

El teix: biodiversitat per a la salut

CÈSAR BLANCHÉ*

* Jardí Botànic Marimurtra, Fundació Carl Faust. Pg Carles Faust, 9, 17300-Blanes (Adreça actual: Laboratori de Botànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, E-08028-Barcelona)

cesarblanche@ub.edu

RESUM

Es revisen els sistemes de producció de taxans derivats del teix destinats a l'obtenció de fàrmacs antitumorals: recol·lecció, síntesi química, hemisíntesi, cultius cel·lulars i tissulars, cultius de planta en vivers i parcel·les, cultius de fongs epífits, transformació genètica i biotecnologia, així com d'altres fonts vegetals. S'analitzen les característiques de les diverses alternatives actuals, tant per a la producció de paclitaxel (*Taxol*®) com per a la del seu equivalent europeu, el docetaxel (*Taxotere*®) i d'altres derivats, en un context d'explotació sostenible de la biodiversitat d'ús farmacèutic.

Mots clau: *Taxus*, taxans, CITES, explotació sostenible, mercat farmacèutic

RESUMEN

Se revisan los sistemas de producción de taxanos derivados del tejo destinados a la obtención de fármacos antitumorales: recolección, síntesis química, hemisíntesis, cultivos celulares y tisulares, cultivos de planta en viveros y parcelas, cultivos de hongos epífitos, transformación genética y biotecnología, así como de otras fuentes vegetales. Se analizan las características de las distintas alternativas en la actualidad, tanto para la producción de paclitaxel (*Taxol*®) como para la su equivalente europeo, el docetaxel (*Taxotere*®) y otros derivados, en un contexto de explotación sostenible de la biodiversidad de uso farmacéutico.

Palabras clave: *Taxus*, taxanos, CITES, explotación sostenible, mercado farmacéutico.

ABSTRACT

Production systems of taxanes derived from yew for obtention of antitumoral drugs are revised: wild collection, chemical synthesis, semisynthesis, cell- and tissue-culture, tree cultivation in nurseries and in the field, epiphytic

fungi cultures, genetic transformation and biotechnology, as well as different plant sources. Characteristics of current taxane production alternatives to obtain paclitaxel (*Taxol*®), docetaxel (*Taxotere*®) and related compounds, are analyzed in the context of sustainable exploitation of biodiversity for pharmaceutical use.

Keywords: *Taxus*, taxane, CITES, sustainable exploitation, pharmaceutical market.

INTRODUCCIÓ

Des del descobriment, l'any 1963, de l'activitat antitumoral del paclitaxel, aïllat del teix del Pacífic (*Taxus brevifolia* Nutt.), s'ha posat de manifest la necessitat de disposar de material vegetal de partida per a l'obtenció de quantitats creixents de taxans (grup de substàncies químiques al qual pertany el paclitaxel), primer per a les investigacions prèvies a la seva comercialització i, després, per a subvenir a les necessitats d'un mercat amb increment constant de la demanda de fàrmacs per al tractament dels diversos tipus de càncer abordables amb taxans.

Atès que aquest ús del teix no prové d'una pràctica tradicional, sinó que va ser descobert totalment *ex-novo* i, a més, provinent de països desenvolupats (es tracta d'una espècie silvestre a Canadà – Alberta, British Columbia – i als Estats Units – Idaho, Montana, Oregon, Washington) des del primer moment hom va plantejar les necessitats d'aprovisionament des d'una òptica de racionalitat i de sostenibilitat que no són, lamentablement, les habituals en el context de sobreexplotació de recursos naturals destinats a la indústria farmacèutica, especialment en el domini de les plantes medicinals i aromàtiques (SHIPPMANN *et al.*, 2002). Podem dir que és un recurs de la biodiversitat que apareix a Occident al s. XX, amb unes característiques pròpies particulars, però que, en qualsevol cas, és limitat i clarament insuficient per satisfer les demandes del mercat. Des dels primers moments

del descobriment es va abordar la cerca de solucions alternatives d'obtenció de material vegetal que no fossin la tala d'arbres de teix del Pacífic i la història de la investigació en altres fonts de taxans és un paradigma de la recerca per solucions sostenibles pròpia dels temps moderns, enfront de sistemes destructius "antics", que ha generat una abundantíssima literatura científica en els darrers 15 anys, esdevenint model per a molts altres components de la biodiversitat dels quals s'obtenen productes i molècules amb destí al consum sanitari i, més concretament, a la indústria farmacèutica.

A les línies que segueixen, hem intentat resumir quines són aquestes fonts alternatives investigades i, també, quin és l'origen actual del material vegetal consumit i els problemes de conservació de la biodiversitat que estan associats a la provisió del mercat de taxans del s. XXI, així com les possibles solucions proposades.

ORIGEN DEL MATERIAL VEGETAL PER A LA RECERCA PRÈVIA A LA COMERCIALITZACIÓ DEL TAXOL (1962-1992)

La primera mostra de teix recol·lectada amb destí al programa de recerca en nous fàrmacs anticancerosos coordinat pel NCI (*National Cancer Institute*) dels Estats Units fou de 15 lliures (c. 6 kg) d'escorça de *Taxus brevifolia*, obtinguda el 21 d'agost de 1962 per un equip de botànics dirigits per Arthur Barclay, en una localitat situada a 7 milles al N. de Packwood, Washington, al *Gifford Pinchot National Forest*, Washington. L'extracte d'aquesta escorça es confirmà actiu en animals d'experimentació el 1963 i, al setembre de 1964, es realitzà una recol·lecció més gran per tal de permetre l'aïllament del compost actiu de l'extracte (encara no conegut aleshores) (cf. HANSEN, 1992; STEPHENSON, 2002).

Aquest compost és aïllat i, posteriorment, elucidat estructuralment l'any 1971, en què MONROE E. WALL l'anomena "taxol" (WANG *et al.*, 1971), mentre que cal esperar fins el 1977 a què SUSAN HOROWITZ i els seus col·laboradors de l'*Albert Einstein College of Medicine* de Nova York descobreixin el mecanisme d'acció farmacològica del taxol (bloquejant el desacoblament dels microtúbuls implicats en la divisió cel·lular). El procés d'autorització de nous fàrmacs als Estats Units és lent, complex i amb moltes garanties per part de l'agència competent (la FDA, *Food and Drug Administration*). Per a les fases d'anàlisi clíniques (estudis de dosi, efectes secundaris, etc.), es consumeixen,

fins al 1989, 50 tones d'escorça (pes sec) de *T. brevifolia*, que el NCI contracta a *Hauser Chemical Research* (Boulder, Colorado), obtingudes principalment de poblacions naturals i apareixen els primers dubtes sobre la sostenibilitat del sistema d'obtenció (i sobre l'extensió real de les poblacions de l'espècie, no avaluades encara en aquells moments).

Finalment, la FDA lliura l'autorització per a l'ús del taxol per al tractament del càncer d'ovari el 1992 (i, més tard, per al càncer de mama, el 1994) i el nom del fàrmac és registrat com a *Taxol*® per la companyia protegida per la patent (MBS, *Bristol-Myers Squibb Company*, New York), mentre que el nom genèric del compost químic serà, a partir d'ara, paclitaxel.

Després de 3 dècades de recerca en I+D, a punt de produir-se el llançament del nou medicament autoritzat, calia resoldre l'aprovisionament de material vegetal d'origen. La previsió de necessitats era que, per al tractament amb paclitaxel d'una sola pacient, es requerien 3-4(6) arbres de *Taxus brevifolia* (que podien tenir 150-200 anys d'edat!). A la consciència de la capacitat de producció limitada de les poblacions naturals, calia afegir-hi la problemàtica de conservació de l'hàbitat, on vivia un mussol catalogat per la normativa nord-americana. Tot plegat va generar una considerable controvèrsia, que va arribar a plantejar-se com un (fals) dilema entre els drets del teix i de les malalties a tractar, formulat en els termes següents:

Do we need to sacrifice a unique Pacific yew ecosystem in order to treat ovarian and breast cancer for our mothers, sisters, and daughters?

El debat públic va arribar a forçar audiències al Congrés dels Estats Units i, finalment, a una avaluació d'impacte ambiental, de més de 2.000 pàgines, preparada per la EPA (*Environment Protection Agency*), a principis del 1993. En definitiva, Bristol-Myers es comprometia a obtenir paclitaxel de fonts sostenibles per al llançament del seu producte: s'investigaven altres teixos [com ara *T. x media* (= *T. cuspidata* x *T. baccata*), ornamental] amb menys contingut en paclitaxel, amb la idea d'aprofitar restes de poda i, finalment, es signava un encàrrec de 40 tones de fulles i brots de teix a un grup (*Alliance for Taxol*), constituït per dues universitats (*Ohio State University* i *University of Mississippi*) i els més grans viveristes i productors de teix del país, (*Zelenka Nursery, Inc.*, de Michigan). No obstant això, s'inicià immediatament una amplíssima

bateria de projectes de recerca per identificar altres maneres alternatives d'obtenir el paclitaxel, que han continuat fins als nostres dies, amb la consciència que encara no es disposava d'una font sostenible, segura i contínua de taxans per a ús en terapèutica anticancerosa (HANSEN, 1992; STEPHANSON, 2002).

MÈTODES D'OBTENCIÓ DE TAXOL I D'ALTRES TAXANS (1992-2007)

1. Extracció de paclitaxel de *Taxus* silvestres

El procediment inicial consistia en l'activitat de recol·lectors (percepció mitjana: c. 5 \$ / kg d'escorça i 100-150 \$ / dia de treball al bosc, cf. HANSEN, 1992). L'escorça se separa de l'arbre amb una navalla especial, s'uniformitzen les dimensions de les peces d'escorça, aquesta s'asseca i el paclitaxel s'extreu químicament. El primer any de producció de la patent, el Govern dels EEUU i BMS van encarregar la producció de 25 kg de Taxol® (paclitaxel), per als quals calien 312 tones d'escorça (30.000 arbres) que servien per al tractament de 12.000 pacients. Per a l'any següent, amb unes expectatives de 21.000 noves pacients diagnosticades amb càncer d'ovari/any, la previsió era de 130 kg de Taxol® (= 800 tones d'escorça, per a 65.000 pacients) per arribar a unes estimacions de consum, durant 5 anys i per a 185.000 pacients, de 12.000 tones d'escorça de teix. L'any 1994 s'aconsegueix resoldre l'hemisíntesi del paclitaxel a partir de la 10-DAB (10-deacetil baccatina III), un precursor del Taxol® que es pot obtenir de les fulles de *T. baccata* i de *T. wallichiana* (vegeu més endavant, 2). Això impulsa el conreu a gran escala del teix europeu (*T. baccata*, cf. PIESCH *et al.*, 1994) i alleuja la pressió sobre *T. brevifolia*, però la traspasa al teix de l'Himàlaia (*T. wallichiana*), mancat de protecció que, a més dels usos tradicionals en medicina ayurvèdica i tibetana, passa a esdevenir sobreexplotat de manera incontrolada durant alguns anys.

SHIPPMANN (2001) aporta les següents dades alarmants sobre les quantitats de *T. wallichiana* explotades: s'estima que l'any 1994 es van exportar des de l'Índia 5.500 tones de fulles (tenint en compte que 1 arbre pot oferir 15-25 kg de fulla en pes fresc) i, fruit de la pressió internacional i del propi compromís governamental, l'Índia prohibeix l'exportació de fulla de teix el 1996. Bloquejada aquesta línia d'aprovisionament, el problema es desplaça a la Xina i al Nepal (tot i que aquest país en tenia prohibida l'exportació des del 1993).

SHIPPMANN (l.c.) estima que, només a la província xinesa de Yunnan, durant el període 1995-2001, es van recol·lectar 5.000-10.000 tones d'escorça i 2.000 tones de fulla, amb destí a una única companyia, productora d'uns 150 kg de paclitaxel/any. Naturalment, aquesta activitat va tenir un impacte enorme sobre les poblacions de *T. wallichiana* i el sistema d'explotació era absolutament desorganitzat: els arbres silvestres eren talats per habitants locals i després venuts a comerciants intermediaris, amb escàs seguiment de les conseqüències i amb poquíssims programes de regeneració o de cultiu (en contrast amb la situació a França, on existeix un mercat organitzat per als brots de *T. baccata*).

Aquesta situació va comportar l'adopció de mesures de protecció internacionals a través dels instruments de regulació del comerç: *T. wallichiana* era inclòs l'any 1995 al conveni CITES (Apèndix II), a proposta de l'Índia, prohibint-ne l'exportació de material vegetal silvestre. No obstant, es consideren exempts d'aquesta regulació els productes farmacèutics acabats (és a dir, el paclitaxel, classificat com a tal, que és exportat per Índia i Xina). Pel que fa a *T. brevifolia*, ha aconseguit escapar a la pressió sense arribar a atènyer graus d'amenaça a gran escala significatius en l'actualitat: l'avaluació que en fa la llista vermella de la UICN (IUCN, 2008) és de NT (*Near threatened*).

2. Síntesi química i hemisíntesi de paclitaxel

És lògic pensar que la primera alternativa a assajar havia de ser la de sintetitzar químicament el paclitaxel, de manera que l'aprovisionament esdevingués independent del material vegetal. No obstant, aquesta síntesi és complexa (més de 25 passes) i no va ser completada fins l'any 1994 (HOLTON *et al.*, 1994). Té un rendiment molt baix (c. 2%), amb passes especialment crítiques i tot el procés requereix de l'ús de dissolvents molt potents, de manera que no s'ha aconseguit encara la producció per aquesta via a escala industrial, tot i que segueix investigant-se en la síntesi completa (cf. KINGSTON *et al.*, 2002).

En canvi, l'any 1988 un equip francès havia publicat l'hemisíntesi de paclitaxel des de 10 DAB, produïda per fulles de *T. baccata* (DENIS *et al.*, 1988). Aquest compost químic (la 10-DAB) ja conté el nucli bàsic de la molècula de paclitaxel, és produït en grans quantitats pel teix i és fàcilment transformable en el compost final, de manera que només cal realitzar la síntesi parcialment ("hemisíntesi"). L'equip nord-americà

Espècie de <i>Taxus</i>	Espècie fúngica	Referència
<i>T. brevifolia</i>	<i>Taxomyces andreanae</i>	STIERLE <i>et al.</i> , 1993
	<i>Pestalotia sp</i>	STROBEL <i>et al.</i> , 1996
	<i>Pithomyces sp</i>	STROBEL <i>et al.</i> , 1996
	<i>Monochaetia sp</i>	STROBEL <i>et al.</i> , 1996
<i>Taxodium distichum</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	LI <i>et al.</i> , 1996; YUAN <i>et al.</i> , 2006
	<i>Periconia sp.</i>	LI <i>et al.</i> 1996; WANG <i>et al.</i> , 2000; ZHOU 2001; GUO <i>et al.</i> , 2006; XU <i>et al.</i> , 2006;
<i>T. wallichiana</i>	<i>Sporormia minima</i>	SHRESTHA <i>et al.</i> , 2001
<i>T. wallichiana</i>	<i>Trichothecium sp.</i>	SHRESTHA <i>et al.</i> , 2001
---	<i>Alternaria sp.</i>	WANG <i>et al.</i> , 2000; ZHOU 2001; GUO <i>et al.</i> , 2006; XU <i>et al.</i> , 2006; YUAN <i>et al.</i> , 2006).
---	<i>Fusarium lateritium</i>	LI <i>et al.</i> , 1996; WANG <i>et al.</i> , 2000; ZHOU 2001; GUO <i>et al.</i> , 2006; XU <i>et al.</i> , 2006;
---	<i>Penicillium raistrickii</i> H10BA2	STIERLE & STIERLE, 2000
---	<i>Seimatoantherium tepuiense</i>	TULP & BOHLIN, 2002
---	<i>Nodulisporium sylviforme</i>	ZHAO <i>et al.</i> , 2004
<i>T. chinensis</i>	<i>Ozonium</i> BT2	GUO <i>et al.</i> , 2006
<i>T. celebica</i>	<i>Fusarium solani</i>	CHAKRAVARTHI <i>et al.</i> , 2008

Taula 1: Espècies fúngiques productores de paclitaxel

Espècie fúngica / Origen	Rendiment	Referència
<i>Ozonium sp.</i> -BT2	4 -7 µg/L DAB III	GUO <i>et al.</i> , 2006
<i>T. chinensis</i> var. <i>mairiei</i>	12 -18 µg/L paclitaxel	
<i>Fusarium solani</i>	1.6 µg/L paclitaxel	CHAKRAVARTHI <i>et al.</i> , 2008
<i>T. celebica</i>		
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	60-70 µg/L paclitaxel	CHAKRAVARTHI <i>et al.</i> , 2008
<i>T. wallichiana</i>		
<i>Fusarium mairiei</i>	20 µg/L paclitaxel.	CHAKRAVARTHI <i>et al.</i> , 2008
<i>T. chinensis</i> var. <i>mairiei</i>		
<i>Pestalotiopsis microspora</i> -CP4	50 -1487 ng/L paclitaxel (genèticament inestable)	LI <i>et al.</i> , 1996
<i>T. wallichiana</i>		

Taula 2. Rendiment en la producció fúngica de paclitaxel

Tàxon	Compost químic	Referència
<i>Afrocarpus gracilior</i>	paclitaxel	STAHLHUT <i>et al.</i> , 1999
<i>Corylus avellana</i>	paclitaxel	SERVICE, 2000
<i>T. canadensis</i>	taxà 46	HANSON, 2001
<i>T. cuspidata</i>	I-hidroxitaxuspina C	HANSON, 2001
<i>T. cuspidata</i>	taxezopidina J	HANSON, 2001
<i>T. cuspidata</i>	taxà reestructurat 49	HANSON, 2001
<i>T. mairei</i>	component bicíclic 50	HANSON, 2001
<i>T. mairei</i>	component bicíclic 51	HANSON, 2001
<i>T. mairei</i>	taxamaina A (52)	HANSON, 2001
<i>T. mairei</i>	2(3→20) abeotaxà	HANSON, 2001
<i>T. media</i> + <i>T. brevifolia</i>	anàlegs de paclitaxel i brevifoliol	HANSON, 2001

Taula 3. Altres fonts vegetals de paclitaxel i d'altres taxans relacionats

patenta el 1992 un sistema d'hemisíntesi amb més rendiment i des de 1993 ja s'obté industrialment per aquesta via per BMS, principalment a Irlanda, desestimant-se des d'aleshores l'aprovisionament a partir del *T. brevifolia* nord-americà. No obstant, a més d'aquestes dues línies principals (extracció de material vegetal i síntesi/hemisíntesi), centenars d'investigadors de tot el món han mirat d'obrir noves vies d'obtenció que es resumeixen a continuació.

3. Producció fúngica (de paclitaxel i d'altres taxans)

Ja l'any 1993 s'havia descobert que el paclitaxel era produït també per un nou fong, recentment descrit, *Taxomyces andreanae*, que viu (endofític) a l'escorça de *T. brevifolia* (STIERLE *et al.*, 1993). El descobriment era rellevant perquè suggeria la possibilitat de transferència horitzontal de material genètic entre hoste (teix) i fong, obrint nous conceptes en evolució, però sobretot perquè iniciava una línia de recerca en fongs productors de taxans. Una mostra de les espècies investigades es pot observar a la taula 1.

Òbviament, el pas següent és la previsió de desenvolupar fermentacions fúngiques a gran escala per a produir industrialment paclitaxel i d'altres taxans (amb o sense precursors), a baix cost i en grans quantitats. I la possibilitat d'ús de la diversitat fúngica subratlla les relacions estretes entre Biodiversitat i Salut. Tanmateix, els resultats obtinguts (taula 2) mostren una producció baixa i inestable i es requereixen noves investigacions: el sistema no és apte encara per a la producció immediata.

4. Altres fonts vegetals (de paclitaxel i d'altres taxans)

Si alguns fongs podien produir paclitaxel, per què no d'altres espècies vegetals? Fruit del desenvolupament d'amplis programes de química orgànica de productes naturals, a més de *T. brevifolia*, el paclitaxel ha estat aïllat de la resta d'espècies de *Taxus*, juntament amb d'altres compostos

químics relacionats, derivats o anàlegs, com ara el brevifoliol, o precursors, com la ja citada acetil baccatina o 10-deacetilbaccatina III (10 DAB). Les limitacions en l'origen de material vegetal han fet orientar les recerques també cap a d'altres grups vegetals, propers a *Taxus* (descobriment de la podocarpàcia africana *Afrocarpus gracilior* com a productora de paclitaxel) o filogenèticament allunyats (producció de paclitaxel a l'avellaner, *Corylus avellana*) (vegeu taula 3). Es tracta d'una línia d'obtenció que encara no ha passat a fases industrials, a excepció de l'ús de la 10-DAB com a precursor en l'hemisíntesi de paclitaxel.

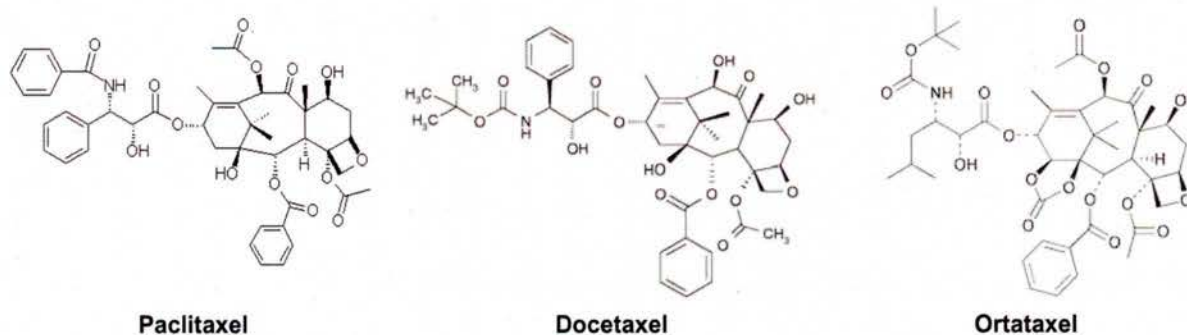


Figura 1: Estructura química de paclitaxel, docetaxel i ortataxel

5. Cultius cel·lulars. Biorreactors

Una alternativa de producció que ha estat desenvolupada amb un gran esforç ha estat cercar el disseny d'instal·lacions (biorreactors) on es poden cultivar cèl·lules aïllades de la fulla de teix que siguin capaces de produir taxans. És una via ambientalment correcta i sostenible perquè pressuposa no haver de consumir recursos vegetals silvestres, sinó cèl·lules que es poden anar renovant i que, a més, permet tenir un control estricte dels requeriments tècnics del procés i intervenir en l'augment del rendiment i de la selectivitat (manipulant les condicions de conreu o a través d'enginyeria metabòlica), encara que presenta els desavantatges genèrics de la producció de metabòlits secundaris que, per norma general, sol ser més gran en teixits diferenciats i menor en les cèl·lules meristemàtiques i indiferenciades dels cultius cel·lulars.

Aquesta tecnologia, coneguda també com a PCF (*Plant Cell Fermentation*) ha estat capaç de proveir el mercat de paclitaxel en quantitats significatives. Un cop seleccionades les línies cel·lulars, es transfereixen a reactors biològics o fermentadors, on les cèl·lules produeixen paclitaxel, que és extret directament del medi de cultiu, purificat per cromatografia i aïllat per cristal·lització. El procediment va obtenir la llicència i els drets de desenvolupament per a BMS i la seva filial *Phyton Catalytic* i la producció es duia a terme a través de l'empresa de matriu alemanya *DBF Pharmaceuticals*, que es van fusionar el 2003. També *Samyang Genex* comercialitza un procés de producció de paclitaxel per a cultius cel·lulars. La recerca en aquesta opció de producció ha comportat notables avenços en el coneixement de la biosíntesi de paclitaxel (ROBERTS, 2007).

6. R+D en nous taxans

Les limitacions que presenta el paclitaxel (en l'eficàcia del tractament, en la solubilitat en medi

aquós o en el rendiment de la producció) han estimulat la cerca (disseny, síntesi, hemisíntesi) de noves molècules relacionades que han d'aspirar a cobrir part del mercat creixent de taxans a escala mundial. Els múltiples programes de R+D en aquest àmbit han donat lloc a diversos productes nous, els més rellevants dels quals són el docetaxel i l'ortataxel (figura 1).

El docetaxel és un producte esterificat de la 10 DAB III i és similar al paclitaxel, del qual difereix a la posició C10 per un grup hidroxil en lloc d'èster acetat i per una substitució ter-butil en lloc de la cadena lateral de fenilpropionat. Aquestes característiques químiques permeten a la nova molècula una millor solubilitat en solució acuosa. El docetaxel és d'aplicació al càncer de mama, de cèl·lules no petites de pulmó, de pròstata, d'estómac, i insensibles a paclitaxel. És comercialitzat per *Sanofi – Aventis* i el seu nom registrat és *Taxotere®*. Pel que fa a l'origen, s'obté per hemisíntesi a partir de materials extrets de *T. baccata* renovables (fulles de teixos conreats, principalment a França).

L'ortataxel, amb menys substituents cíclics, és una molècula amb millor solubilitat encara i de potència superior al paclitaxel i al docetaxel, d'aplicació al càncer de mama refractari o amb metàstasi. Es troba en l'actualitat en fase d'estudis clínics avançats (Fase II). Pel que fa a la seva obtenció, desenvolupada a Europa per *Indena* (Itàlia) en col·laboració amb *ISOF* (Bologna) i la *Università di Milano* (els drets han estat adquirits el 2007 per *Spectrum Pharmaceutical*, EEUU), es duu a terme per hemisíntesi, també a partir del precursor 10-DAB, obtingut de fulles de *T. baccata*.

Semblantment als citats, s'ha obtingut en els darrers anys una plèiade de nous taxans i compostos relacionats per hemisíntesi (cf. BUTLER, 2005), gairebé sempre a partir de precursors obtinguts de fulles de *Taxus*, que

fan preveure necessitats constants i creixents d'aprovisionament de material vegetal en el futur immediat.

7. Bioenginyeria

Finalment, la cerca de nous procediments d'obtenció de taxans ha començat a explorar les possibilitats de la biotecnologia, mitjançant la transferència de les rutes biosintètiques vegetals dels taxans a hostes microbians susceptibles de ser cultivats. L'alternativa és ambientalment força amigable, permetria la manipulació genètica per incrementar els rendiments i es basa en l'ús de cèl·lules microbianes, més adaptables a processos a gran escala (cèl·lules més petites que les vegetals, insensibles a l'estrès de cisalla dels biorreactors; amb temps de duplicació més curts i amb temps de cultiu també més breus, amb menys risc de contaminació). No obstant, algunes rutes biosintètiques són massa complexes o s'expressen només de manera incompleta i algunes etapes són crítiques i no han pogut ser encara superades de manera efectiva (per exemple, l'expressió de sistemes redox – com ara les P450 hidroxilases – estrictament necessàries). Alguns progressos significatius en aquesta línia de recerca es poden consultar a WALKER & CROTEAU (2000) o a DEJONG *et al.* (2006).

MATERIAL VEGETAL EN EL MERCAT ACTUAL DE TAXANS

El mercat dels taxans

El mercat mundial de fàrmacs representa un volum d'uns 600.000 M \$ (2007), essent les tres primeres indicacions farmacològiques, la cardiovascular, el sistema nerviós central i, en tercer lloc, l'oncologia. Les vendes del mercat oncològic, que s'han duplicat des de l'any 2002, són de c. 60.000 M \$ l'any 2008 (Font: *Lead-Discovery*, UK) i, les de taxans amb marca, ultrapassaven els 3.000 M \$ l'any 2006 (Font: *Edgar-Online*), amb un creixement anual de c. 10% (sense tenir en compte els taxans sense marca). Es tracta, per tant, d'una finestra d'oportunitat econòmica rellevant, les característiques de la qual cal tenir presents si tenim posat l'horitzó en el futur del teix, íntimament lligat a l'evolució d'aquest mercat.

En els darrers anys, ha tingut lloc una certa reestructuració dels agents que intervenen en el marc de l'explotació de taxans. D'una banda, ha expirat la patent del *Taxol*®, que era de cinc anys (1992-1997) per a BMS. Aquesta companyia

(amb no poques dificultats i diversos processos judicials als EEUU) ha aconseguit frenar l'aparició de nous genèrics lliures fins al 2001 (de manera que ha afegit 4.000 M \$ addicionals de vendes als guanys anteriors, totalitzant uns 11.000 M \$). Un cop obert el mercat, al gener del 2001, Ivax ven en 10 setmanes (només als EEUU) 30 M \$ del genèric Paclitaxel Injection (*Onxol*®) i, durant tot el 2001, té lloc un descens en les vendes del paclitaxel amb marca (*Taxol*®, BMS) del 45%, mentre que Ivax factura 206 M \$ per al paclitaxel genèric. En paral·lel, augmenta, a escala mundial, la quota de mercat del docetaxel (*Sanofi-Aventis*, sota el nom de *Taxotere*®). Cal recordar que la patent que protegeix el docetaxel ha començat a caducar el 2007 i, com a molt, diversos països tenen formulacions patentades fins al 2013.

De manera que podem afirmar que en aquests moments s'està alliberant el mercat mundial de taxans i que les dues grans companyies (BMS i *Sanofi-Aventis*), que han tingut una posició predominant fins ara, han donat pas a nous laboratoris, nous productes i noves formes farmacèutiques (per exemple, l'*Abraxane*®, aparegut el 2005, que incorpora al paclitaxel nanopartícules d'albumina, millorant-ne la biodisponibilitat i la penetració). Apareix, doncs, un nou mercat amb possibilitat d'inversió en R+D en l'ús de la biodiversitat, no bloquejat per les grans companyies i amb un volum actual de més de 3.000 M\$: és l'oportunitat per a un gran nombre de companyies biotecnològiques de mida molt variable (més de 2.000 patents registrades), en un context de canvis molt ràpids en la situació econòmica i amb un paper creixent de les empreses dels països emergents, sobretot asiàtics (amb regulacions tècniques diferents dels països occidentals tradicionals). Aquest és l'entorn industrial en el qual cal situar avui l'explotació de les espècies de *Taxus* destinades a l'obtenció de fàrmacs anticancerosos, que es complementa amb les dades de l'entorn sociosanitari que suposen l'òptica de l'usuari: una dosi requereix 300 mg de paclitaxel i un pacient requereix 4-6 dosis; el cost del paclitaxel és d'uns 4800 \$/gram i, per tant, la despesa mitjana de tractament/pacient és de 8.600 \$ (algunes estimacions eleven la xifra fins als 10.000 \$).

La producció de taxans, avui

Tot i que la situació pot canviar molt ràpidament per la mutabilitat general del sistema econòmic mundial, les dades disponibles (que no són ni fàcils d'obtenir ni sempre són coincidents)

Espècie	Paclitaxel	Baccatina III	10 DAB-III	Total taxans (µg/g)
<i>T. baccata</i>	41	14	762	817
<i>T. brevifolia</i>	130	296	41	467
<i>T. canadensis</i>	285	224	2665	3174
<i>T. celebica</i>	26	0	70	96
<i>T. cuspidata</i>	105	15	120	240
<i>T. floridana</i>	516	0	1689	2205
<i>T. globosa</i>	433	168	1395	1996
<i>T. x hunnewalania</i>	41	0	63	104
<i>T. media</i> cv.	211	36	230	266
<i>T. wallichiana</i>	272	0	1092	1364

Taula 4: Contingut en paclitaxel i taxans relacionats en diverses espècies de *Taxus*. Font: VAN ROZENDAAL *et al.*, 2000

ens permeten afirmar que, en l'actualitat, la producció de taxans depèn principalment del material vegetal provinent de teixos, silvestres o cultivats. Les fonts actuals majoritàries són, principalment, l'extracció de 10-DAB i de baccatina (BC) de teixos i la posterior hemisíntesi i, en menor quantitat, l'extracció directa de paclitaxel (sempre, doncs, obtenció primària a partir de taxans naturals). Com a font més minoritària, resta la producció per cultius cel·lulars, mentre que les restants alternatives no han passat de l'estadi experimental.

La dependència de fonts naturals fa necessari conèixer les dades bàsiques de producció, que són subministrades per CAMERON *et al.* (2007). Així, avui són necessàries 10-15 tones de fulla de teix per a extraure 1 kg de paclitaxel (amb una puresa del 99,5%). La demanda mundial de taxans en general l'any 2002 va ser de 300-400 kg (sumant el consum per a l'obtenció del Taxol® i del Taxotere®, és a dir, d'EEUU i d'Europa), al 2006 va ser de 750 kg i, al 2007, de 960 kg. La projecció de CAMERON *et al.* (l.c) per a l'any 2012 és d'una demanda de 1.600 kg (tenint en compte que, només el mercat xinès, consumeix 600 kg/any, quantitat que és la producció total mundial del 2002 multiplicada per 2!). La planificació d'un sistema de conreus com el dissenyat per a *T. canadensis*, al Canadà i als EEUU, amb estructura i tecnologia occidentals, ofereix 90-400 kg de fulla per hectàrea i permet calcular que hauran calgut 11.300 tones de fulles per l'aprovisionament mundial de l'any 2006. Aquestes xifres enormes de producció provenen principalment (segons dades subministrades per les empreses) d'espècimens de *Taxus* cultivats a gran escala a diversos països (Itàlia, França o Polònia, a Europa; Canadà i Estats Units, a Amèrica; Índia, Xina i Nepal, a Àsia) i corresponents a diverses espècies (*T. baccata*, *T. brevifolia*, *T. yunnanensis*, *T. canadensis*, *T. x media*). No obstant això, l'espècie emprada en cada cas és relativament irrellevant, ateses, d'una banda les incerteses taxonòmiques

romanents en certs teixos (cf. COLLINS *et al.*, 2003) i la fiabilitat d'algunes fonts d'informació, i de l'altra, que – tot i que és molt variable – s'ha comprovat la presència de paclitaxel i dels altres taxans en totes les espècies de teix investigades (taula 4). En definitiva, és fàcil trobar a través d'Internet, empreses especialitzades que ofereixen un paquet de producció de teixos cultivats ràpid i eficient (a partir de llavors o de propagació clonal, que inclou generalment la formació de personal i la generació de material per a la plantació en 4-5 mesos).

CONSERVACIÓ DEL TEIX: PROBLEMES I SOLUCIONS

Malgrat que sembla que existeixen uns estàndards tècnics que garanteixen el subministrament sostenible de tot el teix que calgui a partir de cultius a gran escala de centenars de milers d'arbres, no podem pas dir que la realitat es trobi exempta de problemes de conservació per a aquestes espècies. Ja hem esmentat que el Conveni CITES havia hagut d'incloure *T. wallichiana* al llistat de l'Apèndix II l'any 1995. Malgrat això, el WWF seguia alertant sobre problemes de sobreexplotació d'aquesta espècie a la fitxa realitzada l'any 2003. La pressió sobre les poblacions silvestres d'espècies asiàtiques obligava a una nova inclusió de teixos a l'Apèndix II de CITES l'any 2005: *Taxus chinensis*, *T. fuana*, *T. cuspidata* i *T. sumatrana*, desmentint, doncs, que tota la producció prové només de teixos cultivats. Ben al contrari, això sí, lluny del coneixement de molts dels pacients occidentals usuaris de taxans, els sistemes d'obtenció ràpida de material vegetal de teix a països com la Xina o d'altres del SE Asiàtic, segueixen recorrent a exemplars silvestres, en quantitats sempre difícils de conèixer per la pròpia opacitat del comerç amb aquest material.

Pel que fa a les solucions per resoldre els problemes de conservació detectats, hom pot apuntar a dues línies d'actuació: la recerca i la producció sostenible.

En relació a la recerca, a part de la millora de la producció obtinguda directament de teixos (cultivats o silvestres, cf. SMITH & CAMERON, 2002 i treballs posteriors), cal recordar que existeixen altres fonts alternatives a les quals cal parar també atenció. Primerament, els cultius cel·lulars, que proveeixen d'una part dels taxans consumits avui i que, amb menors expectatives (dificultats per a produir en biorreactors molt grans, de c.100 tones), malgrat tot segueixen essent el sistema seguit per *Phyton-DBF* en relació amb BMS per a produir paclitaxel encara avui, i el 2004 Corea comença a produir més paclitaxel des de biorreactors, tot i que representa una petita part del mercat. Amb tot, la investigació en aquest camp és intensa i continuada (cf. per exemple, BESTOSO *et al.*, 2006; BONFILL *et al.*, 2007). Igualment, els procediments basats en la bioenginyeria (combinant l'ús de microorganismes i de l'enginyeria genètica), que encara no han passat a rendiments industrials, segueixen essent una intensa diana de R+D (FRESE, 2007), i són vistos com a sistemes de futur que obren possibilitats a països en vies de desenvolupament i a noves companyies *bio-tech* independents. Aquests nuclis més dinàmics d'investigadors incorporen habitualment a les seves argumentacions al·legacions a favor de la defensa dels teixos i esdevenen aliats en la lluita per la seva conservació. Finalment, cal no oblidar que, simultàniament, està tenint lloc una autèntica revolució en la recerca biomèdica orientada al desenvolupament de la teràpia gènica, que podria obtenir ben aviat resultats en el tractament del càncer i que modificaria radicalment el mercat dels fàrmacs basats en els tractaments químics.

Pel que fa a la sostenibilitat dels programes d'explotació dels teixos, el sistema de cultius es troba ben consolidat, amb experiència des de fa uns quinze anys i amb estàndards que es van actualitzant. Segons CAMERON *et al.* (2007), un projecte d'explotació actual al Canadà s'iniciaria amb la selecció de les plantacions d'elit i, després de la producció i multiplicació dels plançons, es passaria a desenvolupar la plantació pròpiament dita i a ordenar els cicles d'explotació: cal un mínim de 4 anys per la primera campanya de recol·lecció de fulla i 5-8 anys per entrar en un programa d'extracció continuada (poda cada 4 anys). Simplement (o no) cal fer les previsions d'extensions a cultivar per satisfer la demanda a uns quants anys vista i promoure l'extensió dels coneixements tècnics a les comunitats locals (com ara els assaigs de propagació a 3.000 m d'altitud al Nepal (MADEN, 2003) o la distribució de plançons als agricultors locals promoguda per *Dabur India Ltd* (PHILLIPS *et al.*, 1998). Les companyies productores haurien

de ser encoratjades a seguir aquests exemple i la recerca, degudament finançada.

Tanmateix, mentre la demanda de taxans segueixi creixent als ritmes actuals, pensar que hom podrà substituir totalment la recol·lecció silvestre per l'extracció provinent de cultius, no és gaire realista. Aquesta substitució total pot requerir un bon grapat d'anys i, mentrestant, cal desenvolupar sistemes d'extracció de material silvestre sostenibles (puix que tindran lloc igualment), combinats, si cal, amb les replantacions o regeneracions que siguin necessàries, per donar resposta a l'aprovisionament de l'avui més immediat. És més, des del punt de vista de la conservació, els especialistes del MPSG (*Medicinal Plant Specialist Group*) de la UICN recomanen mantenir sistemes de recol·lecció silvestre, sempre sota criteris de sostenibilitat, per tal com: a) es permet l'obtenció d'ingressos a comunitats indígenes; b) es poden destinar les terres disponibles a la producció d'aliments; c) es contribueix al manteniment de la diversitat genètica i d) es manté la valoració dels ecosistemes forestals com a productius, i, doncs, l'incentiu per a la seva conservació. Per a assegurar la sostenibilitat del sistema, han estat publicades darrerament unes normes de bones pràctiques (*International Standard for Sustainable Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants*, ISSC-MAP, 2007) i, en qualsevol cas, l'atenció a la cooperació per al desenvolupament i el reforçament de la normativa de comerç internacional (CITES), són complements necessaris per a orientar sistemes sostenibles d'explotació dels recursos naturals.

El teix és una més de les c. 15.000 espècies (és a dir, el 21% de totes les plantes medicinals i aromàtiques, PMA) en situació de risc per sobreexplotació, segons el raport del MPSG (2007). Més de 400.000 tones de PMA entren al comerç mundial cada any i, c. 80% d'aquestes espècies són recol·lectades de material silvestre. La problemàtica de l'aprovisionament de taxans per a la indústria farmacèutica és, doncs, una bona mostra de l'estreta relació existent entre biodiversitat i salut, de vegades no prou aparent, i de com espècies i ecosistemes sans són a la base del manteniment de la salut dels humans.

BIBLIOGRAFIA

BESTOSO, F.; OTTAGGIO, L.; ARMIROTTI, A.; BALBI, A.; DAMONTE, G.; DEGAN, P.; MAZZEI, M.; CAVALLI, F.; LEDDA, B. & MIELE, M. 2006. In vitro cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes. *BMC Biotechnol.* 6: 45

- BONFILL, M.; EXPÓSITO, O.; ONRUBIA, M.; JANÉ, A.; CUSIDÓ, R.M. & PALAZÓN, J. 2007. Effect of external factors on the production of taxol and other taxanes in cell cultures of *Taxus baccata*. *J. Biotechnol.* 131 (2): S45 - ECB13, 13th European Congress on Biotechnology.
- BUTLER, M. 2005. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Reports* 22 (2): 133-312
- CAMERON, S.I. & SMITH, R.F. 2002. Bringing 'Blue Sky Biology' Down to Earth: Linking Natural Products Research with Commercialization. pp 31-39 In Proc. 29th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, July 28-Aug 1, Halifax N.S.
- COLLINS, D.; MILL, R.R. & MÖLLER, M. 2003. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis*, and *T. cuspidata* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. *Am. J. Bot.* 90:175-182
- DEJONG, J.M.; LIU, Y.; BOLLON, A.P.; LONG, R.M.; SENNEWWEIN, S.; WILLIAMS, D. & CROTEAU, R.D. 2006. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. & bioengin.* 93: 212-224
- DENIS, J.N.; GREENE, A.; GUENARD, D.; GUERITTE-VOEGELEIN, F., MANGATAL, L. & POTIER, P. 1988. A highly efficient, practical approach to natural taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 5917
- FRENSE, E, D. 2007. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (6): 1233-1240
- HANSEN, R. (ed) (1992). *Taxus and Taxol - A Compilation of Research Findings. The Ohio State University Bulletin, Special Circular 150-99*. A: <http://ohioline.osu.edu/sc150/index.html> [Accés 20/10/2008]
- HOLTON, R. A.; SOMOZA, C.; KIM, H. B.; LIANG, F.; BIEDIGER, R. J.; BOATMAN, P. D.; SHINDO, M.; SMITH, C. C.; KIM, S.; NADIZADEH, H.; SUZUKI, Y.; TAO, C.; VU, P.; TANG, S.; ZHANG, P.; MURTHI, K. K.; GENTILE, L. N. & LIU, J. H. 1994. First Total Synthesis of Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 1597-1599
- IUCN (2008). 2008 IUCN Red List of Threatened Species. A www.iucnredlist.org [Accés 11/11/2008]
- KINGSTON, D. G. I.; JAGTAP, P. G.; YUAN, H. & SAMALA, L. 2002. The chemistry of Taxol and related taxoids. *Progress Chem. Org. Nat. Prod.* 84: 53-225
- MADEN, K. (2003). Community Trial on the Propagation and Conservation of *Taxus baccata* L. *Our Nature* 1: 30-32
- MPSG (Medicinal Plant Specialist Group, UICN) (2007). International Standard for Sustainable Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants v. 1.0. BfN -Skripten, 195. Federal agency for Nature Conservation, Bonn.
- PHILLIPS, D.; DWYER, D.B. & Dabur Research Foundation 1998. Sustainable harvesting of Himalayan yews. In "Medicinal plant trade in Europe: conservation and supply", eds Traffic Europe, pp. 147-154. Proceeding of the First International Symposium on the Conservation of Medicinal Plants in Trade in Europe. Traffic Europe, Cambridge.
- PIESCH, R.F., WHEELER, N.C. & WYANT-WHEELER, V. 1994. Large scale cultivation of *Taxus* species for Taxol® production. 4èmes Rencontres Internationales- Nyons, 5,6,7 Decembre 1994: 20-25
- ROBERTS, S.C. 2007. Biosynthesis of paclitaxel and related taxanes. *Nature Chem. Biol.* 3, 387-395
- SHIPPMANN, U. 2001. CITES medicinal plants significant trade study. Project S 109, German Federal Agency for Nature Conservation, Bonn.
- SHIPPMANN, U., LEAMAN, D. & CUNNINGHAM, A.B. 2002. Impact of Cultivation and Gathering of Medicinal Plants on Biodiversity: Global Trends and Issues. In: FAO. Biodiversity and Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries. Satellite event on the occasion of the Ninth Regular Session of the Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Roma, 12-13.X.2002: 142-167. Inter-Departmental Working Group on Biological Diversity for Food and Agriculture, FAO, Roma.
- SMITH, R.F. & CAMERON, S.I. 2002. Domesticating Ground Hemlock (*Taxus canadensis*) for Producing Taxanes: A case Study. pp 40-45 In Proc. 29th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, July 28-Aug 1, 2002, Halifax N.S.
- STEPHENSON, F. 2002. A Tale of Taxol. Office of Research, Florida State University. A: <http://www.rinr.fsu.edu/fall2002/taxol.html> [Accés 20/10/2008]
- STIERLE, A.; STROBEL, G. & STIERLE, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260 (5105): 214-216
- VAN ROZENDAAL E. L.; LELYVELD, M. G. P & VAN BEEK, T.A. 2000. Screening of the needles of different yew species and cultivars for paclitaxel and related taxoids. *Phytochemistry* (Oxford) 53: 383-389
- WALKER, K. & CROTEAU, R. 2000. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 583-587
- WANI, M.C.; TAYLOR H.L.; WAL M.E.; COGNON, P. & MCPHAIL, A.T. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93(9):2325-2327