Organismos marinhos como fonte de novas moléculas para a indústria de fármacos e cosméticos

Roberto G. S. Berlinck
Instituto de Química de São Carlos
Universidade de São Paulo

BIOTA FAPESP-Educação,
Ciclo de Conferências 2013
Ambientes Marinhos e Costeiros

NP BioMar
Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade Marinha -USP

FAPESP

Universidade de São Paulo
Scientia Vincit

Biota FAPESP
O Instituto Virtual da Biodiversidade

Brevíssimo Histórico

Utilização de Fontes de Produtos Naturais → desde Antigüidade

- **Púrpura do Tiro**
- **Papoula**
- **Chinchona**
- **Baiacú**

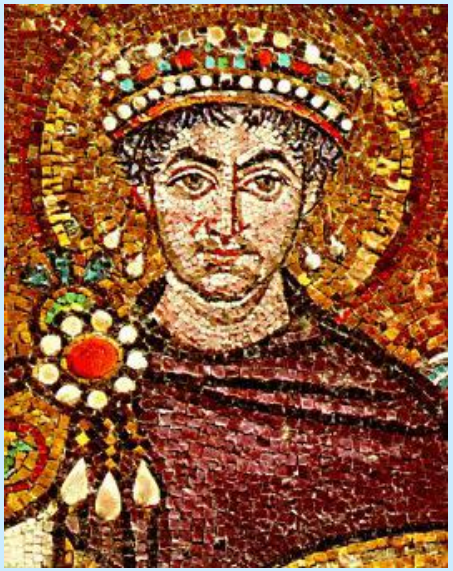
Plantas Medicinais → Idade Média

Início da química de produtos naturais: séculos XVIII e XIX
Química dos venenos e aromatizantes
Primeira metade do século XIX: morfina, estricnina, quinina, cafeína, nicotina, cânfora, cocaína

Púrpura do Tiro

Murex recurvirostris

Murex groschi

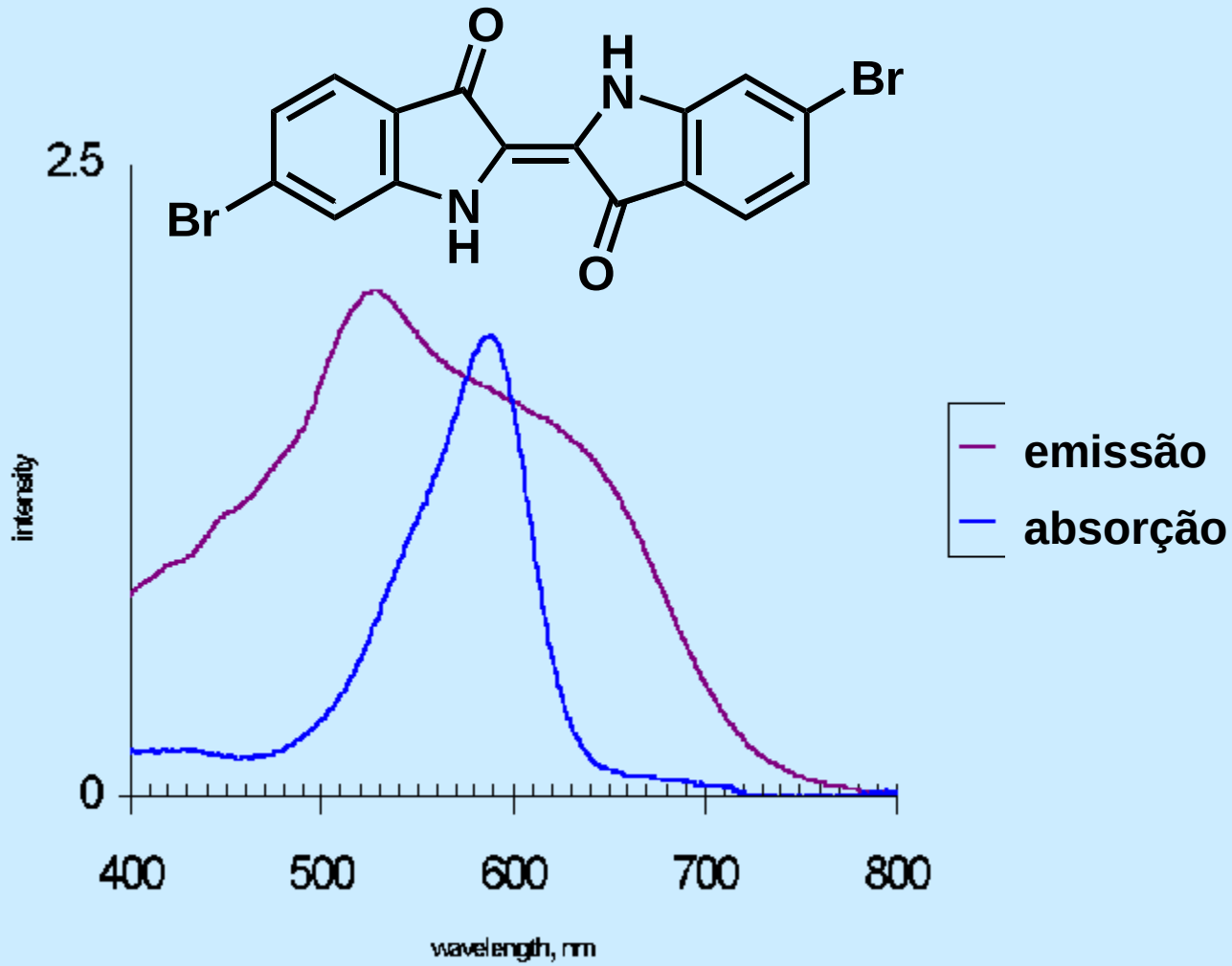


- **Púrpura Real → tingimento do manto de sacerdotes**
- **Mencionada em documentos históricos desde 1600 a.C.**
- **Obtida a partir do muco de moluscos *Murex***
- **Primeira grande indústria química.**
- **Produção terminada em 1453**
- **Substituída por produtos vegetais, até fim século XIX.**

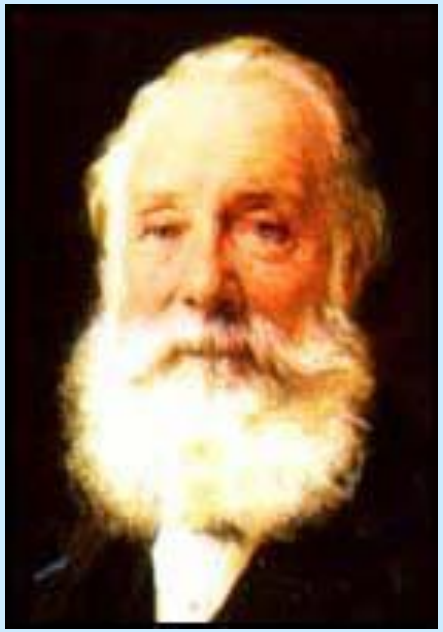
1 g de púrpura do Tiro tinge ½ kg de tecido de algodão
12,000 moluscos fazem 1 g de púrpura do Tiro
Custo: R$ 900,00/kg de tecido tingido com o pigmento

Púrpura do Tiro

- **Estrutura: 1909 (Friedländer, Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1909, 42, 765-770).**



Mauveína – 1º pigmento sintético

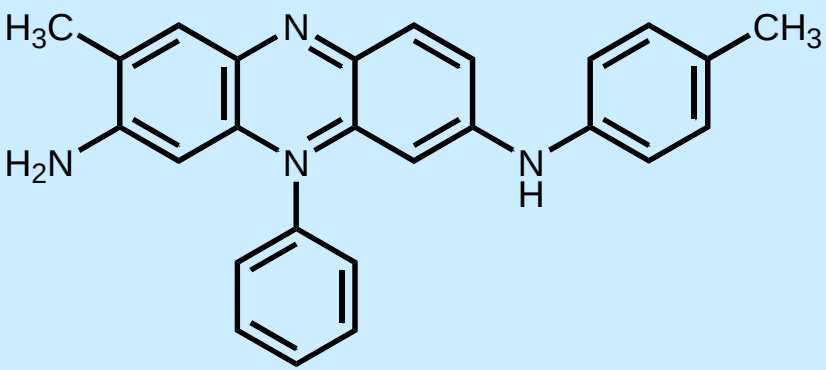


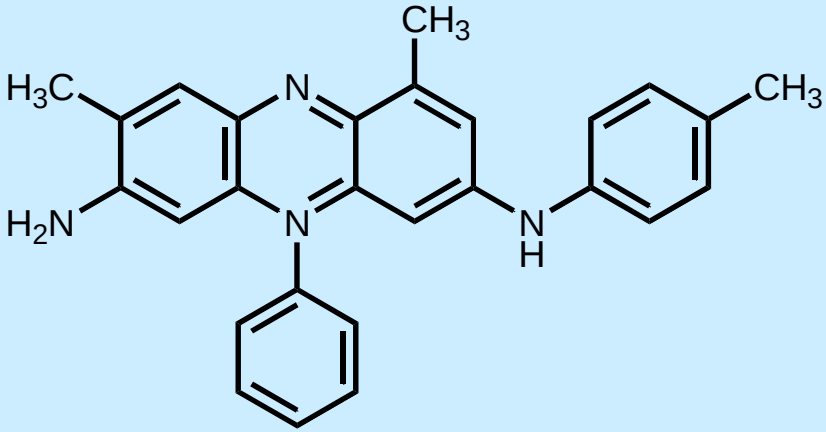
Sir William Perkin

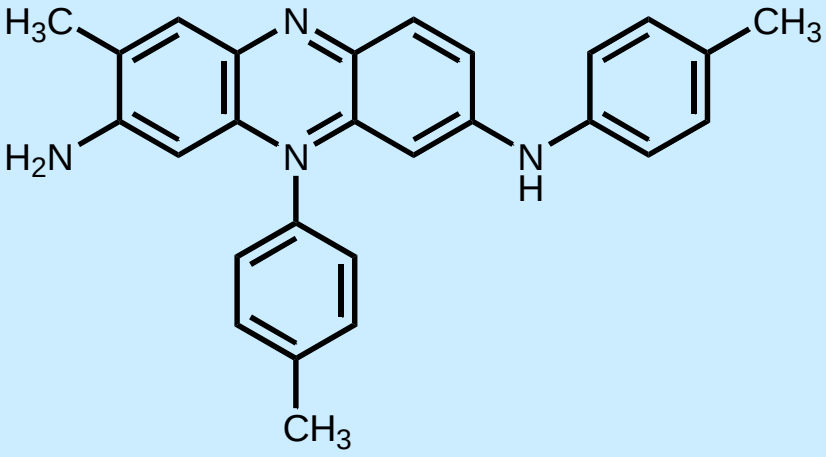
mauveína

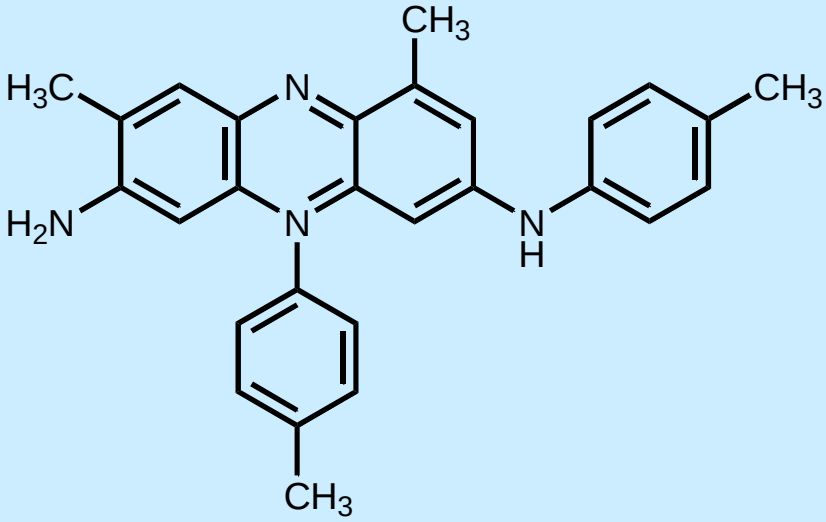
Primeiro pigmento sintético preparado

Mauveína – 1º pigmento sintético

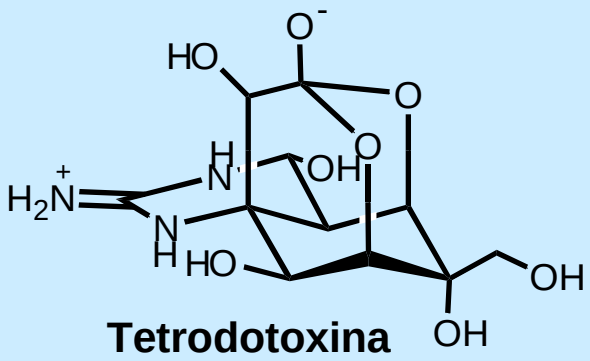








Tetrodotoxina

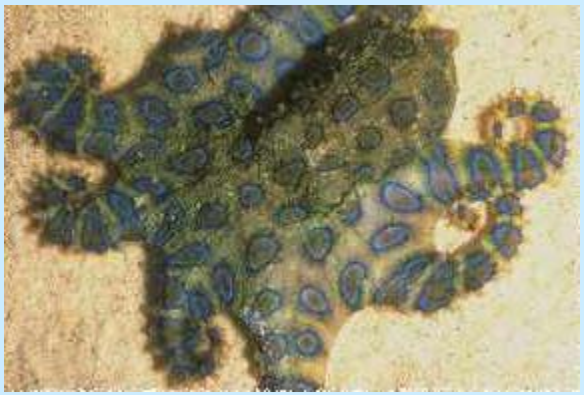


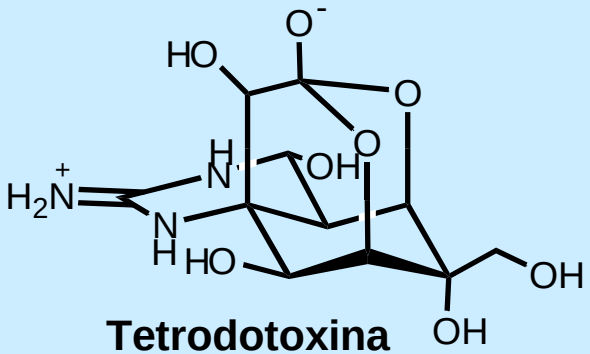
Tetrodotoxina

- **Baiacú → toxidez conhecida desde a antigüidade**
- **Extremamente tóxico**
- **Carne de peixe das mais apreciadas**
- **Casos de morte relatados principalmente no Japão**
- **Isolamento da toxina: Tahara, em 1909.[1]**

1. **Tahara, Y. *Biochemische Zeitschrift*, 1909, *30*, 255-275.**

Tetrodotoxina





Tetrodotoxina

- **Determinação Estrutural → 4 grupos simultaneamente (1964).[2-5]**
- **Características estruturais únicas: densamente funcionalizada, α-hidroxiguanidina e grupo ortoéster**
- **$C_9H_{14}N_3O_8$ → um dos compostos naturais com maior proporção de heteroátomos**
- **Isolada também de caranguejos, polvos, salamandras, sapos, algas e bactérias**

2.Tsuda, Naturwissenshaften, 1966, 53, 171
3. Goto et al., Tetrahedron, 1965, 21, 2059
4. Woodward, Pure Appl. Chem., 1964, 9, 49
5. Mosher et al., Science, 1964, 144, 1100.

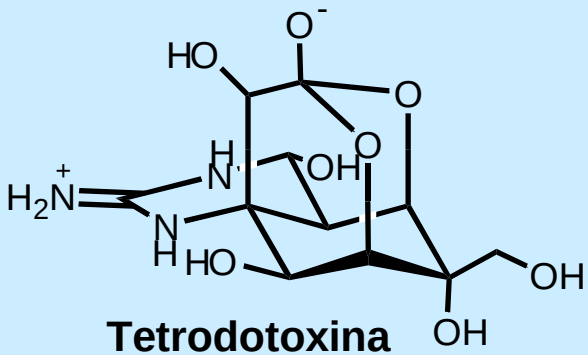
Tetrodotoxina

Tetrodotoxina

Preço catálogo Sigma:
US$ 220.00/1 mg

- **Mais de 20 derivados naturais conhecidos**
- **Síntese total racêmica: uma única → 18 etapas, 28 reações[6]**
- **Síntese total estereosseletiva: 2003!![7,8]**
- **Mecanismo de ação → bloqueador do canal de sódio.**
- **Canal de sódio → transmissão do impulso nervoso**
- **Morte por parada respiratória**

6. Kishi, Y. et al. *J. Am. Chem. Soc*. 1972, 94
7. Hinman A, Du Bois J, *J. Am. Chem. Soc*., 2003, 125, 11510.
8. Ohyabu et al., *J. Am. Chem. Soc*., 2003, 125, 8798.



Tetrodotoxina

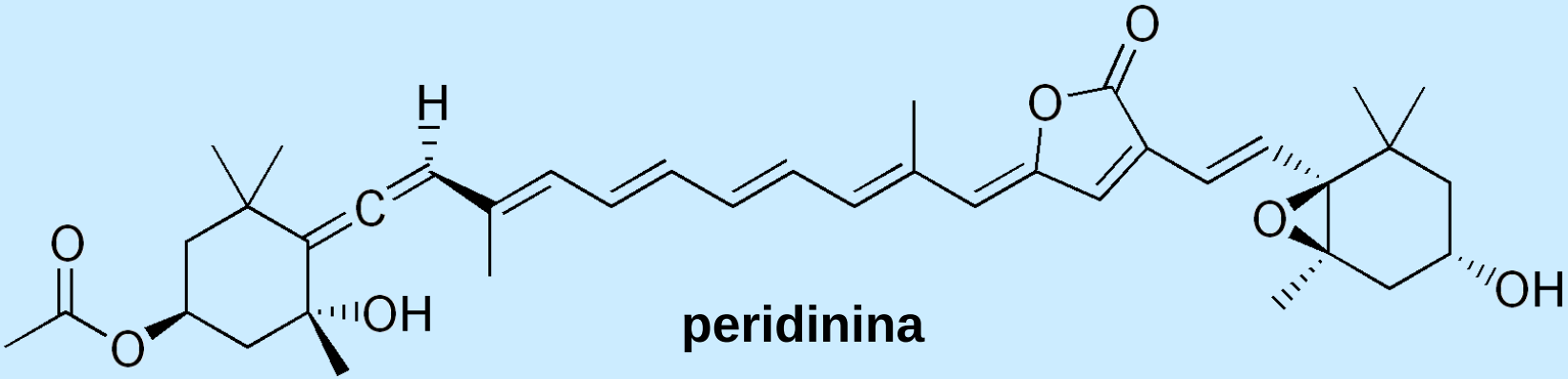
Tetrodotoxina bloqueadora de canais de Na^+

http://www.youtube.com/watch?v=mKalkv9c2iU

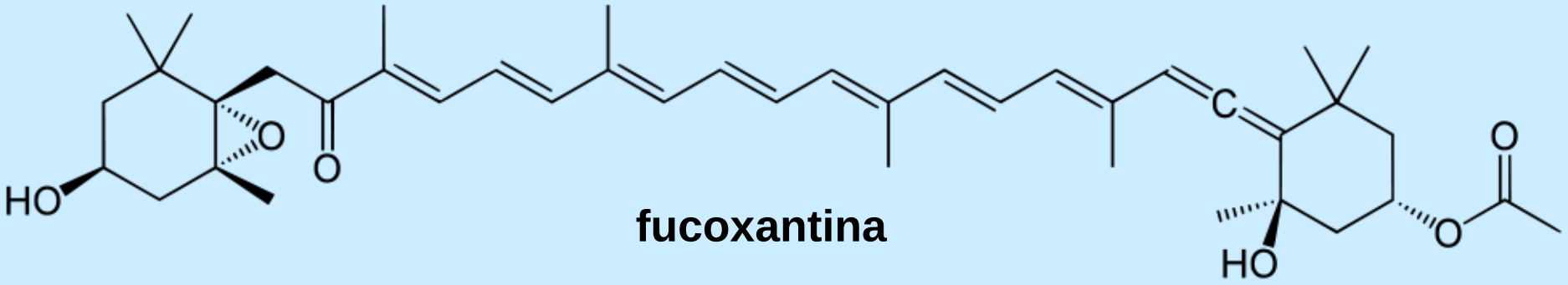
Maré Vermelha

http://www.youtube.com/watch?v=e44Q0MjjXuY

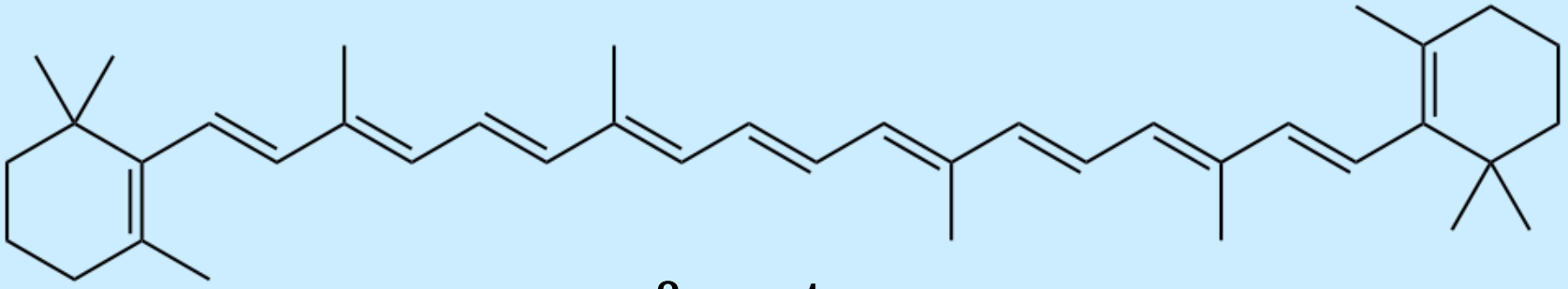
Pigmentos das Marés Vermelhas



peridinina



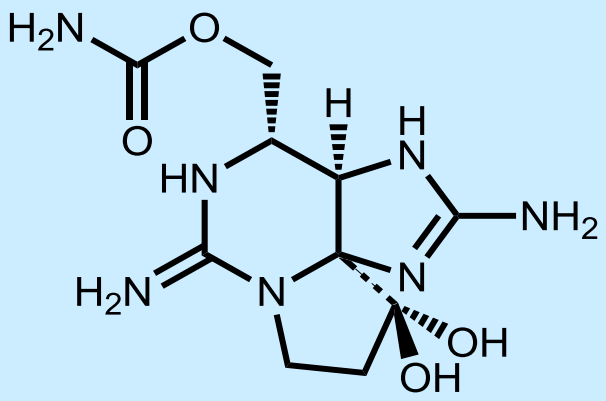
fucoxantina



β-caroteno

Paralytic Shellfish Poisoning

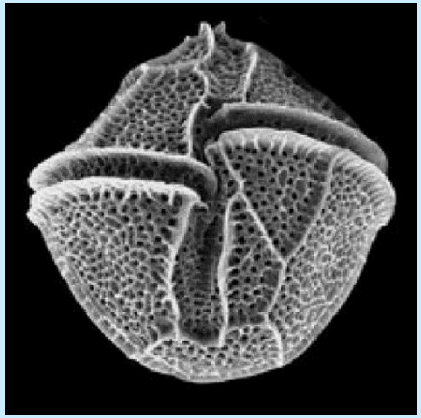
Saxidomus giganteus



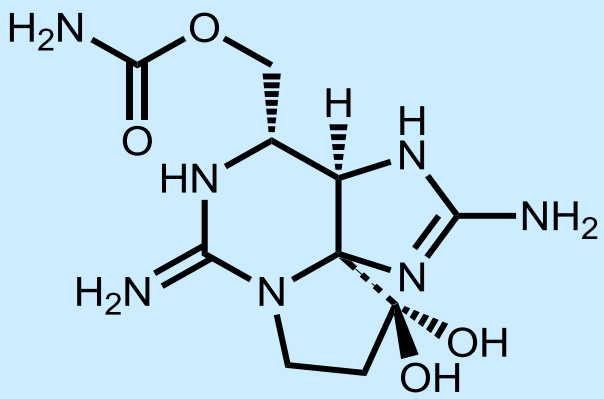
saxitoxina

- **Estruturas: E.J. Schantz, J. Clardy et al., JACS, 1975, 97, 1238;**
- **J. Bordner, H. Rapoport et al., JACS, 1975, 97, 6008.**
- **Derivados: Shimizu, Nakanishi, Coehn, Schantz, Hall.**
- **Biossíntese: Shimizu.**
- **Síntese: Saxitoxina: Kishi, Jacobi.**
- **´Decarbamoilsaxitoxina: Hong e Kishi, JACS, 1992, 114, 7001.**

Paralytic Shellfish Poisoning



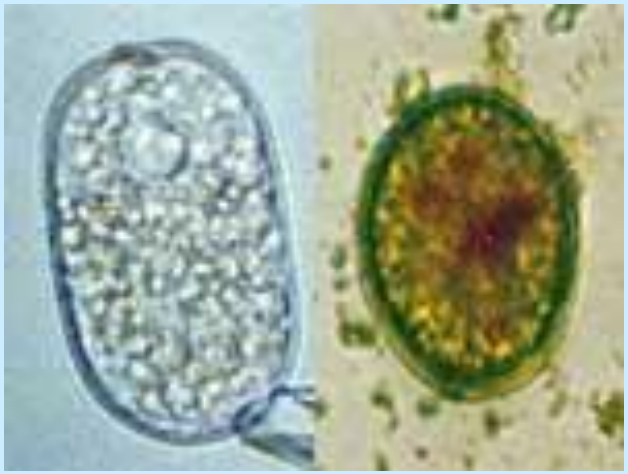
Gonyaulax **spp.**



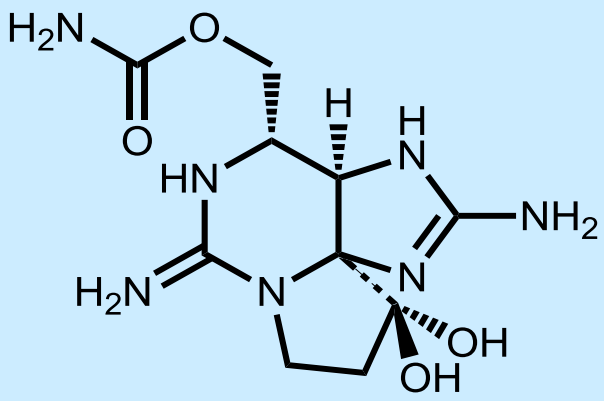
saxitoxina

- **Atividade farmacológica: Paralytic Shellfish Poisoning (PSP): Envenenamento Paralisante de Ostras**
- **Bloqueadora do fluxo de Na^+. Neurotóxica.**
- **Sintomas: adormecimento dos lábios e pontas dos dedos, seguido de paralisia e morte em 1-12 horas**
- **LD_{50}: 2 mg/kG**

Paralytic Shellfish Poisoning

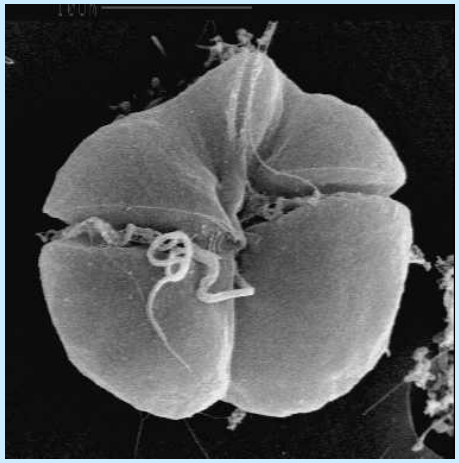


***Alexandrium* spp.**



saxitoxina

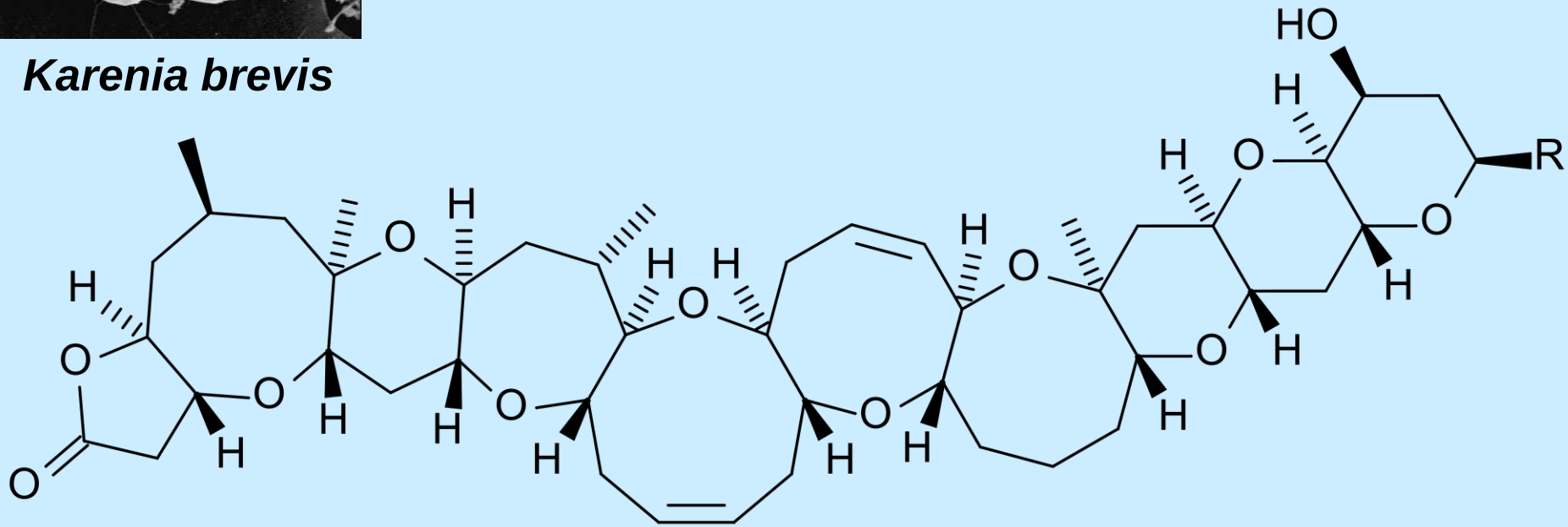
http://www.youtube.com/watch?v=jy3qobpnfEo



Karenia brevis

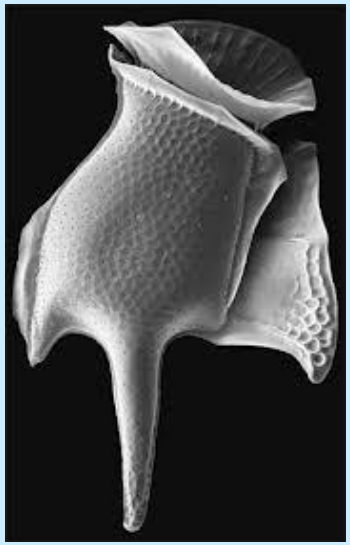
Neurotoxic Shellfish Poisoning

- **Brevetoxinas**
- **Bloqueadores do canal de Na^+ sensível**



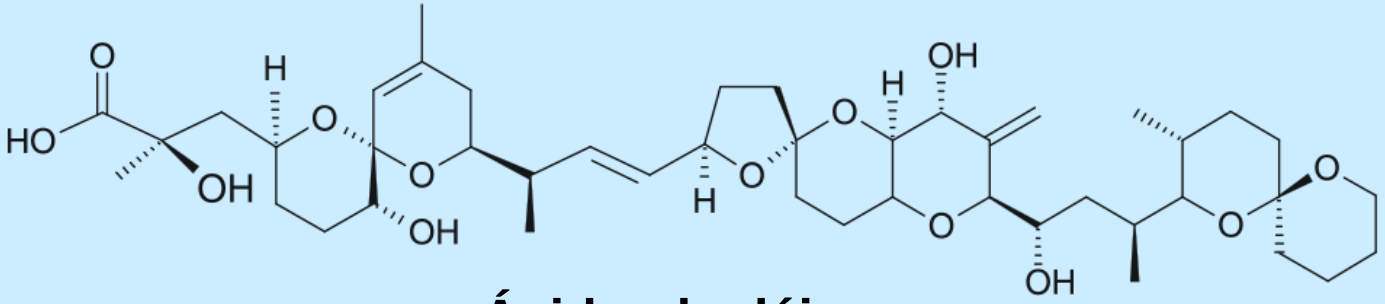
Brevetoxina-1 (PbTx-1) R = $-CH_2C(=CH_2)CHO$
Brevetoxina-7 (PbTx-7) R = $-CH_2C(=CH_2)CH_2OH$
Brevetoxina-10 (PbTx-10) R = $-CH_2CH(-CH_3)CH_2OH$

Diarrhetic Shellfish Poisoning



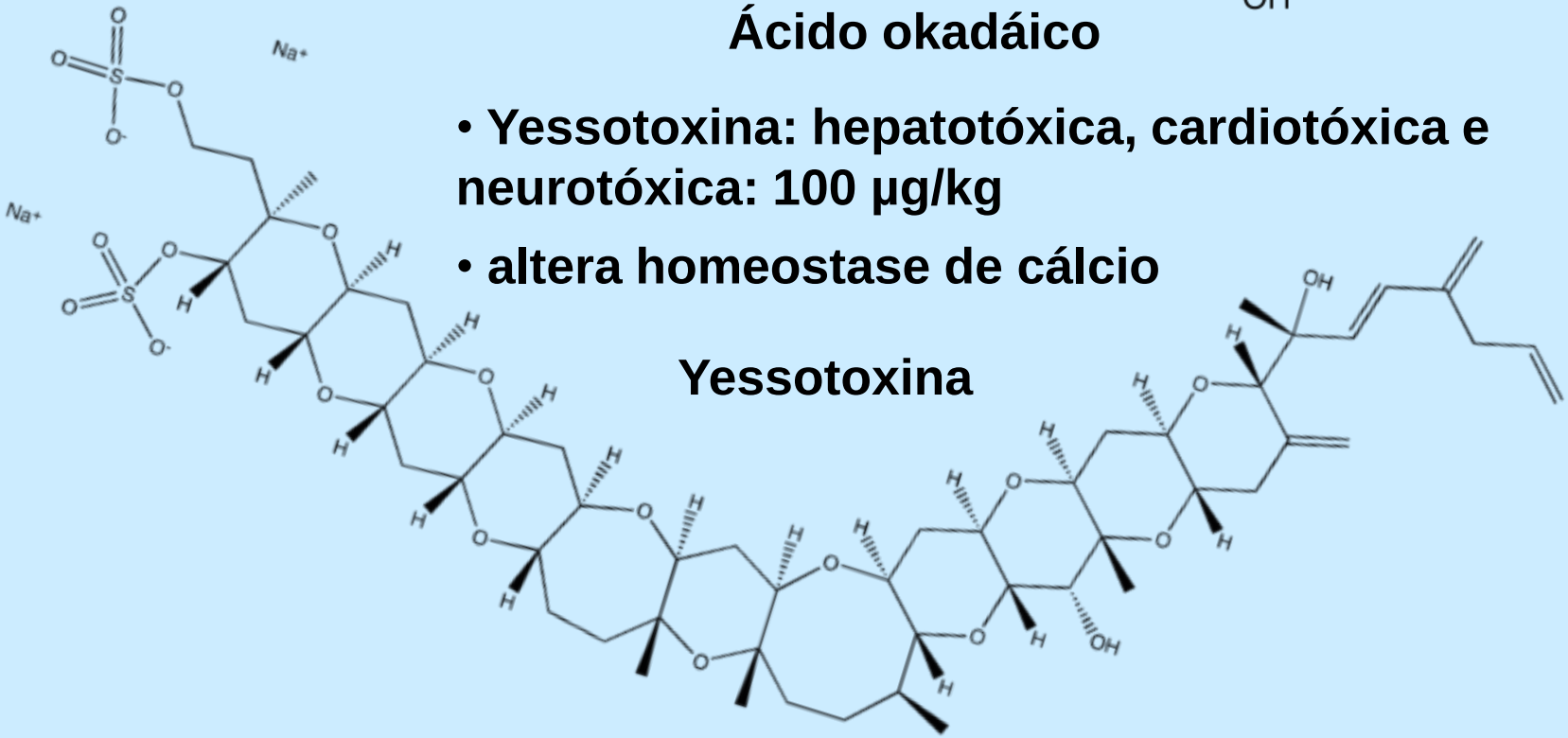
***Dinophysis* spp.**

- **Ácido okadáico: extremamente citotóxico (ng/mL)**
- **Inibidor da treonina/serina fosfatase**



Ácido okadáico

- **Yessotoxina: hepatotóxica, cardiotóxica e neurotóxica: 100 µg/kg**
- **altera homeostase de cálcio**

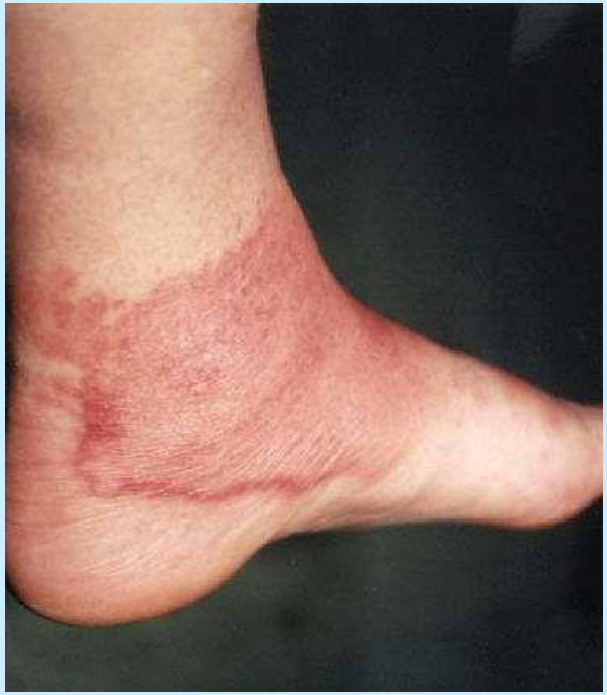


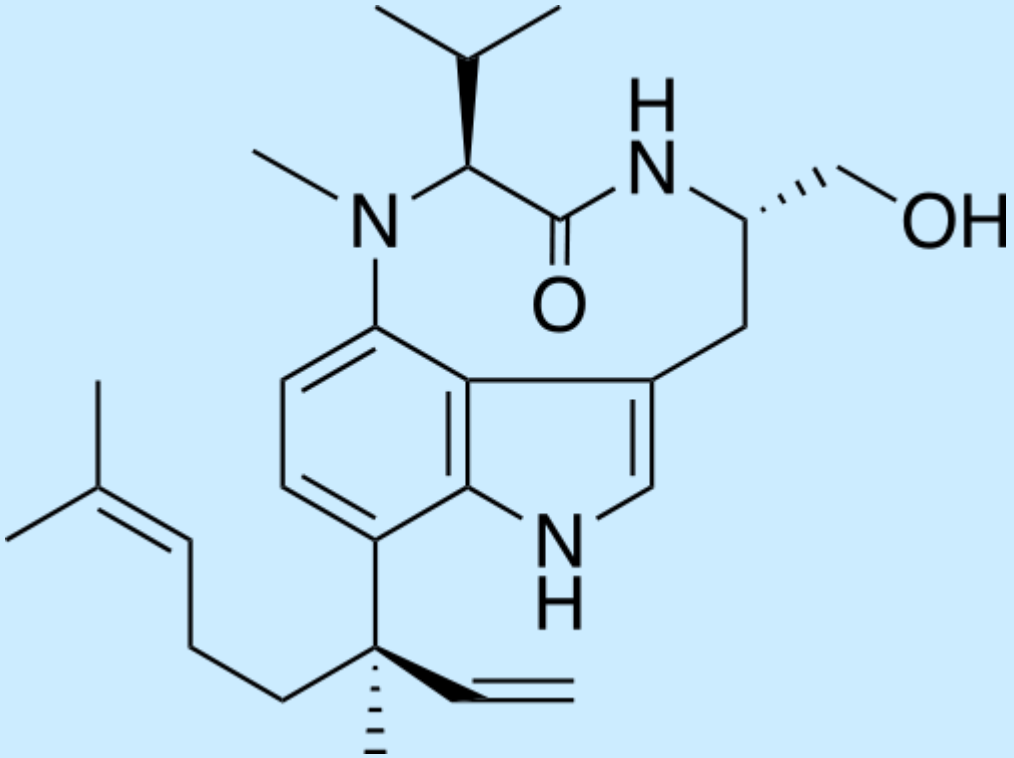
Yessotoxina

Dermatite de Algas

Moorea producens

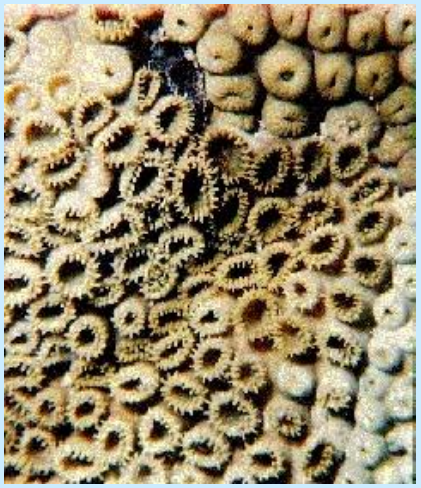
- **Lyngbyatoxina**
- **Produzida por cianobactérias**
- **Irritante e carcinogênica**





Palithoa toxica

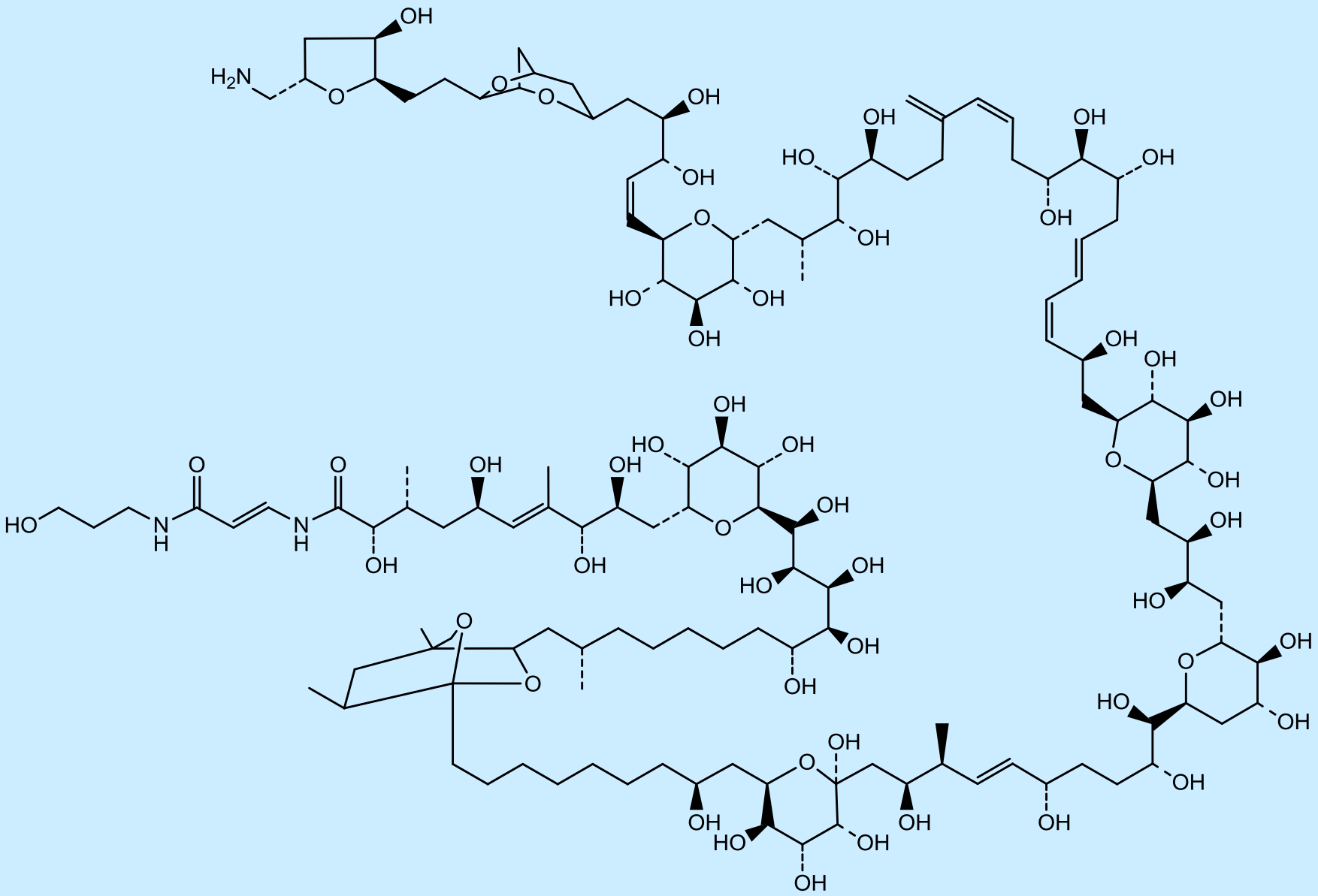
Palitoxina


- **Primeiros relatos: início da década de 60.[1]**
- **Descoberta → etnofarmacologia do Hawaii**
- **Inicialmente isolada de um zoantídeo (tipo de coral), *Palythoa toxica*.[2]**
- **Substância muito solúvel em H_2O → difícil de purificar**
- **Dose letal em camundongos: 0,15 μg/mL**
- **Sintomas: paralisia crescente, constricção ventral, extensão e paralisia dos membros, diarréia, convulsões, dispnéia e morte por colapso respiratório**

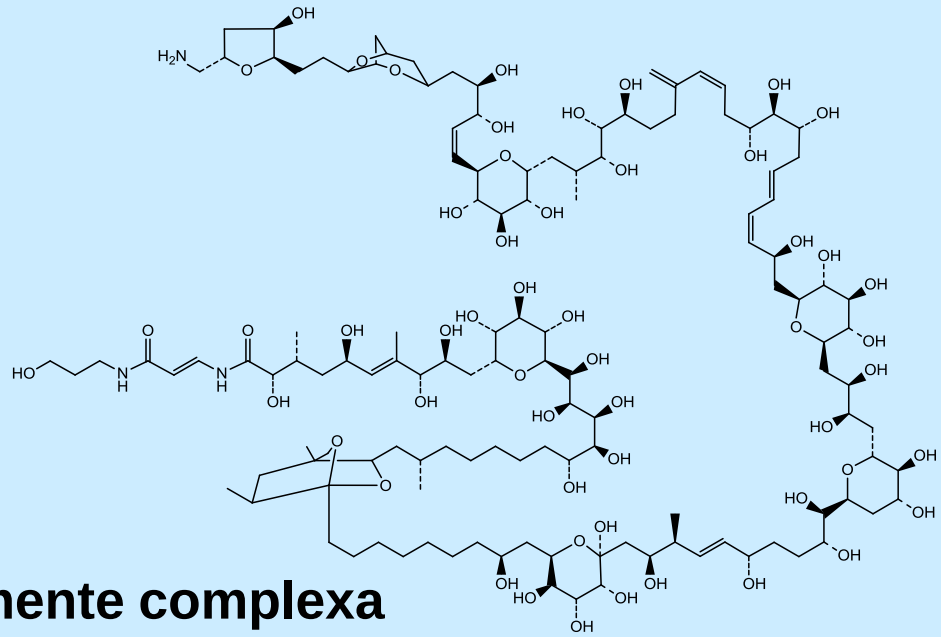
1. Scheuer, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod*., 1964, *22*, 263 e 1969, *27*, 322
2. Scheuer e Moore, *Science*, 1971, *172*, 495

Palitoxina



Palitoxina

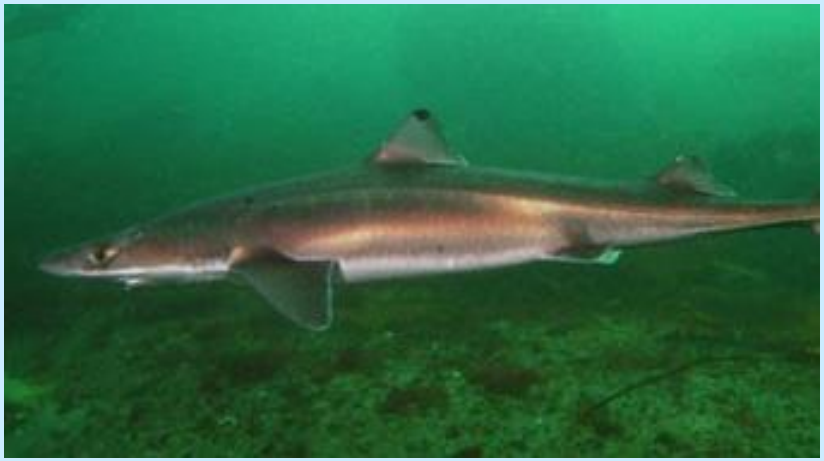
Mecanismo de ação:
Permeabilizante de íons Ca^{2+} em membranas celulares



- **Estrutura molecular extremamente complexa**
- **64 átomos de carbonos quirais + 6 duplas ligações**
- **2^{70} = 1,2 x 10^{21} isômeros possíveis**
- **número de avogadro: 6,02 x 10^{23}**
- **Estrutura definitiva → 20 anos depois de sua descoberta,[3] apesar das técnicas de espectroscopia modernas**
- **Síntese total enantiosseletiva: Kishi, 1989.**

3. Moore, *Prog. Chem. .Org. Nat. Prod.*, 1985, *48*, 81.
4. Kishi et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, *111*, 7530.

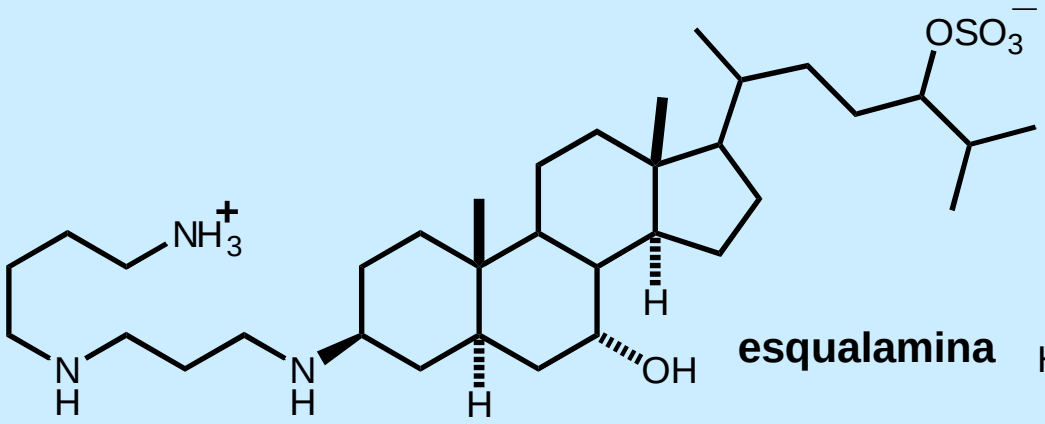
Esqualamina



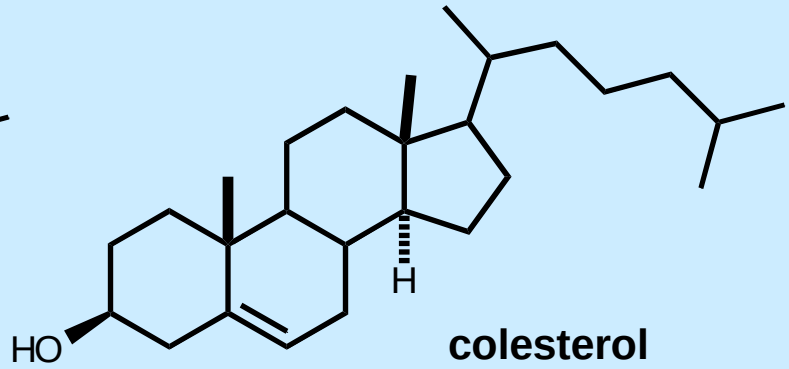
- **Isolada de *Squalus acanthus* (“dogfish”) em 1993.[1,2]**
- **Inicialmente como anti-fúngico**
- **Melhor atividade → antitumoral, inibidora da angiogênese**
- **Derivado esteroidal muito pouco usual**
- **Excelente solubilidade em água**

1. Moore KS, Wehrli S, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 1354.
2. Wehrli et al., Steroids, 1993, 58, 370.

Esqualamina



esqualamina

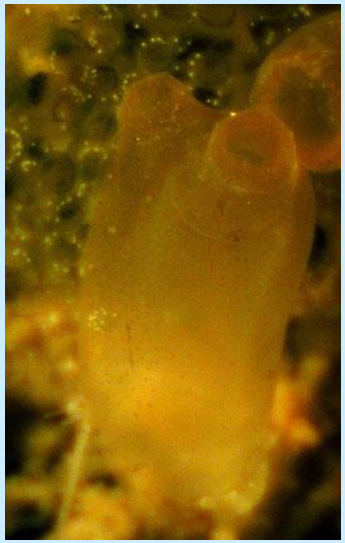


colesterol

- **1a síntese: 1994.[3]**
- **Inibe a angiogênese e o crescimento de tumores**
- **Não é citotóxico**
- **Não afeta células sãs.**
- **Desenvolvimento → Fases I → II de testes clínicos**

1. **Moriarty RM, Tuladhar SM, Guo L, et al., *Tet. Lett.*, 1994, *35*, 8103.**

Ecteinascidina-743

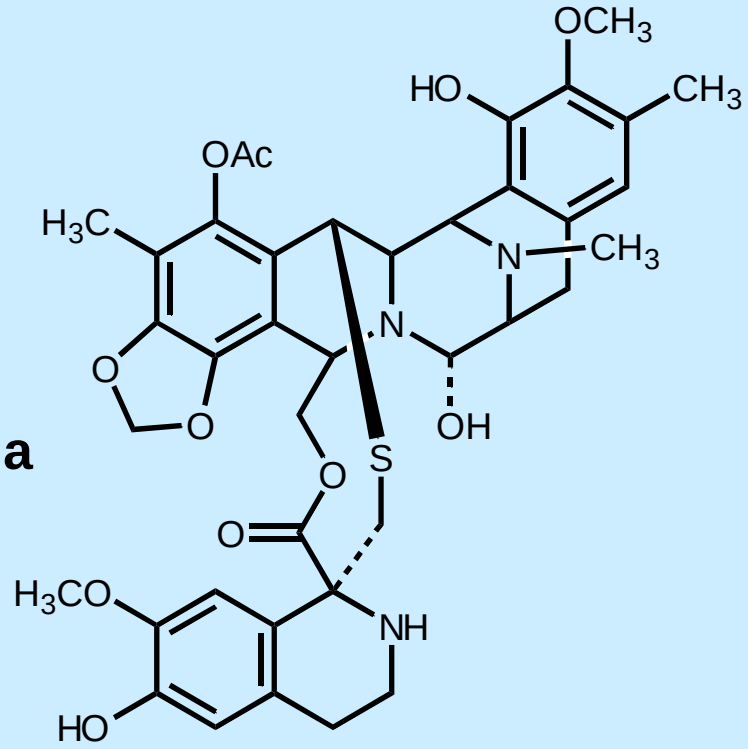


Ecteinascidia turbinata

- **Atividade biológica do extrato observada em 1982.[1]**
- **Isolamento e determinação da estrutura em 1990.[2,3]**
- **Agentes alquilantes de DNA**
- **1a síntese total → Corey (Nobel, 1990), em 1996.[4]**

1. **Dunn, Carrier, Regan, *Toxicon*, 1982, *20*, 703**
2. **Rinehart et al., *J. Org. Chem*., 1990, *55*, 4512.**
3. **Wright et al., J. Org. Chem., 1990, 55, 4508.**
4. **Corey, Gin, Kania, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 9202**

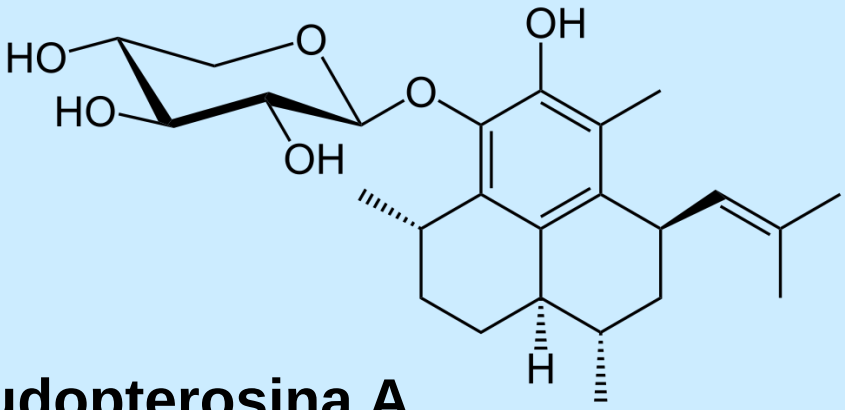
Ecteinascidina-743



- **Estruturalmente muito parecida com saframicinas.[5]**
- **Saframicinas → *Streptomyces lavandulae***
- **Desenvolvimento ET-743 → PharmaMar, na Espanha**
- **Produção ET-743 → semi-síntese a partir da cianosafracina B (natural)**
- **Também por aquacultura de *E. turbinata***
- **Atualmente na Fase II de testes clínicos em humanos**
- **Produto Natural Marinho com melhor potencial de inserção no mercado**

5. Arai, T.; Takahashi, K.; Kubo, A. *J. Antibiot.* 1977, *30*, 1015.

Pseudopterosinas

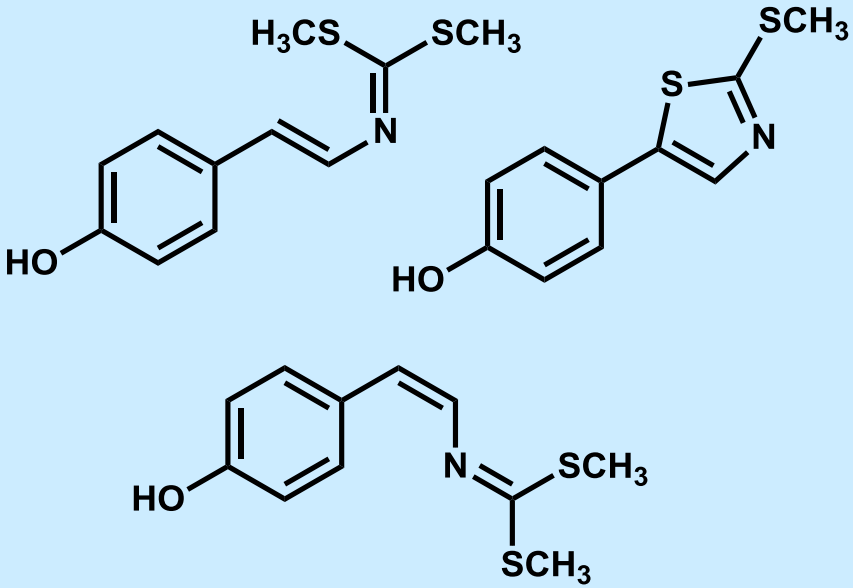


Pseudopterosina A
Potente anti-inflamatório

Pseudopterogorgia elisabethae

Tridentatóis

Tridentata marginata



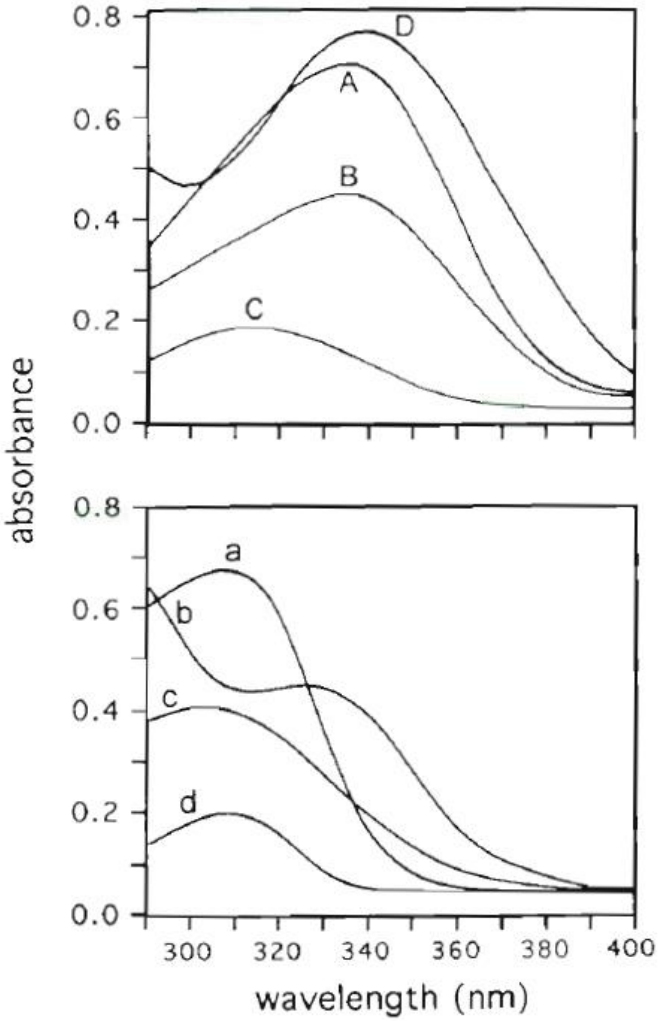
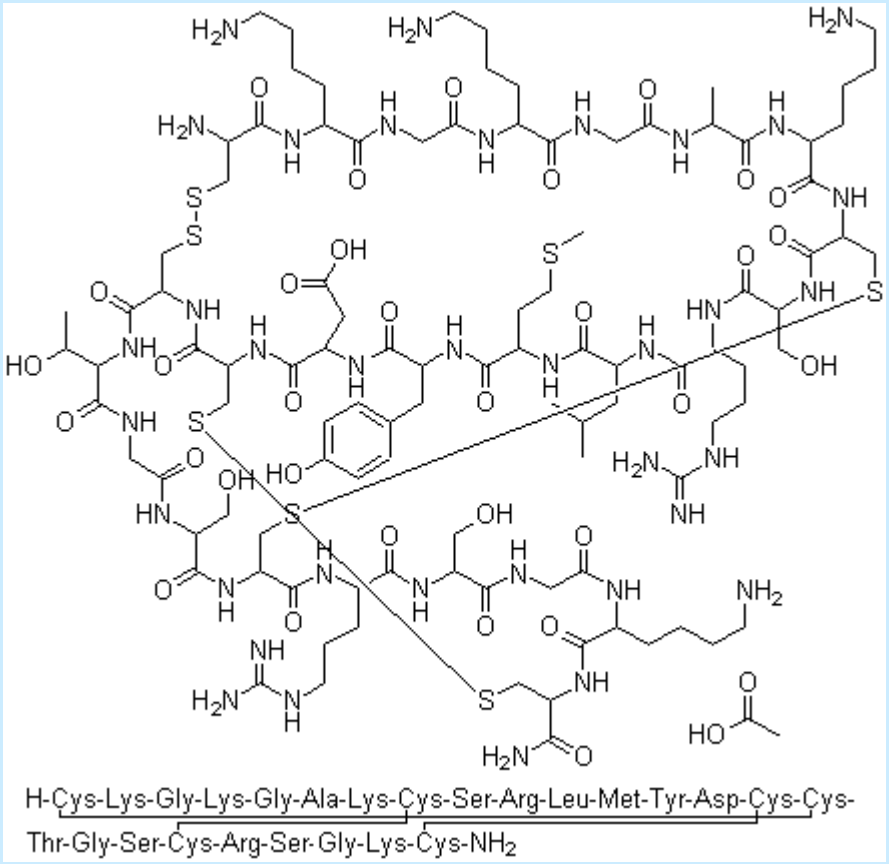


Fig. 8. UV spectra (290 to 400 nm) of tridentatols A to D (top panel), and of the 4 'active ingredients' from Coppertone® SPF 45 sunscreen lotion (bottom panel): octyl methoxy-cinnamate (a), benzophenone (b), octocrylene (c), and octyl salicylate (d). All spectra were recorded at a concentration of 0.01 mg ml^{-1} in methanol

Pontentes anti-oxidantes

Stachowicz, Lindquist, MEPS, 1997

ω-Conotoxina



- **Peptídeos 10 – 30 aminoácidos**
- **ω-Conotoxina ➔ analgésico**
- **Mais potente que a morfina**
- **Não causa dependência química**
- **Comercialmente disponível**
- **Prialt (Ziconotide)**

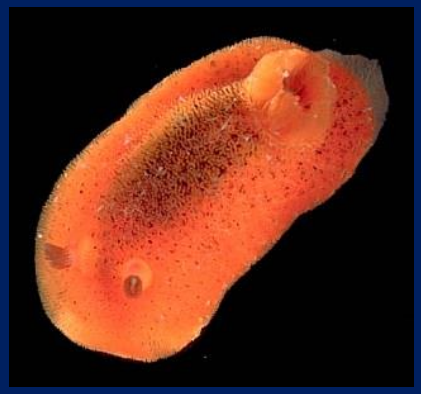
Conotoxina

http://www.youtube.com/watch?v=JjHMGSI_h0Q

Nudibranchia

Três tipos de defesa: comportamental, morfológica e química

Comportamental: evitar exposição
Morfológica: homocromismo, "countershading", coloração disruptiva



Rostranga muscula

Rostranga muscula **em** ***Microciona coccinea***

Eolídeo pelágico ***Glaucus atlanticus***

Peltodoris atromaculata **em** ***Petrosia ficiformis***

Verconia verconis **em** ***Dendrilla rosea***

Melibe **sp. em algas**

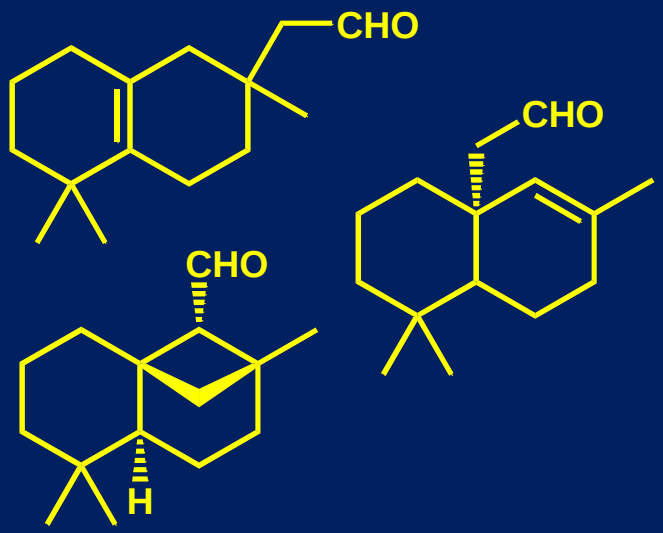
Phyllidia varicosa
coloração aposemática

Fotografias: sea slug forum (http://www.seaslugforum.net)

Nudibranchia – aquisição de defesa química

Membarnipora membranacea

Acanthodoris nanaimoensis



Andersen et al., *Tetrahedron Lett*., 1984, *25*, 141.

Crisia sp.

Triopha catalinae

Gustafson e Andersen, *J. Org. Chem*., 1982, *47*, 2167.

Fotografias: sea slug forum (http://www.seaslugforum.net)

Nudibranchia – defesas químicas

Navanax inermis

navenona A

navenona B

navenona C

Sleeper et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, *99*, 2367.

Fotografias: sea slug forum (http://www.seaslugforum.net)

Investigação da química de Nudibranchia da costa do Brasil
Doris aff. *verrucosa*

Doris aff. *verrucosa*

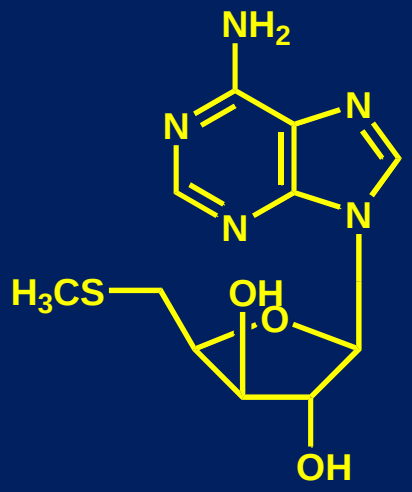
Doris verrucosa Mediterrâneo

Praia do Cabelo Gordo, São Sebastião, SP (1998)
3 indivíduos ➔ extração direta em acetona, ultrassom

1. Extração 3 X 50 mL
2. Evaporação

0,34 g extrato

1. Separação coluna C_{18} MeOH/H_2O



9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)-β-D-xilanofuranosil]adenina
xilosil-MTA

Cimino et al., *Experientia*, 1986, *42*, 1301.

Granato et al., *Quim. Nova*, 2000, 23, 594-599.

Fotografias: sea slug forum (http://www.seaslugforum.net)

Investigação da química de Nudibranchia da costa do Brasil
Tambja sp.

***Tambja* sp.**

Laje da Serraria, São Sebastião, SP (2002)
9 indivíduos

1. Extração CH_2Cl_2/AcOEt 1:1 (extrato A)
2. Extração CH_2Cl_2/MeOH (extrato B)
3. Extração MeOH (extrato C)

Extratos A + B (0,55 g)

Extrato C (0,45 g)

1. Separação coluna ciano
   hexano/acetona
   CH_2Cl_2/acetona
   CH_2Cl_2/MeOH

2. Separação coluna sílica
   CH_2Cl_2/MeOH
   acetona/MeOH
   MeOH

tambjamina A

tambjamina D

Granato et al., *Quim. Nova*, 2005, 28, 192-198.

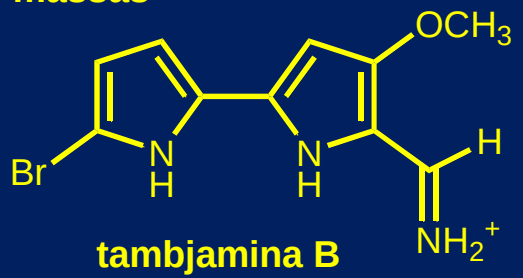
Fotografias: Vinicius Padula (UFRJ)

Investigação da química de Nudibranchia da costa do Brasil

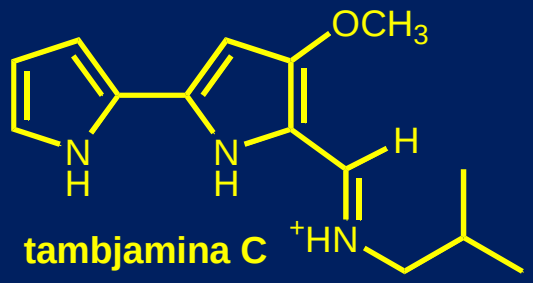
Tambja stegossauriformis

Análise por cromatografia líquida –
Ultravioleta- espectrometria de massas

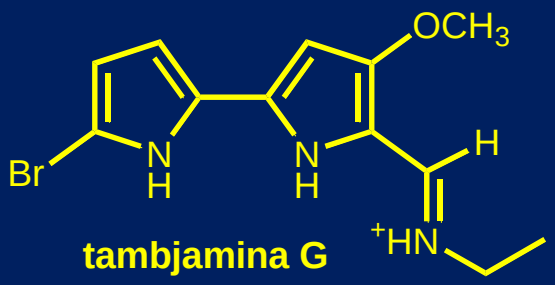
Tambja stegossauriformis



tambjamina B



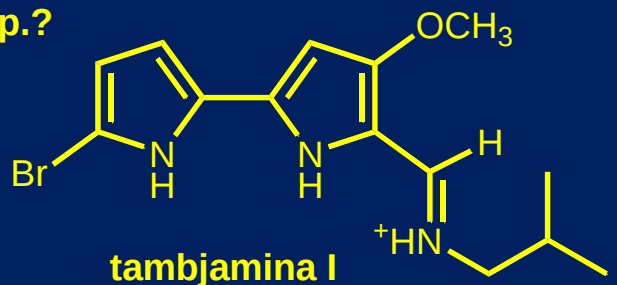
tambjamina C



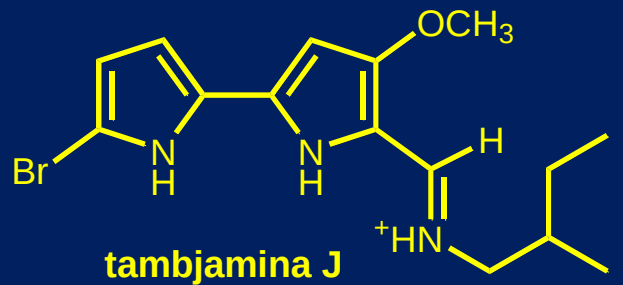
tambjamina G

tambjamina D

Tambjaminas
- Indicadores taxonômicos?
- prêsa comum às *Tambja* spp.?



tambjamina I



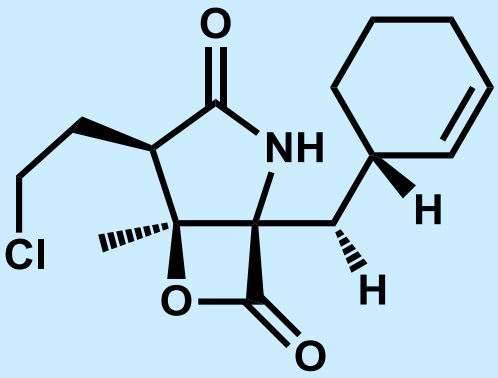
tambjamina J

Fabio R. Pereira, em andamento

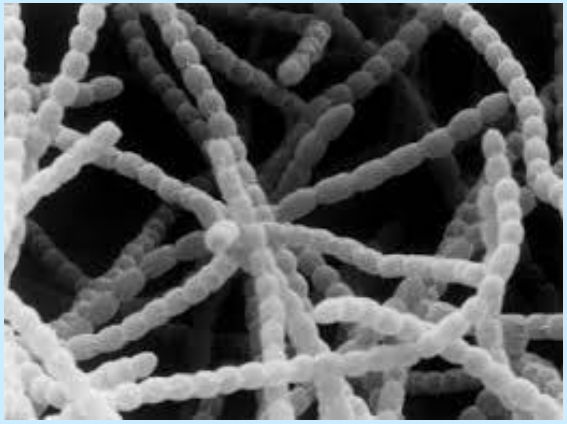
Fotografias: Vinicius Padula (UFRJ)

Bactérias marinhas

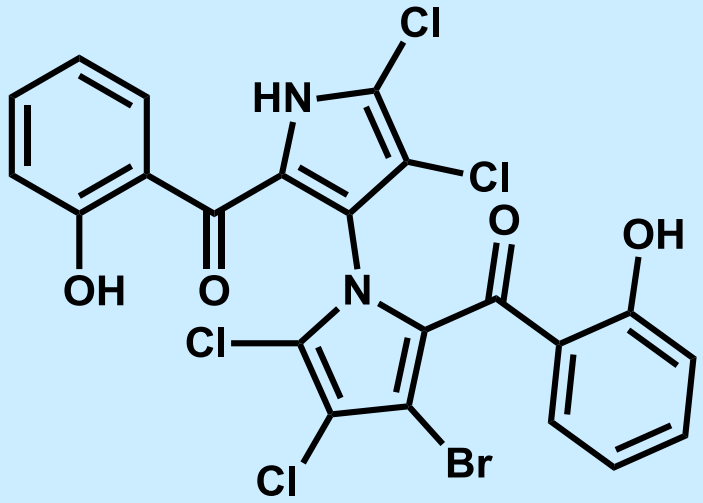
Salinospora tropica



Salinosporamida A
Inibidor do proteassoma ➔ antitumoral



Streptomyces sp.



Marinopirrol A
Potente antibiótico

“Amazônia Azul”???

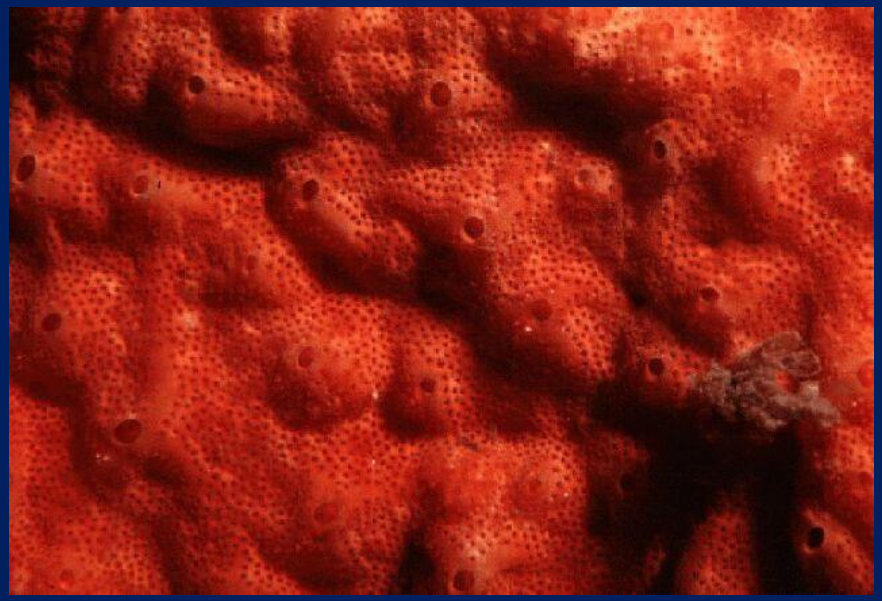
8,000 km

Desenvolvimento de fármacos no Brasil: um sonho?

- Custo elevadíssimo
- Indústria farmacêutica ainda modesta
- Falta de mão de obra especializada
- Falta de infra-estrutura
- Atraso tecnológico
- Abordagens integradas ➔ uma NECESSIDADE

Descoberta de inibidores do ponto de checagem G2 do ciclo celular a partir da ascídia *Didemnum granulatum*

Um caso único?



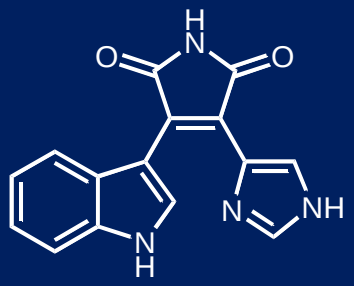
Didemnum granulatum
(Rosana M. Rocha)

Identificação dos inibidores do PC-G2 ciclo celular de *D. granulatum*

Alcalóides indolo-melimido-carbazólicos

granulatimida X = H
6-bromogranulatimida X = Br

isogranulatimida

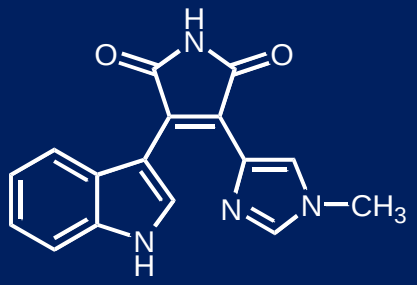


didemnimida A

didemnimida B

didemnimida C

didemnimida D



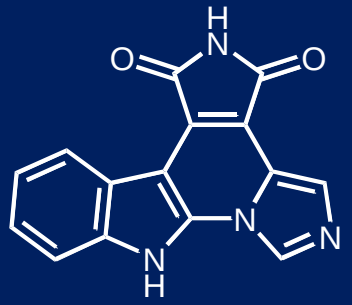
didemnimida E

Berlinck et al., Journal of Organic Chemistry, 63, 9850-9856 (1998);
Britton et al., Journal of Natural Products, 2001, 64, 254-255.

Atividade dos inibidores do PC-G2 ciclo celular de *D. granulatum*

Alcalóides indolo-melimido-carbazólicos

granulatimida



isogranulatimida

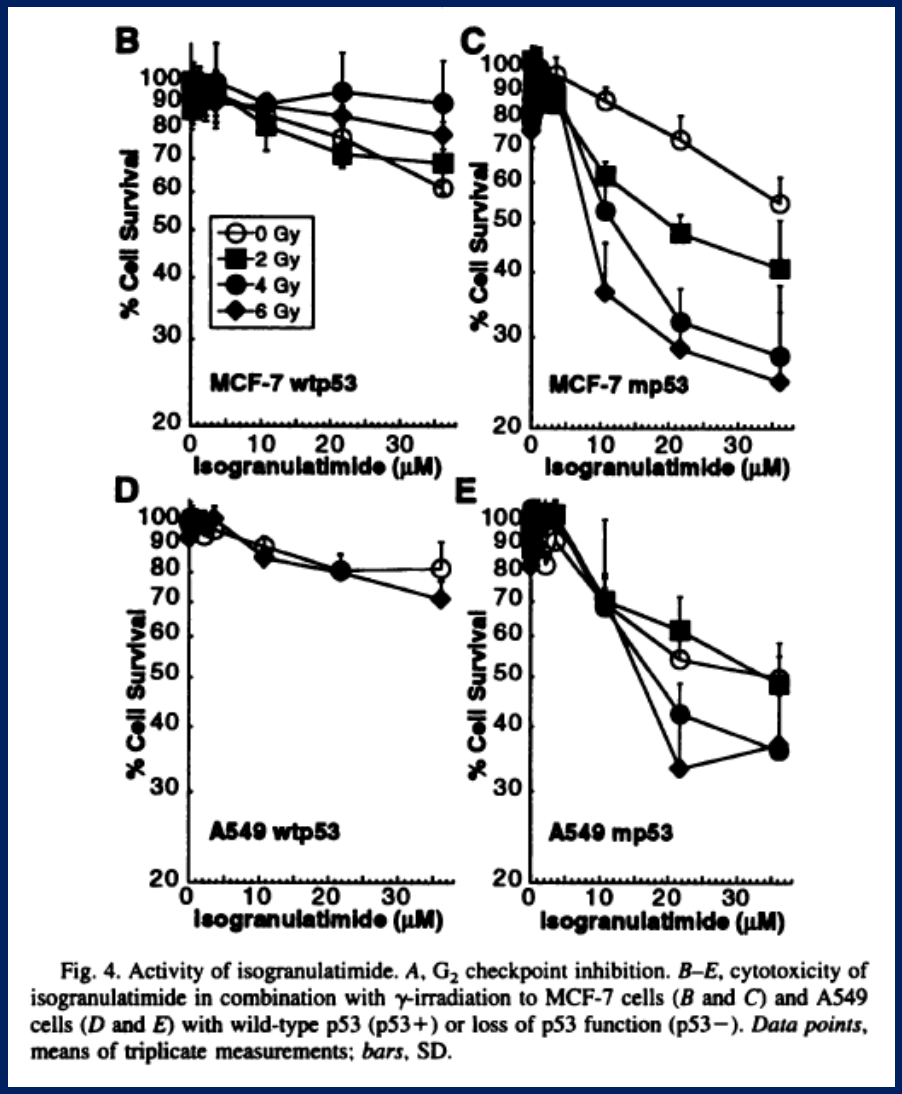
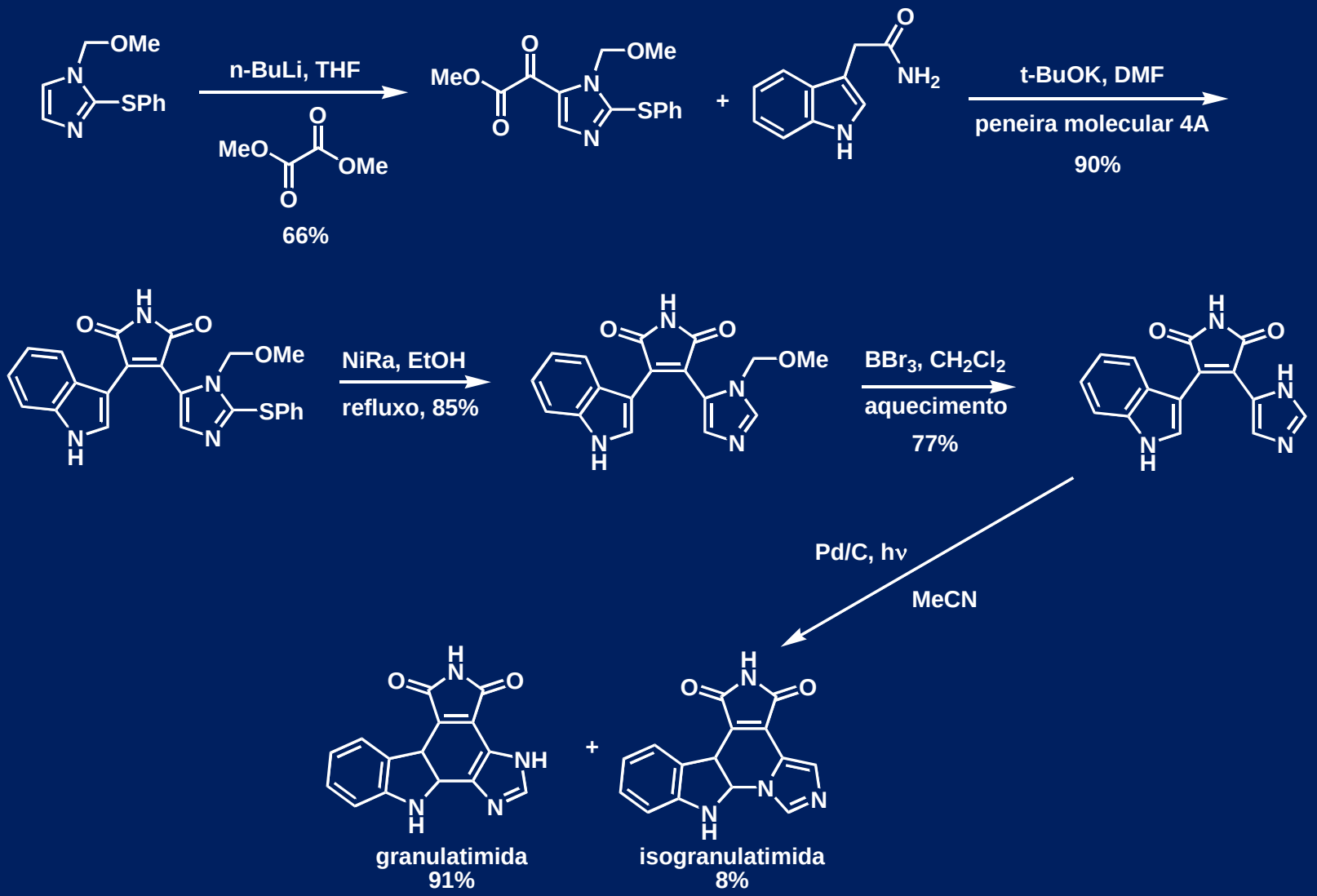


Fig. 4. Activity of isogranulatimide. *A*, G_2 checkpoint inhibition. *B–E*, cytotoxicity of isogranulatimide in combination with γ-irradiation to MCF-7 cells (*B* and *C*) and A549 cells (*D* and *E*) with wild-type p53 (p53+) or loss of p53 function (p53−). *Data points*, means of triplicate measurements; *bars*, SD.

Berlinck et al., Journal of Organic Chemistry, 63, 9850-9856 (1998);
Roberge et al., Cancer Research, 58, 5701-5706 (1998).

Síntese dos inibidores do PC-G2 ciclo celular de *D. granulatum*

Alcalóides indolo-melimido-carbazólicos



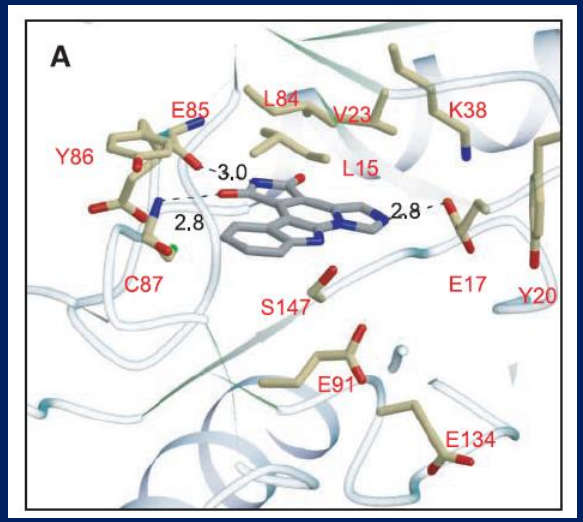
Berlinck et al., Journal of Organic Chemistry, 63, 9850-9856 (1998)

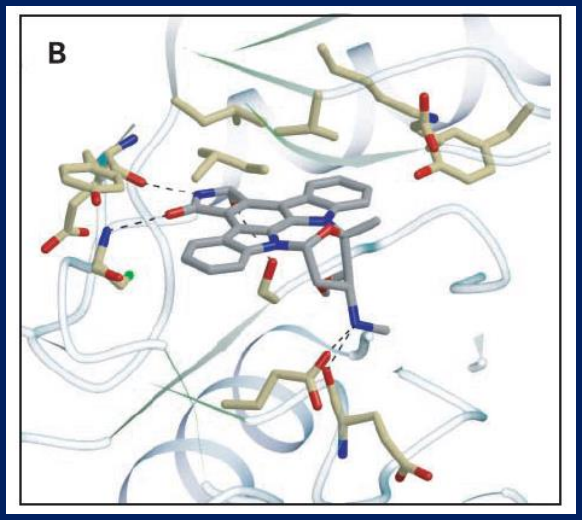
Mecanismo de ação dos inibidores do PC-G2 ciclo celular

Alcalóides indolo-melimido-carbazólicos

granulatimida

isogranulatimida





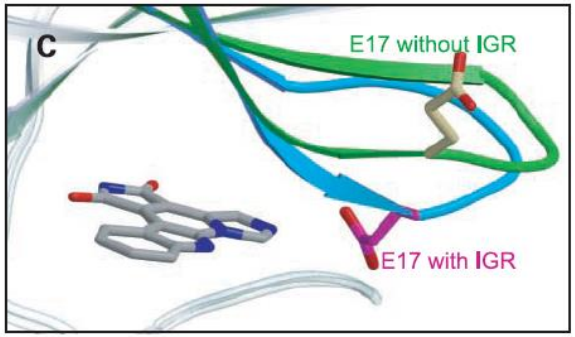


Figure 4. Structural basis for Chk1 inhibition by isogranulatimide. **A,** binding of isogranulatimide in the active site of Chk1: Chk1 atoms involved in binding to isogranulatimide or to UCN-01 binding. *Dashed lines,* hydrogen bonds between isogranulatimide and Chk1 (in Å); *gray,* inhibitor carbons; *beige,* enzyme carbons; *red,* oxygens; *blue,* nitrogens. **B,** binding of UCN-01 in the active site of Chk1. **C,** conformation change in the Chk1 glycine-rich loop induced by isogranulatimide binding. *Green,* glycine-rich loop in the absence of isogranulatimide (*IGR*); *blue,* glycine-rich loop in the presence of isogranulatimide. Only the side chain of Glu^{17} is displayed.

Jiang et al., Molecular Cancer Therapy 2004, 3, 2001, 1221-1227.

Alethia Biotherapeutics

- Product pipeline
- Cancer-associated EMT
- Ovarian cancer
- Bone degradation
- G2 checkpoint inhibitor
  - Background
  - Product development

Isogranulatimide - a CHK1 inhibitor

One of the most frequently mutated genes in human cancer is p53 where approximately 50% of all tumors show mutations in this gene. Clearly p53 is important and one of its major functions is in DNA damage-induced cell cycle checkpoints which are paramount for proper functioning of cellular DNA repair mechanisms. Chemotherapeutic agents such as topotecan hydrochloride (Hycamptin®) and doxorubicin (Doxil®) as well as radiotherapy work by damaging DNA and those cancer cells containing non-functional p53 are unable to arrest at the G1 checkpoint thus allowing mutations in the damaged DNA to be propagated by completing their cell cycle through the G2 checkpoint. This appears to be one of the explanations why cancer cells develop resistance to chemotherapeutic agents. Very recent studies have begun to explore ways of bypassing this desensitization by forcing the cancer cells into mitotic cell death through inhibition of the G2 checkpoint. Therefore, it has been hypothesized that treatment with DNA-damaging chemotherapy or radiotherapy in combination with drugs that inhibit the G2 checkpoint could promote the selective killing of cancer cells bearing p53 mutations thus providing therapeutic benefit.

Alethia is developing a G2 checkpoint inhibitor that has been integrated into our current ovarian cancer program. Isogranulatimide (AB-IsoG) is the first G2 checkpoint inhibitors that was discovered in a rational cell-based assay designed specifically to identify these types of small molecules. Much of the preliminary studies have been conducted including drug optimization, target identification, structure determination of the molecule bound to its target, and synthesis.

References:

Inhibition of Chk1 by the G2 DNA damage checkpoint inhibitor isogranulatimide. Mol Cancer Ther. 3:1221-1227

High-throughput assay for G2 checkpoint inhibitors and identification of the structurally novel compound isogranulatimide. Cancer Res. 58: 5701-5706

http://www.alethiabio.com/Checkpoint.html

Desenvolvimento de fármacos no Brasil: um sonho

- Fomento à Inovação ➔ OK!
- Estímulo às indústrias farmacêuticas
- Melhor preparo das agências institucionais
- Maior agilidade dos órgãos governamentais
- Marco regulatório ➔ estimular
- Diminuição da burocracia
- Trabalhar de maneira integrada, organizada, estruturada, com estratégias definidas.

Apoio financeiro

IQSC

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SCIENTIA VINCES

FAPESP

bioprospecta
rede biota de bioprospecção e bioensaios

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES

dtp

Grants and Contracts Operations Branch (GCOB)

NIH/NCI's
Prof. Andersen's program

NATIONAL COOPERATIVE DRUG DISCOVERY GROUPS