



Producción de artemisinina y sus derivados en *Saccharomyces cerevisiae*

Beatriz García Lavilla

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Junio 2019

1. INTRODUCCIÓN



S. cerevisiae

- Modelo celular eucariota.
- Screening farmacológico.
- Producción proteica heteróloga.

Tabla 1.: ventajas y desventajas de *S. cerevisiae* en la expresión heteróloga.

Ventajas	Desventajas
Experiencia de uso industrial y status GRAS.	Inestabilidad plasmídica en el cambio de escala.
Manipulación biotecnológica sencilla.	Bajos rendimientos proteicos.
Producción industrial económica.	Hiperglicosilación → problemas inmunológicos.
Crecimiento rápido y en condiciones sencillas.	
Eficiente sistema de secreción proteica.	
Resistencia intrínseca a condiciones de estrés.	
Modificaciones postraduccionales eucariotas.	
Variedad de fuentes de C para obtener energía.	

Ingeniería metabólica

↑ Demanda y ↓ rendimiento de extracción → ↑ € → búsqueda de recursos para producción sostenible.

2002 la OMS establece la TCA (Terapias Combinadas de Artemisinina) como tratamiento de primera línea para presentaciones severas.

- Componente activo de *Artemisia annua* L.
- Lactona sesquiterpénica, puente endoperóxido responsable de actividad.
- Acción sobre: fase tardía de trofozoito y esquizonte; y estados tempranos de anillo y trofozoito.

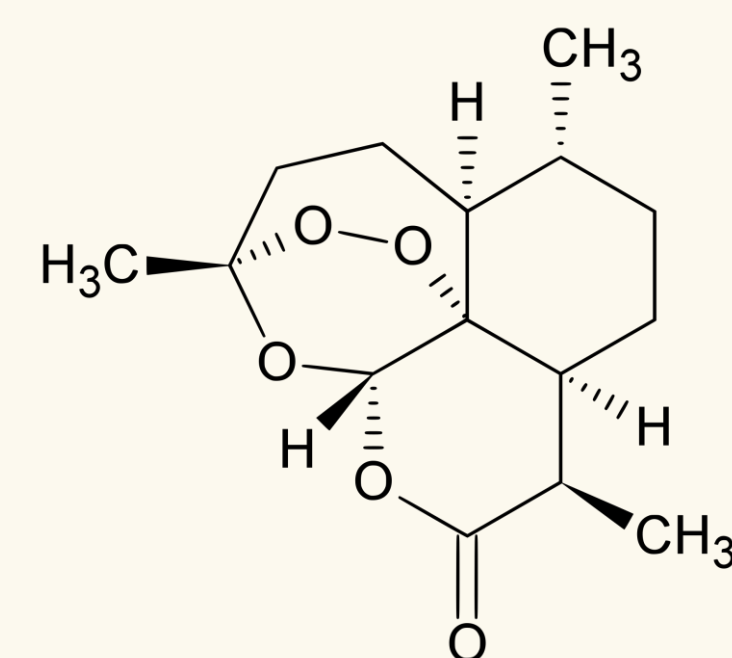


Fig. 2.: estructura química de la artemisinina

¿Por qué es tan importante?

1. La malaria, causada por protozoos del género *Plasmodium* transmitidos por hembras de mosquitos del género *Anopheles*, afectaba a 216M de personas en todo el mundo, en 2016. *P. falciparum* es responsable de la presentación más grave y letal¹ y de la mayoría de muertes.
2. Cepas multirresistentes dificultan el tratamiento.

2. OBJETIVOS

2.1 Desarrollar el proceso hasta producción biosintética actual de artemisinina y sus derivados en *S. cerevisiae*.

2.2 Resaltar que se trata del modelo más ventajoso a día de hoy para hacer frente a la demanda de TCAs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda bibliográfica basada principalmente en:



SANOFI

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



U. de California



OMS



Proyecto artemisinina

Lograr un abastecimiento y precio de TCA estable, asequible para países subdesarrollados → proceso de semisíntesis → objetivo = 25 g de amorfadieno/ L.²

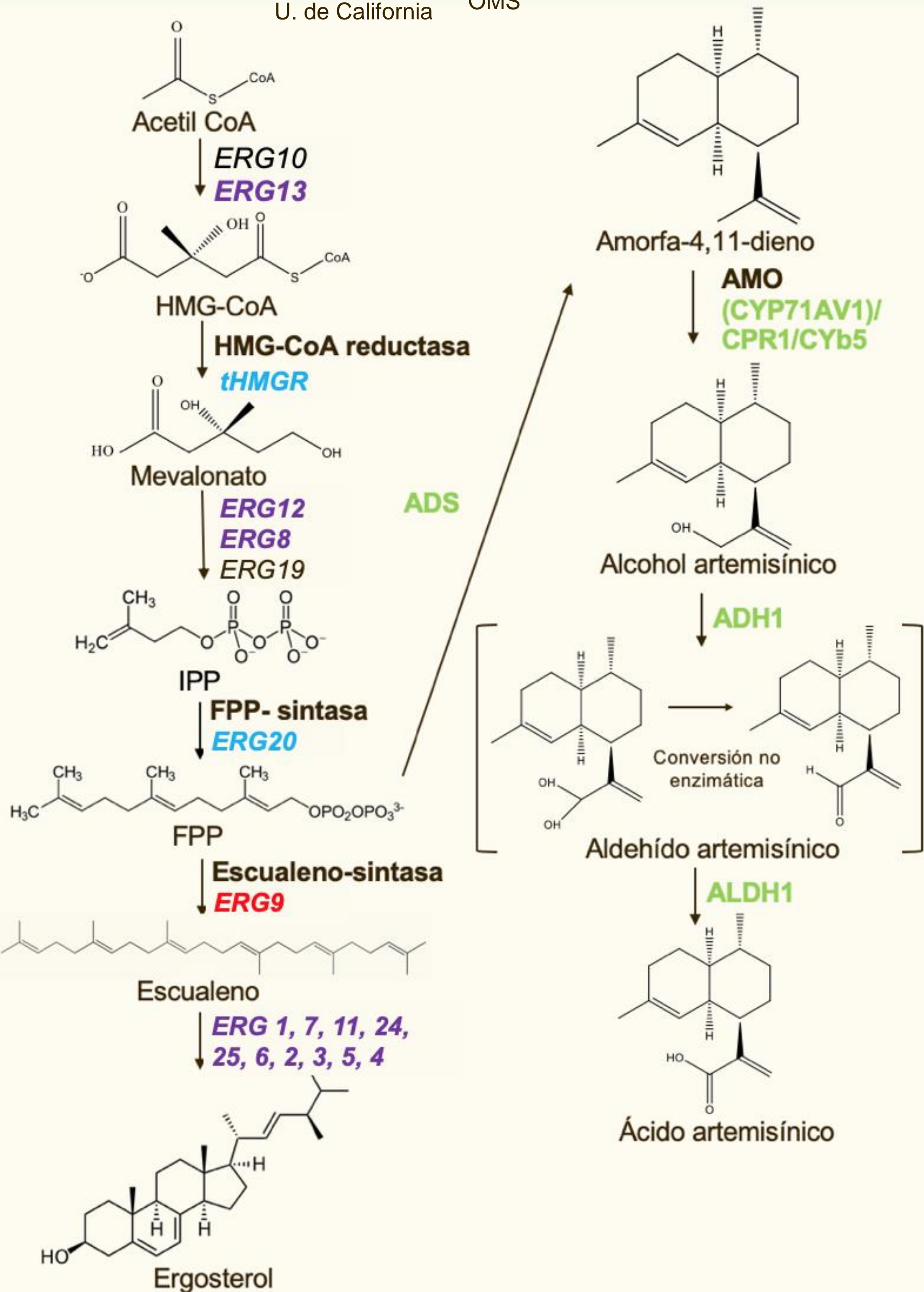


Fig. 3.: ruta en *S. cerevisiae* para la síntesis de ácido artemisínico. Abreviaturas: AMO (amorfadieno oxidasa), ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1), ALDH1 (aldehído deshidrogenasa). Los genes en verde son los originales de *A. annua*, en azul los sobreexpresados, en rojo los reprimidos y en morado los sobreexpresados indirectamente por la regulación de *upc2-1*.

5. CONCLUSIONES

- La extracción vegetal directa no cumple objetivos predeterminados (↑ rendimiento, ↓ coste).
- La biotecnología vegetal podría llegar a cumplirlos pero no está totalmente desarrollada y cuenta con demasiados factores limitantes.
- La síntesis química completa tiene interés meramente académico.
- El proceso de biosíntesis por ingeniería metabólica en *S. cerevisiae* es el método más coste-efectivo, respondiendo a la creciente demanda actual de TCAs.

1. INTRODUCCIÓN DE ADS

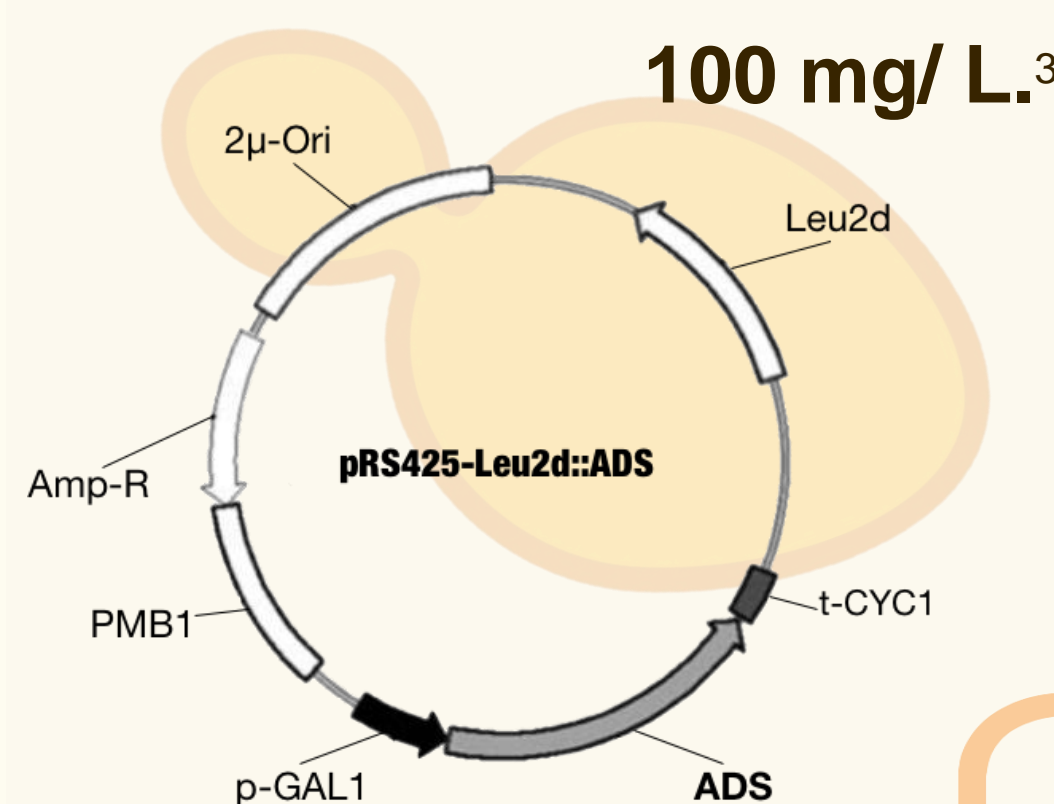
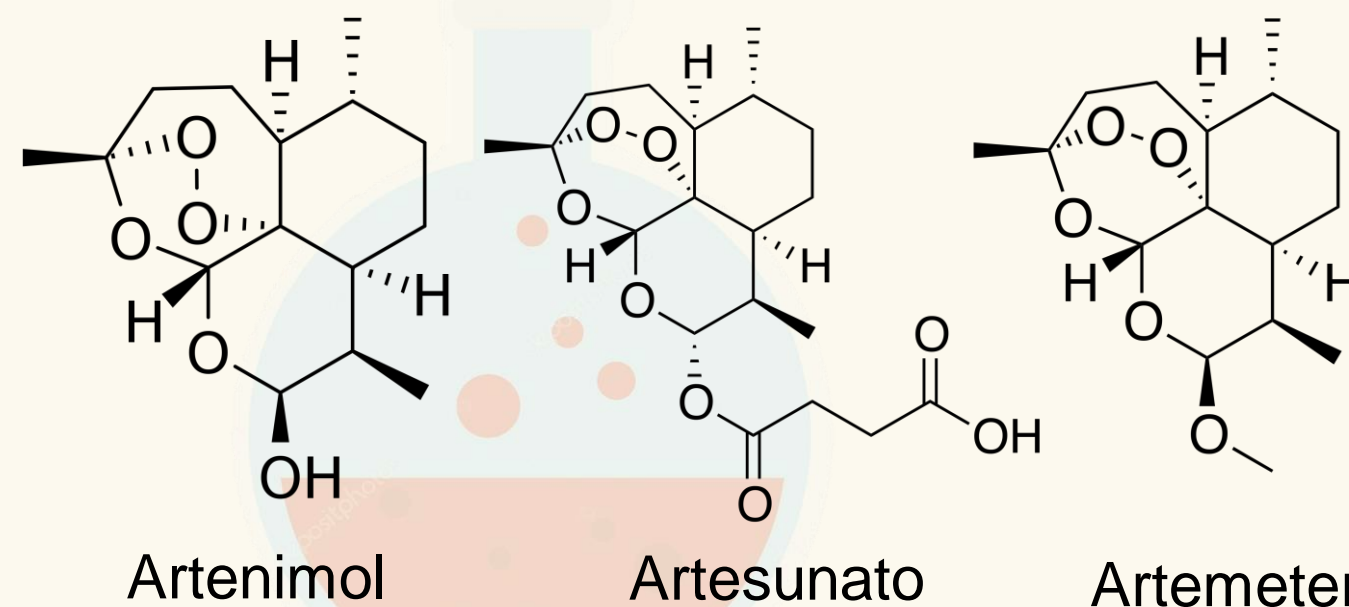


Fig. 4.: plásmido con el gen codificante para ADS, para la producción de amorfadieno.⁴

2. ↑ PRODUCCIÓN FPP

Δ *upc2-1*, ▲ *tHMGR*, ▲ *ERG20* → 149 mg/ L.⁵
 X *ERG9* → 153 mg/ L.⁶

4. CONVERSIÓN QUÍMICA



3. CONVERSIÓN A ÁCIDO ARTEMISÍNICO

- CYP71AV1, CPR1 + optimizaciones → 2'5 g/ L.
- Cambio de cepa: S288C → CEN.PK2
- ADS, AMO, CPR1 + optimizaciones → 40 g/ L.²
- Expresión CYb5 → ↑↑ [aldehído artemisínico].
- ADH1, ALDH1, NADPH oxidorred. → 25 g Ác. artemisínico/ L.

2008: concluye el Proyecto Artemisinina. El Dr. Keasling establece modelo de propiedad intelectual y cede las patentes a Amyris Biotechnologies y OMS (con condiciones) → escalado por Sanofi.
 2013: comercialización artemisinina semi-sintética.

Tabla 2.: comparación entre los distintos métodos de obtención de artemisinina.

Tipo de síntesis	Rendimiento	Ventajas	Desventajas
Química	-	-	↑€, ↓ rendimiento.
Vegetal	Disponibilidad natural	0'01-0'8% de peso seco	Anual. ↑ extensión plantaciones. Clima.
	Métodos no transgénicos	1'8 mg artemisinina/ g peso seco.	Insuficiente.
	Variedad transgénica	Posibles 25 μg amorfadieno/ g.	Equipos <€. Posible futuro desarrollo.
	Mejora extracción	Posibles 2'1 kg/ L al día.	Posible futuro desarrollo. Necesidad urgente.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS. Paludismo: datos y cifras 2019 [Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malaria>].
2. 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.
3. Zeng Q, Qiu F, Yuan L. Production of artemisinin by genetically-modified microbes. *Biotechnol Lett.* 2008;30(4):581-92.
4. 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.
5. 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.
6. 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.