

**Estrategias para la optimización de la producción de proteínas recombinantes
terapéuticas en *Pichia pastoris* modificadas genéticamente**

Revisión de literatura

Sonia Natalia Triviño Clavijo

Directora

Angela Johana Espejo Mojica PhD

Codirector

Carlos Javier Alméciga Díaz PhD

Instituto de Errores Innatos del Metabolismo

Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología

Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá, D.C

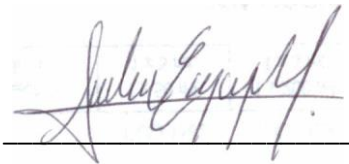
2020

**Estrategias para la optimización de la producción de proteínas recombinantes
terapéuticas en *Pichia pastoris* modificadas genéticamente**

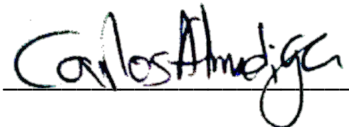
Revisión de literatura

Sonia Natalia Triviño Clavijo

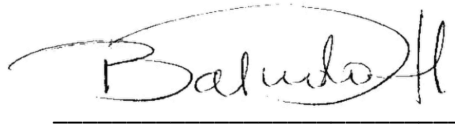
APROBADO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angela Espejo', written over a horizontal line.

Angela Johana Espejo Mojica PhD
DIRECTORA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Alméciga', written over a horizontal line.

Carlos Javier Alméciga Díaz PhD
CODIRECTOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Balkys', written over a horizontal line.

Balkys Esmeralda Quevedo Hidalgo PhD
PAR EVALUADOR

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien sea en ellas el anhelo de buscar la verdad y justicia”

Artículo 23 De La Resolución No. 13 de Julio de 1946

Agradecimientos:

Agradezco a Dios por guiarme y acompañarme en cada momento de mi vida , a mis papás, mi hermana, mi novio y amigos por estar a mi lado, apoyarme en cada proyecto y alentarme a ser mejor, le agradezco a mi directora Angela Johana Espejo y a mi codirector Javier Alméciga por sus consejos y acompañamiento en todo este proceso tanto en el laboratorio como en el trabajo escrito, también a todos los integrantes del IEIM ya que todos tuvieron aportes valiosos durante mi proceso en el laboratorio y en el trabajo escrito.

Lista de Tablas

Tabla 1. Terapias de reemplazo enzimático aprobadas para su uso.....	14
Tabla 2. Sistemas de expresión usados en la producción de proteínas recombinantes.	15
Tabla 3. Comparación de la producción de proteínas recombinantes usando cosustratos.....	34
Tabla 4. Temperaturas empleadas durante la producción de proteínas recombinantes en cepas de <i>P. pastoris</i> con modificaciones en la ruta de N-glicosilación.....	35
Tabla 5. Diferentes valores de pH usados en la base de datos.....	36
Tabla 6. Estrategia teórica planteada para optimización del cultivo.....	43

Lista de Figuras

Figura 1. Metabolismo del glicerol en <i>Pichia pastoris</i>	18
Figura 2. Proceso de identificación y selección de la muestra.	29
Figura 3. Distribución de los artículos incluidos en el estudio por años (A) y país (B).	30
Figura 4. Proteínas recombinantes producidas en la base de datos.....	30

Tabla de Contenido

1	Resumen	8
2	Introducción	9
3	Planteamiento del problema y justificación	11
4	Marco teórico.....	13
4.1.	Errores Innatos del Metabolismo	13
4.2.	Terapias	13
4.3.	TRE	14
4.4.	Proteínas recombinantes	15
4.5.	<i>Pichia pastoris</i>	16
4.5.1.	Metabolismo de <i>Pichia pastoris</i>	17
4.5.2.	Glicoingeniería en <i>Pichia pastoris</i>	19
4.6.	Producción de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> y su optimización	20
4.6.1.	Co-sustratos	21
4.6.1.1.	Sorbitol	22
4.6.1.2.	Gluconato.....	22
4.6.1.3.	Manitol.....	23
4.6.1.4.	Glucosa	23
4.6.1.5.	Glicerol.....	24
4.6.2.	Temperatura.....	24
4.6.3.	Fuente de nitrógeno.....	24
5	Objetivos	25
5.1.	Objetivo general	25
5.2.	Objetivos específicos.....	26
6	Metodología.....	26
6.1.	Tipo de estudio	26
6.2.	Diseño de la investigación	26
6.2.1.	Población de estudio y Muestra	26
6.2.2.	Criterios de inclusión:	27
6.2.3.	Criterios de excusión:	27
6.3.	Recolección y selección de la información.....	27

6.4.	Análisis de la información	28
7	Resultados.....	28
7.1.	Factores de optimización en cepas delecionadas.....	30
7.1.1.	Alimentación con metanol y el uso de cosustratos.....	31
7.1.1.1.	Cosustratos	32
7.1.2.	Temperatura.....	34
7.1.3.	pH.....	35
7.1.4.	Tasa de consumo de oxígeno.....	37
7.1.5.	Inhibidores de proteasas	38
7.1.6.	Concentración de fuentes de nitrógeno	38
7.1.7.	Otros factores.....	38
8	Discusión.....	39
8.1.	Planteamiento de una estrategia teórica para la optimización de producción de proteínas recombinantes empleado la cepa <i>Pichia pastoris NRRLY11430/ΔOCH1</i>	42
9	Conclusiones	43
10	Recomendaciones	44
11.	Referencias.....	45
12.	Anexos.....	54
12.1.	Matriz de análisis del segundo filtro de análisis (17 artículos).	54

1 Resumen

Los errores Innatos del metabolismo (EIM) son trastornos genéticos causados por mutaciones en un gen que codifica para enzimas o transportadores involucrados en diferentes rutas del metabolismo. Algunos de estos trastornos pueden ser tratados a través del control de la dieta, mientras otros pueden ser tratados con otro tipo de aproximaciones como la terapia génica y terapia de reemplazo enzimático. La terapia de reemplazo enzimático consiste en la administración periódica, generalmente vía intravenosa, de una enzima exógena biológicamente activa, la cual reemplaza la que está defectuosa en el organismo del paciente, permitiendo la degradación de los sustratos acumulados. La producción de esta enzima exógena se realiza mediante el uso de un sistema de expresión como las células de mamífero, células de insecto, bacterias, hongos filamentosos o levaduras. En el instituto de errores innatos del metabolismo (IEIM) la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* G115 ha sido utilizada como plataforma de expresión de diferentes enzimas lisosomales biológicamente activas, como las hexosaminidasas A y B, N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) y la iduronato 2-sulfatasa (IDS), las cuales son foco actual de estudio, dado su uso potencial en el desarrollo de TRE para el tratamiento de las correspondientes enfermedades de depósito lisosomal (EDL), en las cuales están deficientes.

Una de las desventajas que presenta *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, es su capacidad de adicionar hasta 200 residuos de manosa a las proteínas, generando hipermanosilaciones, que pueden traer consigo consecuencias en el organismo una vez son aplicadas de forma intravenosa a los pacientes afectados. Teniendo en cuenta esto, en trabajos previos en el IEIM se desarrolló una cepa de *P. pastoris* con una deleción en el gen *OCH1*, el cual está involucrado en la adición de la primera manosa en el proceso de maduración postraducciona. Esta modificación evita que ocurran los eventos de hipermanosilación haciendo que la proteína producida tenga un patrón de N-glicosilación más parecido al de las proteínas humanas. Sin embargo, la cepa delecionada *Pichia pastoris* NRRLY-11430/ Δ *OCH1* ha mostrado que su nivel de producción de proteínas recombinantes ha sido menor que el obtenido en *Pichia pastoris* sin deleción. Una de las alteraciones reportadas por diversos autores y observadas en el IEIM, son los cambios en su morfología y crecimiento, lo cual puede afectar el proceso de cultivo y por ende la expresión de la proteína de interés. A pesar de que se han realizado algunas aproximaciones para mejorar el proceso de producción en estas cepas, es

necesario conocer cuáles factores han sido reportados como los más relevantes para ser utilizados en procesos productivos para este tipo de cepas.

En la siguiente revisión de literatura se hizo una búsqueda a través de diferentes bases de datos para conocer cuáles son los factores de cultivo que pueden ayudar a mejorar la producción de proteínas recombinantes, bajo la regulación del promotor *AOX1*, en cepas de *Pichia pastoris* modificadas genéticamente en sus rutas de N-glicosilación. De esta búsqueda en diferentes bases de datos se observó que factores como la temperatura, el pH, la tasa de alimentación y la concentración del metanol, el uso de cosustratos, la tasa de consumo de oxígeno, y la fuente de nitrógeno, están relacionados con la productividad de las proteínas, y por tanto se deben tener muy presentes al momento de optimizar los procesos de producción en cepas delecionadas, ya que estas son sensibles a pH ácidos (por debajo de 5), a temperaturas mayores a 28 °C, a concentraciones de metanol altas (por encima de 10 g/L) y a bajas tasas de oxígeno, debido a las alteraciones presentes en su membrana celular.

Teniendo en cuenta la información evaluada en esta revisión bibliográfica, se plantea como estrategia a evaluar experimentalmente en el IEIM para mejorar la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* NRRLY-11430/ Δ *OCH1*, mantener una temperatura de cultivo en la fase de inducción de 26 °C, un pH de 5,8, una concentración de metanol de 1% (v/v) co-alimentado con sorbitol con una concentración de 46 g/L, y una suplementación con 10 g/L de sulfato de amonio en el medio, durante 96 horas de inducción

2 Introducción

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son enfermedades monogénicas, en su mayoría de herencia autosómica recesiva producidas por mutaciones en un gen que codifica para una proteína involucrada en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, aminoácidos o ácidos nucleicos, causando un defecto enzimático que conduce a alteraciones bioquímicas (1). Estas enfermedades son consideradas enfermedades raras debido a su baja frecuencia y en algunos casos el tratamiento para esta clase de enfermedades puede presentar un costo elevado para el paciente y el sistema de salud (2) (3).

Para el tratamiento de los EIM se han estudiado varias estrategias terapéuticas como manejo dietario, suplementación con cofactores, terapia génica, chaperonas farmacológicas, inhibición de sustrato y terapia de reemplazo enzimático (TRE) (4) entre

otras. La TRE consiste en la administración, generalmente por vía intravenosa, de una enzima recombinante completamente activa a pacientes que tienen la enzima nativa defectuosa o deficiente. La TRE es actualmente usada para el tratamiento de algunas enfermedades de depósito lisosomal. Las enzimas usadas para este efecto son producidas mediante tecnología de ADN recombinante y contienen N-glicanos con residuos principalmente de manosa o manosa-6-fosfato (M6P), los cuales son reconocidos por los respectivos receptores en la superficie celular para ser incorporadas en la célula y posteriormente dirigidas al lisosoma (4).

Las enzimas recombinantes utilizadas para TRE son producidas principalmente en células de mamífero debido a que la estructura del glicano es similar al de la enzima sintetizada en células humanas (5). Sin embargo, este sistema de expresión tiene un tasa de crecimiento lenta, además de un rendimiento bajo (6), y un alto riesgo de contaminación con patógenos razones por las cuales en los últimos años se ha trabajado en el uso de microorganismos (bacterias y levaduras) como sistemas de expresión. Entre ellos, las levaduras han sido usadas como modelo celular para la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico, siendo la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, una de las más empleadas para la producción de proteínas heterólogas, debido a que presenta algunas ventajas como su fácil manipulación genética, medios económicos de cultivo y una alta producción de células sobre otros sistemas de expresión. Generalmente, dicha producción se ha realizado bajo el promotor alcohol oxidasa I (AOX1), el cual es un promotor fuerte regulado por la presencia de metanol (4).

En el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) se ha trabajado en la producción de diferentes proteínas recombinantes como potenciales herramientas para el desarrollo de una TRE para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal (7)(8)(9)(10). Esta producción de enzimas lisosomales recombinantes se ha evaluado en bacterias como *Escherichia coli* y en levaduras como *P. pastoris* GS115, demostrando que este último sistema ha sido eficiente en la obtención de proteínas heterólogas lisosomales biológicamente activas, dentro de las cuales se pueden encontrar la N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS, EC 3.1.6.4) con actividad específica de 0,29 U.mg⁻¹ (7), la iduronato 2-sulfatasa (IDS, EC. 3.1.6.13) con una actividad de 12,45 nmol mg⁻¹ (8) y las hexosaminidasas lisosomales A y B (Hex-A y Hex-B, EC 3.2.1.52) (10) para las cuales se obtuvieron actividades de 13.124 U.mg⁻¹ para rhHexA; 12.779 U.mg⁻¹ para rhHex-B (6).

Sin embargo, una de las desventajas de usar levaduras como sistema de expresión es que pueden causar hipermanosilación en las proteínas producidas, debido a que su proceso de glicosilación hace que la enzima α -1,6-manosiltransferasa adicione residuos de manosa α -1,6 a las proteínas, haciendo que su patrón de N-glicosilación sea diferente al de la proteína producida en células humanas (3). Para mejorar esto, en el IEIM, se desarrolló la cepa *P. pastoris* NRRLY-11430 Δ OCH1, la cual tiene una delección en el gen *OCH1*, y que permite obtener proteínas recombinantes con un patrón de N-glicosilación más parecido al generado por células humanas (11). Esto fue observado en el trabajo realizado por Rodríguez en 2018, en el cual se obtuvo GALNS recombinante de forma activa y con un patrón de glicosilación más homogéneo y similar al de la enzima humana (12). Sin embargo, una de las consecuencias de la mutación en esta cepa fue que el crecimiento en placa estaba caracterizado por la formación de agregados celulares en forma de racimo, lo cual se atribuyó a cambios metabólicos y fenotípicos de las células. Este comportamiento mostró sus efectos en el proceso de producción dado que en los cultivos se observó la formación de agregados celulares que podrían haber afectado la expresión eficiente de la proteína dado que los niveles de actividad obtenidos fueron más bajos que los obtenidos en *P. pastoris* GS115 (12).

De esta forma, en esta revisión de literatura se busca realizar una actualización de información e identificar los factores que pueden influir en el proceso de producción de proteínas recombinantes a partir de levaduras modificadas genéticamente en su ruta de N-glicosilación, de tal forma que se puedan seleccionar aquellos que hayan sido propuestos como los más favorables y de esta forma proponer una estrategia teórica de optimización de la producción que posteriormente pueda ser probado e implementado en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM), para mejorar la productividad en la obtención de proteínas lisosomales recombinantes.

3 Planteamiento del problema y justificación

Los errores innatos del metabolismo son enfermedades causadas por defectos en genes que codifican enzimas que facilitan la conversión de sustratos en metabolitos, estas enfermedades surgen debido a la acumulación de sustratos tóxicos o a la deficiencia de metabolitos esenciales (2). Usualmente las terapias para el manejo de algunos EIM pueden realizarse a través del manejo paliativo y nutricional de los pacientes. Sin embargo, EIM

como las enfermedades de depósito lisosomal (EDL) requieren de manejos más especializados como la terapia génica, la terapia de reemplazo enzimático (TRE), la terapia de reducción de sustrato, el trasplante de células madre hematopoyéticas y la terapia con chaperonas farmacológicas (13). Cabe resaltar, que muchas EDL no cuentan actualmente con una terapia efectiva para su tratamiento.

La TRE, es una de las alternativas terapéuticas evaluada para el tratamiento de las EDL y en algunas de ellas se ha tenido un impacto positivo en el mejoramiento de muchas de las complicaciones clínicas que presentan los pacientes (14). Actualmente, se cuenta con TRE aprobadas para once EDL como Gaucher, Pompe, lipofuscinosis neuronal ceroida (LNCs), deficiencia de lipasa ácida, alfa-manosidosis y algunas MPS (I, II, IVA, VI y VII) (13). Las proteínas usadas para TRE han sido producidas tradicionalmente en células de mamífero, aunque en los últimos años nuevos sistemas de expresión se han evaluado, entre los que se destacan las levaduras como *Pichia pastoris*, la cual presenta ventajas como tiempos cortos de producción, bajo riesgo de contaminación con patógenos, además de producir modificaciones post-traduccionales como las N-glicosilaciones (3). Sin embargo, el número de mannosilaciones adicionado a las proteínas puede ser superior al de las células de mamífero. Por esta razón, *P. pastoris* ha sido blanco de modificaciones genéticas con las cuales se ha optimizado el patrón de glicosilación haciendo que las proteínas recombinantes sean más parecidas a las humanas.

En el IEIM se ha trabajado con la cepa *Pichia pastoris* delecionada en el gen *OCH1* (*P. pastoris* NRRLY-11430 Δ *OCH1*) para la producción de enzimas recombinantes activas y con un perfil de glicosilación similar al humano (3). Sin embargo, los niveles de actividad obtenidos en GALNS y en las hexosaminidasas recombinantes, no ha sido el esperado comparado con los resultados obtenidos en *P. pastoris* GS115. Por tanto, se han venido buscando estrategias que permitan aumentar la productividad de estas enzimas recombinantes al ser obtenidas en la cepa *P. pastoris* NRRLY-11430/ Δ *OCH1* (12). Para dar solución a esta problemática, se observó una primera aproximación con el trabajo realizado por Garzón en 2017, en el cual se estudió el uso del sorbitol como co-sustrato y regulador osmótico, el uso de chaperonas químicas y la temperatura de inducción como factores de cultivo a optimizar en la producción de GALNS, logrando aumentar el doble de la actividad de la enzima recombinante (0,06 U/mL) (15). Sin embargo, el mejoramiento no fue el esperado.

De esta forma, en esta monografía se busca identificar, mediante una revisión de literatura de los últimos 10 años, los factores más influyentes en el mejoramiento de la producción de proteínas recombinantes en cepas de *Pichia pastoris* modificadas en las rutas de N-glicosilación, para de esta forma poder establecer estrategias teóricas que combinen dichos factores para que puedan ser posteriormente evaluadas e implementadas en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, con el objetivo de mejorar la producción de proteínas recombinantes en la cepa (*P. pastoris* NRRLY-11430/ Δ OCH1).

4 Marco teórico

4.1. Errores Innatos del Metabolismo

Los EIM son trastornos genéticos debidos a mutaciones en genes que codifican enzimas o transportadores involucrados en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, aminoácidos y ácidos nucleicos (1). Estas enfermedades a menudo surgen debido a la acumulación de sustratos tóxicos o a una deficiencia de metabolitos esenciales (2). Aproximadamente se conocen más de 500 enfermedades de este tipo (16). Los EIM pueden ser clasificados en función de su aparición, signos y síntomas predominantes, órganos o sistemas principales afectados y cronicidad de su aparición. Están divididos en dos grandes categorías clínicas: la categoría 1, son los trastornos que involucran solo un sistema funcional (como el sistema endocrino, el sistema inmunitario o los factores de coagulación) o afectan solo un órgano o sistema anatómico (como el intestino, los túbulos renales, los eritrocitos o el tejido conectivo). La categoría 2, incluye enfermedades en las que la lesión bioquímica básica afecta una vía metabólica común a una gran cantidad de células u órganos (por ejemplo: enfermedades de almacenamiento debido a trastornos catabólicos lisosomales y a la deficiencia energética en trastornos mitocondriales) o está restringida a un órgano, pero da lugar a consecuencias humorales y sistémicas (por ejemplo: hiperamonemia en defectos del ciclo de la urea, hipoglucemia en glucogenosis hepática entre otros) (17)(18).

4.2. Terapias

Los EIM son enfermedades raras debido a que su incidencia es de menos de 1 en cada 5000 nacimientos (16). Sin embargo, su interés clínico y biológico es alto, ya que estas enfermedades permiten entender el funcionamiento y el rol biológico de diversos componentes de las rutas metabólicas (19). El manejo de los EIM ha consistido

tradicionalmente en terapia nutricional y terapia de apoyo, pero se han ido evaluando y poniendo a disposición otras opciones de tratamiento, que incluyen, la eliminación de sustancias nocivas, el trasplante de células y órganos, la terapia génica y la terapia de reemplazo enzimático y coenzimas (2).

4.3. TRE

La terapia de reemplazo enzimático (TRE) se basa en la administración periódica vía intravenosa de una enzima exógena biológicamente activa, la cual es absorbida en las células y reemplaza la que está defectuosa permitiendo la degradación de los sustratos acumulados (20). La proteína puede provenir de tejidos y fluidos humanos, ser producida en bacterias, levaduras, células de mamífero, insectos o plantas, a las cuales se les ha introducido el gen correspondiente (20). A la fecha la TRE ha sido aprobada para once enfermedades de depósito lisosomal (EDL) entre las cuales se encuentran Gaucher, Pompe, lipofuscinosis neuronal ceroida (LNCs), deficiencia de lipasa ácida, alfa-manosidosis y MPS tipo I, II, IVA, VI y VII (Tabla 1) (13).(21).

Tabla 1. Terapias de reemplazo enzimático aprobadas para su uso. Fuente: Livertox (21).

Nombre genérico	Nombre comercial	Enzima	Año	Enfermedad
Inhibidor de alfa1-Proteinase	Prolastin-C Glassia	Alfa1-Antitrypsin	2009 2010	Deficiencia de A1AT
Alglucerasa alfa	Ceredase*	β -Glucocerebrosidasa	1991	Gaucher
Imiglucerasa	Cerezyme	β -Glucocerebrosidasa	1995	Gaucher
Taliglucerasa alfa	Elelyso	β -Glucocerebrosidasa	2012	Gaucher
Velaglucerasa alfa	VPRIV	β -Glucocerebrosidasa	2010	Gaucher
Pegademasa	Adagen	Adenosina desaminasa	2000	Deficiencia de ADA
Agalsidasa beta	Fabrazyme	Alfa-Galactosidasa A	2003	Fabry
Alglucosidasa alfa	Lumizyme	Alfa-Glucosidasa acida	2010	Pompe
Laronidasa	Aldurazyme	α -L-Iduronidasa	2003	Hurler, MPS I
Idursulfasa	Elaprase	Iduronato-2-Sulfatasa	2006	Hunter, MPS II
Elosulfasa alfa	Vimizim	N-Acetylgalactosamina-6 Sulfatasa	2014	Síndrome Morquio A, MPS IVA
Galsulfasa	Naglazyme	N-Acetylgalactosamina-4 Sulfatasa	2005	Maroteaux-Lamy, MPS VI

Nombre genérico	Nombre comercial	Enzima	Año	Enfermedad
Sebelipasa alfa	Kanuma	Lipasa acida Lisosomal	2015	Wolman, Deficiencia de LAL

4.4. Proteínas recombinantes

Debido a la invención de nuevas técnicas de ingeniería genética en los años 80, se crearon las proteínas recombinantes, las cuales son proteínas producidas a partir de una especie o línea celular distinta a la nativa; para poder producirlas, es necesario conocer el gen de interés y poder insertarlo en el sistema de expresión escogido (22). La selección de un sistema de expresión depende de las características y la aplicación de la proteína recombinante, así como de las posibles ventajas y desventajas con que cuenta cada uno de ellos. Los sistemas de expresión usados pueden ser desde procariotas como *Escherichia coli*, hasta eucariotas como *Pichia pastoris* (Tabla 2) (23).

Tabla 2. Sistemas de expresión usados en la producción de proteínas recombinantes. Ajustada de (3) (23) (24) (25) (26) (27).

Sistema de expresión	Ventajas	Desventajas
Bacterias (<i>E. coli</i>) Procariota	<ol style="list-style-type: none"> 1) Medios de cultivo económicos 2) Fácil manipulación genética 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Formación de cuerpos de inclusión, proteínas intracelulares 2) no tiene modificaciones post-traduccionales
Células de mamífero Eucariota	<ol style="list-style-type: none"> 1) Expresión de proteínas nativas con modificaciones post-traduccionales apropiadas para proteínas terapéuticas. 2) Tiene un nivel de expresión razonable 3) Libre de endotoxinas 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Medios de cultivo costosos 2) Biorreactores especiales 3) Riesgo de contaminación por virus 4) Tiempos de expresión prolongados
Hongos Filamentosos Eucariota	<ol style="list-style-type: none"> 1) Alto nivel de expresión. 2) Medios de cultivo económicos 3) Tiene algunas modificaciones post traduccionales 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Las esporas pueden traer problemas a la salud 2) Los hongos producen proteasas homólogas que podrían degradar el producto proteico heterólogo, las estrategias para prevenir la proteólisis han tenido un éxito limitado 3) Reología del medio
Células de insectos Eucariota	<ol style="list-style-type: none"> 1) Crecen en medios parecidos al de los mamíferos 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Tiene un bajo nivel de expresión

	2) Manipulación genética sencilla	2) Medios de cultivo costosos 3) Tiene una baja rentabilidad
4) Levaduras Eucariota Microorganismos usados: <i>Pichia pastoris</i> (26) <i>Sacharomyces cerevisiae</i> <i>Kluveromyces lactis</i>	1) Las condiciones de cultivo de las levaduras no requieren equipos costosos a diferencia 2) Fácil de manipular genéticamente 1) Hay un gran número de proteínas heterólogas que se han expresado en levaduras 2) Generan modificaciones post-traduccionales similares a las obtenidas en células de mamífero 3) 5) El tiempo de duplicación es corto en comparación con un sistema de expresión como el de células de mamífero 4) 6) El tiempo de duplicación es corto en comparación con un sistema de expresión como el de células de mamífero 5) 7) Tiene altos niveles de expresión	1) Modificaciones post-traduccionales como la hipermanosilaciones

4.5. *Pichia pastoris*

Pichia Pastoris es una levadura metilotrófica ampliamente usada para la expresión de proteínas recombinantes con fines terapéuticos e industriales (27), en la cual se han logrado expresar más de 600 proteínas, tanto intra como extracelulares (23). Generalmente, esta producción se realiza bajo la regulación del promotor *AOX1*, el cual es un promotor fuerte que se activa mediante la adición de metanol (21). Sin embargo, también se han usado promotores constitutivos como gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*), formaldehido deshidrogenasa 1 (*FLD1*), proteínas del matriz del peroxisoma (*PEX8*) y GTP-proteína de unión (*YPT7*) (28).

Las cepas *P. pastoris* se clasifican en tres fenotipos (Mut^+ , Mut^S y Mut^-) con respecto a su capacidad para utilizar metanol (28). La cepa de *P. pastoris* de tipo salvaje (WT) es fenotipo Mut^+ lo cual quiere decir que tiene los dos promotores alcohol oxidasa (*AOX1* y *AOX2*) para el consumo de metanol, mientras que el fenotipo Mut^S carece del gen *AOX1* por lo cual su crecimiento en metanol es más lento que la WT (27), por último está el fenotipo Mut^- el cual no puede emplear el metanol como fuente de carbono porque tiene los genes *AOX1* y *AOX2* inactivados (3).

Gracias al metabolismo aeróbico de *Pichia pastoris* es posible alcanzar altas densidades celulares si las condiciones de cultivo son las adecuadas (19)(3), además no necesita de un medio complejo para su crecimiento en comparación con otros sistemas como las células de mamífero lo cual permite bajar los costos en la producción (29), secreta pocas proteínas endógenas lo cual contribuye a facilitar los procesos de purificación de la proteína recombinante (3). Adicional a la eficiencia de la producción de proteínas recombinantes bajo promotores fuertes como el *AOX1*, *Pichia pastoris* tiene una alta eficiencia en la secreción de proteínas heterólogas (30).

Por otro lado, *P. pastoris* tiene la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales como la inclusión de N-glicosilaciones, la cual es una de las modificaciones postraduccionales más importantes debido a que está relacionada con una amplia variedad de funciones de la proteína como la secreción, plegamiento, estabilidad, antigenicidad, y actividad biológica (31). La N-glicosilación en *Pichia pastoris* se caracteriza por la tener enlaces terminales α -1,6 de los residuos de manosa, y por la adición de hasta 200 de estos residuos generando hipermanosilaciones, lo cual puede limitar de forma importante la aplicación en terapia, debido al riesgo de generación de una respuesta inmune adversa contra la proteína (3). Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para modificar (humanizar) las N-glicosilación realizadas por diferentes levaduras, incluyendo *P. pastoris* (32).

4.5.1. Metabolismo de *Pichia pastoris*

P. pastoris puede producir energía a partir de la fermentación de varias fuentes de carbono como: maltosa, lactato, glicerol, glucosa, fructosa, manitol, sorbitol, metanol, etanol, galactosa y manosa. La velocidad del transporte de la fuente de carbono del medio extracelular al citoplasma determina la cinética de crecimiento de la levadura, por eso las fuentes de carbono se consumen en cierto orden debido al control del nivel de transcripción de las enzimas involucradas en las vías metabólicas para degradar las diferentes fuentes de carbono (33)

Se ha reportado que el glicerol es uno de los mejores sustratos para *Pichia pastoris*, esto debido a que tiene un alto nivel de consumo por parte de la célula ya que cuenta con una velocidad específica de consumo de $0,054 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ del glicerol. Esto es debido a que una

vez el glicerol entra por difusión pasiva a la célula a través de la membrana, en la vía catabólica, el glicerol es fosforilado por una glicerol quinasa y oxidado por una glicerol fosfato ubiquinona reductasa mitocondrial para luego ser convertido a gliceraldehido 3 fosfato y entrar a la vía glucolítica (Figura 1) (34).

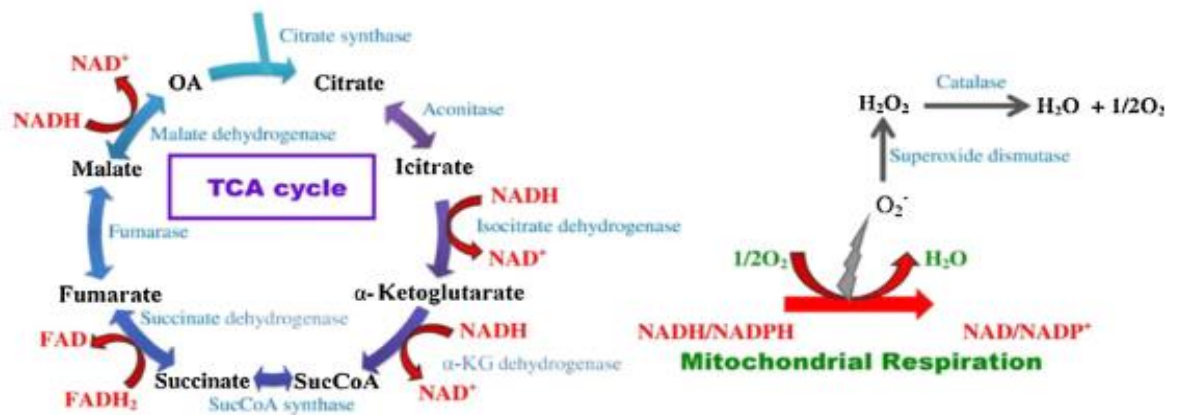
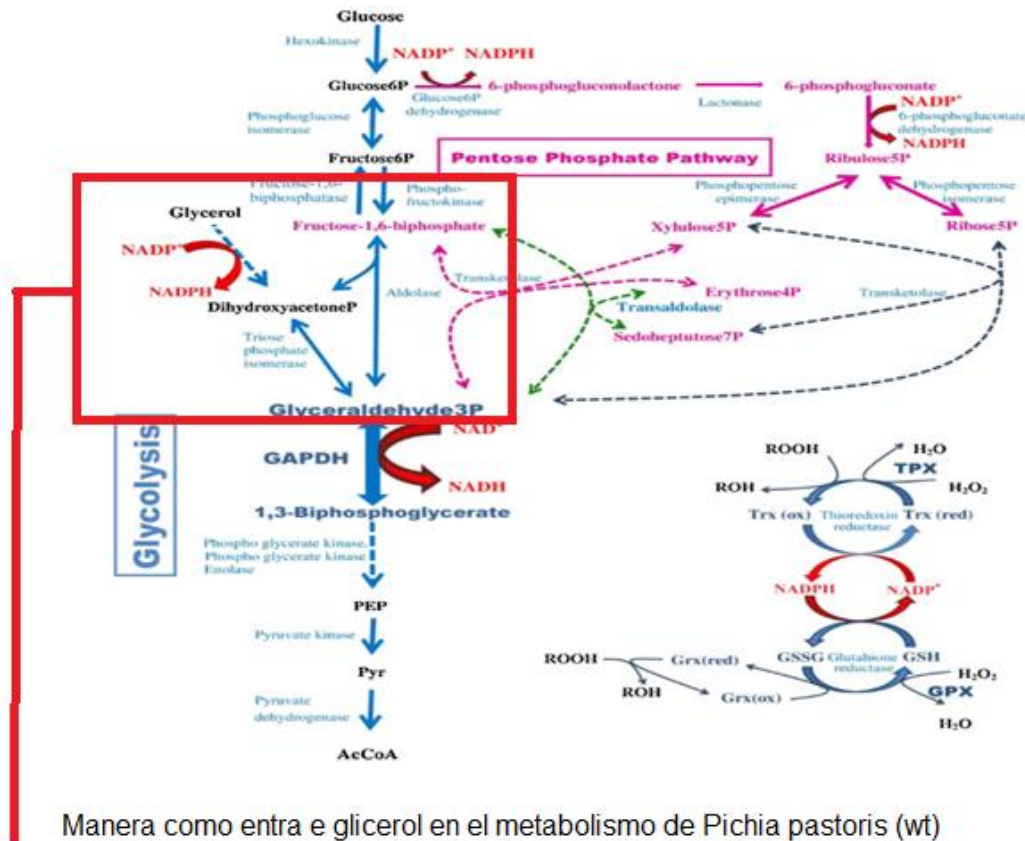


Figura 1 Metabolismo del glicerol en *Pichia pastoris*. En esta imagen se puede observar cómo entra el glicerol a la vía glucolítica en *Pichia pastoris*, dado que el glicerol entra por difusión pasiva a la célula se le atribuye más energía al crecimiento de las células, por lo tanto, se obtiene una mayor biomasa celular. **Fuente:** Calik et al, 2015 (33)

Por otro lado, los cofactores son muy importantes en el crecimiento de *P. pastoris* por eso esta levadura no puede crecer en un medio sin biotina. La biotina es un importante cofactor en el metabolismo de carbohidratos especialmente en la enzima piruvato carboxilasa, también la fuente de nitrógeno es de gran importancia en el metabolismo de *Pichia pastoris* porque una buena suplementación de nitrógeno mejora los niveles de producción de proteínas recombinantes, se ha reportado que las mejores fuentes de nitrógeno son las fuentes orgánicas porque tienen mayor contenido de aminoácidos esenciales (34).

4.5.2. Glicoingeniería en *Pichia pastoris*

Con el objetivo de modificar las rutas de N-glicosilación de las levaduras y lograr un patrón de glicanos más homogéneo y similar al observado en proteínas humanas, en los últimos años se ha trabajado en la modificación de aquellos genes implicados en esta ruta postraduccional. Uno de los genes más estudiados es el gen *OCH1*, el cual es el encargado de codificar para la enzima α -1,6-manosiltransferasa (Och1p) (32). Esta es una enzima del aparato de Golgi (35) que desempeña un papel clave en la adición de la primera manosa al oligosacárido central de las N-glicosilaciones en varias especies de levaduras, incluidas *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Hansenula polymorfa* (26).

Debido al papel del gen *OCH1* en la hipermanosilación en *Pichia pastoris*, este gen ha sido deletado en algunas cepas y se ha demostrado que las proteínas producidas presentan N-glicanos más pequeños y con estructuras similares a las de las proteínas producidas en humanos (36). Adicionalmente, se ha reportado que las cepas de *P. pastoris* mutadas en este gen son sensibles a temperatura, tienen un crecimiento lento, muestran una mayor floculación en medio de cultivo líquido, presentan cambios morfológicos en placas de cultivo posiblemente debido a los bajos niveles de manoproteínas en su pared celular, y además presentan una menor resistencia a pH ácido (26).

Otros genes que están involucrados en el sistema de glicosilación están los PMT, los cuales hacen parte de la familia genética de la proteína o manosiltransferasa (PMT), entre ellos se encuentran los genes PMT1 y PMT2, los cuales juegan un papel importante en la O-glicosilación, otro cambio post traduccional que a diferencia de la N-glicosilación la información sobre su funcionalidad aún es limitada. En estudios donde se ha deletado

alguno de estos genes se ha podido ver una reducción importante en la O-manosilación y en el largo de la cadena de estos glicanos (37). No se ha reportado que generen cambios morfológicos en cepas modificadas en la ruta de O-glicosilación.

4.6. Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* y su optimización

Las condiciones de cultivo de *Pichia pastoris* para la producción de proteínas recombinantes, a diferencia de otros sistemas de expresión, es económica, porque usualmente los medios de cultivo para su crecimiento están compuestos principalmente por una fuente de carbono (glucosa, glicerol), biotina, sales y agua. Adicionalmente, el promotor del gen *AOX1*, el cual es el que principalmente se usa para regular la expresión de las proteínas recombinantes, éste es reprimido en presencia de glicerol o glucosa pero es fuertemente inducido en presencia de metanol (3), (30), (38).

El metanol es usado como fuente de carbono y también como inductor de la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. El protocolo estándar para la producción de proteína recombinantes en *P. pastoris*, a través del promotor *AOX1*, en general se realiza en tres etapas. Primero, las células se cultivan en un medio definido que tiene glicerol para alcanzar densidades celulares altas, en esta etapa el promotor *AOX1* se mantiene reprimido debido al glicerol. En la segunda etapa el glicerol se alimenta a concentraciones limitantes permitiendo mantener la concentración de biomasa, lo cual permite la desrepresión gradual de las enzimas necesarias para la asimilación de metanol y reduce el tiempo necesario para que las células se adapten al crecimiento en metanol. Finalmente, en la tercera etapa se realiza inducción del promotor *AOX1* mediante la alimentación del cultivo con metanol para así producir la proteína recombinante (39) (40) (33).

A pesar de que la producción de proteínas recombinantes bajo el promotor *AOX1* es una de las más realizadas, ésta presenta algunos inconvenientes ya que el uso de metanol como inductor en altas concentraciones como el 3% v/v (41) causa toxicidad en la levadura debido a la acumulación de formaldehído y peróxido de hidrógeno dentro de las células (42), afectando la viabilidad celular y por consiguiente la producción de la proteína heteróloga. Adicionalmente, el metanol es un reactivo altamente inflamable y por ser un derivado del petróleo se prohíbe su empleo en la obtención de alimentos o suplementos nutricionales (3). Es por esto que en algunos estudios se ha buscado bajar la dependencia

al metanol, buscando nuevos promotores como: promotor gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*pGAP*) o el promotor de la 3-fosfatoglicerato quinasa (*PGK1*) los cuales son promotores constitutivos que se activan por la presencia de fuentes de carbono (40).

Para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* bajo el promotor *AOX1* se han utilizado varias estrategias para mejorar su producción como el uso de co-sustratos en la fase de inducción con metanol, el uso de diferentes temperaturas y la cantidad de oxígeno. En estudios recientes también se han venido investigando las fuentes de nitrógeno y su incidencia en la producción de proteínas recombinantes (3)(43).

Cuando se trabaja con cepas modificadas genéticamente, especialmente en los genes relacionados con la N-glicosilación como *OCH1*, a menudo muestran una disminución de la productividad en el tiempo, lo que podría estar relacionado con su maquinaria de glicosilación alterada y, por lo tanto, con un estrés metabólico. En este sentido, estas cepas presentan una aglomeración celular lo cual afecta el rendimiento de producción de la proteína (44).

4.6.1. Co-sustratos

El uso de metanol como única fuente de carbono puede ser perjudicial para la célula debido a que al ser usado en altas concentraciones causa toxicidad en la levadura debido a la acumulación de formaldehído y peróxido de hidrógeno dentro de las células (42). Además, el uso de metanol está limitado por la alta demanda de oxígeno y la necesidad de eliminación de calor en biorreactores a gran escala. El uso de solo metanol en el proceso de producción de proteínas recombinantes a gran escala tiene grandes peligros para la salud de los trabajadores como intoxicación por el manejo del metanol siendo otra razón por la cual el proceso de escalado en la industria es difícil (45).

Por estas razones se han evaluado el uso de cosustratos como glicerol, sorbitol, gluconato, glucosa, manitol entre otros, para ayudar a bajar la toxicidad producida por el metanol. Esta estrategia de alimentación mixta o uso de cosustratos ofrece diferentes beneficios como menor consumo de oxígeno y menor producción de calor, además facilita el crecimiento celular aumentando los rendimientos de biomasa con el segundo sustrato, lo cual conduce a una mayor densidad celular que resulta en aumento de la productividad volumétrica (46) (47).

4.6.1.1. **Sorbitol**

El sorbitol ha sido uno de los co-sustratos más estudiados para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en cepas de *Pichia pastoris* sin modificar y genéticamente modificadas. Se ha sugerido el uso de sorbitol ya que este puede ingresar por vía glucolítica como co-sustrato con el metanol y tiene una entalpía de combustión relativamente baja, por lo tanto, la alimentación mixta sorbitol/metanol podría reducir el consumo de oxígeno hasta dos veces, reduciendo los costos en la producción de estas proteínas a gran escala, ya que en un proceso alimentado solo con metanol se necesita remover el calor impidiendo que se puedan diseñar diferentes tipos de reactores más económicos (45) (48). Además, reportes como los de Jung *et al* 2007 (49) y los de Wang *et al* 2019 (45) han descrito que la inducción mixta de sorbitol/metanol reduce la formación de formaldehído tóxico mejorando la viabilidad celular y viéndose reflejado en una mejor producción de las proteínas recombinantes, por ejemplo, Wang *et al* en 2019 reportaron que la productividad de la eritropoyetina humana recombinante se mejoró 1,8 veces al usar sorbitol (45).

Otra ventaja del sorbitol es que puede ser usado como osmoprotectante ya que funciona como regulador osmótico, se acumula en las células, aparentemente para compensar las diferencias entre los potenciales del agua tanto intracelular como extracelular (50).

4.6.1.2. **Gluconato**

El gluconato es otro de los cosustratos usados, en cultivos de *Pichia* sp., sin embargo ha sido menos estudiado (51). En *P. pastoris*, el gluconato se metaboliza como fuente de carbono en condiciones aeróbicas. El gluconato entra por difusión pasiva a través de la membrana plasmática y es fosforilado por la glucoquinasa, luego el gluconato-6-P entra en la vía pentosa y es convertido a D-ribosa-5-fosfato, generando un mol de NADPH y ayudando así en la formación de biomasa (52)(51).

El uso de gluconato presenta ventajas como el hecho de no ser una fuente de carbono que reprima el promotor *AOX1*, posee una entalpía mucho menor que la del metanol, por lo cual el calor liberado es menor que la fermentación de metanol solo. Adicionalmente, la limitación de oxígeno se puede reducir ya que el requerimiento de oxígeno para la fermentación de gluconato es menor en comparación con la del metanol. En estudios en la producción de interferón gama humano (*hIFN-γ*) usando el gluconato como co-sustrato, se tuvo una producción de 27 mg L⁻¹ usando 40 g/L de gluconato y 10 g/L de metanol (52)

4.6.1.3. Manitol

El manitol es otro co-sustrato que se ha ensayado para la producción de proteínas recombinantes, a diferencia del sorbitol y el gluconato, el manitol se añade al medio de cultivo por alimentación continua. En el estudio realizado por Eskitoros *et al* en 2014 ellos afirman que el consumo de manitol por parte de la levadura es mayor que la del sorbitol y que puede ser debido a la forma en que el manitol es metabolizado por las células (47). Esta metabolización puede darse de dos maneras, una similar a como ingresa el sorbitol y la otra opción es que el manitol se fosforila a manitol-1-fosfato por la manitol-quinasa y luego se oxida a fructosa-6-fosfato por la manitol-1-fosfato deshidrogenasa, siendo necesaria la respiración aeróbica para su metabolismo. Para la producción de eritropoyetina humana Eskitoros *et al* 2014 usaron el manitol como cosustrato en un cultivo mixto junto con el metanol en el cual se obtuvo una actividad de la proteína de 120 U g^{-1} (47).

4.6.1.4. Glucosa

El uso de glucosa como co-sustrato no es muy común, debido a que se ha reportado que la glucosa es un represor del promotor *AOX1*, aunque en algunos estudios realizados se ha reportado que es posible eliminar completamente el efecto represivo de la glucosa en la producción de proteínas recombinantes (53) (46). Sin embargo, se reportó que la glucosa es una fuente factible para ser co-sustrato con el metanol en cultivos continuos con *P. pastoris* para la secreción de tripsinógeno porcino bajo control de promotor *AOX1*. El efecto represivo de las concentraciones de glucosa sobre el promotor *AOX1* fueron eliminados en cultivos continuos debido a la disponibilidad de ambos sustratos de carbono. En estudios realizados en la producción de tripsinógeno de cerdo recombinante usando el metanol y glucosa, el metanol fue consumido completa y simultáneamente a la glucosa, por lo tanto al usar glucosa la productividad se mejora particularmente debido al rendimiento 1,4 mayor que con solo metanol, la productividad máxima es de $(0,70 \pm 0,12) \text{ mg g}^{-1}$, las mayores tasas de producción de biomasa, según Paulová *et al* en 2012 se cree que las mayores tasas de producción de biomasa podrían estar relacionada con mayor cantidad de proteína y con mayor cantidad de proteína, menor evolución del calor y una alta proporción de células productoras activas (46)(53).

4.6.1.5. Glicerol

El uso de glicerol ha sido propuesto también como una opción de co-sustrato, pero se ha reportado que el uso de esta fuente de carbono tiene un efecto represor del promotor del gen *AOX1*. Sin embargo, para la producción de lipasas en *Pichia pastoris*, se comparó la productividad específica (qP) y volumétrica (QP), al usar glicerol como cosustrato. En los cultivos de glicerol-metanol la qP estaba por debajo de los cultivos de control, lo que indica una posible represión de *pAOX1* por este co-sustrato, sin embargo, el valor de QP fue mayor y se logró con glicerol a 22 ° C, siendo 34% más alto que el control solo con metanol y casi 20% más alto que el cultivo de sorbitol. Esto debido a la mayor concentración de biomasa observada con glicerol, a pesar que hubo una represión del promotor, la cantidad producida de biomasa fue mucho mayor que en un cultivo de solo metanol (43) (28).

4.6.2. Temperatura

La temperatura es otro factor importante en la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*, en algunos estudios se ha obtenido una mayor producción de biomasa en temperaturas por debajo de 30 °C, debido al largo período de adaptación de las células (5–10 h) después de cambiar al entorno de inducción, deteriorando la productividad. Alguna de las explicaciones para que haya una mejor producción en 20 °C que en 30 °C es el hecho de que bajar la temperatura al menos podría ayudar a aliviar la lisis y la secreción de proteasas cuando se cultiva en metanol (54)(43).

4.6.3. Fuente de nitrógeno

Las fuentes de nitrógeno también tienen un papel clave en el crecimiento celular y en la síntesis de proteínas recombinantes (55). Se ha encontrado que diferentes fuentes de nitrógeno pueden alterar la regulación de varias vías metabólicas, como en el caso de las enzimas involucradas en procesos catabólicos en *P. pastoris*, las cuales pueden ser fuertemente inducidas por la metilamina. Con el uso de algunas fuentes de nitrógeno como el sulfato de amonio se ha podido evidenciar que los niveles de expresión de genes que utilizan en metanol fueron más altos a comparación del uso de otras fuentes de nitrógeno como la prolina, lo cual indica que las fuentes de nitrógeno están involucradas en el metabolismo del metanol (56).

En algunos estudios se ha evaluado el uso de piel de bacalao como fuente de nitrógeno orgánico. Usando esta fuente de nitrógeno, la producción de catepsina humana en *Pichia pastoris* (WT), aumento un 18,3%, así como la densidad celular del cultivo, la cual aumentó un 21% (55).

Otra opción de fuente de nitrógeno sugerida para la producción de proteínas recombinantes son los casaminoácidos (CA), los cuales constituyen una mezcla de aminoácidos obtenidos de la hidrólisis ácida de caseína. Esta mezcla contiene todos los aminoácidos excepto el triptófano, el cual se degrada durante la hidrólisis con ácido sulfúrico. Para el sistema de expresión basado en el uso del promotor del gen *AOX1* varios autores (55)(56)(57) han informado sobre un efecto positivo de CA sobre la productividad de proteínas recombinantes. Kaushik *et al* en 2016 han informado sobre el efecto positivo de los CA sobre la secreción del dominio III (EDIII) de la proteína de la envoltura del virus del dengue serotipo-3 ya que obtuvieron un nivel máximo de expresión de EDIII de 187 mg / L en presencia de CA al 1%, siendo esta concentración nueve veces mayor que en condiciones donde sin CA (57). Esto pudo deberse a que la suplementación con CA facilita la sobreexpresión de las células de *P. pastoris* y permite secretar más EDIII, reduciendo la proporción de proteína que queda retenida intracelularmente (57). Una de las ventajas de la presencia de CA en los medios de cultivo no interfiere en la purificación de la proteína, a diferencia de los componentes del extracto de levadura y las peptonas (57).

Por último, el uso de alanina en la producción de fitasa en *Pichia pastoris* en escala laboratorio (100 mL) permitió una obtención de 8632 U/mL proteína a comparación del cultivo con solo metanol que tuvo una producción de 2711 U/mL en 45 horas de incubación (52).

5 Objetivos

5.1. Objetivo general

Analizar el efecto de los factores involucrados en la optimización de la producción de proteínas recombinantes empleando cepas de levaduras modificadas genéticamente en la ruta de N-glicosilación.

5.2. Objetivos específicos

- Identificar los factores más influyentes en la de producción de proteínas recombinantes en levaduras obtenidas mediante modificaciones en la ruta de N-glicosilación.
- Plantear una estrategia teórica para la optimización de producción de proteínas recombinantes empleado la cepa *Pichia pastoris* $\Delta OCH1$, previamente diseñada en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo

6 Metodología

6.1. Tipo de estudio

La búsqueda realizada es una revisión de la literatura existente sobre los factores de cultivo que influyen en la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en cepas de *Pichia pastoris* modificadas genéticamente en la ruta de N-glicosilación, publicadas entre el 2010 al 2020.

6.2. Diseño de la investigación

6.2.1. Población de estudio y Muestra

Se seleccionaron los estudios que relacionaban los posibles factores de cultivo que pueden dar paso a la optimización de los procesos de producción de proteínas recombinantes con el uso de levaduras con modificaciones en la ruta de N-glicosilación. Incluyendo los siguientes tipos de publicaciones:

- i) Artículos de revisión: Son los cuales proporcionan un resumen amplio de la investigación sobre un tema, y una perspectiva sobre el estado y perspectivas futuras del campo científico.
- ii) Investigación original: permite conocer los avances en diversos campos y tipos de estudios. Incluye una introducción completa y secciones de métodos, resultados y discusión.
- iii) Métodos: estos documentos presentan un nuevo método experimental, prueba o procedimiento. El método descrito puede ser completamente nuevo

o puede ofrecer una versión mejorada de un método existente. El artículo debe describir un avance demostrable sobre lo que está actualmente disponible.

6.2.2. Criterios de inclusión:

- Publicaciones que cumplan con el tipo de estudio a incluir ya sean artículos de revisión, investigación original, y métodos publicados en inglés y español.
- Publicaciones realizadas en el periodo del 2010 a 2020 (periodo que comprende 10 años de investigación actualizada).
- Publicaciones encontradas en las bases de datos, que contengan una o más de las palabras clave empleadas.

6.2.3. Criterios de excusión:

- Reportes de congreso, editoriales, estudios de caso, notas periodísticas y cartas al autor.
- Investigaciones originales y revisiones que sean publicadas antes del 2010.
- Investigaciones originales y revisiones publicadas en idiomas diferentes al español o inglés.

6.3. Recolección y selección de la información

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las siguientes bases de datos: Ebscohost, Scopus, Proquest, y PubMed; teniendo en cuenta los siguientes criterios de búsqueda: (“Protein recombinant” AND “*Pichia pastoris*”) y (“Co-feeding” AND “*Pichia pastoris*”), (*glycoengineered* AND *pichia* AND *optimization*), (*glycoengineered* AND *pichia* AND *optimization* AND *human*).

Para la selección de los artículos de interés, se hizo una preselección de la literatura con base en el año de publicación (2010-2020). Después de lectura del título y resumen del artículo, en el cual se descartaron las publicaciones que no estuvieran en idiomas especificados (inglés y español), se descartaron los que no tuvieran las palabras clave utilizadas en los criterios de búsqueda y los cuales su acercamiento al tema principal no

fuera a proteínas recombinantes terapéuticas u optimización de la producción. Una vez preseleccionados, se revisó el texto completo, excluyendo artículos de acuerdo con los criterios de exclusión.

6.4. Análisis de la información

A partir de los artículos seleccionados como muestra, se diseñó una matriz de datos (Anexo 12.1) para el registro de la información recolectada según el tipo de estudio, año, país, tipo de modificación de la cepa incluyendo información relacionada con las estrategias de optimización presentadas.

7 Resultados

A partir de la búsqueda inicial con la clave booleana (“Protein recombinant” AND “Pichia pastoris”) se obtuvieron 108 artículos, la cual fue posteriormente fue refinada delimitando la búsqueda teniendo en cuenta los criterios de selección y términos más precisos acerca del tema de interés como cepas de *Pichia pastoris* con glicoingeniería, con lo cual se obtuvieron 30 documentos, después se eliminaron los artículos repetidos y por resumen del cual resultaron 17 artículos (Anexo 12.1). Finalmente, se curó la búsqueda eliminando aquellos que no tuvieran estrategias de optimización para cepas de *Pichia pastoris* con glicoingeniería en el cultivo, con esto se obtuvo como muestra final 10 publicaciones distribuidas en ocho investigaciones originales y dos revisiones de literatura (Figura 2).

Los 10 artículos seleccionados hablan acerca de los diferentes aspectos que se han tenido en cuenta para evaluar los procesos de producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico en cepas con por lo menos una modificación de glicoingeniería para la producción.

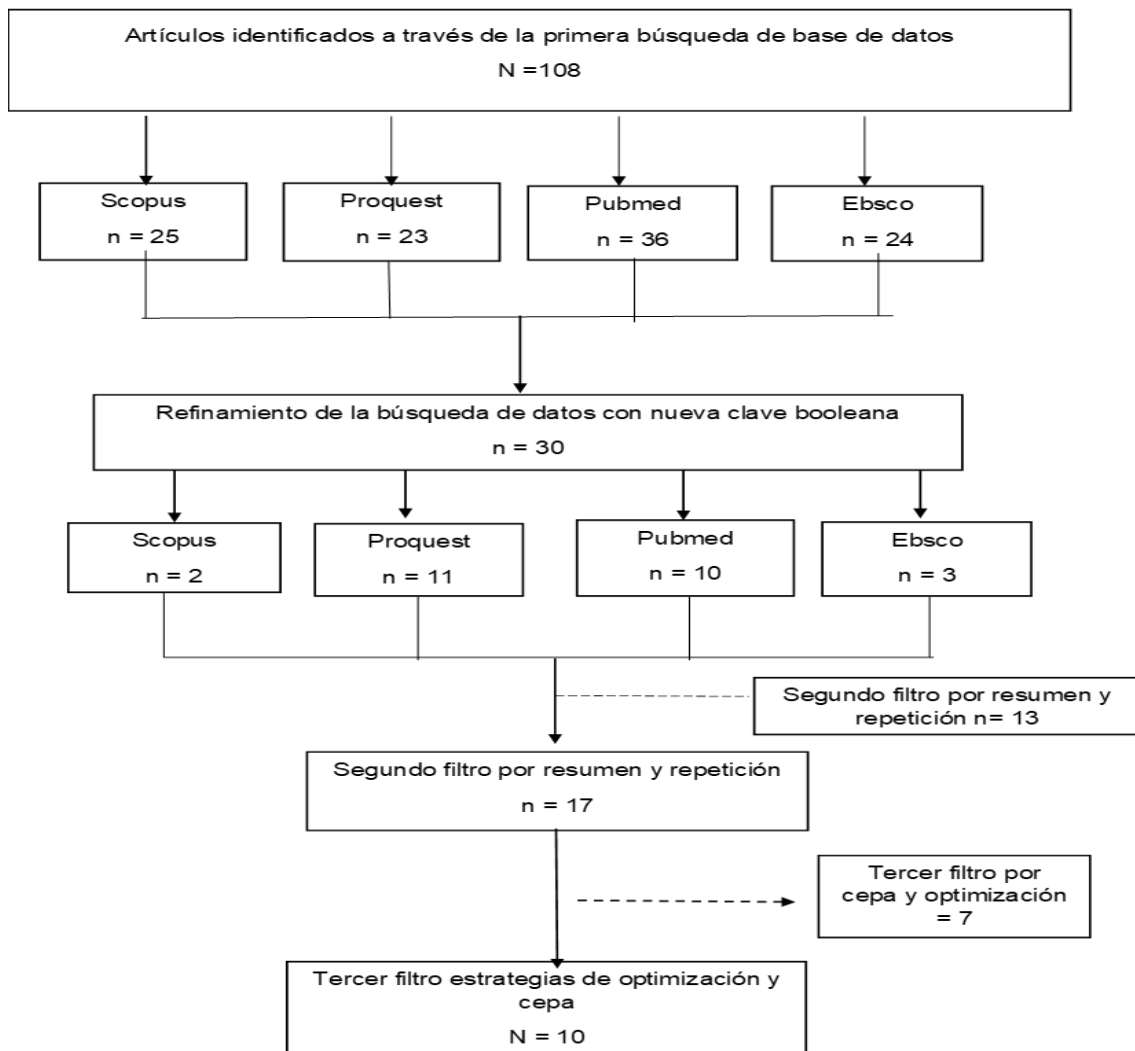


Figura 2. Proceso de identificación y selección de la muestra.

Respecto a los años de publicación de estos artículos y los países donde fueron publicados se puede observar que la gran mayoría de los estudios se realizaron en el 2015 con tres artículos publicados en ese año. Respecto al país de origen se encontró que el país que tenía mayor cantidad de artículos es Estados Unidos seguido por Austria e India (Figura 3).

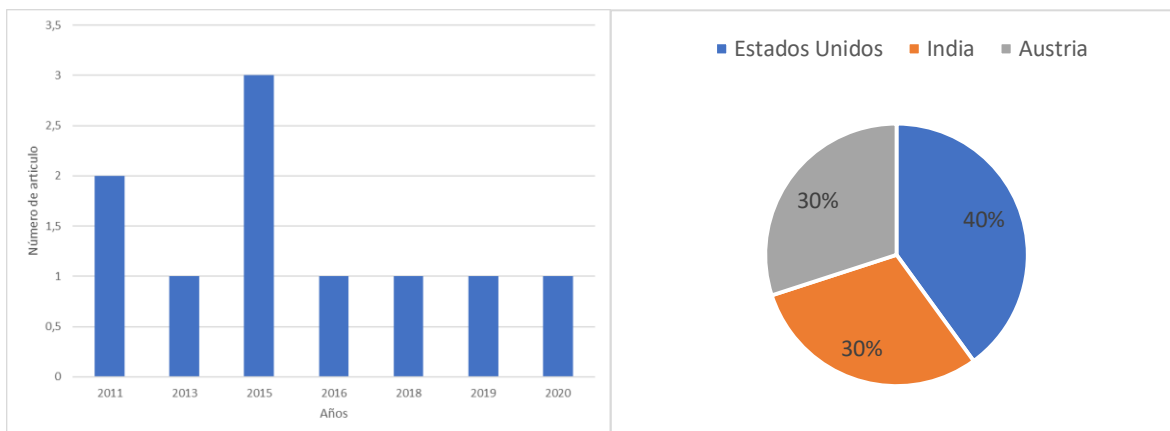


Figura 3. Distribución de los artículos incluidos en el estudio por años (A) y país (B).

Respecto a las proteínas recombinantes obtenidas en los estudios encontrados se puede observar que todas son de uso terapéutico. Además, se ve que la mayoría de las proteínas recombinantes producidas (45 %) fueron anticuerpos, seguido de interferon humano (22 %) y peroxidasa de rábano picante (22 %) (Figura 4).

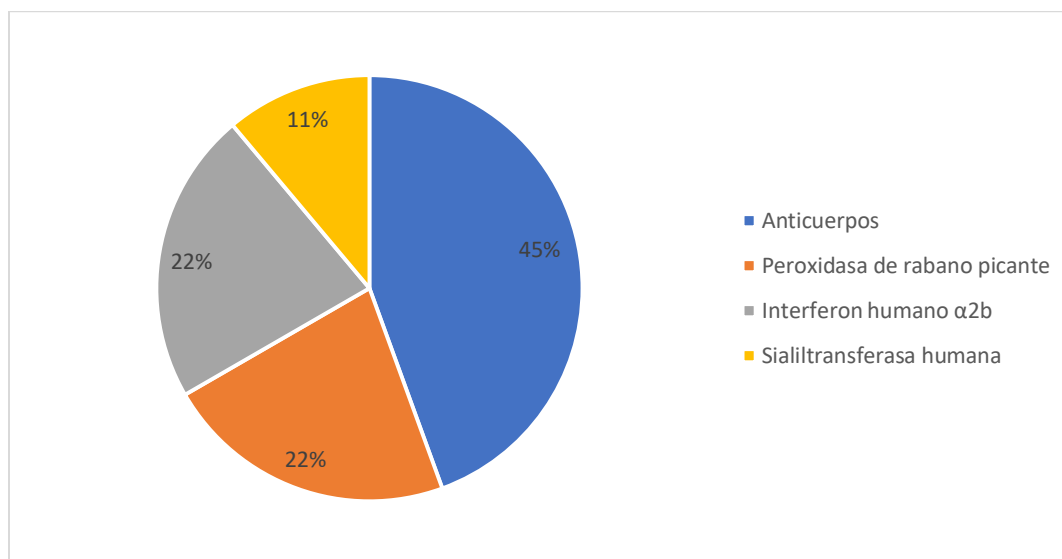


Figura 4. Proteínas recombinantes producidas en la base de datos

7.1. Factores de optimización en cepas delecionadas

En los estudios revisados se identificaron algunos factores como el pH, la temperatura, la tasa de transferencia de oxígeno, la tasa de alimentación del metanol, la biomasa inicial de proceso, como los parámetros frecuentemente usados y que al parecer son claves en el

crecimiento celular, productividad y la calidad de la proteína recombinante producida en cepas de *Pichia pastoris* modificadas en su ruta de N-glicosilación específicamente en el gen *OCH1*.

7.1.1. Alimentación con metanol y el uso de cosustratos

De los artículos revisados se encontró que cinco de ellos reportaban la alimentación con metanol como uno de los factores que tiene gran impacto en la optimización de cultivos de *P. pastoris* $\Delta OCH1$ mejorando la productividad y calidad del producto final (58)(59)(60)(61)(62).

La productividad en un cultivo puede depender de la concentración de metanol. En estudios como el de Kim et al en 2015 la concentraciones indicadas de metanol son por debajo de 10 g/L (1% v/v) ya que si se usan concentraciones mayores como 20 g/L (2 % v/v) o 15 g/L (1,5 %v/v) se puede ver un efecto de inhibición del crecimiento (59). Berdichevsky et al en 2011 usaron una concentración de 1% (v/v) para tener una producción de anticuerpos monoclonales de 1,9 g/L (63). En otro estudio para la producción de interferón gamma humano hecho por Katla et al/2019 reportaron que la concentración de metanol óptima es de 1,4 % (v/v) (60). Esto sugiere que, a pesar de la mayor sensibilidad a concentraciones de metanol en el medio, reportada para cepas modificadas debido a las alteraciones en su estructura celular y los mecanismos secretores de la expresión proteína, las cepas de *Pichia pastoris* $\Delta OCH1$ requieren de concentraciones más altas de metanol, comparado con las que se trabaja en la producción de enzimas lisosomales en el IEIM, la cual ha sido de 0,5 % (v/v), tanto para cepas WT como modificadas genéticamente (7)(64)(9) .

En el estudio realizado por Ye et al/ en el 2011 se estudió la velocidad de alimentación del metanol, la biomasa inicial y el tiempo de inducción durante la fase de inducción (58). Los investigadores encontraron que para poder escalar el proceso es importante controlar la biomasa inicial (debajo de 500 g/L peso celular húmedo), la tasa de alimentación con metanol de 0,006 h⁻¹ y el tiempo de inducción, entre 72 horas y 100 horas, ya que estos investigadores sugieren que después de 100 horas de inducción la productividad cae debido a la acumulación de compuestos tóxicos en la célula o por falta nutrientes en el medio. Sin embargo, con el fin de evitar la falta de nutrientes en el medio se suministró biotina y sales durante la alimentación con metanol pero tampoco hubo un aumento de la productividad después de las 100 horas de inducción (58).

Por otro lado, Kim *et al* en 2015 reportaron en su estudio cómo afecta la concentración limitada de metanol en el crecimiento de la cepa y en la producción de anticuerpos. Para ello se adicionó metanol a una velocidad límite, de modo que el metanol agregado era consumido inmediatamente después de la distribución en todo el reactor (59). En estas circunstancias, el nivel de oxígeno disuelto se mantuvo cercano al 20% de saturación de aire y el metanol se alimentó continuamente para mantener una tasa de crecimiento específica para las células. En este estudio los autores encontraron que en condiciones limitadas de metanol evitan la degradación proteolítica durante en el ensamblaje de los anticuerpos. Adicionalmente los investigadores hallaron que hay mayor lisis celular bajo condiciones limitadas de metanol, por lo cual ellos concluyen que el crecimiento celular en la fase de producción de proteínas es más bajo en condiciones limitadas de oxígeno que en condiciones limitadas de metanol (59).

Respecto al consumo de metanol por las cepas modificadas de *Pichia pastoris* Gmeiner *et al* en sus dos estudios publicados en 2015 para la producción de peroxidasa de rábano picante (HRP) afirmaron que estas cepas mutadas presentan diferencias en la absorción de metanol y que esto está correlacionado con la temperatura, ya que en 30 °C la tasa de absorción del metanol (q_s) (mmol/g/h) para *Pichia pastoris* wild type (WT) fue de 1,32 (mmol/g/h) mientras para la cepa mutada $\Delta OCH1$ fue de 0,600 (mmol/g/h) y para la variante 4/8 HRP $\Delta OCH1$ de 0,800 (mmol/g/h) (44)(65). Esto muestra que la cepa con la variante 4/8 HRP mostró una q_s menor en comparación con la cepa no mutada que produce la enzima, por lo cual sugieren que la producción de la HRP de la cepa con glicoingeniería es una carga fisiológica adicional para la levadura, reafirmando que la captación de metanol en las cepas modificadas es más lento, según lo reportado en otros estudios (44)(65)(58).

7.1.1.1. Cosustratos

Ye *et al* en 2011 reportaron que el uso de cosustratos durante la fase de inducción para la producción de anticuerpos en una cepa delecionada no mejoró la productividad debido a una reducción en la tasa de alimentación de metanol (58). Además, la alimentación conjunta con sorbitol aumentó el contenido de N-glucano no deseado. Sin embargo, Luley-Goedl *et al* en 2016, mostraron lo contrario, ya que al usar una estrategia de alimentación mixta con glicerol y metanol en una relación de 2:1 aumentaron la producción de sialiltransferasa humana 1,7 veces comparado con la producción en *Pichia pastoris* WT

(62). Con esta estrategia mixta a 72 h de inducción se obtuvo en promedio un peso celular húmedo de 565 ± 51 g / L ,una actividad de 22 U/L y una producción de proteína de 1,1 g/L, comparado con los resultados obtenidos en una alimentación solo con metanol, donde se obtuvo un peso celular húmedo de 324 ± 49 g/L, una producción de proteína de $0,6 \pm 0,2$ g/L, con una actividad de 0,3U/L. El rendimiento promedio de fue de $17,2 \pm 5,2$ U/L después de 96 h de inducción, demostrando así que la estrategia de cosustrato en glicerol aumenta la producción para la cepa mutada y para la cepa silvestre.

En otro estudio realizado por Katla *et al* 2019, donde se optimizó el uso de metanol, glicerol y amonio para la producción de interferón humano $\alpha 2b$ (huIFN $\alpha 2b$) se encontró que la concentraciones de 46,06 g/L glicerol, 10,15 g/L de sulfato de amonio y 1,4% (v/v) metanol, permitieron un aumento del 31,2 % de interferón humano $\alpha 2b$ (huIFN $\alpha 2b$) (436 mg/L) frente al obtenido en cepas de *Pichia pastoris WT* (300 mg/L) (60). Posteriormente, en otros estudios realizados por el mismo equipo de investigación, Katla *et al* en 2020, compararon tres estrategias de alimentación: metanol/sorbitol, metanol /glicerol y solo metanol (61). Los resultados mostraron que el enfoque de alimentación mixta con sorbitol fue el que tuvo la mayor tasa de crecimiento específico durante la fase de inducción ($0,066$ h⁻¹), a diferencia de las otras dos estrategias de alimentación donde se obtuvo $0,024$ h⁻¹ y $0,033$ h⁻¹ para metanol y metanol/glicerol respectivamente. En cuanto a la producción de interferón humano $\alpha 2b$ (huIFN $\alpha 2b$), la estrategia de alimentación mixta de metanol/sorbitol alcanzó una concentración de 287,91 mg/L de proteína purificada, a comparación de la concentración obtenida solo con metanol (201,04 mg/L) y con metanol/glicerol (166,71 mg/L), siendo la mejor opción como cosustrato para la producción de interferón humano $\alpha 2b$ (huIFN $\alpha 2b$) el sorbitol.

Sin embargo, los estudios sobre el uso de cosustratos dan a entender que el uso de una alimentación mixta debe hacerse de manera meticulosa conociendo el producto de interés, evaluando si la coadministración puede afectar la calidad del producto, y determinando la proporción en la cual se deben usar estos cosustratos, ya que no siempre pueden tener un buen efecto sobre la producción. En la Tabla 3 se hace una comparación sobre la producción de las proteínas recombinantes usando diferentes co-sustratos y diferentes cepas (*Pichia pastoris WT* y *Pichia pastoris $\Delta OCH1$*).

Tabla 3. Comparación de la producción de proteínas recombinantes usando cosustratos.

Proteína recombinante	Producción en <i>Pichia pastoris</i> Δ OCH1 alimentada con solo metanol	Producción en <i>Pichia pastoris</i> Δ OCH1 con estrategia mixta cosustrato	Producción en <i>Pichia pastoris</i> (WT)	Veces aumento de producción entre <i>Pichia pastoris</i> Δ OCH1 alimentado con metanol y <i>Pichia pastoris</i> Δ OCH1 con estrategia mixta	Veces de aumento de producción entre <i>Pichia pastoris</i> WT y <i>Pichia pastoris</i> Δ OCH1 alimentado solo con metanol
Sialtransferasa humana(62)	0,3 U/L	22 U/L *	17,2 U/L	73.3	1,27
Interferón humano α 2b (huIFN α 2b) (60)	Información no mostrada	436 mg/L ^{^*}	300 mg/L ^{^*}	Información no mostrada	1,46
Interferón humano α 2b (huIFN α 2b) (61)	201,04 mg/L	287,91 mg/L [°]	Información no mostrada	1,43	Información no mostrada

[^] Proteína total sin purificar

^{*} Alimentación en fase de inducción con glicerol y metanol

[°] Alimentación en fase de inducción con sorbitol y metanol

7.1.2. Temperatura

De los 10 estudios revisados, un artículo habla sobre la optimización de la temperatura como uno de los parámetros más importantes en el proceso de optimización, ya que las cepas delecionadas son más sensibles a las temperaturas por encima de los 28 °C. Ye et al en 2011 recomiendan para todas las cepas trabajar los cultivos por debajo de esta temperatura (58). Sin embargo, advierten que mantener esta condición pueden causar un gasto económico extra en el biorreactor, ya que producir las proteínas a estas temperaturas puede llevar el uso de sistemas de refrigeración

En la Tabla 4 se puede observar como la temperatura de producción de las diferentes proteínas recombinantes (anticuerpos, peroxidasas) tiende a estar entre los 20 °C y 30 °C con un promedio de $26,4 \pm 3,21$ °C.

Tabla 4 Temperaturas empleadas durante la producción de proteínas recombinantes en cepas de *P. pastoris* con modificaciones en la ruta de N-glicosilación.

Artículo	Temperatura °C	Referencia
Optimization of a Glycoengineered <i>Pichia pastoris</i> Cultivation Process for Commercial Antibody Production	26	(58)
Improved Production of Monoclonal Antibodies Through Oxygen-Limited Cultivation of Glycoengineered Yeast	24	(63)
Real-time monitoring of glycerol and methanol to enhance antibody production in industrial <i>Pichia pastoris</i> bioprocesses	24	(59)
Combining Protein and Strain Engineering for the Production of glyco-engineered horseradish Peroxidase C1A in <i>Pichia pastoris</i> recombinant <i>Pichia pastoris</i> $\Delta och1$ strain expressing a plant peroxidase	30	(65)
Development of a fed-batch process for a recombinant <i>Pichia pastoris</i> $\Delta och1$ strain expressing a plant peroxidase	20	(44)
Combining expression and process engineering for high-quality production of human sialyltransferase in <i>Pichia pastoris</i>	28	(62)
Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins	28	(66)
High level extracellular production of recombinant human interferon alpha 2b in glycoengineered <i>Pichia pastoris</i> : culture medium optimization, high cell density cultivation and biological characterization	28	(60)
Biocalorimetric monitoring of glycoengineered <i>P. pastoris</i> cultivation for the production of recombinant hulfN α 2b: A quantitative study based on mixed feeding strategies	29,5	(61)

7.1.3. pH

El pH es otro parámetro crítico en la producción de las proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* delecionadas en sus rutas de N-glicosilación. De los 10 artículos revisados dos muestran este parámetro como un factor importante en la producción de la proteína.

En el estudio de Gmeiner et al en 2015 los autores afirman que la cepa delecionada de *Pichia pastoris* no crece adecuadamente en medios muy ácidos (por debajo de 5) o alcalinos (por encima de 9) pero han encontrado que a un pH entre 5 y 7 la producción de la proteína HRP tiene una buena estabilidad. Adicionalmente, afirman que a pH ácido la cepa tiene una mayor afinidad con el sustrato (en este estudio alimentación mixta con glicerol-metanol y suplementación con sulfato de amonio), por lo tanto, hay una mayor producción. De igual forma, Gupta et al 2018 recomiendan bajar el pH del cultivo, ya que en la producción de un anticuerpo monoclonal (mAb) encontraron que el pH entre 7 y 7,5 incrementaba el tamaño de la glicosilación en la proteína en los anticuerpos (66). En la *Tabla 5* se observan los diversos pH que se usaron en los estudios de la base de datos, siendo el pH promedio de $5,8 \pm 0,77$.

Tabla 5. Diferentes valores de pH usados en la base de datos

Artículo	pH usado	Referencia
Optimization of a Glycoengineered <i>Pichia pastoris</i> Cultivation Process for Commercial Antibody Production	6,3	(58)
Improved Production of Monoclonal Antibodies Through Oxygen-Limited Cultivation of Glycoengineered Yeast	6,5	(63)
Real-time monitoring of glycerol and methanol to enhance antibody production in industrial <i>Pichia pastoris</i> bioprocesses	6,5	(59)
Combining Protein and Strain Engineering for the Production of glyco-engineered horseradish Peroxidase C1A in <i>Pichia pastoris</i> recombinant <i>Pichia pastoris</i> $\Delta och1$ strain expressing a plant peroxidase	5	(65)
Development of a fed-batch process for a recombinant <i>Pichia pastoris</i> $\Delta och1$ strain expressing a plant peroxidase	5	(44)
Combining expression and process engineering for high-quality production of human sialyltransferase in <i>Pichia pastoris</i>	5	(62)
Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins	7	(66)
High level extracellular production of recombinant human interferon alpha 2b in glycoengineered <i>Pichia pastoris</i> : culture medium optimization, high cell density cultivation and biological characterization	5,4	(60)
Biocalorimetric monitoring of glycoengineered <i>P. pastoris</i> cultivation for the production of recombinant hIFN α 2b: A quantitative study based on mixed feeding strategies	5,5	(61)

7.1.4. Tasa de consumo de oxígeno

La tasa de transferencia de oxígeno según los investigadores es un factor clave en las cepas delecionadas y un marcador importante para escalar la producción incluso se ha propuesto como nutriente limitante en lugar del metanol; Algunos factores que afectan la velocidad de transferencia de oxígeno al cultivo es la aireación y la agitación por lo cual afectara la tasa de consumo de oxígeno (59)

Berdichevsky et al en 2011 realizaron estudios para conocer que factor de producción tenía mayor impacto en el crecimiento y producción de la proteína, las condiciones de oxígeno limitado o las condiciones de metanol limitado (63). Bajo condiciones de oxígeno limitado el crecimiento celular a 90 horas de inducción fue de 0,76 g/L, mientras el crecimiento en condiciones limitadas de metanol fue de 0,89 g/L. Dado que las condiciones limitadas de oxígeno limitan la velocidad máxima de consumo de oxígeno (y la tasa de remoción de calor) y también permite la extensión de la fase de inducción, con lo cual los autores lograron extenderla hasta 140 h. Esto contribuyó a obtener un aumento en la concentración de anticuerpos (1,9 g L⁻¹ (condiciones limitadas de oxígeno) vs. 1,2 g L⁻¹ (condiciones no limitadas de oxígeno)).

En estudios realizados por Kim *et al* en 2015 buscaron determinar qué modo de operación afectaba más la producción de anticuerpos recombinantes y se encontró que en cultivos con oxígeno limitado la producción de anticuerpos fue 1,72 veces más alta que en condiciones de metanol limitado (10 g/L). Según los autores esto se debe a que en condiciones de oxígeno limitado, el oxígeno se alimenta a una velocidad igual o menor de la tasa metabólica de las células, manteniendo así un nivel de oxígeno disuelto cercano a cero (59).

En los estudios encontrados en la base de datos se encontró que el uso de cosustratos como el sorbitol tienen ventajas en que ayudan a bajar el consumo de oxígeno (58), como lo es el caso de Katla *et al* 2020 en este estudio se comparó la tasa de consumo de oxígeno para metanol/glicerol en la fase de crecimiento e inducción de *P. pastoris* y este osciló entre 4 y 320 mmol / L.h pero, para el caso de metanol + sorbitol, la tasa de consumo de oxígeno estaban en un rango relativamente más bajo (4 - 260 mmol / L.h), siendo el sorbitol un cosustrato que ayuda a bajar el consumo de oxígeno por lo tanto pudiendo alargar el tiempo de inducción de la producción de las proteínas (61).

7.1.5. Inhibidores de proteasas

Luley-Goedl *et al* en 2016 proponen el uso de inhibidores de proteasa durante la fase de inducción debido a que la productividad y calidad de la proteína a menudo se ve obstaculizada por la actividad proteasas inherente al huésped y a la estrategia de inducción (62). Por eso en este estudio los investigadores estudiaron el uso de inhibidores proteasas durante la fase de inducción de la proteína sialiltransferasa humana, en este estudio se probaron los inhibidores fenilmetilsulfonilo (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y Zn^{2+} . Estos inhibidores se evaluaron mediante el suministro de una fuente constante de PMSF a una velocidad de flujo de 0,1 mmol/h/L o mediante la adición de EDTA a una concentración de 1 mM antes de la inducción y posteriormente cada 24 h. Por su parte, la influencia del Zn^{2+} se estudió usando una solución de sal de rastreo PTM1 con una concentración de $ZnCl_2$ al 0,2%.

7.1.6. Concentración de fuentes de nitrógeno

Respecto al uso de fuentes de nitrógeno, el estudio de Katla *et al* en 2019 encontró que el sulfato de amonio es un factor que afectó la producción de la proteína hulfN α 2b (60). En este sentido, los autores optimizaron la concentración de este factor para poder obtener una concentración óptima de amonio en un cultivo con metanol y glicerol como cosustrato. Tras la aplicación de diferentes estrategias de optimización, se encontró que la mayor concentración de la proteína recombinante se lograba con 10 g/L de sulfato de amonio, logrando un incremento de cerca de 5 veces en los valores de producción de la proteína recombinante, en comparación con los valores alcanzados empleando un medio complejo (Buffered minimal glycerol yeast, BMGY) (60).

7.1.7. Otros factores

En los estudios encontrados en la base de datos otras recomendaciones para optimizar el proceso están algunas de las opciones como las presentadas por Kim *et al* en 2015 en las cuales recomiendan el uso de equipos de supervisión en tiempo real para generar perfiles personalizados de la concentración de glicerol y metanol, así como de la densidad celular relativa (59)

8 Discusión

En las cepas modificadas como *Pichia pastoris* NRRLYY 1144 Δ OCH1 que tienen su ruta de N-glicosilación modificada tienen una inestabilidad en la membrana, cambios en pared celular como la pérdida de la capa de manoproteínas lo que con lleva a que se reorganice la quitina esto a consecuencia de la delección del gen *OCH1*, debido a esto se ha encontrado que esta cepa tiene un crecimiento más lento, células más pequeñas, mayor sensibilidad a la temperatura, y al metanol (58)(44) (67). En los estudios encontrados en el presente trabajo, se reporta que la producción de proteínas recombinantes son una carga fisiológica adicional para la levadura modificada lo que puede afectar la captación del metanol, y generar estrés metabólico debido a la acumulación de subproductos de una ruta metabólica alterna a la de alcohol oxidasa (AOX), lo cual produce lisis celular, proteólisis de la proteína de interés y la liberación de otras proteínas nativas que interferirán en los procesos de purificación (68).

Un aspecto que denotaron los estudios y adicionalmente se ha observado en la cepa *Pichia pastoris* NRRLY-11430/ Δ OCH1 diseñada en el IEIM (12)(64) es el crecimiento en formas de racimo, lo cual según Gmeiner *et al* 2015 trae consigo mayor lisis celular, mayor secreción de proteasas y formación de espuma, esto debido a que las células que están en el centro se limitan por sustrato y oxígeno causando una mayor muerte celular (44).

El uso de estrategias de alimentación mixta o co-sustrato para la fase de inducción con metanol ha sido una estrategia comúnmente usada en la cepa silvestre de *Pichia pastoris* cuando se usan promotores regulados con el metanol como el caso del promotor *AOX1* (3)(30). En los estudios revisados en la base de datos se encontraron resultados mixtos sobre si el uso o no de cosustratos en el cultivo de cepas modificadas en su ruta N-glicosilación puede aumentar la producción de proteínas recombinantes. Para Ye *et al* en el 2011 en la producción de anticuerpos el resultado obtenido indicó que la alimentación conjunta con sorbitol no mejora la productividad, aunque en el estudio no muestran los valores obtenidos con la alimentación conjunta ni la velocidad del crecimiento de la cepa en el medio de cultivo, para los autores estos resultados pueden ser debidos a una tasa baja de alimentación de metanol en el cultivo (58). Estos resultados son contrarios a los reportados para cepas silvestres de *Pichia pastoris* en los que usaron el sorbitol como cosustrato; como es el caso de Jungo *et al* 2007 quienes produjeron avidina recombinante en una cepa de *P. pastoris* Mut⁺ y mostraron que la alimentación mixta de sorbitol y metanol en lugar de metanol como única fuente de carbono, mejoró la productividad de la avidina

recombinante 1,3 veces con una velocidad específica de crecimiento $0,03 \text{ h}^{-1}$ (49). Esta diferencia de resultados entre estos dos estudios puede ser debida a que la tasa de asimilación del metanol que tienen estas cepas mutadas es más lenta, debido a la carga fisiológica que implica tener el gen *OCH1* delecionado, razón por la cual hay que controlar y revisar la tasa de alimentación del metanol y la concentración del metanol con menor espacio de tiempo que con una cepa silvestre.

Respecto a la concentración de metanol óptima en el medio existen diferentes valores en los estudios revisados en la base de datos, algunos estudios recomiendan concentraciones de metanol de 1% (v/v) (58), otros de 1,4 % (v/v) (63). En otros estudios recomiendan que la concentración estuviera por debajo de 1% (v/v) (60), por lo que comúnmente se recomienda usar concentraciones de metanol mayores a 0,5 % (v/v) en cepas delecionadas en su ruta de N-glicosilación, ya que en estudios como el reportado por Katla *et al* en 2019 la producción más baja de interferón humano $\alpha 2b$ se dio a una concentración de metanol al 0,5 % (v/v) ya que su concentración fue de 3,86 mg/L a diferencia de cuando se usó una concentración de metanol de 1,2 % (v/v) que tuvo una concentración de 52,0 mg/L (61). Adicionalmente, en el IEIM la alimentación de metanol para cultivos a escala de 100 mL se hace cada 12 horas en vez de 24 h (6) para así poder mantener la concentración de 0,5% (v/v) de metanol en el cultivo, mientras que a escala de biorreactor la concentración de metanol se mantiene normalmente en 0,5% (v/v), empleando un sistema de control basado en una sonda de pervaporación (12)(7). Sin embargo, en un estudio reciente realizado en el IEIM por Rincón (69) para la producción de la proteína recombinante GALNS, empleando la cepa *Pichia pastoris* NRRLY11430/ Δ *OCH1*, se encontró que una concentración de metanol del 1% (v/v) permitió un aumento de 2,34 en la actividad específica con respecto a lo observado con una concentración de 0,5% (v/v) lo cual refuerza la importancia del estudio de la concentración del metanol en la optimización de la producción de proteínas en este tipo de cepas. Adicionalmente, en aquellos estudios donde se usó la estrategia de cosustratos o alimentación mixta en el medio y se observó un aumento en la producción de proteínas recombinantes, los autores tenían previamente estandarizada la concentración de metanol. Es por esto por lo que, se recomienda tener la concentración de metanol optimizada previo a la evaluación o adición de algún cosustrato, de lo contrario es posible que no se vean cambios significativos en la producción de la proteína.

Es por esto que cuando se trabaje una estrategia alimentación mixta con cosustratos es importante encontrar la proporción adecuada de cada uno de los componentes usados. *et*

Luley-Goedl *et al* en 2016 evaluando proporciones de glicerol/metanol (2:1, 1:1, 2:1) mostró que a pesar que el glicerol es un represor del promotor *AOX1*, éste permitió un aumento del 40% en la cantidad de biomasa en cualquiera de las proporciones evaluadas en comparación a los cultivos inducidos con solo metanol (62). Esto fue posiblemente debido a que el glicerol es la mejor fuente de carbono para *Pichia pastoris* y por lo tanto se espera que la formación de biomasa aumente. Finalmente, Luley-Goedl *et al* 2016 determinaron que usar una mayor proporción de glicerol sobre metanol (2:1) permite la obtención de hasta 1 g/L de la proteína sialiltransferasa con un aumento de tres veces la actividad de la proteína, sin generar represión del promotor *AOX1*. Además, se reporta que esto podría atribuirse a la reducción del estrés y al aumento de la viabilidad celular en presencia de concentraciones más altas de glicerol. Esto concuerda con lo reportado por Katla *et al* 2019 quienes mediante el uso de glicerol como cosustrato observaron un aumento tanto en la biomasa (37,5 g/L) como en la productividad del sustrato ($Y_{x/glicerol} = 0,856$ glicerol/g biomasa) y en la producción de interferón humano alfa 2b (hIFNa2b) (436 mg/L) (61).

Otro cosustrato que fue usado para la cepa de *Pichia pastoris* con glicoingeniería es el sorbitol, el cual según Katla *et al* en 2020 (61) es una fuente de carbono que, a diferencia del metanol, entra por vía glucolítica, no reprime el promotor *AOX1*, ya que ayuda a que una buena cantidad de metanol pueda ser usado mayoritariamente en actividades de transcripción del promotor *AOX1* y por lo tanto a la producción de la proteína en lugar de ser usado en la generación de energía. Adicionalmente, su efecto osmoprotectante ayuda a proteger la célula la cual, como ya se ha mencionado anteriormente, tiene alterada su membrana (68).

Respecto sobre qué cosustrato sería el mejor para la producción de proteínas recombinantes, Katla *et al* 2020 encontraron que al usar una mezcla de glicerol:metanol la cantidad metanol residual en el cultivo era mayor respecto a la observada en los cultivos alimentados con la mezcla sorbitol:metanol, demostrando de esta forma que el glicerol genera un efecto represor sobre el consumo de metanol (61). Adicionalmente, obtuvieron 166,71 mg/L y 287,91 mg/L de la proteína recombinante, respectivamente, lo cual refuerza la idea que el sorbitol es mejor opción que el glicerol para ser usado como cosustrato.

Referente al consumo de oxígeno Katla *et al* 2020 reportaron una tasa de consumo de oxígeno mayor para cultivos de metanol:glicerol (4 - 320 m.mol / L.h) que la observada en cultivos de metanol:sorbitol (4 - 260 m.mol / L.h) (61). Teniendo en cuenta que la tasa de oxígeno ha sido propuesta como un factor limitante en la producción de proteínas

recombinantes en cepas con las rutas de N-glicosilación alteradas, el sorbitol pareciera ser una mejor opción a la hora de diseñar estrategias de producción basadas en el uso de cosustratos. Sin embargo, una comparación económica de los cosustratos puede aportar información importante en la selección del sustrato, en este sentido, un 1L o 1,26 Kg de glicerol puede estar en cerca de \$314.000 COP (Merck), mientras que un 1 Kg o 671,13 mL de sorbitol está alrededor de \$242.000 COP (Merck), lo cual en comparación de precios hace que el sorbitol sea más costoso un 12,9 % que el glicerol.

En cuanto al pH y la temperatura, en los estudios encontrados los valores promedio para cada una de estas variables fue de 5,8 y 26,4 °C, respectivamente. Una de las mayores diferencias que tienen las cepas silvestres de *Pichia pastoris* y mutada es la alta sensibilidad a la temperatura de estas últimas. En este sentido, los estudios recomiendan trabajar a temperaturas por debajo de los 30 °C que usualmente son empleados en los cultivos de *P. pastoris*. Sin embargo, estas temperaturas no deben ser inferiores a los 20 °C ya que el costo de mantener una refrigeración por debajo de esta temperatura puede incrementar los costos del proceso(44). Por esta razón, se aconseja mantener una temperatura en un rango entre 28°C y 20 °C para la producción de proteínas recombinantes en cepas modificadas genéticamente, ya que además en este rango de temperatura la captación del metanol por parte de la cepa delecionada es mayor que cuando se trabaja a 30 °C (67).

8.1. Planteamiento de una estrategia teórica para la optimización de producción de proteínas recombinantes empleado la cepa *Pichia pastoris* NRRLY11430/ Δ OCH1

En el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) para la producción de proteínas recombinantes en cepas de *Pichia pastoris silvestre* y *Pichia pastoris Δ OCH1* para inducción con metanol a escala laboratorio (100 mL) se han empleado concentraciones de metanol de 0,5 % (v/v) con una alimentación de cada 12 horas de metanol a escala de laboratorio (100mL), sin ningún uso de cosustrato, a una temperatura de 28-30 °C durante 96 horas de inducción (64).

De acuerdo con la revisión de literatura realizada en este trabajo, se estableció que para plantear la estrategia final para ser recomendada al IEIM para la optimización de la producción de proteínas recombinantes en la cepa *Pichia pastoris* NRRLY11430/ Δ OCH, es importante ver la relación de tres factores importantes como lo son la temperatura, la

concentración de metanol y el cosustrato. De esta forma se propone un modelo *full factorial* de 3³ en el cual se evaluarán diferentes temperaturas, y concentraciones tanto de metanol como de sorbitol, para realizar una alimentación mixta durante el proceso de inducción del cultivo (Tabla 6).

Respecto a las temperaturas, se eligió el rango de temperaturas entre 20 °C y 26 °C, el cual fue escogido teniendo en cuenta el rango de temperaturas hallado en esta revisión (Tabla 4). Las concentraciones de metanol escogidas son entre 0,5 % (v/v) a 1 % (v/v) y por último la concentración de sorbitol es entre 0,5 M a 1,5 M para ser administrada durante 96 horas de inducción. Con este planteamiento se espera que haya un aumento de mínimo 2 veces la producción como se observó en los resultados mostrados en la *Tabla 3* del documento, al optimizar la producción con el uso de cosustratos en cepas de *Pichia pastoris* con modificaciones en la ruta de N-glicosilación.

Tabla 6. Estrategia teórica planteada para optimización del cultivo

	Metanol			Sorbitol		
Temperatura	1 % (v/v)	0,85 % (v/v)	0,5 % (v/v)	0,5 M	1 M	1,5 M
20°C						
23°C						
26°C						

9 Conclusiones

- I. Mediante el análisis de cuatro bases datos se realizó una matriz de análisis de los diferentes estudios encontrados sobre la optimización de la producción de proteínas recombinantes en cepas de *Pichia pastoris* con delección en sus rutas de N-glicosilación. Se encontró que los factores involucrados en la optimización de estas cepas son la temperatura, el pH, la tasa de alimentación del metanol, la tasa de consumo de oxígeno, y el uso de inhibidores de proteasas.

- II. Los factores más influyentes en la producción de proteínas recombinantes en levaduras obtenidas mediante modificaciones en la ruta de N-glicosilación según los estudios encontrados fueron la concentración del metanol, la tasa de consumo de oxígeno y la temperatura.
- III. La estrategia teórica recomendada para el IEIM en la optimización de producción de proteínas recombinantes empleando la cepa *Pichia pastoris* NRRLY11430/ Δ OCH1 es mantener una temperatura de cultivo en la fase de inducción entre 20 °C y 26 °C, un pH de 5 a 7, una concentración de metanol entre 0,5 % (v/v) y 1 % (v/v) - co-alimentada con sorbitol de 0,5 M- 1,5 M y una suplementación con sulfato de amonio en el medio de 10 g/L durante 96 horas de inducción.

10 Recomendaciones

- I. Respecto a la búsqueda de información se recomienda ampliar la búsqueda considerando patentes
- II. Ampliar la ventana de tiempo de la búsqueda a estudios hechos antes del 2010 y con otras cepas de levaduras con maquinaria metabólica similar para conocer otros aspectos importantes que posiblemente en *Pichia pastoris* aún no hayan sido evaluados.
- III. Evaluar experimentalmente las condiciones recomendadas para la cepa *Pichia pastoris* NRRLY11430/ Δ OCH1 para la producción de diferentes proteínas recombinantes, con el objetivo de determinar el rol de estos factores en la producción de dichas proteínas.
- IV. Evaluar otras opciones de cosustratos que tuvieron resultados exitosos en *Pichia pastoris* WT en las cepas de *Pichia pastoris* con la ruta N-glicosilación alterada.

11. Referencias

1. Del EI, A JFC, Giugliani R, Pediatría D De, Las C. Inborn errors of metabolism. Rev medica Clinia Condes. 2015;26(4):483–6.
2. Fukao T, Nakamura K. Advances in inborn errors of metabolism. J Hum Genet [Internet]. 2019;64(2):65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-018-0535-7>
3. Serrano-rivero Y, Fando-calzada KMR. *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. Rev CENIC Ciencias Biológicas. 2016;47(2):67–77.
4. Akeboshi H, Chiba Y, Kasahara Y, Takashiba M, Takaoka Y, Ohsawa M, et al. Production of Recombinant α -Hexosaminidase A, a Potential Enzyme for Replacement Therapy for Tay-Sachs and Sandhoff Diseases, in the Methylophilic Yeast *Ogataea minuta*. Appl Environ Microbiol. 2007;73(15):4805–12.
5. Ali MJ, Venugopal A, Ranganath KS, Kumar NS. Lysosomal enzymes and mannose 6 - phosphate receptors in the lacrimal drainage system : Evidence and its potential implications. 2018;66(11):1595–9. Doi: 10.4103/ijo.IJO
6. Espejo-Mojica AJ, Mosquera A, Rodríguez-López A, Díaz D, Beltrán L, Hernandez FL, et al. Characterization of recombinant human lysosomal beta-hexosaminidases produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Univ Sci. 2016;21(3):195–217. Doi: 10.11144/Javeriana.SC21-3.corh
7. Rodríguez-López A, Pimentel-Vera LN, Espejo-Mojica AJ, Van Hecke A, Tiels P, Tomatsu S, et al. Characterization of Human Recombinant N-Acetylgalactosamine-6-Sulfate Sulfatase Produced in *Pichia pastoris* as Potential Enzyme for Mucopolysaccharidosis IVA Treatment. J Pharm Sci. 2019;108(8):2534–41. Doi: 10.1016/j.xphs.2019.03.034.
8. Pimentel N, Rodríguez-Lopez A, Díaz S, Losada JC, Díaz-Rincón DJ, Cardona C, et al. Production and characterization of a human lysosomal recombinant iduronate-2-sulfatase produced in *Pichia pastoris*. Biotechnol Appl Biochem. 2018;65(5):655–64. Doi: 10.1002/bab.1660
9. Mosquera A, Rodríguez A, Soto C, Leonardi F, Espejo A, Sánchez OF, et al.

Characterization of a recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *E. coli* for enzyme replacement therapy of Morquio A disease. *Process Biochem* [Internet]. 2012;47(12):2097–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.028>

10. Vu M, Li R, Baskfield A, Lu B, Farkhondeh A, Gorshkov K, et al. Neural stem cells for disease modeling and evaluation of therapeutics for Tay-Sachs disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):1–15. Doi : 10.1186/s13023-018-0886-3.
11. El-Baky NA, Redwan EM. Therapeutic alpha-interferons protein: Structure, production, and biosimilar. *Prep Biochem Biotechnol*. 2015;45(2):109–27. Doi: 10.1080/10826068.2014.907175
12. López EAR. Metabolic engineering of glycosylation and secretion pathways in *Pichia pastoris* and its application in production of the human recombinant enzyme n-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. Pontificia Universidad Javeriana; 2018.
13. Puentes-Tellez MA, Lerma-Barbosa PA, Garzón-Jaramillo RG, Suarez DA, Espejo-Mojica AJ, Guevara JM, et al. A perspective on research, diagnosis, and management of lysosomal storage disorders in Colombia. *Heliyon*. 2020;6(3).Doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03635
14. Garbade SF, Zielonka M, Mechler K, Kölker S, Hoffmann GF, Staufner C, et al. FDA orphan drug designations for lysosomal storage disorders - A cross-sectional analysis. *PLoS One*. 2020;15(4):1–13. Doi: 10.1371/journal.pone.0230898
15. Garzón Jaramillo RG. Evaluacion del efecto de la temperatura y la adición de sorbitol, 4-pba y ezetimiba sobre la produccion de la proteina recombinante N-Acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) en *Pichia Pastoris NRRLY-11430/ΔOCH1/His3*. Pontificia Universidad Javeriana; 2017.
16. Guo K, Zhou X, Chen X, Wu Y, Liu C, Kong Q. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism and genetic characteristics in a Chinese population. *Front Genet*. 2018;9(APR):1–7. Doi: 10.3389/fgene.2018.00122
17. Agana M, Frueh J, Kamboj M, Patel DR, Kanungo S. Common metabolic disorder (inborn errors of metabolism) concerns in primary care practice. *Ann Transl Med*. 2018;6(24):469–469. doi: 10.21037/atm.2018.12.34

18. Saudubray JM, Garcia-Cazorla À. Inborn Errors of Metabolism Overview: Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatr Clin North Am.* 2018;65(2):179–208. Doi: 10.1016/j.pcl.2017.11.002
19. Parenti G, Andria G, Valenzano KJ. Pharmacological chaperone therapy: Preclinical development, clinical translation, and prospects for the treatment of lysosomal storage disorders. *Mol Ther.* 2015;23(7):1138–48.
20. Barrera LA. La Terapia De Reemplazo Enzimático En El Tratamiento De Enfermedades Genéticas. *Univ Sci.* 2003;8(2):31–42.
21. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug- Induced Liver Injury. Enzyme replacement therapy. Bethesda Natl Inst Diabetes Dig Kidney Dis [Internet]. 2016;64(3):439. Doi: 10.1016/j.survophthal.2018.09.003
22. Rueda P. Proteínas Recombinantes, ¿Cómo y para qué? VLPs: un ejemplo interesante. *Revista Sociedad española de Bioquímica y Biología Molecular.* 2013;2. Doi: http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2013.07.1
23. Brondyk WH. Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009. p. 131–47. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63011-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63011-1)
24. Zhang N, Daubaras DL, Suen WC. Heterologous protein expression in yeasts and filamentous fungi. In: Z A, editor. *Handbook of Industrial Mycology.* New York; 2004. p. 667–88.
25. Ward OP. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2012;30(5):1119–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>
26. Liu B, Gong X, Chang S, Yang Y, Song M, Duan D, et al. Disruption of the *OCH1* and *MNN1* genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*. *J Biotechnol.* 2009;143(2):95–102. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.06.016

27. Suzuki R, Sakakura M, Mori M, Fujii M, Akashi S, Takahashi H. Methyl-selective isotope labeling using α -ketoisovalerate for the yeast *Pichia pastoris* recombinant protein expression system. *J Biomol NMR*. 2018;71(4):213–23. Doi: 10.1007/s10858-018-0192-3
28. Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangoan K, Suzara V V., Düzgüneş N, et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007;142(2):105–24.
29. Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, Figueroa CA, Pessoa A, Farías JG. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. Vol. 44, *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013. p. 1043–8. Doi: 10.1590/S1517-83822013000400004
30. Zahrl RJ, Peña DA, Mattanovich D, Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res*. 2017;17(7):1–15. Doi: 10.1093/femsyr/fox068
31. Xu G, Wu Y, Zhang Y, Fang W, Xiao Y, Fang Z. Role of N-glycosylation on the specific activity of a *Coprinopsis cinerea* laccase Lcc9 expressed in *Pichia pastoris*. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2019;128(5):518–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.05.004>
32. Dai M, Yu C, Fang T, Fu L, Wang J, Zhang J, et al. Identification and functional characterization of glycosylation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pichia pastoris*. *PLoS One*. 2015;10(12):1–15. Doi: 10.1371/journal.pone.0145419
33. Çalik P, Ata Ö, Güneş H, Massahi A, Boy E, Keskin A, et al. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. *Biochem Eng J*. 2015;95:20–36. Doi: 10.1016/j.bej.2014.12.003
34. Choi DB, Park EY. Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*. 2006;41(2):390–7. Doi: 10.1016/j.procbio.2005.06.020

35. Lambou K, Perkhofer S, Fontaine T, Latge J-P. Comparative functional analysis of the OCH1 mannosyltransferase families in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* [Internet]. 2010 Jun 28;27(8):625–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.1798>
36. Wang Y, Gong X, Chang SH, Liu B, Song M, Huang HH, et al. A *Pichia pastoris* with α -1,6-mannosyltransferases Deletion and Its Use in the Expression of HSA/GM-CSF Chimera. *Chin J Biotechnol*. 2007;23(5):907–14. Doi: 10.1016/S1872-2075(07)60056-9
37. Nett JH, Cook WJ, Chen MT, Davidson RC, Bobrowicz P, Kett W, et al. Characterization of the *Pichia pastoris* Protein-O-mannosyltransferase Gene Family. *PLoS One*. 2013;8(7):1–13. Doi: 10.1371/journal.pone.0068325
38. Yang J, Cai H, Liu J, Zeng M, Chen J, Cheng Q, et al. Controlling AOX1 promoter strength in *Pichia pastoris* by manipulating poly (dA:dT) tracts. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19831-y>
39. Eda ,Celik, Pınar ,Calık SGO. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. *Yeast*. 2009;26(July):473–84. Doi: 10.1002/yea
40. Theron CW, Berrios J, Delvigne F, Fickers P. Integrating metabolic modeling and population heterogeneity analysis into optimizing recombinant protein production by *Komagataella (Pichia) pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102(1):63–80. Doi: 10.1007/s00253-017-8612-y
41. Khatri NK, Hoffmann F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*. 2006;93(5):871–9. Doi: 10.1002/bit.20773
42. Whitaker S. Differential toxicity caused by methanol on the growth of *Pichia pastoris* cultures in solid-state and in submerged fermentation. *Rev Mex Ing Química*. 2017;16(3):735–43.
43. Berrios J, Flores MO, Díaz-Barrera A, Altamirano C, Martínez I, Cabrera Z. A comparative study of glycerol and sorbitol as co-substrates in methanol-induced cultures of *Pichia pastoris*: temperature effect and scale-up simulation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2017;44(3):407–11.

44. Gmeiner C, Saadati A, Maresch D, Krasteva S, Frank M, Altmann F, et al. Development of a fed-batch process for a recombinant *Pichia pastoris* Δ *pichia pastoris* strain expressing a plant peroxidase. *Microb Cell Fact*. 2015;14(1). Doi: 10.1007/s10295-016-1895-7
45. Wang B, Nesbeth D, Keshavarz-Moore E. Sorbitol/methanol mixed induction reduces process impurities and improves centrifugal dewatering in *Pichia pastoris* culture. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. 2019;130(June):109366. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109366>
46. Wurm DJ, Spadiut O. Efficient development of a mixed feed process for *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol*. 2019;1923:323–33. Doi: 10.1007/978-1-4939-9024-5_15
47. Eskitoros MS, Çalik P. Co-substrate mannitol feeding strategy design in semi-batch production of recombinant human erythropoietin production by *Pichia pastoris*. *J Chem Technol Biotechnol*. 2014;89(5):644–51. Doi : 10.1002/jctb.4177
48. Benz GT. Bioreactor Design for Chemical Engineers. *CEP Mag* [Internet]. 2011;(August):21–6. Available from: <http://d.umn.edu/~rdavis/courses/che4601/notes/BioreactorDesignForChEs.pdf>
49. Jungo C, Schenk J, Pasquier M, Marison IW, von Stockar U. A quantitative analysis of the benefits of mixed feeds of sorbitol and methanol for the production of recombinant avidin with *Pichia pastoris*. *J Biotechnol*. 2007;131(1):57–66. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.019
50. Shen B, Hohmann S, Jensen RG, Bohnert HJ. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiol*. 1999;121(1):45–52. Doi: 10.1104/pp.121.1.45
51. Prabhu AA, Mandal B, Dasu VV. Medium optimization for high yield production of extracellular human interferon- γ from *Pichia pastoris*: A statistical optimization and neural network-based approach. *Korean J Chem Eng*. 2017;34(4):1109–21. Doi: 10.1007/s11814-016-0358-
52. Prabhu AA, Venkata Dasu V. Dual-substrate inhibition kinetic studies for recombinant human interferon gamma producing *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotechnol* [Internet]. 2017;47(10):953–62. Available from:

<https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1350977>

53. Paulová L, Hyka P, Branská B, Melzoch K, Kovar K. Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut +. J Biotechnol [Internet]. 2012;157(1):180–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.010>
54. Jin H, Liu G, Ye X, Duan Z, Li Z, Shi Z. Enhanced porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. Biochem Eng J [Internet]. 2010;52(1):91–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.009>
55. Li GY, Fu M, Qin M, Xue LM. High Expression of Human Cathepsin S by Recombinant *Pichia pastoris* with Cod Skin as an Organic Co-Nitrogen Source. J Mol Microbiol Biotechnol. 2018;27(6):363–70. Doi: 10.1159/000486395
56. Rumiantsev AM, Padkina M V., Sambuk E V. Effect of nitrogen source on gene expression of first steps of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*. Genetika. 2013;49(4):454–60. Doi: 10.7868/S0016675813040115
57. Kaushik N, Rohila D, Arora U, Raut R, Lamminmäki U, Khanna N, et al. Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. BMC Biotechnol [Internet]. 2016;16(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-016-0243-3>
58. Ye J, Ly J, Watts K, Hsu A, Walker A, Mclaughlin K, et al. Optimization of a glycoengineered *Pichia pastoris* cultivation process for commercial antibody production. Biotechnol Prog. 2011;27(6):1744–50. Doi: 10.1002/btpr.695
59. Kim S, d'Anjou M, Lanz KJ, Evans CE, Gibson ER, Olesberg JT, et al. Real-time monitoring of glycerol and methanol to enhance antibody production in industrial *Pichia pastoris* bioprocesses. Biochem Eng J [Internet]. 2015;94:115–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.12.002>
60. Katla S, Karmakar B, Tadi SRR, Mohan N, Anand B, Pal U, et al. High level extracellular production of recombinant human interferon alpha 2b in glycoengineered *Pichia pastoris*: culture medium optimization, high cell density cultivation and biological characterization. J Appl Microbiol. 2019;126(5):1438–53. Doi: 10.1111/jam.14227

61. Katla S, Pavan SS, Mohan N, Sivaprakasam S. Biocalorimetric monitoring of glycoengineered *P. pastoris* cultivation for the production of recombinant hulfN α 2b: A quantitative study based on mixed feeding strategies. *Biotechnol Prog.* 2020; Doi: 10.1002/btpr.2971
62. Luley-Goedl C, Czabany T, Longus K, Schmölzer K, Zitzenbacher S, Ribitsch D, et al. Combining expression and process engineering for high-quality production of human sialyltransferase in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol.* 2016;235:54–60. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.046
63. Berdichevsky M, d'Anjou M, Mallem MR, Shaikh SS, Potgieter TI. Improved production of monoclonal antibodies through oxygen-limited cultivation of glycoengineered yeast. *J Biotechnol [Internet].* 2011;155(2):217–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.021>
64. Solano Galarza AD. Produccion de dos hexominidasas recombinantes en *Pichia pastoris* NRRLY-11430 NATIVA y NRRLY-11430/ Δ OCH1 regulada bajo el promotor AOX1. Pontificia Universidad Javeriana; 2019.
65. Capone S, Ćorajević L, Bonifert G, Murth P, Maresch D, Altmann F, et al. Combining protein and strain engineering for the production of Glyco-engineered horseradish peroxidase C1A in *Pichia pastoris*. *Int J Mol Sci.* 2015;16(10):23127–42. Doi: 10.3390/ijms161023127
66. Gupta SK, Shukla P. Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(24):10457–68. Doi: 10.1007/s00253-018-9430-6
67. Krainer FW, Gmeiner C, Neusch L, Windwarder M, Pletzenauer R, Herwig C, et al. Knockout of an endogenous mannosyltransferase increases the homogeneity of glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. *Sci Rep.* 2013;3. Doi: 10.1038/srep03279
68. García-Ortega X, Cámara E, Ferrer P, Albiol J, Montesinos-Seguí JL, Valero F. Rational development of bioprocess engineering strategies for recombinant protein production in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) using the methanol-free GAP promoter. Where do we stand? *N Biotechnol [Internet].* 2019;53(June):24–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.06.002>

69. Rincon N. Análisis del estrés oxidativo en modelos de MPS IVA como indicador de la respuesta celular al tratamiento con la proteína recombinante GALNS producida en *Pichia pastoris* Δ OCH1-GALNS-SUMF1. Pontificia Universidad Javeriana; 2020.

12. Anexos

12.1. Matriz de análisis del segundo filtro de análisis (17 artículos).

Número de artículo	Título	Autores	Tipo de artículo	Base de datos	Revista	Tema central	Año	Modificación	Estrategia tenían	Proteína	Resultado	Escala	País
1	Optimization of a Glycoengineered Pichia pastoris Cultivation Process for Commercial Antibody Production	Jianxin Ye, Jeffrey Ly, Kathryn Watts, Amy Hsu, Andre Walker, Kathleen McLaughlin, and Marina Berdichevsky	Artículo (revisar la referencia No. 17 del artículo para información de la cepa)	Pubmed	Biotechnology and progress	Aumentar la producción de anticuerpos en Pichia pastoris con glicoingeniería	2011	cepa de P. pastoris glicoingeniería que es capaz de producir el N-glicano Gal2GlcNAc2Man3	Aumentar el tiempo de inducción con metanol pasar de 72 h a 140 H	Anticuerpos	Hubo un aumento en la producción	1,200 L y 500 L	Estados Unidos*
2	Improved Production of Monoclonal Antibodies Through Oxygen-Limited Cultivation of Glycoengineered Yeast	Marina Berdichevsky 1, Marc d'Anjou, Muralidhar R Mallem, Seemab S Shaikh, Thomas I Potgieter	Artículo (revisar el artículo de (Potgieter et al., 2009) sobre información de la cepa)	Pubmed	Journal of Biotechnology y	Un proceso de producción con cantidad de oxígeno limitado aumenta la producción de proteínas	2011	Cepa Pichia pastoris Mut + glicoingeniería	El proceso se basó en la alimentación pulsada, se descubrió que el metanol y su productividad dependen de la concentración biomasa y disponibilidad de oxígeno. a tasa de absorción de oxígeno se utilizó como un parámetro de escala para demostrar la consistencia del proceso entre la escala de laboratorio de 3 L y el fabricante piloto de 1200 L	Anticuerpos	La concentración final de mAb fue L-1. aumentó de 1.2 a 1.9 g La limitación de oxígeno también mejoró Composición de N-glicano, galactosilación y fragmentación que todos demostraron depender de la tasa de consumo de oxígeno	3 L, 30 L y 300 L	Estados Unidos*
3	A dynamic method based on the specific substrate uptake rate to set up a feeding strategy	Christian Dietzsch, Oliver Spadiut, Christoph Herwig*	Artículo	Proquest	Microbial Cell Factories	Las tasas de absorción de sustrato dieron como resultado una mayor productividad específica	2011	El fenotipo de la cepa correspondió a un clon deficiente en AOX1 que MutS se caracteriza	El contenido de proteína en el caldo de cultivo aumentó con el tiempo desde 0.052 mg / mL después de la fase de alimentación por	enzima rábano picante peroxidasa	la productividad fue directamente correlacionado con el tiempo de inducción para todos los experimentos con canalizado en este	7,5 L	Austria

	for Pichia pastoris							como (utilización lenta de metanol)	lotes con glucosa a 0.243 mg / mL al final del cultivo que fueron alrededor de 91 horas de inducción		estudio, incluso en los experimentos por lotes		
4	Pichia pastoris: protein production host and model organism for biomedical research	Brigitte Gasser ^{1,2} , Roland Prielhofer ¹ , Hans Marx ¹ , Michael Maurer ^{2,3} , Justyna Nocon ¹ , Matthias Steiger ^{1,2} , Verena Puxbaum ^{1,2} , Michael Sauer ^{1,2} & Diethard Mattanovich	Review	Pubmed	Future Microbiology		2013	Cepas de Pichia pastoris con rutas de n-glicosilación alterada no especifican mas	Para la producción recomienda la importancia de la botina en la preparación. Ellos resaltan que antes de empezar cualquier producción hay que saber si la línea celular si está produciendo la proteína en buena cantidad y calidad Varias técnicas de cultivo han sido adoptado para el cultivo de alto rendimiento de P. pastoris. Estos incluyen el cultivo en pozos de 24 platos o incluso conjuntos más pequeños			No aplica	Austria
5	A Dual-Mode Surface Display System for the Maturation and Production of Monoclonal Antibodies in Glyco-Engineered Pichia pastoris	Hussam H. Shaheen*, Bianka Prinz ^a , Ming-Tang Chen, Tej Pavoorn ^b , Song Lin, Nga Rewa Houston-Cummings, Renee Moore, Terrance A. Stadheim, Dongxing Zha	Articulo	Proquest	PLOS ONE		2013						Estados Unidos *

						la misma célula de levadura. Este paradigma aprovecha la homodimerización de la porción Fc de una molécula de IgG a un Fc "cebo" anclado en la superficie, lo que resulta en dirigir IgG "medias" funcionales a la pared celular de Pichia pastoris sin interferir con la secreción de longitud completa mAb.							
6	Fast development of Pichia pastoris GS115 Mut+ cultures employing batch-to-batch control and hybrid semi-parametric modeling	Ferreira, A R; Dias, J M; L; von Stosch, M; Clemente, J; Cunha, A E;	Artículo	Proquest		P. pastoris GS115 cepa que expresa una cadena sencilla fragmento de anticuerpo (scFv) determinando el tiempo óptimo Perfiles de temperatura, pH, alimentación de glicerol y metanol. alimentación que maximiza el título de punto final scFv. El primero modelo híbrido se identificó a partir de datos de seis experimentos realizados en un reactor piloto de 50 L.	2014					50 I	Portugal
7	Real-time monitoring of glycerol and methanol to enhance antibody production in industrial Pichia pastoris bioprocesses	Sehoon Kima,*, MarcdAnjoua, KayleeJ.Lanzb, ChristineE.Evansb, ElizabethR.Gibsonb, Jonathon T.Olesbergb, MuralidharMallema, IshaanShandila,	Artículo	EBSCO	Biochemical Engineering Journal	Determinar que afecta más el modo de operación (metanol limitado u oxígeno limitado)	2015			Anticuerpos			Estados Unidos *

		Adam Nylena, Edwin J. Koerperickb, Daniel W. Cooleyb, Gregory A. Browerb, Gary W. Smallb, Mark A. Arnoldb											
8	Combining Protein and Strain Engineering for the Production of Glyco-Engineered Horseradish Peroxidase C1A in <i>Pichia pastoris</i>	Simona Capone 1, Lejla Corajević 1, Günther Bonifert 1, Patrick Murth 1, Daniel Maresch 2, Friedrich Altmann 2, Christoph Herwig 1 and Oliver Spadiut	Artículo	Proquest	International Journal of Molecular Sciences	Conocer la productividad de las peroxidases en una cepa mutada en su ruta de n-glicosilación tanto como en la parte de la construcción molecular como en el cultivo	2015	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> con el OCH1 deletado	En el presente estudio, combinaron ingeniería de proteínas y (2) ingeniería de cepas para obtener un Variante de HRP estable y activa con glicosilación superficial reducida y más homogénea. se combinaron las cuatro mutaciones que identificamos como beneficiosas para la actividad catalítica o estabilidad	Peroxidasa	Los investigadores afirman que la el mejoramiento de la producción en <i>Pichia</i> no es solo una construcción molecular, sino el cultivo y sus condiciones afectan mucho a la cepa. Respecto a la producción afirman que cuando se trabaja con estas cepas seleccionadas para la producción de peroxidasa lo mejor es temperaturas inferiores a 30 siendo una gran diferencia a una cepa WT	5 L	Austria *
9	Development of a fed-batch process for a recombinant <i>Pichia pastoris</i> Δoch1 strain expressing a plant peroxidase	Christoph Gmeiner1, Amirhossein Saadati1, Daniel Maresch2, Stanmore Krasteva1, Manuela Frank1, Friedrich Altmann2, Christoph Herwig1 and Oliver Spadiut1	Artículo	EBSCO	Microbio Cell Factores	En el presente estudio, investigamos los efectos de los 3 parámetros del proceso: temperatura, pH y oxígeno disuelto. concentración en 1) fisiología celular, 2) morfología celular, 3) lisis celular, 4) productividad y 5) pureza del producto cepa recombinante och1 de forma multivariante.	2015	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> con el OCH1 deletado	Es la continuidad del estudio anterior hablado, evaluaron diferentes temperaturas, pH y oxígeno disuelto	Peroxidasa	El mejor pH para producción de esta enzima fue pH 5, temperatura de 20 grados y oxígeno disuelto del 10%	5 L	Austria *

10	Combining expression and process engineering for high-quality production of human sialyltransferase in <i>Pichia pastoris</i>	Christiane Luley-Goedla, Tibor Czabanyb, Karin Longusb, Katharina Schmölzera, Sabine Zitzenbachera, Doris Ribitscha, Helmut Schwabc, Bernd Nidetzky	Review	Pubmed	Journal of Biotechnology	Un protocolo de alimentación mixta de glicerol / metanol para <i>P. pastoris</i>	2016	<i>P. pastoris</i> KM17H	sialiltransferasa humana	El crecimiento y la inducción de <i>pastoris</i> fueron clave para la producción de enzimas con alto rendimiento y calidad. Se recuperó del cultivo de biorreactor con un rendimiento del 70% utilizando un solo paso de intercambio aniónico cromatografía Su actividad específica fue de 0,05 unidades / mg de proteína.	Austria*	
11	Enhanced truncated-t-PA (CT-b) expression in high-cell-density fed-batch cultures of <i>Pichia pastoris</i> through optimization of a mixed feeding strategy by response surface methodology	Mohammad Reza Kazemali1 • Keivan Majidzadeh2 • Soroush Sardari1 • Amir Hossein Saadati1 • Farzaneh Barkhordari1 • Ahmad Adeli1 • Fereidoun Mahboudi1 • Amir Maghsoudi	Articulo	Proquest	Bioprocess Biosyst Eng	El objetivo del presente estudio fue investigar y optimizar la alimentación conjunta de glicerol y metanol para lograr máxima expresión de t-PA en <i>P. pastoris</i> fed-batch cultivos con tasa de crecimiento específico constante.	2016	<i>A. P. pastoris</i> GS115 (Mut? his-)	Los experimentos fueron diseñados por la metodología de superficie de respuesta, considerando las tasas de alimentación específicas de metanol y glicerol como variables independientes. En cada experimento el glicerol y el metanol se alimentaron de acuerdo con un predeterminado minado ecuación para mantener una tasa de crecimiento específica constante.	Se encontró que con la alimentación de glicerol para mayor especificidad tasas de crecimiento, las propiedades inhibitorias del glicerol son más pronunciado, mientras se alcanza el mejor nivel de expresión cuando la relación del glicerol a la del metanol era alrededor de 1.67. En todas las tasas de crecimiento específicas probadas, casi un proporción similar de la tasa de alimentación de glicerol específica a la de	Irán	
12	The growth of <i>Pichia pastoris</i> Mut+ on methanol-	Christian Canales1,2 · Claudia Altamirano1 · Julio Berrios1	Articulo	Pubmed	Bioprocess and Biosystems Engineering	La cinética está modulada por la co-metabolización del glicerol, lo que resulta en un	2018	<i>P. pastoris</i> Mut+ X-33 containing the vector pPICZαA-ROL	ROL	La alimentación de mezclas de metanol-glicerol es una estrategia que puede	Modelado basado en la cinética de mejora interactiva predice correctamente el	Chile

	glycerol mixtures fits to interactive dual-limited kinetics: model development and application to optimized fed-batch operation for heterologous protein production					efecto potenciador de la tasa de crecimiento específico del glicerol. El enfoque de modelado de cultivos de lotes alimentados también incluyó la volatilización de metanol causada por la aireación que se encontró ser un fenómeno no despreciable			mejorar la productividad de la producción de proteínas heterólogas mediante el movimiento ascendente el crecimiento específico óptimo tasa de productividad específica de proteínas que se obtiene en positivamente valores μ bajos (0.02–0.03 h ⁻¹) cuando se usa metanol solamente en alimentaciones		tendencias generales de la producción de biomasa y ROL, el consumo de sustratos metanol-glicerol y variación de μ en un rango estrecho con una clara tendencia al valor de interés (0.05 h ⁻¹) en la operación de alimentación por lotes		
13	Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins	Sanjeev K. Gupta ¹ & Pratyosh Shukla	Review	Proquest	Applied Microbiology and Biotechnology	Esta revisión resume las tecnologías recientes utilizadas para mejorar la composición de glucanos de bioterapéutica, centrándose principalmente en la selección de un huésped de expresión apropiado, la glicoingeniería y la optimización del proceso para controlar la glucosilación de proteínas y, por tanto, mejorar la actividad biológica con menos efectos secundarios Aquí, también sugerimos varios enfoques tales como la selección del huésped y el cion para lograr la	2018	Cepa de pichia pastoris con el OCH1 deleccionado	Hay varios parámetros en la optimización como: Alta cantidad de oxígeno disuelto, Co2 Disuelto, Amino ácidos y sales, Baja temperatura, Bajo pH, Osmolaridad, Acumulación de ácido láctico.	No habla de ninguna en específico	La composición de glicosilación de una proteína terapéutica. puede estar muy influenciado por el medio y composición del alimento y parámetros del proceso de cultivo celular	No aplica	India *

						glucosilación esperada en una proteína recombinante.							
14	Glycoengineering of antibody (Herceptin) through yeast expression and in vitro enzymatic glycosylation	Chiu-Ping Liua,b, Tsung-I. Tsaic, Ting Chenga, Vidya S. Shivatara, Chung-Yi Wua,1, Chung-Yi Wua,2, and Chi-Huey Wonga	Artículo (No hablan de optimización)	Pubmed	PNAS	En este estudio, demostramos que el mAb trastuzumab expresado en glicoingeniería P. pastoris puede ser remodelado a través de la desglicosilación por endoglicosidasas identificado a partir de la base de datos de enzimas activas de carbohidratos y a través de la transglucosilación utilizando glucanos	2018	Cepa de pichia pastoris con el OCH1 delecionado					Taiwán
15	Influence of carbon source on cell size and production of anti LDL (-) single-chain variable fragment by a recombinant Pichia pastoris strain	Cesar Andres Diaz Arias1 · João Vitor Dutra Molino1 · Daniela de Araújo Viana Marques2 · Andrea Queiroz Maranhão3 · Dulcinea Abdalla Saes Parra4 · Adalberto Pessoa Junior1 · Attilio Converti	Artículo	Proquest	Molecular Biology Reports	El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la fuente de carbono (glicerol, sacarosa, glucosa o una mezcla de sacarosa / glucosa) sobre la producción del fragmento variable de cadena simple (scFv) anti LDL (-) por el recombinante Pichia pastoris SMD 1168 tensión, así como en el tamaño de la célula. El uso de glucosa como fuente de carbono en la fase de crecimiento condujo a un aumento notable en la célula.	2019	Cepa de pichia pastoris con el OCH1 delecionado	El presente trabajo se centró principalmente en la influencia de la tipo de fuente de carbono en el tamaño de las células de un recombinante Cepa de P. pastoris que produce el anti LDL (-) scFv.	Estos resultados demuestran que la sacarosa es la mejor fuente de carbono para la expresión de dicho anticuerpo fragmento por el recombinante P. pastoris cepa, que puede ser muy útil para el análisis de diagnóstico de la llamada "mala colesterol"		Brasil	

						tamaño en comparación con el glicerol, mientras que las células más pequeñas se obtuvieron con sacarosa probablemente debido a la aparición de un energético estrés.						
16	High level extracellular production of recombinant human interferon alpha 2b in glycoengineered Pichia pastoris: culture medium optimization, high cell density cultivation and biological characterization	S. Katla1, B. Karmakar1, S.R.R. Tadi1, N. Mohan1, B. Anand2, U. Pal3 and S. Sivaprakasam1	Articulo	Pubmed	Journal of Applied Microbiology	El presente estudio tuvo como objetivo el diseño de experimentos (DoE) - y basado en inteligencia artificial cultura medio mejoramiento para alto nivel Producción extracelular de un nuevo interferón humano recombinante alfa 2b (huIFNa2b) en Pichia pastoris con glicoingeniería y su caracterización	2019	Cepa de pichia pastoris con el OCH1 delecionado	alimentación mixta a base de sorbitol	Interferón Humano 2B	La optimización del medio de cultivo resultó en una producción mejorada de huIFNa2b en P. pastoris glicoingeniería tanto en matraz de agitación como en nivel biorreactor	India *
17	Biocalorimetric monitoring of glycoengineered P. pastoris cultivation for the production of recombinant huIFNa2b: A quantitative study based on mixed feeding strategies	Srikanth Katla1, Satya Sai Pavan1, Naresh Mohan1, Senthilkumar Sivaprakasam1	Articulo	Pubmed	American Institute of Chemical Engineers	El presente estudio se centra en la influencia de los sustratos de carbono de alimentación mixta. Durante las fases de inducción del cultivo de P. pastoris con glicoingeniería, para recombinante Producción de huIFNa2b (interferón humano a2b)	2020	Cepa de pichia pastoris con el OCH1 delecionado	alimentación mixta a base de sorbitol y glicerol	Interferón Humano 2B	resultó en un título mejorado de huIFNa2b de 288 mg / L al canalizar predominantement e metanol hacia un funcionamiento óptimo del sistema de expresión AOX.	India *

					<p>empleando parámetros como calorimetría (calor biológico) Velocidad,) y mediciones espirométricas (NUESTRO y CER). Flujo de alimentación mixta de carbono sustratos (metanol + glicerol, metanol + sorbitol) a una "relación molar C" predeterminada fueron añadidos durante las fases de inducción. Metanol</p>							
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--