

Nuevos antitumorales de origen marino*

JOSÉ CARLOS MENÉNDEZ

*Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional
de Farmacia*

RESUMEN

Aunque los océanos contienen una biodiversidad muy superior a la de la tierra, su explotación desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos químicos apenas se ha iniciado, conociéndose en la actualidad únicamente unos 11.000 productos naturales de origen marino frente a más de 155.000 terrestres. En este discurso se hace una breve revisión general de los principales compuestos antitumorales de origen marino, estudiándose después con mayor detalle los grupos de las piridoacridinas y las triprostatinas. Se hace también una breve revisión de los mecanismos de la acción antitumoral de estos compuestos, entre los que pueden mencionarse los siguientes: inhibición de la angiogénesis, inducción de apoptosis, interrupción del ciclo celular en diversas fases, fragmentación del ADN a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, inhibición de enzimas relacionadas con el ADN (topoisomeras, polimerasas, factores de transcripción), interacción con tubulina y microtúbulos y despolarización de la membrana de los lisosomas. Finalmente, se revisan algunas rutas sintéticas hacia dos grupos de productos naturales de origen marino, las piridoacridinas y las triprostatinas.

Palabras clave: Antitumorales.—Compuestos marinos.—Piridoacridinas.—Triprostatinas.—Síntesis orgánica.

ABSTRACT

Although oceans cover about 70% of the Earth's surface and contain most of the biosphere, they are almost unexplored regarding the search for new chemical

* Versión resumida del discurso de toma de posesión como Académico Correspondiente, pronunciado el 7 de octubre de 2004 en la Real Academia Nacional de Farmacia.

entities. Thus, only about 11,000 marine natural products are known, in contrast to more than 155,000 terrestrial compounds. In this talk, after a schematic review of the main marine antitumour compounds and their mechanisms of action, the pyridoacridines and tryprostatins are discussed in more detail. The mechanisms of antitumour activity are also briefly reviewed including angiogenesis inhibition, apoptosis induction, interruption of the cell cycle at several stages, DNA fragmentation through the generation of reactive oxygen species, inhibition of DNA-related enzymes (topoisomerases, polymerases, transcription factors), interaction with tubulin and microtubules and lysosome membrane depolarization. Finally, some routes for the synthesis of the pyridoacridines and the tryprostatins are discussed.

Key words: Antitumour compounds.—Marine compounds.—Pyridoacridines.—Tryprostatins.—Organic synthesis.

EXTENDED SUMMARY

New marine antitumour compounds

Although oceans cover about 70% of the Earth's surface and contain most of the biosphere, they are almost unexplored regarding the search for new chemical entities. Thus, only about 11,000 marine natural products are known, in contrast to more than 155,000 terrestrial compounds.

About 70% of the marine organisms that have yielded natural products belong to five *phyla*, namely *Porifera*, *Mollusca*, *Cnidaria*, *Echinodermata* and *Tunicata*. They are normally very primitive organisms that use bioactive secondary metabolites as an environmental adaptation mechanism and, because they often inhabit unique ecological niches, can be expected to produce structurally unique compounds, among which ecteinascidin-743 (trabectedin), aplidin, bryostatin, the dolastatins, kahalalide F and discodermolide, are currently undergoing clinical evaluation. Their mechanisms of action are very varied, and include angiogenesis inhibition, apoptosis induction, interruption of the cell cycle at several stages, DNA fragmentation through the generation of reactive oxygen species, inhibition of DNA-related enzymes (topoisomerases, polymerases, transcription factors), interaction with tubulin and microtubules and lysosome membrane depolarization.

Pyridoacridines are a group of strongly coloured, polycyclic alkaloids isolated from marine organisms, with potent cytotoxic activities. Their mechanism of action is not completely understood, although topoisomerase II inhibition, apoptosis induction and oxygen radical generation have been proved to take place in the case of ascididemin. Pyridoacridines are obtained in tiny amounts from their natural sources because they are not easily accesible and also because they produce very low concentrations of the alkaloids. This has stimulated their preparation by total synthesis, and strategies based on the use of hetero Diels-Alder, Suzuki and Friedländer reactions as the key steps are discussed. Finally, a route is described for the total synthesis of tryprostatin B, a cell cycle inhibitor isolated from a marine fungal strain, based on the tandem prenylation-cyclization of a 2,5-piperazinedione precursor followed by rearrangement of the prenyl chain.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en los países desarrollados, de manera que una de cada tres personas se verá afectada por esta enfermedad y entre un 20 y un 25% fallecerá por su causa. A diferencia de lo que sucede en otros campos terapéuticos, la quimioterapia del cáncer está dominada por los productos naturales, que suponen más del 60% de los fármacos utilizados con este fin. En este contexto, comentaré a continuación algunos de los avances realizados en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales en fuentes de origen marino.

Como es bien sabido, el océano cubre el 70% de la superficie del planeta y la biodiversidad en su seno es muy superior a la existente en la tierra, estimándose que contiene alrededor del 95% de la biosfera. Pese a ello, los océanos están todavía casi inexplorados desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos químicos, y actualmente se conocen solamente unos 11.000 compuestos marinos frente a unos 155.000 de origen terrestre. Estos productos naturales de origen marino poseen con frecuencia estructuras y mecanismos de acción biológica sumamente originales, que los hacen sumamente interesantes como modelos para la búsqueda de nuevos fármacos (1).

Si se examina una distribución de los productos naturales marinos en función de la taxonomía de los organismos de los que proceden (2), se observa que aproximadamente un 70% del total corresponde a cinco grupos: esponjas, celentéreos, moluscos, tunicados y equinodermos. Se trata de organismos primitivos, poseedores de sistemas inmunitarios muy rudimentarios, que con frecuencia viven inmóviles y que habitan nichos ecológicos muy poblados. La evolución de estos organismos se ha dirigido hacia la producción de sustancias químicas con las que interactúan con su entorno, incluyendo compuestos citotóxicos para defenderse de sus predadores o de infecciones, por lo que pueden constituir una fuente muy importante de nuevos antitumorales (3).

Algunos productos del metabolismo secundario de estos organismos marinos han alcanzado la fase clínica de su desarrollo (4). Entre ellos, mencionaremos en primer lugar la briostatina, aislada por

primera vez a partir del briozoo *Bugula neritina*. Su primer ensayo clínico se llevó a cabo por el National Cancer Institute de Estados Unidos (NCI), siendo necesario recolectar 13 toneladas de organismo y utilizar técnicas cromatográficas a gran escala para obtener 18 g de compuesto para este estudio clínico inicial. Actualmente se encuentra en fase II, y también ha servido de modelo para la preparación de numerosos análogos de síntesis.

De la babosa marina *Dolabella auricularia* se han aislado numerosos péptidos bioactivos, incluyendo el antitumoral dolastatina 10. Aunque en los ensayos de fase II este compuesto demostró una actividad insuficiente frente a varios tumores, ha servido de modelo para la preparación de numerosos análogos de síntesis. Destacaremos la auristatina PE, que se diferencia del modelo en la ausencia del anillo de tiazol señalado en la figura 1, y que se encuentra actualmente en fase II.

El primer compuesto marino que se ensayó en clínica fue la didemnina, aislada por el grupo de Rinehart en la universidad de Illinois a partir del tunicado *Trididemnum solidum* (5). Resultó demasiado tóxica, lo que se ha atribuido posteriormente al empleo de dosificaciones inadecuadas, por lo que fue abandonada. No obstante, el desarrollo de este compuesto sentó las bases para la puesta a punto de métodos de cultivo y extracción a gran escala que han resultado esenciales para el desarrollo de otros fármacos marinos (6). Actualmente ha sido reemplazada por la aplidina, de la empresa española PharmaMar, que aunque es estructuralmente muy similar a ella, resulta menos tóxica y se encuentra actualmente en fase II. Otro compuesto procedente de la colaboración entre Rinehart y PharmaMar (7) es la ecteinascidina 743 o trabectedina, que se encuentra en fase III y será con toda probabilidad el primer compuesto de origen marino en alcanzar el mercado (figura 3). Procede del tunicado *Ecteinascidia turbinata* y se obtuvo inicialmente por extracción a partir de este organismo, obtenido por técnicas de maricultura, pero en la actualidad se obtiene por semi-síntesis a partir de un metabolito de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, la cianosafracina (8).

La halicondrina B se aisló inicialmente de la esponja *Halichondra okadai*, y después se encontró en otras, siendo necesaria una tone-

lada de una de ellas (*Lyssodendoryx sp.*) para obtener 300 mg de compuesto. Actualmente ha sido reemplazado por un análogo de síntesis, que está en Fase I, en el que se ha sustituido el grupo lactona por una cetona para aumentar su estabilidad. A pesar de la

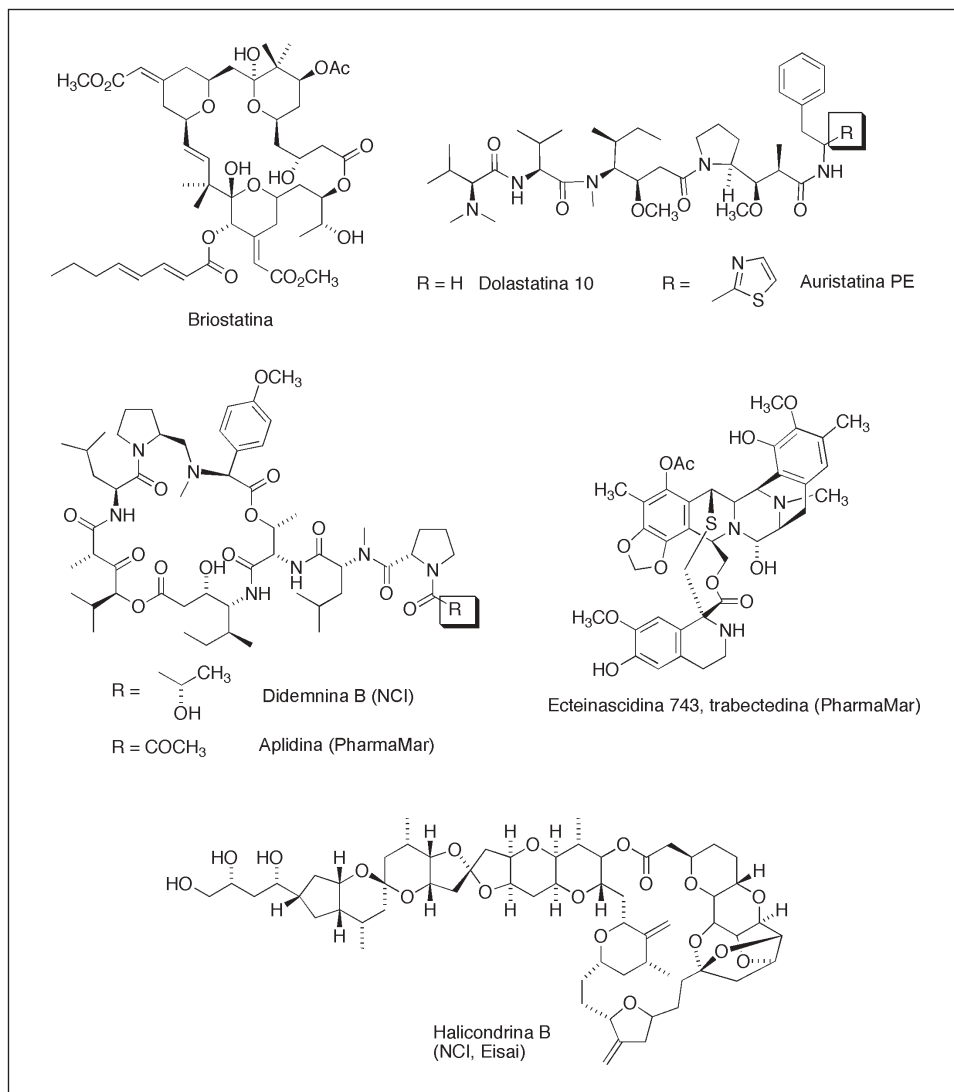


FIGURA 1. Estructuras de la briostatina, dolastatina 10, auristatina PE, didemnina B, ecteinascidina 743 y halicondrina B.

complejidad de este compuesto, el material necesario para los ensayos clínicos se obtiene en la compañía Eisai por síntesis total, utilizando metodología desarrollada por Kishi, lo cual es una prueba del enorme avance de la síntesis orgánica moderna.

La Kahalalida A, un desipéptido cíclico, es producida por algas del género *Bryopsis*, aunque en cantidades muy pequeñas (5 mg a partir de 3 kg de alga). Una fuente más adecuada es la babosa marina *Elysia rufescens*, que se alimenta del alga y concentra el compuesto (2,1 g a partir de 216 g de babosa). Este compuesto se encuentra en fase II para la indicación de cáncer de próstata.

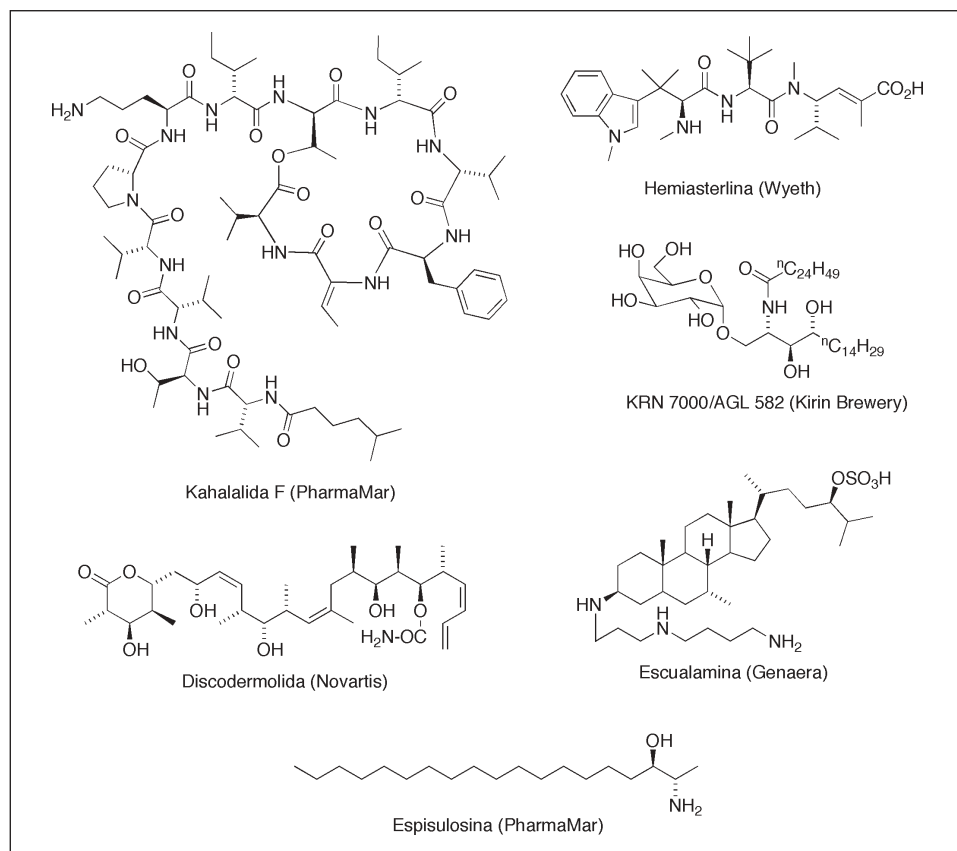


FIGURA 2. Estructuras de la kahalalida A y otros antitumorales de origen marino que se encuentran actualmente en fase de ensayo clínico..

Varios productos procedentes de esponjas se encuentran en fase I, como la discodermolida (de *Discodermia dissoluta*), que, pese a su complejidad, se puede obtener a escala de kilogramos por síntesis total, la hemiasterlina (de *Hemiasterella minor*) y el heterósido conocido como KRN 7000 (de *Agelas sp.*). También es interesante la escualamina, el único compuesto de los mencionados aquí que procede de un vertebrado, el tiburón *Squalus acanthias*. Este esteroide se encuentra actualmente en fase II contra tumores sólidos y, a causa de su efecto inhibidor de la angiogénesis, se está investigando también para otros fines, como el tratamiento de la neovascularización que acompaña a la degeneración macular asociada con la edad.

La espisulosina, un aminoalcohol altamente lipófilo procedente de la almeja antártica *Spisula polynimia* (*Mactromeris polynyma*), está siendo desarrollada por PharmaMar como antitumoral.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE ANTITUMORALES MARINOS

Los mecanismos de la acción antitumoral de estos y otros compuestos de origen marino son demasiado complejos para intentar un comentario completo (9). Mencionaremos entre ellos, los siguientes:

- a) Inhibición del proceso de angiogénesis (desarrollo de nuevos vasos sanguíneos), que es esencial para el crecimiento y propagación de los tumores.
- b) Inducción del proceso de muerte celular programada, o apoptosis, a través de diversos mecanismos.
- c) Inhibición de diversas proteínas específicamente destinadas a regular el ciclo celular, como las quinasas dependientes de ciclinas (*Cyclin-Dependent Kinases*, CDK), las quinasas de "checkpoint" (Chk) y las fosfatasa de especificidad dual.
- d) Las topoisomerasas son otro grupo de enzimas que actúan sobre el ADN, rompiendo una o las dos hebras y volviéndolas a unir tras un giro. Algunos inhibidores, como la sansalvamiida A, actúan inhibiendo la etapa de fijación de la topoisomerasa al ADN. Sin embargo, el mecanismo más habitual de inhibición, característico de compuestos con estructuras pla-

nas que puedan actuar como agentes intercalantes, consiste en la formación de un complejo ternario estable ADN-topoisomerasa-inhibidor, que impide la actuación de la enzima. Este es el modo de acción sobre las topoisomerasas de las pirroloiminoquinonas, piridoacridinas y lamelarinas (10).

- e) Los microtúbulos son los principales componentes del esqueleto celular y están formados por la agregación de heterodímeros de una proteína llamada tubulina, donde existen sitios de unión de algunos antitumorales de uso en terapéutica, como el paclitaxel y los alcaloides de vinca. Son una de las dianas más habituales de antitumorales de origen marino, entre los que pueden destacarse la dolastatina, que se une al sitio de vinca y la discodermolida, en fase I, cuya unión es más potente que la del taxol y probablemente ocurre en el mismo sitio. También son interesantes la halicondrina B, que inhibe la despolimerización de la tubulina por unión a un sitio próximo (pero diferente) al de vinca y la eleuterobina, que se une al sitio del taxol y que ha sido objeto de interesantes estudios de química combinatoria por el grupo de Nicolau.
- f) El ADN es otra de las dianas de antitumorales marinos. Algunos de ellos contienen subestructuras de quinonimina, como las pirroloiminoquinonas y las piridoacridinas (11, 12), lo cual permite que actúen promoviendo la formación de especies reactivas de oxígeno, como se indica en la figura 3.a. La ecteinascidina 743 puede considerarse un agente alquilante del ADN, con el que forma enlaces covalentes, aunque se diferencia de otros agentes alquilantes en que se une de forma específica al surco menor. Esta unión deforma la molécula del ADN, lo cual, unido al efecto estérico debido al fragmento C de la molécula, impide la actuación correcta de diversas enzimas que deben unirse al ADN, fundamentalmente TC-NER (*Transcription-Coupled Nucleotide Excision Repair*) y NF-Y, un factor de transcripción. Desde el punto de vista químico, la unión covalente de la ecteinascidina al ADN se debe a la presencia de una estructura de tipo hemiaminal, que genera un catión iminio con el que reacciona el grupo amino de la posición 2 de una unidad de guanina (figura 3.b).

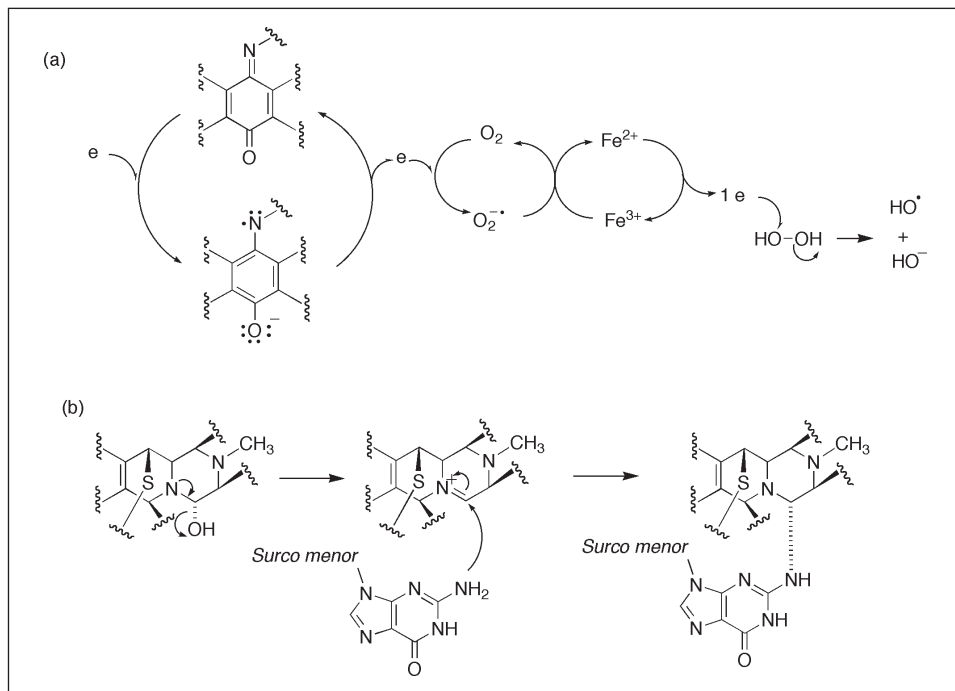


FIGURA 3: (a) Mecanismo de generación de especies reactivas oxigenadas por algunos compuestos de origen marino. (b) Mecanismo de acción de la ecteinascidina 743

EL GRUPO DE LAS PIRIDOACRIDINAS

Una característica común de los organismos marinos mencionados es la de poseer con frecuencia coloraciones muy intensas, que se deben a la presencia de diversas sustancias colorantes, con frecuencia con estructuras heterocíclicas. Entre ellas, destacaremos los compuestos conocidos como piridoacridinas, ya mencionados, que se caracterizan por la presencia de un fragmento de pirido[2,3,4-*kl*]acridina (13). Puede considerarse que hay tres tipos estructurales de piridoacridinas, de los que son ejemplos la anfimedina y la neoanfimedina (aisladas de las esponjas *Amphimedon compressa* y *Xestospongia sp.*, respectivamente), que presentan un anillo adicional fusionado a la cara *h*, la ascididemina (aislada de los tunicados

Didemnum sp. y *Cystodytes dellechiaiei*) y las kuanoniaminas (aislada del tunicado *Didemnum chartacium* y la esponja *Oceanapia sp.*), con un anillo adicional fusionado a la cara *i*, y la eudistona B y la eilatina (ambas aisladas del tunicado *Eudistoma sp.*), con las dos caras ocupadas por anillos adicionales (figura 4).

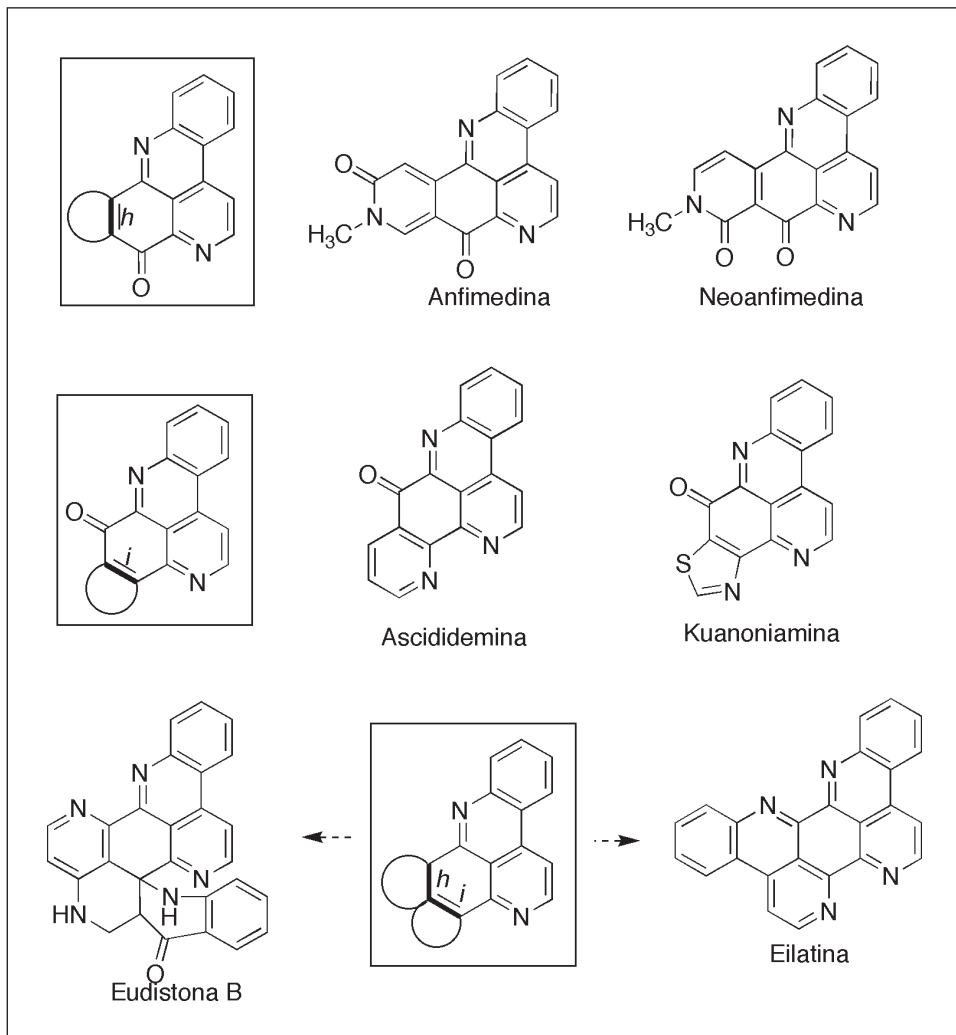


FIGURA 4. *Pyridoacridinas representativas.*

La mayor parte de las piridoacridinas poseen una potente actividad citotóxica, que se traduce en propiedades antitumorales, antifúngicas y antiparasitarias, entre otras. Debe resaltarse, no obstante, que generalmente son compuestos de muy baja solubilidad, lo que hace que sean inadecuados como fármacos tal y como se aíslan de la naturaleza. Los mecanismos implicados en su actuación son complejos y no del todo conocidos, habiéndose estudiado especialmente en el caso de la ascididemia. En primer lugar, la presencia de un fragmento estructural de quinonimina conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno, capaces de fragmentar el ADN (14). Este efecto está reforzado por el carácter quelante de la ascididemia, que se debe a la presencia de un fragmento estructural de 9,10-fenantrolina y que permite su asociación con cationes metálicos capaces de catalizar la transformación del radical superóxido en hidroxilo. Por otra parte, la estructura plana de la ascididemia hace que se comporte como un agente intercalante (15), lo que guarda relación con su capacidad de inhibir la topoisomerasa II (16). Por último, se ha demostrado recientemente la capacidad de la ascididemia de inducir el fenómeno de apoptosis (16, 17) (figura 14). A medida que avanza la investigación sobre las piridoacridinas se van descubriendo otros mecanismos, como por ejemplo la propiedad de la neoanfimedina de inducir a la topoisomerasa a encadenar entre sí moléculas diferentes de ADN (18).

Existen varias razones por las que resulta interesante el estudio de rutas de síntesis hacia las piridoacridinas. En primer lugar, se puede considerar que la estructura de estos compuestos sólo se conoce con seguridad cuando se ha confirmado por síntesis total. Esta era una situación habitual en la química de productos naturales antes del desarrollo de las técnicas de RMN, pero muy rara en la actualidad. Sin embargo, en el campo de las piridoacridinas se han dado asignaciones estructurales erróneas (19), que se pueden atribuir en parte a su baja solubilidad, que impide la realización de ciertos experimentos de RMN, y en parte a la presencia en sus estructuras de muy pocos hidrógenos y muchos carbonos cuaternarios, lo que hace a veces difícil interpretar los experimentos de correlación heteronuclear.

Un segundo factor que hace interesante la síntesis de las piridoacridinas es su escasez, ya que sus fuentes naturales son poco

accesibles y proporcionan cantidades diminutas de compuesto. Esto hace imposible realizar estudios biológicos más allá de los ensayos preliminares; por citar un ejemplo, para aislar 21 mg de 11-hidroxiacrididemia se necesitaron 11 kg de *Amphicarpa meridiana* (20). Finalmente, el desarrollo de rutas sintéticas debe permitir la preparación de análogos en los que se mejoren las propiedades de las piridoacridinas naturales. En este sentido, debe destacarse que la baja solubilidad de las piridoacridinas las hace inadecuadas para su uso como fármacos, por lo que es esencial disponer de métodos de síntesis de análogos mejorados. En este contexto, voy a comentar a continuación algunos de los proyectos en este campo en que he estado involucrado en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad Complutense, junto a la profesora Avendaño y un elevado número de colaboradores, y que se basan en el desarrollo de las estrategias retrosintéticas que se resumen en la figura 5.

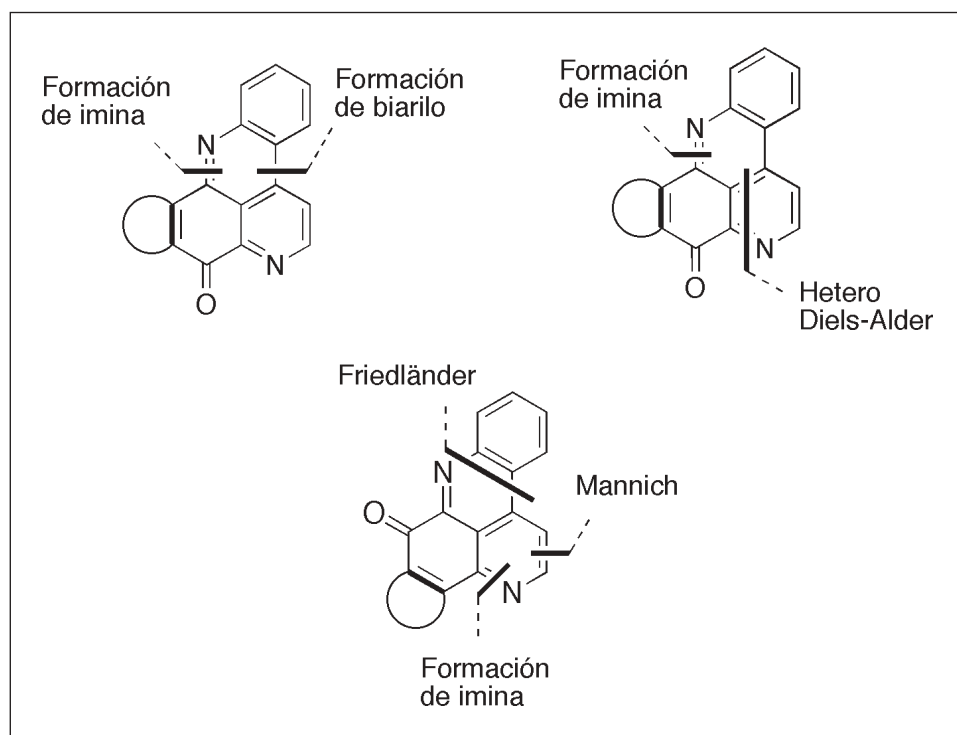


FIGURA 5. Estrategias para la síntesis de sistemas de piridoacridina.

La primera de las estrategias tiene como etapa clave la formación de un sistema de biarilo, una transformación que presenta considerables dificultades a pesar de su aparente sencillez. Los mejores métodos se basan en el empleo de especies organometálicas, y entre ellos pueden destacarse los que implican el uso de catalizadores de paladio. Una de ellas es la reacción de Stille, en la que se consigue la formación de un enlace carbono-carbono a partir de un triflato de arilo y un arilestannano. Esta reacción fue una de las etapas clave de la primera síntesis total de un derivado de piridoacridina, la anfimecina (21). También es de gran importancia la reacción de Suzuki, en la que se unen un ácido arilborónico y un haluro de arilo. Como ejemplo de las estrategias basadas en la formación de sistemas de biarilo, se muestra en la figura 6 la preparación del sistema no sustituido de pirido[2,3,4-*kl*]acridina **6.7**, que era de interés para estudiar su actividad antitumoral y como intermedio de síntesis. El enlace arilo-arilo se creó por medio de una reacción de Suzuki, aunque no había sido aplicada previamente a 4-haloquinolinas, debido a que la de Stille había dado malos resultados en un sustrato

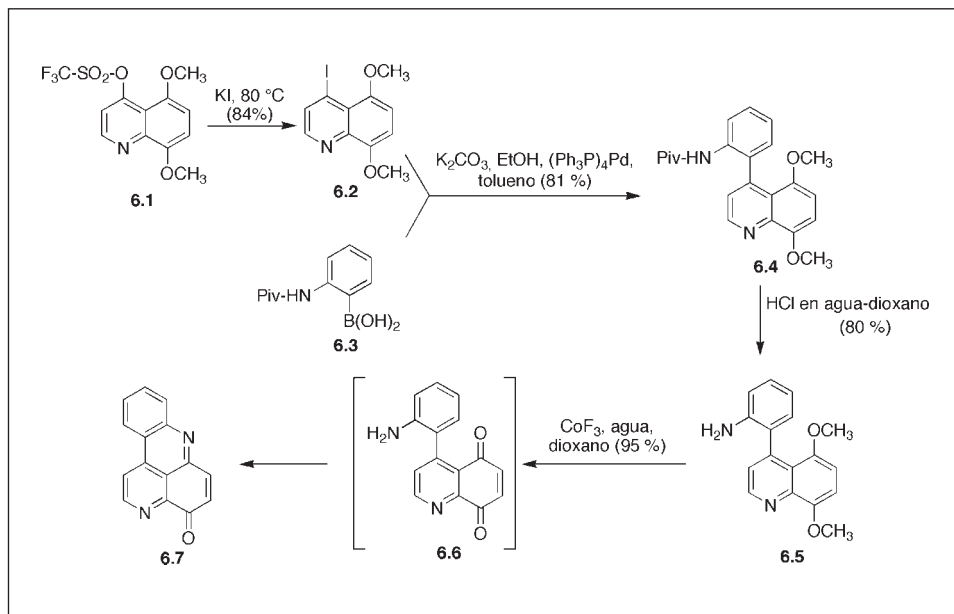


FIGURA 6. Síntesis del sistema no sustituido de pirido[2,3,4-*kl*]acridina.

similar (22). El derivado de 4-yodoquinolina **6.2**, preparado a partir del correspondiente triflato **6.1** (21), se hizo reaccionar con el ácido borónico **6.3** en presencia del complejo $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ para dar **6.4**. Tras una etapa de desprotección se obtuvo el compuesto **6.5**, cuya desmetilación oxidativa en presencia de fluoruro de cobalto dio lugar a **6.6**, no aislado, que se transformó espontáneamente en **6.7** (23). La elección del fluoruro de cobalto como agente oxidante fue clave para el éxito de la síntesis, ya que la presencia de un grupo amino en **6.5** aumenta la densidad electrónica del anillo aromático al que está unido y por tanto su facilidad para la oxidación, por lo que el empleo de agentes más convencionales, como por ejemplo el nitrato cérico amónico, condujo a mezclas muy complejas.

La segunda estrategia de síntesis se basa en el empleo de reacciones de tipo hetero Diels-Alder. Como se observa en la figura 5, la desconexión de este tipo conduce a una quinona y a un 1-azadieno, en el que es necesaria la presencia de un grupo donador electrónico (dimetilamino, normalmente) para compensar el efecto aceptor del doble enlace $\text{C}=\text{N}$. Un problema que plantea el uso de 1-dimetilamino-1-azadienos es la posibilidad de liberación de dimetilamina al medio, lo que puede dar lugar a reacciones no deseadas. Existen varios procedimientos que permiten minimizar estos problemas, algunos desarrollados en nuestro laboratorio. Uno de ellos es el uso de resinas de poliestireno electrófilas, que forman un derivado covalente con la dimetilamina (24). Aunque este procedimiento mejoró la mayor parte de las reacciones ensayadas, no fue adecuado para el caso de los 4-aril-1-dimetilamino-1-azadienos necesarios para la preparación de piridoacridinas ya que, a causa de su baja reactividad, fue necesario el empleo de condiciones de reflujo, en las cuales el producto de reacción se une covalentemente a la resina. Otros procedimientos ensayados, como la realización de las reacciones sobre un soporte de gel de sílice, que retiene la dimetilamina gracias a su acidez (25), y la sustitución del sustituyente dimetilamino por otros que no liberan especies nucleófilas, como los grupos acetilamino (26) y tosilamino, fueron también inadecuados para los 4-aril-1-dimetilamino-1-azadienos, aunque resultaron de interés para otros proyectos (27). El único método que permitió mejorar los resultados de la reacción de Diels-Alder de este tipo de azadienos, ya descrito por otros autores, consistió en el empleo de una corriente de gas

inerte para arrastrar la dimetilamina formada durante la reacción. En estas condiciones, el azadieno **7.1** reaccionó con la quinona **7.2** para dar el compuesto **7.3** con rendimiento aceptable. La síntesis se completó por aromatización a **7.4** en presencia de carbono-paladio y ciclación hidrolítica a **7.5** (28) (figura 7). Este compuesto se puede considerar como un regioisómero de la anfimedina y la neoanfimedina, y ha mostrado una excelente actividad *in vitro* frente a algunos tumores sólidos (29). Su principal limitación radica en una baja solubilidad en todos los medios, que impide su correcta evaluación *in vivo*, aunque actualmente estamos preparando una serie de análogos destinados a resolver este problema.

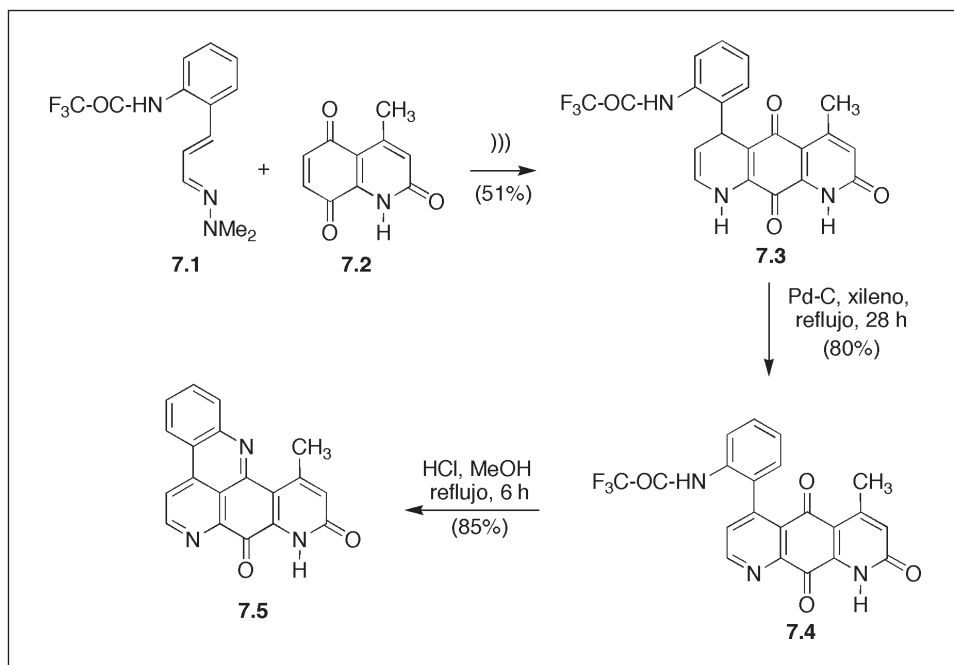


FIGURA 7. Síntesis de un regioisómero de anfimedina y neoanfimedina a través de una reacción hetero Diels-Alder

Como se deduce de la figura 7 y de otros casos similares, la reacción entre 1-azadienos y quinolinaquinonas conduce de forma mayoritaria o exclusiva a derivados de 1,8-diazaantraquinona. Debido a que existen productos naturales con fragmentos de 1,5-diazaan-

traquinona, sería interesante disponer de un método para invertir la regioselectividad de la reacción, y la solución más general a ese problema ha sido la introducción de un halógeno en la posición 6 de la quinolina (30). Cuando se aplica a la preparación de sistemas de piridoacridina, este método tiene el inconveniente de que impide la utilización del azadieno **7.1** porque resultan mezclas complejas, probablemente debido a la hidrólisis del grupo trifluoroacetamido de **7.1** por el bromuro de hidrógeno liberado a partir del aducto de Diels-Alder. Una solución a este problema puede consistir en reemplazar el grupo trifluoroacetamido por un grupo nitro, que no es sensible a la hidrólisis pero tiene el inconveniente de que, a causa de su efecto fuertemente aceptor, hace disminuir la ya escasa reactividad de los 4-arilazadienos, por lo que es necesario encontrar algún método para acelerar la reacción de Diels-Alder. Fracasó el procedimiento más habitual, consistente en el empleo de ácidos de Lewis como catalizadores, porque en su presencia la reacción se desvía hacia la producción de derivados de furo[2,3-*f*]quinolina (26). Por este motivo, aunque apenas existían antecedentes de su empleo en reacciones de Diels-Alder, decidimos estudiar el efecto de la irradiación ultrasónica sobre nuestras reacciones porque los efectos químicos de los ultrasonidos se deben a la generación local de altas temperaturas y presiones como consecuencia del fenómeno de cavitación, y es bien conocido que las reacciones de Diels-Alder se aceleran por efecto de presiones muy elevadas. Después de un estudio inicial que demostró una considerable aceleración de las reacciones de 1-dimetilamino-1-azadienos sencillos con una amplia serie de dienófilos en condiciones de irradiación ultrasónica (31), aplicamos esta técnica a la síntesis de la deshidrolabuanina B, un regioisómero de la meridina que ha sido aislado recientemente de la esponja *Biemnia fortis* y que tiene un gran interés biológico por ser un inductor de la neuritogénesis (32). Como se muestra en la figura 8.a, la reacción entre el azadieno **8.1** y la quinona halogenada **8.2** en condiciones de irradiación ultrasónica condujo al derivado de 1,5-diazaantraquinona **8.3**, que fue transformada posteriormente en el producto natural por ciclación reductora seguida de hidrólisis. Una ruta alternativa, que no se comentará aquí, utilizó como etapa clave una reacción de Stille (33). La síntesis de la deshidrolabuanina B fue el resultado de una colaboración con el Instituto Biomar.

En lo que se refiere a la tercera estrategia de la figura 5, voy a comentar su aplicación a la síntesis de la tetrahidroascididemina. Como se muestra en la figura 8.b, la reacción de Friedländer entre la *o*-aminoacetofenona **8.4** y la ciclohexanona, seguida de desmeti-

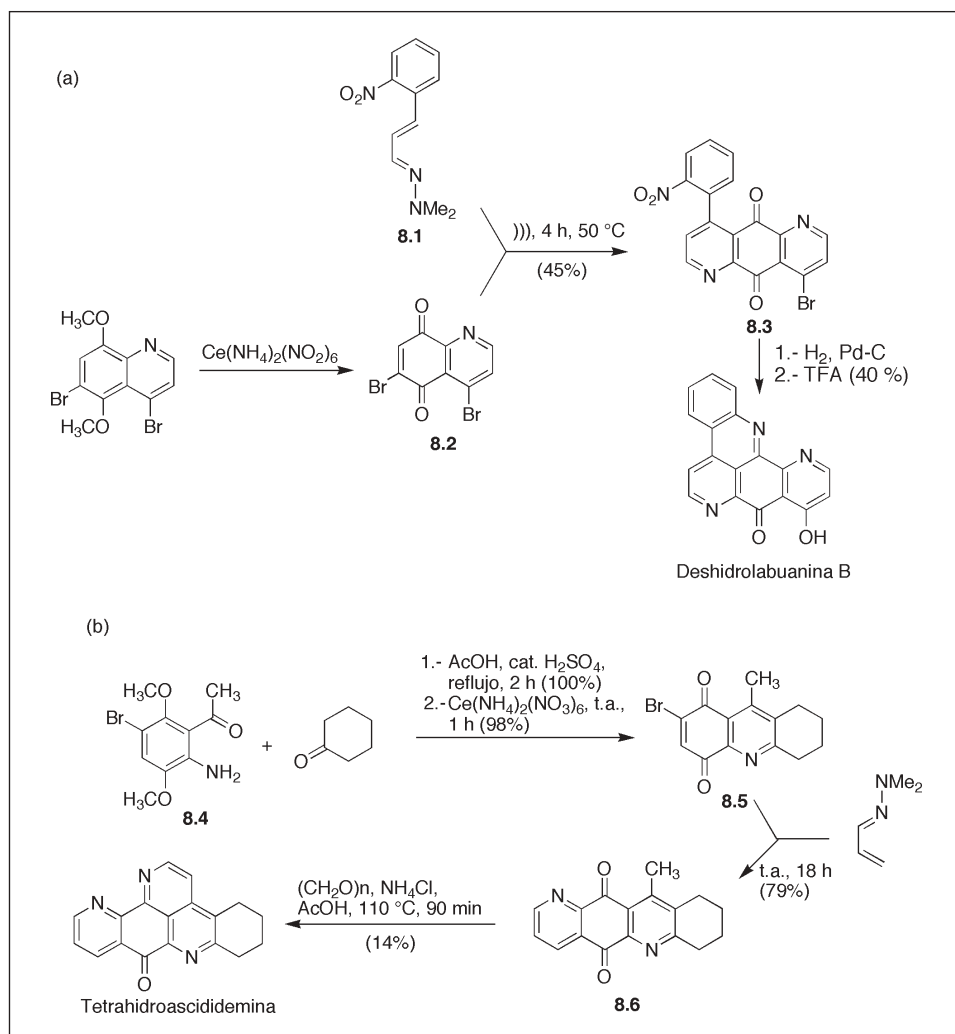


FIGURA 8: (a) Síntesis de la deshidrolabuanina B con una reacción hetero Diels-Alder como etapa clave. (b) Síntesis de la tetrahidroascididemina basada en el uso conjunto de reacciones de Friedländer, hetero Diels-Alder y Mannich

lación oxidativa con nitrato cérico amónico, proporcionó el derivado de acridinaquinona **8.5**. Una reacción de tipo hetero Diels-Alder de este compuesto con la dimetilhidrazona de la acroleína condujo al sistema tetracíclico **8.6** (34), que se transformó en la tetrahidroascididemina por medio de una reacción de Mannich (35). Este compuesto presenta una actividad antitumoral *in vitro* similar a la de la ascididemina, lo que indica que la actividad del producto natural no requiere que su anillo D sea aromático. Este descubrimiento es significativo porque puede servir de base para la preparación de análogos no totalmente planos de ascididemina que mantengan la actividad y para los que cabe esperar una mayor solubilidad que la del producto natural ya que deben estar dificultadas las interacciones de apilamiento entre sistemas aromáticos

PRODUCTOS NATURALES PROCEDENTES DE MICROORGANISMOS MARINOS. SÍNTESIS DE LA TRIPROSTATINA B

Con frecuencia ocurre que dos o más grupos de organismos marinos producen el mismo tipo de sustancias; por ejemplo, los compuestos del grupo de las piridoacridinas se han aislado a partir de esponjas y tunicados. Si se considera la enorme distancia evolutiva entre ambos grupos de organismos, resulta sorprendente que produzcan compuestos similares. Este tipo de situaciones han conducido a la sospecha de que quizá muchos de los compuestos aislados de invertebrados marinos sean producidos en realidad por microorganismos asociados, lo cual se ha confirmado en algunos casos (36, 37). Hay que tener en cuenta, además, que los microorganismos asociados pueden constituir hasta un 40% de la masa de determinados invertebrados marinos, como las esponjas. Si se consiguiera identificar y cultivar estos microorganismos, los compuestos derivados de ellos podrían obtenerse por fermentación y sería mucho más sencillo disponer de cantidades adecuadas para los ensayos biológicos. Por el mismo motivo, se puede considerar muy interesante la investigación de productos naturales aislados de microorganismos marinos (38).

Entre los productos de interés aislados de microorganismos marinos, mencionaremos las triprostatinas, procedentes de una cepa

marina del hongo *Aspergillus fumigatus*. Estos compuestos son de interés biológico por comportarse como inhibidores del ciclo celular en la transición G₂/M por inhibición de la interacción entre una de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP-2) y el extremo C-terminal de la tubulina (39), y también como inhibidores de BRP, una proteína de resistencia a antitumorales (40). Debido a este interés, iniciamos un proyecto orientado al desarrollo de una síntesis

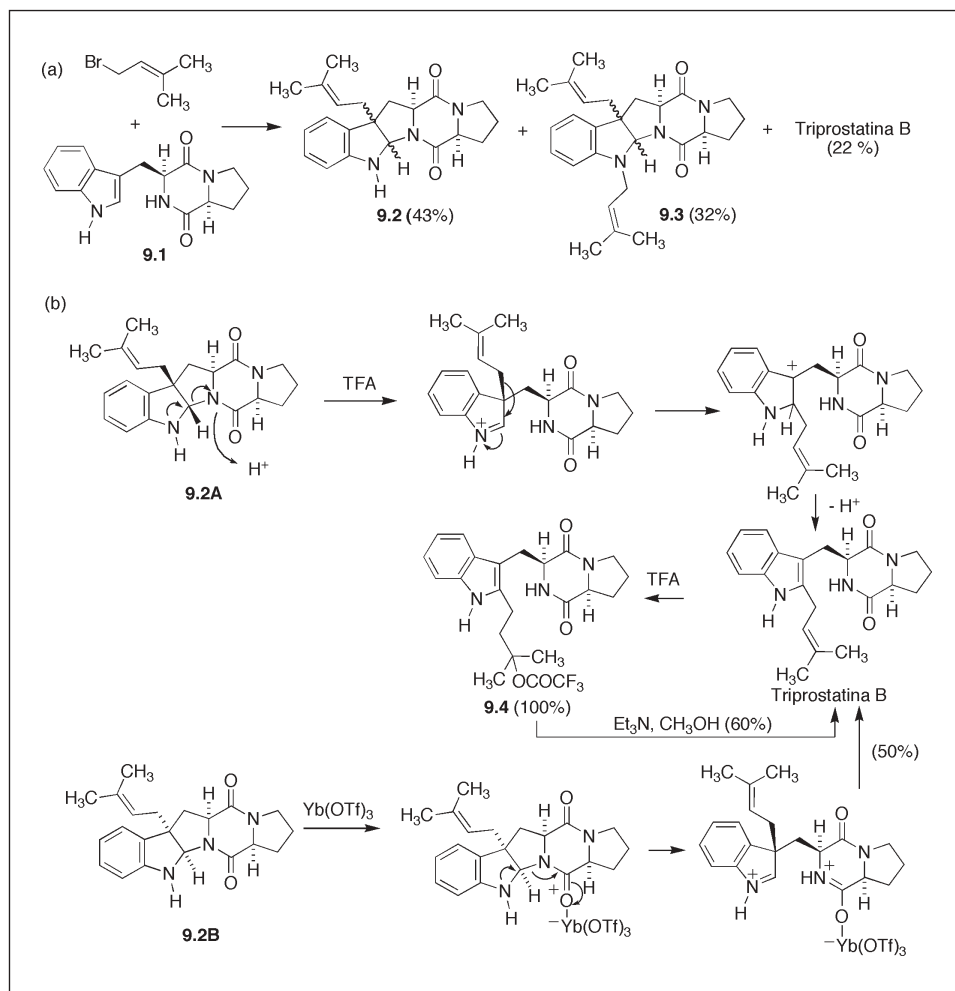


FIGURA 9. Síntesis total de la triprostatina B.

total de la triprostatina B que pudiera adaptarse a la preparación de análogos. En aquel momento existían dos síntesis de las triprostatinas, basadas en la preparación y posterior transformación de un derivado del 2-prenilriptófano. Nuestra estrategia, en cambio, se basaba en un proceso tandem de alquilación/ciclación de la piperazinadiona **9.1** por tratamiento con bromuro de prenilo en medio acuoso tamponado, que proporcionó los compuestos **9.2**, **9.3** (ambos como una mezcla de dos diastereoisómeros) y triprostatina B.

De los dos diastereoisómeros de estructura **9.2**, el que presenta el grupo prenilo en *trans* respecto al hidrógeno de prolina (compuesto **9.2A**) experimentó la transposición deseada por tratamiento con ácido trifluoroacético, según el mecanismo resumido en la figura 10. No fue posible evitar que el doble enlace de la triprostatina así obtenida reaccionara con el ácido trifluoroacético para dar el compuesto **9.4**, que fue posteriormente transformado en el compuesto deseado por eliminación en presencia de base. En cambio, el otro diastereoisómero (compuesto **9.2B**) no experimentó la transposición en presencia de ninguno de los ácidos protónicos ensayados, aunque pudimos lograrla por tratamiento con triflato de iterbio, un ácido de Lewis (41). Utilizando la misma estrategia, se llevó a cabo la preparación del análogo de triprostatina B derivado de alanina, aunque ni este compuesto ni la propia triprostatina B mostraron actividad antitumoral significativa en las líneas celulares donde se ensayaron.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La resolución del problema del suministro de cantidades suficientes de los compuestos de origen marino es esencial para que su uso pueda generalizarse (42). Este objetivo requerirá mejoras en las técnicas de cultivo de organismos marinos, incluyendo sus microorganismos simbiotes productores de compuestos de interés, en caso de haberse identificado, lo que es extremadamente difícil a causa de su íntima adaptación evolutiva al organismo hospedador. Una aproximación alternativa puede basarse en la clonación y expresión de los genes responsables de la biosíntesis de los compuestos de interés, que permitiría la creación de cepas bacterianas susceptibles de cultivo que los contengan. También es de esperar que se registren

avances significativos en el desarrollo de métodos sintéticos, que permitan el acceso eficiente a los productos naturales y la preparación de análogos mejorados. Otro campo en el que cabe esperar avances es el del desarrollo de métodos de ensayo biológico ligados al mecanismo de acción, lo que permitirá seleccionar los compuestos prometedores en función de éste y no de una simple actividad citotóxica.

No quisiera concluir sin reiterar mi agradecimiento a los miembros de esta corporación por acogerme en ella, y a todos los presentes por su amable atención. Muchas gracias a todos.

REFERENCIAS

- (1) MAYER, A. M. S. (2002): Current Marine Pharmacology Contributions to New Drug Development in the Biopharmaceutical Industry. *Pharmaceutical News*, 9, 479.
- (2) BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MURO, M. H. G. (2003): Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 1.
- (3) GARCÍA-FERNÁNDEZ, L. F.; REYES, F.; SÁNCHEZ-PUELLES, J. M. (2002): The Marine Pharmacy: New Antitumoral Compounds from the Sea. *Pharmaceutical News*, 9, 495.
- (4) NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. C. (2004): Advanced Preclinical and Clinical Trials of Natural Products and Related Compounds from Marine Sources. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1693.
- (5) RINEHART, K. (2000): Antitumor Compounds from Tunicates. *Med. Res. Rev.*, 20, 1.
- (6) VERA, M.; JOULLIE, M. M. (2002): Natural Products as probes of Cell Biology: 20 Years of Didemnin Research. *Med. Res. Rev.*, 22, 102.
- (7) JIMENO, J.; FAIRCLOTH, G.; FERNÁNDEZ SOUSA-FARO, J. M.; SCHEUER, P.; RINEHART, K. (2004): New Marine Derived Anticancer Therapeutics? A Journey from the Sea to Clinical Trials. *Mar. Drugs*, 1, 14.
- (8) MANZANARES, I.; CUEVAS, C.; GARCÍA-NIETO, R.; MARCO, E.; GAGO, F. (2001): Advances in the Chemistry and Pharmacology of Ecteinascidins, A Promising New Class of Anticancer Agents. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, 1, 257.
- (9) NAGLE, D. G.; ZHOU, Y.-D.; MORA, F. D.; MOHAMMED, K. A.; KIM, Y.-P. (2004): Mechanism Targeted Discovery of Antitumor Marine Natural Products. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1725.
- (10) DIAS, N.; VEZIN, H.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C. (2005): Topoisomerase Inhibitors of Marine Origin and Their Potential Use as Anticancer Agents. *Topics in Current Chemistry* 253, 89.
- (11) DELFOURNE, E.; BASTIDE, J. (2003): Marine Pyridoacridine Alkaloids and Synthetic Analogues as Antitumor Agents. *Med. Res. Rev.*, 23, 234.

- (12) MARSHALL, K. M.; BARROWS, L. R. (2004): Biological Activity of Pyridoacridines. *Nat. Prod. Rev.*, *21*, 731.
- (13) SKYLER, D.; HEATHCOCK, C. H. (2002): The Pyridoacridine Family Tree: A Useful Scheme for Designing Synthesis and Predicting Undiscovered Natural Products. *J. Nat. Prod.*, *65*, 1573.
- (14) MATSUMOTO, S. S.; BIGGS, J.; COPP, B. R.; HOLDEN, J. A.; BARROWS, L. R. (2003): Mechanism of Ascidiemin-Induced Cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, *16*, 113.
- (15) BONNARD, I.; BONTEMPS, LAHMY, S.; BANAIGS, B.; COMBAUT, G.; FRANCISCO, C.; COLSON, P.; HOUSSIER, C.; WARING, M. J.; BAILY, C. (1995): Binding to DNA and Cytotoxic Evaluation of Ascidiemin, the Major Alkaloid from the Mediterranean Ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *Anticancer Drug Des.*, *10*, 333.
- (16) DASSONNEVILLE, L.; WATTEZ, N.; BALDEYROU, B.; MAHIEU, C.; LANSIAUX, A.; BANAIGS, B.; BONNARD, I.; BAILY, C. (2000): The Marine Alkaloid Ascidiemin Stimulates DNA Cleavage by Topoisomerase II and Induces Apoptosis in Leukemia Cells. *Biochem. Pharmacol.*, *60*, 527.
- (17) DIRSCH, V. M.; KIRSCHKE, S. O.; ESTERMEIER, M.; STEFFAN, B.; VOLLMAR, A. M. (2004): Apoptosis Signaling Triggered by the Marine Alkaloid Ascidiemin is Routed via Caspase-2 and JNK to Mitochondria. *Oncogene*, *23*, 1586.
- (18) MARSHALL, K. M.; MATSUMOTO, S. S.; HOLDEN, J. A.; CONCEPCIÓN, G. P.; TASDEMIR, D.; IRELAND, C. M.; BARROWS, L. R. (2003): The Anti-Neoplastic and Novel Topoisomerase II-Mediated Cytotoxicity of Neoamphimedine, a Marine Pyridoacridine. *Biochem. Pharmacol.*, *66*, 447.
- (19) DELFOURNE, E.; BONTEMPS-SUBIELOS, N.; BASTIDE, J. (2000): Structure Revision of the Marine Pentacyclic Aromatic Alkaloid: Cystodamine. *Tetrahedron Lett.*, *41*, 3863.
- (20) SCHMITZ, F. J.; DE GUZMÁN, F. S.; HOSSAIN, M. B.; VAN DER HELM, D. (1991): Cytotoxic Aromatic Alkaloids from the Ascidian *Amphicarpa Meridiana* and *Leptoclinides sp.*: Meridine and 11-Hydroxyascidiemin, *J. Org. Chem.*, *56*, 804.
- (21) ECHAVARREN, A. M.; STILLE, J. K. (1988): Total Synthesis of Amphimedine. *J. Am. Chem. Soc.*, *110*, 4051.
- (22) ECHAVARREN, A. M. (1996): Recent Developments in the Synthesis of Marine Pyridoacridine Alkaloids. *Advances in Nitrogen Heterocycles*, *2*, 211.
- (23) PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2003): Efficient Synthesis of the Pyrido[2,3,4-*kl*]Acridin-4-One System Common to Several Cytotoxic Marine Alkaloids. *Tetrahedron Lett.*, *44*, 6003.
- (24) PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2003): Improvements in the Hetero Diels-Alder Reactions of 1-Dimethylamino-1-azadienes in the Presence of an Electrophilic Scavenger Resin. *Synlett*, 205.
- (25) PÉREZ, J. M.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; ALONSO, M. A.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1996): Silica Gel-Supported Hetero Diels-Alder Reactions of Quinolinetrienes. *Tetrahedron Lett.*, *37*, 6955.
- (26) PÉREZ, J. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1995): 1-Acylamino-1-azadienes as an Alternative to 1-Dimethylamino-1-azadienes in the Preparation of 1,8-Diazaanthracene-2,9,10-triones. *Tetrahedron*, *51*, 6573.

- (27) AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1998): Recent Progress in the Synthesis of Antitumour Azaanthraquinones. *Recent Res. Devel. in Organic Chem.*, 2, 69.
- (28) BLANCO, M. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2000): "(*o*-Trifluoroacetamido)-cinnamaldehyde Dimethylhydrazone, a Useful Azadiene in the Hetero Diels-Alder Approach to the Pyrido[2,3,4-*kl*]acridine system". *Synlett*, 689.
- (29) FERNÁNDEZ PUENTES, J. L.; GARCÍA GRÁVALOS, D.; AVENDAÑO, C.; BLANCO, M. M.; MENÉNDEZ, J. C. Cytotoxic Compounds: Derivatives of the Pyrido[2,3,4-*kl*]acridine Ring System. US Patent 6,656,948 B2 (2-Diciembre-2003).
- (30) PÉREZ, J. M.; LÓPEZ-ALVARADO, P.; PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2000): Concise Preparation of 1,8-Diazaanthracene-2,7,9,10-tetraones. Two Alternative Syntheses of the Natural Antifolate Diazaquinomycin A. *Tetrahedron* 56, 1561.
- (31) VILLACAMPA, M.; PÉREZ, J. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1994): Ultrasound Assisted Diels-Alder Reactions of 1-Azadienes with "Normal" Electronic Demand. *Tetrahedron*, 50, 10047.
- (32) AOKI, S.; WEI, H.; MATSUI, K.; RACHMAT, R.; KOBAYASHI, M. (2003): Pyridoacridine Alkaloids Inducing Neuronal Differentiation in a Neuroblastoma Cell Line, from Marine Sponge *Biemna fortis*. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 1139.
- (33) DE LA FUENTE, J. A.; MARTÍN, M. J.; BLANCO, M. M.; PASCUAL-ALFONSO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2001): A Regioisomer of the Marine Alkaloid Meridine Exhibits Selective *in vitro* Cytotoxicity for Solid Tumours. *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 1807.
- (34) BLANCO, M. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1999): Concise Synthesis of Tetrahydro Derivatives of the Pyrido[2,3-*b*]acridine and Pyrido[3,2-*b*]acridine Ring Systems. *Tetrahedron*, 55, 12637.
- (35) BLANCO, M. M.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (1999): Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroascididemin. *Tetrahedron Lett.*, 40, 4097.
- (36) LUESCH, H.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J.; MOOBERRY, S. L.; CORBETT, T. H. (2001): *J. Nat. Prod.*, 64, 907.
- (37) DE ROSA, S.; MITOVA, M.; TOMMONARO, G. (2003): Marine Bacteria Associated with Sponge as Source of Cyclic Peptides. *Biomol. Eng.*, 20, 311.
- (38) FENICAL, W.; SETHNA, K. M.; LLOYD, G. K. (2002): Marine Microorganisms as a Developing Resource for Drug Discovery. *Pharmaceutical News*, 9, 489.
- (39) USUI, T.; KONDOH, M.; CUI, C.; MAYUMI, T.; OSADA, H. (1998): Tryprostatin A, a Specific and Novel Inhibitor of Microtubule Assembly. *Biochem. J.*, 333, 543.
- (40) WOEHLECKE, H.; OSADA, H.; HERRMANN, A.; LAGE, H. (2003): Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *Int. J. Cancer*, 107, 721.
- (41) CABALLERO, E.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C. (2003): Brief Total Synthesis of the Cell Cycle Inhibitor Tryprostatin B and Related Preparation of its Alanine Analog. *J. Org. Chem.*, 68, 6944.
- (42) PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R. A.; EBEL, R. (2003): Drugs from the Sea? Opportunities and Obstacles. *Mar. Drugs*, 1, 5.