



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**TÍTULO: Producción de artemisinina y sus
derivados en *Saccharomyces cerevisiae***

Autor: Beatriz García Lavilla.

Fecha: Junio 2019.

Tutor: María Molina Martín.

Índice

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN.....	3
2. Artemisinina	4
2.1 Descubrimiento.....	4
2.2 Importancia a nivel mundial	5
2.3 Estructura y mecanismo de acción.....	5
2.4 Problemas de abastecimiento.....	6
OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	7
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
1. Proyecto Artemisinina	8
2. Síntesis natural de la artemisinina	8
3. Búsqueda de sistemas microbianos para la producción de artemisinina	9
4. Ingeniería metabólica para la producción de artemisinina en <i>S. cerevisiae</i>	10
4.1 Introducción de la ADS	10
4.2 Aumento de la producción de FPP:	11
4.3 Conversión a ácido artemisínico.....	12
4.4 Una nueva cepa.....	13
4.5 Conversión química	14
4.6 Situación actual, ¿es este proceso susceptible de mejoras?.....	14
5. ¿Existen alternativas no microbianas?.....	16
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	19

RESUMEN

Desde que en 1972 el grupo de investigación de la profesora Tu Youyou descubrió la artemisinina, este antimalárico con estructura de lactona sesquiterpénica se ha posicionado como una de las mejores estrategias terapéuticas para el tratamiento de *Plasmodium*. De hecho, las Terapias Combinadas de Artemisinina (TCA) y derivados constituyen la primera elección en casos de malaria severa. De manera natural, este fármaco se encuentra en *Artemisia annua*, una planta que ofrece un rendimiento de extracción tan escaso que supone una limitación para su comercialización, en cuanto a abastecimiento y precio, teniendo en cuenta que debe hacer frente a una altísima demanda de TCAs especialmente en países subdesarrollados.

Así, en 2004 se funda el “Proyecto Artemisinina”, por el que la Universidad de California, Amyris Inc. y la OMS desarrollaron un sistema de producción basado en un proceso de semi-síntesis, capaz de proporcionar un abastecimiento y precio de las TCAs estable. En él, se combinó una primera etapa en la que se produciría ácido artemisínico gracias a la ingeniería metabólica de microorganismos, seguida de una conversión química al derivado artemisínico final. El fracaso en el intento de utilizar *Escherichia coli* como sistema hospedador, llevó a la utilización final de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, debido a sus múltiples ventajas y experiencia de uso como sistema de producción proteica heteróloga. Se aprovechó y optimizó la ruta del mevalonato, preexistente en este organismo, para desviarla hacia la síntesis de ácido artemisínico gracias a la expresión heteróloga de cinco enzimas originarias de la planta: AMO, CPR1, CYb5, ADH1 y ALDH1.

Si bien existen otras alternativas a la semi-síntesis, como el empleo de la biotecnología vegetal (obtención de plantas transgénicas, cultivo de raíces en cabellera...), ningún otro sistema ha logrado superar a la cepa de *S. cerevisiae* capaz de producir 25 g de ácido artemisínico/ L. Concluía así el Proyecto en 2008; y en 2013, Sanofi ya había puesto a punto el cambio de escala para comenzar una producción industrial que a día de hoy cumple con todas las expectativas previstas al inicio del Proyecto.

INTRODUCCIÓN

1. Papel de *Saccharomyces cerevisiae* en biotecnología microbiana

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular conocido comúnmente por su uso tradicional en la producción de pan, vino y cerveza. Desde que fue objeto de una primera transformación con DNA en 1978 y su genoma fue completamente secuenciado en 1996 (1) se ha convertido en una herramienta esencial en la biotecnología microbiana.

Además de su utilidad como modelo celular eucariota o su empleo en el *screening* farmacológico, una de las grandes ventajas del estudio de esta levadura es la producción proteica heteróloga. Esta aplicación biotecnológica es tan importante que a día de hoy muchos de los productos recombinantes utilizados en terapéutica y aprobados por la European Medicines Agency (EMA) y la Food and Drug Agency (FDA) son producidos por *S. cerevisiae* (2). El primero de ellos fue el interferón humano en 1981, seguido de la producción del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B un año después; que constituyó la primera vacuna de ingeniería genética (3). A ellos les ha seguido la producción heteróloga del péptido de la urato oxidasa (tratamiento de hiperuricemia), el glucagón (útil en el diagnóstico de pacientes diabéticos) o la insulina (cubriendo la necesidad de más de 422 millones de adultos diabéticos en el mundo en 2014) (4); entre otros.

Como hospedador para la producción heteróloga, *S. cerevisiae* presenta una serie de desventajas que han propiciado el desarrollo de sistemas de expresión alternativos tales como *Pichia pastoris*, *Candida utilis* o *Schizosaccharomyces pombe*, entre otros. Sin embargo, es conveniente recordar que ningún sistema es óptimo para la producción de toda clase de proteínas recombinantes, ya que cada uno de ellos presenta una serie de beneficios y sus correspondientes inconvenientes. De hecho, el motivo por el cual esta levadura ha sido en tantas ocasiones sistema de elección para el redireccionamiento de rutas metabólicas y producción de compuestos como los anteriormente mencionados, es la larga lista de ventajas y facilidades que posee para ello (Tabla 1). De esta forma, se presenta como un organismo con gran viabilidad para el desarrollo de procesos de producción a escala industrial.

Tabla 1.: ventajas y desventajas de *S. cerevisiae* como especie utilizada para la expresión heteróloga. Fuente: (3, 5).

Ventajas	Desventajas
Organismo con gran experiencia en su uso industrial y status GRAS (<i>Generally Regarded As Safe</i>), lo que garantiza productos seguros (sin pirógenos, patógenos o inclusiones virales).	Inestabilidad plasmídica en el cambio de escala.
Manipulación biotecnológica sencilla.	Bajos rendimientos proteicos.
Crecimiento rápido y en condiciones sencillas, tanto aeróbicas como anaeróbicas.	Hiperglicosilación, que puede causar problemas inmunológicos.
Resistencia intrínseca a condiciones de estrés (alta osmolaridad, bajo pH...)	
Modificaciones postraduccionales típicas de eucariotas.	
Eficiente sistema de secreción proteica.	
Producción industrial económica.	
Facilidad para la transformación.	
Amplia variedad de vectores.	
Posibilidad de uso de un amplio rango de fuentes de C para la obtención de energía.	

Todo este desarrollo de las técnicas necesarias para la transformación y optimización de cepas de levadura capaces de producir moléculas distintas a las propias, ha evolucionado hasta la aparición de la ingeniería metabólica. Esta consiste en servirse de la tecnología del ADN recombinante para modificar reacciones bioquímicas específicas (o introducir unas nuevas), optimizando así determinadas propiedades celulares o la formación de un producto (3). De esta forma, se ha logrado transferir al organismo hospedador genes que codifican para una ruta celular en concreto, llegando incluso a reconstruir rutas metabólicas humanas por completo.

Uno de los ejemplos de ingeniería metabólica más exitosos ha sido la producción del precursor de artemisinina a partir de un metabolito propio de *S. cerevisiae*.

2. Artemisinina

2.1 Descubrimiento

Durante la guerra de Vietnam (1955-1975), el gobierno chino de Mao Zedong promovió una investigación bajo el nombre “Proyecto 523” con el fin de encontrar un antimalárico eficaz. De

esta forma se pretendía ayudar a Vietnam del Norte a ganar la guerra, cuyo ejército tenía más bajas debido a la malaria que por el propio conflicto. Fue así como, en base a documentos sobre la medicina tradicional china, el grupo de investigación de la profesora Tu YouYou aisló por primera vez la artemisinina en el año 1972 (5). Siete años después, su estructura fue completamente dilucidada; y en 2015 se le otorgó a la profesora el Premio Nobel de medicina (6).

2.2 Importancia a nivel mundial

La malaria, o paludismo, es una enfermedad infecciosa causada por protozoos del género *Plasmodium*, transmitidos por la picadura de un vector: mosquitos infectados del género *Anopheles*, en concreto las hembras. Según la Organización Mundial de la Salud se estima que en 2016 hubo aproximadamente 216 millones de casos en todo el mundo, la mayor parte de ellos registrados en África (90%); y seguidos por Asia Sudoriental (7%) y la Región Oriental Mediterránea (2%). Ese mismo año, se estimó una cifra de 445.000 muertes por malaria a nivel mundial (7).

De las cinco especies que infectan al hombre, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. vivax*, y *P. falciparum*, estas dos últimas son las más peligrosas. De hecho, *P. falciparum* es el organismo responsable de la mayoría de muertes provocadas por paludismo en todo el mundo (8), y de la presentación más grave y letal de esta enfermedad (9). Además, la aparición de formas multirresistentes a los diferentes tratamientos obstaculiza continuamente el control de la enfermedad.

La importancia de la artemisinina y sus derivados radica, precisamente, en que a día de hoy son los medicamentos antipalúdicos más efectivos (7), presentando además actividad frente a cepas de *P. falciparum* ya resistentes a otros fármacos como la cloroquina (10). Es por eso que el tratamiento de primera línea para una malaria severa incluye siempre la artemisinina o uno de sus derivados, lo que ha dado lugar a la conocida como TCA (Terapia Combinada de Artemisinina).

Esta estrategia ha sido clave para el control mundial de esta enfermedad infecciosa. Al combinar un derivado artemisínico, cuya duración de acción es corta, con otro antimalárico de acción más prolongada, se dificulta el desarrollo de resistencias y se evitan las recrudescencias típicas de la monoterapia de curso breve con este grupo farmacológico. Sin embargo, pese a todos los esfuerzos por evitarlo, en 2009 se reportan resistencias (9).

2.3 Estructura y mecanismo de acción

Se trata del componente activo del Qinghao, nombre por el que tradicionalmente se designa a *Artemisia annua* L; localizado principalmente en las hojas y flores de las partes altas de la planta. Presenta una estructura de lactona sesquiterpénica con un puente endoperóxido característico y responsable de su actividad antimalárica (Fig. 1). Debido a su escasa solubilidad en agua y aceites, su administración se reduce a la vía oral, algo que limita en gran medida el tratamiento de pacientes con malaria severa ya que en numerosas ocasiones se necesita una formulación parenteral (11).

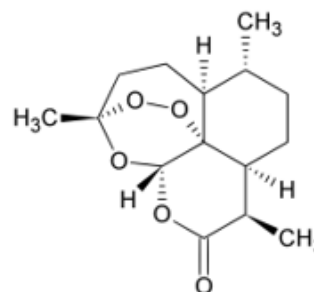


Fig. 1.: estructura química de la artemisinina.

Esta condición ha promovido el desarrollo de fármacos derivados tales como el artesunato o el artemeter, aptos para su administración intravenosa e intramuscular. Son de gran utilidad también las formulaciones vía rectal aptas para su uso en atención primaria, especialmente en caso de emergencia. De esta forma los pacientes no tienen que esperar a ser atendidos en el hospital más cercano, hecho que en numerosas ocasiones retrasa el inicio de tratamiento poniendo en peligro la vida del paciente, principalmente si se trata de niños.

Su acción, de inicio rápido, se ejerce sobre la fase tardía de trofozoito y esquizonte (similar a otros tratamientos antimaláricos); con la ventaja de que además actúa en estados de anillo y trofozoito tempranos (Fig. 2). Pese a que no afecta a la etapa hepática, al interferir en el desarrollo de los gametocitos, la transmisión se ve disminuida.

El mecanismo de acción se basa en los radicales libres que genera la escisión del puente endoperóxido. Esta activación de la artemisinina puede darse de dos maneras (12):

- Activación mitocondrial: favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (13) que derivan en una peroxidación lipídica responsable de la despolarización de la membrana mitocondrial y plasmática del parásito.
- Intervención en la digestión del parásito: durante la fase eritrocitaria, *Plasmodium* se nutre de la digestión de la hemoglobina del hospedador. El grupo hemo resultante le es tóxico, por lo que es neutralizado a hemozoína. Esta conversión es interrumpida por la acción de la artemisinina. En este caso la activación por el grupo hemo da lugar a un radical sobre un átomo de carbono.

También se ha propuesto como mecanismo, la inhibición de la actividad del SERCA de *P. falciparum* (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) (14); y se han descubierto cinco enzimas del metabolismo de *Plasmodium* sobre las cuales la artemisinina podría estar actuando mediante una unión covalente: ornitina aminotransferasa (OAT), piruvato kinasa (PyrK), lactato deshidrogenasa (LDH), espermidina sintasa (SpdSyn) y S-adenosil metionina sintasa (SAMS) (12).

Además, se ha descrito actividad frente a virus, bacterias, helmintos, hongos; e incluso antiinflamatoria (5) y antitumoral (formando enlaces covalentes con proteínas tumorales) (12).

2.4 Problemas de abastecimiento

Desde que en 2002 la OMS establece la TCA como tratamiento de primera línea para presentaciones severas de la enfermedad, el aumento de los requerimientos de producción ha supuesto un desequilibrio entre demanda, disponibilidad y coste por tratamiento (15).

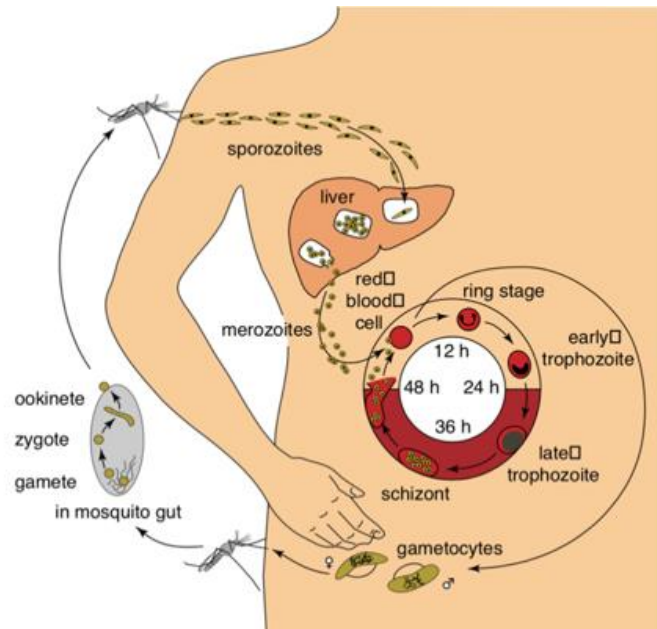


Fig. 2.: ciclo biológico del protozoo *P. falciparum* en humanos (11).

Por una parte, se debe tener en cuenta que los derivados artemisinínicos tienen una vida media corta, por lo que se deben administrar varias veces al día (16). Además, la necesidad de tratamientos basados en esta terapia ha crecido exponencialmente en los últimos años, especialmente en África y Asia, debido al aumento en la incidencia de formas multirresistentes a tratamientos convencionales (10). A esto se le suma que no existe en el mercado ninguna vacuna que ayude a prevenir la infección (17), por lo que el éxito de su control depende de las medidas preventivas actuales y de la terapia farmacológica. Estos tres factores explican la necesidad de un sistema de producción capaz de satisfacer una demanda tan alta.

Si bien es cierto que *A. annua* crece en climas templados y en una amplia variedad de condiciones y localizaciones (principalmente China y Vietnam; pero también África del Este, EEUU, Rusia, India, Brasil...), la producción de artemisinina varía considerablemente según el contenido en la hoja, la variedad de la planta, el riego, los fertilizantes... En cualquier caso, el rendimiento suele ser de un 0'01-0'8% de peso seco (11). En base a este dato, se estimó que el área global destinada a la plantación de *A. annua* debería estar entre 3.000 y 14.000 hectáreas (unos 96.000 kg) para que la producción fuese suficiente para cubrir los 120 millones de tratamientos completos de TCA para adultos en 2006 (18). Esto supone una seria limitación para su comercialización; y explica el elevado coste de producción.

El resultado final ha sido la urgente necesidad de búsqueda de otros recursos, independientes de la planta, que permitan estabilizar el coste de producción y por tanto el del tratamiento; permitiendo así responder a la enorme demanda.

En conclusión, es necesaria una producción sostenible. Primero, tiene que satisfacer los requerimientos globales de fármaco, especialmente teniendo en cuenta que en 2016 casi la mitad de la población mundial corría el riesgo de padecer paludismo (8). Segundo, tiene que hacerse posible permitiendo que el abastecimiento tenga lugar a un precio razonable. Y es que, aquellas zonas en las que más necesidades existen, son precisamente las que menos recursos económicos tienen.

OBJETIVOS

Desarrollar el proceso seguido hasta la producción biosintética actual de artemisinina y sus derivados como fármacos recombinantes, en *S. cerevisiae*; y resaltar que este modelo de síntesis es, a día de hoy, el más ventajoso para hacer frente a la demanda actual de TCAs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de cumplir con los objetivos mencionados, se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed (NCBI), páginas web de instituciones como la Organización Mundial de la Salud (<https://www.who.int/es>), la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (<https://www.aemps.gob.es/home.htm>) o del Centers of Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/>); fundamentalmente. Además, se han utilizado plataformas como Google Patents o la información publicada en las páginas webs de laboratorios como Sanofi, Amyris o Novartis para determinar el posicionamiento actual de las TCA en el mercado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Proyecto Artemisinina

Gracias a una donación de la fundación Bill and Melinda Gates, en 2004 se funda el “Proyecto Artemisinina”, cuyo objetivo era lograr un abastecimiento y precio de las TCA estable, no estacional, de calidad y asequible para países subdesarrollados. Se llevó a cabo gracias a la colaboración de la Universidad de California (con el Doctor Jay Keasling a la cabeza), Amyris Inc., y la OMS (19).

La forma de alcanzar estos propósitos resultó ser un proceso de semi-síntesis. En él, se combinaba una primera etapa en la que se produciría ácido artemisínico (precursor de la artemisinina y sus derivados) gracias a la ingeniería metabólica de microorganismos; seguida de una segunda fase de conversión química al producto final. Esta intervención química en el proceso es esencial para la presencia del puente endoperóxido, ya que, tal y como se ha mencionado anteriormente, es un elemento indispensable para que el fármaco ejerza su mecanismo de acción.

Su punto de partida fue, evidentemente, recopilar toda la información posible sobre la ruta metabólica por la cual la planta produce la artemisinina; y los componentes celulares que participan en ella.

2. Síntesis natural de la artemisinina

Gracias a los sustratos fotosintéticos, las plantas producen Acetil-CoA, punto de inicio de la vía del mevalonato (MVA) (Fig. 3). Esta ruta, presente en eucariotas, algunas bacterias y arqueas; es la base de la síntesis de isoprenoides y tiene lugar en el citosol. Tras una serie de reacciones anabólicas se llega a la producción de farnesil difosfato (FPP), de 15C, compuesto por la condensación de tres isopentenil difosfatos (IPP). La implicación de la vía MVA en la biosíntesis de artemisinina se dedujo mediante un seguimiento de un isótopo marcado de mevalonato hasta su incorporación a la molécula final (20).

Existe también una ruta de biosíntesis de isoprenoides independiente del mevalonato, que tiene lugar en otro compartimento celular: el cloroplasto. El hecho de que su reproducción en organismos no vegetales resulte inviable hace que, en este aspecto, carezca de interés (20).

En *A. annua*, mediante una reacción de ciclación catalizada por la amorfadieno-sintasa (ADS), el FPP es transformado en amorfa-4,11-dieno. A continuación, comienzan una serie de reacciones oxidativas sobre el C12 en las que interviene un citocromo P450 (CYP71AV1, también conocido como AMO,

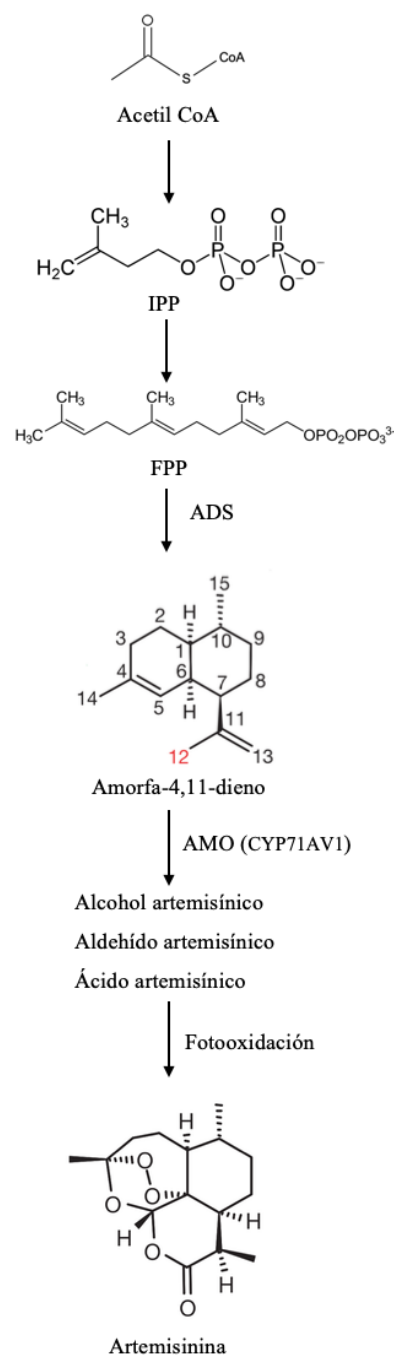


Fig. 3.: principales reacciones en la ruta de síntesis de artemisinina en *A. annua* a partir de Acetil CoA.

amorfadieno-oxidasa), localizado en los tricomas de *A. annua*; para derivar finalmente en ácido artemisínico y ácido dihidroartemisínico (Fig. 4). Estos dos compuestos, son precursores directos de la artemisinina, conversión que tiene lugar mediante un proceso espontáneo dependiente de la luz solar (16).

Desde 1995, doce de los genes relacionados con la biosíntesis de artemisinina en *A. annua* y las secuencias de sus ARNm completos o parciales, se encuentran descritos en GenBank. Además, dado que la familia de los CYP es muy extensa y presenta una amplia variedad de secuencias, se dispone también de una librería de genes presentes en los tricomas de la planta, entre los que se encuentra el que codifica para el CYP71AV1, perteneciente a la subfamilia CYP71D (20).

Tras una serie de valoraciones, se concluyó que alcanzar los de 25g de amorfadieno/ L sería la concentración idónea para una producción semi-sintética de artemisinina que resultase económicamente rentable. No se contabilizó en términos de ácido artemisínico ya que la oxidación del amorfadieno hasta obtener dicho compuesto resultaba en un principio demasiado compleja (19).

3. Búsqueda de sistemas microbianos para la producción de artemisinina

De manera natural, la producción de terpenoides tiene lugar en pequeñas cantidades debido a su compleja estructura, por lo que su obtención natural resulta compleja y de rentabilidad económica escasa. Es por esto que la ingeniería metabólica arroja un poco de luz a la hora de reproducir este tipo de rutas, ya que permite utilizar sistemas microbianos que suponen una alternativa atractiva frente a la extracción de la planta o síntesis química; especialmente si se pretende producir a gran escala (10).

En un principio, el organismo en el punto de mira fue *Escherichia coli*. Esta bacteria ya se había utilizado previamente en el suministro de insulina y somatostatina recombinantes, ya que ofrece ventajas como un alto nivel de expresión proteica, un crecimiento rápido y elevada densidad celular; o requerimientos sencillos y económicos de medios de cultivo. Contra todo pronóstico, no resultó ser tan buen sistema como parecía.

En primer lugar, para aumentar la producción de isoprenoides y poder llegar al FPP, esta bacteria utiliza una ruta diferente, conocida como la ruta DXP (1-deoxi-d-xilulosa-5-fosfato). La idea en un origen fue la sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas que participan en dicha vía. Sin embargo, pese a que la producción de isoprenoides se veía aumentada, continuaba resultando insuficiente, por lo que se concluyó que podría existir algún mecanismo de control desconocido que inhibiese su síntesis (19).

Martin *et al.* (21) probaron entonces a expresar heterológamente en *E. coli* los componentes propios de la ruta del mevalonato presentes en *S. cerevisiae*; además de una versión sintética de la ADS propia de *A. annua* (mejorada mediante una optimización de codones). Se consiguió así una producción de 112 mg de amorfadieno/ L añadiendo glicerol al 0'8% (16). Este rendimiento logró ser mejorado tras una serie de intervenciones en el proceso de fermentación. Los más relevantes fueron:

1. Optimización del proceso de extracción mediante la utilización de un biorreactor bifásico. Esto permitía incorporar una capa de dodecano que atrapaba el amorfadieno, evitando que se perdiese ya que se trata de un componente volátil.

2. Modificación de las condiciones de cultivo que permitiesen la producción de compuestos durante la fase estacionaria.

Así se consiguió aumentar el rendimiento hasta los 450 mg/ L tras 60 horas de fermentación en un biorreactor de 6L. A pesar de todos estos esfuerzos, el objetivo de 25 g/ L seguía lejano.

En segundo lugar, *E. coli* resultó no ser un sistema apto para la expresión de citocromos eucariotas. Además, aunque pudiese llegar a expresar el CYP71AV1 y producir los intermediarios oxidados, se alcanzaría únicamente 1g de ácido artemisínico/ L una vez finalizado el proceso; siempre y cuando este se desarrollase a una temperatura de 20°C, insostenible en un proceso de fermentación industrial (19).

Estos fueron los motivos principales por los que se comenzaron a considerar otras posibilidades, como la extracción de amorfadieno de un tanque de producción con *E. coli* para completar el resto de reacciones hasta ácido artemisínico en otro con *S. cerevisiae*. Esta idea también fue descartada tras llegar a la conclusión de que, para cumplir con un precio que los países subdesarrollados pudiesen asumir, era necesario un solo paso de fermentación (19). Así fue como los dos equipos, el que trabajaba con la bacteria y el que lo hacía con la levadura, evaluaron la situación y concluyeron que este último era el organismo idóneo para desarrollar el Proyecto Artemisinina con éxito.

4. Ingeniería metabólica para la producción de artemisinina en *S. cerevisiae*

Dada su condición de organismo eucariota, *S. cerevisiae* fue finalmente considerado el hospedador más prometedor del proyecto. Se podrían así expresar con mayor facilidad las enzimas vegetales que presentaban problemas de funcionalidad en sistemas bacterianos (20).

4.1 Introducción de la ADS

Para la expresión de la ADS, el grupo de investigación a cargo, comparó el rendimiento, en cuanto amorfadieno obtenido, del gen que codifica para dicha sintasa introducido en un plásmido episómico con un promotor inducible por galactosa (*GALI*) y la introducción del gen en el genoma de la levadura mediante recombinación homóloga. El resultado fue una producción de 600 mg/ L y 100 mg/ L respectivamente (20). El plásmido final, fue denominado *pRS425-Leu2d::ADS* (14) (Fig. 4).

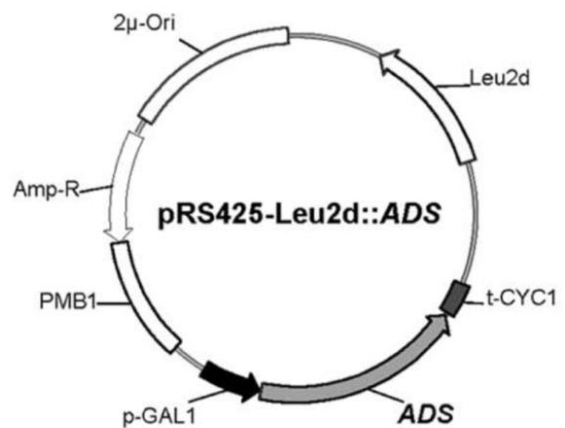


Fig. 4.: plásmido con el gen codificante para ADS bajo el control del promotor *GALI*, utilizado para la producción de amorfadieno (14).

El amorfadieno final, una vez disuelto en dodecano, fue cuantificado por cromatografía de gases (14). Pese a que existen discrepancias en cuanto al rendimiento final, dos cosas estaban claras. La primera es que la optimización del medio, por ejemplo un cambio de medio selectivo a uno rico no selectivo, puede mejorar este rendimiento (14). La segunda es que, dados los resultados del experimento con diferentes plásmidos, la producción de sesquiterpenos en la levadura está directamente relacionada con la dosis génica; aun así, la cantidad de sustrato (FPP) seguía siendo el factor limitante (20).

4.2 Aumento de la producción de FPP:

Para favorecer un aumento en su síntesis por parte de la levadura, se buscaba potenciar la expresión de genes que la promoviesen y disminuir la que derivaban su uso hacia la síntesis de esteroides. Todas estas modificaciones (Fig. 5) se llevaron a cabo mediante el uso de plásmidos integrativos, asegurando así la estabilidad genética de la levadura como hospedador (22).

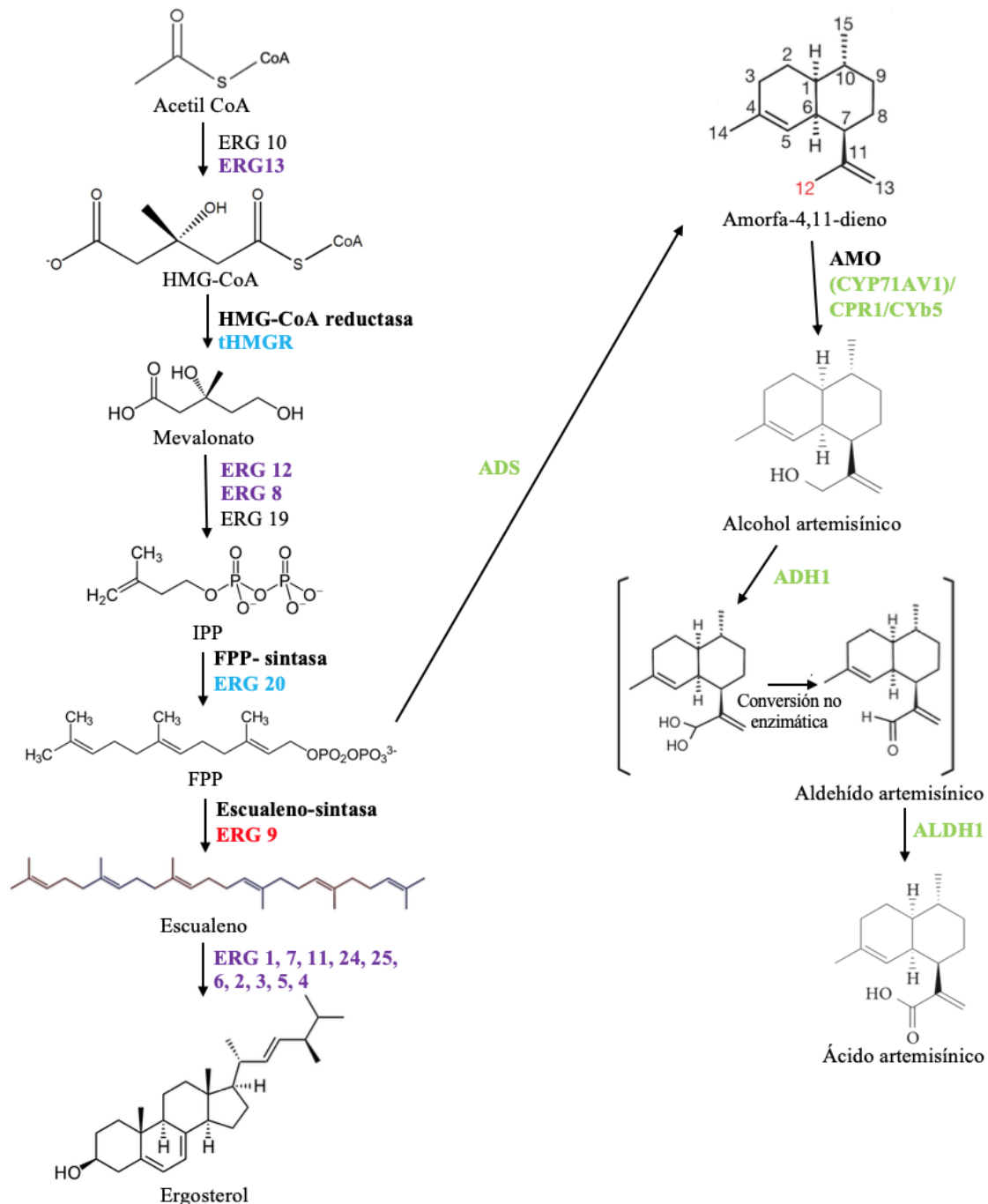


Fig. 5.: esquema general de la ruta en *S. cerevisiae* para la síntesis de ácido artemisínico. El color azul remarca los genes directamente sobreexpresados en la levadura, el color morado los sobreexpresados indirectamente por la regulación de *upc2-1*, el rojo los genes reprimidos y en verde los procedentes de *A. annua*. Basado en: (19, 22, 23, 24, 15).

Los genes sobreexpresados fueron:

- a. Mutación de *upc2* a *upc2-1*, un factor de transcripción implicado en la regulación de la biosíntesis de esteroides (22).
- b. Gen codificante para una 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzimaA-reductasa truncada (*tHMGR*) (22).
- c. *ERG20*, codificante para la FPP-sintasa.

Los genes reprimidos fueron:

- d. *ERG9*, codificante de la escualeno-sintasa, enzima responsable de dirigir el FPP a la biosíntesis escualeno y por tanto a la de ergosterol (25). Para ello, en un comienzo se utilizó un promotor *MET3*, reprimible por metionina (20). Posteriormente, se descubrió que este podía ser reemplazado por el *CTR3*, en este caso regulado por cobre. Así, la expresión génica podría restringirse añadiendo CuSO_4 al medio, que además resulta más económico que la metionina. Dado que ambas cepas produjeron cantidades similares de amorfadieno, la equivalencia en cuanto a la eficacia de ambos promotores quedó demostrada (23).

La manipulación de la expresión de los genes del punto (a) y (c), aumentó el rendimiento a 105 mg de amorfadieno/ L. Tras una integración en el genoma de una copia adicional de *tHMGR*, se alcanzaron los 149 mg/ L (22).

Estas modificaciones, llevadas a cabo por el grupo del Dr. Keasling, todavía no superaban los avances realizados en *E. coli*. Fue en este punto en el que se introdujo la represión de *ERG9*, de tal manera que el carbono no era desviado a la producción de ergosterol y se presentaba más disponible para la ruta del mevalonato. El resultado fueron 153 mg/ L a nivel de laboratorio (26). Conviene apuntar que limitar el carbono disponible para la formación de ergosterol en exceso puede llegar a ser tóxico para la célula (14), por lo que se debía controlar minuciosamente la cantidad de CuSO_4 utilizada.

4.3 Conversión a ácido artemisínico

Para la conversión de amorfadieno a ácido artemisínico se prosiguió con la expresión del citocromo CYP71AV1 junto con su correspondiente reductasa, CPR1, originaria también de la planta. El resultado fue una producción de 100 mg de ácido artemisínico/ L (19). Esto suponía un dilema, ya que resultaba ser un rendimiento menor que el obtenido en *E. coli*; y además la viabilidad de la cepa resultante no era la deseable.

Tras una serie de optimizaciones tanto en la ruta como en las condiciones de cultivo, se consiguió llegar a 2'5 g de ácido artemisínico/ L, mediante un proceso de fermentación basado en el uso de galactosa como fuente de carbono (27).

4.4 Una nueva cepa

Hasta ahora, todo este proceso de ingeniería se había llevado a cabo sobre la cepa de *S. cerevisiae* S288C, debido a su amplia experiencia de uso en biotecnología microbiana. Pese a ello, presenta una serie de inconvenientes, como que no esporula adecuadamente, las construcciones basadas en genética mendeliana resultan complejas y existe poca información sobre su comportamiento a escala industrial (19).

Por el contrario, la cepa CEN.PK2 no presenta estas complicaciones y tiene una fisiología bien conocida (27). Los genes codificantes de ADS, AMO y CPR1 se expresaron conjuntamente en un plásmido denominado pESC-Leu2 (Fig. 6). Al no encontrarse variaciones en la expresión de la ADS, se concluyó que esta no se veía afectada por el tipo de plásmido utilizado (14). Además, el marcador de selección *leu2d* resultó ideal para que los plásmidos perdurasen en la levadura, favoreciéndose así la viabilidad del cultivo (14).

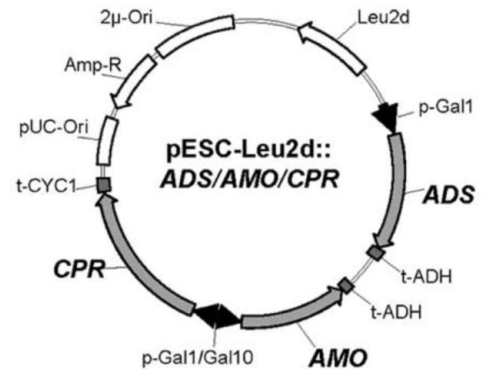


Fig. 6.: plásmido con genes que codifican para ADS, AMO y CPR1; bajo el control de los promotores *GAL1* y *GAL10* (14).

Al expresarse los genes para la ADS, AMO y CPR1, se llevaron a cabo una serie de modificaciones que derivaron en una producción de 40 g de amorfadieno/ L, todavía a escala de laboratorio (19). Una de ellas fue tratar con un medio de crecimiento selectivo, ya que se había comprobado que los no selectivos suponían una pérdida de los plásmidos por parte del hospedador.

Además de una optimización de codones para *S. cerevisiae*, también se eliminó el uso de galactosa como única fuente de carbono, debido principalmente a su elevado coste. La cepa hospedadora, al no presentar el gen *GALI*, no puede metabolizar la galactosa. Esto permite que se pueda utilizar glucosa como fuente de energía (que además es más económica) y galactosa como inductor para la expresión heteróloga de genes de la planta. El crecimiento de ambas cepas es similar (27).

Pese a todos estos avances, los 40 g de amorfadieno/ L no pudieron finalmente ser convertidos en ácido artemisínico. Aunque en un principio se achacó a problemas en la exportación de producto final al exterior celular, un análisis transcripcional indicó que el problema se debía a que la expresión conjunta del CYP71AV1 y la reductasa CPR1 ejercía sobre la célula un estrés oxidativo. Parecía ser, en principio, debido a un mal acoplamiento de las enzimas del citocromo y las reductasas correspondientes. Se les ocurrió entonces expresar tanto el CYP71AV1 como CPR1 en un plásmido multicopia, regulado por un promotor fuerte de galactosa, asumiendo así que serían expresados en la misma proporción. Sin embargo, a pesar de que la cepa era más viable, la producción de ácido artemisínico se veía reducida (19).

Estudiando más a fondo el metabolismo de *A. Annu*a se dieron cuenta de que expresando también el citocromo b5, la velocidad de reacción de enzimas del P450 aumentaba debido a su interacción con este (19). Así se obtuvo mayor cantidad de ácido artemisínico, aunque su síntesis seguía sin ser rentable mientras que las concentraciones de aldehído artemisínico se dispararon. En conclusión, la titulación obtenida continuaba siendo insuficiente y, pese a que

la viabilidad había mejorado, aumentó la acumulación de un intermediario muy reactivo y se cree que también muy tóxico (19).

En la biblioteca de genes que se expresan específicamente en los tricomas de *A. Annuu*, se identificaron los que codificaban para la aldehído deshidrogenasa (ALDH1) y la alcohol deshidrogenasa (ADH1), dependiente de NAD.

En resumen, en este punto ya se había trabajado con las cinco enzimas que intervienen en la oxidación de amorfadieno a ácido artemisínico: AMO, CPR1, CYb5, ADH1 y ALDH1. Faltaba entonces la presencia de la NADPH oxidoreductasa asociada a la ADH1 y ALDH1, que redujo la presencia de aldehído artemisínico (había llegado a suponer un 40% de la producción sesquiterpénica) aumentando así la viabilidad del cultivo (23). También se alcanzó la concentración de ácido artemisínico más alta que se había logrado, al obtenerse una cepa capaz de sintetizar 25g de ácido artemisínico/ L.

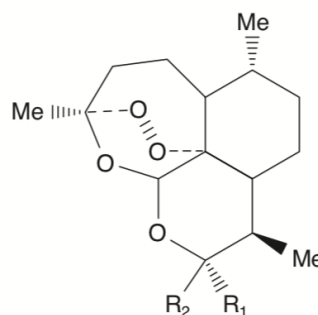
Otra ventaja de *S. cerevisiae* como sistema hospedador, es la eficiencia con la que el ácido artemisínico es expulsado al exterior celular, hecho que facilita mucho su aislamiento a nivel industrial (20). Dado que su pKa es 4.34 ± 0.11 , lo más lógico es que en el medio citosólico se encuentre ionizado, por lo que su transporte al exterior debía estar mediado por un transportador de moléculas polares (14). Este resultó ser un transportador de tipo ABC (ATP-binding cassette), gracias al cual el ácido artemisínico quedaba en el exterior celular como un precipitado cristalino, que podía ser extraído en miristato de isopropilo, al ser soluble en este aceite (23).

4.5 Conversión química

La sucesión de reacciones químicas posteriores depende del derivado artemisínico final que se desee obtener (Fig. 7). Estas pueden tener lugar a gran escala en unos reactores sencillos, por lo que la inversión es razonablemente asequible.

Laboratorios Sanofi ha desarrollado un proceso industrial que consiste en una conversión fotoquímica alternativa y requiere una serie de fotorreactores especializados, logrando potenciar la eficacia de la reacción (15).

Fig. 7.: estructura de la artemisinina y sus derivados (11).



$R_1, R_2 = O$	Artemisinin
$R_1 = H, R_2 = OH$	Dihydroartemisinin
$R_1 = H, R_2 = OMe$	Artemether
$R_1 = H, R_2 = OEt$	Arteether
$R_1 = H, R_2 = OCH_2C_6H_5CO_2H$	Artelinic acid
$R_2 = H, R_1 = O_2CCH_2CH_2CO_2H$	Artesunic acid

4.6 Situación actual, ¿es este proceso susceptible de mejoras?

El modelo de propiedad intelectual establecido por el Doctor Keasling le permitió asegurarse de que toda la artemisinina y derivados producidos gracias a su trabajo, sería accesible para los países subdesarrollados ofreciéndola de la manera menos costosa posible. Es por esto que todas las patentes derivadas de su trabajo se autorizaron gratuitamente a Amyris Biotechnologies (que participó en la optimización y desarrollo del proceso) y la OMS, con la condición de que no obtuviesen beneficio en su suministro a países subdesarrollados. Las cepas modificadas de levadura fueron puestas a disposición de Sanofi de forma gratuita a través de la OMS (28), quienes se encargaron de llevar a cabo el escalado a producción industrial (29). Esto supuso un

intensivo esfuerzo de adaptación de la ruta a la industrialización, y pronto se llegó a la conclusión de que todo el tiempo y recursos invertidos no llevarían al proceso a ser lo suficientemente coste-efectivo para la producción industrial. Es por esto que el laboratorio desarrolló el proceso de conversión fotoquímica del ácido artemisínico, antes mencionado; y una reducción de este compuesto a ácido dihidroartemisínico mediante un catalizador que hace el proceso más estereoselectivo y da lugar a altos rendimientos (superiores al 90% incluyendo la cristalización, aislamiento y secado) (15). Así, en 2013, se empezó a comercializar la artemisinina semi-sintética y aproximadamente 51 millones de tratamientos fueron enviados a África (28).

Aunque la ingeniería genética desarrollada sobre *S. cerevisiae* que lleva a la obtención de amorfadieno y ácido artemisínico a escala de laboratorio se completó en 2008, el progreso tecnológico ha permitido introducir mejoras en el proceso (15). Esto favorece, entre otras cosas, la disminución del coste de producción y una mejor adaptación al cambio de escala. Algunas de las etapas de producción susceptibles de optimización son:

a) Sustratos presentes en el medio: las optimizaciones génicas ya mencionadas y el uso de etanol puro, que favorece la formación de Acetil-CoA como fuente de carbono hicieron que el rendimiento de síntesis de amorfadieno llegase a los 40 g/ L. Sin embargo, a escala industrial, la demanda de oxígeno se ve excesivamente aumentada. Dado el elevado coste de la utilización de galactosa y que la mezcla etanol-glucosa disminuye la cantidad final de amorfadieno a 20 g/ L; el sustrato utilizado es la glucosa (15).

b) Inductores de expresión: el uso de plásmidos inducibles resulta muy positivo sobre la estabilidad de la cepa productora a escala industrial. Se posee amplia experiencia en el empleo de galactosa como inductor de expresión, pero su coste económico nos lleva a pensar que la búsqueda de otros inductores de menor coste podría optimizar el proceso industrial (15).

c) Oxidación de amorfadieno a ácido artemisínico: pese a que se llegó a obtener una cepa productora de 40 mg de amorfadieno/ L, la máxima cantidad de ácido artemisínico publicada fue de 25 g/ L (23). Esto resulta en un rendimiento de conversión del 55% (15), porcentaje que podría aumentarse mediante la manipulación de las enzimas que intervienen en las oxidaciones seriadas. Un ejemplo sería la introducción de mejoras en el acoplamiento entre AMO y CPR1 alterando las interacciones proteína-proteína; especialmente teniendo en cuenta que su asociación produce muchas especies reactivas de oxígeno, lo que supone un elevado consumo de NADPH (15).

d) Selección de los plásmidos (14).

e) Condiciones del medio (14).

Sería útil disponer de un sistema que sirviese como herramienta de apoyo complementaria para poder analizar todas estas posibles variaciones. Por ejemplo, los ensayos de cuantificación de ácido artemisínico y otros intermediarios oxidados que se han utilizado hasta la fecha, requieren, al menos, 30 minutos cada uno y consumen gran cantidad de recursos (15). Se han sugerido, entre otros, espectrometría de masas rápida o ensayos de fluorescencia. Estos permitirían realizar mediciones en menos de 10 segundos por muestra (15).

5. ¿Existen alternativas no microbianas?

Por supuesto, la ingeniería metabólica no ha sido la única alternativa propuesta frente al escaso rendimiento de extracción de la planta.

Para empezar, se propuso el desarrollo de un proceso completo de síntesis química. Sin embargo, se trata de un procedimiento de interés meramente académico, ya que se requieren demasiados pasos para llegar a un producto final cuyo coste pueda competir con la biosíntesis (15). Este modelo es complejo, de bajo rendimiento (27) y no es económicamente sostenible (19).

Por otro lado, *A. annua* ha sido también sujeto de múltiples estrategias para mejorar su productividad. Y es que la disponibilidad natural de artemisinina en planta es difícil de determinar, al tardarse aproximadamente 18 meses desde su plantación hasta la recolección. Este es uno de los motivos por los cuales, tal y como se ha mencionado anteriormente, tanto el precio del producto como su abastecimiento fluctúan constantemente (19).

En primer lugar, se evaluó la viabilidad de métodos no transgénicos. Esto incluía prácticas como la adaptación de los nutrientes y las condiciones ambientales, el cultivo in vitro, la selección de cepas que aportan más rendimiento; o la elicitación (método utilizado a gran escala para inducir la expresión de genes asociados a enzimas del metabolismo secundario) (26). Finalmente, la investigación se centró principalmente en el cultivo selectivo, in vitro, de raíces en cabellera y de brotes; usando miconazol como inhibidor de la escualeno-sintasa, desviando así la ruta de producción de IPP y aumentando las concentraciones obtenidas de artemisinina. El sistema se perfeccionó con la adición de glucosa como fuente de energía (en lugar de sacarosa) y quitosano; alcanzándose finalmente 1'8 mg de artemisinina/ g de peso seco (26), en biorreactores con cultivos de raíces en cabellera (16).

A raíz de la sospecha de que el pico de producción de artemisinina tenía lugar durante la floración, se incrementaron los niveles de fitohormonas y síntesis de FPP. Los resultados sin embargo no fueron satisfactorios, llevando a la conclusión de que no había una relación entre ambos acontecimientos. El aumento de la citoquinina, en cambio, sí se asoció a una mayor producción, ya que esta enzima favorece la formación de nuevos brotes (donde se sintetiza más artemisinina). Pese a todos los esfuerzos, los niveles de producto continuaban resultando insuficientes (26).

La idea de una nueva variedad de planta transgénica se mantenía en el punto de mira, ya que la artemisinina no es el único producto de valor que se puede obtener de ella. Se pueden extraer, además, aceites esenciales como el alcanfor (19). Así, se consiguió obtener 8-10 mg de FPP/ g de peso seco gracias a la expresión de la FPS de *A. tumefaciens*; lo que sugiere que la síntesis de este compuesto es un paso limitante del proceso global (16). Desafortunadamente, los mecanismos de control de este modelo de producción son muy complejos y no existe gran cantidad de información sobre la productividad a escala industrial a largo plazo.

Otro experimento que aportó datos especialmente interesantes fue la introducción en la planta del tabaco de un gen para la FPP-sintasa y la ADS a través de *Agrobacterium* (una bacteria capaz de transferir ADN a las células vegetales), con un péptido que dirigía dichas enzimas al cloroplasto. Pese a que no se trataba del compartimento celular en el que dichas enzimas ejercen su acción de forma natural, se obtuvo un rendimiento de amorfadieno de, aproximadamente, 10-25 µg/ g; frente a los 0,1-1 ng/ g obtenidos con enzimas no dirigidas. La conclusión del

proyecto fue que la producción de sesquiterpenos aumenta de cuatro a cinco veces si las enzimas son dirigidas a compartimentos celulares concretos, desconociéndose el por qué (16).

Una combinación de esta técnica junto con la regulación de algunos genes de la ruta, podría hacer posible la aparición de un nuevo sistema que no necesitase un equipamiento costoso, medios de cultivo o los costes iniciales de una puesta a punto de un sistema de producción basado en la biotecnología microbiana. Sin embargo, por el momento solo se han alcanzado 25 $\mu\text{g/g}$ de amorfadieno en la planta del tabaco (16).

Pese a que los rendimientos finales no son los deseables, sigue existiendo la posibilidad de introducir otros genes y modificaciones que, en general, requieren menos labor de ingeniería y optimización que la que necesitan los sistemas microbianos (16). Además, en los últimos años se han desarrollado nuevas estrategias para mejorar la extracción. Algunos ejemplos de ellas son el uso de ultrasonidos como alternativa a la maceración (que en tan solo 10 minutos puede extraer 4'43 mg de artemisinina/ g) (30); o la reacción entre extracto de planta, oxígeno, ácido y luz, con la que se puede llegar a los 2,1 kg/ L al día (31). Todo esto hace que los sistemas vegetales continúen siendo una opción que merece la pena considerar.

CONCLUSIONES

Desde que en 1972 la profesora Tu YouYou y su equipo aislaron por primera vez la artemisinina, han sido innumerables los esfuerzos realizados por encontrar un sistema que permita que los 216 millones de afectados por malaria (datos de la OMS de 2016) (7), cuenten con una nueva línea de fármacos disponibles para su tratamiento. Este reto contaba con una complicación adicional y es que el proceso de producción tenía que ser lo suficientemente coste-eficiente como para poner esta nueva terapia a disposición de los países subdesarrollados a un precio que estos pudiesen asumir. Se presentaron por tanto dos objetivos principales: alcanzar el mayor rendimiento de producción aceptable y hacerlo al menor precio posible.

La extracción directa vegetal no presenta ninguno de los requisitos necesarios para cumplir con los objetivos predeterminados: el rendimiento de extracción es inferior al 1% y el coste fluctúa en base a demasiadas variables (clima, condiciones del suelo...). La aparición de la biotecnología vegetal hizo que se volviese a reconsiderar esta opción, habiéndose publicado datos de producción de 2,1 kg/ L al día (31). Teniendo en cuenta que siguen existiendo puntos del proceso susceptibles de mejora y optimización parece ser una alternativa bastante competente y con ventajas importantes. Por ejemplo, con los cultivos *in vitro*, se puede llegar a reducir considerablemente la cantidad de pesticidas utilizados y del espacio necesario para la plantación; y se ahorra tiempo en expresar heterológicamente una ruta metabólica ya existente. Sin embargo, las biofactorías como sistema de producción ocupan mucho más espacio que los biorreactores microbianos y demandan más recursos para la misma cantidad de producto. Además, la síntesis nunca llega a ser independiente del tiempo que necesita la planta para el crecimiento y producción de compuestos. Por mucho que este se pueda optimizar, siempre va a ser un factor limitante.

Tampoco un proceso completo de síntesis química supone ningún beneficio, por lo que ha sido simplemente descrito con interés científico. Sí es cierto que su combinación con la participación de la biotecnología microbiana para dar lugar a un proceso biosintético ha resultado ser una de las alternativas más acertadas. Todos los intentos por hacer de *E. coli* el organismo hospedador, por las múltiples ventajas que presenta para ello (alto nivel de expresión proteica, rápido crecimiento, requerimientos sencillos...), se vieron frustrados al obtenerse rendimientos

insuficientes y bajo unas condiciones industriales poco rentables económicamente. Sin embargo, *S. cerevisiae* no presenta esos problemas. Además, al tratarse de un organismo eucariota, conserva la ruta del mevalonato necesaria para el anabolismo del precursor del amorfadieno, el FPP; de manera que se reduce a la mitad la expresión heteróloga de genes de origen vegetal. En general, ha demostrado ser un hospedador genéticamente estable tras largos periodos de cultivo, robusto frente al cambio de escala y de requerimientos sencillos para el crecimiento. Se ha conseguido, además, la posibilidad de activar la biosíntesis en el momento adecuado gracias a promotores inducibles; y la coordinación en la expresión de varios genes al mismo tiempo. Tras muchos años de investigación, ha logrado ofrecer un rendimiento de producto aceptable y a un coste asumible: puede doblar la producción de ácido artemisínico con respecto a *A. annua* para la misma biomasa; y hacerlo en 4-5 días en lugar de en meses (20). Por todo esto, se ha establecido como un método más coste-efectivo que el resto de alternativas basadas en el cultivo vegetal (26).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que han transcurrido casi 10 años desde que en 2004 se fundó el “Proyecto Artemisinina” hasta que en 2013 se comenzó a comercializar una artemisinina semi-sintética. El desarrollo de toda esta investigación ha supuesto una inversión desmesurada, no solo económica sino del tiempo y trabajo que han sido necesarios para dilucidar completamente el metabolismo vegetal y los genes implicados en este. Esto ha supuesto una gran limitación, debido principalmente a la urgente necesidad de una terapia alternativa para aquellas nuevas cepas de *Plasmodium* resistentes a los tratamientos preestablecidos. Sin embargo, todo este esfuerzo ha merecido la pena. En 2014 ya se habían suministrado 51 millones de tratamientos gratuitos a los países más necesitados. Esto solo teniendo en cuenta el continente africano, donde además se ha conseguido aumentar la proporción de niños menores de 5 años por *P. falciparum* que reciben TCAs (Fig. 8); dato muy importante, especialmente teniendo en cuenta que se trata del grupo poblacional más vulnerable.

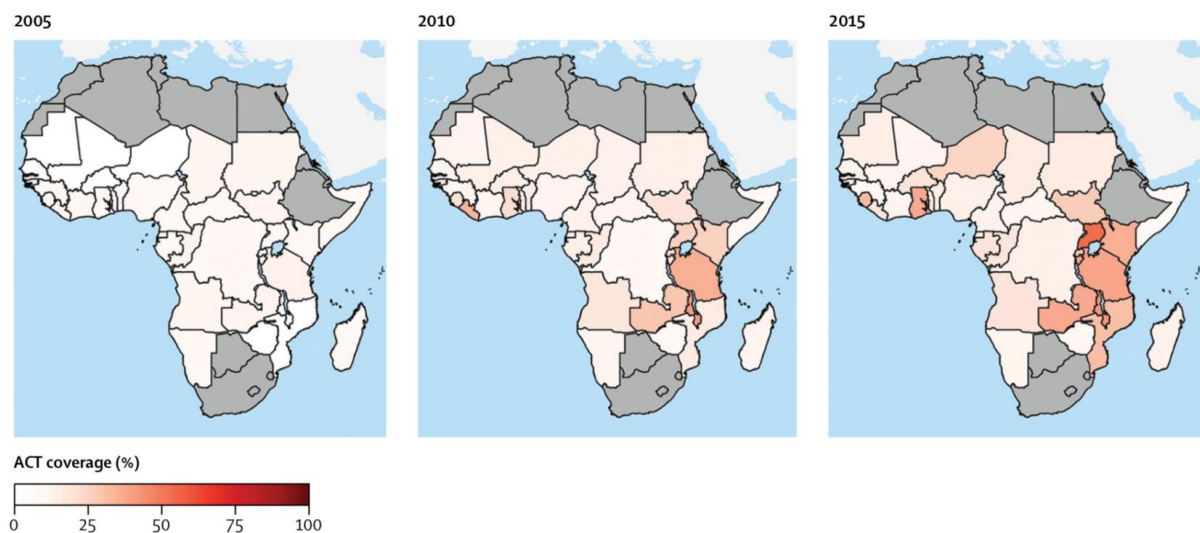


Fig. 8.: Proporción de menores de 5 años con *P. falciparum* que recibieron TCA, por país, en 2005, 2010 y 2015. Las zonas en gris representan países donde la prevalencia de infección por *P. falciparum* en niños de 2 a 10 años es inferior al 2% (32).

BIBLIOGRAFÍA

1. CSIC. [Disponible en: <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>.
2. Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv.* 2012;30(5):1108-18.
3. Ostergaard. S, Olsson. L, Nielsen. J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. 2000;64:34-50.
4. OMS. Informe mundial sobre la diabetes [Disponible en: <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/>.
5. Zyad A, Tilaoui M, Jaafari A, Oukerrou MA, Mouse HA. More insights into the pharmacological effects of artemisinin. *Phytother Res.* 2018;32(2):216-29.
6. Gunduz Ergun B, Huccetogullari D, Ozturk S, Celik E, Calik P. Established and Upcoming Yeast Expression Systems. *Methods Mol Biol.* 2019;1923:1-74.
7. OMS. Informe mundial sobre paludismo 2017 2017 [Disponible en: <https://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2017/es/>.
8. OMS. Paludismo: datos y cifras 2019 [Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
9. Krungkrai SR, Krungkrai J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Asian Pac J Trop Med.* 2016;9(6):525-34.
10. Abdin MZ, Alam P. Genetic engineering of artemisinin biosynthesis: prospects to improve its production. *Acta Physiologiae Plantarum.* 2015;37(2).
11. Agtmael MAV, Eggelte TA, Boxtel CJv. Artemisinin drugs in the treatment of malaria from medicinal herb to registered medication. 1999.
12. Muangphrom P, Seki H, Fukushima EO, Muranaka T. Artemisinin-based antimalarial research: application of biotechnology to the production of artemisinin, its mode of action, and the mechanism of resistance of *Plasmodium* parasites. *J Nat Med.* 2016;70(3):318-34.
13. Feth MP, Rossen K, Burgard A. Pilot Plant PAT Approach for the Diastereoselective Diimide Reduction of Artemisinic Acid. *Organic Process Research & Development.* 2013;17(2):282-93.
14. Ro DK, Ouellet M, Paradise EM, Burd H, Eng D, Paddon CJ, et al. Induction of multiple pleiotropic drug resistance genes in yeast engineered to produce an increased level of anti-malarial drug precursor, artemisinic acid. *BMC Biotechnol.* 2008;8:83.
15. Kung SH, Lund S, Murarka A, McPhee D, Paddon CJ. Approaches and Recent Developments for the Commercial Production of Semi-synthetic Artemisinin. *Front Plant Sci.* 2018;9:87.
16. Arsenault PR, Wobbe KK, Weathers PJ. Recent advances in artemisinin production through heterologous expression. 2008.
17. CDC. How to Reduce Malaria's Impact 2019 [Disponible en: https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/vaccine.html.
18. Lapkin AA, Plucinski PK, Cutler M. Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin. 2006.
19. Paddon CJ, Keasling JD. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(5):355-67.
20. Zeng Q, Qiu F, Yuan L. Production of artemisinin by genetically-modified microbes. *Biotechnol Lett.* 2008;30(4):581-92.
21. Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD, Keasling JD. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature biotechnology.* 2003;21:796-802.

22. Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*. 2006;440(7086):940-3.
23. Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*. 2013;496(7446):528-32.
24. Li C, Li J, Wang G, Li X. Heterologous biosynthesis of artemisinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*. 2016;120(6):1466-78.
25. Keasling JD. Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metab Eng*. 2012;14(3):189-95.
26. Lian J, Mishra S, Zhao H. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metab Eng*. 2018;50:85-108.
27. Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng D, Woolard FX, Regentin R, et al. Production of amorpha-14:15-diene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(3):E1111-8.
28. Keasling Lab [Disponible en: <https://keaslinglab.lbl.gov/application-areas/#Artemisinin>].
29. Amyris [Disponible en: <https://amyris.com/products/malaria-treatment/>].
30. Chemat S, Aissa A, Boumechhour A, Arous O, Ait-Amar H. Extraction mechanism of ultrasound assisted extraction and its effect on higher yielding and purity of artemisinin crystals from *Artemisia annua* L. leaves. *Ultrason Sonochem*. 2017;34:310-6.
31. Triemer S, Gilmore K, Vu GT, Seeberger PH, Seidel-Morgenstern A. Literally Green Chemical Synthesis of Artemisinin from Plant Extracts. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2018;57(19):5525-8.
32. Bennett A, Bisanzio D, Yukich JO, Mappin B, Fergus CA, Lynch M, et al. Population coverage of artemisinin-based combination treatment in children younger than 5 years with fever and *Plasmodium falciparum* infection in Africa, 2003–2015: a modelling study using data from national surveys. *The Lancet Global Health*. 2017:e418-e27.