

TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE
BIOMOLÉCULAS DE ORIGEN MARINO SOBRE
CULTIVOS DE CÉLULAS HUMANAS Y MODELOS
ANIMALES DE ENFERMEDADES HUMANAS**

María Roel Sánchez

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA E APLICADA EN CIENCIAS
VETERINARIAS

LUGO

2018

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

**Estudio de los efectos biológicos de biomoléculas de origen marino
sobre cultivos de células humanas y modelos animales de enfermedades
humanas**

Dna. María Roel Sánchez

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Lugo, 8 de Xaneiro de 2018

Asdo. María Roel Sánchez

AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR DA TESE

**Estudio de los efectos biológicos de biomoléculas de origen marino
sobre cultivos de células humanas y modelos animales de enfermedades
humanas**

D. Luis M. Botana López
D. Juan A. Rubiolo Gaytán

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por Dna. María Roel Sánchez,, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Lugo, 8 de Xaneiro de 2018

Asdo. Luis M. Botana López

Asdo. Juan A. Rubiolo Gaytán



Agradecimientos

La mayor parte de las veces todo está dicho y, sin embargo, no quisiera que quedase nada por decir. Para todos vosotros son estas palabras de agradecimiento.

Ha sido un largo camino que emprendí hace ya algún tiempo gracias a Luis y Mercedes. Siempre os estaré agradecida por la oportunidad que me habéis dado.

Gracias también a la gente de Fisio que me acogió en un primer momento, a Jesús, Isa, Henar, Félix y sobre todo a Juan. A Juan, del que tanto he aprendido y sigo aprendiendo, que me ha guiado en este camino y que tantas veces, incluso con un océano de por medio, me ha aconsejado con infinita paciencia. Supongo que la grandeza de la gente se mide por lo que hace y no por lo que dice, y supongo también que es algo que solo se aprende con el tiempo y la experiencia.

A mis compañeros, con los que he compartido todo este tiempo. A los veteranos y a también a los novatos. Somos ya un grupo considerable y el espacio es limitado, así que me perdonareis si no os nombro uno a uno. Gracias a Andrés, una de las mejores personas que he conocido, y a Olalla, con quien empecé este camino y con quien no pude terminarlo porque a veces la vida simplemente es así.

Gracias también a Silvia y al resto de la familia de Cifga por los ratos de conversación que hacen más llevadero el trabajo. Gracias a las chicas y chicos de la asociación, me ha encantado poder contribuir a divulgar la ciencia con todos vosotros. Gracias a Jorge, Pablo y Laura por ser siempre tan positivos y constructivos, ha sido un placer trabajar con vosotros.

Gracias al Dr. Wicha por la oportunidad de ampliar mis horizontes y trabajar en un campo que me apasiona con uno de los mejores grupos de investigación. A todo el personal de su laboratorio que me han “adoptado” y acogido como una más durante el tiempo que estuve con ellos. Gracias también a la Fundación Barrié por darme la oportunidad y particularmente a Montse, por su eficiencia y por estar siempre pendiente de nosotros, incluso cuando somos tantos y estamos tan dispersos.

Gracias a mi *familia americana* del 616 por endulzar mi estancia y facilitarme la adaptación creando un ambiente extraordinario en casa y arrancándome siempre una sonrisa.

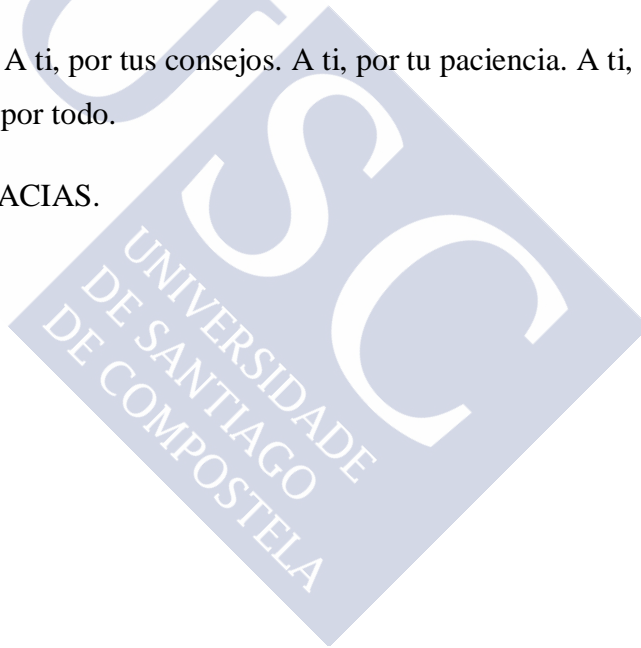
Gracias a Eveth, por todo. Por entenderme, por ayudarme, por tu paciencia, por traerme, por llevarme, por esperarme, por las risas, por la complicidad, por todos esos momentos. Por una amistad que ya ha cruzado el charco y a la que le quedan muchos viajes desde y hacia el Nuevo Mundo. A la resistencia española en A2, especialmente a Carlos, Juan y Alfonso.

A mi familia, a mis padres biológicos y a los adoptivos. A mis dos hermanos y al resto, gracias por guiarme, apoyarme y aguantarme.

A mis amigos, que me han enseñado mucho más sobre el mundo durante este tiempo de lo que he aprendido en esta Tesis. Sobre todo a David y Begoña, para los que simplemente no tengo palabras. A Goretti, Álex, Alberto y Rubén. No se puede ser ni más auténtico ni mejor persona. Gracias por formar parte de mi vida.

Y finalmente, a ti. A ti, por tus consejos. A ti, por tu paciencia. A ti, por hacerme feliz. A ti, por esto, por aquello, por todo.

A ti y a todos, GRACIAS.





Resumen/Summary

RESUMEN

La Tesis Doctoral “*Estudio de los efectos biológicos de biomoléculas de origen marino sobre cultivos de células humanas y modelos animales de enfermedades humanas*” describe en profundidad los efectos biológicos de los alcaloides guanídínicos originalmente aislados a partir de la esponja marina *Crambe crambe* conocidos como crambescinas y crambescidinas. Las crambescidinas constituyen una amplia familia de metabolitos secundarios con una interesante actividad anticancerígena frente a diversos tipos de tumores de origen humano. Esta Tesis Doctoral caracteriza los mecanismos celulares responsables de dicho efecto así como las distintas vías de señalización implicadas. Asimismo, este trabajo describe por primera vez su actividad sobre las adhesiones célula-célula, célula-matriz y el citoesqueleto celular, además de corroborar su eficacia y capacidad para detener el crecimiento y producir la regresión tumoral *in vivo*.

Los efectos biológicos de varios análogos de la familia de las crambescinas han sido también objeto de estudio durante la elaboración de la presente Tesis Doctoral, demostrando su actividad citoprotectora frente al daño oxidativo mediante el incremento de la expresión de las proteínas de la familia de las metalotioneínas. Los resultados aquí presentados reafirman la utilidad farmacológica de los compuestos de origen marino y su valor como moléculas líderes para la síntesis de nuevas estructuras químicas.

PALABRAS CLAVE

Crambescinas, crambescidinas, actividad antitumoral, metalotioneínas, estrés oxidativo.

RESUMO

A Tese Doutoral “*Estudo dos efectos biolóxicos de biomoléculas de orixe mariña sobre cultivos de células humanas e modelos animais de enfermidades humanas*” describe en profundidade os efectos biolóxicos dos alcaloides guanídnicos orixinalmente illados a partir da esponxa mariña *Crambe crambe* coñecidos coma crambesciñas e crambescidiñas. As crambescidiñas constitúen unha ampla familia de metabolitos secundarios cunha interesante actividade anticanceríxena fronte a diversos tipos de tumores de orixe humana. Esta Tese Doutoral caracteriza os mecanismos celulares causantes de dito efecto así coma as distintas vías de sinalización implicadas. De igual xeito, este traballo describe por primeira vez a súa actividade sobre as adhesións célula-célula, célula-matriz e o citoesqueleto celular, ademáis de corroborar a súa eficacia e capacidade para deter o crecemento e producir a regresión tumoral *in vivo*. Os efectos biolóxicos de varios análogos da familia das crambesciñas tamén foron obxecto de estudo durante a elaboración da presente Tese Doutoral, demostrando a súa actividade citoprotectora fronte o dano oxidativo mediante o incremento dos niveis celulares das proteínas da familia das metalotioneínas. Os resultados aquí presentados reafirman a utilidade farmacolóxica dos compostos de orixe mariña e o seu valor coma moléculas líderes para a síntese de novas estruturas químicas.

PALABRAS CHAVE

Crambesciñas, crambescidiñas, actividade anticanceríxena, metalotioneínas, estrés oxidativo.

SUMMARY

The dissertation entitled “*Biological effects of marine compounds on human cells and animal models of human diseases*” deals with the in depth study of the biological effects of several guanidine alkaloids originally isolated from the marine sponge *Crambe crambe* known as crambescins and crambescidins. Crambescidins constitute a large family of secondary metabolites with an interesting antitumoral activity against several types of human tumors. Herein we characterize the underlying cellular mechanisms and the involved signaling networks. Furthermore, the present work describes their activities on cell-cell adhesion, cell-matrix adhesion and cell cytoskeleton, also confirming their efficacy and capacity to impair the growth and to induce tumor regression *in vivo*. The biological effects of several crambescins analogs have been assayed and the results of the studies carried out towards that objective are also presented in this dissertation, demonstrating their cytoprotective effect against oxidative injury through metallothionein induction. These results support the pharmacological utility of marine natural molecules and their value as lead compounds for the synthesis and optimization of new chemical structures.

KEYWORDS

Crambescins, crambescidins, antitumoral activity, metallothioneins, oxidative stress.



Abreviaturas

11 β HSD1	11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
ADMET	Absorción, distribución, metabolización, excreción y toxicidad
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALCL	Linfoma anaplásico de células grandes (anaplastic large-cell lymphoma)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato (adenosine triphosphate)
CAT	Catalasa
CBD	Convenio sobre la Diversidad Biológica
CD95	Receptor de muerte celular Fas (cluster of differentiation 95)
CDK	Quinasas dependientes de ciclinas
CDKIs	Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas
CE	Electroforesis capilar (capillary electrophoresis)
CLDNs	Claudinas
CYN	Cilindroespermopsina (cylindrospermopsin)
ED ₅₀	Dosis efectivas 50 (effective dose 50)
EMA	Agencia Europea de Medicamentos (European Medicines Agency)
ERBB3	Proteína tirosina quinasa receptora erbB3 (receptor tyrosine-protein kinase erbB3)
ERK1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (extracellular signal-regulated kinases)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (U.S. Food and Drug Administration)

FT-ICR/MS	Espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier (Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry)
GFP	Proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
GGTasa 1	Geranilgeraniltransferasa 1
GSH	Glutación
HCS	Ensayos de alto contenido (high-content screening)
HDA	Histona deacetilasas
HIF1 α	Factor de transcripción inducible por hipoxia-1 α (hipoxia-inducible factor 1 α)
HMA	Elevada abundancia microbiana (high microbial abundance)
Hpf	Horas tras la fecundación (hours post fecundation)
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrómetro de masas (high-performance liquid chromatography-mass spectrometry)
HTS	Cribado farmacológico de alto rendimiento (high-throughput screening)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50 (half maximal inhibitory concentration)
ICL	Isocitrato liasa (isocitrate lyase)
iNOS	Oxído nítrico sintasa inducible (inducible nitric oxide synthase)
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal (c-Jun N-terminal kinase)
LMA	Baja abundancia microbiana (low microbial abundance)
MAPK	Quinasa activada por mitógenos (mitogen-activated protein kinase)
MDR	Proteínas de resistencia a múltiples fármacos (multiple drug resistance)
MTs	Metalotioneínas
NCEs	Nuevas entidades químicas (new chemical entities)

NCI	Instituto Nacional del Cáncer (National Cancer Institute)
Nef	Factor de regulación negativa (negative regulatory factor)
NMB	Glicoproteína transmembrana neuropomina B (neuromedin B)
NME	Nuevas entidades moleculares (new molecular entities)
NMNP	Nuevos productos naturales de origen marino (new marine natural products)
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal (neuronal nitric oxide synthase)
NO	Óxido nítrico (nitric oxide)
NPs	Productos naturales (natural products)
Nrf2	Factor de transcripción nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 (nuclear factor erythroid 2 -related factor 2)
NSCLC	Carcinoma pulmonar no microcítico (Non-small-cell lung carcinoma)
OATP	Polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (organic anion-transporting polypeptide)
OCLN	Ocludina
OSMAC	Compuestos producidos por la misma cepa (one strain, many compounds)
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (plasminogen activator inhibitor-1)
PGE ₂	Prostaglandina E2
PI3K/Akt	Fosfatidil-inositol 3-quinasa (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)
PKC	Proteína quinasa C (protein kinase C)
PP1	Fosfoproteína fosfatasa 1 (protein phosphatase 1)
PP2A	Fosfoproteína fosfatasa 2A (protein phosphatase 2A)

PSSC	Agrupación por similitud estructural con otras proteínas (protein structure similarity clustering)
PTP-S2	Proteína tirosina fosfatasa S2 (nuclear protein tyrosine phosphatase S2)
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (reactive nitrogen species)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
SAR	Relación estructura-actividad (structure–activity relationship)
SCONP	Clasificación estructural de los productos naturales (structural classification of natural products)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos (supercritical fluid chromatography)
-SH	Grupos tiol
SNSRs	Receptores sensoriales acoplados a proteína G (sensory neuron specific receptors)
SOD	Superóxido dismutasa
STX	Saxitoxina
TC-NER	Escisión de nucleótidos acoplada a transcripción (transcription-coupled nucleotide excision repair)
TGA	Alcaloides guanidínicos de triazaacenaftileno (triazacenaftylene guanidine alkaloids)
TIF2	Factor de transcripción intermediario 2 (transcriptional intermediary factor 2)
TTX	Tetrodotoxina
UTO	Unidad taxonómica operativa (operational taxonomic unit)
VCL	Vinculina
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (endothelial growth factor)

VIH-1

Virus de la inmunodeficiencia humana adquirida





Índice

Índice

1. Introducción	1
1.1 Estudio farmacológico de los compuestos de origen natural	1
1.1.1 Compuestos de origen marino	9
1.1.2 Importancia de los compuestos de origen marino como agentes antineoplásicos	16
1.1.3 Compuestos de origen marino e industria farmacéutica: estado, retos y oportunidades	28
1.2 Compuestos de guanidina de origen natural	35
1.2.1 Origen de los compuestos marinos de guanidina.....	36
1.2.1.1 Compuestos de guanidina producidos por microorganismos marinos y de agua dulce.....	37
1.2.1.2 Compuestos de guanidina producidos por esponjas	41
1.2.1.3 Compuestos de guanidina producidos por otros invertebrados marinos.....	44
1.2.2 Alcaloides guanidínicos de origen marino	45
1.3 Crambescinas y crambescidinas	48
1.3.1 Estructura de las crambescinas y crambescidinas.....	48
1.3.2 Origen de las crambescinas y crambescidinas naturales	52
1.3.3 Síntesis y relación estructura-actividad de las crambescinas y crambescidinas	57
1.3.4 Actividades biológicas y posibles usos terapéuticos de las crambescinas y crambescidinas	59
2. Objetivo	62
3. Publicaciones	64
3.1 Presentación	64
4. Discusión	123
5. Conclusions	138
6. Bibliografía	140



Introducción



1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTUDIO FARMACOLÓGICO DE LOS COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL

Durante siglos la fauna y flora terrestre y marina han sido una fuente de incalculable valor y riqueza para el desarrollo de nuevos fármacos, tanto por su notable aportación de nuevas entidades moleculares (NME, en inglés new molecular entities), como por ser la fuente de inspiración para el desarrollo de muchos otros fármacos de origen total o parcialmente sintético [1-4]. Tradicionalmente los programas de cribado de la industria farmacéutica o *Big Pharma* se han beneficiado de esta enorme biodiversidad, incluyendo productos naturales como parte de sus librerías de nuevos compuestos químicos con potencial terapéutico [5]. El desarrollo farmacológico de los compuestos naturales alcanzó su pico de máxima productividad en los países occidentales en el período comprendido entre 1970 y 1980 [4, 6, 7]. De las 877 Nuevas Entidades Químicas (NCEs, en inglés new chemical entities) clasificadas como fármacos de bajo peso molecular introducidas en el mercado entre 1981 y 2002 casi la mitad, un 49%, eran compuestos naturales, análogos semi-sintéticos de compuestos naturales o compuestos sintéticos inspirados en farmacóforos naturales [4, 6, 7]. Al considerar un marco temporal más amplio, el comprendido entre 1981 y 2010, los datos reflejan una significativa reducción del peso de los productos naturales en el porcentaje total de nuevos fármacos autorizados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, en inglés U.S. Food and Drug Administration) para uso clínico del 15%. La aportación final de los estos compuestos supuso el 34% de los nuevos fármacos aprobados [8]. La larga duración de los ciclos de desarrollo farmacéuticos desde el descubrimiento inicial de un nuevo agente con potencial terapéutico hasta su lanzamiento final al mercado, con un lapso temporal de diez años o más entre ambos eventos, explica que

la disminución de la relevancia de los compuestos de origen natural sea una consecuencia directa del revés sufrido en cuanto al interés del *Big Pharma* por su estudio en la década de los 90 [7]. Paradójicamente y pese al éxito alcanzado en el pasado, un gran número de compañías como Pfizer (Nueva York, Estados Unidos de América), Bristol-Myers (Nueva York, Estados Unidos de América), Merck (Kenilworth, Nueva Jersey, Estados Unidos de América), Johnson and Johnson (Nuevo Brunswick, Nueva Jersey, Estados Unidos de América) o Glaxo-SmithKline (Brentford, Londres, Reino Unido) no mantuvieron o terminaron paulatinamente sus programas de cribado de compuestos naturales [5] (Tabla I).

Diversas causas motivaron este cambio de rumbo y resultaron decisivas para implementar modificaciones estratégicas de tan profundo calado en los programas científicos y comerciales de las grandes corporaciones del sector.

Por un lado los avances técnicos producidos en campos como la biología molecular y la genómica, con la obtención de la secuencia completa del genoma humano y la posibilidad de clonar y sintetizar grandes cantidades de proteínas purificadas, incrementaron el número de dianas farmacológicas disponibles, facilitando la

automatización robótica de las cascadas de cribado y el desarrollo y auge del cribado farmacológico de alto rendimiento (HTS, en inglés high-throughput screening). Este enfoque se basa en la evaluación sistemática y aleatoria de grandes librerías de compuestos con potencial para modular las dianas moleculares de interés [5, 7, 9, 10]. Por otro, el número de nuevos fármacos aprobados por la FDA sufrió un notable descenso durante las últimas dos décadas, pasando de 45 en 1990 a 21 en 2010 [11].

Detenidos	Continúan
Abbott	Dabur
Astellas	Eisai
Bayer	Novartis
Boehringer Ingelheim	Otsuka
Bristol-Myers Squibb	Pierre Fabre
Daiichi Sankyo	Framal
Eli Lilly	
GlaxoSmithKline	
Johnson and Johnson	
Kyowa Hakko	
Merck Sharp and Dohme	
Novo Nordisk	
Pfizer	
Roche	
Sanofi	
Servier	
Takeda	

Tabla I. Compañías farmacéuticas que han cesado o todavía mantienen sus programas de bioprospección (período 2000 - 2013). Adaptado de Bruno *et al.*

La combinación de ambos factores impulsó la implementación de las estrategias de cribado ultrarrápidas en respuesta a la presión por elevar la productividad y acotar los plazos de desarrollo de nuevos productos [12, 13]. Como resultado, a mediados de los años 2000 el número de ensayos HTS realizados diariamente había aumentado de manera notable [5]. Estas campañas de cribado generan una gran cantidad de respuestas biológicas a partir de las cuales se identifican los compuestos con mayor potencial terapéutico, conocidos como moléculas candidatas o *hits*. Los resultados recabados son posteriormente controlados y comprobados para verificar la idoneidad de las moléculas seleccionadas antes de proceder a su optimización para obtener los compuestos que pasarán a la siguiente fase de desarrollo preclínico, conocidos como cabezas de serie o *leads* [5].

La celeridad en cuanto a la identificación y desarrollo de nuevos *hits* sigue resultando crítica para la industria farmacéutica. En este sentido, el HTS incorpora diversas innovaciones técnicas que proporcionan la mejora competitiva deseada por el sector sobre el enfoque tradicional, basado en la recolección de evidencias de distinta naturaleza y en la realización de bioensayos más complejos [7]. La pequeña escala a la que se realizan los ensayos de HTS permite utilizar cantidades de compuesto muy reducidas y realizar cientos de miles al día, generando grandes volúmenes de datos en muy poco tiempo [5]. La habilidad para identificar nuevas moléculas con identidades químicas inesperadas y biológicamente activas, evitando la aparición de redundancias estructurales, es otra de las ventajas teóricas atribuibles a este sistema [5]. Sin embargo, la identificación de las interacciones de las moléculas de pequeño tamaño con receptores, enzimas o canales iónicos constituye un hallazgo muy inicial en la cadena de desarrollo farmacológico y, por tanto, la significación de los *hits* obtenidos mediante este método es reducida y sin relevancia a nivel de paciente. La necesidad posterior de realizar ensayos de confirmación más elaborados utilizando, por ejemplo, modelos animales sigue presente, por lo que estos ensayos de HTS no evitan la inversión adicional de más tiempo, esfuerzo y dinero durante el desarrollo de los *hits* [7]. Desde su identificación el número de estos compuestos que supera las sucesivas fases de desarrollo experimenta una reducción paulatina conocida como desgaste, y aproximadamente solo una de cada millón de moléculas evaluadas consigue llegar hasta el final [14]. En este

sentido el sesgo producido por la excesiva limitación conceptual de los ensayos basados exclusivamente en dianas moleculares favorece la aparición de cuellos de botella. Dado que los modelos utilizados en este tipo de ensayos HTS son muy básicos, la significación patológica, la fiabilidad y la correcta validación de las dianas seleccionadas resultan críticas para la identificación eficiente de NCEs [5, 15, 16]. El otro factor determinante son las librerías de compuestos empleadas.

La implantación de modelos de HTS basados en dianas supuso un cambio de paradigma y el declive del interés por los productos naturales al considerar que era una revolución tecnológica poco compatible con el uso de estas librerías, formadas por extractos crudos (10-100 compuestos), mezclas semi-puras (5-10 compuestos), o compuestos puros [7, 17]. Asimismo, el desarrollo de la química combinatoria generó extensas colecciones de compuestos sintéticos. Este tipo de librerías presentaban prometedoras posibilidades al compartir importantes características moleculares, como el tamaño y la solubilidad en agua y solventes orgánicos, con fármacos ya aprobados. Además, al estar compuestas por moléculas con los grupos reactivos y demás sustratos químicos problemáticos eliminados, poseen características más favorables en cuanto a su absorción, distribución, metabolización, excreción y toxicidad (ADMET) [18, 19]. En cambio, la heterogeneidad presente en las colecciones de productos naturales supone una dificultad añadida para los ensayos HTS orientados a la detección directa de la unión a dianas puras [5]. La complejidad molecular de las librerías de extractos o mezclas parcialmente purificadas, y la naturaleza química de muchos de sus componentes, suponen un desafío para la robustez de esta tecnología. En estos ensayos la presencia de distintas familias de análogos estructurales dificulta la identificación de nuevos *hits* [7].

La reducción de la inversión farmacéutica en el desarrollo de nuevas terapias frente a enfermedades infecciosas, un área especialmente fructífera para los productos naturales en el pasado, también contribuyó al declive de su estudio [20, 21].

Las dudas sobre la capacidad para aislar compuestos naturales de manera eficiente y reproducible, y de sintetizarlos para su manufacturación, han sido otros de los aspectos más

cuestionados a cerca de la conveniencia de su utilización industrial [22]. La elevada complejidad molecular de muchos compuestos bioactivos de origen natural, con gran cantidad de grupos funcionales y centros quirales, dificulta enormemente la semi-síntesis o síntesis total de sus estructuras, necesitando rutas sintéticas demasiado extensas que suponen una gran inversión temporal y económica con elevado riesgo de resultar infructuosas [5, 7, 23-25]. La obtención directa de los compuestos con estructuras conocidas a partir de los organismos productores terrestres y marinos se ve entorpecida por la dificultad o imposibilidad de cultivar muchos de ellos y por la modificación de su composición química y microbiana en respuesta a factores de estrés bióticos y abióticos, dificultando enormemente los procesos de reaislamiento [26]. Por ello, la preparación de grandes colecciones de moléculas puras a partir de los extractos obtenidos de las fuentes naturales resulta complicada y poco rentable.

La dificultad para contar con un suministro fiable y continuo supone, ya desde fases muy tempranas, un importante lastre para el desarrollo de los productos naturales (NPs, en inglés natural products), pues a pesar de que el HTS requiere de pequeños volúmenes iniciales, cantidades crecientes son pronto necesarias para la validación de *hits*, la realización de ensayos farmacológicos adicionales y la obtención de análogos [5].

Los compuestos naturales son extraídos a partir de los organismos productores, concentrados, fraccionados y aislados hasta obtener las moléculas bioactivas puras. Posteriormente se identifican aquellas con estructuras ya elucidadas para evitar duplicidades innecesarias y se procede a la determinación *de novo* de las estructuras de las moléculas no conocidas. Cuando los perfiles de actividad biológica reúnen los criterios de potencia y selectividad adecuados se realizan los estudios preliminares de relación estructura-actividad (SAR, en inglés structure–activity relationship) y se optimizan los procesos de purificación para aumentar sus rendimientos. La capacidad para modular las respuestas biológicas producidas por los compuestos mediante la modificación sintética de sus estructuras originales es comprobada, y una vez asegurada el *hit* es confirmado como *lead* y avanza en la línea de desarrollo para su optimización mediante reacciones tradicionales de química médica (Figura 1).

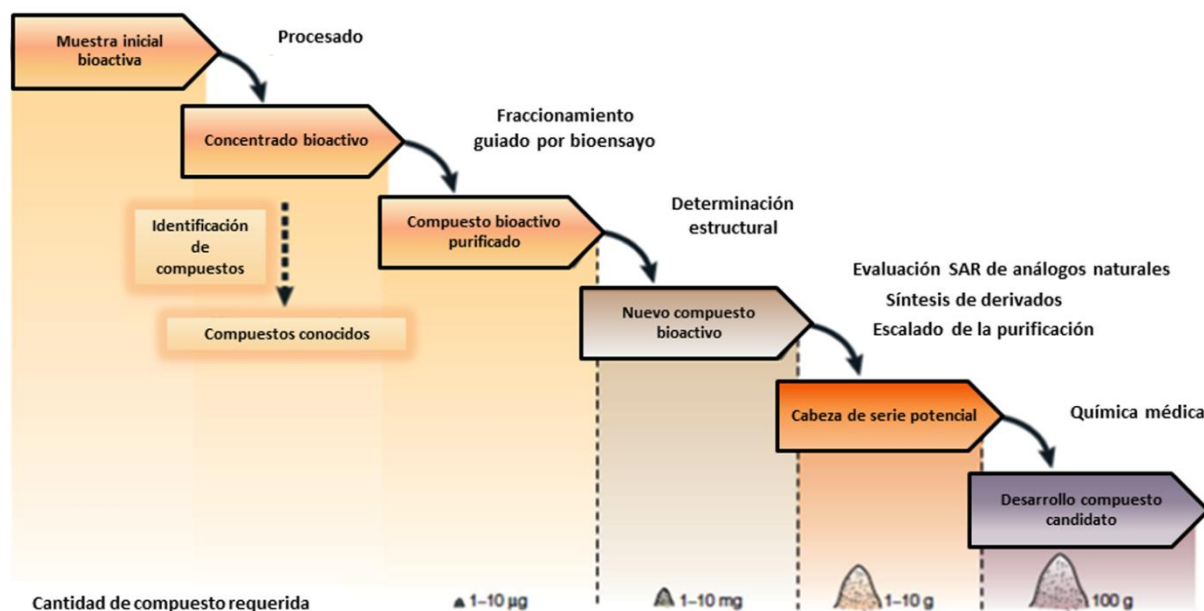


Figura 1. Secuencia de desarrollo de los compuestos naturales. Adaptado de Koehn y Carter.

Las inversiones de capital insuficientes, la falta de infraestructuras adecuadas, los cambios en las políticas gubernamentales y las consideraciones de tipo ecológico y legal acerca de los derechos de explotación de los NPs también han afectado a su interés comercial [27-29].

La entrada en vigor del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD) de las Naciones Unidas el 29 de Diciembre 1993 supuso un revés para la utilización de los NPs. Este acuerdo, negociado por la Comunidad Internacional en Río de Janeiro (Brasil) en 1992, tenía como objetivo regular el acceso y uso de los recursos naturales más allá de las fronteras nacionales y asegurar la conservación de la biodiversidad, el uso sostenible de los recursos genéticos y el reparto equitativo y justo de los beneficios derivados de su explotación. La definición de biodiversidad recogida en el Artículo número 2 de este tratado se estableció en los siguientes términos: “*la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte: comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas*”. En este mismo artículo el material genético está definido como “*todo material de origen vegetal, animal, microbiano o*

de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia”, los recursos genéticos como *“el material genético de valor real o potencial”* y los recursos biológicos como *“los recursos genéticos, los organismos o partes de ellos, las poblaciones, o cualquier otro tipo del componente biótico de los ecosistemas de valor o utilidad real o potencial para la humanidad”*. El CBD reconoce el derecho soberano de los estados sobre los recursos presentes en sus territorios, establece que el acceso a los mismos por parte de grupos extranjeros requiere de un consentimiento informado de la respectiva autoridad competente en el país de origen, que el país de origen debe facilitar el acceso a dichos recursos según los términos previamente establecidos de mutuo acuerdo, y que, de ser posible, el país de origen debe ser incluido en los trabajos de investigación que impliquen la utilización de dichos recursos y beneficiarse de la posible transferencia tecnológica. Los beneficios obtenidos por la utilización de dichos recursos deben repartirse de forma equitativa y justa con el país de origen. Este Convenio ha sido firmado por la Unión Europea y 196 estados y ha sido extensamente ratificado por la mayoría de ellos, con la notable excepción de los Estados Unidos de América. Por tanto, en los años 90 resultó evidente para las grandes corporaciones farmacéuticas que las reivindicaciones de los estados sobre sus recursos genéticos se harían también extensivas a los recursos biológicos, creando un marco de incertidumbre jurídica inasumible [30-33].

Todos estos factores contribuyeron al ocaso del otrora exitoso estudio de los compuestos naturales y ocasionaron el cese de muchos programas de prospección y desarrollo farmacológico al considerar que la farmacología reversa, basada en el cribado de las librerías de extractos, el aislamiento guiado por bioensayos de los componentes activos, la determinación de las estructuras de los compuestos puros y el escalado industrial final de la producción, presentaba grandes desventajas competitivas en comparación con las estrategias basadas en la utilización de las librerías de compuestos sintéticos [34, 35].

No obstante, cuando el cribado de las librerías sintéticas no arroja resultados positivos los compuestos naturales constituyen la última oportunidad de éxito antes de declarar la campaña como desierta, pues su diversidad química es mucho mayor [5, 23].

Las moléculas de origen natural cumplen funciones biológicas clave para los organismos terrestres y marinos, habiendo evolucionado para ser activos a nivel celular, interactuar con receptores, canales iónicos y enzimas y atravesar las membranas celulares [5, 22, 36, 37]. El significado biológico de la diversidad molecular de estos compuestos todavía no está claro, sin embargo diversos autores han formulado una hipótesis según la cual la actividad biológica es una propiedad excepcional de cualquier molécula, debiendo existir alguna ventaja adaptativa para aquellos organismos capaces de generar y retener una elevada diversidad química a un bajo coste [38]. Por tanto, la variedad de familias de análogos estructurales presentes en la naturaleza, incluidos aquellos sin actividad biológica, sería consecuencia de la necesidad de los distintos organismos productores de generar su propia diversidad química para optimizar la actividad de sus metabolitos secundarios, realizando su propia optimización SAR [38]. Así, aunque estos productos pertenecen en su mayoría a familias químicas que se conocen desde el S. XIX, el número de posibles combinaciones es ilimitado y pequeños cambios estructurales provocan grandes diferencias en cuanto a su actividad biológica. Además, pese a que no están diseñados para interactuar con todas las dianas, su función mayoritaria es la defensa química, por lo que parece probable que estén orientados a modular procesos celulares vitales y universales [5, 39].

Las expectativas generadas por la industria en torno a la afirmación de que la química combinatoria y el diseño racional de fármacos serían capaces de asegurar la diversidad necesaria para garantizar el éxito de los procesos de desarrollo de nuevos *leads* todavía no se han cumplido [2, 40-45]. Muchas de estas grandes colecciones han resultado decepcionantes en la práctica, y cada vez parece más evidente que incrementar la diversidad estructural de los compuestos que forman las librerías es biológicamente más relevante que aumentar el tamaño de las mismas [41, 46, 47]. El análisis de los resultados obtenidos por una compañía farmacéutica durante sus campañas de HTS corroboró que la inclusión de productos naturales en los muestrarios mejora significativamente el éxito de identificación de nuevos *hits* y, paradójicamente, las librerías están siendo diseñadas para imitar de forma más precisa ciertas propiedades químicas de los compuestos naturales [41, 48-50]. Por tanto, las estrategias basadas en el aprovechamiento de la diversidad química de las librerías naturales

para el descubrimiento de nuevos núcleos biológicamente activos, compaginado con las ventajas ofrecidas por la química combinatoria para su optimización estructural posterior, propicia los ansiados incrementos de productividad pretendidos por la industria farmacéutica [7, 23, 25, 37, 51-56].

Las colecciones de productos naturales están formadas por metabolitos con capacidad para actuar a nivel intracelular y cuentan con una amplia diversidad de farmacóforos y un alto grado de estereoisomería, propiedades que contribuyen a su capacidad para generar *hits* incluso contra las uniones de mayor dificultad, como las interacciones proteína-proteína [7, 49, 57-60].

Pese a las dificultades técnicas para su desarrollo industrial, el valor biológico de los productos naturales nunca ha sido cuestionado. Por ello, cuando las grandes corporaciones farmacéuticas abandonaron sus programas de desarrollo de NPs, su estudio se trasladó principalmente a la esfera académica y al ámbito de las empresas emergentes o *start-ups* [34, 35, 61-63]. Los avances en el desarrollo de nuevas tecnologías aplicadas al estudio de los NPs y la optimización de los métodos ya existentes están propiciando el resurgir de un renovado interés por su estudio [60]. En este ambiente las instituciones académicas desempeñan un rol clave al impulsar y liderar la investigación de nuevos compuestos naturales y al posicionarse como agentes de especial relevancia a través del establecimiento de colaboraciones y asociaciones estratégicas con institutos sanitarios y empresas biotecnológicas.

1.1.1 Compuestos de origen marino

En 1951 Bergmann y Feeney publicaron una serie de tres estudios en los que describieron por primera vez el aislamiento de dos *arabino-* y *ribo-*pentosil nucleósidos a partir de la esponja *Tethya cripta* [64-66]. Este hecho constituyó no solo un hito para el estudio químico y estructural de los compuestos naturales de origen marino, sino también un punto de inflexión y el verdadero despegue de la biotecnología marina al lograr atraer la atención de la comunidad científica sobre el potencial farmacológico e industrial de estos compuestos [67]. El impacto alcanzado se explica tanto por lo novedoso de sus estructuras

químicas como por el exitoso desarrollo posterior de sus respectivos derivados sintéticos, el ara-A (vidarabine) y ara-C (cytarabine), con propiedades antivirales y antitumorales tan relevantes que han estado en uso clínico durante décadas [68]. Sin embargo, pese a los elevados rendimientos alcanzados en términos del éxito obtenido en los estudios de cribado farmacológico y a la profundidad y diversidad de los efectos biológicos exhibidos por muchos de ellos, el papel de los compuestos naturales de origen marino en el desarrollo de nuevos fármacos ha variado enormemente durante los últimos 40 años [69, 70]. Así, se considera que fue a finales de la década de 1960, con el aislamiento de algunos derivados de prostaglandinas a partir de la gorgonia *Plexaura homomalla*, cuando la utilización de los organismos marinos como fuente de metabolitos bioactivos comenzó realmente [71]. Esta tendencia continuó durante los años siguientes y, en la década de 1980, las investigaciones se centraron principalmente en las toxinas que presentaban actividad sobre el sistema nervioso y los canales iónicos, además de aquellas con propiedades antitumorales, antivirales y antiinflamatorias [72].

El número de nuevos productos naturales de origen marino (NMNP, en inglés new marine natural products) descubiertos experimentó un acusado aumento en 1985 para después estabilizarse, manteniéndose en un nivel constante de 500 NMNP/año durante la última parte de la década de los 90 [70]. Desde entonces el número de NMNP ha aumentado considerablemente. Así, entre los años 2001 y 2010 se descubrieron 8368 NMNP, casi la mitad del total de compuestos descubiertos desde 1951 [73-77] (Figura 2).

El número total de NMNP identificados cada año no ha parado de aumentar desde el 2006. Al analizar la proporción de NMNP con actividad biológica respecto al total de NMNP descubiertos, el último pico

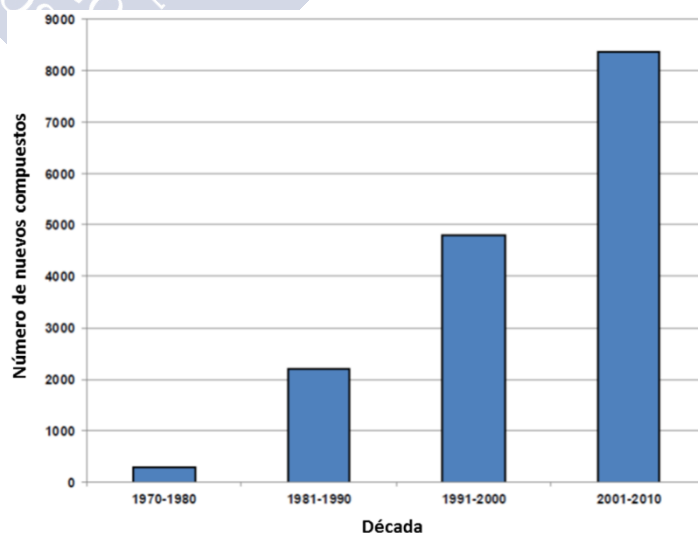


Figura 2. Nuevos compuestos de origen marino por década desde 1970 hasta 2010. Adaptado de Mehbub *et al.*

documentado se produjo en el año 2003 [73] (Figura 3). Resulta destacable que durante la última década analizada la proporción media haya descendido, indicando que la tendencia al alza de su descubrimiento en los últimos 30 años no se ha hecho extensible al estudio de sus bioactividades y que, por tanto, sigue existiendo un gran número de compuestos de origen marino todavía por estudiar [70]. De igual manera, esta discrepancia deja patente la necesidad de encontrar y optimizar nuevas estrategias metodológicas más eficientes que agilicen la identificación y caracterización de sus actividades biológicas.

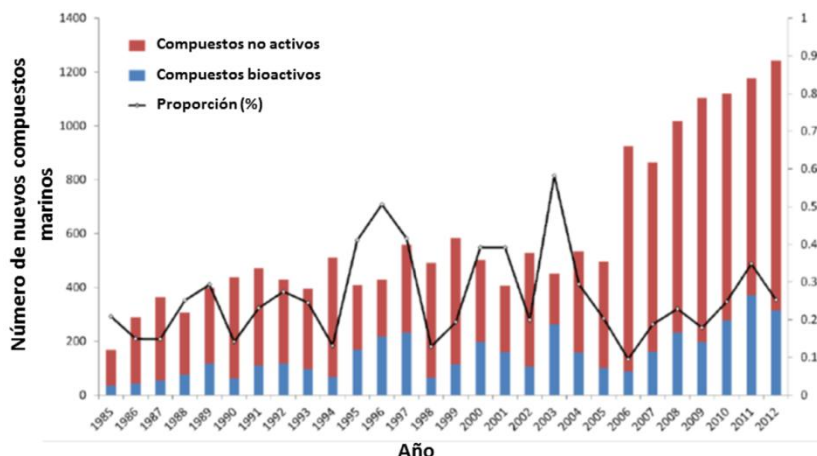


Figura 3. Variación en el número de NMNPs con actividades biológicas conocidas y no conocidas durante el período 1985-2012.

Adaptado de Hu *et al.*

Los productos de origen marino no solo pueden contribuir a la salud humana mediante el aprovechamiento de sus actividades biológicas para el desarrollo de nuevos fármacos o cosméticos, sino que poseen intereses y utilidades adicionales para su empleo en una amplia variedad de sectores como la industria alimentaria y energética [78-80]. La mayor parte de los compuestos naturales de origen marino han sido aislados a partir de organismos invertebrados. Las esponjas representan la fuente marina de mayor riqueza y han aportado aproximadamente el 30% de todos los NMNP identificados hasta el año 2012 [77, 81-83].

Estos invertebrados son metazoarios primitivos sésiles desprovistos de tejidos u órganos sensoriales pero dotados de diferentes tipos celulares capaces de desempeñar todas las funciones corporales [84]. Los estudios ecológicos sobre la significación biológica de los metabolitos secundarios producidos por estos organismos señalaron que, entre otros procesos, están involucrados en la defensa frente a las amenazas potenciales que suponen predadores como los peces, los equinodermos, los moluscos o los crustáceos, las infecciones microbianas, la bioincrustación de otras especies en su superficie o el crecimiento excesivo

de otros organismos sésiles en el espacio físico que ocupan, lo que resulta esencial para su supervivencia [85-92]. Por ello no es de extrañar que una única especie de esponja albergue una gran cantidad de moléculas que utiliza para llevar a cabo todos los procesos biológicos asociados a su mantenimiento y para afrontar los retos derivados de las amenazas presentes en el ambiente que habita [92].

El origen de dicha diversidad química ha sido motivo de controversia y objeto de amplio estudio en el pasado, pues resulta de especial interés, tanto científico como industrial, el elucidar como las esponjas marinas consiguen acumular tan elevado número de compuestos químicos estructuralmente distintos [67]. Las esponjas son organismos filtradores muy eficientes, llegando a procesar volúmenes diarios de agua de hasta 24 m³/kg [93]. Esta capacidad para concentrar los solutos presentes en el agua que los rodea facilita el incremento de la población bacteriana presente en sus tejidos, que normalmente es dos o tres órdenes de magnitud superior a la concentración del medio exterior [94].

Las esponjas ofrecen un nicho ecológico a los microorganismos que, a cambio, proporcionan al hospedador los productos derivados de sus diversos metabolismos que este utiliza para satisfacer necesidades fisiológicas muy diversas [95-98]. Un ejemplo notable es la asociación existente entre las esponjas y los organismos fotosintéticos, particularmente cianobacterias y en menor medida dinoflagelados, en la que estos proporcionan al hospedador la capacidad para la asimilación de carbono [99]. Las relaciones simbióticas contribuyen también a la nitrificación, la fijación de nitrógeno, la nutrición y el metabolismo anaeróbico de las esponjas, y tienen una significación vital para su supervivencia, con profundas implicaciones que van más allá de la producción de metabolitos bioactivos con función defensiva, ya que las bacterias pueden, por ejemplo, procesar los desechos metabólicos de las esponjas, estabilizar su esqueleto y proporcionarles protección frente a la radiación ultravioleta [96-98]. La implicación en los mecanismos químicos de defensa del hospedador constituye el ejemplo más relevante de la ventaja evolutiva derivada de esta clase de interacciones biológicas, que proporcionan a las esponjas la bioquímica única responsable de su gran arsenal molecular [100, 101].

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos desprovistos de roles funcionales o participación directa en los procesos celulares responsables del crecimiento, desarrollo y reproducción de las esponjas [67]. Estos compuestos son sintetizados a partir de múltiples precursores biológicos y son liberados en respuesta a depredadores y patógenos [86, 89, 102, 103].

Los estudios sobre el origen de los metabolitos secundarios aislados a partir de esponjas se han centrado en discernir si estos son producidos por ellas, por alguno de los microorganismos que hospedan o, si bien, su origen se debe a la propia naturaleza simbiótica de la asociación existente entre ambos [99, 104, 105]. El alcaloide estevensina, obtenido por primera vez a partir de la esponja *Axinella corrugata*, es un ejemplo de un compuesto aislado a partir de una esponja que ha sido producido con éxito a partir de sus cultivos celulares primarios [106]. Por el contrario, las manzaminas son un ejemplo de alcaloides β -carbolínicos aislados a partir de diversas especies de esponjas y producidos por los microorganismos asociados a ellas, en este caso *Micromonospora sp.* [107]. Hasta la fecha el número de compuestos para los que sus fuentes de origen han sido completamente establecidas es reducido, por lo que los resultados obtenidos no son extrapolables a la gran cantidad de moléculas aisladas a partir de las esponjas, dificultando el establecimiento de patrones y conclusiones generales [92].

Los estudios sobre el origen de los metabolitos secundarios liberados por las esponjas proporcionan los conocimientos básicos sobre la cinética de producción y las rutas metabólicas implicadas en sus síntesis necesarios para superar el cuello de botella que, la obtención de suministros estables en cantidades suficientes, supone para su explotación comercial [79, 108]. Muchas especies de esponjas y microorganismos son todavía incultivables, por lo que los valiosos compuestos que producen deben ser extraídos y purificados a partir de los especímenes de esponjas recolectados por buzos o por embarcaciones sumergibles equipadas con brazos robóticos. Ambas técnicas son demasiado costosas y poco adecuadas para su empleo por la industria farmacéutica moderna [68]. Las mejoras técnicas introducidas para solventar este problema abarcan ámbitos tan diversos como el cultivo acuícola de las esponjas marinas, la producción y el cultivo de los

microorganismos simbioses y la obtención y mantenimiento *in vitro* de líneas celulares estables mediante el desarrollo de cultivos axénicos a partir de tejidos o células de esponja disociadas [79].

Otro enfoque prometedor se basa en el potencial de la metagenómica aplicada al análisis de las poblaciones bacterianas presentes en las esponjas para identificar los genes implicados en los procesos biosintéticos de los metabolitos secundarios [109-111]. Estos genes son posteriormente expresados en microorganismos cultivables en laboratorio, mejorando la eficiencia y el rendimiento de los procesos productivos y reduciendo los costes [112, 113].

La gran masa de agua salada que rodea a las esponjas en sus hábitats naturales provoca la rápida dilución de los metabolitos secundarios una vez que han sido liberados al medio exterior, por lo que, como armas químicas de defensa biológica que son, estas moléculas han sido seleccionadas para ser biológicamente activas, muy potentes, y estables en medios salinos [114]. La mayor parte de estos compuestos poseen un elevado grado de complejidad estructural y han sido clasificados en 17 categorías químicas diferentes definidas en revisiones previas como ácidos, alcaloides, ésteres, ácidos grasos, glucósidos, cetonas, lípidos, macrólidos, alcoholes, péptidos, peróxidos, policétidos, quinonas, esteroides, esterol, terpenos y terpenoides. Una última categoría es la constituida por todos aquellos compuestos que, no perteneciendo a ninguna de las anteriores, han sido agrupados conjuntamente bajo el epígrafe de no clasificados [73, 76, 77, 81, 82, 115-119].

A principios de los años 2000 los nuevos NMNP aislados a partir de esponjas fueron clasificados mayoritariamente como alcaloides, terpenos, terpenoides y péptidos, sumando en conjunto casi el 50% del total de nuevos compuestos descubiertos. De entre estas cuatro clases los alcaloides supusieron el 20% [67] (Figura 4).

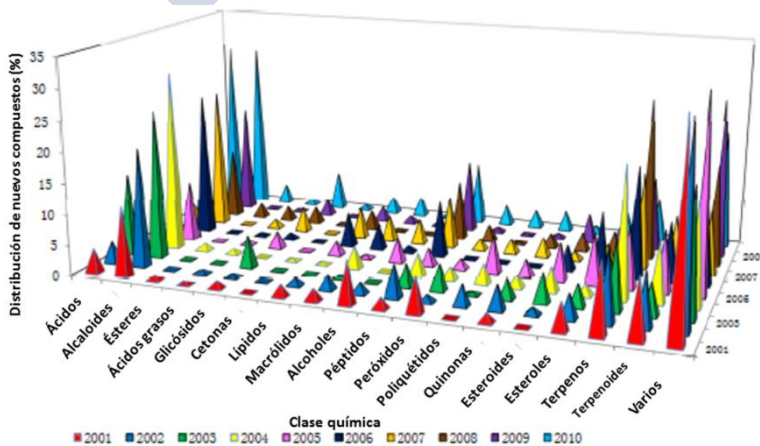


Figura 4. Distribución de las diferentes clases químicas de nuevos compuestos aislados a partir de esponjas marinas entre los años 2001 y 2010. Adaptado de Mehub *et al.*

El análisis de la proporción de metabolitos secundarios bioactivos pertenecientes a cada categoría química obtenidos de todas las fuentes marinas muestra que los péptidos son las moléculas biológicamente más activas [70]. Numerosos péptidos de origen no marino ya han sido aprobados para su uso clínico [120]. Este hecho, unido a las propiedades químicas y biológicas características de estos compuestos como la baja inmunogenicidad y pesos moleculares y su elevada estabilidad, así como la disponibilidad de medios técnicos para su síntesis química y/o expresión recombinante, y la posibilidad de diseñar y obtener moléculas con propiedades funcionales, biofísicas o bioquímicas mejoradas a través de modificaciones estructurales sencillas, han impulsado el interés por su estudio y desarrollo farmacológico [121].

La aprobación del ziconotide, la forma sintética del péptido marino ω -Conotoxina MVIIA, para su uso como analgésico en el tratamiento del dolor crónico severo por la FDA en diciembre de 2004, y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, en inglés European Medicines Agency) a principios de 2005, confirmó el potencial y la utilidad terapéutica de estos compuestos. El ziconotide fue finalmente lanzado con el nombre comercial de Prialt[®] tras más de 20 años de investigación y desarrollo, convirtiéndose así en el primer fármaco marino en alcanzar el mercado [122-125].

De los metabolitos secundarios producidos por las esponjas los alcaloides son la clase química más abundante [67]. Estos compuestos son muy eficaces en la defensa frente a los predadores naturales, siendo producidos por la mayoría de especies de esponjas [126]. El alcance y la significación de su capacidad protectora han sido confirmados para la especie *Latrunculia magnifica*. Los alcaloides impiden que los peces ataquen los tejidos de esta esponja pese a presentar un patrón de crecimiento expuesto que facilita el acceso a los mismos. En cambio, al exponer de modo artificial los tejidos de otras especies de esponjas de crecimiento incrustante a los predadores presentes en el mismo hábitat, estos los consumen con facilidad [127].

En cuanto a su potencial terapéutico los metabolitos de las esponjas poseen actividades biológicas muy diversas, pudiendo actuar como agentes antitumorales, antivirales,

antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, antihelmínticos, antiprotozoarios, inmunosupresores, neurosupresores y neuroprotectores [70]. Sin embargo, la citotoxicidad *in vitro* es la actividad biológica más comúnmente descrita [76]. También en este ámbito las esponjas son los organismos productores más destacados, seguidas por los microorganismos, los tunicados y los moluscos [67, 128].

La muerte celular inducida por los compuestos marinos puede producirse vía apoptosis, autofagia u oncosis [129]. Sin embargo en la mayoría de estudios realizados hasta la fecha únicamente la inhibición del crecimiento, y no la capacidad para inducir algún tipo de muerte celular, ha sido corroborada [130-132]. Para poder clasificarlos como potenciales agentes antitumorales el estudio de las moléculas de origen marino debe centrarse en otros marcadores y dianas de especial relevancia en los procesos clave del desarrollo tumoral, como las implicadas en el control del ciclo celular, la transducción de señales, la angiogénesis y la apoptosis. Además, la eficacia *in vivo* ha sido comprobada para un número muy reducido de moléculas marinas [133-136].

A continuación se incluye una descripción detallada de los compuestos con propiedades antitumorales de origen marino más destacados.

1.1.2 Importancia de los compuestos de origen marino como agentes antineoplásicos.

Del total de compuestos de origen marino biológicamente activos identificados hasta el año 2012 el 56% posee actividad citotóxica frente a células tumorales, siendo clasificados como moléculas con potencial anticancerígeno [70]. Para la mayoría de ellos ensayos adicionales que corroboren su eficacia *in vivo* y establezcan sus mecanismos de acción son todavía necesarios.

Entre los compuestos marinos con actividad antitumoral reconocida el denominado como ecteinascidina-743 (ET-743/trabectedina) fue el primero en alcanzar el mercado bajo la denominación comercial de Yondelis[®] casi 40 años después de su descubrimiento y 17 años después de la publicación de su estructura química [137-139] (Figura 5A). Este alcaloide era la ecteinascidina activa más abundante de las originalmente aisladas a partir de los extractos

del tunicado *Ecteinascidia turbinata*. Su estructura química está formada por tres anillos de tetrahidroisoquinolina fusionados y es similar a la del alcaloide de isoquinolina saframicina A, producido por varias especies de bacterias del género *Streptomyces*. La actividad citotóxica de las ecteinascidinas fue inicialmente descrita frente a la línea celular de leucemia linfocítica L1210, con una concentración inhibitoria 50 (IC₅₀, en inglés half maximal inhibitory concentration) de 0,5 ng/ml [138]. Su eficacia *in vivo* fue posteriormente confirmada en modelos de xenotransplantes murinos con líneas humanas de linfoma (P388), melanoma (B16), sarcoma ovárico (M5076), carcinoma de células pequeñas (LX-1) y de Lewis, y carcinoma de mama (MX-1) [138, 140].

La síntesis total se completó con éxito en 1996 dando lugar a la aparición de un nuevo derivado sintético, la phthalascidina, con propiedades antiproliferativas comparables a las exhibidas por el ET-743 [141-145]. Sin embargo, las cantidades obtenidas por este método no fueron suficientes para permitir su utilización clínica. Esto fue finalmente logrado por la empresa PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, España) mediante la semisíntesis a partir del antibiótico cianosafracina B, marcando a su vez un hito en el aprovechamiento de los productos marinos naturales y posibilitando el escalado industrial de la producción y su aprobación final bajo las indicaciones terapéuticas de tratamiento del carcinoma ovárico recidivante sensible al platino y del sarcoma de tejidos blandos en estadio avanzado [143-145].

La trabectedina es un agente alquilante con unión covalente a las pirimidinas, más específicamente al grupo amino exocíclico en la posición N2 de las guaninas del surco menor del ADN mediante los enlaces intermedios de iminio generados *in situ* por la deshidratación de la fracción de carbinolamina presente en el anillo A. Esta unión es selectiva para secuencias ricas en guanina-citosina y ocasiona la torsión de la doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN) hacia el surco mayor, lo que, unido al efecto estérico debido al fragmento C de la molécula de ET-743, interfiere con los mecanismos de reparación del ADN por escisión de nucleótidos acoplada a transcripción (TC-NER, en inglés transcription-coupled nucleotide excision repair) e induce la muerte final por apoptosis de las células cancerígenas [146-149].

Resulta destacable que otro alcaloide derivado de un compuesto natural aislado a partir del mismo tunicado y con características similares al ET-743, la lurbinedina (PM01183), esté siendo actualmente desarrollado por PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, España) como una evolución del mismo. El PM01183 se encuentra en fase III de registro para el tratamiento del cáncer de ovario platino-resistente y cáncer de pulmón microcítico y en fase II para el de mama metastásico BRCA 1/2 localmente avanzado y/o metastásico HER2 [150-153].

La trabectedina no es el único ejemplo de un agente antitumoral aislado a partir de un tunicado. La didemnina B, obtenida a partir de *Trididemnum solidum*, y la plitidepsina, aislada a partir de *Aplidium albicans*, constituyen dos ejemplos adicionales del potencial de este subfilo como fuente de nuevas moléculas con propiedades terapéuticas [154, 155] (Figura 5B).

Ambos compuestos son depsipéptidos cíclicos estructuralmente similares. La didemnina B presenta potentes actividades antivirales, inmunosupresoras y antitumorales *in vitro* e *in vivo*, siendo el primer compuesto de origen marino en iniciar las fases clínicas de desarrollo [156]. La ausencia de respuestas significativas y la elevada toxicidad neuromuscular y fatiga producidas por este compuesto propiciaron el abandono de los ensayos en fase II a mediados de los años 90 [157]. La plitidepsina es un análogo sencillo de la didemnina B que solo difiere de la anterior en la sustitución de una cadena lateral *N*-lactilo por un grupo piruvil [158]. Sin embargo, a diferencia de esta, la investigación clínica de la plitidepsina ha sido completada con éxito por la compañía biotecnológica PharmaMar

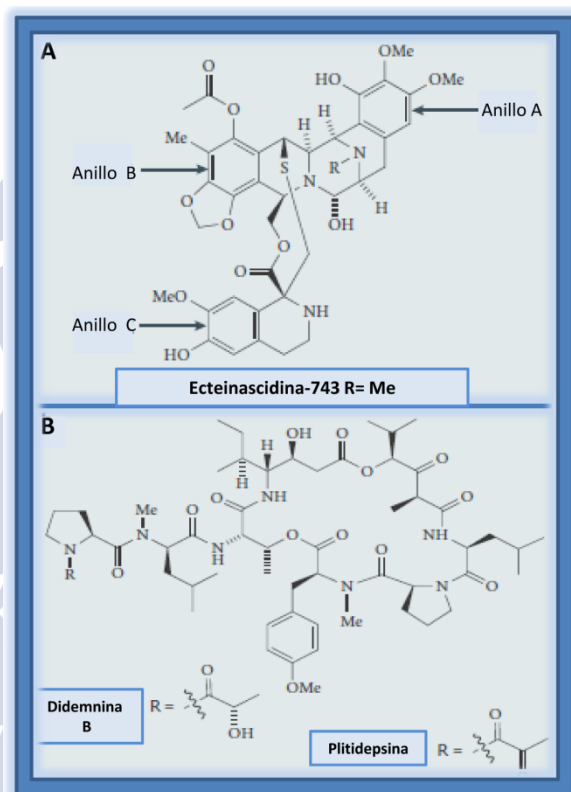


Figura 5. Estructuras químicas de la ecteinascidina-743 (A), didemnina B y plitidepsina (B). Adaptado de Molinski *et al.*

(Colmenar Viejo, Madrid, España) y este compuesto se encuentra actualmente en proceso de aprobación por la EMEA bajo el nombre comercial de Aplidine[®] para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple refractario, y en estudio de registro para el tratamiento del linfoma de células T angioinmunoblástico [159-162].

La plitidepsina posee una actividad antitumoral *in vitro* similar a la exhibida por la didemnina B, con valores IC₅₀ en el rango nanomolar para ambas moléculas [158]. Este compuesto induce la apoptosis celular por vía extrínseca mediada por el receptor de muerte celular Fas (CD95, en inglés cluster of differentiation 95) a través del incremento de los niveles intracelulares de las especies reactivas de oxígeno (ROS, en inglés reactive oxygen species) y por vía intrínseca mediante la liberación del citocromo C provocada por la activación sostenida de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK, en inglés c-Jun N-terminal kinase) y la quinasa activada por mitógenos (MAPK, en inglés mitogen-activated protein kinase) p38 [155, 163-166]. La plitidepsina actúa también inhibiendo la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, en inglés vascular endothelial growth factor) y su capacidad para bloquear la angiogénesis durante el desarrollo embrionario ha sido demostrada *in vivo* [159, 167]. En líneas celulares de leucemia aguda refractaria esta molécula produce el arresto del ciclo celular en las fases G1 y G2/M e induce la apoptosis mediante mecanismos p53-independientes [168]. La citotoxicidad *in vitro* exhibida por este compuesto en cultivos de linfocitos primarios y en líneas celulares transformadas difiere notablemente, ratificando la baja hemotoxicidad mostrada *in vivo* [168-171].

Los antitumorales naturales de origen marino también actúan sobre la tubulina, interfiriendo con la dinámica del citoesqueleto y con la formación del huso mitótico. El desarrollo de esta clase de compuestos ha sido un campo especialmente fructífero en el pasado y continúa presentando un potencial prometedor. Los ejemplos históricos más destacados se describen a continuación.

La hemiasterlina es un tripéptido antimicótico aislado originalmente a partir de la esponja *Hemiasterella minor* en 1994 (Figura 6A) [172]. Estudios iniciales con este compuesto demostraron su citotoxicidad frente a la línea celular de leucemia P388 con una

IC₅₀ aproximada de 10 nM [172]. Los isómeros hemiasterlina A y B aislados en 1995 demostraron ser incluso más potentes y todas las hemiasterlinas mostraron citotoxicidad en el rango nanomolar frente a diversas líneas celulares tumorales de origen humano y murino [173].

La obtención del análogo sintético HTI-286 (SPA-110/taltobulina) mediante la introducción de un grupo fenilo en sustitución del *N*-metiltriptófano encontrado en la estructura química original aumentó la potencia del compuesto y permitió la corroboración de su eficacia *in vivo* en modelos murinos de melanoma (LOX-IMVI), carcinoma epidermoide (KB-3-1), carcinoma de próstata (PC3MM2), carcinoma de colon (SW620 y LoVo), glioma (U87) y carcinoma de mama (MCF-7) entre otros (Figura 6B) [174].

Las hemiasterlinas producen la inhibición de la mitosis en la metafase con una dinámica celular similar a la observada para otros antineoplásicos con esta capacidad, como el paclitaxel o la vinblastina, con dosis efectivas 50 (ED₅₀, en inglés effective dose 50) comprendidas entre 0,5 nM (hemiasterlina) y 28 nM (hemiasterlina B) [175]. A dosis bajas la hemiasterlina A interfiere con la formación del huso mitótico, y a dosis altas produce la despolimerización de la tubulina con una eficacia superior a la del paclitaxel y la vinblastina [175]. Las hemiasterlinas se unen al dominio de vinca de la β -tubulina e impiden la adhesión de otros inhibidores como la dolastina 10 y la vinblastina [172, 173]. La reacción de unión del HTI-286 a la tubulina es rápida y exotérmica, con una relación estequiométrica de unión a monómeros de 1:1, sin embargo, la formación oligómeros es más lenta [176]. Se necesitan bajas concentraciones de HTI-286 para interferir en la actividad dinámica de la tubulina, pero se necesita al menos un equivalente químico de este péptido para provocar la despolimerización de los microtúbulos [177].

A diferencia del paclitaxel y la vinblastina, el HTI-286 no es un sustrato de la glicoproteína P y mantiene su actividad citotóxica en células que expresan elevados niveles de proteínas de resistencia a múltiples fármacos o bombas de resistencia activa (MDR, en inglés multiple drug resistance). En estos casos el efecto se mantiene pero las dosis de compuesto requeridas son mayores [178]. Las resistencias producidas por el HTI-286

parecen estar asociadas a la aparición de mutaciones en las subunidades α y β de la tubulina que, pese a no estar localizadas en los sitios de unión del compuesto, incrementan la estabilidad de los microtúbulos generando resistencias cruzadas frente a otros agentes despolimerizantes y aumentando la sensibilidad y la respuesta celular a los agentes polimerizantes [178].

La capacidad del HTI-268 para producir el colapso de la vasculatura tumoral también ha sido documentada *in vivo* 3 horas después de la administración intravenosa de una única dosis del mismo (1,7 mg/kg) a ratones con trasplantes heterólogos subcutáneos de células de carcinoma de colon de origen humano (HTC-116) [179].

Este compuesto sigue considerándose interesante para el tratamiento del cáncer de próstata refractario [180].

La (+)-discodermolida es otro ejemplo de un compuesto de origen marino con actividad sobre los microtúbulos (Figura 6C). Este policétido inmunosupresor fue aislado por primera vez a partir de la esponja *Discodermia dissoluta* en 1990 [181, 182]. La (+)-discodermolida produce el arresto del ciclo celular en la fase S a través de la estabilización de los microtúbulos con una afinidad de unión a tubulina superior a la del paclitaxel, interfiere también con la unión de la proteína tau a los microtúbulos, y disminuye la expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia-1 α (HIF1 α , en inglés hipoxia-inducible factor 1 α) [183-185].

La (+)-discodermolida no es un sustrato de la glicoproteína P y mantiene su actividad citotóxica frente a líneas celulares con resistencia adquirida al paclitaxel. En contraposición a las resistencias debidas a las mutaciones en la estructura de la tubulina generadas por el paclitaxel, la aparición de las resistencias producidas por la (+)-discodermolida está vinculada a la activación de ciertas moléculas de señalización, como el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1, en inglés plasminogen activator inhibitor-1), la proteína p66 y las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2, en inglés extracellular signal-regulated kinases) y, a diferencia de este, la (+)-discodermolida puede incluso inducir la senescencia de aquellas células tumorales con resistencia aumentada a la

misma [186]. Además, pese a su unión competitiva a la tubulina, ambos compuestos poseen una interesante actividad sinérgica [187, 188].

La eficacia *in vivo* de la (+)-discodermolida fue comprobada empleando un modelo murino de carcinoma colorrectal humano (HTC-116) [189]. En este sentido la síntesis total del enantiómero natural (+)-discodermolida supuso un gran avance para el desarrollo de este compuesto y permitió la obtención de la cantidad necesaria para la realización de un ensayo clínico en fase I por la compañía farmacéutica Novartis (Basilea, Suiza) [190-194].

La dolastina 10 es un depsipéptido lineal obtenido originalmente a partir de la babosa marina *Dolabella auricularia*, presente en el océano Índico (Figura 6D) [195]. Su desarrollo se inició en 1972 y su aislamiento guiado por bioensayo a partir de extractos resultó especialmente laborioso dados los bajos rendimientos obtenidos. Para la obtención del primer miligramo de este compuesto fueron necesarias casi dos toneladas de dicho animal [196]. Su síntesis total fue completada en 1989, y a finales de los años 90 y principios de los 2000 el aislamiento de las dolastinas 3, 10 y 12 a partir de diferentes especies de cianobacterias planteó por primera vez la posibilidad de que estos compuestos pudiesen, de hecho, ser producidos por dichas bacterias [197, 198].

La dolastina 10 es un potente agente antimetabólico que actúa impidiendo el ensamblaje de los microtúbulos y la polimerización de la tubulina [199, 200]. Los ensayos *in vitro* demostraron su actividad inhibitoria frente a líneas celulares humanas de melanoma, sarcoma y carcinoma ovárico, entrando por primera vez en desarrollo clínico a mediados de los años 80. Este compuesto alcanzó la fase II como agente único para el tratamiento del adenocarcinoma de próstata, del carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC, en inglés Non-small-cell lung carcinoma), melanoma, carcinoma colorrectal, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de mama y adenocarcinoma pancreático [201-205]. A pesar de su aceptable perfil toxicológico, la ausencia de significación clínica en todos los ensayos realizados propició su retirada [1].

Lo que en principio podría parecer un rotundo fracaso estuvo, en realidad, muy lejos de serlo, pues los resultados obtenidos durante su desarrollo clínico sirvieron de base para la

mejora de su estructura química y la consiguiente síntesis de nuevos análogos, entre los que se encuentra el compuesto semisintético conocido como TZZ-1027 o soblidotina (Figura 6D). Este derivado se obtuvo mediante la sustitución del residuo terminal de la dolastina 10 por un grupo funcional feniletilamina y mostró una potencia y eficacia *in vivo* similares a las exhibidas por el compuesto original, reduciendo a su vez la toxicidad y la aparición de neuropatías secundarias [206, 207]. Los buenos resultados propiciaron la puesta en marcha de los ensayos en fase clínica con este compuesto por la compañía Aska Pharmaceuticals (Minato-ku, Tokio, Japón), alcanzando la fase III de desarrollo [208]. Este no es el único éxito derivado de la investigación de las dolastinas, ya que primero la FDA en el año 2011, y posteriormente la EMEA en el 2012, autorizaron el empleo del fármaco conocido con el nombre comercial de Adcetris[®] (brentuximab vedotin) para el tratamiento de los pacientes con linfoma de Hodgkin y linfoma anaplásico de células grandes (ALCL, en inglés anaplastic large-cell lymphoma) refractarios. Esta terapia combinada consta de un anticuerpo monoclonal (brentuximab) que se une de forma selectiva a las células que expresan el receptor de membrana CD30, un marcador clásico del linfoma de Hodgkin y ALCL, conjugado con el análogo de la dolastina 10 auristatina E [209].

El glembatumumab vedotin (CDX-011 o CR011-vcMMAE) y el vosetuzumab mafodotin son dos ejemplos adicionales de terapias combinadas basadas en derivados sintéticos de las dolastinas que están siendo desarrolladas por Celldex Therapeutics (Hampton, Nueva Jersey, estados Unidos de América) y Seattle Genetics (Bothell, Washington, Estados Unidos de América) respectivamente. El glembatumumab vedotin es una combinación de auristatina E con el anticuerpo humanizado contra la glicoproteína transmembrana neuropomina B (NMB, en inglés neuromedin B) conocido como glembatumumab, que está en la fase II de desarrollo para las indicaciones de cáncer de mama metastático y melanoma. El vosetuzumab mafodotin es otro fármaco asociado a un anticuerpo constituido por el anticuerpo monoclonal anti-CD70 vorsetuzumab unido a la auristatina F que ha completado los ensayos en fase I para su utilización en el tratamiento de pacientes con carcinoma renal y linfoma no Hodgkin [210].

Entre los compuestos naturales de origen marino con actividad sobre los microtúbulos destacan también la halicondrina B y su análogo sintético, el mesilato de eribulina (E7389, número NCI NSC707389) (Figura 6E y 6F). La halicondrina B, la norhalicondrina B y la homohalicondrina B fueron aisladas en 1986 a partir de los extractos de la esponja *Halichondria okadai* [211, 212]. La síntesis total de la halicondrina B se logró por primera vez en 1992 y requería un total de 90 pasos para su obtención [213]. A principios de los años 90 estos compuestos fueron también aislados a partir de la esponja *Lissodendoryx n. sp. 1*; hecho que resultaría finalmente fundamental para el diseño de las estrategias que permitieron superar el obstáculo que para su desarrollo supuso la escasa disponibilidad de compuesto [214, 215].

El esfuerzo multidisciplinar realizado por ecologistas marinos y científicos de los ámbitos académico y gubernamental bajo el paraguas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, en inglés National Cancer Institute) fructificó en el desarrollo de los cultivos acuícolas de esta esponja y el posterior refinado de los métodos químicos para el aislamiento y la purificación de sus metabolitos secundarios, que permitieron el escalado de la producción hasta la obtención final de 310 mg de halicondrina B. Suficientes para la realización de los estudios preclínicos [215].

Aunque este enfoque incrementó los rendimientos, el avance producido fue solo parcial y la solución final se centraría en la síntesis total de los compuestos. Considerando la enorme complejidad estructural de las halicondrinas y la laboriosidad de los procesos de síntesis los esfuerzos se centraron en obtener análogos estructurales truncados más sencillos con perfiles biológicos similares a los de los compuestos originales. El trabajo académico multidisciplinar realizado en colaboración con la corporación japonesa Eisai Company (Tokio, Japón), su filial en los Estados Unidos, y el Instituto Eisai, supuso un gran empuje en esta dirección, obteniendo por primera vez análogos con el 70% de la masa de las moléculas originales e igual potencia y efecto sobre las células tumorales [216-218]. Este trabajo culminó con la identificación y posterior escalado de la producción de uno de estos análogos, el mesilato de eribulina [219].

Desde los primeros ensayos realizados las halicondrinas mostraron prometedoras actividades inhibitorias del crecimiento de células tumorales a concentraciones nanomolares [220]. El mesilato de eribulina, al igual que la halicondrina B, posee actividad anti proliferativa frente a una amplia variedad de líneas tumorales. Ambos compuestos se unen a la tubulina en la región del péptido de vinca, arrestando la progresión del ciclo celular en la fase de mitosis e induciendo la muerte celular por apoptosis [220]. Los buenos resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* propiciaron que en el año 2002 el NCI decidiese iniciar los estudios clínicos en fase I. Los resultados del ensayo en fase II con este compuesto como agente único en el tratamiento de 88 pacientes con cáncer de mama refractario se hicieron públicos en el año 2006 [221]. La duración media de la respuesta confirmada fue de 113 días y los efectos secundarios más destacables fueron la neutropenia y leucopenia. Estudios posteriores en pacientes con cáncer de mama en estadios avanzados y pacientes con NSCLC mostraron tasas de respuesta del 15% y 9.7% respectivamente [222]. Una vez más los buenos resultados obtenidos garantizaron la puesta en marcha de los ensayos clínicos en fase III que culminaron con la aprobación por la FDA en el año 2010 y por la EMEA en el 2011 del mesilato de eribulina, conocido comercialmente como Halaven[®], como tercera línea de tratamiento en pacientes con cáncer de mama metastático y con liposarcoma no extirpable o metastásico tras un régimen previo con antraciclina [223].

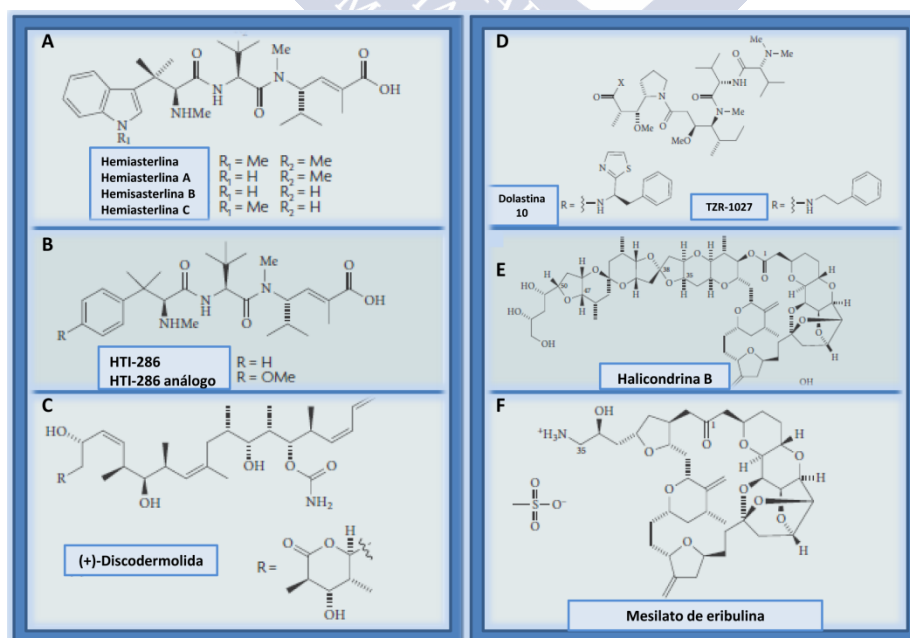


Figura 6. Estructuras químicas de diversos agentes dirigidos contra la tubulina.

Hemiasterlina (A), HTI-286 (B), (+)- discodermolida (C), dolastina 10 (D), halicondrina B (E) y mesilato de eribulina (F). Adaptado de Molinski *et al.*

Los agentes con potencial antitumoral de origen marino destacan también su gran diversidad de actividades biológicas. El depsipéptido conocido como Kahalalida F es un agente lisosomotrópico capaz de inducir la vacuolización y muerte celular por oncosis de las células tumorales pancreáticas y de mama, además de producir la necrosis de diversas líneas celulares tumorales de carcinoma hepático, de colon, de mama y NSCLC sensibles a este compuesto mediante la disminución de la proteína tirosina quinasa receptora erbB3 (ERBB3, en inglés receptor tyrosine-protein kinase erbB-3) y la inhibición de la vía de señalización fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K/Akt, en inglés phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) (Figura 7A) [224-226]. Este compuesto también provoca el aumento de la permeabilidad de las células tumorales de carcinoma hepático HepG2 mediante la apertura de canales iónicos en su membrana plasmática [225]. La Kahalalida F está siendo desarrollada por la compañía PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid) y ha alcanzado la fase II para el tratamiento de tumores sólidos en fases avanzadas, incluyendo melanoma, NSCLC y carcinoma hepático [227, 228].

Las briostatinas son una familia de 20 lactonas macrocíclicas de las que el análogo más conocido y mejor caracterizado es la briostatina 1 (Figura 7B) [196]. Este compuesto actúa modulando la proteína quinasa C (PKC, en inglés protein kinase C) a través de su unión al dominio regulador C1, el mismo al que se unen los ésteres de forbol. Sin embargo, a diferencia de estos, la briostatina 1 no actúa produciendo las mismas respuestas fisiológicas ni promoviendo el crecimiento tumoral [229-231]. Por el contrario, mientras las exposiciones de corta duración a este compuesto provocan la activación, autofosforilación y translocación de la PKC a la membrana plasmática de las células tumorales, los tratamientos largos la inhiben, produciendo una disminución hasta el nivel no detectable de su concentración intracelular, posiblemente a través de su reclutamiento y consiguiente unión a un proteosoma [232]. Esta molécula también actúa modulando el sistema inmune e induciendo la diferenciación celular, además de presentar interesantes interacciones sinérgicas con otros agentes terapéuticos [233-235]. Diversos ensayos clínicos en fases I y II con este compuesto como agente único fueron iniciados para el tratamiento de varios tipos de tumores, sin embargo, la falta de resultados positivos provocó su interrupción [236]. Cinco nuevos

ensayos en fase II en combinación con rituximab, vincristina, temsirolimus, cladribina o interleucina 1 fueron posteriormente iniciados por el NCI 268 [68].

La salinosporamida A (marizomib, NPI-0052) es otro ejemplo de un inhibidor de la subunidad catalítica 20S del proteasoma en fase I que está siendo desarrollado por la compañía Nereus Pharmaceuticals (San Diego, California, Estados Unidos de América) (Figura 7C) [237, 238]. El NSC 630173 es un péptido bicíclico inhibidor de las histona deacetilasas (HDA) que está siendo desarrollado por el NCI y ha alcanzado los ensayos clínicos en fase II [28].

Todos estos ejemplos constatan la solidez y el potencial de los compuestos naturales de origen marino como fuente de nuevas terapias antitumorales (Tabla II).

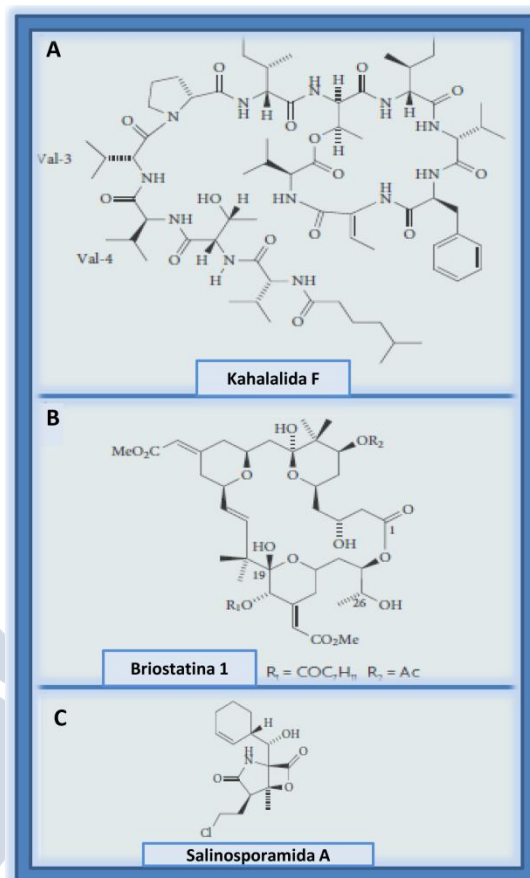


Figura 7. Estructuras químicas de la kahalalida F (A), briostatina 1 (B) y salinosporamida A (C). Adaptado de Molinski *et al.*

Compuesto	Clase	Organismo	Mecanismo de acción principal
Trabectedina (ET-743)	alcaloide	tunicado	arresto del ciclo celular
Didemnina B	depsipéptido cíclico	tunicado	inducción apoptosis
Plitidepsina	depsipéptido cíclico	tunicado	inducción apoptosis
Hemiassterlina (E7974)	tripéptido	esponja	interferencia con microtúbulos
HTI-286	péptido	análogo sintético	interferencia con microtúbulos
(+)-discodermolida	policétido	esponja	interferencia con microtúbulos
Dolastina 10	depsipéptido lineal	gasterópodo	interferencia con microtúbulos
Soblidotina (TZT 1027)	depsipéptido lineal	análogo semisintético	interferencia con microtúbulos
Mesilato de eribulina (E7389)	macrólido	análogo sintético	interferencia con microtúbulos
Kahalalida F	depsipéptido cíclico	gasterópodo/alga	agente lisosomotrópico
Briostatina 1	lactona macrocíclica	bacteria/briozoo	modulación PKC
Salinosporamida A	lactona	bacteria	inhibición proteasoma
NSC 630173	péptido bicíclico	cianobacteria	inhibición HDA

Tabla II. Resumen de los principales compuestos con actividad antitumoral de origen marino.

La aportación de estos compuestos no se reduce solo a la obtención de nuevas moléculas, sino que en repetidas ocasiones se han revelado como una valiosa fuente de inspiración para el desarrollo de nuevos compuestos sintéticos, reivindicando así su capacidad para aportar la tan ansiada diversidad estructural necesaria para incrementar las tasas de éxito de las librerías combinatorias. El caso del mesilato de eribulina es uno de los paradigmas más representativos de la importancia y el papel clave que las investigaciones de carácter multidisciplinar realizadas en el ámbito académico tienen para el descubrimiento, la identificación, la caracterización y el estudio de los compuestos naturales de origen marino, así como la transcendencia de las colaboraciones academia-empresa para afianzar el éxito final de su desarrollo clínico. Por todo ello, una parte de la presente tesis doctoral se centra en la caracterización farmacodinámica y el desarrollo preclínico de varios alcaloides de guanidina de origen marino con elevado potencial terapéutico y prometedores efectos antitumorales.

1.1.3 Compuestos de origen marino e industria farmacéutica: estado, retos y oportunidades

El descubrimiento de compuestos de origen marino con actividades farmacológicas potentes y uniones selectivas a dianas de interés terapéutico ha impulsado con anterioridad diversos avances tecnológicos orientados a combatir la escasez y la dificultad de la obtención de estos productos a partir de sus fuentes naturales [239]. Muestra de ello es el desarrollo de múltiples técnicas para el cultivo acuícola de los organismos productores y la optimización de los procesos de obtención de productos sintéticos y semisintéticos con propiedades farmacológicas y estructuras químicas optimizadas más fáciles de modificar [79, 80, 240]. Las investigaciones realizadas en las instituciones académicas y los institutos públicos han sido cruciales para el estudio de los productos naturales en el pasado [11, 240]. La tendencia actual hacia la ciencia translacional no solo afianza su importancia, sino que acentúa el valor y el potencial de sus aportaciones para acelerar la progresión de los productos naturales desde su descubrimiento hasta su aprobación para uso clínico. En este sentido, las investigaciones basadas en enfoques multidisciplinarios entre los ámbitos químico, farmacológico y médico proporcionan un marco colaborativo altamente competitivo en el que todas las partes implicadas se benefician de los conocimientos y avances mutuos,

incrementando exponencialmente la velocidad de obtención de resultados. En el campo de los productos marinos la colaboración entre los sectores público y privado también proporciona ventajas adicionales que mejoran el aprovechamiento de los recursos facilitando el acceso a los sistemas de cribado más sofisticados, acelerando la evaluación farmacológica de las moléculas y el avance de los cabezas de serie hasta los modelos *in vivo* [35]. Esto supone la oportunidad única para la industria farmacéutica de obtener nuevos compuestos líder de elevado valor terapéutico evadiendo parte del elevado riesgo asociado al desarrollo de los compuestos marinos [5]. La financiación pública también está impulsando y fortaleciendo la creación de este tipo de redes colaborativas, y ya son varios los ejemplos de países que han incluido el desarrollo de la biotecnología marina como objetivo estratégico en su agenda a través de la inclusión y el lanzamiento de múltiples programas nacionales centrados en el descubrimiento de fármacos a partir de fuentes marinas [69].

En este sentido, la presente Tesis Doctoral es un trabajo colaborativo multidisciplinar que se articula tanto a través de la participación en proyectos internacionales de carácter público como mediante la colaboración con plataformas e institutos médicos.

Los medios y métodos empleados en el estudio de los productos naturales han evolucionado notablemente en las últimas décadas. Los avances en espectroscopia analítica han reducido las cantidades de compuesto necesarias para el descubrimiento de nuevas moléculas a unos cuantos microgramos [241]. Los incrementos de la sensibilidad y de los rangos lineal y dinámico de las plataformas analíticas posibilitan el análisis de cantidades cada vez más pequeñas de NPs, simplificando su estudio [239, 242].

El proceso de descubrimiento de nuevos compuestos naturales ha sufrido históricamente varias limitaciones. La primera es la necesidad de identificar de forma rápida aquellas moléculas con estructuras conocidas para evitar las duplicidades innecesarias.

Este problema ha sido superado gracias al desarrollo de la cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrómetro de masas (HPLC-MS, en inglés high-performance liquid chromatography-mass spectrometry) y la creación de bases de datos que compilan las estructuras ya elucidadas [241, 243-247].

La segunda mayor limitación, la determinación de las estructuras de los NMEs, ha experimentado un notable avance gracias a las mejoras producidas en los métodos espectrométricos empleados, más concretamente en las tecnologías de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución. Entre estas mejoras las de mayor relevancia en cuanto a la determinación de las estructuras de los productos naturales son las relacionadas con la adquisición rápida de espectros de RMN multidimensionales y el incremento de la sensibilidad [248]. La determinación de las fórmulas moleculares mediante espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR/MS, en inglés Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry) precisa también de cantidades reducidas de compuesto [249]. Así, la combinación de ambas técnicas ha permitido disminuir los requerimientos para la caracterización estructural de los productos naturales y ha reducido la duración del proceso a horas o días, en lugar de semanas o meses.

El aislamiento y la purificación de los principios activos contenidos en los extractos naturales sigue siendo un proceso limitante para su obtención. Aunque el avance de los métodos empleados en su separación ha mejorado el poder de resolución de técnicas como el HPLC, la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC, en inglés supercritical fluid chromatography) o la electroforesis capilar (CE, en inglés capillary electrophoresis), la purificación sigue constituyendo un cuello de botella que contribuye al principal inconveniente tradicionalmente asociado al estudio de los productos naturales, la dificultad para contar con suministros estables, rentables, y en cantidades suficientes [7].

Pese a las dificultades, el elevado valor intrínseco de los productos naturales mantiene e impulsa el interés por afrontar y solventar los retos todavía pendientes. Un modo de lograrlo es la creación de colecciones de compuestos sintéticos o semisintéticos basados en el núcleo estructural de las moléculas naturales [51-53]. La premisa de la aparente separación entre los productos naturales y la química combinatoria parece por tanto superada, y el empleo de estrategias híbridas que combinan ambos enfoques de forma más eficiente y racional está cada vez más consolidado [50, 54-56].

El enfoque orientado a obtener compuestos que se unan a los espacios estructurales biológicos, definidos como los sitios de unión de los ligandos potenciales a las proteínas, se basa en el principio de la conservación evolutiva de los núcleos estructurales de los productos naturales y de las propias proteínas. Esta estrategia aprovecha dicha característica para mejorar la actividad biológica y las propiedades farmacológicas de las moléculas naturales mediante la modificación sintética parcial de sus estructuras [48, 49]. Las estructuras guía son seleccionadas en función de su compatibilidad biológica con las dianas de interés, y la elección de la clase química de los compuestos puede realizarse según la clasificación estructural de los productos naturales (SCONP, en inglés structural classification of natural products), mediante la agrupación por similitud estructural con otras proteínas (PSSC, en inglés protein structure similarity clustering), o por la combinación de ambas. Las colecciones de compuestos generados mediante este método han mostrado niveles de actividad biológica mayores a los de las librerías de compuestos sintéticos tradicionales, tanto en ensayos celulares como en ensayos con dianas moleculares puras, con tasas de éxito del 0,2-1,5 % [49].

Ejemplos de dicho éxito son las librerías de 483 decalinas creada para la obtención de inhibidores selectivos de la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β HSD1), y la colección de 74 inhibidores del factor de transcripción intermediario 2 (TIF2, en inglés transcriptional intermediary factor 2), basada en el alcaloide nakijiquinona C [49, 51].

La aplicación de estas estrategias también puede dirigirse hacia la maximización de la diversidad biológica, aprovechando la naturaleza privilegiada de los núcleos estructurales de origen natural para sintetizar librerías de moléculas capaces de unirse a una amplia variedad de dianas biológicas [48, 50, 52].

La capacidad para aprovechar el enorme potencial terapéutico contenido en las estructuras naturales plantea la necesidad de resolver la siempre problemática cuestión de su obtención. Este aspecto parece estar beneficiándose de la masiva cantidad de información genética obtenida de los microorganismos. Así, pese a que en la actualidad la proporción de microbios cultivable sigue siendo minoritaria, diversos trabajos han demostrado que la

información genética de los mismos puede ser extraída a partir de los organismos sésiles que habitan [250, 251].

La metagenómica permite el análisis del material genético presente en muestras ambientales y, durante la década de 2000 a 2010, su empleo aplicado al estudio de las complejas mezclas de microorganismos presentes en los ecosistemas marinos se generalizó, suponiendo una auténtica revolución y un gran avance para el entendimiento de los mecanismos genéticos y enzimáticos implicados en la síntesis de los metabolitos secundarios [109].

A principios de la década el estudio de las bases genéticas de estos procesos se centró en la identificación y secuenciación de pequeños grupos de genes proporcionando poca información sobre la cantidad y la biodiversidad de las rutas biosintéticas empleadas por los microorganismos marinos [68, 77, 208]. El desarrollo técnico posterior permitió la secuenciación completa de sus genomas y su análisis mediante *minería genómica* para la identificación de los genes implicados en la síntesis de los metabolitos conocidos, y para la liberación de su potencial biosintético mediante la localización de las rutas celulares implicadas en la producción de las biomoléculas no identificadas [110, 252-254].

El objetivo final de estos esfuerzos es la explotación del potencial biosintético de los microorganismos para la obtención de los metabolitos secundarios. El análisis de la información genómica recabada ha permitido la expresión heteróloga de las enzimas necesarias para la síntesis de varios metabolitos en microorganismos fácilmente cultivables y la consiguiente obtención de dichos compuestos a partir de los cultivos de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Streptomyces coelicolor* [255-265]. El alcance de estas técnicas para solventar los problemas de producción de los NPs se ve reforzado por el hecho de que muchos de estos compuestos, que se creía eran producidos por organismos como las esponjas, provienen en realidad de sus microorganismos simbiotes asociados. Un ejemplo de ello es el Yondelis[®], cuya fuente natural ha resultado ser un microorganismo no cultivable hasta la fecha y no el tunicado que habita, *E. turbinata*, a partir del que fue originalmente aislado [251].

La metabolómica persigue el análisis del perfil de metabolitos de un organismo en un momento dado y bajo unas condiciones determinadas, permitiendo así la monitorización indirecta de la expresión génica y de su estado bioquímico. La combinación de ambas técnicas, metabolómica y genómica, está siendo utilizada para mejorar la reproducción y el control de las rutas biosintéticas [104, 105, 111]. La metabolómica permite la optimización de la fermentación de los microorganismos a través de la monitorización en tiempo real de los niveles de los metabolitos secundarios de interés en los cultivos productores [266, 267]. Esta información sirve para incrementar los rendimientos de los procesos biosintéticos mediante el ajuste de los parámetros de cultivo y para la estabilización del suministro mediante la comprobación de los niveles durante los procesos de producción. El fenotipado metabolómico en combinación con la estrategia OSMAC (en inglés, one strain, many compounds) permite el estudio y determinación de las relaciones existentes entre las condiciones y métodos de cultivo y la evolución del metaboloma microbiano, la diversidad estructural y la actividad biológica de los compuestos generados [245, 268-270]. Desde la perspectiva del incremento de los rendimientos productivos el análisis del metaboloma facilita además la identificación de aquellos precursores biosintéticos clave para la síntesis de los metabolitos funcionales de interés [271]. Esta información resulta especialmente valiosa para su aplicación en el diseño de rutas con potencial de mejora y escalado de la producción [271].

El abordaje multidisciplinar basado en la utilización de todas estas estrategias para potenciar la explotación terapéutica comercial de los compuestos naturales combinado con métodos de síntesis química total y combinatoria, y con la manipulación genética de las rutas biosintéticas microbianas, seguirá muy posiblemente aportando la mejor solución para mitigar la crisis de productividad del sector farmacéutico en el futuro [6].

Otro aspecto decisivo para el ahorro temporal y económico en los programas de desarrollo de nuevos fármacos es la anticipación en el diseño de los estudios a realizar una vez que las moléculas de interés han sido seleccionadas mediante ensayos básicos. En este sentido el empleo de los denominados ensayos de alto contenido (HCS, en inglés high-content screening), que permiten el análisis del fenotipo celular resultante tras la exposición

a las moléculas de interés, permite confirmar la relevancia biológica de los resultados obtenidos mediante ensayos más sencillos y aporta información adicional sobre la afectación de los compartimentos subcelulares y los procesos y rutas implicados en la respuestas producidas por los compuestos [272].

En la presente Tesis Doctoral dichas técnicas han sido empleadas para el análisis y la caracterización de los efectos y las respuestas celulares producidas por los compuestos estudiados.

Existe por tanto una tendencia cada vez más pronunciada hacia la reaparición del cribado fenotípico y su utilización combinada con ensayos frente a dianas moleculares específicas. Los ensayos fenotípicos evitan los sesgos introducidos por estos últimos y presentan un mayor potencial para modular las dianas y las vías de señalización en los contextos celulares nativos, por lo que suelen identificar compuestos con mayor efecto terapéutico *in vivo* [273, 274].

El pez cebra, *Danio rerio*, constituye un ejemplo de un sistema *in vivo* con capacidad para acelerar el desarrollo farmacológico preclínico mediante su contribución al estudio simultáneo de aspectos tan diversos como la identificación de nuevos *leads*, la evaluación toxicológica, la determinación de las dianas farmacológicas de las moléculas en estudio, los estudios SAR y la comprobación de su eficacia *in vivo* en modelos de enfermedad [275-277]. La facilidad de manipulación genética, la disponibilidad de una amplia variedad de líneas transgénicas y la flexibilidad para integrarse en las cascadas de cribado de nuevos fármacos como plataformas para la realización de ensayos de HCS *in vivo* mediante la utilización de sus embriones, apoyan su utilización e inclusión en los programas de descubrimiento de nuevos fármacos [278, 279]. Los embriones de estos animales son transparentes, permitiendo la evaluación simultánea de sus efectos sobre diferentes órganos [280]. Otros aspectos como su elevada fecundidad, el bajo coste de los embriones y la eficiencia de su desarrollo hacen que, desde el punto de vista económico, este sistema sea una herramienta muy atractiva y eficiente para el diseño y realización de ensayos de cribado de elevado contenido y alta capacidad [281, 282].

La obtención de la mayor cantidad de resultados empleando la menor cantidad de compuesto posible es un aspecto crítico para el desarrollo farmacológico de los compuestos de origen marino, especialmente en las fases preclínicas, en las que los aspectos técnicos relacionados con la obtención de suministros estables no son abordadas y resueltos hasta que la relevancia terapéutica de los compuestos en cuestión ha sido convenientemente ratificada. En este contexto, una parte de la presente Tesis Doctoral se centra en el desarrollo y la evaluación de nuevas soluciones de cribado HCS adaptadas y aplicadas al estudio de los compuestos marinos. En concreto, para su caracterización y estudio *in vivo* mediante la utilización del pez cebra como organismo modelo.

1.2 COMPUESTOS DE GUANIDINA DE ORIGEN NATURAL

La guanidina es una imina de la urea formada por tres átomos de nitrógeno. Su elevada basicidad está relacionada con la estabilización termodinámica de su ácido conjugado, el ión guanidinio ($pK_a = 13.6$) que, a causa de la resonancia, es 6-8 kcal/mol más estable que la propia guanidina (ambas especies presentan una conjugación π debida a la deslocalización de seis electrones π) [283-285]. Los compuestos de guanidina son definidos como todos aquellos compuestos orgánicos que incorporan al menos un grupo funcional guanidinio como parte de su estructura [286-288]. Dicha estructura forma parte de muchos compuestos naturales de gran importancia bioquímica, tales como la guanina, el aminoácido arginina, el antibiótico estreptomycin, la creatina y otros metabolitos secundarios.

El interés por el estudio de la química y biología de los compuestos guanidínicos ha experimentado un crecimiento continuado en la última década explicado, en gran medida, por su extrema versatilidad funcional y por los notables avances realizados en la optimización de las reacciones necesarias para la síntesis parcial y total de sus estructuras [289]. Factores ambos que ofrecen prometedoras posibilidades para el estudio y desarrollo de su potencial industrial y terapéutico [290]. La gran diversidad de actividades biológicas que desempeñan estos compuestos explica el hecho de que la Selección Natural haya favorecido la adquisición y conservación por parte de los diferentes organismos productores de las rutas bioquímicas únicas necesarias para su síntesis [290]. Así, una enorme diversidad de toxinas

naturales incluyen un grupo funcional guanidinio u otros derivados de la arginina como parte de sus estructuras químicas [286-288, 290, 291]. Las actividades biológicas de estas moléculas se deben principalmente a las interacciones del catión guanidinio con los grupos fosfato y carboxilo presentes en una amplia variedad de moléculas biológicas. Esta propiedad es igualmente característica del aminoácido arginina, cuya presencia contribuye a la formación de las interacciones iónicas y, por consiguiente, al establecimiento de las fuerzas que finalmente estabilizan y afianzan la estructura terciaria de las proteínas [286-288, 290, 291]. Su habilidad para unirse a los compuestos aniónicos los convierte en excelentes catalizadores químicos. Por ello las guanidinas naturales son moléculas de elevado valor estructural tanto desde el punto de vista biológico, por la gran variedad de actividades que poseen, como químico, por su utilidad como herramientas de reconocimiento y reacción. En la actualidad gran parte del estudio de estos compuestos se centra en áreas orientadas a su desarrollo y utilización como bases, catalizadores, transportadores de membrana, sondas moleculares y miméticos funcionales de péptidos y nucleótidos [292-299]. El desarrollo de nuevos métodos para su síntesis química sigue avanzando impulsado por el interés que poseen, entre otras aplicaciones, como potenciales agentes antibacterianos, antimicrobianos, antiparasitarios, antivirales, antitumorales e inhibidores enzimáticos [217, 300-307].

1.2.1 Origen de los compuestos marinos de guanidina

Los compuestos orgánicos de guanidina de origen marino han sido extensamente estudiados durante los últimos 20 años [286-288, 290, 291, 308]. Los avances en su identificación, estudio farmacológico y biosíntesis tienen implicaciones directas para la salud humana y animal dada la gran diversidad de toxinas producidas por esponjas y cianobacterias que, a través de rutas biosintéticas únicas, incorporan derivados de arginina y grupos guanidinio completos en sus estructuras. Por consiguiente, su estudio es relevante tanto desde el punto de vista terapéutico como para el control de la calidad y salubridad de los suministros de agua potable, para el establecimiento de sus mecanismos de acción y para el estudio de la ecología, filogenia y evolución de las cianobacterias y demás microorganismos productores.

A continuación se incluye una clasificación de los metabolitos guanidínicos secundarios de origen marino ordenados en función de los principales grupos de organismos productores.

1.2.1.1 Compuestos de guanidina producidos por microorganismos marinos y de agua dulce

Las cianobacterias son uno de los grupos de microorganismos productores de compuestos guanidínicos más estudiados y mejor caracterizados. Estos microorganismos procariotas se distinguen por ser capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, colonizar una amplia variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres, y presentar una enorme diversidad morfológica [309]. Es en los ambientes acuáticos donde se producen los crecimientos exponenciales de patrón agregado responsables de la aparición de las características floraciones algales producidas por estas bacterias en las aguas eutróficas ricas en nutrientes [309].

Las cianobacterias presentan un metabolismo secundario muy activo, siendo la fuente de un gran número de compuestos estructuralmente diversos y biológicamente activos. Desde el punto de vista toxicológico las cianotoxinas se clasifican en cuatro categorías principales: neurotoxinas, hepatotoxinas, citotoxinas y dermatoxinas o toxinas irritantes [309]. De entre ellas la microcistina, la saxitoxina (STX), la anatoxina, la nodularina y la cilindroespermopsina (CYN, en inglés cylindrospermopsin) son consideradas como las cianotoxinas de mayor relevancia por sus implicaciones para la salud humana y animal [309]. Dada su condición de alcaloide guanidínico, en la presente tesis doctoral la STX, la anatoxina y la CYN han sido incluidas en dicho epígrafe.

Las microcistinas son el grupo de toxinas más numeroso y estructuralmente diverso de entre las producidas por las cianobacterias [310, 311]. Estos compuestos son heptapéptidos monocíclicos que incorporan dos aminoácidos proteinógenos en su estructura. Su nombre se define en función de estos dos aminoácidos variables [312, 313]. En la actualidad se han identificado alrededor de noventa isoformas de estas hepatotoxinas que difieren tanto en su grado de metilación, hidroxilación y epimerización como en su secuencia peptídica y toxicidad, siendo las más comunes las microcistinas LR, RR e YR [310, 311]. De entre ellas, la microcistina LR, que incorpora en su estructura la leucina y arginina como aminoácidos

variables, es la más tóxica y abundante. Los efectos biológicos intracelulares de las microcistinas incluyen la inhibición de las subunidades catalíticas de las fosfoproteínas fosfatasa 1 (PP1, en inglés protein phosphatase 1) y 2A (PP2A, en inglés protein phosphatase 2A), el incremento de ROS y la depleción de los niveles de glutatión (GSH) [314]. La estructura hidrofílica de estas moléculas hace que su paso al interior celular esté mediado por los sistemas transportadores implicados en la internalización de los péptidos cíclicos conocidos como polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP, en inglés organic anion-transporting polypeptide). La microcistina-LR ha sido identificada como sustrato de tres de estos transportadores, los OATP1A2, OATP1B1 y OATP1B3 [314]. El consumo de agua o alimentos contaminados con estas toxinas provoca que, una vez en el intestino, estas pasen al torrente sanguíneo a través de los OATP presentes en la superficie de las células epiteliales. Mediante esta vía alcanzan el hígado, dónde son concentradas por los hepatocitos que sobreexpresan este tipo de receptores en su membrana, provocando la aparición del daño hepático debido a los mecanismos celulares anteriormente descritos [314]. Estas toxinas también han sido descritas como agentes genotóxicos, produciendo la fragmentación del ADN, la aparición de aberraciones cromosómicas, la formación de micronúcleos, la pérdida de heterocigosidad e incluso la aparición de mutaciones por sustitución de bases [314].

Las nodularinas son pentapéptidos cíclicos aislados mayoritariamente a partir de la cianobacteria filamentosa *Nodularia spumigena*. Estructuralmente estas toxinas son similares a las microcistinas y sus efectos tóxicos son también similares a los provocados por estas [309]. Un total de siete isoformas naturales de nodularinas han sido descritas [315]. Estos compuestos son hepatotóxicos y carcinogénicos y sus efectos están igualmente relacionados con su capacidad para inhibir tanto la PP1 como la PP2A, aunque con una marcada afinidad por esta última [316-318].

Otro ejemplo de guanidina producida por cianobacterias es el polipéptido aeruginosina 298-A, aislada a partir de la cepa NIES-298 de la bacteria *Microcystis aeruginosa*. Esta molécula actúa como un inhibidor de la tripsina y la trombina. Las aeruginosinas 98-A y B, 102-A, 102-B y 103-A también son inhibidores de la tripsina, la trombina y la plasmina [286,

319]. Además, las aeruginosinas 98-A, B y C presentan efecto citotóxicos moderados frente a la línea celular de leucemia P388 [320]. La micropeptina 90, aislada a partir de la cepa NIES90 de la misma bacteria, y las aeruginosinas 205A y 205B actúan también inhibiendo las actividades enzimáticas de la plasmina y la tripsina [321]. Las micropeptinas C, F-I, SD944, SD999, SF995, SF608, EI922, EI964, LH1048, LH102, LH911A, las banyasinas A y B, las nostosinas A y B, la cianopeptolina 1020 y las aeruginosinas KT608A, KT608B, KT50 y KY642 son otros inhibidores de la tripsina, mientras que las micropeptinas SF909, SD979, SD1002 y LH1021 y la SD1634 actúan inhibiendo únicamente la quimotripsina [322-329]. Como las anteriores, la oscillatorina, producida por la cianobacteria *Oscillatoria agardhii*, es un inhibidor de la quimotripsina [330]. Además de la tripsina, la cianopeptolina 1020 aislada a partir de la cepa UV-006 de *M. aeruginosa* actúa inhibiendo el factor de coagulación XIa y la serina proteasa calicreína [331].

El A9072A es un ciclodepsipéptido aislado a partir de otra cianobacteria, *Microchaete loktakensis*, que actúa como inhibidor de las hidrolasas serina proteasas, la trombina, la tripsina y la plasmina [332].

La calophicina 60 es un decapeptido cíclico producido por *Calothrix fusca* con actividad antifúngica frente a *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Penicillium notatum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichophyton mentagrophytes*, y citotoxicidad moderada frente a la línea celular de carcinoma de cérvix KB [333]. Las alterobactinas A y B son los primeros polipéptidos sideróforos aislados a partir de una bacteria, *Alteromonas luteoviolacea*, que crece en las aguas oceánicas [334, 335]. Los polipéptidos producidos por la cianobacteria *Anabaena flos-aquae* NCR 525-17 conocidos como anabaenopeptinas A y B producen una relajación dosis-dependiente en el rango de 10 a 400 μ M de los anillos aórticos de rata con endotelio pretratados con norepinefrina (0,1 M), mientras que la anabaenopeptinas H actúa inhibiendo la actividad enzimática de la carboxipeptidasa A [336].

Múltiples compuestos producidos por cianobacterias actúan provocando la inhibición de las proteasas, es el caso de las micropeptinas SD944, SD979, SD999 y SD1002. Otros, como los péptidos producidos por las cianobacterias *Planktothrix (Oscillatoria) agardhii* y

Planktothrix rubescens, conocidos como oscillamidas B y C, son inhibidores de la PP1 y PP2A, pero no de la proteína tirosina fosfatasa S2 (PTP-S2, en inglés nuclear protein tyrosine phosphatase S2) [337].

La autumnalamida es un péptido cíclico prenilado obtenido de la cianobacteria *Phormidium autumnale* que actúa bloqueando la recaptación normal de Ca^{2+} por parte de la mitocondria mediante la apertura del poro de permeabilidad transitoria y el bloqueo indirecto de los canales de calcio [338].

Además de las cianobacterias otros microorganismos han sido identificados como productores de compuestos guanidínicos. Los sideróforos vanchrobactina y pseudoalterobactina A y B han sido aislados a partir de cultivos de *Vibrio anguillarum*, serotipo O2, cepa RV22, deficientes en hierro y de cultivos de *Pseudoalteromonas sp.*, respectivamente [339, 340]. Las lucentamicinas A-D son péptidos aislados a partir de la bacteria marina *Nocardiopsis lucentensis* de las cuales dos, la A y la B, poseen actividad citotóxica frente a la línea celular humana de carcinoma de colon HCT-116 [341].

En la tabla III se resumen las principales características de los compuestos más señalados descritos en este apartado.

Compuesto	Clase	Actividad biológica
Microcistinas	heptapéptidos	inhibición PP1 y PP2A, incremento de ROS, depleción GSH
Nodularinas	pentapéptidos cíclicos	inhibición PP1 y PP2A
Aeruginosinas	polipéptidos	inhibición tripsina, trombina y plasmina citotoxicidad moderada frente a línea tumoral P388
Micropeptinas	depsipéptidos cíclicos	inhibición tripsina, plasmina y quimotripsina inhibición proteasas
Cianopeptolina 1020	péptido	inhibición tripsina, plasmina y quimotripsina inhibición factor de coagulación XIa y calicreína
A9072A	ciclopepsipéptido	inhibición trombina, tripsina y plasmina inhibición hidrolasas serina proteasas,
Calophicina 60	decapéptido cíclico	antifúngica frente a <i>A. oryzae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. notatum</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>T. mentagrophytes</i> citotoxicidad moderada frente a línea tumoral KB
Alterobactinas	polipéptidos	quelante de hierro
Anabaenopeptinas	polipéptidos	relajación dosis-dependiente anillos de aorta inhibición carboxipeptidasa A
Oscillamidas	péptidos	inhibición PP1 y PP2A
Autumnalamida	péptido cíclico prenilado	bloqueo recaptación mitocondrial Ca^{2+}
Lucentamicinas	péptidos	citotoxicidad frente a la línea tumoral HCT-116

Tabla III. Guanidinas de origen microbiano.

1.2.1.2 Compuestos de guanidina producidos por esponjas

Tradicionalmente las esponjas marinas han sido la fuente de una gran cantidad de metabolitos guanidínicos policíclicos. Estos organismos constituyen el grupo biológico productor de la mayor diversidad de metabolitos de guanidina, probablemente porque sus tejidos albergan una gran cantidad de complejas asociaciones microbianas, que parecen ser, al menos parcialmente, su fuente de origen [290]. De entre todos ellos en este apartado se recogen aquellos con las actividades biológicas más destacadas documentadas hasta la fecha. En la introducción de la presente Tesis Doctoral las principales clases de alcaloides guanidínicos originalmente obtenidos a partir de las distintas especies de esponjas se incluyen en el epígrafe 1.2.2 dedicado a esta clase de compuestos.

Las onnamidas son una familia de compuestos cuyas estructuras están formadas por un residuo de arginina unido a un esqueleto de carbono polifuncionalizado derivado de acetato aisladas a partir de dos especímenes de la esponja *Theonella sp.* [342]. Tanto estas moléculas como algunos de sus derivados presentan potentes actividades citotóxicas frente a células tumorales humanas y propiedades antivirales [343]. La koshikamida A2, obtenida a partir de las esponjas del mismo género, presenta una citotoxicidad moderada frente a la línea murina de leucemia P388 [344]. La koshikamida B también presenta actividad citotóxica [345].

Diversas familias de polipéptidos también han sido obtenidas a partir de esponjas. Es el caso de las discoderminas, que fueron los primeros compuestos de dicha clase en ser aislados a partir de estos invertebrados, más concretamente a partir la esponja *Discodermia kiiensis*. Las discoderminas A-H presentan actividad antimicrobiana frente a una gran variedad de microorganismos [346-348]. La discodermina A provoca la permeabilización de la membrana plasmática de las células A10 permitiendo la entrada de las sondas fluorescentes homodímero-1 de etidio y calceína, además de aumentar la permeabilidad de los tejidos vasculares al Ca^{2+} y al adenosín trifosfato (ATP, en inglés adenosine triphosphate) [349]. Las halicilindramidas A-D son polipéptidos estructuralmente similares a las discoderminas aisladas por primera vez a partir de la esponja *Halichondria cylindrata* con actividad

antifúngica frente a *Mortierella ramanianna* y citotóxica frente a la línea murina de leucemia P388 [350, 351].

Las criamidas son otros polipéptidos aislados a partir de la esponja *Cymbastela sp.* de entre las cuales, la criamida B, muestra actividad citotóxica frente a líneas celulares de diverso origen, como la de leucemia P388, y las de carcinoma de mama MCF7, glioblastoma U373, carcinoma ovárico HEY, carcinoma de colon LOVO y carcinoma pulmonar A549 [173]. Las phloeodictinas, obtenidas de la esponja *Phloeodictyon sp.*, poseen actividad antibacteriana y citotoxicidad moderada frente a la línea celular tumoral de carcinoma de cérvix KB [352]. Otros péptidos con actividad inhibitoria frente a células tumorales humanas son los conocidos como neamphamidas B, C y D, aisladas a partir de la esponja *Neamphius huxleyi*, cuya citotoxicidad ha sido demostrada frente a las líneas de adenocarcinoma pulmonar A549, adenocarcinoma de cérvix HeLa, adenocarcinoma prostático LNCaP y PC3, además de frente a las líneas humanas no tumorales embrionarias HEK 293 y de fibroblastos NFF [353]. Las neopetrosiamidas A y B son dos péptidos tricíclicos aislados a partir de las esponjas marinas del género *Neopetrosia sp.* que presentan una interesante y prometedora actividad como potenciales agentes antimetastásicos al actuar inhibiendo la invasión ameboide de las células tumorales en los ensayos de migración celular *in vitro* documentados [354, 355].

Las callipeltas constituyen otra familia de polipéptidos cuya fuente de origen es la esponja marina *Callipelta sp.* Tanto la callipelta A como las B y C mostraron una interesante actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares tumorales humanas, siendo la callipelta A la molécula más activa de todas [356, 357]. Las callipeltas A, C y F-I mostraron actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, y la callipelta A también ha demostrado ser citotóxica frente a linfocitos de la línea celular CEM4 infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH-1) [357, 358].

Las narainas, obtenidas a partir de un espécimen de esponja del género *Jaspis* son inductores de la metamorfosis de las larvas del ascidio *Halocynthia roretzi* [359]. De los pirroles conocidos como decapamidas que han sido aislados a partir de cuatro especies

diferentes de esponjas del género *Agelas*, solo uno mostró actividad antihistamínica a una concentración de 1 μM [360].

Varios compuestos obtenidos a partir de las esponjas del género *Theonella*, como la nazumamida A, han demostrado ser potentes inhibidores de la trombina [361]. Es el caso de las cicloteonamidas A, C y D que mostraron una inhibición similar de la actividad enzimática de la trombina, mientras que la cicloteonamida E presenta una actividad veinte veces menor [362]. Tanto la cicloteonamida E2 como la E3 son inhibidores de serina proteasas e inhibidores de la trombina y tripsina en el rango nanomolar [363]. La cicloteonamida E4 y E5 producen la inhibición de la actividad de la tripsina en el rango nanomolar [364]. Otros seis nuevos péptidos con actividad inhibidora de la trombina y tripsina, las pseudoteonamidas A1, A2, B2, C y D y la dihidrocicloteonamida A, han sido aislados a partir de la esponja *T. swinhoei* [365]. La cupolamida A es otro compuesto obtenido a partir de la especie *T. cupola*, sin embargo esta molécula no presenta actividad anti-trombina, sino que produce la inhibición del crecimiento de la línea tumoral murina P388 con una IC_{50} de 7,5 mg/ml [366]. La tokaramida A es un inhibidor de la catepsina B obtenido a partir de la esponja *T. mirabilis* [367]. La miraziridina es un péptido inhibidor de las cisteín-proteasas aislado a partir de la misma esponja. La miraziridina A inhibe la catepsina B con una IC_{50} de 1,4 μM [368].

La 3-piridil-guanidina conocida como piraxinina, obtenida de la esponja *Cymbastela cantharella*, presenta una actividad inhibitoria de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, en inglés inducible nitric oxide synthase) de hasta el 50% sin signos aparentes de citotoxicidad significativa a una concentración de 100 μM [369]. La microspinasomida aislada a partir de la esponja *Sidonops microspinosa* actúa como inhibidor del efecto citopático del VIH-1 en células CEM-SS [370]. El mismo efecto ha sido descrito para la neamphamida A, aislada a partir de la esponja *Neamphius huxleyi* [371].

Las polidiscamidas B-D aisladas a partir de la esponja *Ircina sp.* son potentes agonistas de los receptores sensoriales acoplados a proteína G (SNSRs, en inglés sensory neuron specific receptors), implicados en la manifestación del dolor. Dichos compuestos poseen una

EC₅₀ de 1.26, 3.57 y 2.80 μM , respectivamente [372]. Los halisulfatos 1, 2, 3 y 5, obtenidos de la esponja *Dysidea sp.* son inhibidores de la enzima isocitrato liasa (ICL, en inglés isocitrate lyase), siendo de todos ellos el halisulfato 5 la sal que mostró la actividad más significativa frente a la ICL del hongo *C. albicans*. Estos compuestos presentan también una actividad antibiótica significativa frente a *Bacillus subtilis*, y en menor medida frente a *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhimurium* [373]. La nakijiquinona H es un meroterpeno con actividad antibiótica frente a algunos de estos microorganismos y *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus niger* [374].

1.2.1.3 Compuestos de guanidina producidos por otros invertebrados marinos

Entre los invertebrados marinos productores de guanidinas naturales distintos de las esponjas los ascidios han sido los más prolíficos en cuanto al número de nuevos compuestos proporcionados, tanto de alcaloides como de péptidos. Los derivados de guanidina no se aíslan de forma frecuente a partir de los moluscos terrestres o marinos, y algunas de las guanidinas naturales obtenidas a partir de estos animales son derivados de naturaleza peptídica y origen alimentario. Un ejemplo de ellos son las kahalalidas [375].

Las phidianidinas A y B, aisladas a partir del molusco marino *Phidiana militaris*, producen una interesante actividad citotóxica en el rango sub-micromolaren células de glioma C6, de carcinoma de cérvix HeLa, fibroblastos embrionarios de origen murino y células humanas de epitelio renal HEK293 [376].

La gymnangiamida, producida por *Gymnangium regae*, es un peptapéptido con actividad citotóxica comprobada en 10 líneas celulares tumorales distintas, incluyendo carcinomas de colon, pulmonar, ovárico y leucemia [377]. Un derivado de la D-arginina, la herdmanina C, aislada a partir del ascidio *Herdmania momus*, presenta una moderada actividad antiinflamatoria, inhibiendo la producción de óxido nítrico (NO, en inglés nitric oxide) a una concentración de 96 μM y de la prostaglandina E2 (PGE₂) [378].

Las eusinstielamidas A-C fueron originalmente aislados a partir del ascidio *Eusyntyla latericius*. Algunos de estos compuestos derivados de indol muestran actividad inhibidora de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS, en inglés neuronal nitric oxide synthase), es el caso de las eusinstielamidas B y C, con valores IC_{50} de 4.3 y 5.8 μ M respectivamente, mientras que la eusinstielamidas A presenta una IC_{50} de 41.7 μ M. Ninguno de estos compuestos presentó citotoxicidad alguna frente a las líneas celulares humanas de carcinoma de mama MCF7, de células derivadas del sistema nervioso central SF-268, y de carcinoma pulmonar H-460 [379].

1.2.2 Alcaloides guanidínicos de origen marino

La distribución de los alcaloides guanidínicos de estructuras complejas entre los organismos vivos es limitada, habiendo sido aislados a partir de ciertos microorganismos, algas y animales (invertebrados, peces y anfibios). Dichos compuestos presentan estructuras y propiedades farmacológicas muy diversas [290].

La gran diversidad de alcaloides de guanidina producidos y almacenados por las esponjas marinas constituye otro de los aspectos más interesantes de la bioquímica de estos compuestos [380]. El número de estudios que tratan de elucidar su origen y las rutas biosintéticas implicadas en su producción es, en la actualidad, reducido, y su diversidad estructural elevada. Así, los alcaloides descritos hasta la fecha incorporan residuos de arginina, agmantina y sus derivados como parte tanto de las estructuras más simples de terpenos y péptidos, como de los motivos estructurales policíclicos de elevada complejidad de las palauaminas, massadinas, ptilomycalinas y crambescidinas [381].

Los compuestos de guanidina presentes en las esponjas marinas poseen estructuras químicas realmente únicas que se aíslan a partir de mezclas complejas de difícil separación, siendo la gran mayoría de ellos alcaloides [380].

Los alcaloides guanidínicos han sido clasificados mediante diferentes criterios, como su biosíntesis, la presencia de ciclos en su estructura y por familias estructurales.

1.- Según su biosíntesis, en función de la procedencia de su función nitrogenada se clasifican en:

- ***Procedentes de arginina***, aquellos que como fuente del grupo guanidinio utilizan un aminoácido de arginina e incorporan su esqueleto en la estructura del alcaloide [382].
- ***No procedentes de arginina***, los átomos de nitrógeno de la guanidina se incorporan vía aminación de otro tipo de sustrato carbonado. Estos pueden ser derivados de acetato, shikimato, terpenos o esteroides. Por ejemplo, la ruta biosintética propuesta por Snider y colaboradores para los alcaloides guanidínicos policíclicos aislados a partir de algunas especies de esponjas marinas, entre los que se incluyen la ptilomicalina A, las crambescidinas, las crambescinas, las ptilocaulinas, las mirabilinas y las batzelladinas, implica una doble adición conjugada de guanidina a una cadena de policétido (bis-enona) convenientemente funcionalizada [383].

2.- Según la presencia o ausencia de ciclos en su estructura, se pueden clasificar en:

- ***Acíclicos***, aquellos en los que la guanidina es un sustituyente de una cadena principal lineal, ramificada o cíclica.
- ***Cíclicos***, aquellos en los que el grupo guanidinio forma parte de un heterociclo. Algunos ejemplos son la tetrodotoxina (TTX), la STX, las crambescidinas, las ptilomicalinas y la guanina.

3.- Según la familia estructural se pueden clasificar en:

- ***Las caracasanamidas***. Como la galegina, que proporciona la estructura base para la síntesis de la metformina y se utiliza en los procesos de síntesis de otros compuestos biguanidínicos comercializados como fármacos antidiabéticos [384].
- ***Las crambescidinas y ptilomicalinas***. La estructura de estos alcaloides presentan una guanidina tricíclica central conectada a una unidad de espermidina a

través de un ácido graso de cadena larga lineal empleado como separador. Algunos ejemplos de esta familia son las ptilomicalina, mirabilina F, celomicalina, batzelladina D, fromiamicalina y las crambescidinas [385-387].

- **La oroidina:** Esta clase está formada por una compleja y diversa mezcla de metabolitos secundarios bioactivos. Esta familia incluye, entre otros, los compuestos conocidos como dibromophakellina, bromophakellina y la amina de Palau o paulamina [388, 389].

- **Las massadinas:** Los compuestos relacionados con la familia de las massadinas poseen una potente actividad fungicida frente a *C. albicans* mediante la inhibición de la geranylgeranyltransferasa 1 (GGTasa 1). También presentan una notable actividad inmunosupresora, citotóxica y antiinflamatoria. [389-391].

- **La saxitoxina:** La STX es una neurotoxina cuya presencia ha sido detectada en numerosas especies de crustáceos (mayoritariamente bivalvos) que se alimentan de dinoflagelados. Este filo, que forma parte del fitoplacton marino, está formado por un extenso grupo de protistas flagelados principalmente unicelulares, que son la verdadera fuente de origen de la toxina [392].

- **La tetrodotoxina:** La TTX es una toxina aislada por primera vez en 1909 a partir de los ovarios de un pez globo del orden *Tetraodontidae*. Este grupo incluye, entre otros compuestos, la 11-norTTX-(6S)-ol, la 11-nor-TTX-(6R)-ol y la chiriquitoxina. Las especies de bacterias de los géneros: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Flavobacterium* han sido señaladas como posibles productoras de TTX [393-396]. Sin embargo, la producción continuada de TTX de origen bacteriano en el laboratorio todavía no se ha logrado.

Históricamente las guanidinas marinas de origen natural han mostrado una gran variedad de interesantes actividades biológicas, modulando distintas rutas celulares y actuando sobre una amplia gama de dianas farmacológicas de diversa naturaleza [286-288, 290, 291, 397]. Las privilegiadas estructuras moleculares de estos compuestos han incentivado el interés que

tradicionalmente ha existido por el aprovechamiento de sus prometedoras propiedades funcionales, muy adecuadas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

De entre la totalidad de compuestos guanidínicos marinos los alcaloides han sido una de las clases químicas más relevantes en cuanto al número de nuevos compuestos proporcionados, a la diversidad de actividades biológicas exhibidas, y a su idoneidad y aptitud terapéutica. De entre ellos, la ptilomicalina, las crambescidinas, las crambescinas, y sus respectivos análogos y derivados conforman tres de las familias más prometedoras y mejor caracterizadas en lo relativo a sus estructuras, origen, propiedades químicas y otros aspectos relacionados con su explotación comercial. Es por ello que la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio y caracterización de las actividades biológicas y el potencial farmacológico de los alcaloides guanidínicos naturales de origen marino conocidos como crambescinas y crambescidinas.

1.3 CRAMBESCINAS Y CRAMBESCIDINAS

1.3.1 Estructura de las crambescinas y crambescidinas

El descubrimiento de la ptilomicalina A, un alcaloide guanidínico pentacíclico estructuralmente complejo, aislado a partir de las esponjas *Ptilocaulis spiculifer* y *Hemimycale sp.*, anticipó la identificación de varios de sus análogos a partir de otras especies de esponjas y estrellas marinas [398-404]. La ptilomicalina A es, por tanto, el compuesto parental de una serie de metabolitos secundarios estructuralmente relacionados entre los que se incluyen las crambescidinas y sus derivados conocidos (la isocrambescidina, la crambidina, los neofolitispates, el ácido crambescidínico, la ptilomicalina D, las monanchocidinas y las monanchomicalinas) [398-400, 403, 405-414].

Trabajos posteriores centrados en el estudio de una especie desconocida de esponja del género *Monanchora* concluyeron con el aislamiento e identificación de una serie adicional de metabolitos guanidínicos policíclicos estructuralmente relacionados entre sí [406]. Entre dichos compuestos se incluyen las crambescinas, la ptilocaulina e isoptilocaulina, las batzelladinas A-J y sus derivados, las isobatzellinas A-B y las secobatzellinas A-B [397, 409,

415-426]. Por tanto, la ptilomicalina A, las crambescinas, las crambescidinas, las ptilocaulinas, las mirabilinas y las batzelladinas son alcaloides guanidínicos biogénicamente relacionados caracterizados por sus inusuales estructuras químicas y sus potentes actividades biológicas. Todos estos alcaloides guanidínicos de triazaacenaftileno (TGA, en inglés triazaacenaphthylene guanidine alkaloids) han sido aislados a partir de ejemplares de esponjas pertenecientes al orden *Poecilosclerida* [427].

Los TGA pueden ser clasificados de diversas formas, la clasificación propuesta por Santos *et al.* en 2015 dividía dichos compuestos en cuatro clases químicas [426]. En modificaciones posteriores se introdujeron cambios en la tercera categoría, de forma que describiese aquellos TGAs con estructuras de triazaacenaftileno pentacíclicas como las crambescidinas [381].

La tabla IV resume ambas clasificaciones, las distintas clases de TGAs, las estructuras características de cada una de ellas y las esponjas a partir de las que fueron aislados.




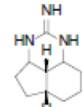


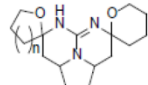
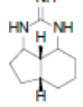
Nº	Clase 1	Clase 2	Clase 3	Clase 4	Referencia
1			 +1 o más núcleos de guanidina		(426)
Esponjas	<i>Batzella</i> <i>Crambe</i> <i>Pseudaxinella</i> (<i>Ptilocaulis</i>)	<i>Clathria</i> <i>Crambe</i> <i>Hemimycale</i> <i>Monanchora</i> <i>Neofolitispa</i> <i>Ptilocaulis</i>	<i>Batzella</i> <i>Manchora</i>	<i>Acanthella</i> <i>Arenochalina</i> <i>Batzella</i> <i>Biemna</i> <i>Clathria</i> <i>Monanchora</i> <i>Ptilocaulis</i>	-
2			 $n = 1 \text{ o } 3$		(381)
Esponjas	<i>Batzella</i> <i>Crambe</i> <i>Pseudaxinella</i> (<i>Ptilocaulis</i>)	<i>Batzella</i> <i>Clathria</i> <i>Monanchora</i>	<i>Crambe</i> <i>Hemimycale</i> <i>Monanchora</i> <i>Neofolitispa</i> <i>Ptilocaulis</i>	<i>Acanthella</i> <i>Arenochalina</i> <i>Batzella</i> <i>Biemna</i> <i>Clathria</i> <i>Monanchora</i> <i>Ptilocaulis</i>	-

Tabla IV. Diferentes categorías de TGAs.

Más recientemente estos compuestos han sido reclasificados en dos grupos, los denominados alcaloides de guanidina similares a las crambescidinas y los alcaloides de guanidina similares a las batzelladinas [381]. El término crambescidinas se emplea para designar a una serie de complejos compuestos guanidínicos pentacíclicos unidos mediante un ω -hidroxiácido lineal a una unidad de hidroxiespermidina.

La tabla V recoge los alcaloides similares a las crambescidinas identificados hasta el año 2015.

Metabolito	Espanja	Procedencia	Año de descubrimiento	Núcleos guanidínicos	Actividad biológica	Síntesis descrita	Referencias
Ptilomicalina A	<i>Hemimycale sp.</i> <i>Ptilocaulis spiculifer</i>	Mar Rojo	1989	1	Av, Am, At	Sí	(405, 428, 429)
Crambescidina 800	<i>Crambe crambe</i>	Mar Mediterráneo	1991	1	Av, Am, At	Sí	(399, 400, 406, 429, 430)
Crambescidina 816	<i>Crambe crambe</i>	Mar Mediterráneo	1991	1	Av, At, antagonista Ca ²⁺	No	(398-400)
Crambescidina 830	<i>Crambe crambe</i>	Mar Mediterráneo	1991	1	Np	No	(399)
Crambescidina 844	<i>Crambe crambe</i>	Mar Mediterráneo	1991	1	Av	No	(399, 400)
13, 14, 15-isocrambescidina 800	<i>Crambe crambe</i>	Mar Mediterráneo	1993	1	Sin actividad	Sí	(400, 428, 431)
Crambidina	<i>Crambe crambe</i>	Mar Mediterráneo	1993	1	Np	Sí	(398, 432, 433)
Neofolitispate 1	<i>Neofolitispa dianchora</i>	Océno Índico	1999	1	Av	No	(407)
Neofolitispate 2	<i>Neofolitispa dianchora</i>	Océno Índico	1999	1	Av	Sí	(407)
Neofolitispate 3	<i>Neofolitispa dianchora</i>	Océno Índico	1999	1	Av	No	(407)
Crambescidina 359	<i>Monanchora unguiculata</i>	Océano Atlántico	2000	1	Np	Sí	(385, 403, 434, 435)
Crambescidina 431	<i>Monanchora unguiculata</i>	Océano Atlántico	2000	1	Np	No	(403)
Crambescidina 826	<i>Monanchora sp.</i>	Océno Pacífico	2003	1	Av	No	(406)
Ácido crambescidínico	<i>Monanchora unguiculata</i>	Océno Índico	2004	1	At	No	(408)
Ácido crambescídico	<i>Monanchora unguifera</i> <i>Monanchora dianchora</i>	Océano Atlántico	2005	1	Np	No	(409)
16 β -hidroxicrambescidina 359	<i>Monanchora unguiculata</i>	Océano Atlántico	2007	1	Am	No	(429)
Ptilomicalina D	<i>Monanchora dianchora</i>	Océno Índico	2007	1	Np	No	(410)
Monanchocidina A	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2010	1	At	No	(411)
Monanchocidina B	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2011	1	At	No	(413)
Monanchocidina C	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2011	1	At	No	(413)
Monanchocidina D	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2011	1	At	No	(413)
Monanchocidina E	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2011	1	At	No	(413)
Monanchomicalina A	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2012	1	At	No	(412)
Monanchomicalina B	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2012	1	Np	No	(412)
Monanchomicalina C	<i>Monanchora pulchra</i>	Océno Pacífico	2013	1	Np	No	(414)

Am, actividad antimicrobiana; Av, actividad antiviral; At, actividad antitumoral y Np, no probada

Tabla V. Alcaloides guanidínicos similares a las crambescidinas identificados entre 1989 y 2015. Adaptado de Sfecci *et al.*

Los alcaloides similares a las crambescidinas están estrechamente relacionados entre sí, difiriendo unos de otros en el compuesto espiro de la posición C-8, la presencia o la ausencia del grupo hidroxilo en la posición C-13 y en la naturaleza de la terminación de la cadena lateral de la posición C-14 [381] (Figura 8).

Por su parte, las crambescinas A, B, C1 y C2 (Figura 9) fueron aisladas por primera vez como una mezcla de homólogos obtenida a partir de los extractos de la esponja *C. crambe*

[415, 416]. A partir de la fracción más polar de dichos extractos Jares-Erijman *et al.* aislaron posteriormente otros alcaloides policíclicos adicionales, las crambescidinas 800, 816, 830 y 844 [399]. Además de las crambescidinas 800 y 816 Berlinck *et al.* identificaron otros dos compuestos a partir de los extractos de la misma esponja, la isocrambescidina 800 y la crambidina [398]. Así, la mayoría de los compuestos aislados a partir de la esponja *C. crambe* fueron originalmente agrupados en las dos familias denominadas crambescinas y crambescidinas.

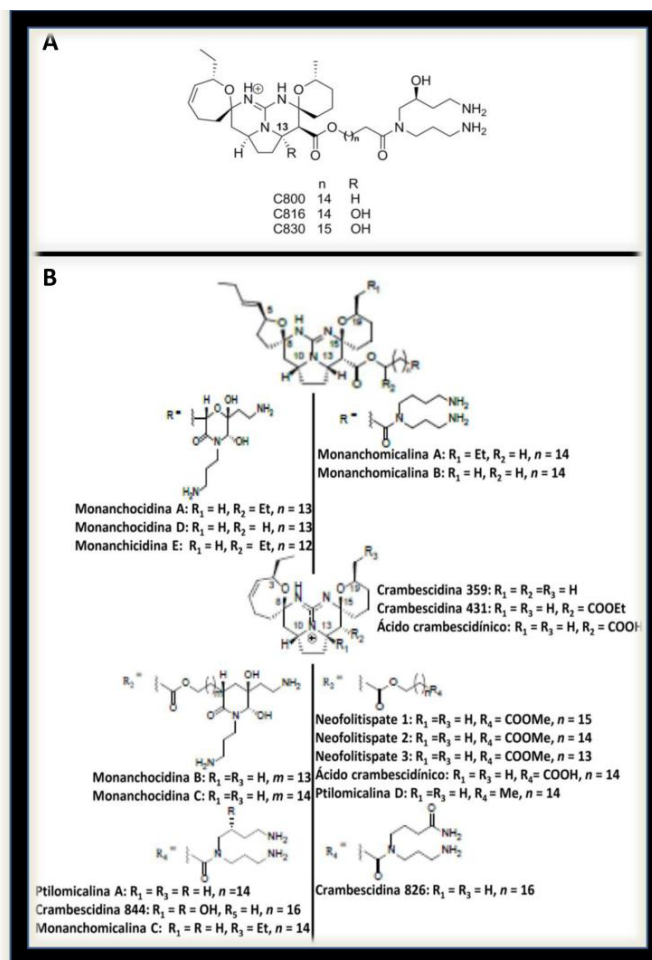


Figura 8. Estructura de las crambescidinas 816, 830 y 800 (A). Resumen de las estructuras de distintos alcaloides de guanidina similares a las crambescidinas (B). Adaptado de Sfecci *et al.*

Posteriormente tanto estos compuestos como otros miembros adicionales de ambas familias fueron identificados a partir de la misma y de otras especies de esponjas e invertebrados. Es el caso de la crambescidina 826, 359, 431, la dehidrocrambescina A, y más

recientemente, la crambescina A2, la homocrambescina A2, la didehidrocrambescina A1, la norcrambescina B1, la norcrambescina A2, la homocrambescina B1, la norcrambescina C1 y la homocrambescina C1 [399, 400, 403, 404, 406, 428, 429].

De acuerdo con la proposición inicial de Rinehart las crambescinas pueden clasificarse en tres grupos según las diferencias estructurales existentes entre las cadenas laterales de propil presentes en la posición C-8 del núcleo guanidínico. Así, las crambescinas A presentan un anillo de pirrolidina en dicha posición, mientras las crambescinas B se caracterizan por la presencia de un grupo espiroaminal y las crambescinas C por la presencia de una cadena lateral lineal 3-hidroxipropil [417].

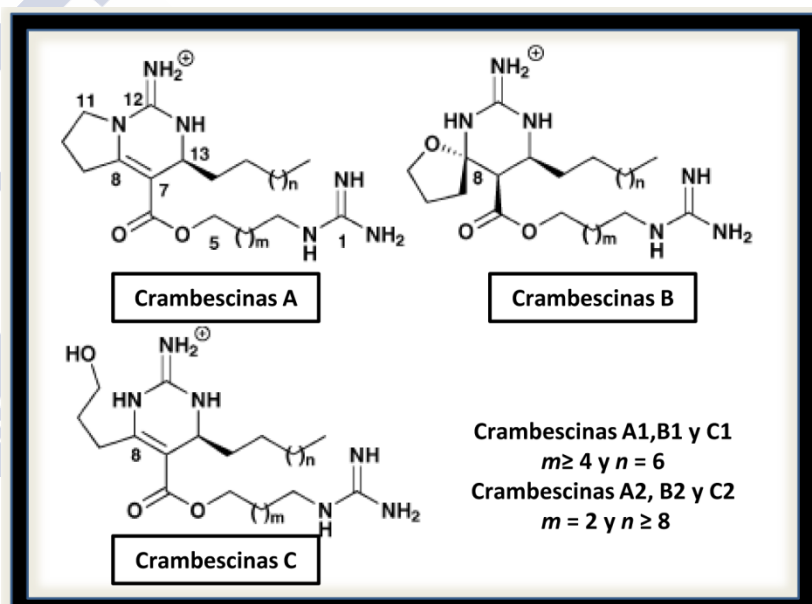


Figura 9. Estructuras de las crambescinas A, B y C.
Adaptado de Bondu *et al.*

1.3.2 Origen de las crambescinas y crambescidinas naturales

Como se indica en la sección anterior, las crambescinas y crambescidinas fueron aisladas por primera vez a partir de los extractos de la esponja marina *C. crambe*. Esta especie de esponja, de color rojizo y crecimiento incrustante, presenta una amplia distribución siendo muy común en las aguas litorales del Mediterráneo occidental [430]. Antes incluso de que estos compuestos fuesen aislados, diversos autores habían documentado algunas de las actividades biológicas propias de los extractos de *C. crambe*,

entre las que se incluían las propiedades antibacterianas y la ictiotoxicidad [431-433]. Dichas observaciones sirvieron de base para el aislamiento de las crambescinas y las crambescidinas e impulsaron el interés por el estudio de diversos aspectos relacionados con la biología de la esponja. Trabajos posteriores se centraron en esclarecer la función e importancia de la presencia de estos compuestos en sus tejidos para su supervivencia. Los autores encontraron que, de entre la totalidad de extractos de los organismos bentónicos presentes en el Mediterráneo incluidos en el estudio, los obtenidos a partir de *C. crambe* presentaban la mayor actividad antiincrustante frente a las larvas del briozoo marino *Bugula neritina* y antimicótica/citotóxica frente a embriones del erizo de mar común *Paracentrotus lividus* [90, 434]. Igualmente, dichos extractos poseían una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias bentónicas que los obtenidos a partir de otras dos especies de esponjas [435]. Tampoco se detectó presencia de bacterias sobre la superficie externa de estas esponjas [435].

Las defensas mecánicas, como las espículas, la producción de mucus o la realización de ecdisis no han sido nunca descritos para esta especie de esponja, sugiriendo que, en este caso, la naturaleza de sus mecanismos de defensa es genuinamente química. La presencia de estos metabolitos secundarios estaría por tanto relacionada con la ausencia de organismos de crecimiento incrustante en su superficie externa, con la capacidad para estabilizar la composición de su población de bacterias simbiotas y para competir con otros organismos por el sustrato disponible, o con la mejora de la eficiencia de filtrado [435]. Esta esponja fotófila destina gran parte de sus recursos energéticos al crecimiento y la reproducción [436]. La presión por ocupar el espacio disponible parece ser un factor clave de su metabolismo. Así, los especímenes sometidos a mayor presión destinan más energía a la colonización en detrimento del crecimiento somático y la reproducción, además de ser más tóxicos [437, 438]. Por tanto, en esta especie de esponja el tamaño está relacionado con la toxicidad, siendo los organismos de tamaño intermedio los más tóxicos [439].

La toxicidad intraindividual también varía en función de la distribución espacial siendo mayor en la periferia de la esponja que en su zona central [438]. Pequeños incrementos en la concentración de sus metabolitos secundarios producen un marcado aumento de la toxicidad

indicando que la toxicidad basal de esta especie de esponja es elevada y que posee la habilidad de regularla de forma precisa en respuesta a la presión ambiental y a las variaciones estacionales, alcanzando los niveles máximos entre el final del verano y el inicio del otoño [440]. Estos patrones parecen estar relacionados con los ritmos reproductivos, pues a partir del mes de abril la presencia de embriones en algunas colonias empieza a ser ya detectable, desarrollándose las larvas principalmente en el mes de agosto. Este fenómeno coincide con el período de menor toxicidad, mientras que el incremento de la misma durante el otoño parece estar relacionado con la reactivación del crecimiento competitivo por el espacio tras la temporada estival [308, 438]. Así, la liberación de las larvas marca el fin de la inversión energética en las funciones reproductivas y el inicio de transición hacia la función defensiva, caracterizada por un incremento en la producción de metabolitos secundarios durante el otoño y el invierno [438]. Dichos patrones apuntan a que *C. crambe* es capaz de regular la producción de sus metabolitos secundarios mediante un complejo mecanismo que integra y compagina los procesos fisiológicos internos propios de la esponja y los factores bióticos externos [438].

La distribución de los metabolitos secundarios en los especímenes de *C. crambe* también ha sido objeto de estudio [441]. Estos se localizan principalmente en el ectosoma, en detrimento del coanodermo. Los resultados parecen indicar que las células esferulosas son las responsables del su almacenamiento, produciéndose una liberación continuada de los mismos a través de la capa externa de la esponja que explicaría la elevada toxicidad observada en los tejidos periféricos [438, 441]. Además, estos compuestos parecen estar implicados en las interacciones de *C. crambe* con otros organismos [442]. La falta de contacto entre los bordes externos de esta esponja y el resto de especímenes presentes en el mismo hábitat indican que esta especie posee un eficiente mecanismo de inhibición del crecimiento de sus competidores. Por tanto, los metabolitos guanidínicos producidos por esta esponja son considerados como herramientas químicas multifuncionales altamente eficientes de gran importancia para su mantenimiento y supervivencia [90, 443].

El hecho de que tras su aislamiento a partir de la esponja *C. crambe* tanto la crambescidina 800 como otros alcaloides guanidínicos policíclicos estructuralmente

relacionados fuesen también aislados a partir de las esponjas *M. unguifera*, *M. arbuscula*, *M. pulchra*, *M. dianchora*, *Neofolitispa dianchora* y *Cathria calla*, además de las estrellas de mar *Fromia monilis* y *Celerina heffermani*, planteó la conveniencia de redefinir y agrupar a las esponjas de los géneros *Monanchora*, *Batzella*, y *Crambe* bajo el género *Crambe* [444].

La posible síntesis y origen microbiano de estos compuestos sigue siendo una cuestión en estudio. Las esponjas marinas albergan una amplia variedad de microorganismos asociados, incluyendo algas unicelulares, cianobacterias, bacterias heterótrofas y arqueas [445-449]. El grado de asociación existente entre dichos microorganismos y los diferentes tipos de esponjas es variable. En el caso de las denominadas bacterioesponjas o esponjas de elevada abundancia microbiana (HMA, en inglés high microbial abundance), la presencia de estos organismos puede llegar a constituir el 40% de su biomasa, mientras que las esponjas de baja abundancia microbiana (LMA, en inglés low microbial abundance) albergan comunidades bacterianas mucho más pequeñas y de menor diversidad, dominadas generalmente por uno o dos filos [446-448, 450-453].

La esponja *C. crambe* es un buen modelo para el estudio del origen de los TGA por la elevada diversidad presente en sus extractos. Sin embargo, la presencia o ausencia de bacterias asociadas a los tejidos de *C. crambe* ha sido motivo de controversia en el pasado. Las observaciones realizadas por Uriz *et al.* mediante microscopía electrónica de transmisión establecieron la aparente ausencia total de microorganismos simbiotes en las células y el mesohilo de dicha esponja [441]. Esta afirmación fue posteriormente rebatida por Sará *et al.* en un estudio que documentaba la presencia esporádica de cianobacterias en especímenes procedentes de las costas italianas [454]. Estudios recientes empleando pirosecuenciación del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal 16S e hibridación *in situ* para la identificación y caracterización de la población bacteriana de *C. crambe* revelaron la presencia dominante de un única unidad taxonómica operativa (UTO, en inglés operational taxonomic unit) en sus tejidos [455]. Esta unidad fue caracterizada como una especie de betaproteobacteria no identificada como planctónica y no cultivable hasta la fecha. Los datos obtenidos sugieren la posibilidad de que se trate de una especie de escasa presencia en el medio externo que se

introduce en los tejidos de la esponja durante los procesos de filtración y cuyo crecimiento se ve favorecido en este ambiente [455].

Resulta interesante que los tejidos de las formas larvarias de las esponjas estén generalmente libres de la presencia de bacterias, sugiriendo que, sin importar su origen, la adquisición y mantenimiento de los simbioses deseados y la exclusión de otras bacterias debe realizarse mediante antibiosis [456, 457]. Este mecanismo se basaría en la capacidad de un grupo reducido de bacterias de adaptarse a la presencia de los antibióticos producidos por las esponjas. *C. crambe* produce una amplia gama de alcaloides guanidínicos con una reconocida y potente actividad antimicrobiana, lo que podría contribuir a explicar la aparente selección de un único tipo de organismo simbiote por parte de dicha esponja [435].

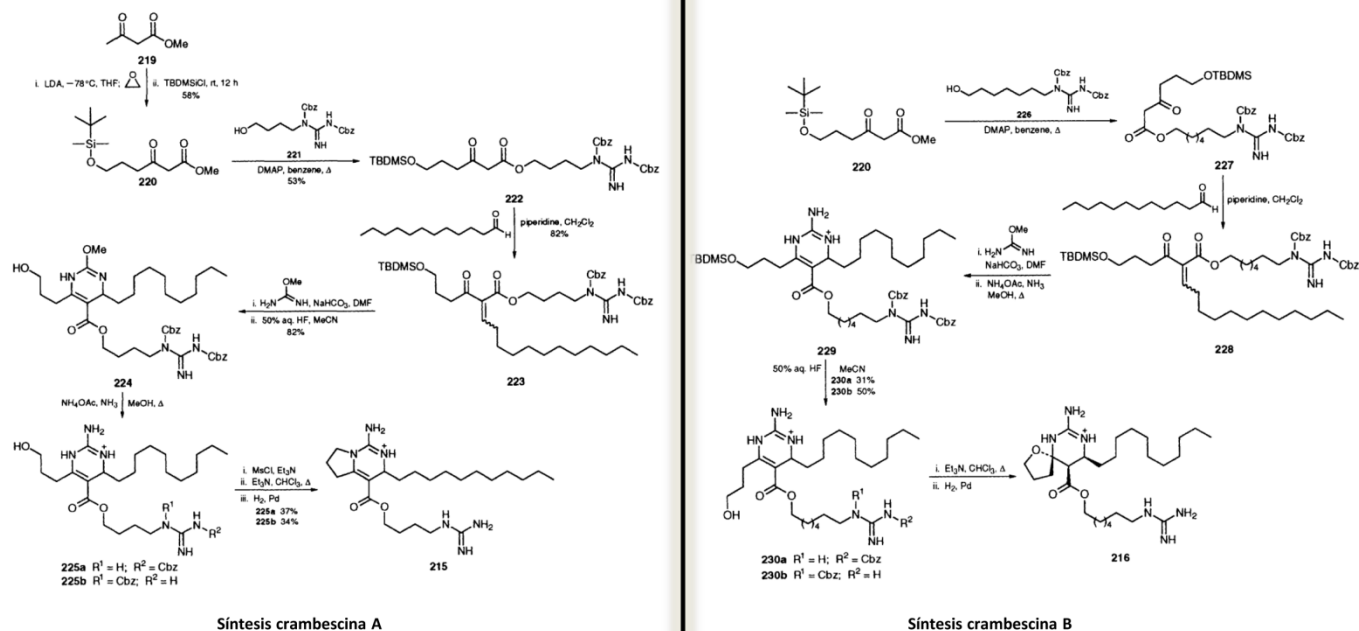
Un estudio integral de los simbioses encontrados en diferentes especies de esponjas reveló la presencia de 26 filos distintos, siendo las proteobacterias las que presentaban una mayor diversidad [448]. Estudios posteriores señalaron la posibilidad de que la asociación existente entre las betaproteobacterias y las esponjas LMA en aguas templadas fuese un fenómeno global en el que cada especie de esponja selecciona y favorece el establecimiento de asociaciones estables con OTUs filogenéticamente distintas y específicas para cada una [452, 453, 458]. En el caso concreto de *C. crambe* los estudios previos indicando la ausencia de microflora asociada a esta esponja y la presencia de altas concentraciones de alcaloides guanidínicos en sus tejidos apuntaron hacia la posibilidad de que la biosíntesis de sus potentes metabolitos secundarios fuese únicamente debida a las células de la esponja [435, 441]. Sin embargo estudios biomiméticos sobre la síntesis de los alcaloides similares a las crambescidinas señalaron una posible implicación, cuando menos parcial, de los microorganismos en los procesos de biosíntesis de este tipo de moléculas [420]. En este sentido, y aunque la realización de nuevos estudios adicionales resulta todavía necesaria, la identificación de la presencia de betaproteobacterias en los tejidos de *C. crambe* indica que la participación de dichas bacterias en la síntesis de las crambescinas y crambescidinas no puede ser completamente descartada, con las posibles implicaciones que ello tendría en la simplificación del diseño y el escalado de los procesos de producción industrial y su contribución a la reducción de los costes asociados. Existen, por tanto,

evidencias que apoyan la realización de estudios de transcritómica y proteómica adicionales sobre la expresión de determinados genes bacterianos para el esclarecimiento de la importancia de la presencia de dichos microorganismos y su contribución a la producción de estos compuestos [455].

1.3.3 Síntesis y relación estructura-actividad de las crambescinas y crambescidinas

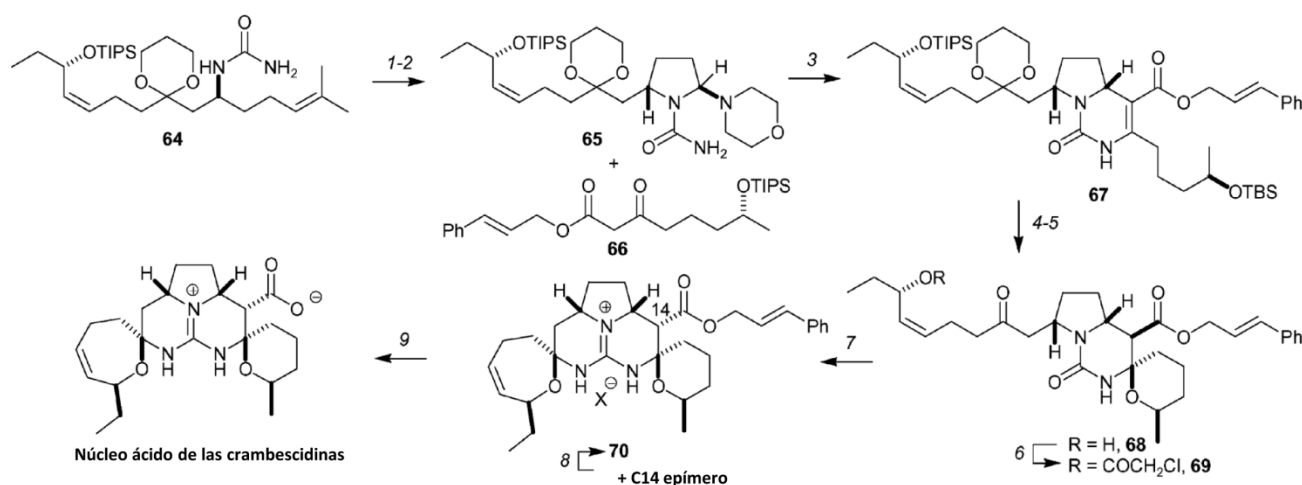
El esqueleto policíclico de la ptilomicalina A y los alcaloides guanidínicos similares a ella han sido objeto de estudio por parte de diversos grupos en el pasado [459-462]. Así, Snider y Murphy lograron la síntesis total de los núcleos bicíclicos de la familia de las crambescinas, de varios de sus análogos, y de los núcleos pentacíclicos de las crambescidinas mediante el diseño de rutas sintéticas biomiméticas basadas en la premisa de la obtención mediante la adición de grupos funcionales guanidío a cadenas de poliquétido convenientemente funcionalizadas (Esquema I), de manera análoga a lo sucedido con la ptiolocalina y la isoptilocalina [383, 463].

Trabajos posteriores realizados por Overman se centraron en el diseño y obtención de



Esquema I. Síntesis de los núcleos bicíclicos de la crambescina A y B según lo propuesto por Snider y Shy.

una ruta para la síntesis total del núcleo ácido de las crambescidinas (Esquema II). Dicha estructura se descarboxila con facilidad dando lugar a la conocida como crambescidina 359, caracterizada por ser el primer compuesto de su clase cuya estructura carece de la cadena lateral presente en la posición C14 del resto de crambescidinas [461]. Este grupo fue también responsable del diseño de la síntesis de los alcaloides conocidos como crambidina, 14, 15, 16-isocrambescidina 800, 13, 14,15- isocrambescidina 657, ptilomicalina A, crambescidina 657 y crambescidina 800 [464, 465]. Esta metodología ha sido posteriormente empleada por otros grupos para la síntesis de otros derivados pentacíclicos y de diversos análogos de la crambescidina 800 con utilidad e interés como catalizadores químicos y herramientas biológicas [385].



En el año 2004 otro método de síntesis del núcleo ácido de las crambescidinas fue documentado. La consiguiente obtención de tres librerías de análogos sintéticos de las crambescidinas 359, 657 y 800 mediante este método permitió el estudio y comparación de sus actividades biológicas en 14 líneas celulares tumorales diferentes [466]. Los resultados de estos estudios SAR demostraron que la inhibición del crecimiento celular producida aumentaba al incrementar la longitud de la cadena lateral en la posición C14. Notablemente, alteraciones estructurales mínimas producían también variaciones sustanciales en la

selectividad de estos compuestos frente a las distintas líneas celulares tumorales [466]. Así, mientras la crambescidina 359 mostró una elevada selectividad frente a leucemias, la introducción de una cadena lateral alil éster en la posición C14 resultó en un incremento de la selectividad frente a tumores sólidos. En las series de análogos de las crambescidinas 657 y 800 la longitud de la cadena lateral en la posición C14 resultó ser también decisiva, siendo aquellos compuestos con cadenas cortas más selectivos frente a leucemias [466].

1.3.4 Actividades biológicas y posibles usos terapéuticos de las crambescinas y crambescidinas

Las crambescidinas constituyen una familia de alcaloides guanidínicos con reconocida actividad citotóxica, antifúngica, antibacteriana y antiviral [399, 404, 406, 418, 428, 429, 466, 467].

Varios análogos sintéticos de esta familia de compuestos han mostrado capacidad para inhibir las interacciones de la proteína vírica Nef (en inglés, negative regulatory factor) con las proteínas p53, p56^{lck} y la actina [468]. Este hallazgo resulta interesante para el estudio del mecanismo patogénico del VIH-1; pues aunque se sabe que Nef juega un papel fundamental durante su propagación, se desconoce cómo. Por tanto, el interés de estos compuestos radica tanto en su potencial terapéutico como nuevos agentes anti-VIH como en su utilidad como herramientas para el estudio y entendimiento del ciclo reproductivo de este virus [468]. La capacidad de las crambescidinas para evitar las interacciones proteína-proteína plantea la interesante posibilidad de que puedan inhibir más uniones de este tipo.

Diversos análogos de esta familia de compuestos han sido objeto de estudio en el pasado. Es el caso de la crambescidina 800, capaz de inhibir el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* y, junto con la ptilomicalina A y ciertos análogos sintéticos de ambos compuestos, con actividad antiparasitaria frente al protozoo *Plasmodium falciparum* [469, 470]. Su utilidad como tratamiento antipalúdico fue corroborada en las fases hepática y eritrocítica de la enfermedad causada por dicho protozoo. Sus efectos fueron caracterizados frente a la cepa sensible a cloroquina 3D7-wy la cepa resistente FCR3, con valores IC₅₀ de 160 nM y 240 nM, respectivamente [470]. La ptilomicalina A y la crambescidina 800 poseen también

actividad antifúngica frente a *C. albicans*, *C. neoformans* y *A. fumigatus*, y antibacteriana frente a *S. aureus*, *P. aureginosa* y *M. tuberculosis*. Ambos compuestos mostraron también una marcada citotoxicidad frente a diversos carcinomas de origen humano [471-473].

Otra prometedora actividad biológica de la crambescidina 800 es su capacidad protectora frente al estrés oxidativo inducido por glutamato en línea celular de hipocampo de ratón HT22 [474]. La coincubación con crambescidina 800 impidió la muerte celular por apoptosis de las células HT22 expuestas a altas concentraciones de este compuesto. Su capacidad protectora es extensible al estrés oxidativo producido por la hipoxia y el NO. Esta actividad neuroprotectora resulta interesante para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson, en las que la elevada mortalidad celular observada ha sido vinculada al incremento en la producción y los niveles de ROS [474].

La crambescidina 800 también induce la diferenciación a eritroblastos de las células de la línea de leucemia mieloide crónica K562 produciendo un arresto de la mitosis en la fase S del ciclo celular [475].

De todos los análogos estructurales que conforman la familia de las crambescidininas la conocida como crambescidina 816 es también una de las mejor caracterizadas hasta la fecha.

Los canales iónicos son dianas habituales de las toxinas naturales por lo que su actividad sobre los canales de calcio regulados por voltaje fue analizada por primera vez en 1993 en la línea celular híbrida NG108-15 (neuroblastoma x glioma) [398]. Los resultados obtenidos demostraron que la crambescidina 816 bloquea la entrada celular de calcio con un efecto antagónico superior al de la nifedipina (un bloqueante selectivo de los canales de calcio tipo-L) [398]. Estudios posteriores en cultivos de neuronas embrionarias corticales de rata no sólo respaldaron estos resultados, sino que la caracterización de sus efectos sobre los canales de sodio dependientes de voltaje mostró una actividad adicional como bloqueante parcial de la corriente de entrada de sodio [476].

La actividad citotóxica de la crambescidina 816 ha sido comprobada frente a diversas líneas celulares. Estudios previos han documentado su efecto letal sobre células humanas de

carcinoma de colon (IC_{50} 0,24 $\mu\text{g/ml}$) [398]. Trabajos posteriores documentaron su citotoxicidad en cultivos primarios de neuronas corticales, estableciendo un valor IC_{50} de 0,354 $\mu\text{g/ml}$ y postulando una marcada dependencia de su efecto en función de la línea celular empleada [428].

La actividad antifúngica frente a *S. cerevisiae* de tres análogos estructurales de esta familia ha sido corroborada. De entre los compuestos empleados la crambescidina 816 mostró el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de dicho hongo en comparación con las crambescidinas 830 y 800, con una IG_{50} de 0,557 μM [469]. Dichos compuestos producen un incremento del tamaño celular de este hongo, la apertura del poro mitocondrial y la muerte por apoptosis [469].

La gran diversidad de actividades biológicas exhibidas por las crambescidinas remarca sus prometedoras posibilidades terapéuticas a la vez que evidencia la actual falta de conocimiento sobre importantes aspectos básicos tales como el descubrimiento de nuevos efectos biológicos, la caracterización de los mecanismos celulares responsables de sus actividades conocidas y la comprobación de su eficacia *in vivo*. En el caso de las crambescinas este desconocimiento resulta incluso más evidente. Por ello, ambas familias de compuestos son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.





Objetivo

2. OBJETIVO

Los compuestos naturales de origen marino poseen una gran diversidad estructural y un elevado valor y potencial como agentes terapéuticos únicos o coadyuvantes farmacológicos para el tratamiento de múltiples enfermedades. En este contexto, y en virtud de las actividades incluidas en el marco de los proyectos europeos BAMMBO (Ref. 265896) y PHARMASEA (Ref. 312184), orientados al descubrimiento, obtención, identificación y evaluación de las posibles actividades biológicas y potencial terapéutico de una amplia librería de moléculas naturales de origen marino, se recibieron en el Departamento de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela distintos análogos pertenecientes a las dos familias de compuestos conocidas como crambescinas y crambescidinas.

Las crambescinas y crambescidinas presentan una amplia variedad de interesantes actividades biológicas aparentemente debidas a la forma y propiedades de su característico núcleo. En el caso de las crambescidinas, los datos obtenidos hasta la fecha apuntan a la singular fracción nuclear pentacíclica de su estructura como causa principal. Sin embargo, para ambas familias de compuestos la falta de conocimiento acerca de sus posibles dianas y mecanismos de acción es casi total. En el caso de las crambescinas este vacío se hace también extensible al estudio e identificación de sus posibles actividades biológicas, de las que casi ninguna ha sido documentada hasta la fecha. En la presente Tesis Doctoral se investiga la habilidad terapéutica de varios análogos de las familias de las crambescinas y las crambescidinas.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es profundizar en la caracterización farmacodinámica de las actividades biológicas y los mecanismos de acción involucrados en las respuestas celulares producidas por las crambescinas y crambescidinas mediante la

evaluación y el estudio inicial de sus efectos *in vitro*, y la posterior confirmación de su eficacia *in vivo*.

El hecho, anteriormente documentado, de que cambios mínimos en la estructura de los compuestos de la familia de las crambescidinas provoquen variaciones sustanciales en la selectividad frente a los distintos tipos de tumores, así como el potencial de los ensayos de elevado valor funcional para reducir los cuellos de botella inherentes al descubrimiento y desarrollo farmacológico de los compuestos de origen marino, han despertado y promovido nuestro interés, dando lugar al establecimiento de los siguientes objetivos específicos:

1. Confirmación y caracterización del potencial antitumoral de diversos análogos de la familia de las crambescidinas frente a distintos tipos de tumores sólidos. Estudio e identificación de los mecanismos de acción y las rutas celulares implicadas en las respuestas celulares observadas y comparación de la magnitud de los efectos producidos en cada caso.
2. Exploración del potencial terapéutico de diversos análogos de la familia de las crambescinas mediante la identificación inicial *in vitro* de sus efectos biológicos y la caracterización posterior de los mecanismos celulares subyacentes.
3. Evaluación de la capacidad y compatibilidad de los ensayos de elevado valor funcional para el cribado de compuestos naturales mediante el desarrollo y utilización del pez cebra como organismo modelo.



Publicaciones



3. PUBLICACIONES

3.1 PRESENTACIÓN

En esta sección se incluyen los datos derivados de los trabajos realizados durante la elaboración de la presente Tesis Doctoral. Dichos resultados han sido recogidos en los 3 artículos publicados en revistas internacionales que le dan forma y constituyen el núcleo de la misma. Cada una de estas publicaciones recopila, además, las descripciones detalladas de las metodologías científicas empleadas, la discusión de los resultados y las conclusiones obtenidas en cada caso. Los artículos presentados se agrupan en las dos partes que a continuación se exponen:

Parte I: Estudio y caracterización del potencial antitumoral y los mecanismos de acción de distintos alcaloides de origen marino análogos de la familia de las crambescidinas.

Los compuestos conocidos como crambescidinas son alcaloides guanidínicos caracterizados por la presencia en sus estructuras moleculares de la distintiva fracción pentacíclica nuclear propia de esta familia de moléculas. Las crambescidinas presentan diversas e interesantes actividades biológicas entre las que destaca su capacidad para inhibir el crecimiento de las células cancerígenas, ofreciendo un inexplorado potencial terapéutico para el tratamiento de los procesos tumorales. La disponibilidad y el elevado número de análogos que constituyen esta familia de compuestos, su diversidad biológica y la capacidad de modular sus propiedades farmacológicas y selectividad mediante la introducción de modificaciones químicas puntuales en sus estructuras, hacen de las crambescidinas prometedoras herramientas para el diseño de nuevas terapias farmacológicas antitumorales.

Amparándose en la dilatada experiencia del grupo de investigación FARMATOX en el estudio de los compuestos de origen marino y sus mecanismos de acción, la presente Tesis Doctoral se centra en la exploración terapéutica de varios alcaloides guanidínicos análogos de las familias de las crambescinas y crambescidinas.

El estudio de la posible actividad antitumoral de las crambescidinas se inició con la comprobación y evaluación de sus efectos sobre el crecimiento de las células cancerígenas, empleando para ello diversos modelos *in vitro* de cultivos celulares tumorales humanos. Una vez verificada su actividad antiproliferativa se analizaron los cambios producidos en el transcriptoma de las células de carcinoma humano en respuesta a las distintas concentraciones de crambescidina 816 y tiempos de exposición empleados. El análisis diferencial de los efectos de los tratamientos empleados sobre la expresión génica de estas células respecto a los cultivos no tratados y entre sí, demostró la capacidad de este compuesto para alterar múltiples procesos biológicos y componentes celulares de muy diversa naturaleza; tales como la organización del citoesqueleto, la regulación de la transcripción, el transporte y secreción proteicos y la diferenciación celular, entre otros. Este análisis funcional demostró que la adhesión y migración celulares, junto con las funciones de regulación del ciclo celular, eran los procesos más profundamente afectados por la crambescidina 816. Por consiguiente, los trabajos posteriores se centraron en el estudio de dichos efectos y de los mecanismos implicados, empleando diversas técnicas como la citometría de flujo, la microscopía confocal y la microscopía electrónica. La capacidad de la crambescidina 816 para provocar la muerte de las células cancerígenas fue inicialmente corroborada. Asimismo, se caracterizó por primera vez el tipo de muerte celular causada, demostrando que las crambescidinas inducen la muerte celular por apoptosis de las células tumorales. Estos resultados fueron posteriormente ampliados incluyendo otros análogos de esta familia de compuestos, estudiando sus efectos directos sobre los microtúbulos y profundizando en las rutas de señalización implicadas. Por último, su eficacia *in vivo* fue también documentada, demostrando su capacidad para provocar la regresión tumoral en xenotransplantes de cáncer de colon en embriones de pez cebra. Los resultados obtenidos en esta parte de trabajo han sido publicados en los siguientes artículos:

I.1. Mechanism of cytotoxic action of crambescidin-816 on human liver-derived tumour cells.

I.2. Marine guanidine alkaloids crambescidins inhibit tumor growth and activate intrinsic apoptotic signaling inducing tumor regression in a colorectal carcinoma zebrafish xenograft model.

Parte II: Estudio de los efectos biológicos y el potencial farmacológico de las crambescinas sobre células humanas de carcinoma hepático.

Las crambescinas constituyen la segunda familia de alcaloides guanidínicos originalmente aislados a partir de la esponja *Crambe crambe*. Mientras que las crambescidinas han atraído la atención y han sido objeto de estudio por parte de numerosos grupos de investigación en el pasado, el potencial y los efectos biológicos de las crambescinas han permanecido inexplorados casi por completo desde su descubrimiento en la década de los 90. Por tanto, la segunda parte de los trabajos realizados durante esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio farmacológico de estos compuestos, empleando para ello un modelo celular *in vitro* de hepatocarcinoma humano. Mediante técnicas de bioquímica, biología celular y molecular se determinaron en primer lugar sus efectos sobre el crecimiento celular a distintas dosis, estableciéndose el umbral para el análisis posterior de las respuestas celulares producidas a concentraciones subtóxicas. La crambescina C1 demostró una interesante capacidad citoprotectora vinculada a los incrementos en los niveles de expresión de las proteínas conocidas como metalotioneínas. Estos resultados constituyen un interesante hallazgo que destaca la aptitud terapéutica de la crambescina C1 fomentando el estudio en profundidad de los mecanismos y vías de señalización involucrados. Los trabajos realizados y los resultados obtenidos en esta parte han sido documentados en la siguiente publicación:

II.1. Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction.

A continuación se presentan los artículos descritos en ambos apartados, junto con una traducción de sus resúmenes en castellano.



I.1. Mechanism of cytotoxic action of crambescidin-816 on human liver-derived tumour cells.

Resumen

Antecedentes y objetivo

Las esponjas marinas han desarrollado la capacidad de producir una amplia variedad de compuestos de elevada eficacia para la defensa frente a virus, bacterias y organismos eucariontes. La capacidad antineoplásica de varios de estos compuestos ha sido demostrada en el pasado. La esponja *Crambe crambe* presenta una elevada toxicidad siendo la fuente de origen de una amplia diversidad de moléculas conocidas como crambescidinas. Entre ellas, la crambescidina 816 presenta actividad citotóxica frente a las células de carcinoma de colon. A fin de profundizar en el estudio del potencial efecto anticancerígeno de la crambescidina 816, en el presente manuscrito se analizaron sus efectos sobre el transcriptoma de las células HepG2 empleando para ello *microarrays* de ADN. Los resultados obtenidos fueron posteriormente confirmados y caracterizados mediante la realización de ensayos adicionales.

Diseño experimental

Tras la comprobación de su efecto citotóxico, el transcriptoma celular fue analizado para estudiar el efecto de la crambescidina 816 en la línea tumoral derivada de carcinoma hepático HepG2. Basándonos en los resultados obtenidos, los efectos de la crambescidina 816 sobre las uniones célula-célula, las adhesiones célula-matriz y la migración celular fueron también analizados mediante Western blot, microscopía confocal, citometría de flujo y microscopía electrónica de transmisión. Tanto la citotoxicidad como los efectos sobre la migración celular fueron también comprobados en una amplia variedad de líneas celulares derivadas de distintos tipos de tumores humanos.

Resultados clave

La crambescidina 816 posee actividad citotóxica frente a todas las líneas celulares incluidas en este estudio. Dicho compuesto actúa inhibiendo las adhesiones célula-célula,

interfiriendo en la formación de las uniones estrechas, las adhesiones célula-matriz y afectando la presencia de las adhesiones focales de forma negativa. La crambescidina 816 también altera la dinámica del citoesqueleto celular. Como consecuencia de todo ello la crambescidina 816 inhibe la migración de las células tumorales.

Conclusiones e implicaciones

Los resultados obtenidos indican que la crambescidina 816 presenta actividad frente a las células cancerígenas, estableciendo asimismo un nuevo mecanismo de acción para el efecto antitumoral de este compuesto.





<http://onlinelibrary.wiley.com/wol1/doi/10.1111/bph.12552/full>

II.2. Marine guanidine alkaloids crambescidins inhibit tumor growth and activate intrinsic apoptotic signaling inducing tumor regression in a colorectal carcinoma zebrafish xenograft model.

Resumen

Los ambientes marinos constituyen una extraordinaria fuente para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. En el presente manuscrito se estudia el efecto de tres alcaloides guanidínicos diferentes obtenidos a partir de una esponja conocidos como crambescidina 816, 830 y 800. Estos compuestos inhiben significativamente la proliferación celular mediante la disminución de la expresión de las quinasas dependientes de ciclina 2/6, las ciclinas D/A y el incremento de los niveles de expresión de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina -2A, -2D y -1A. Estos alcaloides alteran también la adhesión y la integridad del citoesqueleto de las células tumorales, produciendo la activación de las rutas de señalización que regulan la vía intrínseca de la apoptosis y resultando en la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la consiguiente activación de la proteína efectora caspasa-3. La eficacia antitumoral de la crambescidina 816 fue finalmente comprobada en un modelo de xenotransplante en embriones de pez cebra confirmando su potente actividad antitumoral frente al carcinoma de colon *in vivo*.

Considerando estos resultados las crambescidinas podrían constituir una nueva clase de prometedores agentes anticancerígenos de origen natural y de herramientas terapéuticas.



[http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view
&path\[\]=13068](http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=13068)

II.1. Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction.

Resumen

La esponja mediterránea *Crambe crambe* es la fuente de origen de dos familias de alcaloides guanidínicos conocidos como crambescinas y crambescidinas. Algunas de las actividades biológicas de las crambescidinas han sido anteriormente descritas mientras que el potencial de las crambescinas ha permanecido inexplorado. Considerando este hecho, se realizaron diversos estudios comparativos iniciales del transcriptoma de las células de carcinoma hepático HepG2 tratadas con crambescina C1 para examinar sus efectos celulares. Estos resultados fueron posteriormente validados mediante experimentos adicionales que confirmaron las actividades biológicas predichas. El presente manuscrito demuestra que, mientras la crambescina A1 presenta un efecto minoritario en dichas células, la crambescina C1 las protege frente al daño oxidativo mediante el incremento de los niveles celulares de metalotioneínas incluso tras la exposición a concentraciones bajas de este compuesto. Además, a concentraciones altas, la crambescidina C1 arresta el ciclo celular de las células HepG2 en las fase G0/G1 y, por tanto, actúa inhibiendo la proliferación celular. Estos hallazgos suponen el primer estudio detallado de los distintos efectos de las crambescidinas en células tumorales humanas y constituyen la base necesaria para la realización de futuros estudios acerca de otras posibles rutas y mecanismos de señalización celular relacionados con las actividades biológicas aquí descritas.



<http://www.mdpi.com/1660-3397/13/8/4633>





Discusión

4. DISCUSIÓN

Los organismos marinos constituyen una fuente inagotable de compuestos químicos caracterizados por su gran diversidad estructural y biológica. La capacidad de estos últimos para modular una amplia variedad de rutas y dianas celulares les confiere un potencial terapéutico e industrial único, de gran interés para la industria farmacéutica y biotecnológica. Tradicionalmente el grupo de investigación del departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria ha centrado sus esfuerzos en la identificación y estudio de los mecanismos de acción de múltiples compuestos y toxinas de origen marino, con el fin tanto de desarrollar métodos de detección funcionales más rápidos y fiables, como de explotar y revalorizar el enorme potencial terapéutico contenido en los fondos marinos. En este sentido, la presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de los esfuerzos colaborativos internacionales y multidisciplinarios que supusieron la realización de los proyectos BAMMBO (Ref. 265896) y PHARMASEA (Ref. 312184). El desarrollo de un método de producción fiable que garantizase un suministro estable de los compuestos a estudiar, desarrollado por el equipo del Dr. Olivier P. Thomas, constituyó un logro fundamental que permitió la realización y el avance de los ensayos farmacológicos posteriores.

El término cáncer engloba a un grupo de patologías de diverso origen caracterizadas, entre otros factores, por un crecimiento celular aberrante y descontrolado [477]. Este grupo de enfermedades se caracteriza por sus devastadores efectos tanto a nivel personal como sanitario, social y económico. Según los datos ofrecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad es una de las principales causas de muerte en el mundo, con una población estimada de 7,9 millones de personas afectadas en el año 2007, siendo la segunda causa de muerte a escala global y responsable del 13% del total de defunciones registradas durante dicho período. La búsqueda de nuevas terapias antitumorales continúa mejorando la eficacia de los tratamientos y los índices de supervivencia de los pacientes. Así,

pese a que la radioterapia y la cirugía fueron las estrategias terapéuticas preferentes hasta principios del siglo XX, la tasa de recuperación de los afectados nunca excedió el 33%, evidenciando la urgencia y la necesidad de desarrollar nuevas terapias adyuvantes para su tratamiento [478]. En este sentido el cribado de amplias librerías de compuestos empleando modelos *in vitro* e *in vivo* permitió el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos, lo que finalmente supuso un importante avance para el tratamiento de distintos tipos de tumores [479]. Entre los nuevos fármacos descubiertos durante estas campañas se incluyen algunos antitumorales de origen natural obtenidos a partir de organismos marinos como la eribulina (Halaven[®]) y la trabectedina (Yondelis[®]) [215, 480]. Es precisamente este último compuesto, la trabectedina, un destacado ejemplo del gran potencial y aptitud de los alcaloides de origen marino como abordaje terapéutico de elección en los tratamientos de quimioterapia. Múltiples ejemplos de alcaloides naturales obtenidos a partir de diversas fuentes han demostrado la especial relevancia y conveniencia del empleo de estos compuestos para el tratamiento de distintas clases de tumores [210, 481]. Es el caso de los alcaloides de vinca procedentes de plantas o de la plitidepsina (Aplidin[®]), también de origen marino [482]. Dada la especial disposición y potencial demostrada por esta clase de compuestos, parte de los trabajos realizados en la presente Tesis Doctoral se centraron en el estudio de los alcaloides guanidínicos conocidos como crambescidinas que, por sus características, podrían tener potenciales aplicaciones como terapias adyuvantes para el tratamiento del cáncer.

En este sentido, la primera molécula estudiada fue la crambescidina 816, compuesto capaz de inhibir el crecimiento celular. Para verificar sus efectos y comprobar su eficacia frente a varios de los tumores con una mayor incidencia clínica, se emplearon diversas líneas celulares procedentes del panel de líneas tumorales establecido por el NCI. Los resultados obtenidos demostraron que la crambescidina 816 inhibe el crecimiento y reduce la viabilidad de las células cancerígenas de carcinoma hepático, ovárico, pulmonar, prostático, renal, de colon, mama y melanoma, demostrando que su actividad no es por tanto específica frente a un tipo tumoral determinado, sino que se trata de un efecto general.

Para el estudio de los mecanismos y rutas celulares responsables de dicho efecto la línea de carcinoma hepático HepG2 fue seleccionada y utilizada como modelo *in vitro* de

referencia al tratarse de una línea muy bien caracterizada con una sensibilidad intermedia a la crambescidina 816. La crambescidina 816 reduce la viabilidad de las células tumorales mediante la inducción de la muerte celular por apoptosis. La evaluación global de los efectos de este compuesto sobre las células cancerígenas se llevó a cabo mediante el estudio de su transcriptoma tras el tratamiento con una única dosis de crambescidina 816 y distintos tiempos de exposición. Con respecto a los controles, la crambescidina 816 alteró la expresión del 5% de los genes en las tres condiciones probadas. El análisis funcional posterior demostró que, tras períodos cortos de exposición a dosis subtóxicas, la crambescidina 816 produce una disminución de la expresión de múltiples componentes implicados en los procesos de migración celular, adhesión celular a la matriz extracelular y adhesión célula-célula, así como de los procesos celulares relacionados con la organización del citoesqueleto.

El proceso de adhesión celular constituye un fenómeno complejo que implica la participación de varios tipos de moléculas que interactúan con diferentes componentes estructurales tales como la matriz extracelular, formando las adhesiones célula-matriz, o las células adyacentes, formando las uniones célula-célula. Ambos tipos de interacciones proporcionan señales de supervivencia a la célula [483]. Estas uniones se forman mediante la expresión en la superficie celular de diferentes moléculas de adhesión [484-486].

El proceso de pérdida de adhesión comprende la disolución de varios tipos de interacciones célula-célula/célula-matriz. Numerosos estudios describen la importancia del proceso de adhesión de la célula a diferentes componentes de la matriz extracelular así como de las interacciones célula-célula para su supervivencia [483, 485, 487]. Ya en 1994 Frisch *et al.* establecieron el término *anoikis* para definir el proceso de apoptosis resultante de la pérdida de adhesión celular y en cuya inducción participan tanto la vía intrínseca como extrínseca de la apoptosis [488].

La crambescidina 816 afecta a las adhesiones intercelulares conocidas como uniones estrechas. Este tipo de uniones están formadas principalmente por dos clases de proteínas integrales de membrana: la ocludina (OCLN) y las claudinas (CLDNs) [485]. La crambescidina 816 produce una disminución de los niveles de la proteína CLND2,

disminuyendo también la expresión de las claudinas 3, 14, 19 y 20 y de otros muchos componentes implicados en la formación de este tipo de uniones. Además, este compuesto induce la translocación e internalización de la OCLN desde la membrana plasmática y su acumulación en el citoplasma celular. La crambescidina 816 también reduce la presencia de las adhesiones focales que anclan el citoesqueleto de las células a la matriz extracelular mediante la disminución de los niveles de las proteínas que las forman, tales como la vinculina (VCL).

Numerosos estudios han descrito la importancia que los componentes del citoesqueleto desempeñan en el mantenimiento de la morfología y la adhesión celular [486, 489-491]. Según estos resultados, nos planteamos determinar si las alteraciones en la morfología y la capacidad de adhesión observadas en las células tratadas con crambescidina 816 estaban asociadas a posibles defectos en su citoesqueleto. Por ello analizamos el citoesqueleto microtubular y de actina de estas células. Tanto la tubulina como la actina mostraban patrones de distribución aberrantes con respecto a la organización fisiológica observada en las células control que podrían estar asociados a los defectos en la adhesión encontrados en las células tratadas.

Los elementos del citoesqueleto tienen un papel fundamental en el proceso de adhesión [486, 489-491]. Una vez que se establece la adhesión célula-matriz o célula-célula, se dispara una serie de vías de señalización que permiten el ensamblado y la reorganización de los elementos del citoesqueleto tales como los filamentos de actina o microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios [486]. Asimismo, el mantenimiento de la integridad de las adhesiones celulares depende de su anclaje a los elementos del citoesqueleto, que, a su vez, permite otros procesos como la movilidad celular, el mantenimiento de la morfología de la célula y la remodelación del espacio extracelular [486]. Diversos estudios han demostrado que la propia dinámica del citoesqueleto puede también modular la función de las adhesiones celulares [490, 491].

Tanto la reorganización del citoesqueleto como la dinámica de ensamblado y desensamblado de las adhesiones focales son dos eventos necesarios directamente asociados a la migración celular [492, 493]. Este es un proceso altamente complejo y estrechamente regulado que implica la reorganización del citoesqueleto y de las adhesiones célula-matriz.

Durante este proceso tiene lugar una reorganización del citoesqueleto de actina consistente en el ensamblado de los filamentos de esta proteína para formar las fibras de estrés que se disponen atravesando la totalidad de la célula [494-496]. Durante su desplazamiento las células se adhieren a la matriz mediante adhesiones focales y son los extremos de las fibras de estrés los que constituyen el anclaje físico directo de estos contactos, contribuyendo así a su afianzamiento y a la adquisición de las propiedades adhesivas transitorias que las dotan de una mayor capacidad migratoria. Dichas fibras son por tanto esenciales para la adhesión al sustrato y el cambio de morfología durante la migración celular, generando las fuerzas necesarias para mover y adaptar la forma de la célula [493, 497, 498]. Tras el tratamiento con crambescidina 816 las células no presentaban fibras de estrés y mostraban una reducción de los niveles de VCL presentes en las adhesiones focales. Estos cambios se evidencian tras 6 horas de tratamiento y la intensidad de sus efectos sobre la arquitectura de ambas estructuras aumenta hasta las 24 horas. Como consecuencia de las alteraciones producidas en el citoesqueleto celular y las adhesiones focales, la crambescidina 816 es capaz de impedir la migración de las células tumorales. Este efecto no es exclusivo para las células de carcinoma hepático HepG2, sino que los tratamientos con dicho compuesto también reducen la migración invasiva de las células OV-CAR, HOP-92, UO-31, MCF-7 y PC-3.

Además de sus efectos directos sobre las adhesiones celulares y el citoesqueleto el análisis de los perfiles de expresión génica de las células de carcinoma hepático tratadas con crambescidina 816 indicó que este compuesto produce una disminución de los niveles de expresión de las ciclinas A y D y de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) 2 y 16, incrementando a su vez los de varios inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs), como p16 y p19. Los cambios inducidos por la crambescidina 816 sobre estos elementos reguladores del ciclo celular son, en último término, responsables de la inhibición del mismo en la fase G0/G1 comprobada por los análisis realizados mediante citometría de flujo. Esta inhibición del ciclo celular concuerda con los efectos de la crambescidina 816 sobre la expresión génica dado que la ciclina D, en asociación con la CDK4 o la CDK6, y la ciclina E, en asociación con la CDK2, regulan la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular [499-504]. Además, la reducción de la expresión de la ciclina A, involucrada en la

iniciación de la replicación del ADN y asociada a la CDK2, también concuerda con la interrupción observada [505].

Estos resultados se recogen en la publicación titulada: ***“Mechanism of cytotoxic action of crambescidin-816 on human liver-derived tumour cells”***.

La crambescidina 800 es otro análogo de la familia de la crambescidinas con una estructura similar a la de la crambescidina 816. Este compuesto inhibe el ciclo celular de la línea tumoral de leucemia K562 en la fase S tras 48 horas de tratamiento [475]. Una diferencia importante entre esta línea y las empleadas en la presente Tesis Doctoral es que en el caso de las células de leucemia estas presentan un crecimiento independiente de anclaje, mientras que las HepG2 son células derivadas de un tumor sólido con crecimiento adherente. Este podría ser el motivo principal de la diferencia observada entre ambas líneas en cuanto a la fase del ciclo celular afectada, dado que son estas adhesiones a la matriz extracelular, junto con los factores de crecimiento, los principales reguladores de la progresión del ciclo entre las fases G1/S, induciendo la expresión de las ciclinas A y D [506]. Como resultado de la rápida pérdida de adhesión producida por la crambescidina 816 en las líneas derivadas de tumores sólidos dicha progresión quedaría por tanto interrumpida en el estadio G1. Otra hipótesis plausible era la basada en la posibilidad de que la crambescidina 800 tuviese efectos distintos a los descritos para la crambescidina 816 en tumores sólidos o que dichos efectos estuviesen mediados por mecanismos celulares diferentes a los afectados por esta última. Para despejar estas incógnitas y determinar la aptitud general de la familia de las crambescidinas como potenciales agentes antitumorales se realizaron diversos estudios comparativos empleando tres análogos de la misma. Los resultados obtenidos se incluyen como parte de los trabajos realizados durante la presente Tesis Doctoral.

Para la realización de dichos estudios se seleccionaron tanto la crambescidina 816 como la crambescidina 800 y un tercer compuesto, la crambescidina 830, cuyos efectos biológicos apenas habían sido explorados en la literatura previa y cuya estructura química ofrecía prometedoras posibilidades. Al examinar los efectos de la crambescidina 830 y 800 en tumores sólidos bajo las mismas condiciones, dosis y tiempos de exposición, anteriormente empleadas para la crambescidina 816, se comprobó su capacidad para inhibir el crecimiento tumoral tras 48 horas de tratamiento. Sin embargo, los porcentajes de inhibición observados

fueron siempre menores a los producidos por la crambescidina 816. A fin de cuantificar la magnitud de dichos efectos y comparar la potencia de los tres compuestos sus valores IC_{50} fueron determinados tras 48 y 72 horas de tratamiento. Estos resultados confirmaron que la crambescidina 816 produce un descenso de la viabilidad de las células tumorales superior al causado por la crambescidina 830. La crambescidina 800, a su vez, presentó una capacidad inhibitoria inferior a la de los otros dos compuestos.

Los análisis del efecto de estos análogos sobre las adhesiones celulares y el citoesqueleto de las células tumorales demostraron que las crambescidinas disminuyen la presencia de uniones célula-célula y célula-matriz. Sin embargo, y en concordancia con los resultados anteriores, las concentraciones de crambescidina 830 requeridas para igualar los efectos anteriormente descritos para la crambescidina 816 fueron superiores, al igual que los tiempos de tratamiento. De las alteraciones producidas por las tres crambescidinas las causadas por la crambescidina 800 son las de menor magnitud.

Estudios adicionales sobre la capacidad de los tres compuestos de inhibir el proceso de ensamblaje de los microtúbulos demostraron que tanto la crambescidina 816 como la 830 inhiben la polimerización de forma directa y parcial, mientras que la crambescidina 800 produce su retraso, alcanzando de nuevo los niveles propios de los controles negativos tras un lapso temporal de una hora. Estos resultados concuerdan con los anteriormente descritos en cuanto a la potencia de los tres compuestos empleados. Algunos fármacos con actividad despolimerizante del citoesqueleto de tubulina han demostrado su capacidad para afectar las adhesiones focales produciendo alteraciones bifásicas de la adherencia celular caracterizadas por un incremento inicial y transitorio de la adhesión a la matriz extracelular entre las 3 y 6 horas de exposición, seguido de una pérdida completa de la misma y el consiguiente desprendimiento de las células de la matriz extracelular, dando lugar a la aparición de células con una morfología redondeada y un citoesqueleto de actina desorganizado, ambos hallazgos característicos de los fenómenos de pérdida de adhesión celular [486, 489, 507-510]. Estos resultados coinciden con nuestros datos, tanto por la clase de efectos producidos como por el marco temporal de su aparición, pues todos los fenómenos de pérdida de adhesión generados por las crambescidinas se produjeron tras 6 o más horas de tratamiento.

En células derivadas de tumores sólidos las crambescidinas 830 y 800 también producen el bloqueo del ciclo celular en la fase G0/G1 e inducen la muerte celular por apoptosis. Las crambescidinas aumentan los niveles de expresión de distintos componentes del programa transcripcional regulado por el supresor tumoral p53, desencadenando el bloqueo del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. Así, estos compuestos inducen la expresión de diversos mediadores de la vía intrínseca de este proceso involucrados en la afectación de la mitocondria y la consiguiente liberación del citocromo C al citoplasma celular. La función e importancia de la proteína p53 en los efectos producidos por las crambescidinas fue también comprobada, demostrando que, aunque en aquellas células que no albergan alteración alguna de este supresor tumoral este contribuye a la respuesta apoptótica generada, no es la única ruta de señalización celular involucrada en dicho proceso. Diversos estudios realizados empleando distintos tipos celulares han demostrado que la pérdida de adhesión promueve la activación de p53 [511-514]. En células endoteliales se ha observado que la falta de adhesión a la matriz extracelular tras el bloqueo de la integrina $\alpha\beta3$ aumenta la transcripción de genes implicados en la interrupción del ciclo celular, así como de genes que participan en la apoptosis, todos ellos a través de la activación de p53 [515]. Otro estudio realizado con fibroblastos demostró que la presencia de p53 potencia la sensibilidad a *anoikis*, aunque dicho proceso no es abolido en su ausencia [487]. Estos trabajos indican que, en determinados tipos celulares, la pérdida de anclaje a la matriz extracelular desencadena un proceso de apoptosis dependiente de la activación de p53.

El estudio de los efectos de diversos fármacos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina demostró que la pérdida de adhesión celular a la matriz extracelular producida por estos compuestos induce la muerte celular conocida como *anoikis* [489]. Todos estos datos concuerdan con los efectos producidos por las tres crambescidinas. Resulta interesante que la capacidad de estos compuestos para inducir la muerte celular esté parcialmente mediada por la proteína p53. La resistencia a la apoptosis es uno de las marcas distintivas de las células cancerígenas, por lo que cualquier compuesto capaz de inducirla es considerado como un tratamiento prometedor. Dado que la tasa de mutación de la proteína p53 en tumores sólidos es del 50%, los compuestos que ofrecen nuevas formas de inducir la

apoptosis de manera p53-independiente presentan una mayor relevancia clínica [516]. Además, las crambescidinas producen la estabilización del inhibidor p21, un conocido efector de p53, y dado que las mutaciones tumorales de dicha proteína son raras, cualquier tratamiento capaz de incrementar los niveles de la misma resulta especialmente interesante [517].

Por último, la eficacia de estos compuestos fue comprobada *in vivo* por primera vez. La crambescidina 816 fue el compuesto elegido para este tipo de ensayos al ser el más potente de los tres análogos estudiados. Las dosis de compuesto empleadas, 0,5, 1 y 2 μM , fueron elegidas en base a los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad realizados. Dichos ensayos se realizaron con ejemplares de pez cebra obtenidos 48 horas después de la fecundación (hpf, en inglés hours post fecundation). El modelo animal de xenotransplante empleado fue generado mediante el transplante heterólogo de células de carcinoma colorrectal humano transfectadas de forma estable con el gen marcador de la proteína conocida como proteína verde fluorescente (GFP, en inglés green fluorescent protein) en embriones de pez cebra 48 hpf. La exposición de esta proteína autofluorescente a la luz ultravioleta produce una señal verde brillante en células vivas sin necesidad de añadir ningún sustrato o producto. Tras dicha manipulación los animales fueron mantenidos a 35° C durante 24 horas para favorecer tanto la recuperación de los embriones como la implantación y el crecimiento de las células trasplantadas.

La crambescidina 816 impide la progresión e induce la regresión tumoral en el modelo animal de carcinoma de colorrectal empleado. Su eficacia *in vivo* ha sido comprobada en la presente Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos corroboran la capacidad de este alcaloide de detener el crecimiento tumoral, evitando la progresión de la enfermedad, y de reducir su volumen, produciendo la regresión.

La comprobación de la eficacia y de los efectos de una nueva molécula candidata en modelos animales es un paso clave, de gran importancia durante su desarrollo preclínico. Resulta, por tanto, imprescindible para asegurar su progresión e inclusión en las siguientes fases del desarrollo farmacológico. La importancia de los resultados obtenidos radica en la

comprobación de los efectos y el potencial farmacológico de la crambescidina 816 para el tratamiento de los procesos tumorales que, en último término, impulsa y avala la utilidad y el interés por continuar avanzando en su desarrollo.

Para el diseño del modelo animal empleado la línea celular de carcinoma colorrectal trasplantada fue seleccionada, entre otras características, por presentar una de las mutaciones más frecuentes en este tipo de tumores, la mutación en el codón 13 de la proteína *K-RAS* (Gly¹³Asp). Esta mutación puntual es común en esta clase de tumores y representa en torno al 20% del total de mutaciones detectadas en dicha proteína, produciendo su activación constitutiva [518]. Diversos estudios clínicos han demostrado que la respuesta del carcinoma colorrectal metastático a las terapias inhibitoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, en inglés epidermal growth factor receptor) basadas en el empleo de anticuerpos anti-EGFR como el cetuximab y panitumumab, actualmente en uso clínico para su tratamiento, está inversamente relacionada con la activación oncogénica de la vía de señalización RAS/RAF [519]. Por tanto, la regresión tumoral producida por la crambescidina 816 en un modelo animal de carcinoma colorrectal portador de una activación constitutiva de la vía RAS/RAF ofrece prometedoras implicaciones terapéuticas para el tratamiento de aquellos carcinomas colorrectales con ausencia primaria de respuesta o resistencias adquiridas frente a los anticuerpos anti-EGFR.

Estos resultados se recogen en la publicación titulada: ***“Marine guanidine alkaloids crambescidins inhibit tumor growth and activate intrinsic apoptotic signaling inducing tumor regression in a colorectal carcinoma zebrafish xenograft model”***.

La última parte de la presente Tesis Doctoral se centró en la exploración y el estudio del potencial terapéutico de los compuestos pertenecientes a la familia de las crambescinas, dada la falta de conocimiento existente acerca de las actividades biológicas de estos alcaloides guanidínicos. Ante la carencia de estudios previos, en primer lugar se evaluaron los efectos de dos análogos de la familia de las crambescinas, la crambescina A1 y C1, a nivel transcripcional en células HepG2. Las dosis a emplear fueron inicialmente establecidas mediante el estudio de sus efectos sobre el crecimiento y la viabilidad celular. Tras 24 horas

de tratamiento la crambescina C1 induce la muerte celular por apoptosis solo a concentraciones altas (10 μM), mientras que la crambescina A1 no presenta efecto alguno. En base a los resultados obtenidos únicamente la crambescina C1, con efectos demostrados, fue seleccionada para los análisis de expresión génica. Tres concentraciones distintas (1, 5 y 10 μM) y un único tiempo de exposición de 24 horas fueron las condiciones establecidas para dichos ensayos. La concentración más baja (1 μM) fue incluida como no inhibitoria en base a la falta de alteraciones del crecimiento celular respecto a los controles negativos observada tras 24 horas. De manera similar tampoco se produjeron cambios significativos cuando las células fueron expuestas a una concentración de 5 μM . Sin embargo, a diferencia de la anterior, esta concentración sí provoca un descenso moderado de la viabilidad celular tras 48 horas de tratamiento. En base a la diferencia en la respuesta celular observada dicha concentración fue también seleccionada. Por último, debido a su efecto citotóxico, una tercera dosis de 10 μM fue finalmente incluida a fin de descartar las posibles variaciones relacionadas o debidas, en modo alguno, a este efecto.

Los resultados obtenidos muestran que la inducción de la expresión de las proteínas conocidas como metalotioneínas (MTs) fue la respuesta más sólida y consistente de las producidas por las distintas dosis de crambescina C1 empleadas. Las metalotioneínas son una familia de proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína [520-522]. La MT-1 y MT-2 son las isoformas mayoritarias, con una expresión tisular ubicua, mientras que las isoformas minoritarias MT-3 y MT-4 se localizan fundamentalmente en el sistema nervioso central y el epitelio estratificado [523-525]. Las dos isoformas mayoritarias son las predominantes en las células hepáticas y en la línea celular humana de carcinoma hepático empleada, que conserva la capacidad de inducir su expresión frente a diversos estímulos [526-528]. La crambescidina C1 produce un incremento de los niveles de expresión de dichas proteínas detectable también a nivel proteico. Aunque se desconoce cuál es el papel exacto de las metalotioneínas a nivel fisiológico, se sabe que sus niveles aumentan en respuesta a diversos agentes como los glucocorticoides, los metales pesados y la inflamación, estando implicadas en las rutas celulares involucradas en la respuesta celular al daño oxidativo [529-532]. Estas proteínas forman parte de los mecanismos de defensa celular funcionando como antioxidantes frente a

las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS, en inglés reactive nitrogen species) [533-536]. La crambescidina C1 no produce incrementos de los niveles intracelulares de ROS, sin embargo si presenta actividad citoprotectora frente a los agentes oxidantes. Dicha respuesta antioxidante podría estar vinculada a los aumentos de las proteínas MT-1 y MT-2 producidos por este compuesto. Esta observación está respaldada por el hecho de que la crambescidina C1 no causa cambio detectable alguno en los niveles de otras importantes enzimas implicadas en la respuesta y defensa celular frente al estrés oxidativo como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) o el factor de transcripción nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 (Nrf2).

Las metalotioneínas presentan un bajo peso molecular (6-7 kDa) y una estructura bidominal caracterizada por la elevada presencia de residuos de cisteína. El dominio proteico β se encuentra próximo al extremo N-terminal de la molécula mientras que el α se aproxima al extremo C-terminal [537, 538]. Son precisamente los grupos tiol (-SH) de los residuos de cisteína presentes en ambas localizaciones los que confieren a estas proteínas la capacidad de unir iones metálicos fisiológicos y xenobióticos y capturar radicales oxidantes potencialmente peligrosos [533]. El GSH es un antioxidante que forma parte del sistema de regulación redox intracelular y contribuye al mantenimiento del estado oxidativo mediante la neutralización de ROS [539, 540]. La relación existente entre los niveles celulares de GSH y metalotioneínas ha sido previamente documentada *in vitro* e *in vivo*, demostrando que el aumento de estas proteínas aminora los daños causados por la depleción de los niveles intracelulares de GSH en hepatocitos [541, 542]. La expresión de las metalotioneínas es inducida en respuesta al estrés oxidativo, aumentando incluso en aquellas condiciones en las que no se detecta muerte celular asociada [543, 544]. La crambescidina C1 produce una disminución transitoria y moderada de los niveles celulares de GSH y un incremento en los niveles intracelulares de MT-1 y MT-2 que indican que este aumento constituye una respuesta compensatoria suficiente que garantiza la supervivencia celular y la posterior recuperación de los niveles basales de GSH. El incremento de los niveles de metalotioneínas producidos por la crambescidina C1 presenta interesantes implicaciones terapéuticas para el tratamiento de diversas patologías como la enfermedad de Wilson, caracterizada por una

alteración del metabolismo del cobre que ocasiona su acumulación en tejidos tales como el hígado, los núcleos basales y la córnea, originando múltiples manifestaciones clínicas de carácter hepático, en fases iniciales, y neurológico en estadios avanzados, además de posibles secuelas [545, 546]. El tratamiento se basa, entre otras medidas, en la administración de agentes quelantes como la D-penicilamina y la trientina. La D-penicilamina reduce la afinidad de las proteínas intracelulares por el cobre e incrementa la síntesis de metalotioneínas. Estas presentan una elevada afinidad de unión a metales fisiológicos bivalentes como el cobre y el zinc, siendo precisamente esta propiedad la que les confiere la habilidad para restaurar los desequilibrios en la homeostasis del cobre causantes de la enfermedad [527]. Pese a ser uno de los tratamientos de elección la D-penicilamina presenta una serie de efectos adversos como la deficiencia de piridoxal fosfato, la hipersensibilidad a la penicilina, las erupciones cutáneas, las linfadenopatías, la neutropenia, trombopenia y proteinuria, aparición de estomatitis aftosa, hepatotoxicidad y toxicidad en la médula ósea, que hacen necesario un control clínico riguroso y, en casos severos, la suspensión y contraindicación del tratamiento. La trientina, dihidroclorato de trientilene tetramina, es otro agente quelante de cobre de igual eficacia pero sin efectos secundarios destacables. Sin embargo, su absorción es pobre y, en caso de embarazo, puede provocar alteraciones cromosómicas en el feto [547].

El empleo de sales de zinc para bloquear la absorción intestinal de cobre y estimular la síntesis de metalotioneínas en los enterocitos y hepatocitos es otra alternativa empleada para el tratamiento de esta enfermedad. Su utilización, en combinación con otro agente quelante, está indicada durante la fase de mantenimiento, una vez que los síntomas principales han sido reducidos y controlados [547]. Todos estos tratamientos presentan complicaciones asociadas de distinta naturaleza y gravedad y una eficacia limitada. El desarrollo de nuevas terapias más seguras y efectivas continúa, por tanto, resultando necesario. La capacidad de la crambescina C1 de incrementar la expresión y síntesis de la MT-1 y MT-2 en células hepáticas, y su baja citotoxicidad, ofrecen prometedoras posibilidades para el tratamiento de la enfermedad de Wilson que respaldan la realización de estudios adicionales orientados a la

determinación de los mecanismos celulares subyacentes y a la identificación y caracterización de todas las posibles utilidades terapéuticas.

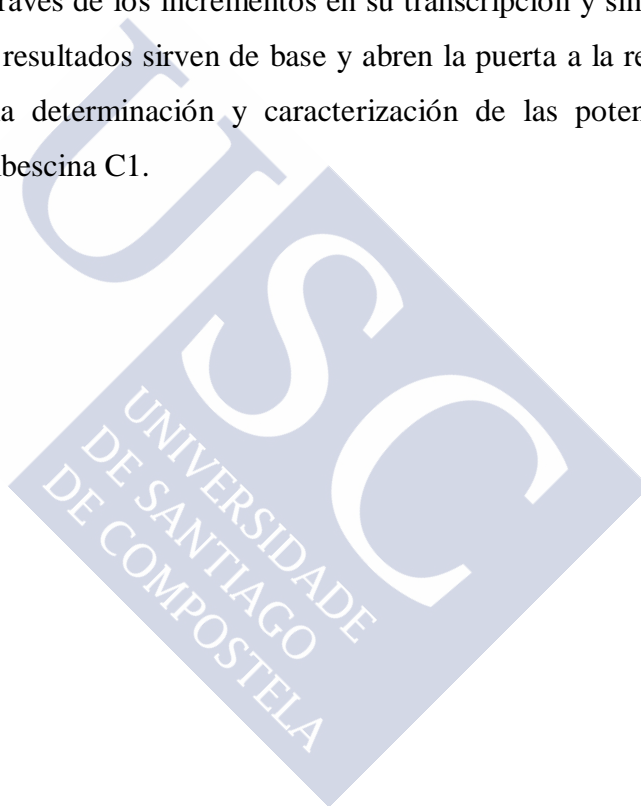
La capacidad de la crambescina C1 para alterar el patrón de distribución celular de las MTs y producir cambios definidos por el incremento de su presencia nuclear tras tratamientos cortos resulta también relevante. En condiciones normales estas proteínas presentan una localización mayoritariamente citoplasmática, sin embargo pueden trasladarse rápidamente al núcleo en determinadas condiciones o en respuesta a estímulos como los insultos oxidativos [548-550]. Además de los incrementos en los niveles de ROS, otros tipos de especies reactivas, como las RNS, aumentan la presencia nuclear de las metalotioneínas [531, 551]. Estudios anteriores han demostrado la relación existente entre la capacidad protectora de las MTs, su localización subcelular y la naturaleza de la agresión oxidativa [552]. De igual modo, trabajos previos han corroborado la capacidad protectora de las MTs frente a la citotoxicidad y la genotoxicidad producida por el NO. Este produce, asimismo, un aumento de los niveles nucleares de dichas proteínas capaz de preservar la integridad del ADN celular [531, 551].

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo se recogen en la publicación: ***“Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction”***.

Finalmente, podemos concluir afirmando que la familia de las crambescidinas presenta una prometedora e interesante actividad antitumoral frente a diversos tipos de carcinoma de origen humano. Dicha propiedad evidencia su capacidad terapéutica, respaldando su potencial como posibles agentes anticancerígenos. Los estudios comparativos realizados demuestran que la diversidad estructural de esta familia de alcaloides influye en la potencia de sus efectos. Este hallazgo, en combinación con la capacidad de modular su selectividad frente a los distintos tipos de tumores mediante la introducción de modificaciones estructurales puntuales, los hace especialmente interesantes y aptos para los procesos de mejora orientados a la obtención de nuevos compuestos cabeza de serie. Sus efectos sobre las uniones celulares y el citoesqueleto subrayan su interés biomédico como herramientas para el

estudio de los procesos de remodelación de las adhesiones celulares, dada su importancia como uno de los pasos clave en la serie de cambios que sufre una célula tumoral durante su transformación maligna. En concordancia con los resultados obtenidos *in vitro*, la eficacia *in vivo* de estos compuestos ha sido verificada por primera vez en la presente Tesis Doctoral.

Los efectos biológicos de los compuestos de la familia de las crambescinas también han sido estudiados y documentados en el presente manuscrito, revelando una interesante actividad antioxidante de la crambescina C1. En dicha respuesta celular están involucradas las metalotioneínas a través de los incrementos en su transcripción y síntesis producidos por este compuesto. Estos resultados sirven de base y abren la puerta a la realización de futuros estudios dirigidos a la determinación y caracterización de las potencial/es aplicaciones terapéuticas de la crambescina C1.







Conclusions

5. CONCLUSIONS

- Crambescidin 816 reduces cell viability in human tumour cells. Either C830 or C800 also reduce tumor cells viability but with a lower potency than C816.
- Crambescidin 816 negatively affects cell-cell adhesion, cell-matrix adhesion and cell migration. Either C830 or C800 reduce these adhesions and compromise cytoskeletal integrity but with a lower potency than C816.
- Inhibition of cell migration results from altered cytoskeletal dynamics, down-regulation of actin expression and inhibition of focal adhesion formation.
- Both C816 and C830 partially inhibit tubulin polymerization while C800 only produces a temporal delay of this process.
- Crambescidins trigger apoptosis in human cancer cells via p53-dependent and independent mechanisms.
- C816 induces tumor regression *in vivo*.
- Zebrafish xenografts could be a useful tool for anti-cancer drug screening of marine compounds.
- Crambescin C1 can induce MTs transcription and synthesis protecting cells from oxidative damage at concentrations that do not reduce cell viability.

- At high doses crambescin C1 arrests cell cycle progression at the G₀/G₁ phase.





Bibliografía



1. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials*. Journal of natural products, 2004. **67**(8): p. 1216-1238.
2. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010*. Journal of natural products, 2012. **75**(3): p. 311-335.
3. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. Journal of natural products, 2007. **70**(3): p. 461-477.
4. Newman, D.J., G.M. Cragg, and K.M. Snader, *Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002*. Journal of natural products, 2003. **66**(7): p. 1022-1037.
5. David, B., J.-L. Wolfender, and D.A. Dias, *The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends*. Phytochemistry Reviews, 2015. **14**(2): p. 299-315.
6. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014*. J. Nat. Prod, 2016. **79**(3): p. 629-661.
7. Koehn, F.E. and G.T. Carter, *The evolving role of natural products in drug discovery*. Nature reviews. Drug discovery, 2005. **4**(3): p. 206.
8. Cragg, G.M. and D.J. Newman, *Natural products: a continuing source of novel drug leads*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013. **1830**(6): p. 3670-3695.
9. Chapman, E., *Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods*. Edited by Kurt Hostettmann, Shilin Chen, Andrew Marston, Hermann Stuppner. 2015, Wiley Online Library.
10. Silverman, L., R. Campbell, and J.R. Broach, *New assay technologies for high-throughput screening*. Current Opinion in Chemical Biology, 1998. **2**(3): p. 397-403.
11. Kingston, D.G., *Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation*. Journal of natural products, 2010. **74**(3): p. 496-511.
12. Dickson, M. and J.P. Gagnon, *Key factors in the rising cost of new drug discovery and development*. Nature Reviews Drug Discovery, 2004. **3**(5): p. 417-429.
13. McChesney, J.D., S.K. Venkataraman, and J.T. Henri, *Plant natural products: back to the future or into extinction?* Phytochemistry, 2007. **68**(14): p. 2015-2022.
14. Butler, M.S., A.A. Robertson, and M.A. Cooper, *Natural product and natural product derived drugs in clinical trials*. Natural product reports, 2014. **31**(11): p. 1612-1661.

15. Bunnage, M.E., *Getting pharmaceutical R&D back on target*. Nature chemical biology, 2011. **7**(6): p. 335-339.
16. Swinney, D.C. and J. Anthony, *How were new medicines discovered?* Nature reviews. Drug discovery, 2011. **10**(7): p. 507.
17. Rishton, G.M., *Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues*. The American journal of cardiology, 2008. **101**(10): p. S43-S49.
18. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1*. Advanced drug delivery reviews, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
19. Oprea, T.I., *Property distribution of drug-related chemical databases*. Journal of computer-aided molecular design, 2000. **14**(3): p. 251-264.
20. Projan, S.J., *Infectious diseases in the 21 st century: increasing threats, fewer new treatments and a premium on prevention*. 2003, Elsevier.
21. Projan, S.J., *Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery?* Current opinion in microbiology, 2003. **6**(5): p. 427-430.
22. Drewry, D.H. and R. Macarron, *Enhancements of screening collections to address areas of unmet medical need: an industry perspective*. Current opinion in chemical biology, 2010. **14**(3): p. 289-298.
23. Feher, M. and J.M. Schmidt, *Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 2003. **43**(1): p. 218-227.
24. Stahura, F.L., et al., *Distinguishing between natural products and synthetic molecules by descriptor Shannon entropy analysis and binary QSAR calculations*. Journal of chemical information and computer sciences, 2000. **40**(5): p. 1245-1252.
25. Henkel, T., et al., *Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds*. Angewandte Chemie International Edition, 1999. **38**(5): p. 643-647.
26. Kusari, S., C. Hertweck, and M. Spiteller, *Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites*. Chemistry & biology, 2012. **19**(7): p. 792-798.
27. Paterson, I. and E.A. Anderson, *The renaissance of natural products as drug candidates*. Science, 2005. **310**(5747): p. 451-453.

28. Bhatnagar, I. and S.-K. Kim, *Marine antitumor drugs: status, shortfalls and strategies*. *Marine drugs*, 2010. **8**(10): p. 2702-2720.
29. Thomas, G.L. and C.W. Johannes, *Natural product-like synthetic libraries*. *Current opinion in chemical biology*, 2011. **15**(4): p. 516-522.
30. Kirsop, B., *The Convention on Biological Diversity: some implications for microbiology and microbial culture collections*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1996. **17**(5): p. 505-511.
31. Cragg, G.M., et al., *The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research*. *Natural product reports*, 2012. **29**(12): p. 1407-1423.
32. Krause, J., G. Tobi, and K. Marianna, *Using old solutions to new problems-natural drug discovery in the 21st century discovery Development, and regulation of natural product*. Rejeka, Croatia: InTech, 2013: p. 5-9.
33. Lallier, L.E., et al., *Access to and use of marine genetic resources: understanding the legal framework*. *Natural product reports*, 2014. **31**(5): p. 612-616.
34. Ortholand, J.-Y. and A. Ganesan, *Natural products and combinatorial chemistry: back to the future*. *Current opinion in chemical biology*, 2004. **8**(3): p. 271-280.
35. Beutler, J.A., *Natural products as a foundation for drug discovery*. *Current protocols in pharmacology*, 2009: p. 9.11. 1-9.11. 21.
36. Evans, B., et al., *Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists*. *Journal of medicinal chemistry*, 1988. **31**(12): p. 2235-2246.
37. Hert, J., et al., *Quantifying biogenic bias in screening libraries*. *Nature chemical biology*, 2009. **5**(7): p. 479-483.
38. Firn, R.D. and C.G. Jones, *Natural products—a simple model to explain chemical diversity*. *Natural product reports*, 2003. **20**(4): p. 382-391.
39. Dančik, V., et al., *Distinct biological network properties between the targets of natural products and disease genes*. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. **132**(27): p. 9259-9261.
40. Macarron, R., et al., *Impact of high-throughput screening in biomedical research*. *Nature reviews. Drug discovery*, 2011. **10**(3): p. 188.

41. Sukuru, S.C.K., et al., *Plate-based diversity selection based on empirical HTS data to enhance the number of hits and their chemical diversity*. Journal of biomolecular screening, 2009. **14**(6): p. 690-699.
42. Gwynn, M.N., et al., *Challenges of antibacterial discovery revisited*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1213**(1): p. 5-19.
43. Payne, D.J., et al., *Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery*. Nature reviews. Drug discovery, 2007. **6**(1): p. 29.
44. Silver, L.L., *Challenges of antibacterial discovery*. Clinical microbiology reviews, 2011. **24**(1): p. 71-109.
45. Lewis, K., *Platforms for antibiotic discovery*. Nature reviews Drug discovery, 2013. **12**(5): p. 371-387.
46. Ajay, W.P. Walters, and M.A. Murcko, *Can we learn to distinguish between "drug-like" and "non-drug-like" molecules?* Journal of medicinal chemistry, 1998. **41**(18): p. 3314-3324.
47. Sadowski, J. and H. Kubinyi, *A scoring scheme for discriminating between drugs and non-drugs*. Journal of medicinal chemistry, 1998. **41**(18): p. 3325-3329.
48. Rosén, J., et al., *Novel chemical space exploration via natural products*. Journal of medicinal chemistry, 2009. **52**(7): p. 1953-1962.
49. Wetzel, S., et al., *Biology-oriented synthesis*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(46): p. 10800-10826.
50. Pascolutti, M. and R.J. Quinn, *Natural products as lead structures: chemical transformations to create lead-like libraries*. Drug discovery today, 2014. **19**(3): p. 215-221.
51. Kissau, L., et al., *Development of natural product-derived receptor tyrosine kinase inhibitors based on conservation of protein domain fold*. Journal of medicinal chemistry, 2003. **46**(14): p. 2917-2931.
52. Burke, M.D. and S.L. Schreiber, *A planning strategy for diversity-oriented synthesis*. Angewandte Chemie International Edition, 2004. **43**(1): p. 46-58.
53. Nicolaou, K., et al., *Natural product-like combinatorial libraries based on privileged structures. 2. Construction of a 10 000-membered benzopyran library by directed split-and-pool chemistry using NanoKans and optical encoding*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(41): p. 9954-9967.

54. Koehler, A.N., A.F. Shamji, and S.L. Schreiber, *Discovery of an inhibitor of a transcription factor using small molecule microarrays and diversity-oriented synthesis*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(28): p. 8420-8421.
55. Brik, A., et al., *Rapid Diversity-Oriented Synthesis in Microtiter Plates for In Situ Screening of HIV Protease Inhibitors*. ChemBioChem, 2003. **4**(11): p. 1246-1248.
56. Niggemann, J., et al., *Natural product-derived building blocks for combinatorial synthesis. Part 1. Fragmentation of natural products from myxobacteria*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 2002(22): p. 2490-2503.
57. Wilson, K.S., et al., *A common protein fold and similar active site in two distinct families of bglycanases*. Nat Struct Biol, 1995. **2**: p. 569-576.
58. Kellenberger, E., A. Hofmann, and R.J. Quinn, *Similar interactions of natural products with biosynthetic enzymes and therapeutic targets could explain why nature produces such a large proportion of existing drugs*. Natural product reports, 2011. **28**(9): p. 1483-1492.
59. Quinn, R.J., et al., *Developing a Drug-like Natural Product Library*. Journal of natural products, 2008. **71**(3): p. 464-468.
60. Harvey, A.L., R. Edrada-Ebel, and R.J. Quinn, *The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era*. Nature reviews. Drug discovery, 2015. **14**(2): p. 111.
61. Sheridan, C., *Recasting natural product research*. 2012, Nature Research.
62. Harvey, A.L., *Natural products in drug discovery*. Drug discovery today, 2008. **13**(19): p. 894-901.
63. Dias, D.A., S. Urban, and U. Roessner, *A historical overview of natural products in drug discovery*. Metabolites, 2012. **2**(2): p. 303-336.
64. Bergmann, W. and R.J. Feeney, *Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I*. The Journal of Organic Chemistry, 1951. **16**(6): p. 981-987.
65. Bergmann, W. and D.C. Burke, *Contributions to the Study of Marine Products. XL. The Nucleosides of Sponges. 1 IV. Spongosiene*. The Journal of organic chemistry, 1956. **21**(2): p. 226-228
66. Bergmann, W. and M.F. Stempien Jr, *Contributions to the Study of Marine Products. XLIII. The Nucleosides of Sponges. V. The Synthesis of Spongosiene*. The journal of Organic Chemistry, 1957. **22**(12): p. 1575-1577.

67. Mehbub, M.F., et al., *Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives*. *Marine drugs*, 2014. **12**(8): p. 4539-4577.
68. Molinski, T.F., et al., *Drug development from marine natural products*. *Nature reviews. Drug discovery*, 2009. **8**(1): p. 69.
69. Jarvis, L.M., *Liquid gold mine*. *Chem. Engin. News*, 2007. **85**: p. 22-28.
70. Hu, G.-P., et al., *Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008*. *Marine drugs*, 2011. **9**(4): p. 514-525.
71. Weinheimer, A.J. and R.L. Spraggins, *The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the Gorgonian PlexauraHomomalla* *Chemistry of Coelenterates. XV*. *Tetrahedron letters*, 1969. **10**(59): p. 5185-5188.
72. Ireland, C.M., et al., *Biomedical potential of marine natural products*, in *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*. 1993, Springer. p. 1-43.
73. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Nat Prod Rep*, 2008. **25**(1): p. 35-94.
74. Faulkner, D.J., *Marine natural products*. *Natural product reports*, 2000. **17**(1): p. 7-55.
75. Faulkner, D.J., *Marine natural products*. *Natural product reports*, 2001. **18**(1): p. 1R-49R.
76. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. 2006.
77. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Nat Prod Rep*, 2010. **27**(2): p. 165-237.
78. Osinga, R., J. Tramper, and R.H. Wijffels, *Marine bioprocess engineering: from ocean to industry*. *Trends in Biotechnology*, 1999. **17**(8): p. 303-304.
79. Wijffels, R.H., *Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology*. *Trends in Biotechnology*, 2008. **26**(1): p. 26-31.
80. Wijffels, R.H., et al., *Marine biotechnology: basics and applications*. 2003, Elsevier.
81. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Nat Prod Rep*, 2011. **28**(2): p. 196-268.
82. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Nat Prod Rep*, 2012. **29**(2): p. 144-222.
83. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. *Nat Prod Rep*, 2013. **30**(2): p. 237-323.

84. Hooper, J.N., *Sponguide: guide to sponge collection and identification*. 2000: Queensland Museum.
85. Paul, V.J. and M.P. Puglisi, *Chemical mediation of interactions among marine organisms*. Natural product reports, 2004. **21**(1): p. 189-209.
86. Paul, V.J., M.P. Puglisi, and R. Ritson-Williams, *Marine chemical ecology*. Natural product reports, 2006. **23**(2): p. 153-180.
87. Bakus, G.J. and G. Green, *Toxicity in sponges and holothurians: a geographic pattern*. Science, 1974. **185**(4155): p. 951-953.
88. Green, G., *Ecology of toxicity in marine sponges*. Marine Biology, 1977. **40**(3): p. 207-215.
89. Pawlik, J.R., et al., *Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence*. Marine Ecology Progress Series, 1995: p. 183-194.
90. Becerro, M.A., X. Turon, and M.J. Uriz, *Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates*. Journal of chemical ecology, 1997. **23**(6): p. 1527-1547.
91. Jones, A.C., J.E. Blum, and J.R. Pawlik, *Testing for defensive synergy in Caribbean sponges: Bad taste or glass spicules?* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005. **322**(1): p. 67-81.
92. Bell, J.J., *The functional roles of marine sponges*. Estuarine, coastal and shelf science, 2008. **79**(3): p. 341-353.
93. Hentschel, U., et al., *Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans*. Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(9): p. 4431-4440.
94. Selvin, J., et al., *Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution*. Microbiological research, 2009. **164**(3): p. 352-363.
95. Wilkinson, C. and P. Fay, *Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria*. Nature, 1979. **279**(5713): p. 527-529.
96. Lee, Y.K., J.-H. Lee, and H.K. Lee, *Microbial symbiosis in marine sponges*. Journal of microbiology-seoul-, 2001. **39**(4): p. 254-264.
97. Diaz, M.C. and K. Rützler, *Sponges: an essential component of Caribbean coral reefs*. Bulletin of Marine Science, 2001. **69**(2): p. 535-546.

98. Thoms, C., et al., *Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation*. *Marine Biology*, 2003. **142**(4): p. 685-692.
99. Taylor, M.W., et al., *Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2007. **71**(2): p. 295-347.
100. Thoms, C. and P. Schupp, *Biotechnological potential of marine sponges and their associated bacteria as producers of new pharmaceuticals (Part II)*. *Journal of International Biotechnology Law*, 2005. **2**(6): p. 257-264.
101. Proksch, P., *Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs*. *Toxicon*, 1994. **32**(6): p. 639-655.
102. Mahon, A.R., et al., *Tissue-specific palatability and chemical defenses against macropredators and pathogens in the common articulate brachiopod *Liothyrella uva* from the Antarctic Peninsula*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003. **290**(2): p. 197-210.
103. Paul, V., E. Cruz-Rivera, and R. Thacker, *Chemical mediation of macroalgal-herbivore interactions: ecological and evolutionary perspectives*. *Marine chemical ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2001: p. 227-265.
104. Piel, J., *Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals*. *Current medicinal chemistry*, 2006. **13**(1): p. 39-50.
105. Newman, D.J. and R.T. Hill, *New drugs from marine microbes: the tide is turning*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006. **33**(7): p. 539-544.
106. Pomponi, S. and R. Willoughby, *Sponge cell culture for production of bioactive metabolites*. *Sponges in time and space*. Balkema, Rotterdam, 1994: p. 395-400.
107. Hill, R., et al., *Manzamine-producing actinomycetes*. 2003, Google Patents.
108. Koopmans, M., D. Martens, and R.H. Wijffels, *Towards commercial production of sponge medicines*. *Marine drugs*, 2009. **7**(4): p. 787-802.
109. Lane, A.L. and B.S. Moore, *A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age*. *Natural product reports*, 2011. **28**(2): p. 411-428.
110. Udvary, D.W., et al., *Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(25): p. 10376-10381.

111. Udvary, D.W., et al., *Significant natural product biosynthetic potential of actinorhizal symbionts of the genus Frankia, as revealed by comparative genomic and proteomic analyses*. Applied and environmental microbiology, 2011. **77**(11): p. 3617-3625.
112. Hildebrand, M., et al., *bryA: an unusual modular polyketide synthase gene from the uncultivated bacterial symbiont of the marine bryozoan Bugula neritina*. Chemistry & biology, 2004. **11**(11): p. 1543-1552.
113. Piel, J., et al., *Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge Theonella swinhoei*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(46): p. 16222-16227.
114. Abad, M., L. Bedoya, and P. Bermejo, *Marine compounds and their antimicrobial activities*. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 2011. **51**: p. 1293-1306.
115. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2003. **20**(1): p. 1-48.
116. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2004. **21**(1): p. 1-49.
117. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Nat Prod Rep, 2005. **22**(1): p. 15-61.
118. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Natural product reports, 2007. **24**(1): p. 31-86.
119. Blunt, J.W., et al., *Marine natural products*. Natural product reports, 2009. **26**(2): p. 170-244.
120. Kaspar, A.A. and J.M. Reichert, *Future directions for peptide therapeutics development*. Drug discovery today, 2013. **18**(17): p. 807-817.
121. Hayashi, M.A., F. Ducancel, and K. Konno, *Natural peptides with potential applications in drug development, diagnosis, and/or biotechnology*. International journal of peptides, 2012. **2012**.
122. Jain, K.K., *An evaluation of intrathecal ziconotide for the treatment of chronic pain*. Expert opinion on investigational drugs, 2000. **9**(10): p. 2403-2410.
123. Lyseng-Williamson, K.A. and C. Perry, *Ziconotide*. CNS drugs, 2006. **20**(4): p. 331-338.
124. Olivera, B.M., et al., *Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails*. Science, 1985. **230**(4732): p. 1338-1343.
125. Terlau, H. and B.M. Olivera, *Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides*. Physiological reviews, 2004. **84**(1): p. 41-68.

126. Assmann, M., et al., *Chemical defenses of the Caribbean sponges Agelas wiedenmayeri and Agelas conifera*. Marine Ecology Progress Series, 2000. **207**: p. 255-262.
127. Neeman, I., L. Fishelson, and Y. Kashman, *Isolation of a new toxin from the sponge Latrunculia magna in the Gulf of Aquaba (Red Sea)*. Marine Biology, 1975. **30**(4): p. 293-296.
128. Paul, V.J., R. Ritson-Williams, and K. Sharp, *Marine chemical ecology in benthic environments*. Natural product reports, 2011. **28**(2): p. 345-387.
129. Folmer, F., et al., *Marine cytotoxins: callers for the various dances of death*. Gastroenterology and Hepatology from bed to bench, 2009.
130. Bao, B., et al., *Bisindole alkaloids of the topsentin and hamacanthin classes from a marine sponge Spongisorites sp.* Journal of natural products, 2007. **70**(1): p. 2-8.
131. Luo, X., et al., *Cytotoxic oxylipins from a marine sponge Topsentia sp.* Journal of natural products, 2006. **69**(4): p. 567-571.
132. Mansoor, T.A., et al., *5, 6: 8, 9-Diepoxy and other cytotoxic sterols from the marine sponge Homaxinella sp.* Journal of natural products, 2006. **69**(1): p. 131-134.
133. Aoki, S., et al., *Bastadin 6, a spongean brominated tyrosine derivative, inhibits tumor angiogenesis by inducing selective apoptosis to endothelial cells*. Anti-cancer drugs, 2006. **17**(3): p. 269-278.
134. Nagle, D.G., et al., *Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products*. Current medicinal chemistry, 2004. **11**(13): p. 1725-1756.
135. Singh, R., et al., *Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources*. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents), 2008. **8**(6): p. 603-617.
136. Gong, H., et al. *Analysis and verification of the HMGB1 signaling pathway*. in *BMC bioinformatics*. 2010. BioMed Central Ltd.
137. Sigel, M., et al., *Food-drugs from the Sea: Proceedings 1969*. Marine Technology Society, Washington, DC, 1970. **281**.
138. Rinehart, K., et al., *Ecteinascidin-729, Ecteinascidin-743, Ecteinascidin-745, Ecteinascidin-759a, Ecteinascidin-759b, and Ecteinascidin-770-Potent Antitumor Agents from the Caribbean Tunicate Ecteinascidia-Turbinata*. 1990, amer chemical soc 1155 16th st, NW, Washington, DC 20036. p. 4512-4515.

139. Wright, A.E., et al., *Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian Ecteinascidia turbinata*. The Journal of Organic Chemistry, 1990. **55**(15): p. 4508-4512.
140. Sakai, R., et al., *Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate: crystal structures and activities in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(23): p. 11456-11460.
141. Martinez, E.J. and E. Corey, *A new, more efficient, and effective process for the synthesis of a key pentacyclic intermediate for production of ecteinascidin and phthalascidin antitumor agents*. Organic letters, 2000. **2**(7): p. 993-996.
142. Corey, E.J., D.Y. Gin, and R.S. Kania, *Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(38): p. 9202-9203.
143. Cuevas, C. and A. Francesch, *Development of Yondelis®(trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem*. Natural product reports, 2009. **26**(3): p. 322-337.
144. Cuevas, C., et al., *Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin B*. Organic letters, 2000. **2**(16): p. 2545-2548.
145. Aune, G.J., T. Furuta, and Y. Pommier, *Ecteinascidin 743: a novel anticancer drug with a unique mechanism of action*. Anti-cancer drugs, 2002. **13**(6): p. 545-555.
146. Pommier, Y., et al., *DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate Ecteinascidia turbinata*. Biochemistry, 1996. **35**(41): p. 13303-13309.
147. Zewail-Foote, M. and L.H. Hurley, *Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove*. Journal of medicinal chemistry, 1999. **42**(14): p. 2493-2497.
148. Zewail-Foote, M., et al., *The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743–DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent*. Chemistry & biology, 2001. **8**(11): p. 1033-1049.
149. Takebayashi, Y., et al., *Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair*. Nature medicine, 2001. **7**(8): p. 961.
150. Elez, M.E., et al., *First-in-human phase I study of Lurbinectedin (PM01183) in patients with advanced solid tumors*. Clinical Cancer Research, 2014. **20**(8): p. 2205-2214.

151. Vidal, A., et al., *Lurbinectedin (PM01183), a new DNA minor groove binder, inhibits growth of orthotopic primary graft of cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer*. *Clinical Cancer Research*, 2012: p. clincanres. 1513.2012.
152. Poveda, A., et al., *Lurbinectedin (PM01183), an active compound in platinum-resistant/refractory ovarian cancer (PRROC) patients: Results of a two-stage, controlled phase II study*. 2014, American Society of Clinical Oncology.
153. Soares, D.G., et al., *Trabectedin and its C subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells*. *Molecular cancer therapeutics*, 2011. **10**(8): p. 1481-1489.
154. Rinehart, K.L., *Antitumor compounds from tunicates*. *Medicinal research reviews*, 2000. **20**(1): p. 1-27.
155. Rinehart, K., A. Lithgow-Bertelloni, and G. Ruffles, *Dehydroidemnin B*, *PCT Intl. Appl.*(41 pp.), International Patent No. WO, 1991. **91**: p. 04985.
156. Chun, H.G., et al., *Didemnin B*. *Investigational new drugs*, 1986. **4**(3): p. 279-284.
157. Shin, D.M., et al., *Phase II clinical trial of didemnin B in previously treated small cell lung cancer*. *Investigational new drugs*, 1994. **12**(3): p. 243-249.
158. Nuijen, B., et al., *Pharmaceutical development of anticancer agents derived from marine sources*. *Anti-Cancer Drugs*, 2000. **11**(10): p. 793-811.
159. Broggin, M., et al., *Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4*. *Leukemia*, 2003. **17**(1): p. 52.
160. Tourneau, C., E. Raymond, and S. Faivre, *Aplidine: a paradigm of how to handle the activity and toxicity of a novel marine anticancer poison*. *Current pharmaceutical design*, 2007. **13**(33): p. 3427-3439.
161. Nuijen, B., et al., *Pharmaceutical development of a parenteral lyophilized formulation of the novel antitumor agent aplidine*. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2000. **54**(3): p. 193-208.
162. Le Tourneau, C., et al., *Reports of clinical benefit of plitidepsin (Aplidine), a new marine-derived anticancer agent, in patients with advanced medullary thyroid carcinoma*. *American journal of clinical oncology*, 2010. **33**(2): p. 132-136.
163. Garcia-Fernández, L., et al., *Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta*. *Oncogene*, 2002. **21**(49): p. 7533-7544.

164. Gajate, C., F. An, and F. Mollinedo, *Rapid and selective apoptosis in human leukemic cells induced by Aplidine through a Fas/CD95-and mitochondrial-mediated mechanism*. *Clinical cancer research*, 2003. **9**(4): p. 1535-1545.
165. Grubb, D.R., et al., *Mitochondrial cytochrome c release is caspase-dependent and does not involve mitochondrial permeability transition in didemnin B-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2001. **20**(30): p. 4085.
166. Cuadrado, A., et al., *JNK activation is critical for Aplidin-induced apoptosis*. *Oncogene*, 2004. **23**(27): p. 4673-80.
167. Taraboletti, G., et al., *Antiangiogenic activity of aplidine, a new agent of marine origin*. *British journal of cancer*, 2004. **90**(12): p. 2418.
168. Erba, E., et al., *Effect of Aplidin in acute lymphoblastic leukaemia cells*. *British journal of cancer*, 2003. **89**(4): p. 763.
169. Bresters, D., et al., *In vitro cytotoxicity of aplidin and crossresistance with other cytotoxic drugs in childhood leukemic and normal bone marrow and blood samples: a rational basis for clinical development*. *Leukemia*, 2003. **17**(7): p. 1338.
170. Albella, B., et al., *In vitro toxicity of ET-743 and aplidine, two marine-derived antineoplastics, on human bone marrow haematopoietic progenitors: comparison with the clinical results*. *European Journal of Cancer*, 2002. **38**(10): p. 1395-1404.
171. Gómez, S.G., et al., *In vitro toxicity of three new antitumoral drugs (trabectedin, aplidin, and kahalalide F) on hematopoietic progenitors and stem cells*. *Experimental hematology*, 2003. **31**(11): p. 1104-1111.
172. Talpir, R., et al., *Hemiasterlin and geodiamolide TA; two new cytotoxic peptides from the marine sponge Hemiasterella minor (Kirkpatrick)*. *Tetrahedron letters*, 1994. **35**(25): p. 4453-4456.
173. Coleman, J.E., et al., *Cytotoxic peptides from the marine sponge Cymbastela sp.* *Tetrahedron*, 1995. **51**(39): p. 10653-10662.
174. Coleman, J., et al., *Hemiasterlin methyl ester*. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 1996. **52**(6): p. 1525-1527.
175. Anderson, H.J., et al., *Cytotoxic peptides hemiasterlin, hemiasterlin A and hemiasterlin B induce mitotic arrest and abnormal spindle formation*. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 1996. **39**(3): p. 223-226.

176. Lo, M.-C., et al., *Probing the interaction of HTI-286 with tubulin using a stilbene analogue*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(32): p. 9898-9899.
177. Krishnamurthy, G., et al., *Biophysical characterization of the interactions of HTI-286 with tubulin heterodimer and microtubules*. Biochemistry, 2003. **42**(46): p. 13484-13495.
178. Poruchynsky, M.S., et al., *Tumor cells resistant to a microtubule-depolymerizing hemiasterlin analogue, HTI-286, have mutations in α -or β -tubulin and increased microtubule stability*. Biochemistry, 2004. **43**(44): p. 13944-13954.
179. Dang, L.H., et al., *Targeting vascular and avascular compartments of tumors with C. novyi-NT and anti-microtubule agents*. Cancer biology & therapy, 2004. **3**(3): p. 326-337.
180. Hadaschik, B.A., et al., *Targeting prostate cancer with HTI-286, a synthetic analog of the marine sponge product hemiasterlin*. International journal of cancer, 2008. **122**(10): p. 2368-2376.
181. De Souza, M., *(+)-discodermolide: a marine natural product against cancer*. TheScientificWorldJournal, 2004. **4**: p. 415-436.
182. Longley, R.E., et al., *Discodermolide-A new, marine-derived immunosuppressive compound: I. in vitro studies*. Transplantation, 1991. **52**(4): p. 650-655.
183. Longley, R.E., et al., *Immunosuppression by discodermolide*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1993. **696**(1): p. 94-107.
184. Kar, S., et al., *Discodermolide interferes with the binding of tau protein to microtubules*. FEBS letters, 2003. **539**(1-3): p. 34-36.
185. Escuin, D., E.R. Kline, and P. Giannakakou, *Both microtubule-stabilizing and microtubule-destabilizing drugs inhibit hypoxia-inducible factor-1 α accumulation and activity by disrupting microtubule function*. Cancer research, 2005. **65**(19): p. 9021-9028.
186. Klein, L.E., et al., *The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence*. Cell Cycle, 2005. **4**(3): p. 501-507.
187. Martello, L.A., et al., *Taxol and discodermolide represent a synergistic drug combination in human carcinoma cell lines*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(5): p. 1978-1987.
188. Giannakakou, P. and T. Fojo, *Discodermolide: just another microtubule-stabilizing agent? No! A lesson in synergy*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(5): p. 1613-1615.
189. Smith, A.B., et al., *Discodermolide analogues as the chemical component of combination bacteriolytic therapy*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2005. **15**(15): p. 3623-3626.

190. Mickel, S.J., et al., *Large-scale synthesis of the anti-cancer marine natural product (+)-discodermolide. Part 1: synthetic strategy and preparation of a common precursor*. Organic process research & development, 2004. **8**(1): p. 92-100.
191. Mickel, S.J., et al., *Large-scale synthesis of the anti-cancer marine natural product (+)-discodermolide. Part 2: synthesis of fragments C1-6 and C9-14*. Organic process research & development, 2004. **8**(1): p. 101-106.
192. Mickel, S.J., et al., *Large-scale synthesis of the anti-cancer marine natural product (+)-discodermolide. Part 3: synthesis of fragment C15-21*. Organic process research & development, 2004. **8**(1): p. 107-112.
193. Mickel, S.J., et al., *Large-scale synthesis of the anti-cancer marine natural product (+)-discodermolide. Part 4: preparation of fragment C7-24*. Organic process research & development, 2004. **8**(1): p. 113-121.
194. Mickel, S.J., et al., *Large-scale synthesis of the anti-cancer marine natural product (+)-Discodermolide. Part 5: Linkage of fragments C1-6 and C7-24 and finale*. Organic process research & development, 2004. **8**(1): p. 122-130.
195. Pettit, G., *The dolastatins*, in *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 1997, Springer. p. 1-79.
196. Pettit, G.R., *Progress in the discovery of biosynthetic anticancer drugs I*. Journal of natural products, 1996. **59**(8): p. 812-821.
197. Pettit, G.R., et al., *Antineoplastic agents. Part 189. The absolute configuration and synthesis of natural (-)-dolastatin 10*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(14): p. 5463-5465.
198. Skulberg, O.M., *Microalgae as a source of bioactive molecules—experience from cyanophyte research*. Journal of Applied Phycology, 2000. **12**(3): p. 341-348.
199. Bai, R., G.R. Pettit, and E. Hamel, *Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal: inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain*. Biochemical pharmacology, 1990. **39**(12): p. 1941-1949.
200. Bai, R., G.R. Pettit, and E. Hamel, *Binding of dolastatin 10 to tubulin at a distinct site for peptide antimetabolic agents near the exchangeable nucleotide and vinca alkaloid sites*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(28): p. 17141-17149.
201. Vaishampayan, U., et al., *Phase II study of dolastatin-10 in patients with hormone-refractory metastatic prostate adenocarcinoma*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(11): p. 4205-4208.

202. Margolin, K., et al., *Dolastatin-10 in metastatic melanoma: a phase II and pharmokinetic trial of the California Cancer Consortium*. Investigational new drugs, 2001. **19**(4): p. 335-340.
203. Saad, E.D., et al., *Phase II study of dolastatin-10 as first-line treatment for advanced colorectal cancer*. American journal of clinical oncology, 2002. **25**(5): p. 451-453.
204. Von Mehren, M., et al., *Phase II trial of dolastatin-10, a novel anti-tubulin agent, in metastatic soft tissue sarcomas*. Sarcoma, 2004. **8**(4): p. 107-111.
205. Kindler, H.L., et al., *Phase II trials of dolastatin-10 in advanced pancreaticobiliary cancers*. Investigational new drugs, 2005. **23**(5): p. 489-493.
206. Hashiguchi, N., et al., *TZT-1027 elucidates antitumor activity through direct cytotoxicity and selective blockade of blood supply*. Anticancer research, 2004. **24**(4): p. 2201-2208.
207. Kobayashi, M., et al., *Antitumor Activity of TZT-1027, a Novel Doiastatin 10 Derivative*. Cancer Science, 1997. **88**(3): p. 316-327.
208. Mayer, A.M., et al., *The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective*. Trends in pharmacological sciences, 2010. **31**(6): p. 255-265.
209. Martins, A., et al., *Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success*. Marine drugs, 2014. **12**(2): p. 1066-1101.
210. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development*. Marine drugs, 2014. **12**(1): p. 255-278.
211. Hirata, Y. and D. Uemura, *Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge*. Pure and Applied Chemistry, 1986. **58**(5): p. 701-710.
212. Uemura, D., et al., *Norhalichondrin A: an antitumor polyether macrolide from a marine sponge*. Journal of the American Chemical Society, 1985. **107**(16): p. 4796-4798.
213. Dabydeen, D.A., et al., *Comparison of the activities of the truncated halichondrin B analog NSC 707389 (E7389) with those of the parent compound and a proposed binding site on tubulin*. Molecular pharmacology, 2006. **70**(6): p. 1866-1875.
214. Fusetani, N., *Drugs from the Sea*. 2000: Karger Medical and Scientific Publishers.
215. Munro, M.H., et al., *The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential*. Journal of Biotechnology, 1999. **70**(1): p. 15-25.

216. Stamos, D.P., S.S. Chen, and Y. Kishi, *New Synthetic Route to the C. 14– C. 38 Segment of Halichondrins*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1997. **62**(22): p. 7552-7553.
217. Wang, Y., et al., *Structure–activity relationships of halichondrin B analogues: modifications at C. 30–C. 38*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2000. **10**(10): p. 1029-1032.
218. Littlefield, B.A., et al., *Macrocyclic analogs and methods of their use and preparation*. 2001, Google Patents.
219. Cragg, G.M., D.G. Kingston, and D.J. Newman, *Anticancer agents from natural products*. 2011: CRC press.
220. Towle, M.J., et al., *In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B*. *Cancer research*, 2001. **61**(3): p. 1013-1021.
221. Forero, J.B., et al., *E7389, a novel anti-tubulin, in patients with refractory breast cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(18_suppl): p. 653-653.
222. Spira, A., et al., *Phase II study of eribulin mesylate (E7389), a mechanistically novel inhibitor of microtubule dynamics, in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. **25**(18_suppl): p. 7546-7546.
223. Cortes, J., A.J. Montero, and S. Glück, *Eribulin mesylate, a novel microtubule inhibitor in the treatment of breast cancer*. *Cancer treatment reviews*, 2012. **38**(2): p. 143-151.
224. Suárez, Y., et al., *Kahalalide F, a new marine-derived compound, induces oncosis in human prostate and breast cancer cells*. *Molecular cancer therapeutics*, 2003. **2**(9): p. 863-872.
225. Sewell, J., et al., *The mechanism of action of Kahalalide F: variable cell permeability in human hepatoma cell lines*. *European Journal of Cancer*, 2005. **41**(11): p. 1637-1644.
226. Janmaat, M.L., et al., *Kahalalide F induces necrosis-like cell death that involves depletion of ErbB3 and inhibition of Akt signaling*. *Molecular pharmacology*, 2005. **68**(2): p. 502-510.
227. Pardo, B., et al., *Phase I clinical and pharmacokinetic study of kahalalide F administered weekly as a 1-hour infusion to patients with advanced solid tumors*. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**(4): p. 1116-1123.
228. Martín-Algarra, S., et al., *Phase II study of weekly Kahalalide F in patients with advanced malignant melanoma*. *European Journal of Cancer*, 2009. **45**(5): p. 732-735.

229. Wender, P.A., et al., *Synthesis of the first members of a new class of biologically active bryostatin analogues*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(18): p. 4534-4535.
230. Wender, P.A., et al., *Modeling of the bryostatins to the phorbol ester pharmacophore on protein kinase C*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(19): p. 7197-7201.
231. Hennings, H., et al., *Bryostatin 1, an activator of protein kinase C, inhibits tumor promotion by phorbol esters in SENCAR mouse skin*. Carcinogenesis, 1987. **8**(9): p. 1343-1346.
232. Isakov, N., et al., *Inhibition of phorbol ester-induced T cell proliferation by bryostatin is associated with rapid degradation of protein kinase C*. The Journal of Immunology, 1993. **150**(4): p. 1195-1204.
233. Hu, Z., et al., *Modulation of gene expression in the acute promyelocytic leukemia cell line NB4*. Leukemia, 1993. **7**(11): p. 1817-1823.
234. Grant, S., G.R. Pettit, and C. McCrady, *Effect of bryostatin 1 on the in vitro radioprotective capacity of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF) toward committed human myeloid progenitor cells (CFU-GM)*. Experimental hematology, 1992. **20**(1): p. 34-42.
235. Berkow, R.L., et al., *In vivo administration of the anticancer agent bryostatin 1 activates platelets and neutrophils and modulates protein kinase C activity*. Cancer research, 1993. **53**(12): p. 2810-2815.
236. Clamp, A. and G.C. Jayson, *The clinical development of the bryostatins*. Anti-Cancer Drugs, 2002. **13**(7): p. 673-683.
237. Feling, R.H., et al., *Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus Salinospora*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(3): p. 355-357.
238. C Potts, B., et al., *Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials*. Current cancer drug targets, 2011. **11**(3): p. 254-284.
239. Schmitt, E.K., et al., *Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective*. Current opinion in chemical biology, 2011. **15**(4): p. 497-504.
240. Michaudel, Q., Y. Ishihara, and P.S. Baran, *Academia–industry symbiosis in organic chemistry*. Accounts of chemical research, 2015. **48**(3): p. 712-721.

241. Strege, M.A., *High-performance liquid chromatographic–electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1999. **725**(1): p. 67-78.
242. Hong, J., *Role of natural product diversity in chemical biology*. Current opinion in chemical biology, 2011. **15**(3): p. 350-354.
243. Nielsen, K.F. and J. Smedsgaard, *Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology*. Journal of Chromatography A, 2003. **1002**(1): p. 111-136.
244. Tawfike, A.F., C. Viegemann, and R. Edrada-Ebel, *Metabolomics and dereplication strategies in natural products*. Metabolomics Tools for Natural Product Discovery: Methods and Protocols, 2013: p. 227-244.
245. Abdelmohsen, U.R., et al., *Dereplication strategies for targeted isolation of new antitrypanosomal actinosporins A and B from a marine sponge associated-Actinokineospora sp. EG49*. Marine drugs, 2014. **12**(3): p. 1220-1244.
246. Ebada, S.S., et al., *Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates*. Nature protocols, 2008. **3**(12): p. 1820.
247. Kjer, J., et al., *Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products*. Nature protocols, 2010. **5**(3): p. 479.
248. Freeman, R. and G.A. Morris, *Two-dimensional Fourier transformation in NMR*. Bull. Magn. Reson, 1979. **1**(5).
249. McDonald, L.A., et al., *FTMS structure elucidation of natural products: application to muraymycin antibiotics using ESI multi-CHEF SORI-CID FTMS n, the top-down/bottom-up approach, and HPLC ESI capillary-skimmer CID FTMS*. Analytical chemistry, 2003. **75**(11): p. 2730-2739.
250. Jaspars, M. and G. Challis, *Microbiology: A talented genus*. Nature, 2014. **506**(7486): p. 38-39.
251. Schofield, M.M., et al., *Identification and analysis of the bacterial endosymbiont specialized for production of the chemotherapeutic natural product ET-743*. Environmental microbiology, 2015. **17**(10): p. 3964-3975.
252. Nett, M., H. Ikeda, and B.S. Moore, *Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes*. Natural product reports, 2009. **26**(11): p. 1362-1384.

253. Challis, G.L., *Genome mining for novel natural product discovery*. Journal of medicinal chemistry, 2008. **51**(9): p. 2618-2628.
254. Corre, C. and G.L. Challis, *New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining*. Natural product reports, 2009. **26**(8): p. 977-986.
255. Stevens, D.C., et al., *Alternative sigma factor over-expression enables heterologous expression of a type II polyketide biosynthetic pathway in Escherichia coli*. PloS one, 2013. **8**(5): p. e64858.
256. Bian, X., et al., *Luminmycins A–C, cryptic natural products from Photorhabdus luminescens identified by heterologous expression in Escherichia coli*. Journal of natural products, 2012. **75**(9): p. 1652-1655.
257. Baltz, R.H., *Streptomyces and Saccharopolyspora hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters*. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2010. **37**(8): p. 759-772.
258. Cimini, D., et al., *Homologous overexpression of rfaH in E. coli K4 improves the production of chondroitin-like capsular polysaccharide*. Microbial cell factories, 2013. **12**(1): p. 46.
259. Kwon, S.-K., Y.-K. Park, and J.F. Kim, *Genome-wide screening and identification of factors affecting the biosynthesis of prodigiosin by Hahella chejuensis, using Escherichia coli as a surrogate host*. Applied and environmental microbiology, 2010. **76**(5): p. 1661-1668.
260. Hwang, E.I., et al., *Production of plant-specific flavanones by Escherichia coli containing an artificial gene cluster*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(5): p. 2699-2706.
261. Carlsen, S., et al., *Heterologous expression and characterization of bacterial 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Applied microbiology and biotechnology, 2013. **97**(13): p. 5753-5769.
262. Shao, Z. and H. Zhao, *Exploring DNA assembler, a synthetic biology tool for characterizing and engineering natural product gene clusters*. Methods in enzymology, 2012. **517**: p. 203.
263. Oliver, S.G., *From genomes to systems: the path with yeast*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2006. **361**(1467): p. 477-482.

264. Jones, A.C., et al., *Evaluation of Streptomyces coelicolor A3 (2) as a heterologous expression host for the cyanobacterial protein kinase C activator lyngbyatoxin A*. The FEBS journal, 2012. **279**(7): p. 1243-1251.
265. Gomez-Escribano, J.P. and M.J. Bibb, *Streptomyces coelicolor as an expression host for heterologous gene clusters*. Methods Enzymol, 2012. **517**: p. 279-300.
266. Zhu, F., et al., *The main byproducts and metabolic flux profiling of γ -PGA-producing strain B. subtilis ZJU-7 under different pH values*. Journal of biotechnology, 2013. **164**(1): p. 67-74.
267. Jordà, J., et al., *Metabolic flux profiling of recombinant protein secreting Pichia pastoris growing on glucose: methanol mixtures*. Microbial cell factories, 2012. **11**(1): p. 57.
268. Rateb, M.E., et al., *Diverse metabolic profiles of a Streptomyces strain isolated from a hyper-arid environment*. Journal of natural products, 2011. **74**(9): p. 1965-1971.
269. Bills, G., et al., *Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays*. Journal of applied microbiology, 2008. **104**(6): p. 1644-1658.
270. Macintyre, L., et al., *Metabolomic tools for secondary metabolite discovery from marine microbial symbionts*. Marine drugs, 2014. **12**(6): p. 3416-3448.
271. Toya, Y. and H. Shimizu, *Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms*. Biotechnology advances, 2013. **31**(6): p. 818-826.
272. Gerwick, W.H. and B.S. Moore, *Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology*. Chemistry & biology, 2012. **19**(1): p. 85-98.
273. Dove, A., *Screening for content—the evolution of high throughput*. Nature biotechnology, 2003. **21**(8): p. 859-864.
274. Zanella, F., J.B. Lorens, and W. Link, *High content screening: seeing is believing*. Trends in biotechnology, 2010. **28**(5): p. 237-245.
275. Challal, S., et al., *Zebrafish bioassay-guided microfractionation for the rapid in vivo identification of pharmacologically active natural products*. CHIMIA International Journal for Chemistry, 2012. **66**(4): p. 229-232.
276. Li, Y., et al., *Screening of anti-cancer agent using zebrafish: comparison with the MTT assay*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. **422**(1): p. 85-90.

277. Moon, H.-S., et al., *A novel microtubule destabilizing entity from orthogonal synthesis of triazine library and zebrafish embryo screening*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(39): p. 11608-11609.
278. Lieschke, G.J. and P.D. Currie, *Animal models of human disease: zebrafish swim into view*. Nature reviews. Genetics, 2007. **8**(5): p. 353.
279. MacRae, C.A. and R.T. Peterson, *Zebrafish-based small molecule discovery*. Chemistry & biology, 2003. **10**(10): p. 901-908.
280. Novodvorsky, P., M.M. Da Costa, and T.J. Chico, *Zebrafish-based small molecule screens for novel cardiovascular drugs*. Drug Discovery Today: Technologies, 2013. **10**(1): p. e109-e114.
281. Kari, G., U. Rodeck, and A. Dicker, *Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2007. **82**(1): p. 70-80.
282. Zon, L.I. and R.T. Peterson, *In vivo drug discovery in the zebrafish*. Nature reviews. Drug discovery, 2005. **4**(1): p. 35.
283. Gobbi, A. and G. Frenking, *Y-conjugated compounds: the equilibrium geometries and electronic structures of guanidine, guanidinium cation, urea, and 1, 1-diaminoethylene*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(6): p. 2362-2372.
284. Oszczapowicz, J. and Z. S. Patai, *The Chemistry of Amidines and Imidates*. The Chemistry of Amidines and Imidates, 1991. **2**.
285. Raczyńska, E.D., et al., *Consequences of proton transfer in guanidine*. Journal of physical organic chemistry, 2003. **16**(2): p. 91-106.
286. Berlinck, R.G., *Natural guanidine derivatives*. Natural product reports, 1999. **16**(3): p. 339-365.
287. Berlinck, R.G., *Natural guanidine derivatives*. Natural product reports, 2002. **19**(5): p. 617-649.
288. Berlinck, R.G. and M.H. Kossuga, *Natural guanidine derivatives*. Natural product reports, 2005. **22**(4): p. 516-550.
289. Tan, C.H. and M. Coles, *The chemistry of guanidine, guanidinium, and guanidinate compounds*. Australian Journal of Chemistry, 2014. **67**(7): p. 963-964.
290. Berlinck, R.G., A.E. Trindade-Silva, and M.F. Santos, *The chemistry and biology of organic guanidine derivatives*. Natural product reports, 2012. **29**(12): p. 1382-1406.

291. Berlinck, R.G., A.C.B. Burtoloso, and M.H. Kossuga, *The chemistry and biology of organic guanidine derivatives*. Natural product reports, 2008. **25**(5): p. 919-954.
292. Phillips, D.J. and A.E. Graham, *Guanidine bases in synthesis: Extending the scope of the corey-chaykovsky epoxidation*. Synlett, 2010. **2010**(05): p. 769-773.
293. Zhang, G., et al., *Access to the nicotine system by application of a guanidine-catalyzed asymmetric Michael addition of diphenyliminoacetate with 3-pyridyl vinyl ketone*. Tetrahedron Letters, 2010. **51**(30): p. 3927-3930.
294. Meloni, D., et al., *Transesterification of soybean oil on guanidine base-functionalized SBA-15 catalysts*. Applied Catalysis B: Environmental, 2011. **102**(3): p. 505-514.
295. Som, A., et al., *Anion mediated activation of guanidine rich small molecules*. Organic & biomolecular chemistry, 2012. **10**(1): p. 40-42.
296. Perche, P., M. Kotera, and J.-S. Remy, *MMT, Npeoc-protected spermine, a valuable synthon for the solid phase synthesis of oligonucleotide oligospermine conjugates via guanidine linkers*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2011. **19**(6): p. 1972-1977.
297. Lam, C.H. and D.M. Perrin, *Introduction of guanidinium-modified deoxyuridine into the substrate binding regions of DNAzyme 10–23 to enhance target affinity: implications for DNAzyme design*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2010. **20**(17): p. 5119-5122.
298. de Sá, A., et al., *Gallium labeled NOTA-based conjugates for peptide receptor-mediated medical imaging*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2010. **20**(24): p. 7345-7348.
299. Becker, G.L., et al., *Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics*. Journal of medicinal chemistry, 2009. **53**(3): p. 1067-1075.
300. Liu, T., et al., *Membrane permeable cyclic peptidyl inhibitors against human Peptidylprolyl Isomerase Pin1*. Journal of medicinal chemistry, 2010. **53**(6): p. 2494-2501.
301. Sinz, C., et al., *Discovery of cyclic guanidines as potent, orally active, human glucagon receptor antagonists*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2011. **21**(23): p. 7131-7136.
302. Thevissen, K., et al., *Novel fungicidal benzylsulfanyl-phenylguanidines*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2011. **21**(12): p. 3686-3692.
303. Pai, N. and A. Samel, *Synthesis of Novel 3, 4-Dihydroquinolin-2 (1H)-one Guanidines as Potential Antihypertensive Agents*. Asian Journal of Chemistry, 2011. **23**(4): p. 1655.

304. Liu, X., et al., *Synthesis and antimalarial activity of 2-guanidino-4-oxoimidazoline derivatives*. Journal of medicinal chemistry, 2011. **54**(13): p. 4523-4535.
305. Sun, S., et al., *Synergistic effects of chitosan–guanidine complexes on enhancing antimicrobial activity and wet-strength of paper*. Bioresource technology, 2010. **101**(14): p. 5693-5700.
306. Mohan, S., et al., *Carbocycles related to oseltamivir as influenza virus group-1-specific neuraminidase inhibitors. Binding to NI enzymes in the context of virus-like particles*. Journal of medicinal chemistry, 2010. **53**(20): p. 7377-7391.
307. Yang, Z., et al., *Synergistic effects in the designs of neuraminidase ligands: Analysis from docking and molecular dynamics studies*. Journal of theoretical biology, 2010. **267**(3): p. 363-374.
308. de Souza Berlinck, R.G., *Some aspects of guanidine secondary metabolites*, in *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 1995, Springer. p. 119-295.
309. Pearson, L., et al., *On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin*. Marine drugs, 2010. **8**(5): p. 1650-1680.
310. Organization, W.H., *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon, 1999.
311. Welker, M. and H. Von Döhren, *Cyanobacterial peptides—nature's own combinatorial biosynthesis*. FEMS microbiology reviews, 2006. **30**(4): p. 530-563.
312. Botes, D.P., et al., *Structural studies on cyanoginosins-LR,-YR,-YA, and-YM, peptide toxins from Microcystis aeruginosa*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1985: p. 2747-2748.
313. Namikoshi, M., et al., *Seven new microcystins possessing two L-glutamic acid units, isolated from Anabaena sp. strain 186*. Chemical research in toxicology, 1998. **11**(2): p. 143-149.
314. Sainis, I., et al., *Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs*. Marine drugs, 2010. **8**(3): p. 629-657.
315. Rinehart, K.L., M. Namikoshi, and B.W. Choi, *Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria)*. Journal of applied phycology, 1994. **6**(2): p. 159-176.

316. Ohta, T., et al., *Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver*. *Cancer Research*, 1994. **54**(24): p. 6402-6406.
317. Eriksson, J., et al., *Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium Nodularia spumigena*. *Toxicon*, 1988. **26**(2): p. 161-166.
318. Honkanen, R., et al., *Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases*. *Molecular Pharmacology*, 1991. **40**(4): p. 577-583.
319. Murakami, M., et al., *Aeruginosins 98-A and B, trypsin inhibitors from the blue-green alga Microcystis aeruginosa (NIES-98)*. *Tetrahedron letters*, 1995. **36**(16): p. 2785-2788.
320. Ishida, K., et al., *Aeruginoguanidines 98-A–98-C: cytotoxic unusual peptides from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 2002. **58**(38): p. 7645-7652.
321. Ishida, K., et al., *Micropeptin 90, a plasmin and trypsin inhibitor from the blue-green alga Microcystis aeruginosa (NIES-90)*. *Tetrahedron letters*, 1995. **36**(20): p. 3535-3538.
322. Reshef, V. and S. Carmeli, *New microviridins from a water bloom of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 2006. **62**(31): p. 7361-7369.
323. Reshef, V. and S. Carmeli, *Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 2001. **57**(14): p. 2885-2894.
324. Ploutno, A. and S. Carmeli, *Banyasin A and banyasides A and B, three novel modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium Nostoc sp.* *Tetrahedron*, 2005. **61**(3): p. 575-583.
325. Ploutno, A., M. Shoshan, and S. Carmeli, *Three Novel Protease Inhibitors from a Natural Bloom of the Cyanobacterium Microcystis a eruginosa*. *Journal of natural products*, 2002. **65**(7): p. 973-978.
326. Raveh, A. and S. Carmeli, *Two novel biological active modified peptides from the cyanobacterium Microcystis sp.* *Phytochemistry Letters*, 2009. **2**(1): p. 10-14.
327. Lifshits, M. and S. Carmeli, *Metabolites of Microcystis aeruginosa bloom material from Lake Kinneret, Israel*. *Journal of natural products*, 2012. **75**(2): p. 209-219.
328. Vegman, M. and S. Carmeli, *Eight micropeptins from a Microcystis spp. bloom collected from a fishpond near Kibbutz Lehavot HaBashan, Israel*. *Tetrahedron*, 2013. **69**(47): p. 10108-10115.
329. Liu, L., et al., *Nostosins, trypsin inhibitors isolated from the terrestrial cyanobacterium Nostoc sp. strain FSN*. *Journal of natural products*, 2014. **77**(8): p. 1784-1790.

330. Sano, T. and K. Kaya, *Oscillatorin, a chymotrypsin inhibitor from toxic Oscillatoria agardhii*. Tetrahedron letters, 1996. **37**(38): p. 6873-6876.
331. Gademann, K., et al., *Multiple toxin production in the cyanobacterium Microcystis: Isolation of the toxic protease inhibitor cyanopeptolin 1020*. Journal of natural products, 2010. **73**(5): p. 980-984.
332. Bonjouklian, R., et al., *A90720A, a serine protease inhibitor isolated from a terrestrial blue-green alga Microchaete loktakensis*. Tetrahedron, 1996. **52**(2): p. 395-404.
333. Moon, S.S., et al., *Calophycin, a fungicidal cyclic decapeptide from the terrestrial blue-green alga Calothrix fusca*. The Journal of Organic Chemistry, 1992. **57**(4): p. 1097-1103.
334. Reid, R.T. and A. Butler, *Investigation of the mechanism of iron acquisition by the marine bacterium Alteromonas luteoviolaceus: Characterization of siderophore production*. Limnology and Oceanography, 1991. **36**(8): p. 1783-1792.
335. Reid, R.T., et al., *A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant*. Nature, 1993. **366**(6454): p. 455.
336. Harada, K.-i., et al., *Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium Anabaena flos-aquae NRC 525-17*. Tetrahedron letters, 1995. **36**(9): p. 1511-1514.
337. Sano, T., et al., *Isolation of new protein phosphatase inhibitors from two cyanobacteria species, Planktothrix spp.* Journal of natural products, 2001. **64**(8): p. 1052-1055.
338. Audoin, C., et al., *Autumnalamide, a prenylated cyclic peptide from the cyanobacterium Phormidium autumnale, acts on SH-SY5Y cells at the mitochondrial level*. Journal of natural products, 2014. **77**(10): p. 2196-2205.
339. Soengas, R.G., et al., *Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen Vibrio anguillarum serotype O2*. Tetrahedron letters, 2006. **47**(39): p. 7113-7116.
340. Kanoh, K., et al., *Pseudoalterobactin A and B, new siderophores excreted by marine bacterium Pseudoalteromonas sp. KP20-4*. The Journal of antibiotics, 2003. **56**(10): p. 871-875.
341. Cho, J.Y., et al., *Lucentamycins A– D, cytotoxic peptides from the marine-derived actinomycete Nocardiopsis lucentensis*. Journal of natural products, 2007. **70**(8): p. 1321-1328.

342. Matsunaga, S., et al., *Aurantosides A and B: cytotoxic tetramic acid glycosides from the marine sponge Theonella sp.* Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(25): p. 9690-9692.
343. Blunt, J., et al., *From the antarctic to the antipodes; 45 of marine chemistry.* New journal of chemistry, 1990. **14**(10): p. 761-775.
344. Araki, T., S. Matsunaga, and N. Fusetani, *Koshikamide A2, a cytotoxic linear undecapeptide isolated from a marine sponge of Theonella sp.* Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2005. **69**(7): p. 1318-1322.
345. Araki, T., et al., *Koshikamide B, a cytotoxic peptide lactone from a marine sponge Theonella sp.* The Journal of organic chemistry, 2008. **73**(20): p. 7889-7894.
346. Matsunaga, S., N. Fusetani, and S. Konosu, *Bioactive marine metabolites VI. Structure elucidation of discodermin A, an antimicrobial peptide from the marine sponge Discodermia kiiensis.* Tetrahedron letters, 1984. **25**(45): p. 5165-5168.
347. Matsunaga, S., N. Fusetani, and S. Konosu, *Bioactive marine metabolites VII. Structures of discodermins B, C, and D, antimicrobial peptides from the marine sponge discodermia kiiensis.* Tetrahedron letters, 1985. **26**(7): p. 855-856.
348. Matsunaga, S., N. Fusetani, and S. Konosu, *Bioactive marine metabolites, IV. Isolation and the amino acid composition of discodermin A, an antimicrobial peptide, from the marine sponge Discodermia kiiensis.* Journal of natural products, 1985. **48**(2): p. 236-241.
349. Sato, K., et al., *Membrane permeabilization induced by discodermin A, a novel marine bioactive peptide.* Toxicon, 2001. **39**(2): p. 259-264.
350. Li, H.-y., S. Matsunaga, and N. Fusetani, *Halicylindramides AC, antifungal and cytotoxic depsipeptides from the marine sponge Halichondria cylindrata.* Journal of medicinal chemistry, 1995. **38**(2): p. 338-343.
351. Li, H.-y., S. Matsunaga, and N. Fusetani, *Halicylindramides D and E, Antifungal Peptides from the Marine Sponge Halichondria cylindrata I.* Journal of natural products, 1996. **59**(2): p. 163-166.
352. Kourany-Lefoll, E., et al., *Phloeodictines A1-A7 and C1-C2, antibiotic and cytotoxic guanidine alkaloids from the new caledonian sponge, Phloeodictyon sp.* Tetrahedron, 1994. **50**(11): p. 3415-3426.
353. Tran, T.D., et al., *Cytotoxic cyclic depsipeptides from the Australian marine sponge Neamphius huxleyi.* Journal of natural products, 2012. **75**(12): p. 2200-2208.

354. Towle, K.M., et al., *Synthesis and biological studies of neopetrosiamides as inhibitors of cancer cell invasion*. Organic & biomolecular chemistry, 2013. **11**(9): p. 1476-1481.
355. Williams, D.E., et al., *Neopetrosiamides, peptides from the marine sponge Neopetrosia sp. that inhibit amoeboid invasion by human tumor cells*. Organic letters, 2005. **7**(19): p. 4173-4176.
356. D'Auria, M.V., et al., *Callipeltins B and C; bioactive peptides from a marine Lithistida sponge Callipelta sp.* Tetrahedron, 1996. **52**(28): p. 9589-9596.
357. Zampella, A., et al., *Callipeltoside A: a cytotoxic aminodeoxy sugar-containing macrolide of a new type from the marine Lithistida sponge Callipelta sp.* Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(45): p. 11085-11088.
358. Sepe, V., et al., *Callipeltins F-I: new antifungal peptides from the marine sponge Latrunculia sp.* Tetrahedron, 2006. **62**(5): p. 833-840.
359. Tsukamoto, S., et al., *Narains: N, N-dimethylguanidinium styryl sulfates, metamorphosis inducers of ascidian larvae from a marine sponge Jaspis sp.* Tetrahedron letters, 1994. **35**(32): p. 5873-5874.
360. Cafieri, F., et al., *Dispacamides, anti-histamine alkaloids from Caribbean Agelas sponges*. Tetrahedron letters, 1996. **37**(20): p. 3587-3590.
361. Nienaber, V.L. and E.C. Amparo, *A noncleavable retro-binding peptide that spans the substrate binding cleft of serine proteases. Atomic structure of nazumamide A: human thrombin*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(29): p. 6807-6810.
362. Nakao, Y., S. Matsunaga, and N. Fusetani, *Three more cyclotheonamides, C, D, and E, potent thrombin inhibitors from the marine sponge Theonella swinhoei*. Bioorganic & medicinal chemistry, 1995. **3**(8): p. 1115-1122.
363. Nakao, Y., et al., *Cyclotheonamides E2 and E3, New Potent Serine Protease Inhibitors from the Marine Sponge of the Genus Theonella 1*. Journal of natural products, 1998. **61**(5): p. 667-670.
364. Murakami, Y., et al., *Cyclotheonamide E4 and E5, new potent tryptase inhibitors from an Ircinia species of sponge*. Journal of natural products, 2002. **65**(3): p. 259-261.
365. Nakao, Y., et al., *Pseudotheonamides, serine protease inhibitors from the marine sponge Theonella swinhoei*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(11): p. 2425-2431.

366. Bonnington, L.S., et al., *Cupolamide A: A cytotoxic cyclic heptapeptide from two samples of the sponge Theonella cupola*. The Journal of Organic Chemistry, 1997. **62**(22): p. 7765-7767.
367. Fusetani, N., et al., *Tokaramide A, a new cathepsin B inhibitor from the marine sponge Theonella aff. mirabilis*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 1999. **9**(24): p. 3397-3402.
368. Nakao, Y., et al., *Miraziridine A, a novel cysteine protease inhibitor from the marine sponge Theonella aff. mirabilis*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(42): p. 10462-10463.
369. Mourabit, A.A., et al., *Pyraxinine, a novel nitrogenous compound from the marine sponge Cymbastela cantharella*. Journal of natural products, 1997. **60**(3): p. 290-291.
370. Rashid, M.A., et al., *Microspinosamide, a New HIV-Inhibitory Cyclic Depsipeptide from the Marine Sponge Sidonops m icrospinososa I*. Journal of natural products, 2001. **64**(1): p. 117-121.
371. Oku, N., et al., *Neamphamide A, a new HIV-inhibitory depsipeptide from the Papua New Guinea marine sponge Neamphius huxleyi*. Journal of natural products, 2004. **67**(8): p. 1407-1411.
372. Feng, Y., et al., *Polydiscamides B– D from a Marine Sponge Ircinia sp. as Potent Human Sensory Neuron-Specific G Protein Coupled Receptor Agonists*. Journal of natural products, 2007. **71**(1): p. 8-11.
373. Lee, D., et al., *Inhibition of Candida albicans isocitrate lyase activity by sesterterpene sulfates from the tropical sponge Dysidea sp.* Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2008. **18**(20): p. 5377-5380.
374. Takahashi, Y., et al., *Nakijiquinones G–I, new sesquiterpenoid quinones from marine sponge*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2008. **16**(16): p. 7561-7564.
375. Hu, Y., et al., *Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012*. Marine drugs, 2015. **13**(1): p. 202-221.
376. Carbone, M., et al., *Structure and cytotoxicity of phidianidines A and B: first finding of 1, 2, 4-oxadiazole system in a marine natural product*. Organic letters, 2011. **13**(10): p. 2516-2519.
377. Milanowski, D.J., et al., *Gymnangiamide, a Cytotoxic Pentapeptide from the Marine Hydroid Gymnangium r egae*. The Journal of organic chemistry, 2004. **69**(9): p. 3036-3042.

378. Li, J.L., et al., *Anti-inflammatory amino acid derivatives from the ascidian Herdmania momus*. Journal of natural products, 2011. **74**(8): p. 1792-1797.
379. Tapiolas, D.M., et al., *Eusynstyelamides A, B, and C, nNOS Inhibitors, from the Ascidian Eusynstyela latericius*. Journal of natural products, 2009. **72**(6): p. 1115-1120.
380. S Ebada, S. and P. Proksch, *Chemical and pharmacological significance of natural guanidines from marine invertebrates*. Mini reviews in medicinal chemistry, 2011. **11**(3): p. 225-246.
381. Sfecci, E., et al., *Polycyclic Guanidine Alkaloids from Poecilosclerida Marine Sponges*. Marine drugs, 2016. **14**(4): p. 77.
382. Cunin, R., et al., *Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria*. Microbiological reviews, 1986. **50**(3): p. 314.
383. Snider, B.B. and Z. Shi, *Biomimetic synthesis of the bicyclic guanidine moieties of crambines A and B*. The Journal of Organic Chemistry, 1992. **57**(9): p. 2526-2528.
384. Fabricant, D.S., et al., *Cimipronidine, a Cyclic Guanidine Alkaloid from Cimicifuga racemosa*. Journal of natural products, 2005. **68**(8): p. 1266-1270.
385. Nagasawa, K. and Y. Hashimoto, *Synthesis of marine guanidine alkaloids and their application as chemical/biological tools*. The Chemical Record, 2003. **3**(4): p. 201-211.
386. Heys, L., C.G. Moore, and P.J. Murphy, *The guanidine metabolites of Ptilocaulis spiculifer and related compounds; isolation and synthesis*. Chemical Society Reviews, 2000. **29**(1): p. 57-67.
387. Coffey, D.S., et al., *A practical entry to the crambescidin family of guanidine alkaloids. Enantioselective total syntheses of ptilomycalin A, crambescidin 657 and its methyl ester (neofolitispatas 2), and crambescidin 800*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(20): p. 4893-4903.
388. Poullennec, K.G. and D. Romo, *Enantioselective total synthesis of (+)-dibromophakellstatin*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(21): p. 6344-6345.
389. Seiple, I.B., et al., *Enantioselective Total Syntheses of (-)-Palau'amine, (-)-Axinellamines, and (-)-Massadines*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(37): p. 14710-14726.
390. Sivappa, R., et al., *Studies toward the total synthesis of axinellamine and massadine*. Organic letters, 2007. **9**(20): p. 3861-3864.

391. Su, S., et al., *Total syntheses of (±)-massadine and massadine chloride*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(49): p. 16490-16491.
392. Kodama, M., T. Ogata, and S. Sato, *Bacterial production of saxitoxin*. Agricultural and biological chemistry, 1988. **52**(4): p. 1075-1077.
393. Fuhrman, F.A., *Tetrodotoxin, tarichatoxin, and chiriquitoxin: historical perspectives*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1986. **479**(1): p. 1-14.
394. Matsumura, K., *Reexamination of tetrodotoxin production by bacteria*. Applied and environmental microbiology, 1995. **61**(9): p. 3468-3470.
395. Yasumoto, T., et al., *Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin*. Agricultural and Biological Chemistry, 1986. **50**(3): p. 793-795.
396. Noguch, T. and O. Arakawa, *Tetrodotoxin—distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication*. Marine drugs, 2008. **6**(2): p. 220-242.
397. Laville, R.m., et al., *Bioactive guanidine alkaloids from two Caribbean marine sponges*. Journal of natural products, 2009. **72**(9): p. 1589-1594.
398. Berlinck, R.G.d.S., et al., *Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge Crambe crambe and Ca++ channel blocker activity of crambescidin 816*. Journal of natural products, 1993. **56**(7): p. 1007-1015.
399. Jares-Erijman, E.A., R. Sakai, and K.L. Rinehart, *Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge Crambe crambe*. The Journal of Organic Chemistry, 1991. **56**(19): p. 5712-5715.
400. Jares-Erijman, E.A., et al., *Polycyclic guanidine-containing compounds from the Mediterranean sponge Crambe crambe: the structure of 13, 14, 15-isocrambescidin 800 and the absolute stereochemistry of the pentacyclic guanidine moieties of the crambescidins*. The Journal of Organic Chemistry, 1993. **58**(18): p. 4805-4808.
401. Tavares, R., et al., *8b-Hydroxyptilocaulin, a new guanidine alkaloid from the sponge Monanchora arbuscula*. Journal of natural products, 1995. **58**(7): p. 1139-1142.
402. Tavares, R., et al., *Isolation of crambescidin 800 from Monanchora arbuscula (Porifera)*. Biochemical systematics and ecology, 1994. **22**(6): p. 645-646.
403. Braekman, J.C., et al., *Novel polycyclic guanidine alkaloids from two marine sponges of the genus Monanchora*. Journal of natural products, 2000. **63**(2): p. 193-196.

404. Palagiano, E., et al., *Ptilomycalin A, crambescidin 800 and related new highly cytotoxic guanidine alkaloids from the starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffernani**. Tetrahedron, 1995. **51**(12): p. 3675-3682.
405. Kashman, Y., et al., *Ptilomycalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(24): p. 8925-8926.
406. Chang, L., N.F. Whittaker, and C.A. Bewley, *Crambescidin 826 and dehydrocrambine A: new polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp. that inhibit HIV-1 fusion*. Journal of natural products, 2003. **66**(11): p. 1490-1494.
407. Venkateswarlu, Y., et al., *Neofolitispates, pentacyclic guanidine alkaloids from the sponge *Neofolitispa dianchora**. 1999.
408. Meragelman, K.M., T.C. McKee, and J.B. McMahon, *Monanchorin, a Bicyclic Alkaloid from the Sponge *Monanchora unguiculata**. Journal of natural products, 2004. **67**(7): p. 1165-1167.
409. Gallimore, W.A., M. Kelly, and P.J. Scheuer, *Alkaloids from the Sponge *Monanchora unguifera**. Journal of natural products, 2005. **68**(9): p. 1420-1423.
410. Bensemhoun, J., et al., *Ptilomycalin D, a polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora dianchora**. Journal of natural products, 2007. **70**(12): p. 2033-2035.
411. Guzii, A.G., et al., *Monanchocidin: A new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra**. Organic letters, 2010. **12**(19): p. 4292-4295.
412. Makarieva, T.N., et al., *Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra**. Tetrahedron Letters, 2012. **53**(32): p. 4228-4231.
413. Makarieva, T.N., et al., *Monanchocidins B–E: polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge *Monanchora pulchra**. Journal of natural products, 2011. **74**(9): p. 1952-1958.
414. Tabakmakher, K.M., et al., *Monanchomycalin C, a new pentacyclic guanidine alkaloid from the far-eastern marine sponge *Monanchora pulchra**. Natural product communications, 2013. **8**(10): p. 1399-1402.
415. Berlinck, R.G.d.S., et al., *Two new guanidine alkaloids from the mediterranean sponge *crambe crambe**. Tetrahedron letters, 1990. **31**(45): p. 6531-6534.
416. Berlinck, R.G.d.S., et al., *Crambines C1 and C2: two further ichthyotoxic guanidine alkaloids from the sponge *Crambe crambe**. Journal of natural Products, 1992. **55**(4): p. 528-532.

417. Jares-Erijman, E.A., et al., *On the structures of crambescins B and C1*. Journal of natural products, 1993. **56**(12): p. 2186-2188.
418. Patil, A.D., et al., *Batzelladines F– I, Novel Alkaloids from the Sponge Batzella sp.: inducers of p56lck-CD4 Dissociation*. The Journal of Organic Chemistry, 1997. **62**(6): p. 1814-1819.
419. Patil, A.D., et al., *Novel alkaloids from the sponge Batzella sp.: inhibitors of HIV gp120-human CD4 binding*. The Journal of Organic Chemistry, 1995. **60**(5): p. 1182-1188.
420. Snider, B.B. and M.V. Busuyek, *Revision of the stereochemistry of batzelladine F. Approaches to the tricyclic hydroxyguanidine moiety of batzelladines G, H, and I*. Journal of natural products, 1999. **62**(12): p. 1707-1711.
421. Harbour, G.C., et al., *Ptilocaulin and isoptilocaulin, antimicrobial and cytotoxic cyclic guanidines from the Caribbean sponge Ptilocaulis aff. P. spiculifer (Lamarck, 1814)*. Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(18): p. 5604-5606.
422. Sakemi, S., et al., *Batzellines A, B, and C. Novel pyrroloquinoline alkaloids from the sponge Batzella Sp.* Tetrahedron Letters, 1989. **30**(19): p. 2517-2520.
423. Sun, H.H., et al., *Isobatzellines A, B, C, and D. Cytotoxic and antifungal pyrroloquinoline alkaloids from the marine sponge Batzella sp.* The Journal of Organic Chemistry, 1990. **55**(16): p. 4964-4966.
424. Gunasekera, S.P., et al., *Secobatzellines A and B, two new enzyme inhibitors from a deep-water Caribbean sponge of the genus Batzella*. Journal of natural products, 1999. **62**(8): p. 1208-1211.
425. Takishima, S., et al., *Merobatzelladines A and B, anti-infective tricyclic guanidines from a marine sponge Monanchora sp.* Organic letters, 2009. **11**(12): p. 2655-2658.
426. Santos, M.F., et al., *Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge Monanchora arbuscula*. Journal of natural products, 2015. **78**(5): p. 1101-1112.
427. Kornprobst, J.M., *Encyclopedia of Marine Natural Products*. 2014: Wiley.
428. Bondu, S., et al., *Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge Crambe crambe*. Rsc Advances, 2012. **2**(7): p. 2828-2835.
429. El-Demerdash, A., et al., *Cytotoxic Guanidine Alkaloids from a French Polynesian Monanchora n. sp. Sponge*. Journal of natural products, 2016. **79**(8): p. 1929-1937.

430. Becerro, M., M. Uriz, and X. Turon, *Trends in space occupation by the encrusting sponge *Crambe crambe*: variation in shape as a function of size and environment*. Marine Biology, 1994. **121**(2): p. 301-307.
431. Burkholder, P.R. and K. Ruetzler, *Antimicrobial activity of some marine sponges*. Nature, 1969. **222**(5197): p. 983-984.
432. Amade, P., et al., *Antimicrobial activities of marine sponges from the Mediterranean Sea*. Marine biology, 1987. **94**(2): p. 271-275.
433. Uriz, M., D. Martin, and D. Rosell, *Relationships of biological and taxonomic characteristics to chemically mediated bioactivity in Mediterranean littoral sponges*. Marine Biology, 1992. **113**(2): p. 287-297.
434. Martin, D. and M. Uriz, *Chemical bioactivity of Mediterranean benthic organisms against embryos and larvae of marine invertebrates*. Journal of experimental marine biology and ecology, 1993. **173**(1): p. 11-27.
435. Becerro, M.A., et al., *Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1994. **179**(2): p. 195-205.
436. Uriz, M., et al., *Feeding deterrence in sponges. The role of toxicity, physical defenses, energetic contents, and life-history stage*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1996. **205**(1): p. 187-204.
437. Uriz, M.J., et al., *Patterns of resource allocation to somatic, defensive, and reproductive functions in the Mediterranean encrusting sponge *Crambe crambe* (Demospongiae, Poecilosclerida)*. Marine Ecology Progress Series, 1995: p. 159-170.
438. Turon, X., M.A. Becerro, and M.J. Uriz, *Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates: the encrusting sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida)*. Oikos, 1996: p. 33-40.
439. Becerro, M., M. Uriz, and X. Turon, *Measuring toxicity in marine environments: critical appraisal of three commonly used methods*. Experientia, 1995. **51**(4): p. 414-418.
440. Becerro, M.A., X. Turon, and M.J. Uriz, *Natural variation of toxicity in encrusting sponge *Crambe crambe* (Schmidt) in relation to size and environment*. Journal of Chemical Ecology, 1995. **21**(12): p. 1931-1946.
441. Uriz, M., et al., *Location of toxicity within the Mediterranean sponge *Crambe crambe* (Demospongiae: Poecilosclerida)*. Marine Biology, 1996. **124**(4): p. 583-590.
442. Turon, X., et al., *Small-scale association measures in epibenthic communities as a clue for allelochemical interactions*. Oecologia, 1996. **108**(2): p. 351-360.

443. Becerro, M.A., M.J. Uriz, and X. Turon, *Chemically-mediated interactions in benthic organisms: the chemical ecology of Crambe crambe (Porifera, Poecilosclerida)*, in *Interactions and Adaptation Strategies of Marine Organisms*. 1997, Springer. p. 77-89.
444. Van Soest, R.W., et al., *The genus Batzella: a chemosystematic problem*. Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Biologie, 1996. **66**: p. 89-101.
445. Vacelet, J. and C. Donadey, *Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria*. Journal of experimental marine Biology and Ecology, 1977. **30**(3): p. 301-314.
446. Hentschel, U., et al., *Microbial diversity of marine sponges*, in *Sponges (Porifera)*. 2003, Springer. p. 59-88.
447. Hentschel, U., K.M. Usher, and M.W. Taylor, *Marine sponges as microbial fermenters*. FEMS microbiology ecology, 2006. **55**(2): p. 167-177.
448. Schmitt, S., et al., *Assessing the complex sponge microbiota: core, variable and species-specific bacterial communities in marine sponges*. The ISME Journal, 2012. **6**(3): p. 564.
449. Simister, R.L., et al., *Sponge-specific clusters revisited: a comprehensive phylogeny of sponge-associated microorganisms*. Environmental microbiology, 2012. **14**(2): p. 517-524.
450. Reiswig, H.M., *Partial carbon and energy budgets of the bacteriosponge Verohgia fistularis (Porifera: Demospongiae) in Barbados*. Marine Ecology, 1981. **2**(4): p. 273-293.
451. Kamke, J., M.W. Taylor, and S. Schmitt, *Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons*. The ISME Journal, 2010. **4**(4): p. 498.
452. Giles, E.C., et al., *Bacterial community profiles in low microbial abundance sponges*. FEMS Microbiology Ecology, 2012. **83**(1): p. 232-241.
453. Simister, R., et al., *Temporal molecular and isotopic analysis of active bacterial communities in two New Zealand sponges*. FEMS microbiology ecology, 2013. **85**(1): p. 195-205.
454. Sarà, M., *Associazioni fra Poriferi e alghe in acque superficiali del litorale marino*. Ricerca scient, 1966. **36**: p. 277-282.
455. Croué, J., et al., *A single betaproteobacterium dominates the microbial community of the crambescidine-containing sponge Crambe crambe*. Scientific reports, 2013. **3**: p. 2583.

456. Schmitt, S., et al., *Molecular microbial diversity survey of sponge reproductive stages and mechanistic insights into vertical transmission of microbial symbionts*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(24): p. 7694-7708.
457. Selvin, J., et al., *Sponge-microbial interactions: Ecological implications and bioprospecting avenues*. Critical reviews in microbiology, 2010. **36**(1): p. 82-90.
458. Fan, L., et al., *Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(27): p. E1878-E1887.
459. Snider, B.B. and Z. Shi, *Biomimetic synthesis of the central tricyclic portion of ptilomycalin A*. Tetrahedron letters, 1993. **34**(13): p. 2099-2102.
460. Snider, B.B. and Z. Shi, *Biomimetic synthesis of the pentacyclic nucleus of ptilomycalin A*. Journal of the American Chemical Society, 1994. **116**(2): p. 549-557.
461. Aron, Z.D. and L.E. Overman, *Total synthesis and properties of the crambescidin core zwitterionic acid and crambescidin 359*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(10): p. 3380-3390.
462. Moore, C.G., et al., *Synthetic studies towards ptilomycalin A: total synthesis of crambescidin 359*. Tetrahedron, 2007. **63**(47): p. 11771-11780.
463. Snider, B.B. and Z. Shi, *Biomimetic synthesis of (.+-.)-crambines A, B, C1, and C2. Revision of the structure of crambines B and C1*. The Journal of Organic Chemistry, 1993. **58**(15): p. 3828-3839.
464. Overman, L.E. and Y.H. Rhee, *Total synthesis of (-)-crambidine and definition of the relative configuration of its unique tetracyclic guanidinium core*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(44): p. 15652-15658.
465. Coffey, D.S., et al., *Enantioselective total synthesis of 13, 14, 15-isocrambescidin 800*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(29): p. 6944-6945.
466. Aron, Z.D., et al., *Synthesis and anticancer activity of side chain analogs of the crambescidin alkaloids*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2004. **14**(13): p. 3445-3449.
467. Sun, X., et al., *A potent antimicrobial compound isolated from Clathria cervicornis*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2015. **25**(1): p. 67-69.

468. Olszewski, A., et al., *Guanidine alkaloid analogs as inhibitors of HIV-1 Nef interactions with p53, actin, and p56lck*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(39): p. 14079-14084.
469. Rubiolo, J.A., et al., *Crambescidin-816 acts as a fungicidal with more potency than crambescidin-800 and-830, inducing cell cycle arrest, increased cell size and apoptosis in Saccharomyces cerevisiae*. Marine drugs, 2013. **11**(11): p. 4419-4434.
470. Lazaro, J.E.H., et al., *Antimalarial activity of crambescidin 800 and synthetic analogues against liver and blood stage of Plasmodium sp.* Journal of Antibiotics, 2006. **59**(9): p. 583-590.
471. Dalisay, D.S., J.P. Saludes, and T.F. Molinski, *Ptilomycalin A inhibits laccase and melanization in Cryptococcus neoformans*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2011. **19**(22): p. 6654-6657.
472. Gassner, N.C., et al., *Accelerating the Discovery of Biologically Active Small Molecules Using a High-Throughput Yeast Halo Assay^L*. Journal of natural products, 2007. **70**(3): p. 383-390.
473. Hua, H.-M., et al., *Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge Monanchora unguifera and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens*. Tetrahedron, 2007. **63**(45): p. 11179-11188.
474. Suna, H., et al., *Crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid, protects a mouse hippocampal cell line against glutamate-induced oxidative stress*. Journal of Natural Medicines, 2007. **61**(3): p. 288-295.
475. AOKI, S., et al., *Erythroid differentiation in K562 chronic myelogenous cells induced by crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid*. Anticancer research, 2004. **24**(4): p. 2325-2330.
476. Martín, V., et al., *Differential effects of crambescins and crambescidin 816 in voltage-gated sodium, potassium and calcium channels in neurons*. Chemical research in toxicology, 2013. **26**(1): p. 169-178.
477. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
478. DeVita, V.T. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. Cancer research, 2008. **68**(21): p. 8643-8653.
479. Galmarini, D., C.M. Galmarini, and F.C. Galmarini, *Cancer chemotherapy: a critical analysis of its 60 years of history*. Critical reviews in oncology/hematology, 2012. **84**(2): p. 181-199.

480. Simmons, T.L., et al., *Marine natural products as anticancer drugs*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2005. **4**(2): p. 333-342.
481. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current "state of play"*. *Planta medica*, 2016. **82**(09/10): p. 775-789.
482. Nobili, S., et al., *Natural compounds for cancer treatment and prevention*. *Pharmacological research*, 2009. **59**(6): p. 365-378.
483. Meredith, J., B. Fazeli, and M. Schwartz, *The extracellular matrix as a cell survival factor*. *Molecular biology of the cell*, 1993. **4**(9): p. 953-961.
484. Jockusch, B.M., et al., *The molecular architecture of focal adhesions*. *Annual review of cell and developmental biology*, 1995. **11**(1): p. 379-416.
485. Schneeberger, E.E. and R.D. Lynch, *The tight junction: a multifunctional complex*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2004. **286**(6): p. C1213-C1228.
486. Weber, G.F., M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone, *Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks*. *J Cell Sci*, 2011. **124**(8): p. 1183-1193.
487. McGill, G., et al., *Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts*. *The Journal of cell biology*, 1997. **138**(4): p. 901-911.
488. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. *The Journal of cell biology*, 1994. **124**(4): p. 619-626.
489. Deschesnes, R.G., et al., *Microtubule-destabilizing agents induce focal adhesion structure disorganization and anoikis in cancer cells*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007. **320**(2): p. 853-864.
490. Stehbens, S.J., et al., *Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts*. *Journal of cell science*, 2006. **119**(9): p. 1801-1811.
491. Waterman-Storer, C.M., W.C. Salmon, and E. Salmon, *Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells*. *Molecular biology of the cell*, 2000. **11**(7): p. 2471-2483.
492. Peng, X., et al., *New insights into vinculin function and regulation*. *International review of cell and molecular biology*, 2011. **287**: p. 191.
493. Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen, *Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(8): p. 1855-1864.

494. Demir, A., et al., *Menstrual effluent induces epithelial–mesenchymal transitions in mesothelial cells*. Human Reproduction, 2004. **19**(1): p. 21-29.
495. Haynes, J., et al., *Dynamic actin remodeling during epithelial–mesenchymal transition depends on increased moesin expression*. Molecular biology of the cell, 2011. **22**(24): p. 4750-4764.
496. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer and Metastasis Reviews, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
497. Cramer, L.P., M. Siebert, and T.J. Mitchison, *Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force*. The Journal of cell biology, 1997. **136**(6): p. 1287-1305.
498. Hotulainen, P. and P. Lappalainen, *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*. The Journal of cell biology, 2006. **173**(3): p. 383-394.
499. Matsushime, H., et al., *Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins*. Cell, 1992. **71**(2): p. 323-334.
500. Xiong, Y., H. Zhang, and D. Beach, *D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA*. Cell, 1992. **71**(3): p. 505-514.
501. Dulic, V., E. Lees, and S.I. Reed, *Association of Human Cyclin E with a Periodic G₁-S Phase Protein Kinase*. SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-, 1992: p. 1958-1958.
502. Koff, A., et al., *Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G₁ phase of the human cell cycle*. Science, 1992. **257**(5077): p. 1689-1695.
503. Bates, S., et al., *CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1*. Oncogene, 1994. **9**(1): p. 71-79.
504. Meyerson, M. and E. Harlow, *Identification of G₁ kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner*. Molecular and cellular biology, 1994. **14**(3): p. 2077-2086.
505. Pagano, M., et al., *Cyclin A is required at two points in the human cell cycle*. The EMBO journal, 1992. **11**(3): p. 961.
506. Zhu, X., et al., *Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein*. The Journal of cell biology, 1996. **133**(2): p. 391-403.

507. Ezratty, E.J., M.A. Partridge, and G.G. Gundersen, *Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase*. Nature cell biology, 2005. **7**(6): p. 581-590.
508. Stracke, M.L., et al., *Cytoskeletal agents inhibit motility and adherence of human tumor cells*. Kidney international, 1993. **43**(1): p. 151-157.
509. Flusberg, D.A., Y. Numaguchi, and D.E. Ingber, *Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells*. Molecular biology of the cell, 2001. **12**(10): p. 3087-3094.
510. Dahlgren, C., B. Norberg, and S. Eriksson, *The Adherence of Polymorphonuclear Leucocytes to an Albumin-coated Glass Surface*. Journal of Internal Medicine, 1987. **221**(1): p. 109-113.
511. Ilić, D., et al., *Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis*. The Journal of cell biology, 1998. **143**(2): p. 547-560.
512. Vitale, M., et al., *Apoptosis induced by denied adhesion to extracellular matrix (anoikis) in thyroid epithelial cells is p53 dependent but fails to correlate with modulation of p53 expression*. FEBS letters, 1999. **462**(1-2): p. 57-60.
513. Nikiforov, M.A., et al., *p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis*. Oncogene, 1996. **13**(8): p. 1709-1719.
514. Nikiforov, M.A., et al., *Suppression of apoptosis by bcl-2 does not prevent p 53-mediated control of experimental metastasis and anchorage dependence*. Oncogene, 1997. **15**(25): p. 3007-3012.
515. Strömblad, S., et al., *Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(2): p. 426.
516. Harper, J.W., et al., *The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases*. cell, 1993. **75**(4): p. 805-816.
517. Aoki, S., et al., *Aaptamine, a spongean alkaloid, activates p21 promoter in a p53-independent manner*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **342**(1): p. 101-106.
518. Bos, J.L., *Ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer research, 1989. **49**(17): p. 4682-4689.

519. Benvenuti, S., et al., *Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies*. *Cancer research*, 2007. **67**(6): p. 2643-2648.
520. Kägi, J., et al., *Synthesis and function of metallothioneins*. *Nature*, 1981. **292**: p. 495-496.
521. Nath, R., et al., *Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins*. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1988. **27**(1): p. 41-85.
522. Palmiter, R.D., *The elusive function of metallothioneins*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(15): p. 8428-8430.
523. Palmiter, R.D., et al., *MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. **89**(14): p. 6333-6337.
524. Quaife, C.J., et al., *Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia*. *Biochemistry*, 1994. **33**(23): p. 7250-7259.
525. Haq, F., M. Mahoney, and J. Koropatnick, *Signaling events for metallothionein induction*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003. **533**(1): p. 211-226.
526. Sadhu, C. and L. Gedamu, *Regulation of human metallothionein (MT) genes. Differential expression of MTI-F, MTI-G, and MTII-A genes in the hepatoblastoma cell line (HepG2)*. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. **263**(6): p. 2679-2684.
527. Sadhu, C. and L. Gedamu, *Metal-specific posttranscriptional control of human metallothionein genes*. *Molecular and cellular biology*, 1989. **9**(12): p. 5738-5741.
528. Jahroudi, N., et al., *Cell-type specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. **265**(11): p. 6506-6511.
529. Bauman, J., et al., *Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress*. *Toxicology and applied pharmacology*, 1991. **110**(2): p. 347-354.
530. Bauman, J.W., et al., *Induction of hepatic metallothionein by paraquat*. *Toxicology and applied pharmacology*, 1992. **117**(2): p. 233-241.
531. Schwarz, M.A., et al., *Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. **92**(10): p. 4452-4456.

532. Yamasaki, M., et al., *Metallothionein is up-regulated under hypoxia and promotes the survival of human prostate cancer cells*. *Oncology reports*, 2007. **18**(5): p. 1145-1153.
533. Maret, W. and B.L. Vallee, *Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(7): p. 3478-3482.
534. Janssen, Y., et al., *Cell and tissue responses to oxidative damage*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1993. **69**(3): p. 261-274.
535. Cai, L., J.B. Klein, and Y.J. Kang, *Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(50): p. 38957-38960.
536. Kumari, M.R., M. Hiramatsu, and M. Ebadi, *Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II*. *Free radical research*, 1998. **29**(2): p. 93-101.
537. Robbins, A. and C. Stout, *[58] X-ray structure of metallothionein*. *Methods in enzymology*, 1991. **205**: p. 485-502.
538. Otvos, J.D. and I.M. Armitage, *Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980. **77**(12): p. 7094-7098.
539. Viña, J., G. Sáez, and J. Viña, *The physiological functions of glutathione*. *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, 1989. **2**: p. 121-132.
540. Sies, H., *Glutathione and its role in cellular functions*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. **27**(9): p. 916-921.
541. Chan, H.M. and M.G. Cherian, *Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium*. *Toxicology*, 1992. **72**(3): p. 281-290.
542. Haïdara, K., P. Moffatt, and F. Denizeau, *Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes*. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 1999. **49**(2): p. 297-305.
543. Andrews, G.K., *Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions*. *Biochemical pharmacology*, 2000. **59**(1): p. 95-104.
544. Samson, S.L.-A. and L. Gedamu, *Molecular analyses of metallothionein gene regulation*. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 1997. **59**: p. 257-288.
545. Ala, A., et al., *Wilson's disease*. *The Lancet*, 2007. **369**(9559): p. 397-408.

546. Ferenci, P., et al., *Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease*. Liver International, 2003. **23**(3): p. 139-142.
547. Roberts, E.A. and M.L. Schilsky, *Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update*. Hepatology, 2008. **47**(6): p. 2089-2111.
548. Cherian, M.G., *The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein in human liver and tumor cells*. Environmental health perspectives, 1994. **102**(Suppl 3): p. 131.
549. Cherian, M. and M.D. Apostolova, *Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation*. Cell Mol Biol, 2000. **46**(2): p. 347-356.
550. Yukihiisa, T., O. Yasumitsu, and I. Kenji, *Role of metallothionein in the cell cycle: Protection against the retardation of cell proliferation by endogenous reactive oxygen species*. Journal of health science, 2004. **50**(2): p. 154-158.
551. Ogra, Y., et al., *Enhancement of nuclear localization of metallothionein by nitric oxide*. Journal of health science, 2008. **54**(3): p. 339-342.
552. Woo, E.S. and J.S. Lazo, *Nucleocytoplasmic functionality of metallothionein*. Cancer research, 1997. **57**(19): p. 4236-4241.