por bueno, por querer aprender de las kinesinas, por no necesitar que seamos iguales, porque somos iguales, por compañero.

A mis compañeras de máster, que no hemos tomado el camino fácil en la vida, pero hemos sobrellevado la presión y seguimos peleando.

A PharmaMar, por la oportunidad de poner en práctica tantas herramientas que fui recogiendo estos años y que necesitaba emplearlas.

Al laboratorio 205, porque sois maravillosos. Y punto – y seguido -. No sé si serán los vapores del diclorometano, pero trabajar con vosotros es una experiencia familiar y cercana, y es el claro ejemplo de equipo, así es fácil desarrollarse cómo trabajador y cómo persona. Muchísimas gracias por resolver mis estúpidas dudas e impedir que explotase algún que otro HPLC. Muchísimas gracias por todo lo aprendido. ¡Os deseo muchos años de unidad y grandes descubrimientos de nuevos hits!

Al laboratorio de Screening. O de MoA. O de Bioquímica. Da igual, dónde quiera que estéis ese día. Trabajar con vosotros ha sido una experiencia como cualquier otro juego: hay una metodología, hay unas reglas, hay que esforzarse, ¡pero disfrutas y te diviertes haciendo parejas y tríos y escaleras! Gracias por compartir conmigo la pasión por las enzimas, por el DNA o por un anticuerpo. Por las carcajadas que ello implica.

Muchas gracias Gema por permitirme volver a “sentenciar” a unas pobres celulillas, por enseñarme la mejor manera de hacer un Western Blot y por dejarme hacer por un ratito lo que más me gusta. Seguro que algún día dirán tu cumpleaños.

Por último, sólo me queda darle las gracias a la persona que más me ha *aturado* estos *corto-largos* cinco meses. Muchas gracias “jefe” por transmitirme lo que sabes, y lo que no sabes, y lo que aún te queda por saber. Me has quitado el derecho a estar cansada a no ser que tenga un hijo y un trabajo y un doctorado y clases de inglés, el derecho a no hacer perfecta una tarea y el derecho a que no conseguir un trabajo donde quiera. Estas páginas son la representación de lo que de aquí me llevo, así que intentaré, una vez más, no dejarte en mal lugar.

¡Gracias por pasar por mi camino!

8. BIBLIOGRAFÍA

- Andavan, G.S., Lemmens-Gruber, R. (2010) Cyclodepsipeptides from marine sponges: natural agents for drug research. *Mar Drugs*. 8(3):810-34.
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv*. 33(8):1582-614.
- Bhushan, R., Brückner, H. (2004) Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: a review. *Amino Acids*. 27(3-4):231-47.
- Bubb, M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L., Korn, E.D. (1994) Jaspilakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem*. 269(21):14869-71.
- Cioca, D.P., Kitano, K. (2002) Induction of apoptosis and CD10/neutral endopeptidase expression by jaspamide in HL-60 line cells. *Cell Mol Life Sci*. 59(8), 1377–1387.
- Crews, P., Manes, L.V., Boehler, M. (1986) Jaspilakinolide, a cyclodepsipeptide from marine sponge *Jaspis* sp. *Tetrahedron Lett*. 27:2797.2800.
- Dembitsky, V.M., Glorizova, T.A., Poroikov, V.V. (2005) Novel antitumor agents: marine sponge alkaloids, their synthetic analogs and derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 5(3):319-36.
- Di Campi, A., Valderrama, F., Babià, T., De, Matteis, M.A., Liuni, A., Egea, G. (1999) Morphological changes in the Golgi complex correlate with actin cytoskeleton rearrangements. *Cell Motil Cytoskeleton*. 43(4):334–348.
- Duncan, M.D., Harmon, J.W., Duncan, L.K. (1996) Actin disruption inhibits bombesin stimulation of focal adhesion kinase (pp125FAK) in prostate carcinoma. *J Surg Res*. 63(1):359-63.
- Fabian, I., Shur, I., Bleiberg, I., Rudi, A., Kashman, Y., et al. (1995) Growth modulation and differentiation of acute myeloid leukemia cells by jaspamide. *Exp Hematol*. 23(7):583-7.
- Hanahan, D., Weinberg, A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646-674.
- International Agency for Research on Cancer. (2014). Informe mundial sobre el cáncer. Recuperado el 20 de enero de 2016 de <http://www.who.int/es/>
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2005) *Inmunobiology: the immune system in health and disease*. New York, Unites States: Garland Sciencie.
- Jiménez, C. (2013) El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *An Quim*. 109(2):134-141.
- Jorde, L.B., Carey, J.C., Bamshad, M.J. (2011) *Genética médica*. Madrid, España: Elsevier.
- Koehn, F.E., Carter, G.T. (2005) Rediscovering natural products as a source of new drugs. *Discov Med*. 5(26):159-64.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2009) *Principios de bioquímica*. Barcelona, España: Omega.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Badertscher, M. (2009) *Structure determination of organic compounds*. Berlin-Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag.
- Ridley, A.J. (1995) Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*. 5(1), 24–30
- Schindler-Horvat, J., Fairchild, D.G., Hassler, C., Tomaszewski, J.E., Donohue, S.J., Tyson, C.A. (1998) Toxicity of jaspilakinolida (NSC 613009) in rats and dogs. *Proc Amer Assoc Cancer Res*. 39:597.

- Schweikart, K., Guo, L., Shuler, Z., Abrams, R., Chiao, E.T., Kolaja, K.L., Davis, M. (2013). The effects of jaspamide on human cardiomyocyte function and cardiac ion channel activity. *Toxicol In Vitro*, 27(2):745–751.
- Senderowicz, A.M., Kaur, G., Sainz, E., Laing, C., Inman, W.D., et al. (1995) Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells in vitro with disruption of the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst.* 87(1):46-51.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., et al. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82(13):1107-12.
- Sociedad Española de Oncología Médica. (2016) Las cifras del cáncer en España 2016. Depósito legal: M-2399-2016.
- Suarez-Jimenez, G.M., Burgos-Hernandez, A., Ezquerra-Brauer, J.M. (2012) Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: sources from marine animals. *Mar Drugs*. 10(5):963-86.
- Turczyńska, K.M., Swärd, K., Hien, T.T., Wohlfahrt, J., Mattisson, I.Y., et al. (2015) Regulation of smooth muscle dystrophin and synaptopodin 2 expression by actin polymerization and vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35(6):1489-97.
- Vichai, V., Kirtikara, K. (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.*1(3):1112-6.
- Zabriskie, T.M., Klocke, J.A., Ireland, C.M., Marcus, A.H., Molinski, T.F., Faulkner, D.J., Xu, C., Clardy, J.C. (1986) Jaspamide, a modified peptide from a Jaspis sponge, with insecticidal and antifungal activity. *J Am Chem Soc.* 108:3123-31-24.
- Zhang, S.X., Duan, L.H., Qian, H., Yu, X. (2016) Actin Aggregations Mark the Sites of Neurite Initiation. *Neurosci Bull.* 32(1):1-15
- Zheng, L.H., Wang, Y.J., Sheng, J., Wang, F., Zheng, Y., et al. (2011) Antitumor peptides from marine organisms. *Mar Drugs*. 9(10):1840-59.

9. ANEXOS

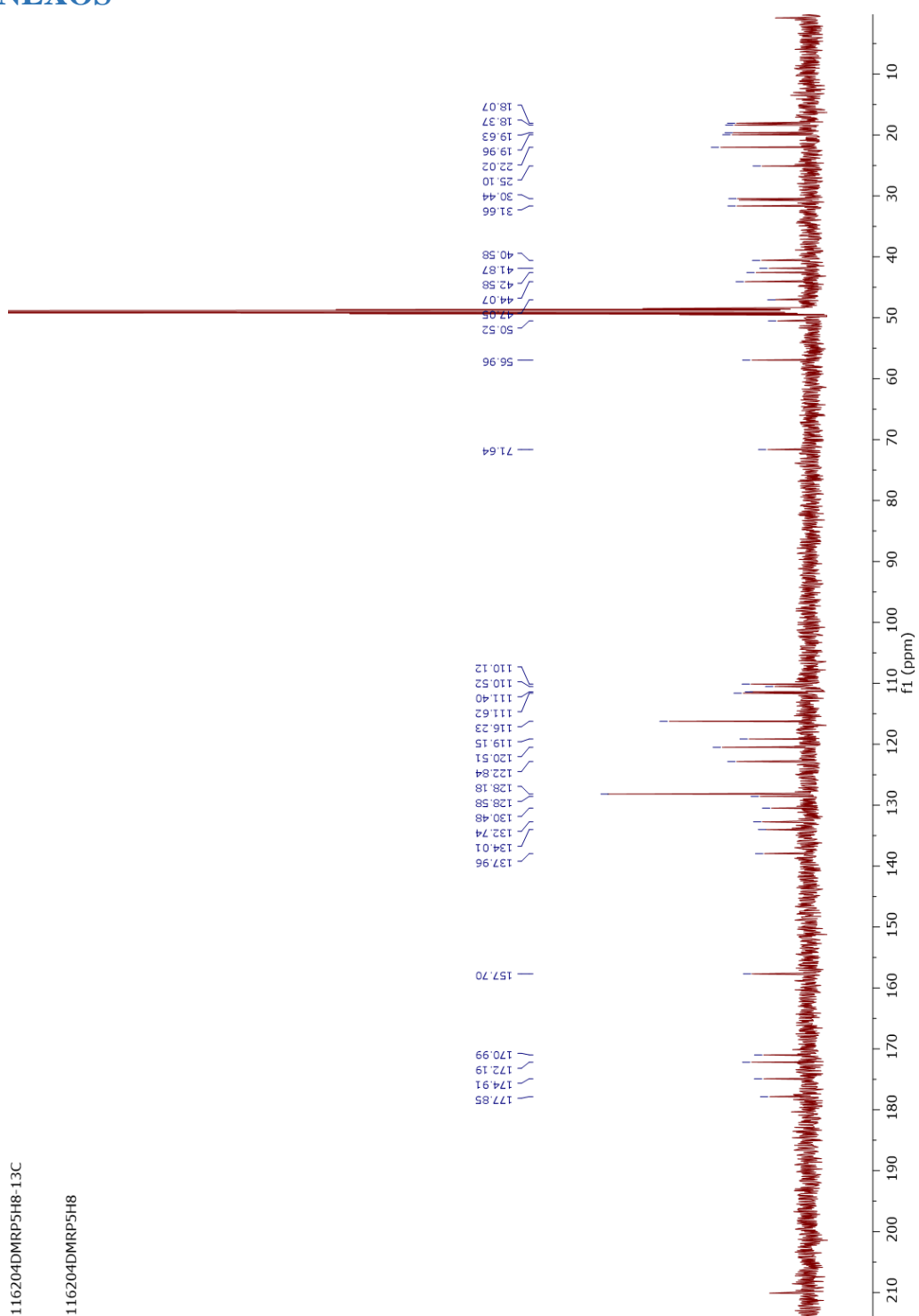


Figura 20. Espectro de ^{13}C -RMN de la fracción H8, obtenida del HPLC, en metanol deuterado.

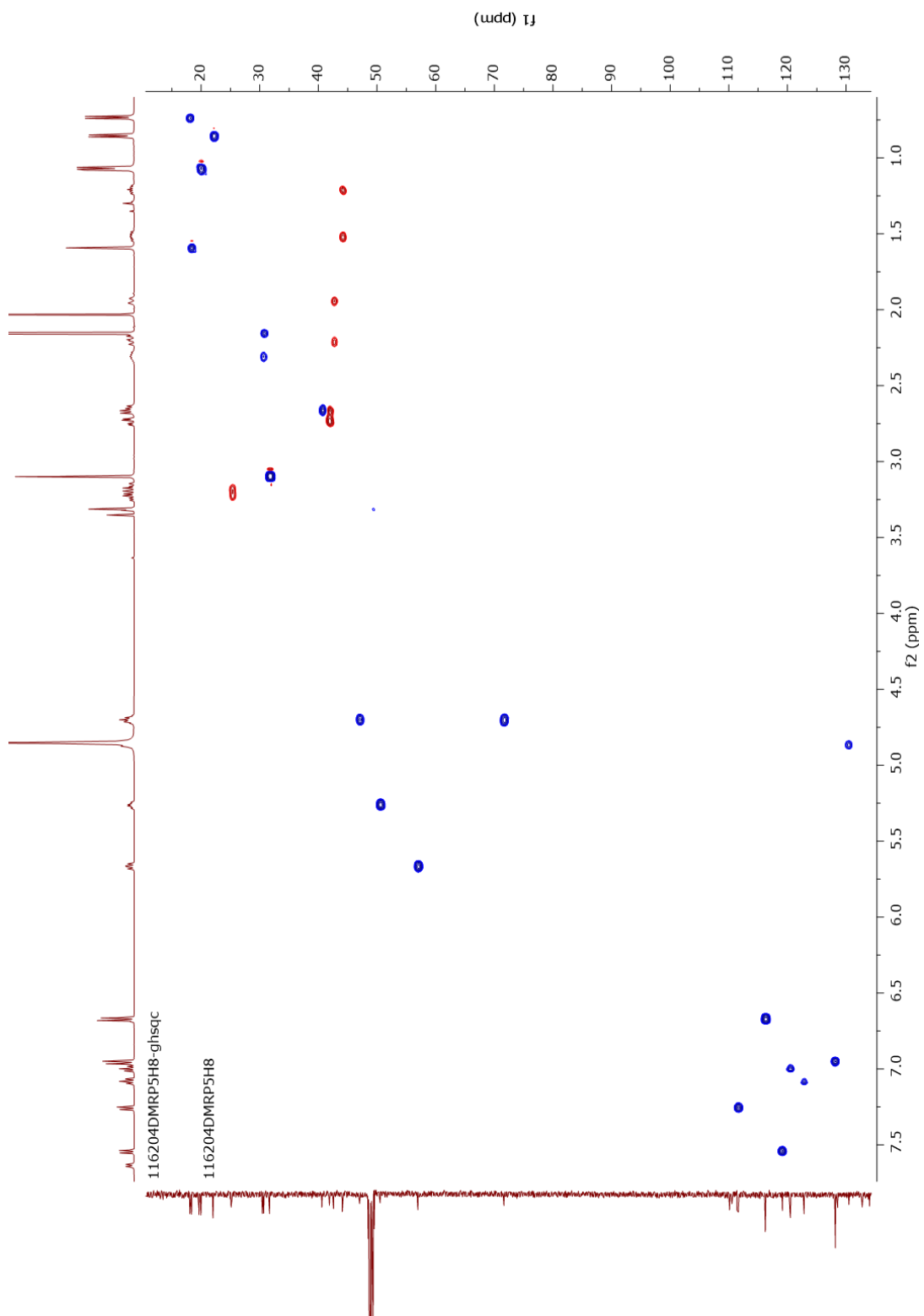


Figura 21. Espectro de gHSQC de la fracción H8, obtenida del HPLC, en metanol deuterado.

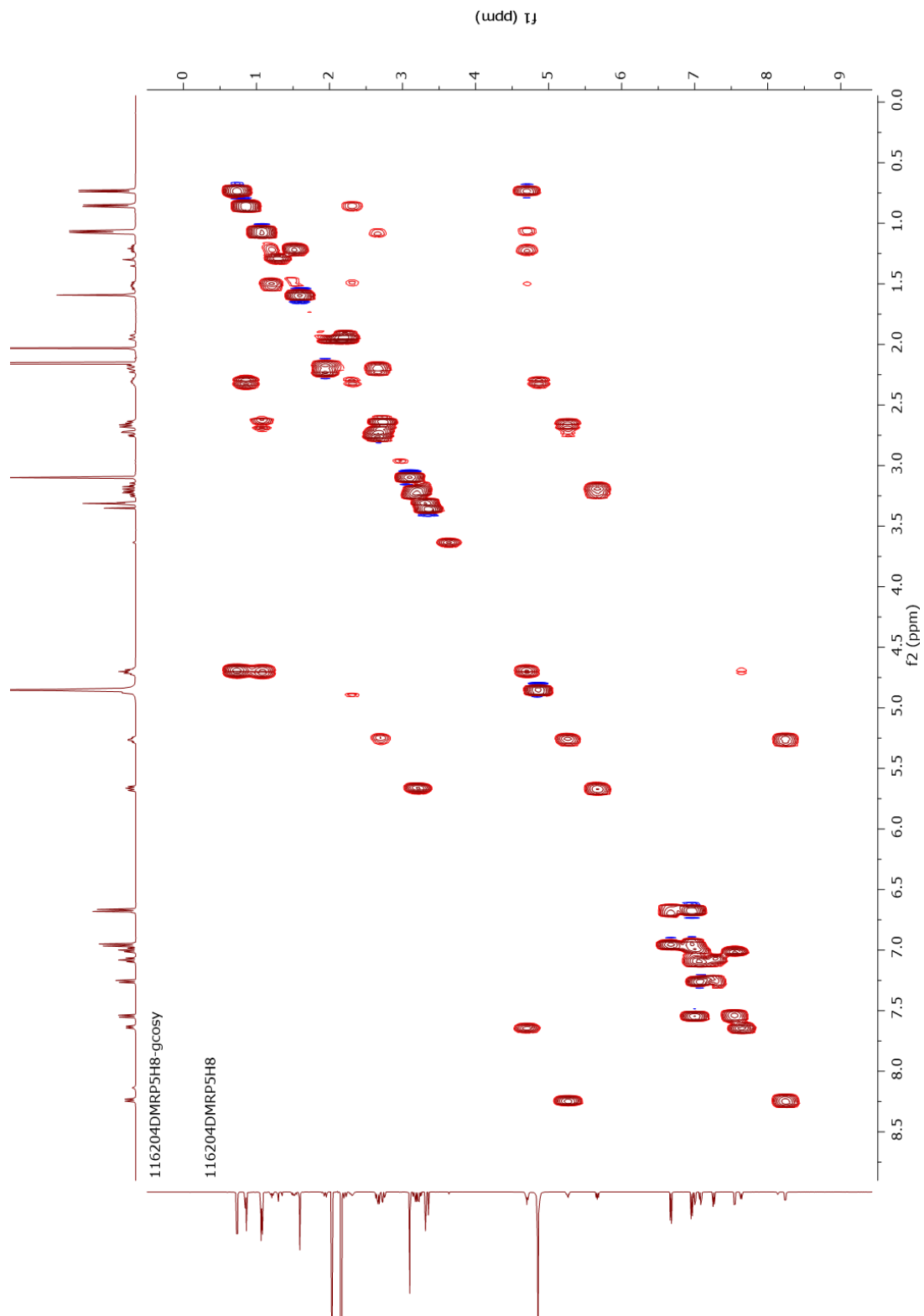


Figura 22. Espectro de gCOSY de la fracción H8, obtenida del HPLC, en metanol deuterado.

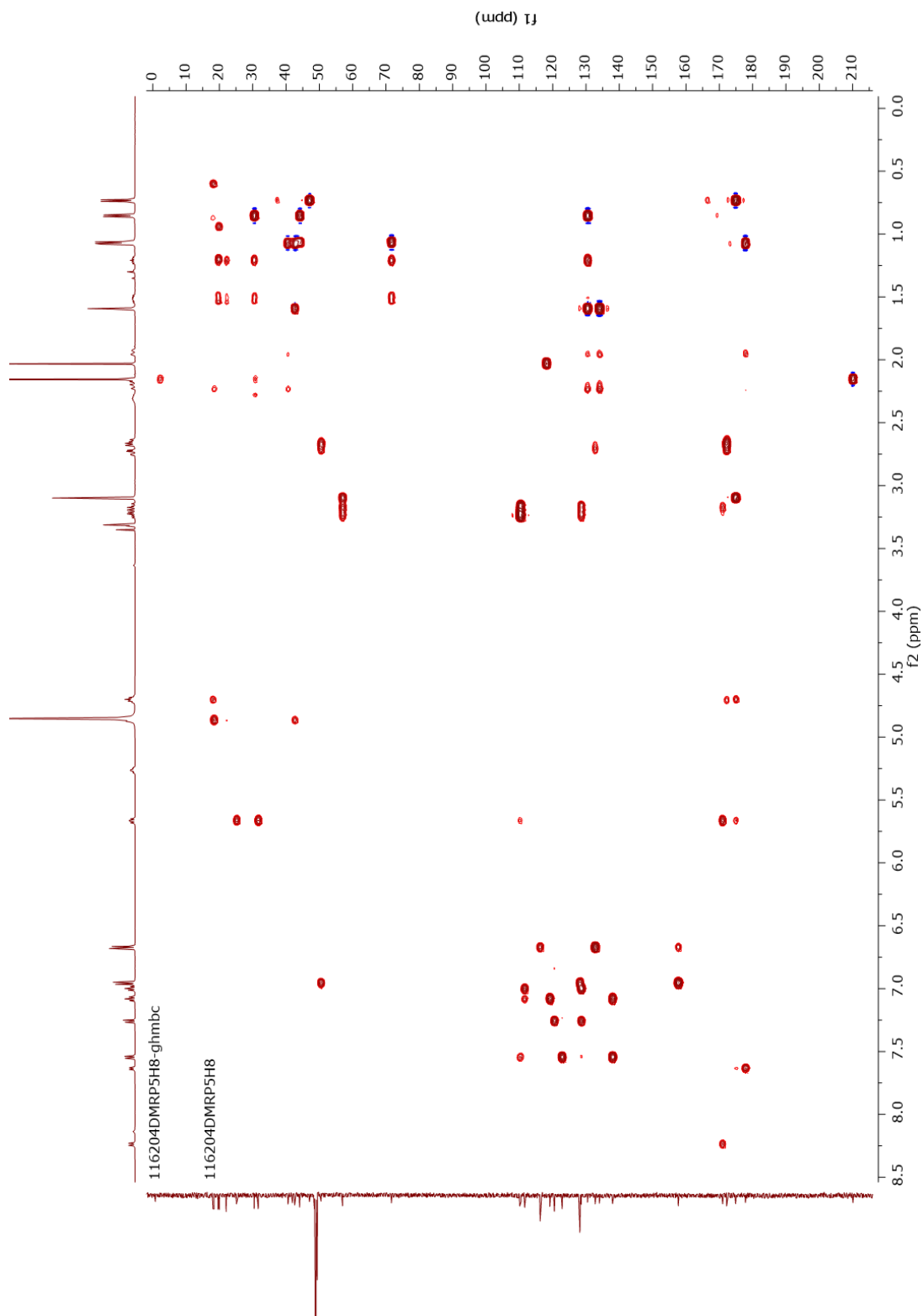


Figura 23. Espectro de gHMBC de la fracción H8, obtenida del HPLC, en metanol deuterado.