



**FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN CIENCIAS DEL MAR
TRABAJO FIN DE GRADO
CURSO ACADÉMICO 2015-2016**

**Trabectedina (Yondelis): un agente antitumoral
aislado de la ascidia *Ecteinascidia turbinata***

ISABEL GONZÁLEZ-GALLEGO RIVERA

RESUMEN

El medio marino ha demostrado tener un gran potencial para ser una de las principales fuentes en el descubrimiento de nuevos fármacos contra el cáncer. Trabectedina es un alcaloide tetrahidroisoquinolínico aislado del tunicado *Ecteinascia turbinata*, una ascidia colonial caribeña. Yondelis® (trabectedina) de Pharmamar fue el primer fármaco anticancerígeno marino en incorporarse al mercado aprobado por la Unión Europea para el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovario recurrente. A pesar de su temprano descubrimiento, su reconocimiento tardó casi dos décadas debido al problema del suministro, por lo que fueron necesarias estrategias como la acuicultura farmacéutica o la síntesis química del compuesto activo. En 1996 se completó una síntesis total de la molécula cuya estrategia era la desconexión biomimética de cuatro subunidades de aminoácidos pero la cantidad obtenida no fue suficiente para llevar a cabo el desarrollo clínico. En un principio, la acuicultura sirvió para solucionar el problema del suministro en el desarrollo clínico pero seguía siendo inviable para la producción industrial. Afortunadamente, unos años más tarde, se hizo posible la obtención de trabectedina a escala multigramos a través de un proceso de semisíntesis que permitió la fabricación industrial. Esta semisíntesis fue desarrollada por la empresa Pharmamar y se consiguió a partir de cianosafracina B, un antibiótico obtenido mediante fermentación de *Pseudomonas fluorescens* y que conseguía sintetizar la trabectedina tras 21 etapas con un rendimiento global de algo más del 1%. En cuanto a su mecanismo de acción, trabectedina es un agente antitumoral que se une al surco menor del ADN afectando a la actividad del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER). Su efectividad depende de la recombinación homóloga (HR) aunque también puede modificar el microambiente tumoral. Los ensayos preclínicos y clínicos revelaron que es efectivo contra una gran variedad de células tumorales pero los sarcomas de tejidos blandos (STS) eran más sensibles a la trabectedina que otros tumores sólidos. Estos ensayos también mostraron resultados positivos contra el cáncer de ovario recurrente combinado con doxorubicina liposomal pegilada (DLP). Actualmente Yondelis® está aprobado en casi 80 países para el tratamiento de STS y en 70 para el tratamiento de cáncer de ovario recurrente.

Palabras clave: ("fármaco", "anticancerígeno", "tetrahidroisoquinolinas", "síntesis biomimética", "acuicultura", "tunicado").

SUMMARY

The marine environment has shown great potential to be one of the main sources on the discovery of new drugs against cancer. Trabectedin is a tetrahydroisoquinolinic alkaloid isolated from *Ecteinascia turbinata*, a Caribbean colonial ascidian. Yondelis® (trabectedin) of Pharmamar was the first marine anti-cancer drug to enter in the market approved by the European Union for treatment of soft tissue sarcoma and recurrent ovarian cancer. Despite its early discovery, its recognition took nearly two decades due to supply problem, so strategies were needed as pharmaceutical aquaculture or chemical synthesis of the active compound. In 1997, a total synthesis of trabectedin was completed whose strategy was biomimetic disconnection of four subunits of amino acid but the amount obtained was not enough to perform clinical development. Initially, aquaculture was used to solve the supply problem in clinical development but was not viable for industrial production. Fortunately, a few years later, obtaining multigram scale of trabectedin was made possible through a semi-synthesis process that enabled industrial production. This semi-synthesis was developed by Pharmamar starting from cyanosafrafricine B, an antibiotic obtained by fermentation of *Pseudomonas fluorescens*. This process synthesized trabectedin in 21 steps with an overall yield of just over 1%. As to their mechanism of action, trabectedin is an antitumor agent that binds to the minor groove of DNA affecting the activity of nucleotide excision repair system (NER). Its effectiveness depends on homologous recombination (HR) but can also modify the tumor microenvironment. Preclinical and clinical trials revealed that it is effective against a variety of tumor cells but soft tissue sarcomas (STS) were more sensitive to trabectedin than other solid tumors. These trials also showed positive results against recurrent ovarian cancer in combination with pegylated liposomal doxorubicin (PLD). Yondelis® is currently approved in almost 80 countries for the treatment of STS and in 70 countries for the treatment of recurrent ovarian cancer.

Keywords: ("drug", "anticancer agent", "tetrahydroisoquinolines", "biomimetic synthesis", "aquafarming", "tunicate").

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. La importancia de los fármacos de origen natural	1
1.2. El mar como fuente de fármacos	2
1.3. Desarrollo de los fármacos de origen marino	4
1.4. Fármacos anticancerígenos procedentes del mar	5
1.5. Trabectedina (Yondelis®)	6
2. Aislamiento de trabectedina	7
2.1. Organismo fuente: <i>Ecteinascidia turbinata</i>	8
2.2. Determinación de la estructura	12
3. Ruta biosintética	14
4. Síntesis	18
4.1. Primera síntesis total (Corey, 1996)	18
4.1.1. Síntesis de la aminolactona 17	19
4.1.2. Síntesis del α-aminoaldehído 21	20
4.1.3. Acoplamiento de la aminolactona 17 y α-aminoaldehído 21	20
4.1.4. Síntesis de la trabectedina a partir del compuesto pentacíclico 24	21
4.2. Semisíntesis de trabectedina (escala multigramo)	23
4.3. Otras síntesis totales y formales de trabectedina	24
4.4. Comparación de las diferentes síntesis de trabectedina	28
5. Actividad farmacológica	30
5.1. Mecanismo de acción	31
5.2. Estudios preclínicos y clínicos	34
6. Situación actual del fármaco Yondelis®	37
7. Conclusiones	38
8. Bibliografía	39

1. Introducción

1.1. La importancia de los fármacos de origen natural

La naturaleza se podría definir como una fábrica de fármacos que desde épocas tempranas la humanidad ha utilizado como fuente de sustancias terapéuticas. Los productos naturales, sobre todo aquellos procedentes de plantas terrestres y de microbios, han sido y siguen siendo hoy en día una fuente importante para la investigación y creación de estos fármacos. Cabe destacar la morfina (Figura 1), procedente de las amapolas o penicilinas (Figura 1) procedentes de distintos hongos (Molinski *et al.*, 2009).

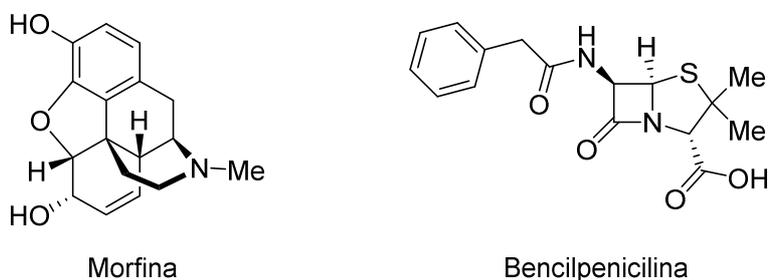


Figura 1

El avance científico a escala molecular y celular ha ido variando las estrategias para la obtención de nuevos fármacos hacia una búsqueda más competitiva. Entre estas estrategias cabe destacar la síntesis química, una técnica muy exitosa en esta última década debido al uso de la química combinatoria, que permite la generación de un gran número de compuestos en pocos pasos de reacción (Montaser and Luesch, 2011).

Sin embargo, no se han llegado a obtener muchas novedades en los últimos años en cuanto a nuevos mecanismos de acción, ya que la química combinatoria, por sí sola, no ha sido capaz de suplir la extraordinaria versatilidad estructural que ofrecen los compuestos naturales (Liu, 2012). Este hecho queda reflejado en una revisión publicada por David J. Newman y Gordon M. Cragg del Instituto del Cáncer estadounidense (NCI), donde se realizó un estudio de los fármacos aprobados para su comercialización en Estados Unidos durante los últimos 25 años. Los resultados de este análisis indican que un 42% de los productos introducidos en el mercado farmacéutico son de origen natural frente un 40% de productos puramente sintéticos y, en cuestión de nuevos fármacos antitumorales, durante el periodo 1940-2006, se obtuvo un resultado de un

57% de moléculas de origen natural frente a un 32% de origen sintético (Miguélez, 2010).

Otro dato a favor del desarrollo de los productos naturales como fármacos es el cambio en la búsqueda de las nuevas necesidades terapéuticas del siglo XXI. En un principio los productos naturales fueron la inspiración en la búsqueda de nuevos antibióticos, mientras que hoy en día son la base para luchar contra el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, obesidad, enfermedades coronarias y antivirales (de la Calle, 2007).

1.2. El mar como fuente de fármacos

El enorme e inexplorado mundo marino, con su gran biodiversidad, se encuentra repleto de organismos sujetos a sustratos rocosos cuyo principal mecanismo de defensa, ataque y señalización es la secreción de sustancias químicas, por lo cual, el medio marino podría ser el principal recurso para encontrar nuevos productos naturales con diversos mecanismos de acción (Simmons *et al.*, 2005).

Casi todos los productos terapéuticos actuales derivados de productos naturales son de origen terrestre. Sin embargo, la exploración de nuevas fuentes, tales como el medio marino, permitirá acceder a nuevas entidades químicas que manifiesten inusuales actividades biológicas. Un estudio comparativo realizado por Kong y sus colaboradores demostró que los productos naturales marinos son superiores a los productos naturales terrestres en términos de novedad química. El análisis compara las variedades estructurales de las moléculas que aparecen en el Diccionario de los Productos Naturales (DPN) con los que aparecen en el Diccionario de los Productos Naturales Marinos (DPNM). En él se muestra que aproximadamente el 71% de los compuestos moleculares en el DPNM son exclusivamente utilizados por organismos marinos. Además, los organismos marinos muestran una alta bioactividad en comparación con los organismos terrestres (Kong *et al.*, 2010). Por ejemplo, los estudios preclínicos sobre citotoxicidad llevados a cabo en el Instituto Nacional de Cáncer estadounidense indicaron que aproximadamente un 1% de las muestras marinas testadas mostraron potencial antitumoral frente al 0,1% de las muestras terrestres (Munro *et al.*, 1999).

El interés por los productos naturales marinos fue más tardío que en el caso de los terrestres, debido en parte a la necesidad de nuevos descubrimientos y avances en la tecnología, como es el buceo científico, necesario para poder adentrarse en este mundo marino y recolectar organismos (De la Calle, 2007). Otros avances en la tecnología, tales como nuevas estrategias de muestreo, la determinación de estructuras mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con cantidades mínimas de muestra, la síntesis química total, la fermentación y la biotecnología son cruciales para garantizar el éxito de los productos marinos naturales como fármacos (Montaser and Luesch, 2011). Aún así, a finales de la década de los 50 del pasado siglo, el concepto de medicamento procedente del mar atrajo el interés de diferentes investigadores.

A partir de 1951, Werner Bergman publicó tres artículos acerca de unos arabinó y ribo-pentósil nucleósidos (Bergmann and Stempien, 1957) obtenidos a partir de esponjas marinas recolectadas en Florida (USA). Los compuestos condujeron al desarrollo de los derivados ara-A (vidarabina) y ara-C (citarabina) (Figura 2), dos nucleósidos con propiedades anticancerígenas significativas que han estado en uso clínico durante décadas.

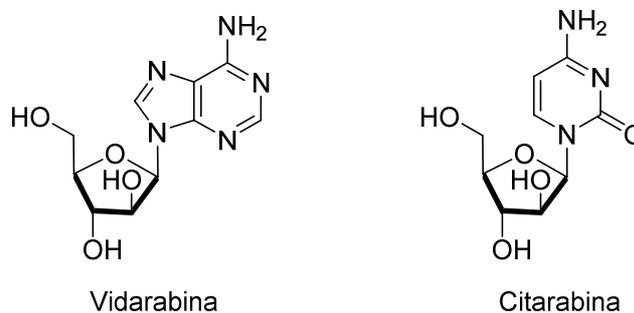


Figura 2

El rol de los productos naturales en los descubrimientos de medicamentos ha sufrido muchos cambios en los últimos años, con una disminución de la participación de las grandes compañías farmacéuticas a mediados de los 90. La investigación científica de productos naturales de origen marino dirigió sus esfuerzos al desarrollo de fármacos a partir de la década de 1970. El primer fármaco de origen marino fue ziconotida (MVIIA ω -conotoxina), un péptido extraído de un caracol de mar tropical y fue aprobado en EEUU en 2004 bajo el nombre comercial de Prilalt® para el tratamiento del dolor crónico en la lesión de médula espinal. En todos estos casos, la historia comienza con el descubrimiento de una nueva molécula procedente de un organismo marino y su progreso a través de ensayos preclínicos y clínicos, principalmente usando la estructura

sin modificar o usando un compuesto sintético siguiendo el modelo del producto natural (Moliniski *et al.*, 2009).

1.3. Desarrollo de los fármacos de origen marino

El cribado de productos naturales sigue siendo una de las vías más útiles para el descubrimiento de su bioactividad. En las últimas décadas, los estudios sobre los productos naturales marinos se han centrado principalmente en microorganismos, esponjas, corales y otros invertebrados marinos. Sin embargo, a pesar de la existencia de un gran número de nuevas entidades químicas aisladas, muchas de ellas con actividad biológica pronunciada, la mayor parte de ellas no supera los ensayos preclínicos y sólo unas pocas han sido comercializadas como productos farmacéuticos (Gerwick *et al.*, 2012). Por otro lado, la línea farmacéutica marina a escala mundial sigue siendo muy activa e incluye, por el momento, ocho fármacos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) o la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y varios compuestos en diferentes fases de la línea de producción clínica: fase III, fase II y fase I (Martins *et al.*, 2014).

Hasta la fecha, los ocho medicamentos marinos que han sido aprobados por la FDA o la EMA son cefalosporina C (Figura 3), citarabina (Ara-C), vidarabina (Ara-A), ziconitida (Prialt), ésteres etílicos ácido omega-3 (Lovaza), trabectedina (ET-743, Yondelis) (Figura 3), mesilato de eribulina (Halaven) (Figura 3), brentuximab vendotin (SGN-35) y un fármaco de venta libre perteneciente al término Over-The-Counter drugs (OTC, no es necesario prescripción médica), iota carragenano (Carragelose) (Figura 3). En 2012 existían 11 fármacos marinos en las diferentes fases de la línea de producción clínica, de los cuales, solamente uno de ellos se encontraba en fase III (Plitidepsin). Once de ellos permanecían en fase II y cuatro en fase III (Mayer, 2012). De los nueve compuestos que se encuentran actualmente en el mercado, sólo tres de ellos (Prialt®, Yondelis® y Carragelose®) se convirtieron en medicamentos sin presentar ninguna modificación de la molécula natural original, mientras que el resto sufrió alguna optimización en diferentes etapas de su desarrollo.

En 2004 los únicos medicamentos que estaban aprobados por la FDA o EMA fueron citarabina, vidarabina, ziconitida y ésteres de etilo de ácido omega-3. Tan sólo nueve años más tarde, los medicamentos aprobados en la gama de fármacos marinos se duplicaron. Esto es una mejora sorprendente ya que, durante los primeros 30 años de

investigación, citarabina y vidarabina eran los únicos fármacos marinos en el mercado (Martins *et al.*, 2014).

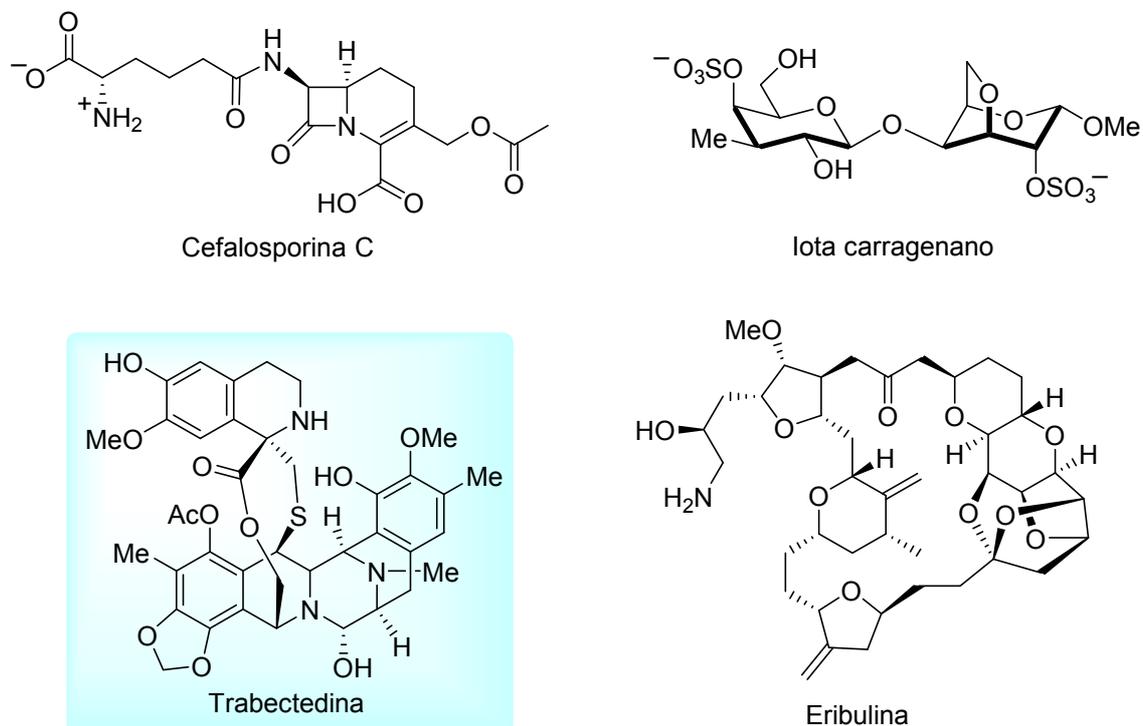


Figura 3

1.4. Fármacos anticancerígenos procedentes del mar

El cáncer es una enfermedad compleja que hoy en día está en aumento debido al cambio de estilo de vida y la nutrición. Un informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 12,7 millones de personas fueron diagnosticadas con cáncer a nivel mundial y alrededor de 7,6 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad en 2008. Como se estimó en este informe se esperan más de 21 millones de nuevos casos de cáncer y 13 millones de muertes para el año 2030. Sin embargo, casi la totalidad de los medicamentos de quimioterapia que se encuentran actualmente en el mercado causan graves efectos secundarios. Los productos naturales y sus derivados representan más del 50% de todos los fármacos en uso clínico del mundo. Tras intensos esfuerzos llevados a cabo durante más de una década con el fin de explorar la rica biodiversidad que nos ofrece el medio marino, han surgido interesantes descubrimientos de nuevos agentes anticancerígenos clínicos y preclínicos.

Cada vez más pruebas sugieren que el descubrimiento de fármacos contra el cáncer proviene del medio marino. Las adaptaciones químicas generalmente adoptan la

forma de los llamados "metabolitos secundarios". Además, es relativamente común la presencia de átomos de halógeno unidos covalentemente a metabolitos secundarios que actúan como sellos del cáncer produciendo autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad ante las señales anti-crecimiento, la desaparición de la apoptosis, etc. (Kim and Kalimuthu, 2015).

Actualmente existen cuatro fármacos marinos anticancerígenos, estos son citarabina (Ara-C) comercializado bajo el nombre de Cytosar-U®, trabectedina (ET-743) con el nombre comercial de Yondelis®, mesilato de eribulina comercializado como Halaven® y Brentuximab vedotin (SGN-35) llamado Adcetris® (Mayer, 2010).

Este estudio se centrará en el fármaco Yondelis® (trabectedina) de Pharmamar (<http://www.pharmamar.com/Products.aspx>), el cual fue el primer anticancerígeno marino en salir al mercado aprobado por la Unión Europea.

1.5. Trabectedina (Yondelis®)

Trabectedina (ecteinascidina-743/ET-743) es un alcaloide tetrahydroisoquinolínico aislado del tunicado marino caribeño *Ecteinascidia turbinata*. Es el primer anticancerígeno marino que ganó la aprobación de la Unión Europea para el tratamiento de sarcoma de tejidos blandos (STB) y cáncer de ovario recurrente (Mayer *et al.*, 2010). Fue aprobado por la FDA en Octubre de 2015 (FDA, 2015).

La estructura química de su compuesto activo más abundante, ET-743, y su análogo ET-729 está formada por tres anillos fusionados de tetrahydroisoquinolina través de un puente tioéter que completa una lactona de 10 componentes, una característica estructural distintiva de ecteinascidinas (Montaser and Luesch, 2011) y en la actualidad producido por semisíntesis (Cuevas *et al.*, 2000) a partir de un precursor: cianosafracina B, producido a partir de fermentación de pseudomonas marinos (Gordaliza, 2015). El compuesto activo T-743 fue seleccionado para su desarrollo debido a que es más abundante que su análogo ET-729 en *E.turbinata*. Aún así, ET-743 poseía un rendimiento del 0,0001% y era necesaria una tonelada de tunicados para aislar un gramo de trabectedina teniendo en cuenta que se necesitaban al menos cinco gramos para la realización de los ensayos clínicos (Mayer *et al.*, 2010).

Este compuesto supone un hito importante en el desarrollo de fármacos de origen marino. Casi 40 años después de su descubrimiento y 17 después de la publicación de su estructura se convirtió en el primer fármaco anticancerígeno de origen marino en incorporarse al mercado. En 1969 ya se publicó que los extractos del tunicado caribeño *E. turbinata* poseían actividad antitumoral y en 1990, Rinehart (Rinehart *et al.*, 1990) y Wright (Wright *et al.*, 1990) publicaron la estructura de los alcaloides llamados ecteinascidinas. Sin embargo su reconocimiento tardó casi dos décadas en obtenerse debido a la falta de métodos rentables para poder aislar una cantidad de producto considerable (Moliniski *et al.*, 2009).

Durante los primeros años de exploración en fases clínicas, Pharmamar llevó a cabo cultivos marinos en piscifactorías costeras para la extracción y obtención del producto (Carballo *et al.*, 2000) pero este método sólo proporcionaba suficiente cantidad de trabectedina para llevar a cabo el ensayo clínico y era poco práctico para su comercialización. Corey y su grupo consiguieron una síntesis total de la molécula en 1996 (Corey *et al.*, 1996), pero una vez más los procedimientos experimentales representaban un enorme impedimento para la fabricación industrial. El problema fue finalmente resuelto con el desarrollo de una ruta semisintética (Cuevas *et al.*, 2000) viable para la producción de este compuesto (Mayer *et al.*, 2010). Pharmamar logró la licencia del recurso natural ET-743 bajo el nombre comercial de Yondelis® y fue aprobado para el tratamiento de sarcomas de tejidos blandos por la Comisión Europea en julio de 2007 (Simmons *et al.*, 2005).

2. Aislamiento de trabectedina

Con el fin de comercializar un producto natural marino como fármaco, inicialmente es necesario llevar a cabo un procedimiento de aislamiento y caracterización de la sustancia bioactiva. Dentro de este procedimiento existen diferentes etapas: selección de la fuente, recolección y cultivo, extracción o fraccionamiento, separación y aislamiento, determinación estructural, búsqueda de aplicaciones y, por último, producción industrial (Laborda y San Sebastián, 2015).

2.1. Organismo fuente: *Ecteinascidia turbinata*

El nombre de la especie productora de trabectedina es *Ecteinascidia turbinata* Hedman, 1880 (Sanamya and Monniot, 2007) y su nombre común es tunicado de manglar.

Filo	Subfilo	Clase	Orden	Familia	Género
Chordata	Tunicata	Ascidiacea	Phlebobranchia	Perophoridae	Ecteinascidia

Es una ascidia colonial formada por zooides individuales conectados a través de una serie de estolones situados en la base de la colonia. Estos estolones se encargan de proporcionar sangre a los zooides y sirven de anclaje entre la colonia y el sustrato. La coloración, el tamaño y las preferencias de hábitat de *E. turbinata* la diferencian fácilmente de otras especies (Sweat, 2009).

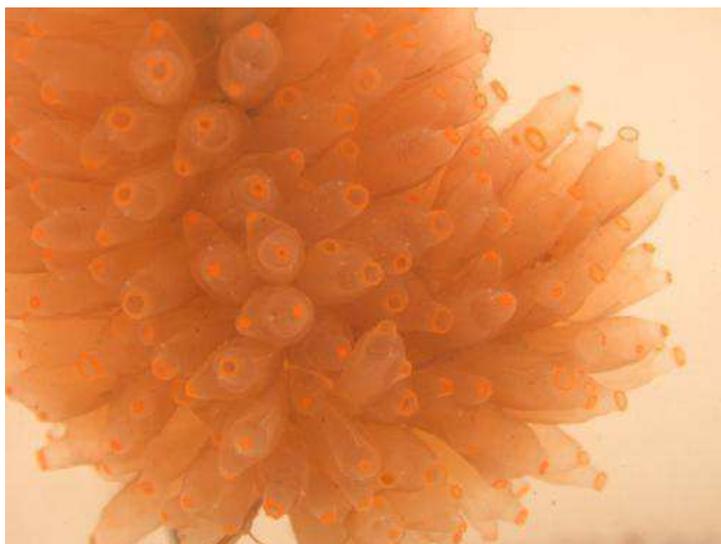


Figura 4: Primer plano mostrando las túnicas individuales del tunicado *E. turbinata*.

Los zooides individuales suelen comprender entre 2,0 y 2,5 centímetros de altura y las colonias pueden alcanzar un diámetro de 14 centímetros y un peso de hasta 350 gramos (Carballo, 2000). Cada zooides se encuentra rodeado por una túnica que posee una abertura en forma de sifón de color naranja. La pigmentación naranja de este sifón se debe a la presencia de carotenoides que se encuentran acumulados en orgánulos en la parte anterior de cada túnica (Lyerla *et al.*, 1975). Existen otros tipos de pigmentos dispersos en otras áreas de la túnica que aportan un aspecto transparente a la colonia,

aún así, en algunas poblaciones de *E. turbinata*, los zooides dentro de cada túnica pueden tener un tono amarillo, naranja o rosa (Voss, 1980).



Figura 5: Túnica individual de *E. turbinata* en primer plano.

Respecto a su hábitat y distribución, *E. turbinata* se extiende a lo largo de aguas cálidas y poco profundas del Golfo de Méjico, la costa este de Florida, las islas Bermudas y el Caribe aunque también se han observado poblaciones estacionales en la Bahía de Chesapeake, los arrecifes frente a las islas Carolinas (Sweat, 2009) y en el Mediterráneo, aunque en este último únicamente se han localizado poblaciones en hábitats cerrados o semicerrados. Esta población en el Mediterráneo fluctúa a lo largo del tiempo (anualmente), y su distribución es irregular con agregaciones más densas en los fondos, pudiendo llegar a 175 zooides por metro cuadrado (Carballo, 2000).

Las ascidias pertenecen a un grupo muy diverso de suspensívoros bentónicos. Algunas ascidias pertenecientes a aguas profundas son carnívoras pero el resto de especies se alimentan a través de la captación de partículas en suspensión. (Petersen, 2007). Las características alimentarias de *E. turbinata* se encontraban indefinidas hasta hace poco, a pesar de que en los últimos años se han estudiado diferentes aspectos de su biología. En 2007 se llevó a cabo un estudio en el cual se determinó que esta ascidia colonial se alimenta casi exclusivamente de microalgas que son arrastradas por las mareas, sobretodo diatomeas y dinoflagelados. En dicho estudio también encontraron dentro los estómagos de *E. turbinata* elevadas concentraciones de dinoflagelados considerados como tóxicos, *Dynophysis*, *Prorocentrum* y *Gymnodinium*, por lo que consideraron que podría existir algún tipo de participación de estos organismos en la gran bioactividad de los extractos de esta especie (Hernández-Zanuy *et al.*, 2007).

En relación a su reproducción, los organismos adultos son hermafroditas simultáneos, pero pueden reproducirse sexual o asexualmente. La reproducción sexual se produce con mayor frecuencia cuando la temperatura del agua es cálida (primavera y verano). Es ovovivíparo y las larvas permanecen en la cavidad peribranquial durante aproximadamente de 7 a 9 días tras la fecundación. Pasado este periodo las larvas son liberadas en la columna de agua (Sweat, 2009).

Las larvas o renacuajos de *E. turbinata*, llamados así por su morfología (García-Cagide *et al.*, 2005), son relativamente grandes, con una longitud de 4,5 milímetros aproximadamente (Figura 6). Poseen un color naranja o amarillo brillante debido a la presencia un pigmento con carotenoides que difiere en composición de los pigmentos de los individuos adultos (Lyerla *et al.*, 1975). Tras varios experimentos, se ha demostrado que esta coloración tiene función aposemántica, ya que también poseen ciertas sustancias químicas de identidad desconocida que, debido a su sabor desagradable, son inapetecibles para los planctívoros. Gracias a ello son capaces de evitar en gran medida la depredación, causa principal de mortalidad en larvas de invertebrados marinos (Young and Bingham, 1987). Son licitotróficas, es decir, obtienen los nutrientes a través del vitelo (saco vitelino) (Carballo, 2000). Debido a esto, la fase larvaria de *E. turbinata* es corta, (García-Cagide *et al.*, 2005) por lo que las larvas deben encontrar un hábitat adecuado para establecerse antes de agotar su reserva de alimentos (Sweat, 2009).

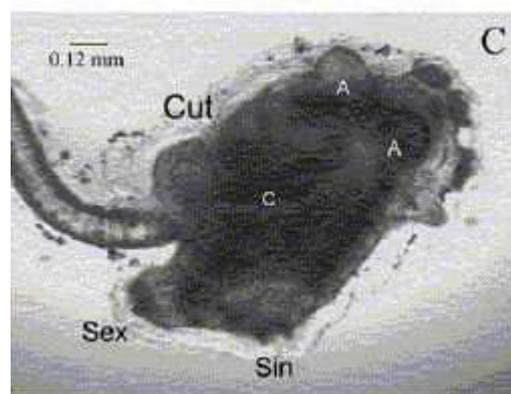


Figura 6: Larva de *E. turbinata* en fase nadadora. Cut: cutícula; C: corazón; A: órganos ampulares; Sex: sifón exhalante; Sin: sifón inhalante.

La fase planctónica de la larva posee dos etapas, una primera etapa en la cual la larva nada de forma vigorosa y después con mayor lentitud hasta quedarse inmóvil y comienza a cambiar la forma de su cuerpo. En la segunda etapa de la fase planctónica ocurre la reabsorción del complejo axial de la cola, retracción de las papilas y el

alargamiento digitiforme de los órganos ampilares (García-Cagide *et al.*, 2005). Al final de esta fase, las larvas se adhieren al sustrato a través de una serie de estructuras adhesivas producidas en la parte delantera del tronco llamado papilas, y sufren otra serie de transformaciones fisiológicas y morfológicas hasta que las larvas se transforman en tunicados juveniles (Sweat, 2009).

Respecto a las tolerancias físicas de *E. turbinata*, este tunicado suele encontrarse en aguas tropicales y subtropicales cálidas en las cuales la temperatura oscila generalmente entre 25°C a 32°C (Vázquez and Young, 1996). Como se ha mencionado anteriormente, se pueden encontrar en aguas del Mediterráneo pero no sobreviven a temperaturas inferiores a 17° C aunque las colonias suelen recuperarse cuando las aguas del Mediterráneo comienzan a calentarse de nuevo (Sweat, 2009).

Por otro lado, en relación a la salinidad, esta especie generalmente se encuentra en aguas estuarinas de salinidad variable (Vázquez and Young, 1996), por lo que presenta buena tolerancia a las fluctuaciones de salinidad. Las larvas de *E. turbinata* también soportan grandes gradientes de salinidad (33 o 26 ppt) (Carballo, 2000). Sin embargo, la presencia de haloclinas reduce la capacidad de las larvas para realizar las migraciones verticales diarias llevadas a cabo por el zooplancton (Vázquez and Young, 1996).

El principal problema en la investigación de fármacos de origen marino es el suministro del material. Hoy en día, las principales estrategias para evitar este problema son la acuicultura farmacéutica del organismo marino biológicamente activo o la síntesis química del compuesto activo. Trabectedina es un compuesto de estructura compleja por lo que inicialmente parecía complicado obtener material suficiente para los ensayos clínicos mediante síntesis química. En 1996 se llevó a cabo una síntesis total de este compuesto, sin embargo la cantidad de material obtenido no fue suficiente para suplir las necesidades del desarrollo clínico. Por este motivo, en 1997, Pharmamar se decantó por el desarrollo de la acuicultura de *E. turbinata* como el principal suministro de trabectedina para llevar a cabo los estudios preclínicos y clínicos. En tan solo un año se produjeron aproximadamente 80 toneladas métricas de biomasa (Fajarningsih, 2012).

Se han estudiado varios métodos con el fin de cultivar grandes cantidades de *E. turbinata* para la extracción de trabectedina. Uno de estos estudios determinó dos

técnicas exitosas de cultivo: una de ellas a partir del asentamiento de larvas en un entorno natural y el segundo, mediante la fragmentación de colonias posteriormente trasplantadas a unas estructuras fabricadas con plástico, ya que se demostró que la madera y el plástico son los materiales más adecuados para el cultivo de *E. turbinata* en el mar (Carballo *et al.*, 2000). Otro estudio determinó la dieta correcta que se le debería suministrar a *E. turbinata* para obtener óptimos resultados en el cultivo *in vitro*: el resultado fue que una dieta mixta de *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* a una concentración de 160.000 células por mililitro es un buen método de alimentación para el cultivo *in vitro* de *E. turbinata* (Duckworth *et al.*, 2004).

Sin embargo, en 2004, PharmaMar decidió cambiar el método de suministro de trabectedina debido a un nuevo descubrimiento: una semisíntesis de la molécula. Este procedimiento se sigue llevando a cabo hoy en día ya que es más práctico que el cultivo de *E. turbinata* e hizo viable la fabricación industrial del compuesto (Fajarningsih, 2012).

2.2. Determinación de la estructura

En el año 1969 se descubrió por primera vez que los extractos de etanol acuoso de colonias de *Ecteinascidia turbinata* poseían una alta actividad antitumoral *in vivo* (Siegel *et al.*, 1969). Estos extractos también demostraron poseer un alto poder como inmunomoduladores. Sin embargo, todos los intentos realizados para poder aislar los compuestos responsables de estas actividades fueron en aquellos momentos infructuosos (Siegel *et al.*, 1983). La primera descripción y caracterización estructural de seis nuevas entidades químicas llamadas ecteinascidinas (ET's: ET-729, ET-743, ET-745, ET-759A, ET-759B, ET-700) la llevó a cabo el grupo de Rinehart de la Universidad de Illinois (Urbana) en 1990, a partir del tunicado *E. turbinata* encontrado en aguas del Mar Caribe (Rinehart *et al.*, 1990). Encontraron que el componente más abundante era ET-743 (trabectedina), aislándose con un rendimiento del 0.0001%. Esto indica que a partir de 1000 kg de *Ecteinascidia turbinata* se obtenía solamente 1 mg de trabectedina. Debido al interés despertado por la potente e inusual actividad biológica de estos extractos, el grupo de Wright, de la Harbor Branch Oceanographic Institution (Florida), también asiló y contribuyó a caracterizar la trabectedina (Wright *et al.*, 1990). Las primeras estructuras propuestas para todas estas ecteinascidinas se realizaron en base a estudios de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y de Espectrometría de Masas

(MS), aunque la asignación inequívoca de la estereoquímica absoluta se consiguió cuando fue posible resolver la estructura del N^{12} -óxido de trabectedina (Figura 7) por difracción de rayos X (Sakai *et al.*, 1992).

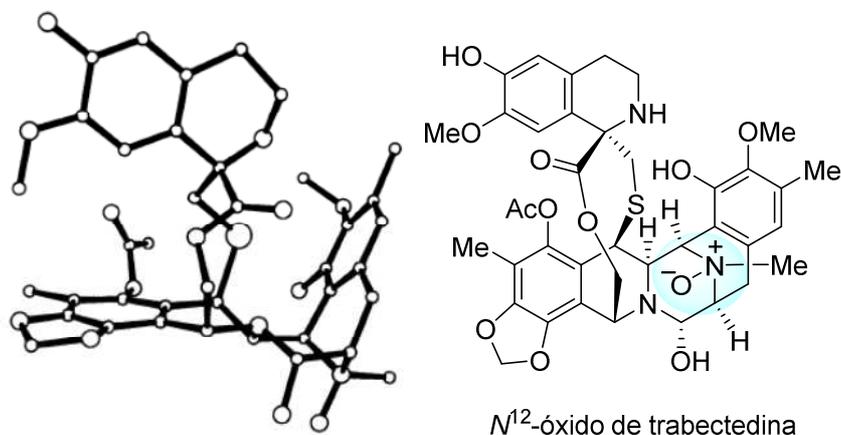


Figura 7: Estructura de rayos X del N^{12} -óxido de trabectedina.

En las ecteinascidinas hay presente un esqueleto pentacíclico compuesto por dos sistemas de tetrahydroisoquinolina fusionados (subunidades A y B), con una lactona puente de 10 eslabones en la que además hay un enlace sulfuro bencílico. Muchas ecteinascidinas tienen además una tercera unidad tetrahydroisoquinolinica (subunidad C) unida al resto como un sistema espiránico, tal y como se ejemplifica para la trabectedina en la **Figura 8**. Este hecho es distintivo de estas moléculas frente a las familias de saframincinas, safracinas y renieramicinas, asiladas de bacterias y esponjas (Scott and Williams, 2002).

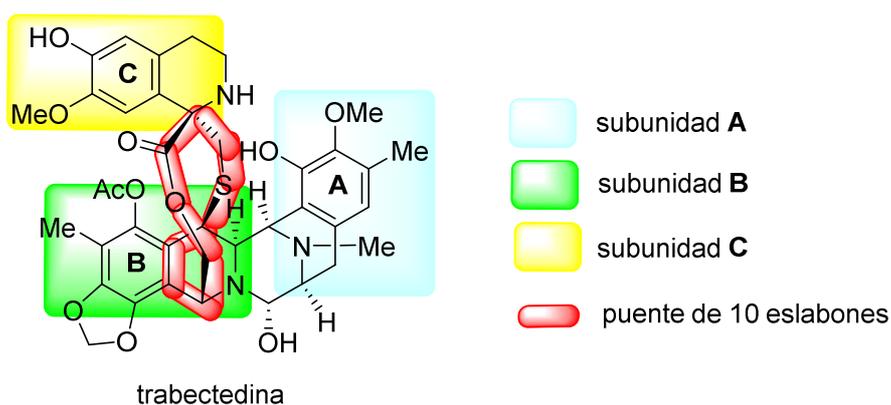


Figura 8: Descripción estructural de trabectedina.

3. Ruta biosintética

Tomando como referencia las rutas biosintéticas previamente caracterizadas de los productos naturales de origen bacteriano saframicina A (*Streptomyces lavendulae*) (Arai *et al.*, 1980), saframicina Mx 1 (*Myxococcus xanthus*) (Irschik *et al.*, 1988) y safracina B (*Pseudomonas fluorescens*) (Iketa *et al.*, 1983) (Figura 9), el grupo de Sherman de la Universidad de Michigan (Ann Arbor) llevó a cabo un estudio exhaustivo de la biosíntesis de la trabectedina (Rath *et al.*, 2011). La similitud estructural de todos estos compuestos, en los que aparece un sistema pentacíclico derivado de tetrahydroisoquinolina, podría ser un indicativo de que las rutas biosintéticas que conducen a su generación en la naturaleza también tendrían que ser muy parecidas. Así, se encontró que estas rutas biosintéticas tenían en común la participación de tres módulos de proteínas péptido sintetasa no ribosómicas (NPRS) y una serie de enzimas asociadas. A su vez, en cada módulo había tres dominios: adenilación (A), condensación (C) y tiolación (T, formación o ruptura de tioésteres), en los que se combinaban los correspondientes amino ácidos utilizados como unidades estructurales (building blocks) en la construcción de estas moléculas complejas. En el caso de la trabectedina, aislada de *Ecteinascidia turbinata*, estos tres módulos son designados como **EtuA1-3** (Figura 9).

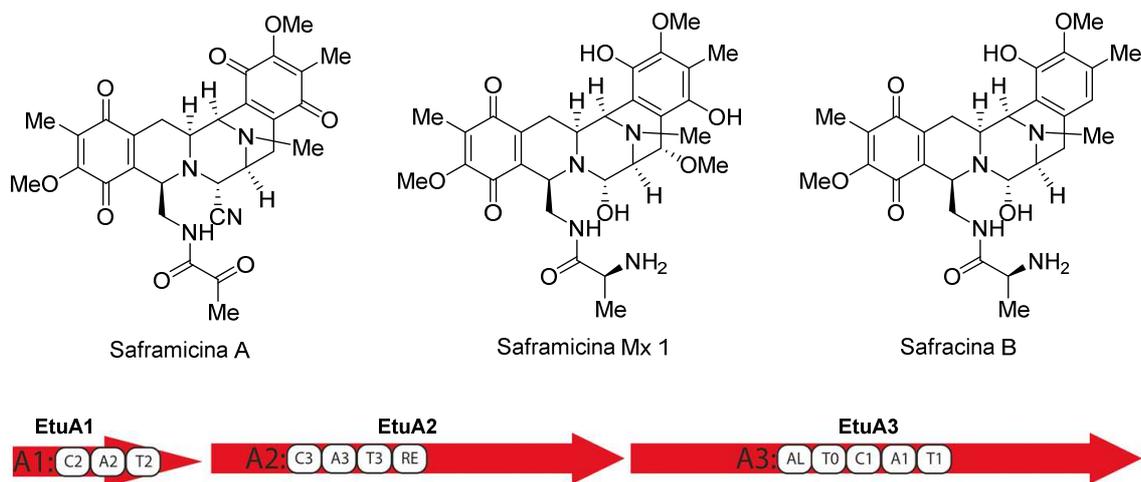
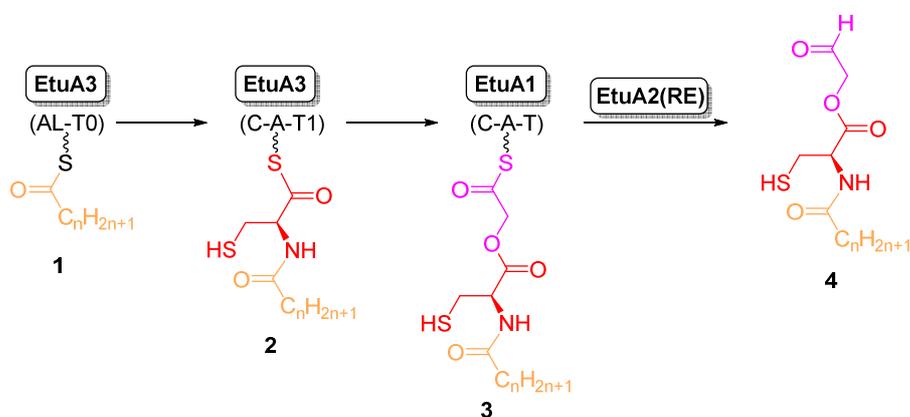


Figura 9: Módulos de proteínas péptido sintetasa no ribosómicas **EtuA1-3** y estructuras de saframicina A, saframicina Mx 1 y safracina B.

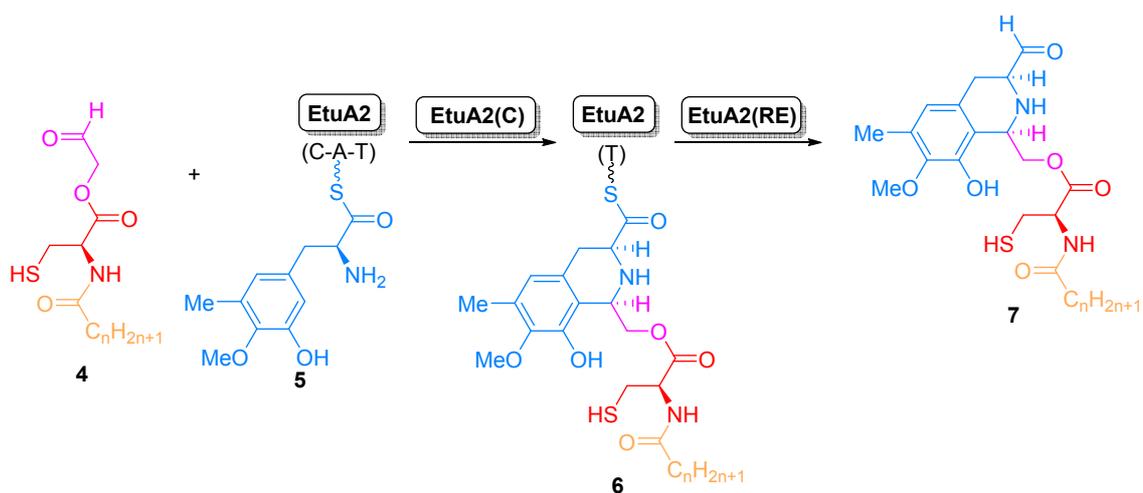
La ruta biosintética propuesta comienza con la unión de un ácido graso al dominio T de **EtuA1** (1) por acción de la enzima ácido graso-ligasa de **EtuA3**. Posteriormente se produce la *N*-acilación del aminoácido cisteína (2), seguido de la

condensación con un glicolato en **EtuA1** para formar un depsipéptido (**3**). La reducción del tioéster en el dominio **EtuA2(RE)** (RE, dominio con actividad reductasa utilizando NADPH como cofactor) libera el aldehído **4** (Koketsu *et al.*, 2010) del dominio T de **EtuA1** (Esquema 1).



Esquema 1

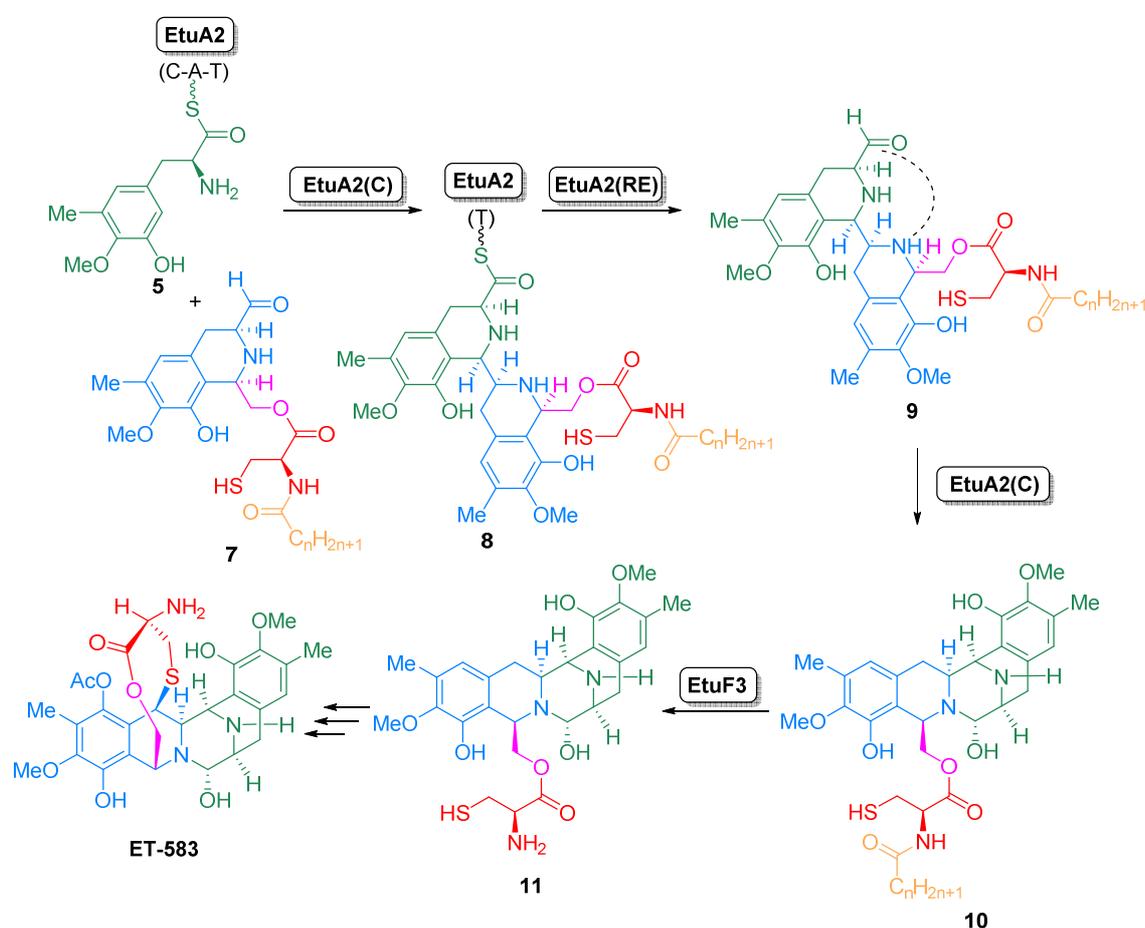
Los aldehídos son especies muy reactivas y participan en procesos de condensación con grupos amina libres (NH₂). A continuación el aldehído **4** reacciona con un aminoácido no proteinogénico derivado de tirosina **5**, anclado como tioéster en **EtuA2**, para generar el compuesto **6** a través de una condensación tipo Pictet-Spengler en el dominio **EtuA2(C)**. Nuevamente, por la acción reductora de **EtuA2(RE)**, se libera el aldehído bicíclico **7** (Esquema 2).



Esquema 2

Se repite de nuevo el mismo tipo de proceso por acción de **EtuA2**, que cataliza una segunda reacción de Pictet-Spengler entre el aldehído liberado **7** y el derivado de tirosina **5** anclado como tioéster en **EtuA2**, para formar el sistema tetracíclico **8**, siendo

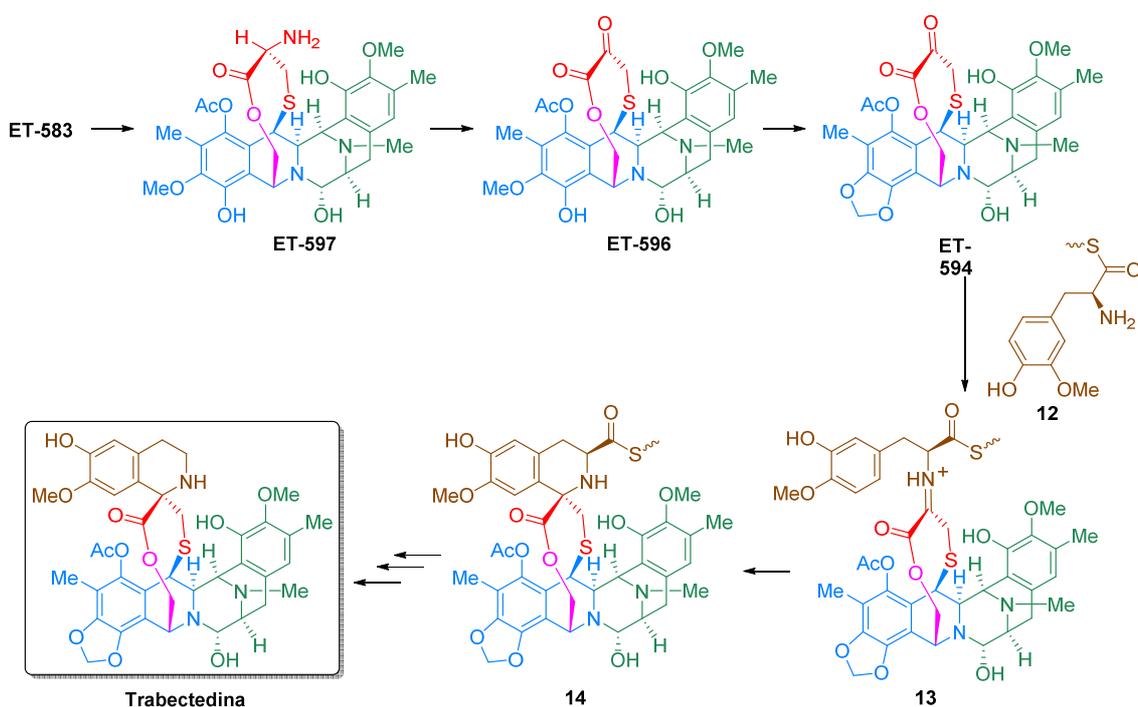
este liberado por acción de de **EtuA2(RE)**, dando lugar al aldehído **9** (Esquema 13). El aldehído **9** sufre una reacción de ciclación intramolecular, en la que participa un grupo amino (NH) y el carbonilo del aldehído, dando lugar al sistema pentacíclico **10** (Esquema 13). Este compuesto posee ya la estructura base de los compuestos bistetrahidroisoquinolínicos anteriormente mencionados (Figuar 9). La acción de la acilasa **EtuF3** sobre **9** produce la ruptura del enlace peptídico que libera al ácido graso, formándose **11**, que es un precursor de ET-583. En este compuesto ya está presente también el puente de lactona de diez eslabones sobre el sistema pentacíclico básico (Esquema 3).



Esquema 3

Los intermedios sintéticos ET-583, ET-597, ET-596 y ET-594, propuestos en esta ruta biosintética han podido ser aislados y caracterizados (Sakai *et al.*, 1996). Así, el compuesto ET-583 se transforma en ET-597 por acción de una *N*-metiltransferasa, y este en ET-596 a través de una transaminación oxidante que transforma la agrupación α -amino éster en α -ceto éster. Otra proteína desconocida cataliza a continuación la formación del dioxolano cíclico en el anillo A, generando el compuesto ET-594. Al

haber sido aislado el compuesto ET-594, parece razonable que el fragmento que falta para completar la biosíntesis de trabectedina se incorpore en estas últimas etapas. La reacción de ET-594 con el derivado de tirosina **12** conduce primeramente a la formación del iminio intermedio **13**, teniendo lugar ahora otra reacción de tipo Pictet-Spengler para formar el compuesto **14** con un nuevo ciclo. Los últimos pasos para llegar a la trabectedina consistirían en la descarboxilación en la posición α respecto al nitrógeno del último sistema tetrahydroisoquinolínico formado, no siendo todavía conocido el mecanismo a través del cual el tioéster **14** es liberado del complejo enzimático (Esquema 4).



Esquema 4

Como resumen de esta propuesta de ruta biosintética hay que indicar que la trabectedina se generaría en el correspondiente microorganismo a partir de solamente cuatro precursores diferentes, que aportarían todos los átomos presentes en su estructura. Estos serían el amino ácido cisteína, el ácido glicólico, 3-metoxitirosina y 3-hidroxi-*O*,5-dimetiltirosina. En el caso de este último amino ácido no proteínogénico, se requerirían dos equivalentes de acuerdo a esta ruta biosintética (Figura 10).

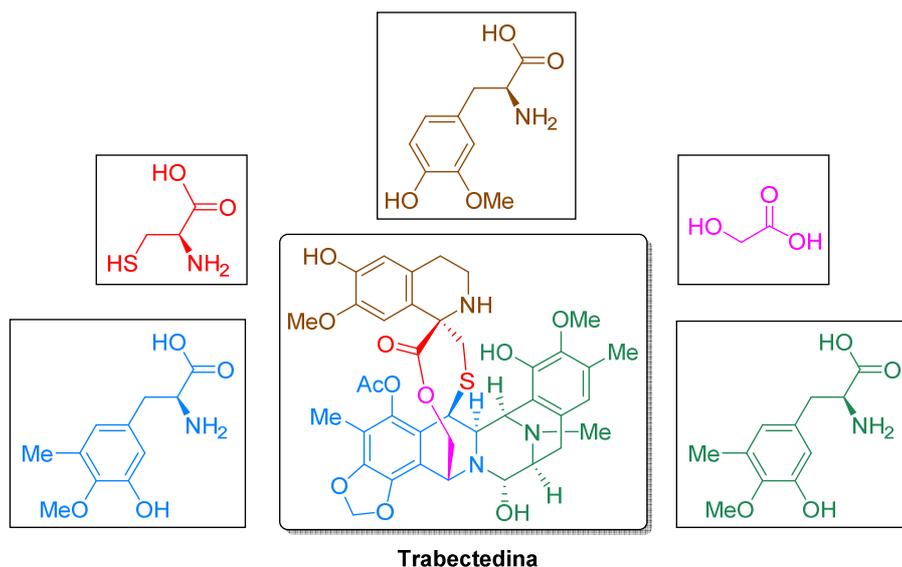


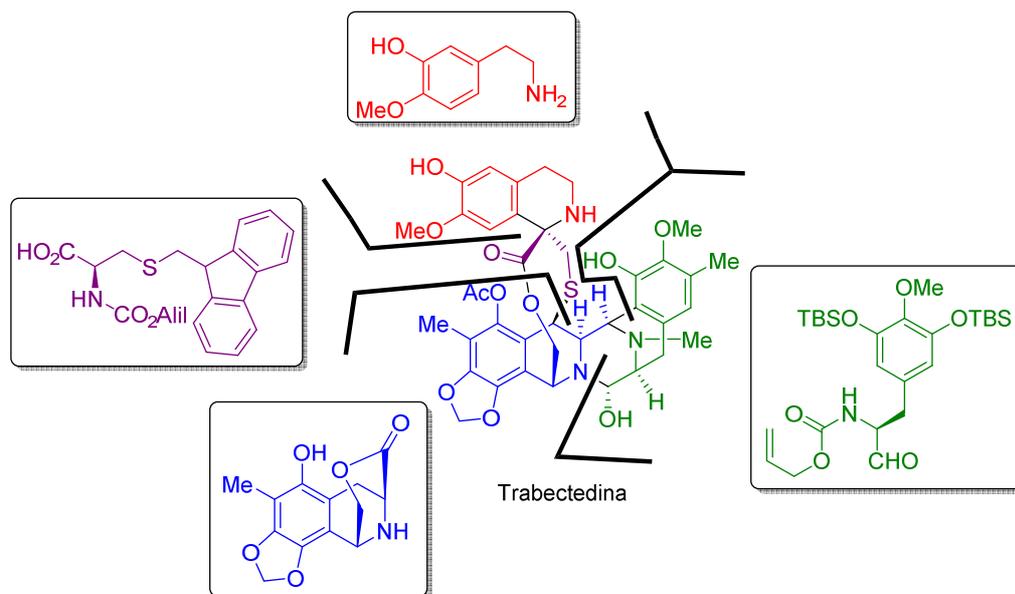
Figura 10: Precursores biosintéticos de trabectedina.

4. Síntesis

Debido a la baja concentración en la que se encuentra la trabectedina en la naturaleza y a la imposibilidad de conseguir cantidades suficientes a partir de las fuentes naturales y la acuicultura para hacer posible su comercialización, fue necesario abordar la síntesis de este compuesto para desarrollar una metodología que evitara la dependencia de la fuente natural.

4.1 Primera síntesis total (Corey, 1996)

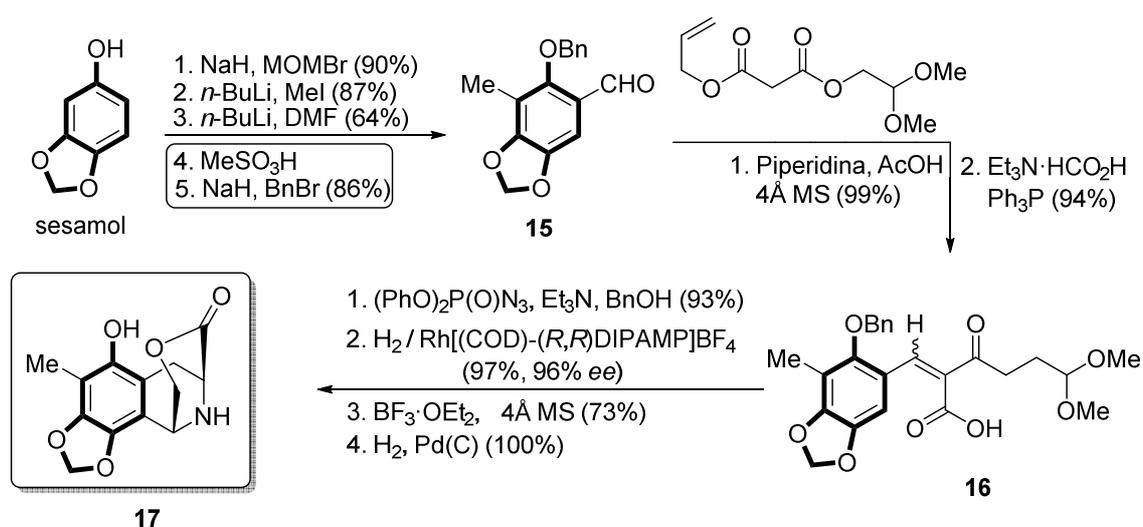
La primera síntesis total de trabectedina fue llevada a cabo por el grupo de Corey en la Universidad de Harvard en 1996 (Corey *et al.*, 1996), inspirándose en la posible biosíntesis de este producto natural (Kerr and Miranda, 1995) y cuya estrategia se basa en la desconexión biomimética de cuatro subunidades de aminoácidos (Corey and Gin, 1996) tal y como se indica en el Esquema 5. Es por lo tanto una síntesis convergente. Se indicará a continuación la síntesis y acoplamiento de estos fragmentos.



Esquema 5: Análisis retrosintético biomimético.

4.1.1. Síntesis de la aminolactona **17**

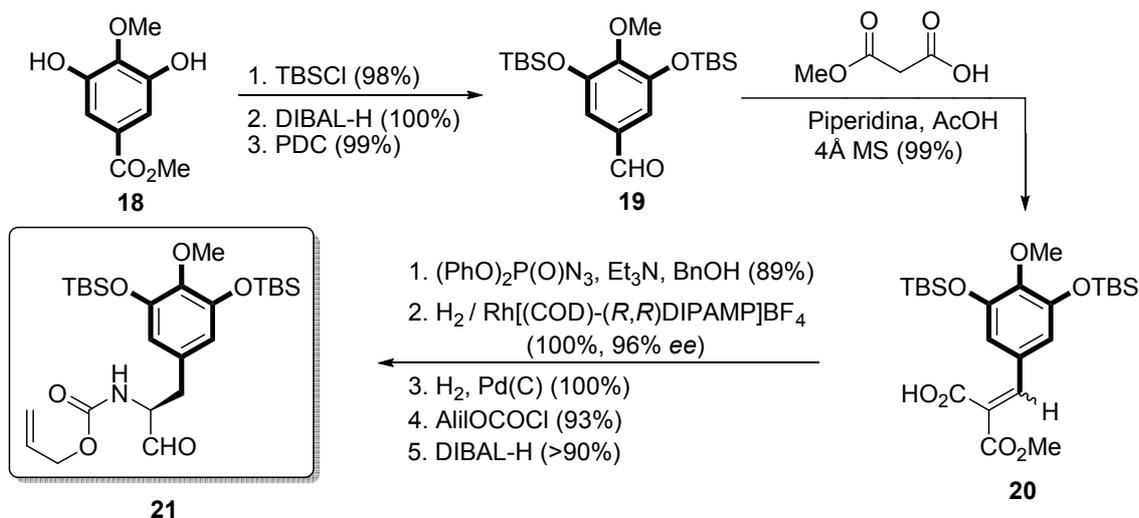
La aminolactona **17** se obtuvo en 12 pasos a partir de sesamol con un rendimiento global del 26%. En los primeros pasos los grupos metilo y formilo se introducen en el anillo aromático a través de reacción de litiación de metoximetil éter derivado de sesamol para formar el compuesto **15**. A través de una condensación malónica se obtiene el compuesto **16** a partir de **15**. La transformación de **16** en el intermedio deseado **17** se realiza mediante una transposición de Curtius, hidrogenación catalítica simétrica y una ciclación intramolecular de Pictet-Spengler (Esquema 6).



Esquema 6: Síntesis de la aminolactona **17**.

4.1.2. Síntesis del α -aminoaldehído 21

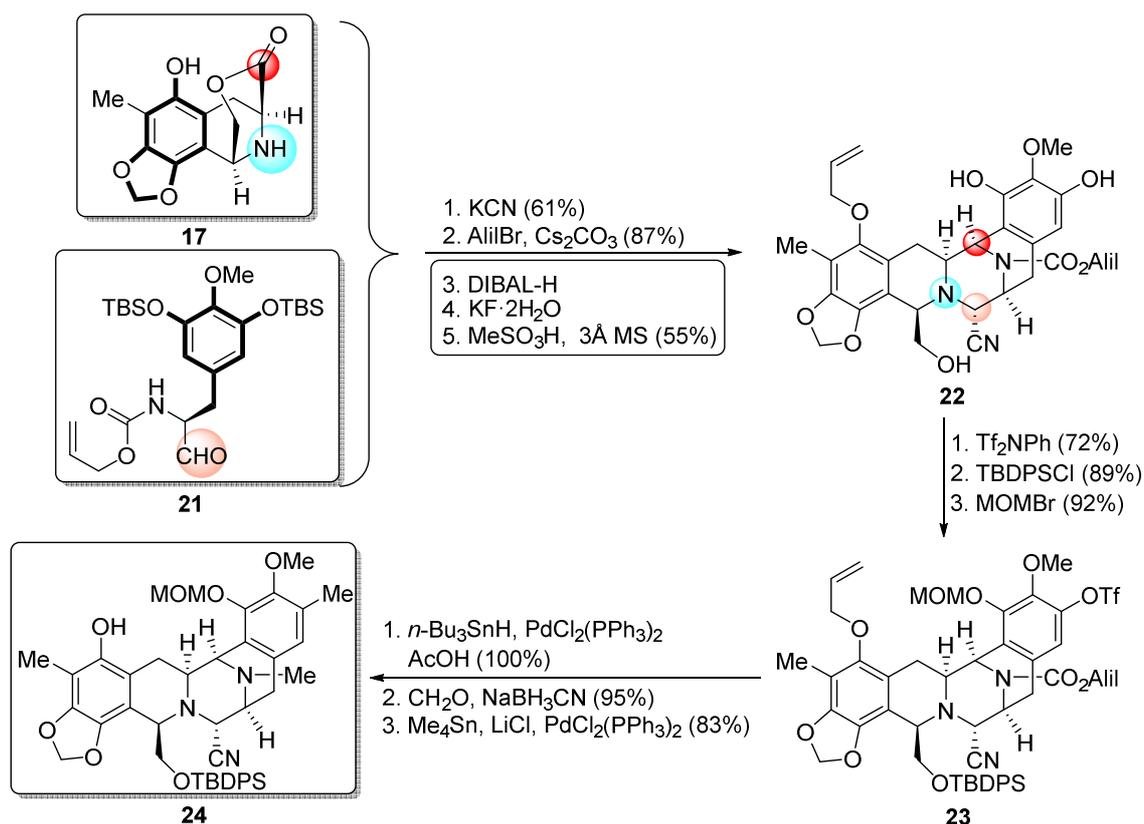
El α -aminoaldehído **21** se obtuvo con un rendimiento global del 66% en 9 pasos a partir del monometil galato de metilo **18** (Esquema 7). El primer intermedio en esta síntesis es el aldehído **19** que sufre una condensación de Knoevenagel con malonato de monometilo para formar el compuesto **20**. Los últimos pasos implican una transposición de Curtius, hidrogenación catalítica y protección del grupo amino como alil carbamato (Esquema 7).



Esquema 7: Síntesis del α -aminoaldehído **21**.

4.1.3 Acoplamiento de la aminolactona **17** y del α -aminoaldehído **21**

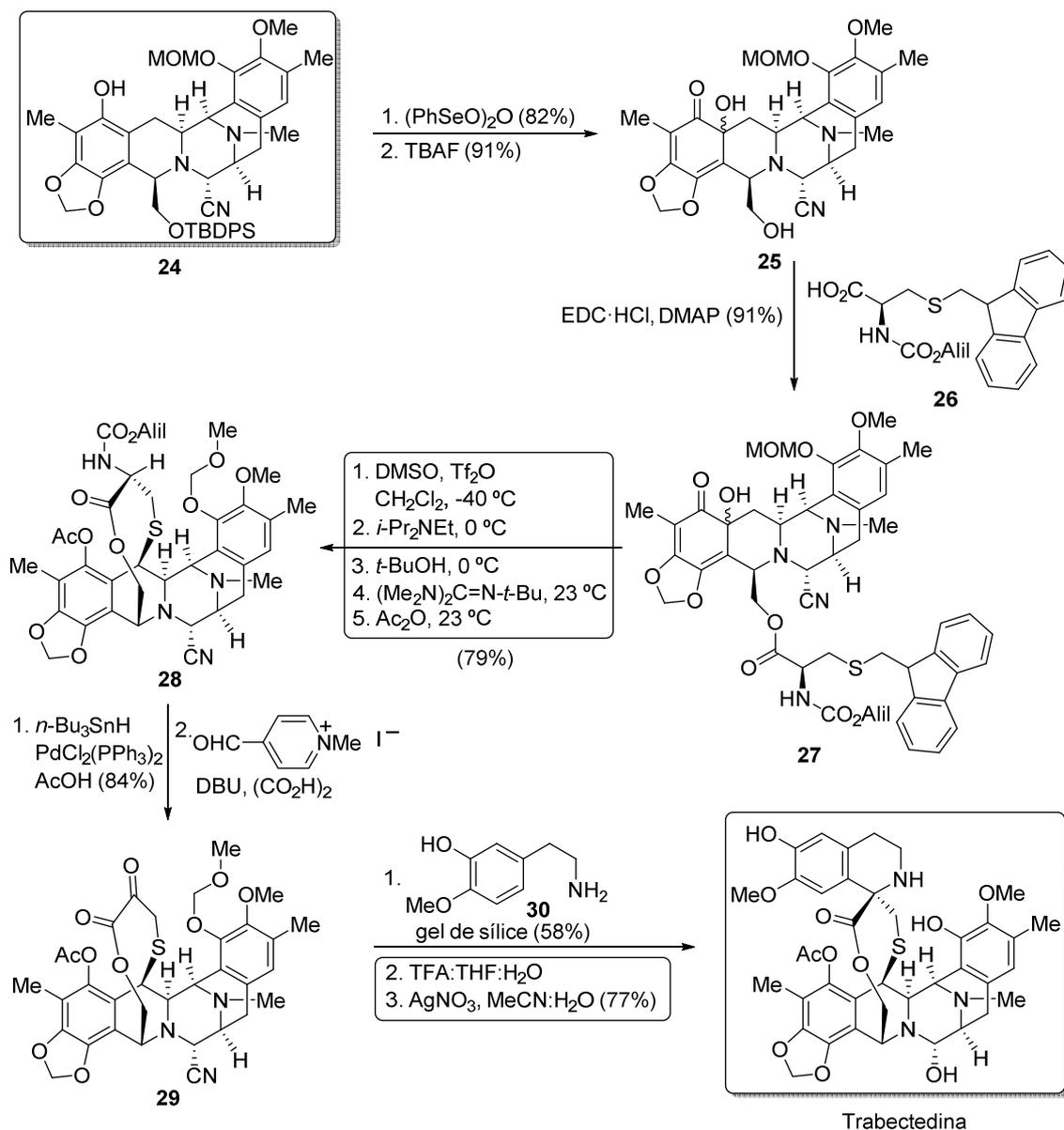
En el siguiente paso de la síntesis, se unen la aminolactona **17** y el α -aminoaldehído **21** para formar, primeramente, el sistema pentacíclico **22**, que sometido a procesos de protección-desprotección selectiva de los diferentes grupos funcionales se transforma primero en el compuesto **23** y finalmente en el producto deseado **24**. La secuencia recogida en el Esquema 8 consta de 11 etapas con un rendimiento global del 14%.



Esquema 8: Síntesis del sistema pentacíclico **24** a partir de los compuesto **17** y **21**.

4.1.4. Síntesis de la trabectedina a partir del compuesto pentacíclico **24**

Los últimos pasos para llegar a la trabectedina a partir del compuesto **24** representan 9 operaciones sintéticas con un rendimiento global del 20%. El primer paso es la oxidación del anillo fenólico para dar el compuesto **25**, seguido de esterificación con el derivado de cisteína **26** para formar el compuesto **27**. En los siguientes pasos se forma el anillo de lactona cíclico de 10 eslabones, siendo transformado el compuesto **28** por oxidación en el 1,2-dicarbonilo **29**, que tras sufrir ciclación de Pictet-Spengler con **30** y transformación del grupo ciano en hidroxilo lleva al producto de reacción deseado trabectedina (Esquema 9).

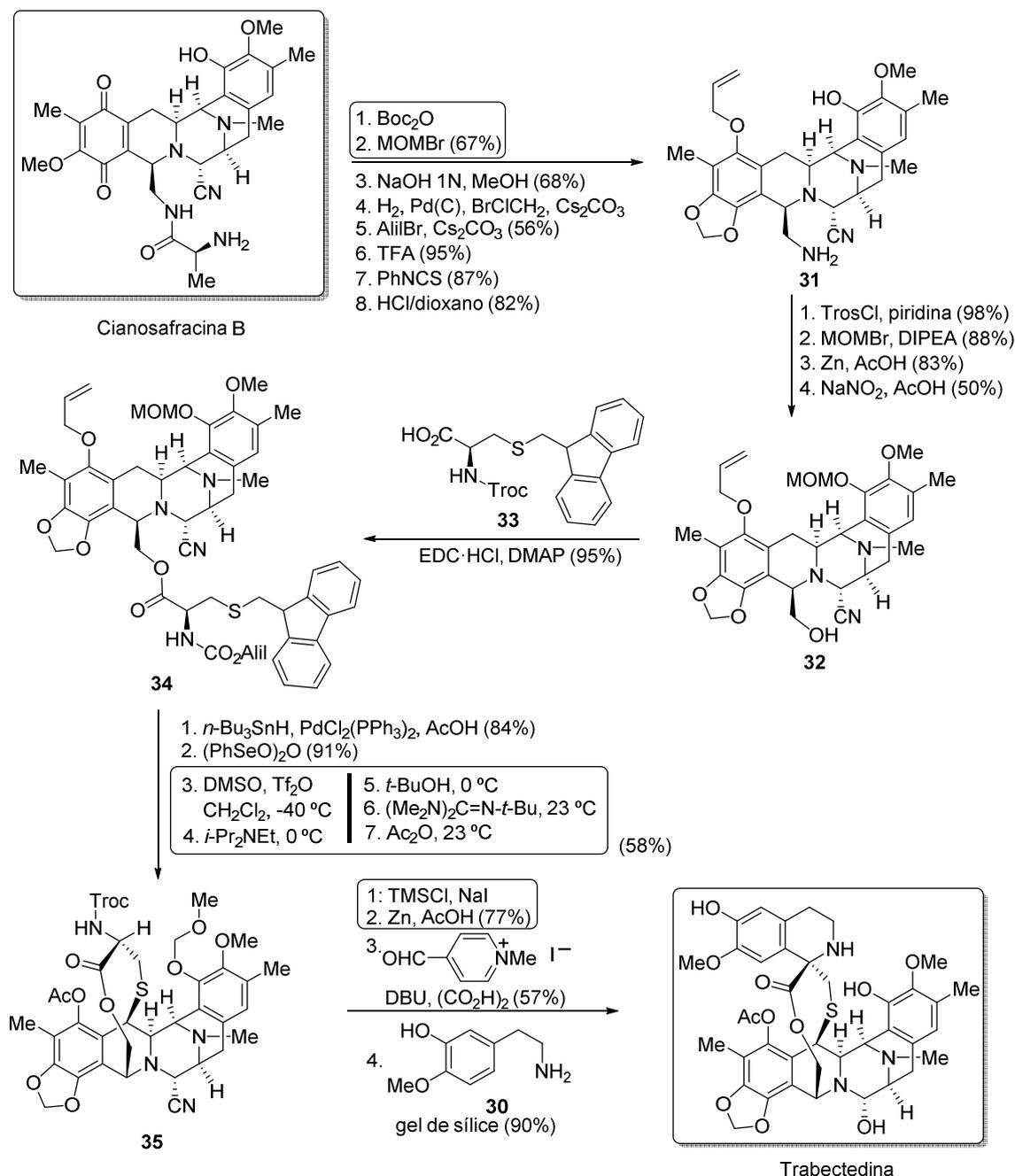


Esquema 9: Síntesis de trabectedina a partir del sistema pentacíclico **24**.

Después de esta primera síntesis total, el grupo de Corey siguió estudiando la mejora de los rendimientos de las rutas sintéticas (Martinez and Corey, 2000). Se logró de esta manera doblar prácticamente el rendimiento en la preparación del intermedio de síntesis **23** a partir de los compuestos **17** y **21** (Esquema 8), pero incluso con estas mejoras, la síntesis total de trabectedina no era viable para llevarla a cabo a escala industrial que permitiera su comercialización, aunque si fue posible generar los gramos suficientes para llevar a cabo los estudios clínicos. Así, el rendimiento total para la secuencia de síntesis más larga de 35 pasos fue de solamente el 0.72%.

4.2. Semisíntesis de trabectedina (escala multigramo)

Afortunadamente, fue posible la preparación de trabectedina a escala de multigramos de manera económica como una síntesis industrial por un proceso de semisíntesis, partiendo de cianosafracina B, un antibiótico obtenido por fermentación de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Ikeda *et al.*, 1983), siendo esta metodología desarrollada por la empresa Pharmamar (Cuevas *et al.*, 2000), aprovechando la información proporcionada por los trabajos previos de síntesis del grupo de Corey. En esta semisíntesis la cianosafracina B se transforma sucesivamente en los intermedios **31** y **32** a través de procesos de protección y desprotección de diferentes grupos funcionales, seguido de esterificación con el compuesto **33** derivado del aminoácido cisteína. El compuesto **34** resultante da lugar a través de 7 pasos de reacción al intermedio de síntesis **35**, donde se encuentra ya presente el anillo puente de lactona de 10 eslabones. Los últimos pasos son idénticos a la síntesis total propuesta por el grupo de Corey, teniendo lugar una ciclación de Pictet-Spengler con **30** y transformación del grupo ciano en hidroxilo (Esquema 10). El producto final en este caso, la trabectedina, se obtiene después de 21 etapas con un rendimiento global de algo más del 1%, con la particularidad respecto a la síntesis total de que la especie de partida cianosafracina B está disponible a escala de kilogramo por fermentación de *Pseudomonas fluorescens*.

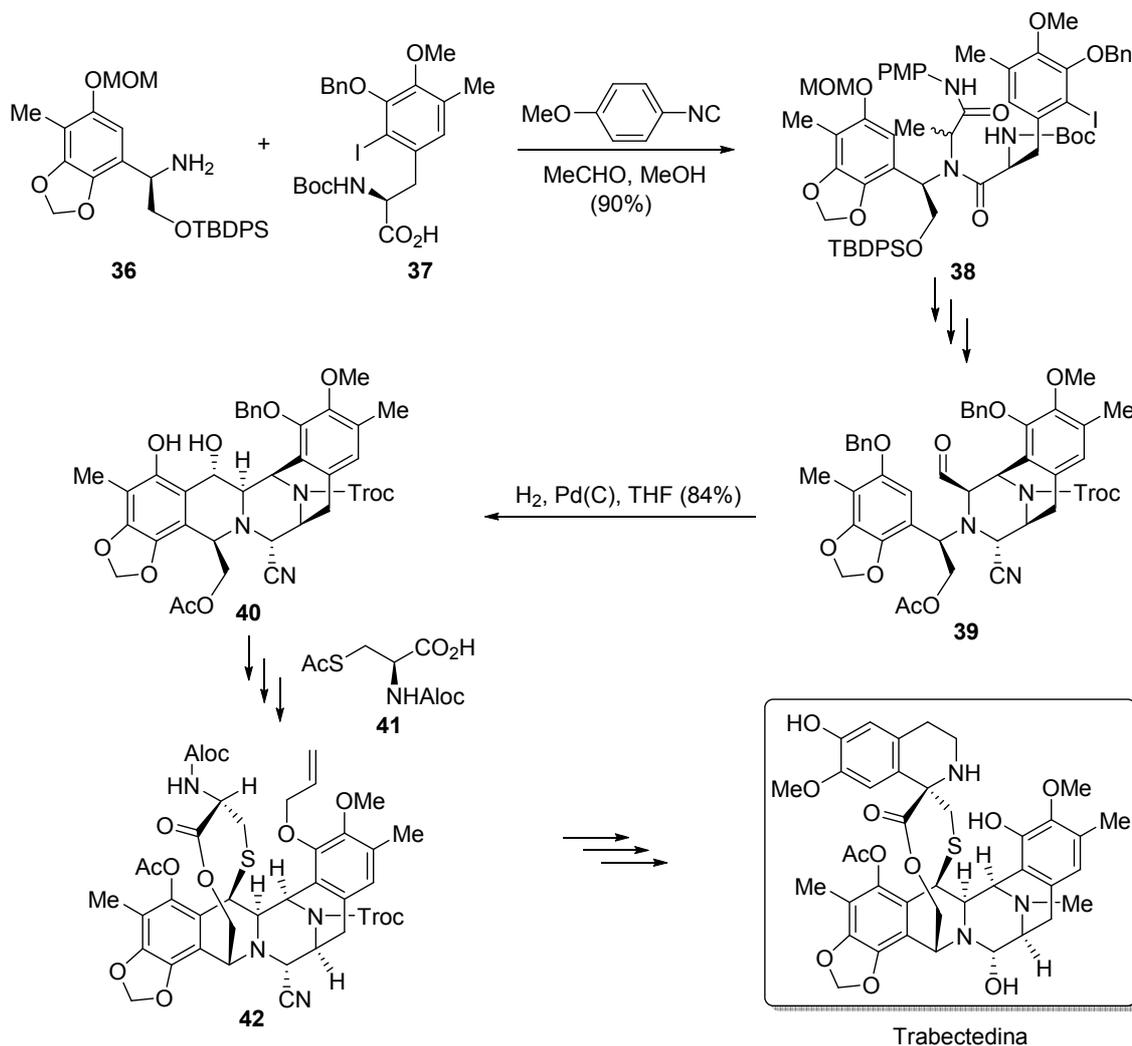


Esquema 10: Semisíntesis de trabectedina a partir de cianosafracina B.

4.3. Otras síntesis totales y formales de trabectedina

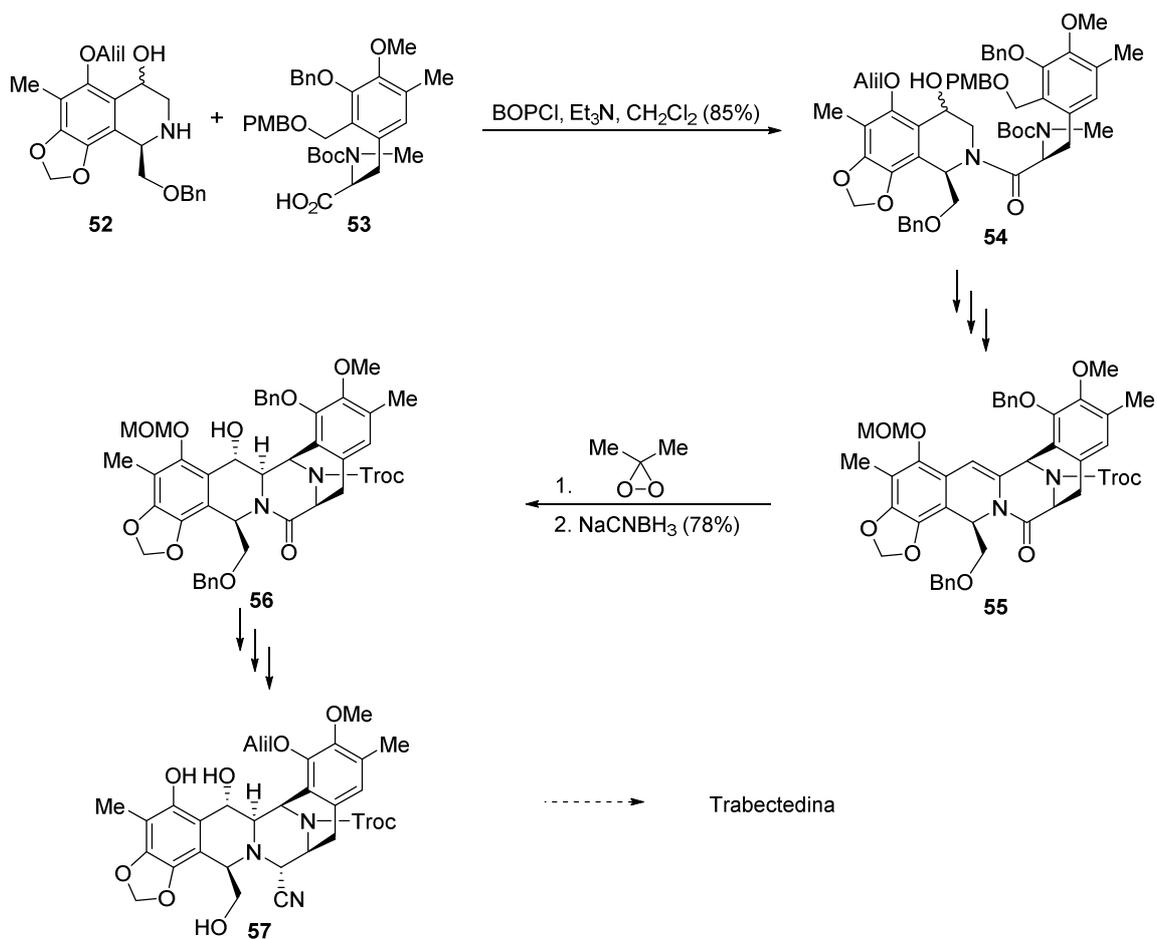
Después de la síntesis total de Corey, el grupo de Fukuyama de la Universidad de Tokio publicó una segunda síntesis total de trabectedina. En esta síntesis se empleaban 50 pasos, siendo el rendimiento global del 0.56% (Endo *et al.*, 2002). En las primeras etapas se produce el acoplamiento de los fragmentos **36** y **37** para formar el compuesto **38**. Una de las etapas clave es la generación del sistema pentaciclíco por una condensación aldólica donde está implicado un fenol que actúa como sistema enólico en la transformación del compuesto **39** en **40**. El resto de etapas que llevan a la formación

de trabectedina, en las que están implicados los compuestos **41** (derivado de cisteína) y **42**, son similares a la síntesis previamente comentada (Esquema 11).



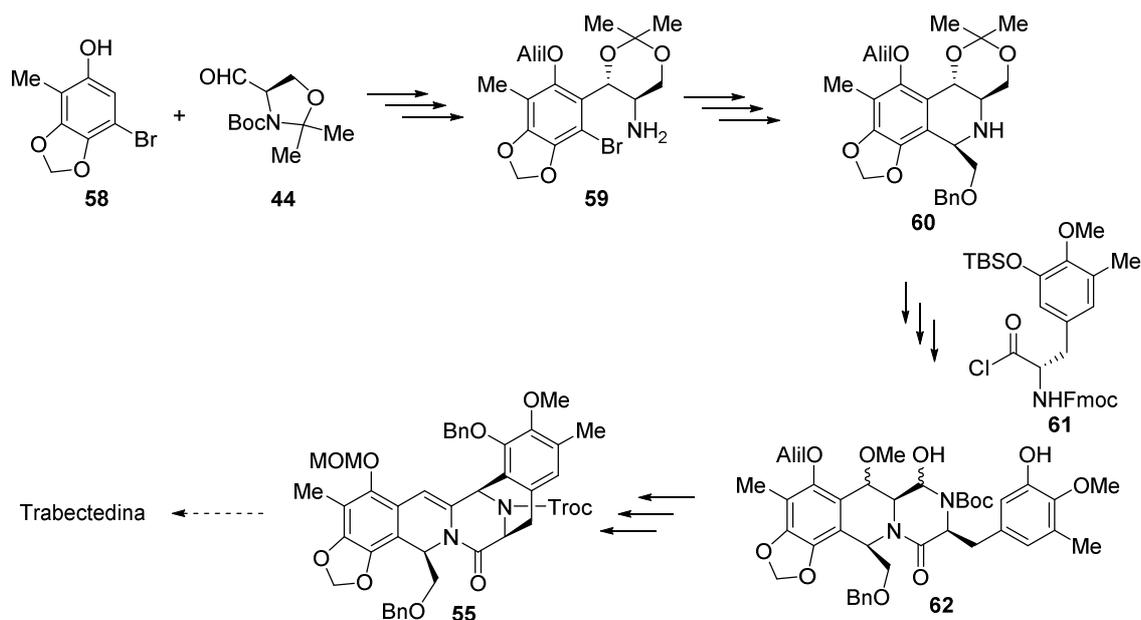
Esquema 11: Síntesis total de trabectedina desarrollada por el grupo de Fukuyama.

Cuatro años más tarde, el grupo de Zhu del Institut de Chimie des Substances Naturelles de la Universidad de Paris-Sud (Gif-sur-Yvett), publicó una síntesis altamente convergente de la trabectedina (Chen *et al.*, 2006). Hechos destacables de esta síntesis son la preparación del compuesto **45** por acoplamiento del aminoalcohol **43** y el aldehído **44**, la *N*-alquilación de **46** con el bromuro racémico **47**, para formar **48** y la formación del pentaciclo **50** a partir de **49**, similar a la propuesta por el grupo de Fukuyama (Esquema 12). Esta tercera síntesis total fue llevada a cabo en 31 pasos, siguiendo la secuencia lineal más larga con un rendimiento global del 1.7%.



Esquema 13: Síntesis formal de trabectedina desarrollada por el grupo de Danishefsky.

Posteriormente, el grupo de Williams (Universidad del Estado de Colorado) publicó una segunda síntesis formal de trabectedina (Fishlock and Williams, 2008) a partir de los compuestos **44** y **58**, precursores de **59**, **60** y **62**, llegando finalmente al producto **55**, un intermedio también en la síntesis formal propuesta por el grupo de Danishefsky (Esquema 14).



Esquema 14: Síntesis formal de trabectedina desarrollada por el grupo de Williams.

4.4. Comparación de las diferentes síntesis de trabectedina

En la Tabla 1 aparecen recogidos una serie de datos relacionados con las distintas síntesis realizadas hasta la fecha de trabectedina. Como se comentó anteriormente, la primera síntesis fue realizada por el grupo de Corey (Universidad de Harvard) en 1996 (Corey *et al.*, 1996). En esta síntesis convergente eran necesarios 41 pasos de reacción a través de la secuencia más larga, siendo el rendimiento global del 0.48%. El mismo grupo de investigación llevó a cabo otra síntesis cuatro años después (Martínez and Corey, 2000), mejorando el rendimiento global (0.72%) y acortando las etapas (de 41 a 35). En 2002 Fukuyama (Universidad de Tokio) publicó una tercera síntesis total que comprendía 50 pasos de reacción con un rendimiento global del 0.56% (Endo *et al.*, 2002), no aportando una mejora a la segunda síntesis del grupo de Corey. El rendimiento global más alto (1.7%) con el menor número de etapas de reacción (31) se logró a través de la síntesis llevada a cabo por el grupo de Zhu (Universidad de Paris-Sud) en 2006 (Chen *et al.*, 2006). Aparentemente esta sería la estrategia más atractiva. Por lo que respecta a las síntesis formales, Danishefsky (Universidad de Columbia) preparó en 2006 un intermedio de reacción **57**, en 30 pasos con un rendimiento global del 0.35% (Zheng *et al.*, 2006). El compuesto **57** era un intermedio de reacción de la síntesis total llevada a cabo por Fukuyama, siendo necesarios 9 pasos adicionales más según esta síntesis para llegar a la trabectedina. Si consideramos estos 9 pasos con sus rendimientos, la síntesis formal propuesta por Danishefsky sería un proceso de 39 pasos

con un rendimiento global del 0.089%. Otra síntesis formal fue llevada a cabo por Williams (Colorado), necesitando de 22 etapas de reacción para preparar el compuesto **55** con un rendimiento del 1.74% (Fishlock and Williams, 2008). Este compuesto era un intermedio en la síntesis formal propuesta por Danishefsky, siendo necesarios 5 pasos de reacción adicionales para llegar al compuesto **57**, y 9 más según la síntesis de Fukuyama para preparar la trabectedina. Por lo tanto, en la síntesis formal del Williams serían necesarios 36 pasos de reacción con un rendimiento global del 0.075%. Ninguna de las síntesis formales representa una mejora sobre las síntesis totales existentes. Finalmente, la semisíntesis desarrollada por la empresa Pharmamar en el año 2000 en la que se parte de un intermedio de síntesis avanzado (Cuevas *et al.*, 2000), la cianosafracina B, obtenido por fermentación y pudiendo disponer del mismo en cantidades de kilogramos, es la más eficiente en cuanto a número de etapas (solamente 21), siendo el rendimiento global del 1%.

Tabla 1: Comparación de los rendimientos obtenidos en las diferentes síntesis de trabectedina.

Grupo de investigación	Año de publicación	Etapas de la secuencia sintética más larga	Rendimiento global
Corey	1996	41	0.48%
Corey	2000	35	0.72%
Fukuyama	2002	50	0.56%
Zhu	2006	31	1.7%
Danishefsky	2006	30 [+9(Fukuyama)]	0.35% (0.089%) ^a
Williams	2008	22 [+5(Danishefsky)+9(Fukuyama)]	1.74% (0.075%) ^b
Pharmamar	2000	21	1.0% ^c

^a Síntesis formal. Entre paréntesis aparece el rendimiento que se obtendría teniendo en consideración los 9 pasos de la síntesis total de Fukuyama. ^b Síntesis formal. Entre paréntesis aparece el rendimiento que se obtendría teniendo en consideración los 5 y 9 pasos de la síntesis de parcial de Danishefsky y total de Fukuyama, respectivamente. ^c Semisíntesis.

Hay que destacar la importancia del desarrollo de rutas sintéticas que permitan la preparación de moléculas complejas (productos naturales) que presenten interés por su actividad biológica. En ocasiones la baja concentración en la que se encuentran en la naturaleza hace inviable el disponer de cantidades suficientes para poder ser aprovechadas, por lo que su síntesis sería la única alternativa viable. Por otro lado, la estrategia de síntesis desarrollada no solamente permite acceder al producto natural objetivo, sino que también se pueden preparar derivados estructurales en los que en función de las diferencias introducidas con respecto a la estructura original, se puede

llegar a modular la actividad que presentan, haciendo que sean más potentes frente al efecto deseado, o bien minimizando efectos secundarios no deseados que pudieran tener.

5. Actividad farmacológica

Para poder conocer claramente el mecanismo de acción de un fármaco es necesario realizar una serie de estudios a través de las fases preclínicas y clínicas. Se estima que de cada diez mil moléculas analizadas, tan solo unas doscientas cincuenta pasan a los ensayos preclínicos. Una vez completado el desarrollo preclínico sobre modelos experimentales en laboratorio y con previa aceptación de las autoridades sanitarias, comienzan los ensayos clínicos en humanos (Laborda y San Sebastián, 2015).

Tabla 2: Fases de los ensayos clínicos.

Fase I	Se demuestra la seguridad del compuesto y orienta sobre la pauta de administración.
Fase II	Estudios terapéuticos exploratorios. Proporciona información preliminar sobre la eficacia del producto y establecen la relación dosis-respuesta.
Fase III	Estudios terapéuticos de confirmación. Evalúa la eficacia y seguridad del tratamiento.
Fase IV	Fase de fármaco-vigilancia durante la utilización rutinaria del producto, una vez que ha sido comercializado.

Las ecteinascidinas son buenas candidatas para el tratamiento de varios cánceres humanos, ya que se ha demostrado que son capaces de eliminar células tumorales *in vitro*, inhibir el crecimiento celular *in vivo*, suprimir el rechazo de aloinjertos, disminuir reacciones a los injertos de tejido e inhibir la proliferación de linfocitos. Poseen dos mecanismos de acción principales: son agentes alquilantes y actúan sobre la tubulina produciendo la desagregación de complejos de microtúbulos (Jeedigunta *et al*, 2000).

La EMEA propuso la trabectedina como un agente capaz de bloquear la activación de la transcripción de un subconjunto de genes inducibles sin afectar a su expresión constitutiva. Para determinar las especificaciones de sustancias activas se utilizaron pruebas para la descripción, identificación (IR, HPLC y rotación óptica), ensayo (HPLC), contenido en agua (determinación coulométrica), impurezas (HPLC), disolventes residuales (GC), metales pesados, impurezas inorgánicas y endotoxinas bacterianas (EMEA, 2007).

5.1. Mecanismo de acción

Trabectedina pertenece a una nueva clase de agentes antitumorales que se unen al ADN presentando un complejo mecanismo de acción muy diferente al que presentan otros agentes alquilantes del ADN, que se unen al surco menor de la doble hélice de ADN de forma no covalente (Aune *et al*, 2002). Así la trabectedina se une al ADN mostrando una mayor preferencia por los tripletes ricos en GC, y forma uniones covalentes con el nitrógeno que se encuentra en la posición 2 de la guanina, generando una agrupación carbinolamina (D'Incalci *et al*, 2002).

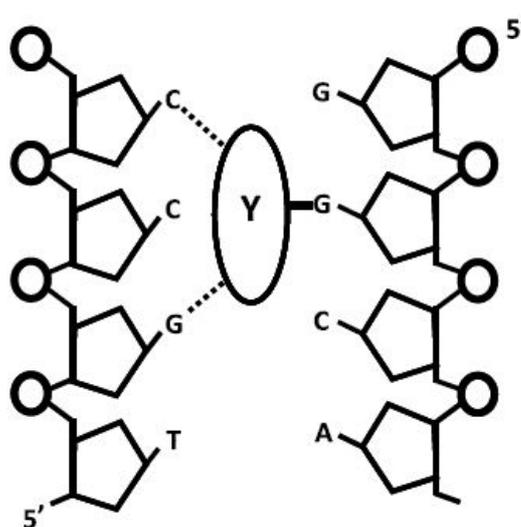


Figura 11: Modo de unión de trabectedina al ADN. Los enlaces covalentes están representados por una línea continua y los puentes de hidrógenos por líneas de puntos.

Esta molécula, como se ha mencionado anteriormente, está compuesta por tres subunidades; dos de ellas (subunidades A y B) son responsables de la unión covalente con el surco menor del ADN, mientras que la tercera (subunidad C) no tiene contacto con él. La unión de trabectedina al ADN cambia su conformación natural provocando una flexión del mismo hacia el surco mayor. Además alquila el N² de la guanina y las hebras del ADN son incapaces de replicarse, causando así la muerte celular (Fayette *et al.*, 2005). La tercera subunidad sobresale hacia fuera del surco menor del ADN lo que permite la interacción con las proteínas nucleares adyacentes. Estas interacciones desencadenan una cascada de eventos que interfieren con varios factores de transcripción, proteínas de unión del ADN y vías de reparación del ADN (Hurley and Zewail-Foote, 2001). La característica más anómala de trabectedina, que hace que su

mecanismo de acción sea único en comparación con otros fármacos antitumorales clásicos, es la respuesta atípica en las células afectadas en la reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Damia *et al.*, 2001). Una de las proteínas de unión que interactúa con la subunidad C de la trabectedina es XPG, un miembro del sistema NER. De esta manera, la trabectedina afecta a la actividad del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (TC-NER) (Herrero *et al.*, 2006). Las proteínas NER están implicadas en la reparación de daños causados por la unión al ADN de fármacos de uso común en el tratamiento del cáncer, tales como cis-platino [cis-diaminodicloroplatino(II)] o mitomicina C. Como consecuencia de esto, los defectos en el sistema NER, por lo general, aumentan la efectividad de los fármacos anticancerígenos (Erba *et al.*, 2001).

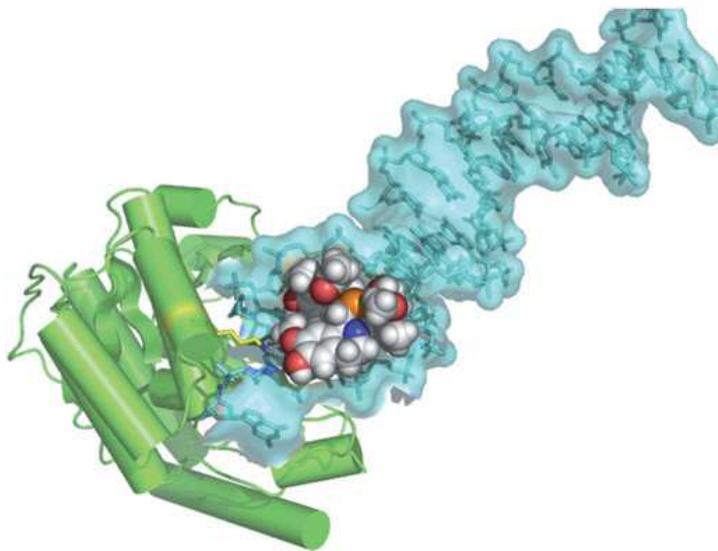


Figura 12: Unión de trabectedina al complejo ADN-XPG.

En ausencia de trabectedina, TC-NER reconoce y elimina las lesiones del ADN, utilizando la hebra no dañada como plantilla (Sugasawa, 2008). En presencia de trabectedina, la maquinaria TC-NER es enviada a la región en la que se encuentra el aducto de ADN en un intento de corregir la lesión. Pero esta acción es bloqueada creando fuertes complejos citotóxicos que provocarán roturas en el ADN y causarán la muerte celular (Soares *et al.*, 2007). Por lo tanto, mientras que otros agentes que interactúan con el ADN requieren un mecanismo NER deficiente, se demostró que un sistema NER deficiente disminuye la sensibilidad a la trabectedina por lo que necesita un sistema NER competente para ejercer su actividad citotóxica (Takebayashi *et al.*, 2001). Los procesos de recombinación homóloga (HR) y recombinación no homóloga (NHEJ) están implicadas en la reparación de las roturas de la doble cadena del ADN

(DSB) y fueron también investigados en el mecanismo de acción de trabectedina. Si las células continúan proliferando, los complejos ternarios (trabectedina-DNA-XPG) paralizarán la replicación durante la fase S e inducirán lesiones en el ADN que necesitan ser reparadas mediante HR. Se demostró que las células deficientes de HR, debido a daños o anomalías en sus proteínas, eran aproximadamente 100 veces más sensibles a la trabectedina (Tavecchio *et al.*, 2008). Sin embargo, no se observaron diferencias en células deficientes de NHEJ (Herrero *et al.*, 2006). Estudios del ciclo celular revelaron que la trabectedina reduce la velocidad de progresión de las células a través de la fase S hacia la fase G2 y las bloquean en la fase G2-M. Se identificaron una serie de genes que están implicados en la detección del ciclo celular después del tratamiento con trabectedina. Estos genes tienen una función común como reguladores de la transcripción, lo que lleva a la detección del ciclo celular en G2-M (Li *et al.*, 2001).

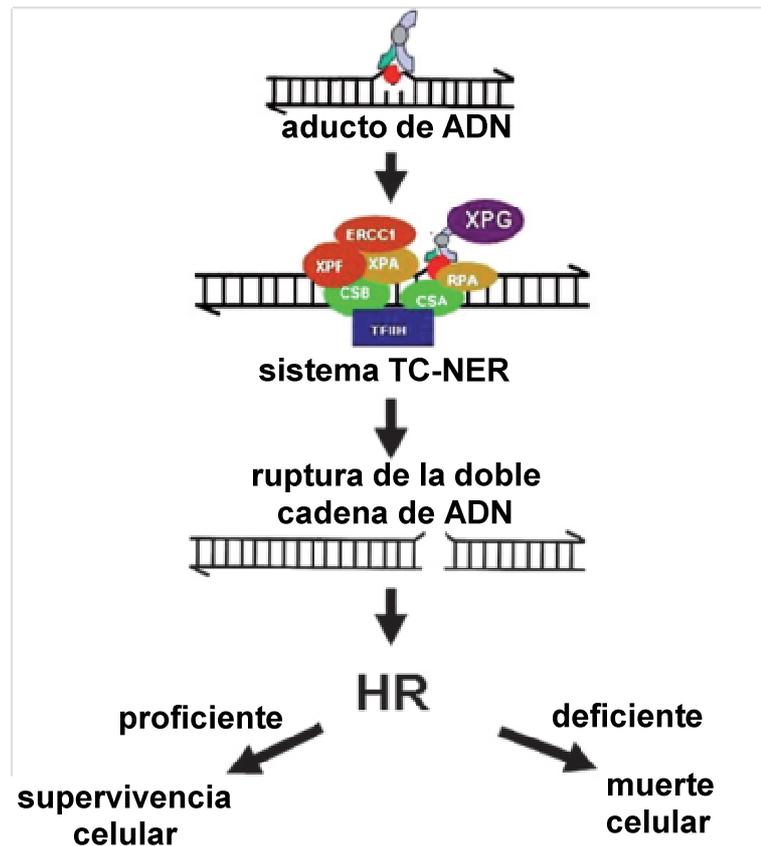


Figura 13: Esquema del mecanismo de acción de la trabectedina.

Por otro lado, se sabe que la trabectedina induce a la apoptosis en diversas células tumorales. Sin embargo, hay pocos estudios que estén de acuerdo con los mecanismos apoptóticos de la misma. Esta actividad se investigó por primera vez en

células del sarcoma de Ewing y osteosarcoma, debido a su fuerte actividad antiproliferativa, y se demostró una inducción significativa de la apoptosis en células del sarcoma de Edwing, pero no en células de osteosarcoma (Scotland *et al.*, 2002). Más tarde también se demostró el efecto apoptótico de trabectedina en células de fibrosarcoma humano HT1080 (Harati *et al.*, 2012), células de leucemia humana HL-60 (Martinez-Serra *et al.*, 2011) y células de cáncer de mama MCF-7. Esta última en tiempo y manera dependiente de la concentración de trabectedina. Otros datos indican que la trabectedina provoca actividad selectiva de las vías de apoptosis intrínsecas y extrínsecas en dos células de cáncer de mama genótipicamente diferentes (Atmaca *et al.*, 2013).

Trabectedina parece actuar también sobre el microambiente tumoral debido a que posee efectos inmunomoduladores potentes, siendo selectivamente citotóxica frente a monocitos y macrófagos asociados a tumores. Además, inhibe la producción de mediadores proinflamatorios y angiogénicos, lo que induce cambios en el microambiente tumoral y contribuyen a su actividad antitumoral. Esta oportunidad de combinar la actividad citotóxica directa con una capacidad de modificar el microambiente tumoral es especialmente atractiva terapéuticamente para una amplia gama de tipos de cáncer (D'Incalci, 2013).

5.2. Estudios preclínicos y clínicos

Los estudios preclínicos han aportado importantes descubrimientos que han sido de gran utilidad para llevar a cabo el desarrollo clínico de trabectedina. Los primeros estudios preclínicos *in vitro* para trabectedina fueron realizados por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) (Cuevas and Francesch, 2009). En este estudio se analizaron 60 células tumorales humanas que identificaron la potente actividad de fármaco. Más tarde, el efecto antitumoral de la trabectedina fue investigado en una serie de xenoinjertos murinos y sarcomas de origen humano. Los resultados obtenidos (Tabla 3) muestran que la trabectedina tuvo efectos antitumorales significativos en cinco modelos de xenoinjertos murinos o de origen humano, produciendo un 33-76% de inhibición del crecimiento tumoral con dosis de entre 0,12 hasta 0,6 mg/m²/tratamiento (EMEA, 2007).

Tabla 3: Efecto antitumoral en xenoinjerto murino y sarcomas de origen humano.

Origen del tumor	Línea celular	Dosis (mg/m ² /día)	Inhibición del crecimiento tumoral (%)
Fibrosarcoma de ratón	UV2237	0.6	63
Reticulosarcoma de ovario de ratón	M5076	0.45	64
Sarcina de cartílago humano	CHSA	0.3	76
Osteosarcoma humano	OSA-FH	0.12	67
Rabdomiosarcoma humano	TE-671	0.6	33

Otros estudios preclínicos in vitro y en vivo han demostrado que la trabectedina provoca hepatotoxicidad. Los fármacos citotóxicos, como la trabectedina, suelen causar mucha toxicidad, siendo esta similar en seres humanos y animales. Este potencial hepatotóxico se observó por primera vez en ratones, ratas, perros y monos, dando como resultado que la hepatotoxicidad de trabectedina en humanos es reversible, por lo que un control sobre los niveles de enzimas hepáticas permitió un mayor control de la seguridad de trabectedina para su desarrollo clínico con humanos (Beumer *et al.*, 2005). Es de destacar que existen muchos efectos secundarios que son comúnmente inducidos por quimioterapia citotóxica y resultan desagradables para los pacientes, como por ejemplo, alopecia, mucositis, diarrea, cistitis hemorrágica, etc. Sin embargo, la terapia con trabectedina no suele causar problemas que puedan poner en peligro la vida, como son neurotoxicidad, toxicidad pulmonar, toxicidad renal o cardiotoxicidad, por lo que ha demostrado ser un fármaco relativamente seguro, en cuanto a su toxicidad, en la lucha contra el cáncer, después del fracaso de otros tratamientos estándar anteriores (Le Cesne *et al.*, 2012). Trabectedina ejerce una actividad antiproliferativa in vitro y en vivo contra una variedad de células tumorales humanas (Jiménez *et al.*, 2007), incluyendo sarcoma de tejido blando, cáncer de mama, de pulmón, de ovario y melanoma (EMEA, 2007) (Tabla 4).

Tabla 4: Actividad in vitro de trabectedina en diferentes líneas celulares de cáncer humano.

Tipo de tumor	Línea celular	Tiempo de exposición (h)	IC ₅₀ (nM)
Fibrosarcoma	HT-1080	72	0.0002
Liposarcoma	HS-18	72	0.06
	SW872	96	0.5
	1455	96	0.1
Rabdomiosarcoma	RD	48	4
Rabdomiosarcoma alveolar	RH30	48	1.5
Carcinoma de colon	HCT-116	72	0.50
	HCT-116	96	0.16
	SW480	96	0.68
Carcinoma de mama	MCF-7	72	0.50
	MCF-7	96	1.5
	MX-1	96	0.1
Sarcoma de Ewing	TC-71	72	0.23
	EW8	48	0.5
Osteosarcoma	U-2 OS	48	4
	U-2 OS	96	0.42
Carcinoma de pulmón	A-549	72	1.0
Carcinoma de próstata	PC-3	72	0.70
Melanoma maligno	A375	72	0.15
Carcinoma hepático	Hep G2	48	0.36-1.07

Durante los ensayos clínicos se observó algo que no se había predicho durante el desarrollo preclínico: los sarcomas de tejidos blandos (STS) eran más sensibles a la trabectedina que otros tumores sólidos. Este hallazgo procede de la observación de respuestas y estabilizaciones prolongadas de la enfermedad en pacientes con STS durante la fase I de los ensayos clínicos y, posteriormente, durante la fase II fue confirmada esta hipótesis (D'Incalci and Jimenez, 2003). La comercialización del fármaco Yondelis fue aprobada en septiembre de 2007 en la Unión Europea para el tratamiento de pacientes adultos con STS en un estado avanzado y en los cuales haya fracasado el tratamiento con antraciclinas e ifosfamida (EMEA, 2007) o bien, que no son adecuados para recibir dichos tratamientos. Del mismo modo, resultados de ensayos clínicos en fase III realizado a 672 pacientes con cáncer de ovario previamente tratado mostraron beneficios estadísticamente significativos y clínicamente relevantes para el tratamiento combinado de trabectedina con doxorubicina liposomal pegilada (DLP) (Le Cesne *et al.*, 2012), cuya comercialización fue aprobada en Europa en 2009 para pacientes con cáncer de ovario recurrente y sensible al cisplatino.

6. Situación actual del fármaco Yondelis®

Trabectedina fue aislada del tunicado caribeño *E. turbinata* y comenzó a investigarse por su citotoxicidad hace ya veinte años. Los primeros ensayos clínicos con trabectedina no se iniciaron hasta finales del siglo XX. Fue comercializado por la empresa PharmaMar bajo el nombre de Yondelis® y su comercialización se aprobó en Europa en el año 2007, pero en EEUU fue rechazada inicialmente en 2009. Finalmente, en el año 2015, Yondelis® fue autorizado por la FDA de EEUU para el tratamiento de sarcomas de tejidos blandos (Sawadogo *et al.*, 2013).

Actualmente Yondelis® está aprobado en casi ochenta países de Europa, Norteamérica, Asia y América del Sur para el tratamiento como agente único de sarcomas de tejidos blandos avanzados, o subtipos específicos de L-sarcomas. Treinta y un países de estos ochenta pertenecen al Espacio Económico Europeo (EEE). También está aprobado en setenta países fuera de Estados Unidos para el tratamiento de cáncer de ovario recurrente y sensible a platino en combinación con Doxil®/Caelyx® (doxorubicina liposomal pegilada). PharmaMar desarrolla y comercializa Yondelis® en Europa, mientras que Janssen Products tiene los derechos para desarrollar y vender Yondelis® en el resto del mundo excepto en Japón, donde Pharmamar firmó un acuerdo de licencia con Taiho Pharmaceutical (Pharmamar2, 2016).

En el primer semestre del 2016 permanecían abiertos un total de 10 estudios post-autorización realizados en colaboración con algunos grupos cooperativos europeos, de los cuales se encuentran activos ocho de ellos. El estudio T-SAR (estudio aleatorizado de fase III de trabectedina frente a mejores cuidados de soporte) realizado en Francia por el Grupo Francés del Sarcoma, terminó en el último trimestre de 2015 y ha presentado sus resultados iniciales en la reunión celebrada en Chicago en Junio de 2016, así como el estudio “Trabectedin plus Olaparib in Metastatic or Advanced Sarcomas” (TOMAS) de fase I de trabectedina en combinación con olaparib, un fármaco usado para tratar el cáncer de ovario en pacientes que no han mejorado o han empeorado con al menos tres terapias anteriores. Por otro lado, se han presentado nuevos datos de un subgrupo de pacientes con leiomioma uterino del estudio llamado SAR-3007 llevado a cabo por Janssen Products en el Congreso de la Sociedad de Ginecología Oncológica de EEUU en San Diego, California. Dentro de los avances para el tratamiento de cáncer de ovario en estos últimos años cabe destacar que en EEUU

continúa el ensayo clínico pivotal en la indicación de cáncer de ovario llevado a cabo por Janssen Products. Este estudio constituirá la base de un potencial de registro en EEUU y otros países donde Yondelis® no está aprobado todavía para tratar el cáncer de ovario. Durante el primer trimestre del 2016 había siete estudios post-aprobación activos. Respecto a nuevas combinaciones de trabectedina con otros fármacos para el tratamiento de cáncer de ovario sigue en curso un estudio en fase II promovido por el Instituto Mario Negri de Milán que combina trabectedina con bevazucimab, utilizado en la actualidad para tratar diversos tipos de cáncer en combinación con otros fármacos (Pharmamar1, 2016).

7. Conclusiones

A pesar de que más de la mitad de los medicamentos están basados en productos naturales terrestres, el ambiente marino puede ser el más prometedor a la hora de descubrir nuevas estructuras biológicamente activas debido a que existe una creciente necesidad de nuevas terapias. Aunque el medio marino puede ofrecer varios desafíos, afortunadamente, estos problemas se pueden solucionar usando estrategias como la acuicultura farmacéutica, procesos de síntesis o procesos de semisíntesis, por lo que hay motivos para pensar que los productos naturales marinos serán de gran importancia en el mercado farmacéutico del futuro. El éxito de la trabectedina como fármaco antitumoral tardó bastante tiempo en llegar, sin embargo, actualmente está siendo comercializado en varios países repartidos por casi todo el mundo y se siguen desarrollando nuevos estudios que podrían dar lugar a grandes y prometedores avances.

Concluding remarks

Although more than half of drugs are based on terrestrial natural products, marine environment may be the most promising environment to discovering new biologically active structures because there is a growing need for new therapies. The marine environment can offer several challenges, but fortunately, these problems can be solved using strategies such as pharmaceutical aquaculture, synthesis processes or semi-synthesis processes so there is reason to believe that marine natural products will be of great importance in the pharmaceutical market in the future. The success of trabectedin as an antitumor drug took a long time to arrive, however, it is currently being marketed in several countries across almost the world and continue to develop new studies that could lead to great and promising progress.

8. Bibliografía

Arai, T., Takahashi, K., Nakahara, S. and Kubo, A. (1980). The structure of a novel antitumor antibiotic, saframycin A. *Cellular and Molecular Life Sciences* 36: 1025-1027.

Atmaca, H., Bozkurt, E., Uzunoglu, S. and Karaca, B. (2013). A diverse induction of apoptosis by trabectedin in MCF-7 (HER2-/ER+) and MDA-MB-453 (HER2+/ER-) breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 221(2): 128-136.

Aune, G.T., Futura, T. and Pommier, Y. (2002). Ecteinascidin 743: a novel anticancer drug with a unique mechanism of action. *Anticancer Drugs*, 13: 545-555.

Bergmann, W. and Stempien, M.F. (1957). Contributions to the study of marine products. XLIII. The nucleosides of sponges. V. The synthesis of spongiosine. *The Journal of Organic Chemistry*, 22: 1575-1577.

Beumer, J.H., Schellens, J.H.M and Beijnen, J.H. (2005). Hepatotoxicity and metabolism of trabectedin: a literature review. *Pharmacological Research*, 51: 391-398.

Carballo, J.L. (2000). Distribución de Ecteinascidia turbinata (Ascidiacea: Perophoridae) en los manglares de la Península de Yucatán, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, 48(2-3): 365-369.

Carballo, J.L., Naranjo, S., Kukurtzú, B., de La Calle, F. and Hernández-Zanuy, A. (2000). Production of Ecteinascidia turbinata (Ascidiacea: Perophoridae) for obtaining anticancer compounds. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(4): 481-490.

Chen, J., Chen, M., Bois-Choussy, M. and Zhu, J. (2006) Total Synthesis of Ecteinascidin 743. *Journal of the American Chemical Society* 128: 87-89.

Corey, E.J. and Gin, D.Y. (1996). A Convergent Enantioselective Synthesis of the Tetrahydroisoquinoline Unit in the Spiro ring of Ecteinascidin 743. *Tetrahedron Letters* 37: 7163-7166.

Corey, E.J., Gin, D.Y. and Kania, R.S. (1996). Enantioselective Total Synthesis of Ecteinascidin 743. *Journal of the American Chemical Society* 118: 9202-9203.

Cuevas, C., Pérez, M., Martín, M.J., Chicharro, J.L., Fernández-Rivas, C., Flores, M., Francesch, A., Gallego, P., Zarzuelo, M., de la Calle, F., Garcia, J., Polanco, C., Rodríguez, I. and Manzanares, I. (2000). Synthesis of Ecteinascidin ET-743 and Phthalascidin Pt-650 from Cyanosafraicin B. *Organic Letters* 2: 2545-2548.

Cuevas, C. and Francesch, A. (2009). Development of Yondelis® (trabectedin, ET-743). A semisynthesis process solves the supply problem. *Natural Products Reports*, 26: 322-337.

Damia, G., Silvestri, S., Carrasca, L., Filiberti, L., Faircloth, G.T., Liberti, G., Foiani, M. and D'Incalci, M. (2001). Unique pattern of ET-743 activity in different cellular systems with defined deficiencies in DNA-repair pathways. *International Journal of Cancer*, 92: 583-588.

De la Calle, F. (2007). Fármacos de origen marino. *Treballs de la SCB*, 58: 141-155.

D'Incalci, M. (2013). Trabectedin mechanism of action: what's new?. *Future Oncology*, 9: 5-10.

D'Incalci, M., Erba, E., Damia, G., Galliera, E., Carrasca, L., Marchini, S., Mantovani, R., Tognon, G., Fruscio, R., Jimeno, J. and Faircloth, G.T. (2002). Unique features of the mode of action of ET-743. *The oncologist*, 7: 210-216.

D'Incalci, M. and Jimeno, J. (2003). Preclinical and clinical results with the natural marine product ET-743. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 12: 1843-1853.

Duckworth, A.R., Samples, G.A., Wright, A.E. and Pomponi, S.A. (2004). In vitro culture of the ascidian *Ecteinascidia turbinata* to supply the antitumor compounds ecteinascidins. *Aquaculture*, 241(1-4): 427-439.

EMA (2007). Scientific Discussion (<https://www.nice.org.uk/guidance/ta185/documents/emea-scientific-discussion2>).

Endo, A., Yanagisawa, A., Abe, M., Tohma, S., Kan, T. and Fukuyama, T. (2002). Total Synthesis of Ecteinascidin 743. *Journal of the American Chemical Society*, 124: 6552-6554.

Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G.T. and D'Incalci, M. (2001). Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *European Journal of Cancer*, 37, 97-105.

Fajarningsih, N.D. (2012). An emerging marine biotechnology: Marine drug discovery. *Squalen*, 7(2): 88-98.

Fayette, J., Coquard, I.R., Albert, L., Ranchère, D., Boyle, H. and Blay, J.Y. (2005). ET-743: A novel agent with activity in soft tissue sarcomas. *Oncologist*, 10(10): 827-832.

FDA (2015). U.S Food and Drug Administration. Trabectedin. (23 Octubre 2015 <http://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm468914.htm>) (Consultada el 12 de Enero de 2016).

Fishlock, D. and Williams R.M. (2008). Synthetic Studies on Et-743. Assembly of the Pentacyclic Core and a Formal Total Synthesis. *Journal of Organic Chemistry* 73: 9594-9600.

García-Cagide, A., Hernández-Zanuy, A. and Cárdenas, A. (2005). Fecundity and early larval development of the ascidian *Ecteinascidia turbinata* (Ascidiacea: Perophoridae) in Cuba. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR*, 34(1): 141-159.

Gerwick, W.H. and Moore, B.S. (2012). Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chemistry and Biology*, 19(1): 85-98.

Gordaliza, M. (2015). Handbook of anticancer drugs from Marine Origin,- Chapter 35: Cytotoxic terpene-purines and terpene-quinones from the sea. Springer. 805 pp.

Harati, K., Chromik, A.M., Bulut, D., Goertz, O., Hahn, S., Hirsch, T., Klein-Hitpass, L., Lehnhardt, M., Uhl, W. and Daigeler, A. (2012). TRAIL and taurolidine enhance the anticancer activity of doxorubicin, trabectedin and mofosfamide in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Anticancer Research*, 32(7): 2967-2984.

Hernández-Zanuy, A., García-Cagide, A, Borrero, N. and Carballo, JL. (2007). Alimentación de la ascidia *Ecteinascidia turbinata* (Ascidia: Perophoridae) en dos áreas de manglar de Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 55(2): 499-507.

Herrero, A.B., Martin-Castellanos, C., Marco, E., Gago, F. and Moreno, S. (2006). Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Research*, 66: 8155-8162.

Hurley, L.H. and Zewail-Foote, M. (2001). The antitumor agent ecteinascidin 743: characterization of its covalent DNA adducts and chemical stability. *Adv Exp Med Biol*, 500: 289-299.

Ikeda, Y., Shimada, Y., Honjo, K., Okumoto, T. and Munakata, T. (1983). Safracins, new antitumor antibiotics. *Journal of Antibiotics* 36: 1290-1294.

Ikeda, Y., Idemoto, H., Hirayama, F., Yamamoto, K., Iwao, K., Asao, T. and Munakata, T. (1983). Safracins, New Antitumor Antibiotics. *Journal of Antibiotics* 36: 1279-1283.

Irschik, H., Trowitzsch-Kienast, W., Gerth, K., Hofle, G. and Reichenbach, H. (1988). Saframycin Mx1, a new natural saframycin isolated from a myxobacterium. *Journal of Antibiotics* 41: 993-998.

Jeedigunta, S., Krenisky, J.M. and Kerr, R.G. (2000). Diketopiperazines as advanced intermediates in the biosynthesis of Ecteinascidins. *Tetrahedron*, 56: 3303-3307.

Kerr, R.G. and Miranda, N.T. (1995). Biosynthetic Studies of Ecteinascidins in the Marine Tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Natural Products* 58: 1618-1621.

Kim, S. and Kalimuthu, S. (2015). Handbook of anticancer drugs from Marine Origin,- Chapter 1: Introduction to anticancer drugs from marine origin. Springer. 805 pp.

Koketsu, K., Watanabe, K., Suda, H., Oguri, H. and Oikawa, H. (2010). Reconstruction of the saframycin core scaffold defines dual Pictet-Spengler mechanisms. *Nature Chemical Biology* 6: 408-411.

Kong, D.X., Jiang, Y.Y. and Zhang, H.Y. (2010). Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. *Drug Discovery Today*, 15: 884-886.

Laborda, A.J. y San Sebastian, M.M. (2015). Drogas marinas: la fauna marina como fuente de compuestos antitumorales. *AmbioCiencias*, 13: 34-51.

Le cesne, A., Youine, A., Blay, J., Delalogue, S., Make, R.G., Misset, J., Frontelo, P., Nieto, A. and Jiao, J.J. (2012). A retrospective pooled analysis of trabectedin safety in 1132 patients with solid tumors treated in phase II clinical trials. *Investigational New Drugs*, 30: 1193-1202.

Li, W.W., Takahashi, N., Jhanwar, S., Cordon-Cardo, C., Elisseyeff, Y., Jimeno, J., Faircloth, G. and Bertinon, J.R. (2001). Sensitivity of soft tissue sarcoma cell lines to chemotherapeutic agents: identification of ecteinascidin-743 as potent cytotoxic agent. *Clinical Cancer Research*, 7(9): 2908-2911.

Liu, Y. (2012). Renaissance of Marine Natural Product Drug Discovery and Development. *Marine Sci Res Development*, 2: 106.

Lyerla, T.A., Lyerla, J.H. and Fisher, M. (1975). Pigmentation in the orange tunicate, *Ecteinascidia turbinata*. *The biological bulletin*, 149(1): 178-185.

Martinez, E.J. and Corey E.J. (2000). 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* 2: 993-996.

Martinez-Serra, J., Maffiotte, E., Martin, J., Bex, T., Navarro-Palou, M., Ros, T., Plazas, J.M., Vögler, O., Gutiérrez, A., Amat, J.C., Ramos, R., Sauz, C., Ginés, J., Alemany, R., Diaz, M. and Besalduch, J. (2011). Yondelis® (ET-743, trabectedin) sensitizes cancer cell lines to CD95-mediated cell death: new molecular insight into the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, 658(2-3): 57-64.

Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H. and Santos, S. (2014). Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine Drugs*, 12: 1066-1101.

Mayer, A.M.S., Glaser, K.B., Cuevas, C., Jacobs, R.S., Kem, W., Little, R.D., McIntosh, J.M., Newman, D.J., Potts, B.C. and Shuster, D.E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31: 255-265.

- Miguélez, F. (2010). Los otros usos del mar. Netbiblo, La Coruña, 153 pp.
- Molinski, T.M., Dalisay, D.S., Lievens, S.L. and Saludes, J.P. (2009). Drug development from marine natural products. *Natural Reviews Drug Discovery*, 8: 69-85.
- Montaser, R. and Luesch, H. (2011). Marine natural products: a new wave of drugs?. *Future Med. Chem*, 3(12): 1475-1489.
- Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Shangxiao, L., Battershill, C.N. and Duckworth, A.R. (1999). The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J Biotechnol*, 70: 15-25.
- Pharmamar1 (2016). Informe a 31 de Marzo de 2016 (<https://www.pharmamar.com/wp-content/uploads/2016/04/INFORME-MARZO-2016.pdf>).
- Pharmamar2 (2016). Informe a 19 de Mayo de 2016 (<https://www.pharmamar.com/wp-content/uploads/2016/05/HECHO-RELEVANTE-PHARMA-MAR-19.05.2016.pdf>).
- Petersen, J.K. (2006). Ascidian suspension feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 342: 127-137.
- Rath, C.M., Janto, B., Earl, J., Ahmed, A., Hu, F.Z., Hiller, L., Dahlgren, M., Kreft, R., Yu, F., Wolff, J.J., Kweon, H.K., Christiansen, M.A., Håkansson, K., Williams, R.M., Ehrlich, G.D. and Sherman, D.H. (2011). Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. *ACS Chemical Biology* 6: 1244-1256.
- Rinehart, K.L., Holt, T.G., Fregeau, N.L., Stroh, J.G., Keifer, P.A., Sun, F., Li, L.H. and Martin, D.G. (1990). Ecteinascidins 729,743, 745, 759A, 759B, and 770: Potent Antitumor Agents from the Caribbean Tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Organic Chemistry* 55: 4512-4515.
- Sakai, R., Jares-Erijman, E.A., Manzanares, I., Silva Elipe, M.V. and Rinehart, K.L. (1996). Ecteinascidins: putative biosynthetic precursors and absolute stereochemistry. *Journal of the American Chemical Society* 118: 9017-9023.

Sakai, R., Rinehart, K.L., Guang, Y. and Wang, A.H.J. (1992). Additional antitumor ecteinascidins from a Caribbean tunicate: Crystal structures and activities in vivo. *Proceedings of the Natural Academic of Sciences* 89: 11456-11460.

Sanamyan, K., Monniot, C. (2007). *Ecteinascidia turbinata* Herdman, 1880. (<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=103756>) (Consultada el 16 de Abril de 2016).

Sawadogo, W.R., Boly, R., Cerella, C., Teiten, M.H., Dicato, M. and Diederich, M. (2015). A Survey of Marine Natural Compounds and Their Derivates with Anti-cancer Activity Reported in 2012. *Molecules*, 20(4): 7097-7142.

Scotlandi, K., Perdichizzi, S., Manara, M.C., Serra, M., Benini, S., Cerisano, V., Strammiello, R., Mercuri, M., Reverter-Branchat, G., Faircloth, G., D'Incalci, M. and Picci, P. (2002). Effectiveness of ecteinascidin-743 against Drug-sensitive and – resistant bone tumor cells. *Clinical Cancer Research*, 8(12), 3893-3903.

Scott, J.D. and Williams, R.M. (2002). Chemistry and Biology of Tetrahydroisoquinoline Antitumor Antibiotics. *Chemical Reviews* 102: 1669-1730.

Sigel, M.M., Wellham, L.L., Lichter, W., Dudeck, L.E., Gargus, J.L. and Lucas, L.H. (1969). Food-Drugs From the Sea: Proceedings, 1969. Marine Technology Society. 281 pp.

Sigel, M.M., McCumber, L.J., Hightower, J.A., Hayasaka, S.S., Huggins, E.M. Jr. and Davis, J.F. (1983). *Ecteinascidia turbinata* Extract Activates Components of Inflammatory Responses Throughout the Phylogenetic Spectrum. *American Zoologist* 23: 221-227.

Simmons, T.L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. and Gerwick, W.H. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther*, 4(2): 333-342.

Soares, D.G., Escargueil, A.E., Poindessous, V., Sarasin, A., de Gramont, A., Bonatto, D., Herique, J.A. and Larsen, A.K. (2007). Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin-743. *Proc Natl Acad Sci*, 104: 13062-13067.

- Sugasawa, K. (2008). Xeroderma pigmentation genes: functions inside and outside DNA repair. *Carcinogenesis*, 29, 455-465.
- Sweat, L.H. (2009). Smithsonian Marine Station at Fort Pierce. (7 mayo 2009; http://www.sms.si.edu/irlspec/Ectein_turbin.htm) (Consultada el 21 de Abril de 2016).
- Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D.B., Nakayama, K., Emmert, S., Veda, T., Urasaki, Y., Kanzaki, A., Akiyama, S., Popsau, N., Kraemer, K.H. and Pommier, Y. (2001). Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is depend upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Medicine*, 7: 961-966.
- Tavecchio, M., Simone, M., Erba, E., Chiolo, I., Liberti, G., Foiani, M., D'Incalci, M. and Damia, G. (2008). Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *European Journal Cancer*, 44: 609-618.
- Vazquez, E. and Young, C.M. (1996). Responses of compound ascidian larvae to haloclines. *Marine Ecology Progress Series*, 133: 179-190.
- Voss, G.L. (1980). *Seashore life of Florida and the Caribbean*. Dover Publications. Mineola, New York, USA. 199 pp.
- Wright, A.E., Forleo, D.A., Gunawardana, G.P., Gunasekera, S.P., Koehn, F.E. and McConnell, O.J. (1990). Antitumor Tetrahydroisoquinoline Alkaloids from the Colonial Ascidian *Ecteinascidia turbinata*. *The Journal of Organic Chemistry* 55: 4508-4512.
- Young, C.M. and Bingham, B.L. (1987). Chemical defense and aposematic coloration in larvae of the ascidian *Ecteinascia turbinata*. *Marine Biology*, 96(4): 539-544.
- Zheng, J., Chan, X., Furuuchi, T., Wright, B.J.D., Zhou, B., Guo, J. and Danishefsky, S.J. (2006). Stereospecific Formal Total Synthesis of Ecteinascidin 743. *Angewandte Chemie International Edition* 45: 1754-1759.