(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 727 530**

(51) Int. CI.:

C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2014 PCT/US2014/049159**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15020876**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2014 E 14756146 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3030661**

(54) Título: **Aumento de la expresión de un transgén en células eucariotas mediante la reducción del ARN de interferencia**

(30) Prioridad:

08.08.2013 US 201361863829 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2019

(73) Titular/es:

DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

(72) Inventor/es:

MIASNIKOV, ANDREI

(74) Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aumento de la expresión de un transgén en células eucariotas mediante la reducción del ARN de interferencia

CAMPO TÉCNICO

[0001] Se han descrito procedimientos para el aumento de la expresión de un transgén en células eucariotas mediante la reducción del ARN de interferencia (ARNi), así como variantes de células producidas mediante el procedimiento. Los procedimientos y variantes de células son útiles, por ejemplo, para la producción eficaz de polipéptidos terapéuticos e industriales en células eucariotas.

REFERENCIAS

[0002]

Fire, A. *et al*. (1998). Nature 391:806-11.
Fulci, V. and Macino, G. (2007) Current Opinion in Microbiology 10:199-203.
Janus, D. *et al*. (2009) Microbiology 155:3946-56.
Nakayashiki, H. (2005) FEBS Letters 579:5950-57.
Brody, H. yMaiyuran, S. (2009) Industrial Biotechnology 5:53-60.
McGinnis, K. (2009) Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize 526:91-99.

ESTADO DE LA TÉCNICA

[0003] El ARN de interferencia (ARNi) es un fenómeno por el cual las moléculas de ARN inhiben la expresión génica. El ARNi se da cuando un ARNm, normalmente transcrito a partir de un transgén, se transforma en ARN bicatenario (ARNbc) mediante una polimerasa de ARN dependiente de ARN (PAda). El ARNbc se convierte en un sustrato para las proteínas de tipo Dicer, que cortan el ARNbc en ARNbc de interferencia pequeños (ARNip) de alrededor de 25 nucleótidos o más cortos. El ARNip se incorpora a un complejo de silenciamento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), que modifica y degrada ARNm de trangén adicional de manera de secuencia específica a partir de la secuencia del ARNip particular. El resultado es una expresión reducida del transgén, así como genes endógenos con secuencias nucleotídicas suficientemente similares a ese transgén. El fenómeno se describió por primera vez en Fire y Mello en *Caenorhabditis elegans* (Fire, A. *et al*. (1998). Nature 391:806-11).

[0004] El ARNi se da en una amplia variedad de células eucariotas y tiene diversos nombres, incluidos cosupresión, silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) y extinción. El término extinción normalmente se reserva para el ARNi en biología molecular fúngica. Algunos hongos pueden presentar una respuesta a la extinción fuerte, mientras que otros presentan una respuesta débil o ninguna respuesta en absoluto. La extinción se describió, por primera vez, en *Neurospora* a principios de los años 90 (Romano, N. *et al*. (1992) Mol. Microbiol. 6:3343-53).

Cogoni *et al*. (P.N.A.S., EE. UU., 94:10233-10238, 1997) describe mutantes defectivos en la extinción (*qde*, por sus siglas en inglés) perjudicados en el silenciamiento génico postranscripcional inducido por transgén en *Neurospora crassa.*

Tabara *et al*. (Cell, 99: 123-132, 1999) describe estudios de ARNi llevados a cabo en *Candida. elegans.* WO 00/50581 se refiere a la caracterización de una proteína *Neurospora crassa* que presenta actividad de silenciamiento génico

WO 00/32785 describe la proteína *Neurospora crassa* con actividad de silenciamiento génico que presenta un dominio de helicasa recQ.

WO 01/29058 se refiere a genes implicados en ARN de interferencia bicatenario (genes de vía ARNi) se identifican y se utilizan para investigar la vía de ARNi.

Catalanotto *et al*. (Molecular Cell Biology , Mar 2004, p.2536-2545) describe un estudio sobre la función de *dcl-1* y *dcl-2*.

SUMARIO

[0005] En consecuencia, en un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para aumentar el nivel de expresión de un transgén en células fúngicas, que comprende:

la introducción de una alteración genética en las células fúngicas, reduciendo dicha alteración genética la cantidad de ARN de interferencia en las células en comparación con la cantidad de ARN de interferencia en ausencia de la alteración genética, donde la alteración genética comprende una interrupción de los genes de tipo Dicer *dcl-1* y *dcl-2;* y

introducir el transgén para la expresión de una proteína de interés en las células.

[0006] La alteración genética puede reducir o evitar la formación de ARNip en las células.

[0007] La interrupción del gen puede deberse a la mutagénesis del gen.

[0008] La interrupción del gen puede llevarse a cabo mediante la utilización de recombinación específica del sitio y/o la interrupción del gen puede llevarse a cabo en combinación con la introducción de un marcador de selección en el locus genético del gen.

[0009] Las células pueden producir considerablemente la misma cantidad de proteína total por cantidad unitaria de biomasa en comparación con la cantidad de proteína por cantidad unitaria de biomasa producida por células equivalentes que carecen de la alteración genética.

[0010] Las células fúngicas pueden ser células fúngicas filamentosas.

[0011] Las células fúngicas filamentosas pueden ser células de especie Pezizomycotina. Las células fúngicas filamentosas pueden ser células de *Trichoderma reesei.*

[0012] El procedimiento puede comprender además la introducción de una copia adicional del transgén en las células, donde los niveles de expresión del transgén después de la introducción de la copia adicional del transgén en las células no son inferiores a los niveles de expresión del transgén antes de introducir la copia adicional del transgén en las células.

[0013] El transgén que codifica la proteína de interés puede estar presente en las células antes de introducir la alteración genética que reduce o evita el ARN de interferencia o el transgén que codifica la proteína de interés se introduce en las células después de introducir la alteración genética que reduce o evita el ARN de interferencia.

[0014] La etapa de aumentar el nivel de expresión de un transgén en células fúngicas puede comprender:

introducir el transgén en un locus de un gen asociado a ARN de interferencia, donde la introducción del transgén interrumpe el gen asociado a ARN de interferencia y reduce la cantidad de ARN de interferencia en las células fúngicas, de tal forma que aumenta el nivel de expresión del transgén en comparación con el de las células fúngicas en las que el gen asociado a ARN de interferencia está intacto.

[0015] En otro aspecto, la invención da a conocer variantes de células fúngicas derivadas de células fúngicas parentales, comprendiendo las variantes de células fúngicas una alteración genética que hace que las variantes de células fúngicas presenten ARN de interferencia reducido en comparación con las células fúngicas parentales y un transgén que codifica una proteína de interés, donde la alteración genética comprende la interrupción de los genes que codifican las proteínas de tipo Dicer DCL1 y DCL2,

donde, en comparación con las células fúngicas parentales, las variantes de células fúngicas son capaces de producir niveles más elevados de la proteína de interés codificada por el transgén, y/o donde las variantes de células fúngicas presentan niveles de expresión medios superiores de la proteína de interés codificada por el transgén tras la tranformación del transgén,

donde las variantes de células fúngicas producen considerablemente la misma cantidad de proteína por cantidad unitaria de biomasa en comparación con la cantidad de proteína por cantidad unitaria de biomasa producida por células fúngicas equivalentes que carecen de la alteración genética.

[0016] La interrupción puede ser la mutagénesis del gen; y/o la interrupción puede ser la deleción parcial o completa del gen; y/o la interrupción del gen puede llevarse a cabo con recombinación específica del sitio; y/o la interrupción del gen puede llevarse a cabo en combinación con la introducción de un marcador de selección en el locus genético del gen.

[0017] Las variantes de células pueden comprender también una pluralidad de copias de un transgén que codifica una proteína de interés.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018]

La figura 1 es un esquema de un casete de interrupción de diseño estándar. En *T. reesei,* la longitud de las regiones flanqueadoras 5' y 3' es de 1-1,5 kb, y la longitud de la región de repetición es de 0,5-0,7 kb.

La figura 2 es un esquema de la región cromosómica de *T. reesei* que contiene el gen *dcl*1. Se indican las dos regiones flanqueadoras *del*1y la región de repetición *del*1. Se muestra el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) correspondiente a la proteína ID 69494 en la base de datos Trire 2.0 y el ORF corregido

hipotético con una extensión terminal 5' al codón ATG más cercano. Se indican sitios de recocido para cebadores de amplificación.

La figura 3 es un esquema de la región cromosómica de *T. reesei* que contiene el gen *del*2. Se indican las dos regiones flanqueadoras *del*2 y la región de repetición *del*2. También se muestra el ORF correspondiente a la proteína ID 79823 en la base de datos Trire 2.0. Se indican sitios de recocido para cebadores de amplificación.

Las figuras 4A y 4B son esquemas de la región cromosómica *del*1 de *T. reesei* tras la interrupción génica (4A) y tras la excisión del gen marcador *pyr2* (4B). Se indican sitios de recocido para los cebadores utilizados para cartografiar las deleciones.

Las figuras 5A y 5B son esquemas de la región cromosómica *del*2 de *T. reesei* tras la interrupción génica (5A) y tras la excisión del gen marcador *pyr2* (5B). Se indican sitios de recocido para los cebadores utilizados para cartografiar las deleciones.

La figura 6 es un gráfico de barras en el que se muestran los niveles de actividad de aminopeptidasa Y (APY) medida en transformantes individuales de las dos cepas *T. reesei*, es decir, DiMorph (manipulado para reducir el ARNi) y CelluLight (tipo salvaje con respecto al ARNi). Ambas cepas fueron transformadas con el mismo fragmento de ADN que contenía el casete de expresión APY. Se midió la actividad en un conjunto aleatorio de transformantes. Cada barra representa la actividad de APY detectada en un solo clon. La información está ordenada desde la actividad más baja hasta la más alta (por separado para cada una de las dos cepas).

La figura 7 muestra los resultados del análisis SDS-PAGE de la expresión de APY en los transformantes DiMorph y CelluLight. Los sobrenadantes de cultivo fueron separados mediante SDS-PAGE y se tiñeron con el reactivo SIMPLYBLUE™ (Invitrogen). Cada pocillo representa un solo transformante (en orden aleatorio).

La figura 8 es un gráfico de barras en el que se muestran los niveles de actividad de tripeptidasa aminopeptidílica (3PP) medida en los transformantes individuales DiMorph y CelluLight que contienen el casete de expresión 3PP. Se midió la actividad en un conjunto aleatorio de transformantes. Cada barra representa la actividad de 3PP detectada en un solo clon. La información está ordenada desde la actividad más baja hasta la más alta (por separado para cada una de las dos cepas).

La figura 9 es un gráfico de barras en el que se muestran los niveles de la actividad de APY medida en los transformantes individuales DiMorph y CelluLight después de dos series de transformación con casetes de expresión de APY que utilizan dos marcadores diferentes. Cada barra (excepto las dos barras del lado derecho del gráfico) representa un solo transformante de la segunda serie. Las dos barras de la derecha representan los mejores transformantes de serie úncia de las cepas CelluLight y DiMorph, que se utilizaron como huéspedes de transformación para la segunda serie de transformación.

La figura 10 es un gráfico de barras en el que se muestran los niveles de la actividad de 3PP medida en los transformantes individuales DiMorph y CelluLight después de dos series de transformación con casetes de expresión de 3PP que utilizan dos marcadores diferentes. Cada barra (excepto las dos barras del lado derecho del gráfico) representa un solo transformante de la segunda serie. Las dos barras de la derecha representan los mejores transformantes de la serie única de las cepas CelluLight y DiMorph, que se utilizaron como huéspedes de transformación para la segunda serie de transformación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Resumen

[0019] Se describen procedimientos para el aumento de la expresión de transgenes en células eucariotas mediante la interrupción de su mecanismo de ARN de interferencia (ARNi), así como cepas de células producidas mediante dicho procedimiento. Si bien el mecanismo de ARNi se ha analizado en las células eucariotas durante algunos años, y el ARNi se ha utilizado para silenciar a propósito la expresión génica no deseada, la interrupción del ARNi para mejorar la expresión de los transgenes no se ha descrito hasta la fecha. Los presentes procedimientos y células son útiles para la expresión de cualquier número de proteínas de interés industriales y farmacéuticas.

II. Definiciones

[0020] Antes de describir las presentes cepas y los procedimientos en detalle, se definen los siguientes términos por motivos de claridad. A los términos que no se definen se les debería otorgar su significado normal tal y como se utiliza en la técnica pertinente.

[0021] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "ARN de interferencia", abreviado como "ARNi", se refiere ampliamente a un mecanismo de silenciamiento génico por ARN en las células eucariotas. El ARNi da lugar a una expresión reducida de un subconjunto de proteínas expresadas en una célula eucariota. El ARNi

también se denomina "cosupresión" en el campo de la biología molecular vegetal y "extinción" en el campo de la biología molecular fúngica. El ARNi se describe en detalle en la referencia citada en la presente memoria.

[0022] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "extinción" se refiere a silenciamiento génico por ARN en los hongos. La extinción se describe en detalle en la referencia citada en la presente memoria.

[0023] Tal y como se utiliza en la presente memoria, un "transgén" es un gen exógeno que se introduce en un organismo huésped. Los transgenes pueden introducirse mediante transfección, transformación, transducción o infección y, preferiblemente, se integran en el cromosoma de la célula huésped. Los transgenes normalmente codifican proteínas de interés, tales como proteínas industrial o farmacéuticamente importantes. Un transgén puede codificar una proteína que no es expresada normalmente por la célula huésped o que es expresada normalmente por la célula huésped. En el último caso, el transgén puede incluso ser el mismo que un gen presente de forma natural en la célula huésped. No obstante, los transgenes son exógenos y pueden introducirse en las células huésped mediante manipulación genética.

[0024] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "tipo salvaje" se utiliza para referirse a los genes, proteínas o células encontradas en la naturaleza.

[0025] Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos "variante", "variante de célula," "variante de cepa," y expresiones similares se refieren a una célula eucariota que ha sido alterada genéticamente.

[0026] Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase "considerablemente libre de una actividad," o frases similares, significan que una actividad específica es, bien indetectable en una mezcla, bien está presente en una cantidad que no interferiría en el fin deseado de la mezcla.

[0027] Tal y como se utiliza en la presente memoria, los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan de forma intercambiable para referirse a polímeros de cualquier longitud que comprenden residuos de aminoácidos enlazados mediante enlaces peptídicos. En la presente memoria, se utilizan los códigos de una letra o de tres letras tradicionales para los residuos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcaje. En la definición, también se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica.

[0028] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido/proteína derivado/a" se refiere a una proteína que se obtiene o puede obtenerse a partir de una proteína mediante la adición de uno o varios aminoácidos a cualquiera o a ambos de los extremos N- y C-terminal, la sustitución de uno o varios aminoácidos en uno o en varios sitios distintos de la secuencia de aminoácidos, la deleción de uno o varios aminoácidos en cualquiera o en ambos extremos de la proteína o en uno o varios sitios de la secuencia de aminoácidos, y/o la inserción de uno o varios aminoácidos en uno o varios sitios de la secuencia de aminoácidos. La preparación de una proteína derivada puede alcanzarse mediante la modificación de una secuencia de ADN que codifica la proteína nativa, la transformación de dicha secuencia de ADN en un huésped adecuado y la expresión de la secuencia de ADN modificada para formar la proteína derivada.

[0029] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "variante de proteínas" se refiere a proteínas que difieren de una proteína de referencia/parental (por ejemplo, una proteína de tipo salvaje) mediante sustituciones, deleciones y/o inserciones en una pequeña cantidad de residuos de aminoácidos. La cantidad de residuos de aminoácidos diferentes entre la variante de proteína y la proteína parental puede ser de uno o varios, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más residuos de aminoácidos. Las variantes de proteínas pueden compartir al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o incluso al menos aproximadamente un 99 % o más, de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína de referencia. Una variante de proteína también puede diferir de una proteína de referencia en motivos, dominios, epítopos seleccionados, regiones conservadas y similares.

[0030] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "proteína homóloga" o simplemente "homólogo/a" se refiere a una proteína que presenta una actividad y/o una estructura similar que una proteína de referencia. No se pretende que los homólogos estén relacionados necesariamente de forma evolutiva, aunque suele ser el caso. Los homólogos suelen tener una estructura similar y pueden identificarse mediante análisis de secuencia primario, análisis de estructura secundario o terciario, análisis funcional y/o reactividad cruzada inmunológica.

[0031] El grado de homología entre las secuencias puede determinarse mediante la utilización de cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica (véase, p. ej., Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol., 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:2444; programas como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático de genética de Wisconsin (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux *et al*. (1984) Nucleic Acids Res. 12:387-95). Por ejemplo, PILEUP es un programa útil para determinar niveles de homología de secuencia. PILEUP crea un alineamiento de secuencia múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas mediante la utilización de alineamientos directos progresivos. También puede trazar un árbol que muestra las relaciones de agrupación utilizadas para crear el alineamiento. PILEUP utiliza una simplificación del procedimiento de alineamiento progresivo de Feng y Doolittle, (Feng y Doolittle (1987) J. Mol. Evol. 35:351-60). El procedimiento es similar al que se describe en Higgins y Sharp ((1989) CABIOS 5:151-53). Los parámetros de PILEUP útiles incluyen un peso de hueco por defecto de 3,00, un peso de longitud de hueco por defecto de 0,10, así como huecos de extremo ponderados. Otro ejemplo de algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul *et al*. ((1990) J. Mol. Biol. 215:403-10) y Karlin *et al*. ((1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:5873-87). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase, p. ej., Altschul *et al*. (1996) Meth. Enzymol. 266:460-80). Los parámetros "W", "T" y "X" determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, p. ej., Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:10915) alineamientos (B) de 50, previsión (E) de 10, M'5, N'-4 y una comparación de ambas cadenas.

[0032] Tal y como se utiliza en la presente memoria, "considerablemente similar/es" y "sustancialmente idéntico/a/os/as" en el contexto de al menos dos ácidos nucleicos o polipéptidos, normalmente significa que un polinucleótido o polipéptido comprende una secuencia que presenta al menos aproximadamente un 70 % de identidad, al menos aproximadamente un 75 % de identidad, al menos aproximadamente un 80 % de identidad, al menos aproximadamente un 85 % de identidad, al menos aproximadamente un 90 % de identidad, al menos aproximadamente un 91 % de identidad, al menos aproximadamente un 92 % de identidad, al menos aproximadamente un 93 % de identidad, al menos aproximadamente un 94 % de identidad, al menos aproximadamente un 95 % de identidad, al menos aproximadamente un 96 % de identidad, al menos aproximadamente un 97 % de identidad, al menos aproximadamente un 98 % de identidad, al menos aproximadamente un 99 % de identidad, o más, en comparación con la secuencia de referencia (es decir, de tipo salvaje). La identidad de las secuencias puede determinarse mediante la utilización de programas conocidos como BLAST, ALIGN y CLUSTAL con parámetros estándar. (Véase, p. ej., Altschul, *et al*. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Henikoff *et al*. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:10915; Karin *et al*. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci EE. UU. 90:5873; y Higgins *et al*. (1988) Gene 73:237-244). El *software* para llevar a cabo análisis BLAST está disponible de forma pública a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica. Asimismo, pueden consultarse las bases de datos mediante la utilización de FASTA (Pearson *et al*. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:2444-48). Una indicación de que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos consiste en que el primer polipéptido presente reactividad cruzada inmunológica respecto al segundo polipéptido. Normalmente, los polipéptidos que se distinguen por sustituciones de aminoácidos conservadoras presentan reactividad cruzada inmunológica. Por lo tanto, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, en caso de que los dos péptidos se distingan solo por una sustitución conservadora. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas consiste en que las dos moléculas se hibriden en condiciones estrictas (p. ej., en un rango de severidad medio a alto).

[0033] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" es sinónimo del término "alelo" en referencia a un ácido nucleico que codifica y dirige la expresión de una proteína o ARN. Las formas vegetativas de los hongos filamentosos son generalmente haploides y, por lo tanto, una única copia de un gen específico (es decir, un único alelo) es suficiente para conferir un fenotipo específico.

[0034] Tal y como se utiliza en la presente memoria, "deleción de un gen" se refiere a su eliminación del genoma de una célula huésped. En los casos en los que un gen incluye elementos de control (p. ej., elementos realzadores) que no se sitúan directamente al lado de la secuencia de codificación de un gen, la deleción de un gen se refiere a la deleción de la secuencia de codificación y, opcionalmente, de secuencias promotoras y/o de terminación adyacentes.

[0035] Tal y como se utiliza en la presente memoria, "interrupción de un gen" se refiere ampliamente a cualquier manipulación genérica o química que evita considerablemente que una célula produzca un producto genético de función; por ejemplo, una proteína, en una célula huésped. Procedimientos de ejemplo de interrupción incluyen la deleción completa o parcial de cualquier parte de un gen, incluidos una secuencia de codificación de polipéptidos, un promotor, un realzador u otro elemento regulador, o la mutagénesis de los mismos, donde la mutagénesis abarca sustituciones, inserciones, deleciones, inversiones y combinaciones y variaciones de los mismos, evitando cualquiera de estas mutaciones sustancialmente la producción de un producto génico de función.

[0036] Tal y como se utiliza en la presente memoria, "manipulación genética" se refiere a la alteración de una secuencia de ácido nucleico diana preseleccionada; por ejemplo, la utilización de macromoléculas (es decir, enzimas y/o ácidos nucleicos) que, preferiblemente, actúan en la secuencia de ácido nucleico preseleccionada. De esta manera, la manipulación genética es distinta de la manipulación química, en la que se utilizan moléculas pequeñas para influir en los cambios de una secuencia de ácido nucleico no preseleccionada de forma aleatoria.

[0037] Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "alteración genética" es un cambio en el ADN de una célula que se obtiene a partir de manipulación genética y es distinta de un cambio en el ADN de una célula que se obtiene a partir de una manipulación química.

[0038] Tal y como se utiliza en la presente memoria, "determinante genético primario" se refiere a un gen o a una manipulación genética del mismo, que es necesario/a y suficiente para conferir un fenotipo específico en ausencia de otros genes o manipulaciones genéticas de los mismos.

[0039] Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido/proteína funcional" se refiere a una proteína que posee una actividad, tal como una actividad enzimática, una actividad de unión, una propiedad de superficie activa, entre otros, y que no se ha mutagenizado, truncado o modificado de cualquier otra manera con el fin de suprimir o reducir dicha actividad. Los polipéptidos funcionales pueden ser termoestables o termolábiles, según el caso.

[0040] Tal y como se utiliza en la presente memoria, "un gen funcional" es un gen que puede ser utilizado por los componentes celulares para producir un producto génico activo; normalmente, una proteína. Los genes funcionales son la antítesis de los genes interrumpidos, que se modifican de tal manera que no puedan ser utilizados por componentes celulares para producir un producto génico activo.

[0041] Tal y como se utiliza en la presente memoria, variantes de células (o una variante de cepa) "mantienen o conservan un alto nivel de expresión y/o secreción de proteínas" en comparación con las células parentales (o una cepa parental) si la diferencia en la expresión de proteínas entre las variantes de células y una células parentales es inferior a aproximadamente un 20 %, inferior a aproximadamente un 15 %, inferior a aproximadamente un 10 %, inferior a aproximadamente un 7 %, inferior a aproximadamente un 5 % o incluso inferior a aproximadamente un 3 %.

[0042] Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "proteína de interés" es una proteína que se desea que sea producida en una células huésped. Por lo general, las proteínas de interés son importantes en términos comerciales para la utilización industrial o farmacéutica, lo que hace que sea deseable producirlas en grandes cantidades. Las proteínas de interés deben distinguirse de muchas otras proteínas expresadas por las células fúngicas filamentosas que, por lo general, no interesan como productos y se consideran principalmente contaminantes de proteína secundarios.

[0043] Tal y como se utiliza en la presente memoria, las variantes de células (o una variante de cepa) produce(n) "sustancialmente la misma cantidad" de proteína por cantidad unitaria de biomasa que las células parentales (o una cepa parental) si la cantidad de proteína producida por las variantes de células no es superior a un 20 % reducido, no superior a un 15 % reducido, no superior a un 10 % reducido, e incluso no superior a un 5 % reducido en comparación con la cantidad de proteína producida por las células parentales, donde la cantidad de proteína se normaliza a la cantidad total de biomasa de células a partir de la que se mide la producción de proteínas, donde la biomasa puede expresarse en términos de peso húmedo (p. ej., de sedimento celular) o de peso en seco.

[0044] Tal y como se utiliza en la presente memoria, la cantidad de proteína de interés expresada por las variantes de células y las células parentales es "considerablemente similar" si la diferencia en la expresión entre las variantes de células y las células parentales es inferior a aproximadamente un 20 %, inferior a aproximadamente un 15 %, inferior a aproximadamente un 10 %, inferior a aproximadamente un 5 %, inferior a aproximadamente un 4 %, inferior a aproximadamente un 3 %, inferior a aproximadamente un 2 %, o incluso incluso inferior a aproximadamente un 1 %.

[0045] Tal y como se utiliza en la presente memoria, los artículos singulares "un/una" y "el/la" abarcan los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Las siguientes abreviaturas y acrónimos presentan los significados siguientes a menos que se indique otra cosa:

EC	comisión de enzima
kDa	kilodalton
kb	kilobase
MW	peso molecular

w/v	peso/volumen
w/w	peso/peso
v/v	volumen/volumen
wt%	porcentaje en peso
°C	grados centígrados
H_2O	agua
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
dH_2O o DI	agua desionizada
dIH_2O	agua desionizada, filtración Milli-Q
g	gramo
µg	microgramo
mg	miligramo
kg	kilogramo
lb	libra
µL y µl	microlitro
mL y ml	mililitro
mm	milímetro
µm	micrómetro
M	molar
mM	milimolar
µM	micromolar
U	unidad
ppm	partes por millón
seg y"	segundo
min y'	minuto
h	hora
EtOH	etanol
eq.	equivalente
N	normal
PCR	reacción en cadena de polimerasa
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
FOA	ácido fluoroorótico
ATP	adenosina 5'-trifosfato
UV	ultravioleta

AAPN	Ala-Ala-Fe-p-nitroanilina
A_{540}	absorbancia medida a una longitud de onda de 540 nm
CMC	carboximetilcelulosa
rpm	revoluciones por minuto
Δ	relativo a una deleción
ARNi	ARN de interferencia
PTGS	silenciamiento génico postranscripcional
ARNbc	ARN bicatenario
PAda	polimerasa de ARN dependiente de ARN
ARNip	ARNbc de interferencia pequeño
POI	proteína(s) de interés
PPD	dominio PAZ-Piwi
DOE	Departmento de Energía
JGI	Joint Genome Institute
APY	aminopeptidasa Y
3PP	tripeptidasas aminopeptidílicas
CBH1	celobiohidrolasa 1
CBH2	celobiohidrolasa 2

III. Aumento de la expresión transgénica mediante la interrupción del mecanismo de ARNi

[0046] Se describe un procedimiento para aumentar el nivel de expresión de un transgén en células eucariotas mediante la introducción de una alteración genética en las células que reduce la cantidad de ARN de interferencia (ARNi). También se describen células producidas por dicho procedimiento. Si bien se ha descrito la explotación del ARNi para reducir la expresión génica, hasta ahora la interrupción del ARNi para aumentar la expresión de un transgén es desconocida. Actualmente, se ha observado que las células que son deficientes para ARNi son huéspedes de producción excelentes para la expresión de alto nivel de proteínas de interés (POI) codificadas por transgenes, incluyendo el aumento de los niveles máximos de expresión en las células, con el aumento del nivel medio o expresión en una pluralidad de transformantes y con la superación de la reducción de la expresión que se observa en ocasiones cuando se introducen diversas copia de un transgén en las células. Las células con ARNi interrumpido no parecen tener defectos de crecimiento, al menos en el transcurso de una fermentación por lotes de cultivo sumergido.

[0047] La interrupción del mecanismo de ARNi puede conseguirse mediante la realización de una o varias alteraciones genéticas que interrumpan uno o varios genes asociados al mecanismo de ARNi. Genes de ejemplo incluyen *dcl*-1 y *dcl*-2, que codifican proteínas de tipo Dicer, que participan en el procesamiento de las moléculas de ARNbc para producir ARNip de aproximadamente 21-25 nucleótidos de longitud de forma dependiente de ATP. Las proteínas Dicer parecen tener funciones parcialmente superfluas en algunos organismos. Se han identificado homólogos de estos genes en una variedad de organismos, incluidos hongos filamentosos, células de mamífero, células vegetales y células de insecto. Otros homólogos pueden ser identificados mediante el alineamiento de secuencia de aminoácidos y otras técnicas bioinformáticas consolidadas.

[0048] La interrupción de uno o varios de estos genes puede llevarse a cabo mediante la utilización de cualquier procedimiento adecuado que sustancialmente evite la expresión de una proteína de función codificada por el uno o los varios genes. Procedimientos de ejemplo de interrupción incluyen la deleción completa o parcial de un gen, incluida la deleción completa o parcial de, por ejemplo, la secuencia de codificación, el promotor, el terminador, un realzador u otro elemento regulador. La interrupción de un gen puede llevarse a cabo también mediante la deleción completa o parcial de una parte del cromosoma que incluya cualquier parte del gen. La interrupción de un gen puede llevarse a cabo también mediante la realización de sustituciones o inserciones de nucleótido en cualquier parte del gen; por ejemplo, la secuencia de codificación, el promotor, el terminador, un realzador u otro elemento regulador. Preferiblemente, las deleciones, inserciones y/o sustituciones (denominadas en conjunto

mutaciones) se llevan a cabo mediante manipulación genética con técnicas de biología molecular de secuencia específica, aunque también pueden llevarse a cabo mediante mutagénesis química.

[0049] Las mutaciones en un gen pueden reducir el rendimiento del promotor, reducir el rendimiento de un realzador, interferir en el empalme o edición del ARNm, interferir en la traducción del ARNm, introducir un codón de parada en la secuencia de codificación para evitar la traducción de la proteína completa, cambiar la secuencia de codificación de la proteína para producir una proteína menos activa o inactiva o reducir la interacción de la proteína con otros componentes celulares, cambiar la secuencia de codificación de la proteína para producir una proteína menos estable o dirigirse a la proteína para su destrucción, hacer que la proteína se pliegue mal o se modifique de forma incorrecta (p. ej., mediante glicosilación) o interferir en el tráfico celular de una proteína. Por lo general, el objetivo de estas y otras manipulaciones genéticas es reducir o evitar la expresión de una proteína funcional asociada a ARNi o reducir o evitar la actividad biológica normal de dichas proteínas.

[0050] Los procedimientos de ejemplo para interrumpir un gen incluyen recombinación específica de sitio, inserción dirigida, la utilización de elementos transportables, la transducción por virus y la mutagénesis química. La interrupción génica puede estar acompañada por la inserción simultánea o secuencial de, por ejemplo, un marcador de selección, un marcador fluorescente u otro marcador distinguible, un sitio de clonación o casete de clonación, una huella digital de secuencia para permitir la identificación posterior de la cepa u otra modificación genética para añadir distintividad o funcionalidad a las células resultantes.

[0051] Las células en las que el mencanismo de ARNi se interrumpe pueden comprender ya una o varias copias de un transgén de interés que se desea expresar a altos niveles. De forma alternativa, una o varias copias de un transgén de interés pueden introducirse en las células después de que se interrumpa el mecanismo de ARNi. En otra alternativa, una o varias copias de un transgén de interés pueden introducirse en el proceso de interrupción de un gen asociado a ARNi. De esta manera, los presentes procedimientos contemplan la integración de un transgén en el sitio de un gen asociado al ARNi, de tal forma que añaden simultáneamente el transgén al cromosoma de una célula al tiempo que interrumpen el mecanismo de ARNi.

[0052] Las células eucariotas en las que el mecanismo de ARNi puede interrumpirse incluyen células derivadas de humanos, monos y roedores, tales como las células de ovario del hámster chino (CHO), células NIH/3T3, células COS, células 293 y células VERO, células de insecto, tales como las células *Drosophila* y de lepidópteros, las células vegetales tales como las células del tabaco, el maíz, el arroz, las algas y de lemna; y las células fúngicas, tales como las células de levadura y de hongos filamentosos. Células fúngicas filamentosas de ejemplo provienen de *phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina,* particularmente las que presentan un estado vegetativo hifa. Células fúngicas de ejemplo particulares son las que se utilizan para la producción de proteínas industriales y farmacéuticas importantes en el mercado, incluidas, pero sin carácter limitativo: *Schizosaccharomyces* spp., *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Penicillium* spp., *Chrysosporium* spp., *Cephalosporium* spp., *Talaromyces* spp., *Geosmithia* spp., *Myceliophthora* spp., y *Neurospora* spp. Organismos particulares incluyen, pero sin carácter limitativo: *Trichoderma reesei* (previamente clasificado como *Trichoderma longibrachiatum* y *Hypocrea jecorina), Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Aspergillus itaconicus, Aspergillus oryzae, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus sojae, Aspergillus japonicus, Scedosporium prolificans, Neurospora crassa, Penicillium funiculosum, Penicillium chrysogenum, Talaromyces (Geosmithia) emersonii, Fusarium venenatum, Myceliophthora thermophila* y *Chrysosporium lucknowense.*

[0053] Los presentes procedimientos y las presentes variantes de células presentan numerosas aplicaciones. Pueden utilizarse para aumentar los niveles de expresión de un transgén en organismos de producción para los fines de aumentar los rendimientos y la pureza relativa cuando se fabrican proteínas industriales o farmacéuticas. Pueden reducir el tiempo que se necesita para identificar células de expresión de alto nivel tras transfección, transformación o transducción con un transgén. Pueden acortar el tiempo que se necesita para identificar huéspedes de producción de expresión de alto nivel. Pueden reducir los problemas asociados a diversas copias de transgenes, lo que puede reducir considerablemente la expresión de proteínas en algunos organismos huésped. Pueden utilizarse para aumentar la expresión de un transgén en las células, donde los aumentos de la cantidad de proteína codificada por el transgén producen una cantidad mayor de un metabolito de interés.

[0054] Estos y otros aspectos y modos de realización de los presentes procedimientos y las presentes variantes de células resultarán obvios para los expertos en la materia en vista de la descripción anterior y los ejemplos adjuntos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Construcción de una cepa *T. reesei* con genes interrumpidos *del1* y *dcl2*

A. Identificación de los genes dicer en *T. reesei*

[0055] Se ha descrito la cepa DURA ΔEG5 18 (WO2012/054554 y US2012107872). Un derivado de esta cepa, denominado 653MU, se utilizó como punto de partida para este ejemplo. En comparación con DURA ΔEG5 18, 653MU contiene tres deleciones adicionales (los dos genes de celulasa, *egl3* y *egl*6, así como el gen de mananasa, *man*1). 653MU carece de un gen funcional *pyr2* (que codifica orotato fosforribosiltransferasa). Ninguna de estas deleciones es importante para los presentes procedimientos o variantes de células.

[0056] Los genes de *T. reesei* que codifican dos hipotéticas enzimas de tipo Dicer fueron identificados en la base de datos del Joint Genome Institute (JGI) del Departamento de Energía (DOE) a partir de búsquedas de homología mediante la utilización de las secuencias de las proteínas *Neurospora crassa* DCL1 y DCL2 codificadas por los genes *dcl*1 y *dcl2*, respectivamente. La proteína ID 69494 en Trire 2.0 presenta la homología más elevada en relación con la proteína *N. crassa* DCL1 y, en la presente memoria, se le hace referencia como proteína de *T. reesei* DCL1, denominándose el gen que la codifica *dcl*1. De acuerdo con la anotación del JGI, la proteína Trire 2.0 69494 no presenta un residuo de metionina en su N-terminal, lo que indica que la anotación no es completamente precisa. Para el objetivo de los presentes Ejemplos, se dio por hecho que el N-terminal correcto se situaba 126 residuos de aminoácidos en dirección 5' del primer residuo en la secuencia anotada del JGI. La longitud total de la proteína pronosticada DCL1 en *T. reesei* supera los 1400 residuos de aminoácidos, lo que proporciona una diana suficiente para la interrupción de genes. La proteína ID 69494 en Trire 2.0 presenta la homología más elevada en relación con la proteína *N. crassa* DCL2 y, en la presente memoria, se le hace referencia como proteína de *T. reesei* DCL2, denominándose el gen que la codifica *dcl2.*

B. Realización de un vector de interrupción *dcl*1

[0057] Los constructos de ADN utilizados para la interrupción siguieron el mismo enfoque que los constructos previamente utilizados para la interrupción de los genes de celulasa (véase, por ejemplo, WO2012/054554 y US2012107872). Los casetes de interrupción incluían los siguientes segmentos (secuencialmente entre 5' y 3'). (i) una región flanqueadora 5' del gen marcador de 1-1,5 kb *pyr2*, (ii) una región "repetición" de 0,5-0,7 kb seleccionada de la secuencia cromosómica original también en dirección 5' de la región flanqueadora 5' y, finalmente, (iii) una región flanqueadora 3' de 1-1,5 kb. Este enfoque se ilustra en la figura 1.

[0058] El conjunto de dicho casete de interrupción puede llevarse a cabo de muchas maneras diferentes mediante la utilización de técnicas estándar. De forma alternativa, un casete de interrupción puede sintetizarse de nuevo. El procedimiento particular utilizado para interrumpir el gen *dcl*1 se describe con detalle a continuación. Los cebadores se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores de PCR utilizados para la construcción del vector de interrupción *dcl*1

Cebador	Secuencia de cebador	SEQ ID NO
DCL1_3	5´-CTTACCCAACGCGAACGATTGC TAGCTCTGGGCTAC-3´	1
DCL1_31	5´-CTGTGCTAGGTGACGGCTCTCCTTGGT GCCAGTATGCGAAGCTTTCTTTG-3´	2
DCL1_51	5´-CATACTGGCACCAAGGAGAGCCGTCA CCTAGCACAGGGCCATACGGACGGC-3´	3
DCL1_5	5´-GCGCCCAGGAAGCAGCGGCAACAGCAGC AGCAGGAG-3´	4
DCL1R_5	5´-GGTGTCGACTCTAGATCTTCAGCCCATTAT TGCTCCAGGCGGACTGGCCAAG-3´	5
DCL1R_3	5´-CTGTGGGATCCAGATTTGGAAGACTTGAT ACGGGTTC-3´	6
oPYR2_35	5´-TTGCAATTGACTAGTGGATCCAACGCCGGC TATTAGGCCATAAG-3´	7
oPYR2_55	5´-AGTACTAGTCAATTGCTCGAGTTTATAAGT GACAACATGC-3´	8

[0059] En primer lugar, las zonas designaron la región flanqueadora 5' y la región flanqueadora 3' (Figura 2) y se amplificaron mediante la utilización de los pares de cebadores DCL_5 más DCL_31 y DCL_51 más DCL_3, respectivamente, mediante la utilización de ADN cromosómico de *T. reesei* 653MU se utilizó como patrón. Los productos de 1,6 y 1,5 kb se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa, mezclado a aproximadamente

una proporción de 1:1 y se utilizaron como patrón para una reacción de PCR con un par de cebadores DCL_5 más DCL_3 para producir un producto de fusión de 3,1 kb. El fragmento se clonó en el vector pCR™-Blunt II-TOPO ® mediante un kit proporcionado por Invitrogen, de tal forma que se generó plásmido pCR(DCL1UD).

[0060] En paralelo, la región de repetición *dcl*1 (Figura 2) se amplificó con los cebadores DCL1R_5 más DCL1R_3 y el gen *pyr2* de *T. reesei* se amplificó con los cebadores oPYR2_55 y oPYR2_35, utilizando ambos el ADN cromosómico de *T. reesei* 653MU como patrón. Ambos fragmentos se clonaron por separado en el vector pCR™-Blunt II-TOPO ® y dieron lugar a los plásmidos pCR(DCL1R) y pCR(FlexiPyr2), respectivamente. El plásmido pCR(DCL1UD) fue digerido con las endonucleasas de restricción *Sal*I y *Bgl*II y el fragmento de ADN de 5,7 kb fue aislado mediante electroforesis de agarosa preparativa. El plásmido pCR(DCL1R) fue digerido con *Xba*I y *Bam*HI con la escisión de un fragmento de 0,6 kb que contiene la región de repetición *dcl1*. El plásmido pCR(FlexiPyr2) fue digerido con *Xho*l y *SpeI* con la escisión de un fragmento de 1,7 kb que contiene el gen *pyr*2. Tras la purificación, estos dos fragmentos de ADN fueron incubados con el vector *Sal*I más pCR(DCL1UD) digerido por *Bgl*II en presencia de la ADN ligasa, dependiendo de los extremos compatibles producidos por *Xho*l y *Sal*I, *Spe*I y *Xba*I, y *Bam*HI y *Bgl*II El vector resultante pCR(DCL1RPyr) llevaba el conjunto final del casete de interrupción del gen *dcl*1.

C. Realización de un vector de interrupción *dcl*2

[0061] La construcción de vectores de interrupción *dcl2* se llevó a cabo de manera similar a la de *dcl*1. El procedimiento se describe en detalle a continuación y los cebadores se indican en la Tabla 1.

Tabla 2. Cebadores de PCR utilizados para la construcción del vector de interrupción *dcl*2

Cebador	Secuencia de cebador	SEQ ID NO
oDCL2_36	5´-GTTGGATAGGTACCTAGATGTAAGATTCTA TATAAGTC-3´	9
DCL2_56	5´-CATCTTCATCATCGGCAGCCCACGTAACC TGTGCCAG-3´	10
DCL2_57	5´-CAGGCGAAAGAGGAGGAGATCTCAAAATT CGTCCCCGAAGGCTCGTGGACCAGTG-3´	11
DCL2_37	5´-TTCGGGGACGAATTTTGAGATCTCCTCCT CTTTCGCCTGCCACTTCAAGATCGCAG-3´	12
DCL2_56	5´-CATCTTCATCATCGGCAGCCCACGTAACCT GTGCCAG-3´	13
DCL2_57	5´-CAGGCGAAAGAGGAGGAGATCTCAAAATT CGTCCCCGAAGGCTCGTGGACCAGTG-3´	14
oDCL2R_3	5´-GGTTGGATCCGCGGAAAGGTCAATAAAATG GGAGTTACTGAG-3´	15
oDCL2R_5	5´-GGTTGTCGACTCTAGATCTGCCCTGTCCAG CATCGAGCTGACCTCTCTATTG-3´	16

[0062] Las regiones flanqueadoras 5' (1,6 kb) y 3' (1,3 kb) fueron amplificadas mediante PCR con la utilización de los pares de cebadores oDCL2_56 más oDCL2_37 y oDCL2_57 más oDCL2_36, respectivamente. El PCR de fusión se llevó a cabo mediante la purificación de los dos productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y mediante la utilización de su mezcla como patrón para una reacción con los cebadores oDCL2_56 más oDCL2_36. El producto de fusión resultante de 2,9 kb se clonó en el vector pCR™-Blunt II-TOPO ® para generar el plásmido pCR(DCL2_UD).

[0063] La región de repetición *dcl1* (0,7 kb) se amplificó con oDCL2R_5 más oDCLR_3. El producto de PCR fue digerido con *Xba*I y *Bam*HI. pCR(DCL2_UD) fue digerido con *Sal*I y *Bgl*II y el fragmento grande fue purificado. El gen *pyr2* fue escindido de pCR(FlexiPyr2) mediante digestión con *Xba*I y *Spe*I, tal y como se había hecho anteriormente. Los tres fragmentos fueron incubados juntos con la presencia de ADN ligasa para producir el vector de interrupción del gen *dcl2*, pCR(DCL2RPyr, de nuevo dependiendo de los extremos compatibles producidos por *Spe*I y *Xba*I, y *Bam*HI y *Bgl*II.

[0064] Para producir una cepa *T. reesei* con un gen *dcl*1 de interrupción, la cepa 653MU fue transformada con un producto de PCR de aproximadamente 4,4 kb obtenido mediante la utilización de pCR(DCL1RPyr) como patrón y

DCL1_5 más DCL1_3 como cebadores. Se aisló un conjunto de transformantes prototróficos estables y su ADN cromosómico fue aislado y analizado mediante PCR con el par de cebadores oDCL1R_D1 más oDCL1D_R1 (Tabla 3 y Figura 3). La generación de un producto de PCR de 1,67 kb indicaba que el ADN transformador se había integrado de forma homóloga en el locus de *dcl*1 del cromosoma de *T. reesei.* El ADN de uno de dichos clones fue analizado adicionalmente con los cebadores oDCL1R_D1 más oDCL1D_R2. La aparición de un producto de 1,8 kb confirmó la integración correcta del casete de interrupción en el locus de *dcl*1. Se dejó que el transformante que lleva el gen *dcl*1 interrumpido esporulara y la suspensión de esporas se colocó sobre una placa con medio de agar mínimo complementado con 1,2 g/L de ácido fluoroorótico (FOA). Debido a la presencia de dos copias de la "región de repetición" en el cromosoma de esta cepa (Figura 4A), se generan mutantes *pyr2* resistentes al FOA a alta frecuencia mediante recombinación homóloga entre las dos secuencias de repetición. Durante un proceso denominado normalmente "*looping out*", el ADN entre las dos copias de la secuencia de repetición se pierde y se genera la estructura mostrada en la Figura 4B. Para comprobar la estructura correcta de la zona cromosómica de *dcl*1 después de la deleción del gen *dcl*1 y la escisión del marcador *pyr2*, se extrajo ADN de diversos aislados resistentes al FOA. Los análisis de PCR con los pares de cebadores oDCL1FU_D1 más oDCL1D_R2 y oDCL1FU_D2 más oDCL1D_R1 dieron lugar a la detección de productos de PCR de 2,3 y 2,4 kb, respectivamente, en todos los clones analizados. Este es el tamaño de los productos de PCR esperado para la estructura cromosómica alrededor del gen *dcl*1 delecionado después de la escisión del marcador (Figura 4B). Uno de estos clones resistentes al FOA, que generan los productos de PCR deseados, se denominaba cepa 356MUΔdcl1.

Tabla 3. Cebadores utilizados para cartografiar las deleciones *dcl*1 y *dcl*2

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO
oDCL1D_R1	5´-CAGACTCGGACGTCGACTCCTTTC GTGGCAAGTATC-3´	17
oDCL1D_R2	5´-GGGAGATGATTCTTGCGGCGAATCC ATCTTCATCTC-3´	18
oDCL1FU_D1	5´-CCATGTCATTTCACCAGAGACAGCAA ATGTCGGAAG-3´	19
oDCL1FU_D2	5´-CCATCAAGAAGATTGAGGAGGCCATC AAAGACCTCGG-3´	20
oDCL1R_D1	5´-GAGCGCTTTATGACAAGCAATGACAG AGGGCAACTG-3´	21
oDCL2_5F	5´-CTAATTTCAGTATTCTAGGTCATGCTA CGCAATAAC-3´	22
oDCL2D_R1	5´-CCAATCAAACACCACCACCACTCAGA ATCTGCATCCTC-3´	23
oDCL2D_R2	5´-CCAGCCAACCCTCGACTCAAAAGAAGA CCAAAACTCCG-3´	24
oDCL2R_D1	5´-GTGCATTAATTAGTCACTGCTACCAAT GGTGATTCCTG-3´	25
oDCL2R_D2	5´-GAAGGTGATGATGACGGTCTGCCTACA TACCTTAGATC-3´	26

[0065] La cepa 356MUΔdcl1 se convirtió en prototrofía de uridina mediante transformación con un producto de PCR de 4,75 kb generado mediante la utilización de plásmido pCR(DCL2RPyr) como patrón y de los cebadores oDCL2_56 más oDCL2_36 como cebadores. Transformantes prototróficos estables fueron cribados mediante el aislamiento del ADN cromosómico de los clones individuales y la realización del análisis de PCR con los pares de cebadores oDCL2R_D1 más oDCL2D_R1. Un transformante que generó el producto de PCR del tamaño esperado (1,86 kb) se analizó adicionalmente con un conjunto distinto de cebadores (oDCL2R_D2 y oDCL2D_R2). Se observó un producto de PCR de 2,1 kb, lo que confirmó que en este clon el casete de interrupción se había integrado en el sitio *dcl*2 (Figura 5B). Este clon fue sometido al procedimiento de escisión de marcador mediante la utilización de FOA de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Un clon resistente al FOA fue analizado mediante PCR con los cebadores oDCL2_5F y oDCLD_R1. Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (2,4 kb), se clonó en vector PCR™-Blunt II-TOPO® y se sometió a

secuenciación de ADN. Los datos de la secuenciación confirmaron que el locus cromosómico *dcl2* presentaba la estructura esperada después de la deleción del gen *dcl2* y la escisión del marcador *pyr2*. La cepa que superó todos los controles de PCR y de secuenciación se denominaba DiMorph y se utilizó para analizar los efectos de la inactivación del sistema de extinción en *T. reesei.*

Ejemplo 2. Análisis de la expresión de proteínas de interés en cepas competentes en términos de extinción e interrumpidas en términos de extinción de *T. reesei*

[0066] Se utilizaron dos proteínas proteolíticas secretadas diferentes para analizar el efecto de la inactivación del sistema de extinción en *T. reesei.* Una proteína es homóloga a la aminopeptidasa Y en diversos organismos y se le denomina APY (proteína ID 81070 en Trire 2.0). La otra proteína es un homólogo de tripeptidasas aminopeptídilicas y se le denomina 3PP (proteína ID 82623 en Trire 2.0). Los casetes de expresión para APY y 3PP fueron construidos mediante la utilización de elementos funcionales que se utilizan habitualmente en el trabajo de expresión de *T. reesei.* La expresión fue impulsada por un promotor *cbh*I y la secuencia de codificación es flanqueada en el extremo 3' por un terminador transcripcional *cbh*I. Para cada gen de interés, se construyeron dos vectores de expresión similares: (i) un vector que lleva el gen marcador *amd*S (es decir, pTrex3gM(APY) y pTrex3gM(3PP) y (ii) un vector que lleva el gen marcador *pyr*2 (es decir, pTrex8gM(APY) y pTrex8gM(3PP).

[0067] Los procedimientos para montar los casetes de expresión son procedimientos habituales de ingeniería genética y no se describen en la presente memoria en detalle. En resumen, las secuencias de codificación de los genes APY y 3PP fueron amplificadas mediante PCR y fueron clonadas en el vector pENTR™/D TOPO® (Invitrogen), seguido de la inserción de las secuencias de codificación clonadas entre el promotor y el terminador *cbh*I mediante la utilización de la mezcla de enzimas Gateway® LR Clonase® (Invitogen). Los casetes de expresión APY y 3PP podrían, de forma alternativa, pedírseles a un proveedor de síntesis comercial de ADN. Los casetes de expresión sin secuencias de vector bacteriano fueron preparados mediante la utilización de los vectores mencionados anteriormente como patrones y de los cebadores indicados en la tabla 4. El cebador oTrex3_AMP_5 fue utilizado en todas las reacciones como cebador de sentido. El cebador oTrex3_Amds_3 fue utilizado como cebador de antisentido para amplificar los casetes de expresión que llevan el marcador *amd*S (con pTrex3gM(APY) y pTrex3gM(3PP) como patrones) y el cebador oTrex8_Pyr2_3 fue utilizado de forma similar para amplificar los casetes que llevan el marcador *pyr*2 (con pTrex8gM(APY) y pTrex8gM(3PP) como patrones). Finalmente, el cebador de antisentido oCBHT_3 fue utilizado (con pTrex3gM(APY) y pTrex3gM(3PP) como patrones) para amplificar los casetes de expresión sin marcador utilizados como ADN "pasajero" en experimentos de cotransformación.

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar casetes de expresión para los genes APY y 3PP

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO
oCBHT_3	5´-TGGTACTGGGATACACGAAGAG CGGCGATTCTACGGGTTATG-3´	27
oTrex3_AmdS_3	5´-CTAGACTGGAAACGCAACCCT GAAGGGATTCTTCCTTTG-3´	28
oTrex3_AMP_5	5´-GTATAGTAATACGAGTCGCAT CTAAATACTCCGAAGC-3´	29
oTrex8_Pyr2_3	5´-GGAGGGGACGATACACGCACCA TGGACCCCAGTGGGGAAGC-3´	30

[0068] Para analizar el efecto de la interrupción por extinción en la expresión de la proteína de interés, DiMorph y una cepa de *T. reesei* casi isogénica positiva en términos de extinción, CelluLight (653MU, que lleva una deleción adicional del gen *egl4* que codifica la endoglucanasa 4) fueron transformados con los casetes de expresión APY y 3PP mediante la utilización de *pyr2* como marcador de transformación. Para cada experimento de transformación, se utilizaon aproximadamente 10 µg de producto de PCR que lleva *pyr2* y 30 µg de casete de expresión sin marcador (que lleva el mismo gen de interés). La transformación se llevó a cabo mediante la utilización del procedimiento estándar protoplasto-PEG (Penttilä, M. *et al.* (1987) Gene 61:155-164.

[0069] En un primer experimento con las cepas DiMorph y CelluLight transformadas con el casete de expresión de APY utilizando el marcador *pyr2*, se cultivaron aproximadamente 30 transformantes de cada cepa que presentaban fenotipos estables durante 6 días en medio de glicina-soforosa (glicina 6 g/L; sulfato de amonio 4,7 g/L; dihidrogenofosfato de potasio 5 g/L; sulfato de magnesio heptahidratado 1 g/L; PIPPS 33 g/L; y cloruro de calcio en autoclave posterior 1 g/L; glucosa 16 g/L y soforosa 0,3 g/L). Se analizó la actividad de aminopeptidasa de la proteína APY en 0,1 M de tampón Tris-HCl, pH 7,5 con 1 mM de cloruro de zinc y 2 mM de

Lis-p-nitroanilina a temperatura ambiente (25 ºC). Se siguió la reacción de manera cinética a 410 nm. Como puede observarse a partir del gráfico de barras de la figura 6, la distribución de las actividades de APY en los dos conjuntos de transformantes era muy diferente. Aproximadamente la mitad de todos los transformantes en la cepa de CelluLight positiva en términos de extinción produjo una actividad de APY no medible, mientras que en la cepa DiMorph interrumpida en términos de extinción casi todos los transformantes produjeron APY. Tanto los niveles medios como máximos de expresión eran claramente superiores en la cepa interrumpida en términos de extinción. Las observaciones basadas en las mediciones de actividad estaban estrechamente relacionadas con los datos de SDS-PAGE (Figura 7).

[0070] En un segundo experimento con las cepas DiMorph y CelluLight transformadas con el casete de expresión 3PP con el marcador *pyr2,* aproximadamente 40 transformantes de cada cepa que presentaban fenotipos estables fueron cultivados en medio inducido, tal y como se ha explicado anteriormente. A continuación, los transformantes fueron analizados en relación con la actividad de tripeptidasa mediante la utilización del derivado de tripéptido Ala-Ala-Fe-p-nitroanilina (AAPN; Bachem) como sustrato. El ensayo se llevó a cabo en tampón de acetato de sodio 0,1, pH 4,0, con 1 mM de AAPN a temperatura ambiente midiéndose la liberación cinética de la p-nitroanilina por absorbancia a 410 nm. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el experimento de expresión de APY, aunque el contraste entre la eficiencia de la expresión en cepas interrumpidas en términos de extinción y cepas competentes en términos de extinción (DiMorph y CelluLight, respectivamente) fue incluso más llamativo (Figura 8). Casi la totalidad de los transformantes de DiMorph produjeron una actividad de tripeptidasa considerable, mientras que solo unos pocos transformantes de CelluLight produjeron una actividad de tripeptidasa considerable. Tanto los niveles medios como máximos de expresión eran claramente superiores en la cepa interrumpida en términos de extinción.

Ejemplo 3. Efecto de series de transformación repetidas en niveles de expresión de proteínas de interés en cepas negativas en términos de extinción y cepas positivas en términos de extinción

[0071] Los transformantes con una expresión más elevada de DiMorph y CelluLight con el casete de expresión APY con el marcador *pyr2* del ejemplo 2, se utilizaron como huéspedes para una segunda serie de transformación. La propia transformación se llevó a cabo de la misma manera que la primera serie de transformación, con la excepción de que el gen *amdS* fue utilizado como marcador de selección. Se cultivaron 48 transformantes dobles y estables, derivados de huéspedes DiMorph o CelluLight, en medio de glicina-soforosa y se analizaron para observar su actividad de APY, como se había hecho previamente. En la cepa de *T. reesei* competente en términos de extinción, solamente un transformante de la segunda serie de 48 presentaba actividad de APY que fuera superior a cualquiera de los transformantes de serie única (Figura 9). Una gran mayoría de los transformantes se la segunda serie mostró una caída en lugar de un aumento en la actividad después de una serie adicional de transformación. Aproximadamente un tercio de todos los transformantes dobles perdió toda la actividad de APY medible. Con la cepa DiMorph interrumpida en términos de extinción, los resultados fueron diferentes. Aunque algunos transformantes de la segunda serie presentaban una actividad de APY inferior que la cepa madre, ninguno de ellos perdió la actividad de APY completamente, y aproximadamente un cuarto de la totalidad de los transformantes dobles presentaba más actividad de APY que su transformante madre de serie única. La cepa que mejor expresaba la APY en fondo DiMorph presentaba aproximadamente un 50 % de nivel de expresión más de APY que la mejor cepa en fondo de CelluLight competente en términos de extinción.

[0072] Un experimento similar se llevó a cabo mediante la utilización de los transformantes DiMorph y CelluLight de expresión más elevada que contenían el casete de expresión 3PP con el marcador *pyr2* del ejemplo 2. En este experimento, las tendencias cualitativas eran similares a las del experimento en transformación doble con el casete APY. Sin embargo, había diferencias cuantitativas muy sustanciales (Figura 10). En la cepa competente en términos de extinción (CelluLight), la mayoría de los transformantes de la segunda serie perdieron la mayoría o la totalidad de la producción de 3PP. Solamente un transformante doble de 48 mostraba una mejora marginal en comparación con su madre, que era el mejor transformante de 3PP de serie única. En la cepa interrumpida en términos de extinción (DiMorph), una cantidad de transformantes de la segunda serie de transformación presenta aproximadamente el doble de nivel de expresión en relación con su transformante madre de serie única. De nuevo, ninguno de los transformantes dobles en la cepa DiMorph perdió completamente la expresión de 3PP como resultado de la serie adicional de transformación. Notablemente, el mejor transformante de 3PP de DiMorph global (entre los transformantes de serie única y de la segunda serie) era aproximadamente 3 veces más productivo que el mejor transformante de 3PP de CelluLight.

Ejemplo 4. Análisis de la expresión de otra proteína de interés en cepas competentes en términos de extinción e interrumpidas en términos de extinción de *T. reesei*

[0073] Se realizaron cepas de *T. reesei* adicionales con los genes *dcl*1 y *dcl*2 interrumpidos y se utilizaron para analizar la expresión de otros transgenes integrados, incluidos α-amilasa de *Aspergillus clavatus* y celobiohidrolasa 2 (CBH2) de *T. reesei*, ambos bajo el control del promotor de celobiohidrolasa 1 (CBH1) de *T. reesei.* En ambos casos, los niveles máximos de expresión de proteínas, así como los niveles medios de

expresión de proteínas entre una pluralidad de transformantes era mayor en las células de *T. reesei* con los genes *dcl*1 y *dcl*2 interrumpidos en comparación con células equivalentes con un mecanismo de ARN de interferencia intacto (datos no mostrados).

[0074] Si bien las composiciones y los procedimientos anteriores se han descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplos a efectos de claridad de comprensión, a los expertos en la materia les resultará obvio que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para aumentar el nivel de expresión de un transgén en células fúngicas, que comprende:

la introducción de una alteración genética en las células fúngicas, reduciendo dicha alteración genética la cantidad de ARN de interferencia en las células en comparación con la cantidad de ARN de interferencia en ausencia de la alteración genética, donde la alteración genética comprende una interrupción de los genes de tipo Dicer *dcl-1* y *dcl-2;* y
la introducción del transgén para la expresión de una proteína de interés en las células.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la alteración genética reduce o evita la formación de ARNip en las células.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la interrupción del gen es el resultado de la mutagénesis del gen.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, donde la interrupción del gen se lleva a cabo mediante la utilización de recombinación específica del sitio y/o la interrupción del gen se lleva a cabo en combinación con la introducción de un marcador de selección en el locus genético del gen.

5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, donde las células producen considerablemente la misma cantidad de proteína total por cantidad unitaria de biomasa en comparación con la cantidad de proteína por cantidad unitaria de biomasa producida por células equivalentes que carecen de la alteración genética.

6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las células fúngicas son células fúngicas filamentosas.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde las células fúngicas filamentosas son células de la especie *Pezizomycotina.*

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, donde las células fúngicas filamentosas son células de *Trichoderma reesei.*

9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la introducción de una copia adicional del transgén en las células, donde el nivel de expresión del transgén después de la introducción de la copia adicional del transgén en las células no es inferior que los niveles de expresión del transgén antes de introducir la copia adicional del transgén en las células.

10. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el transgén que codifica la proteína de interés está presente en las células antes de introducir la alteración genética que reduce o evita el ARN de interferencia o el transgén que codifica la proteína de interés se introduce en las células después de introducir la alteración genética que reduce o evita el ARN de interferencia.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa de aumentar el nivel de expresión de un transgén en células fúngicas comprende:

introducir el transgén en un locus de un gen asociado a ARN de interferencia, donde la introducción del transgén interrumpe el gen asociado a ARN de interferencia y reduce la cantidad de ARN de interferencia en las células fúngicas, de tal forma que aumenta el nivel de expresión del transgén en comparación con el de las células fúngicas donde el gen asociado a ARN de interferencia está intacto.

12. Variantes de células fúngicas derivadas de células fúngicas parentales, comprendiendo las variantes de células fúngicas una alteración genética que hace que las variantes de células fúngicas presenten ARN de interferencia reducido en comparación con las células fúngicas parentales y un transgén que codifica una proteína de interés, donde la alteración genética comprende la interrupción de los genes que codifican las proteínas de tipo Dicer DCL1 y DCL2,

donde, en comparación con las células fúngicas parentales, las variantes de células fúngicas son capaces de producir niveles más elevados de la proteína de interés codificada por el transgén, y/o las variantes de células fúngicas presentan niveles de expresión medios superiores de la proteína de interés codificada por el transgén tras la tranformación del transgén,

donde las variantes de células fúngicas producen considerablemente la misma cantidad de proteína por cantidad unitaria de biomasa en comparación con la cantidad de proteína por cantidad unitaria de biomasa producida por células fúngicas equivalentes que carecen de la alteración genética.

13. Variantes de células fúngicas de acuerdo con la reivindicación 12, donde la interrupción es la mutagénesis del gen; y/o la interrupción es la deleción parcial o completa del gen; y/o la interrupción del gen se lleva a cabo con recombinación específica del sitio; y/o la interrupción del gen se lleva a cabo en combinación con la introducción de un marcador de selección en el locus genético del gen.

14. Variantes de células de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-13, comprendiendo también una pluralidad de copias de un transgén que codifica una proteína de interés.

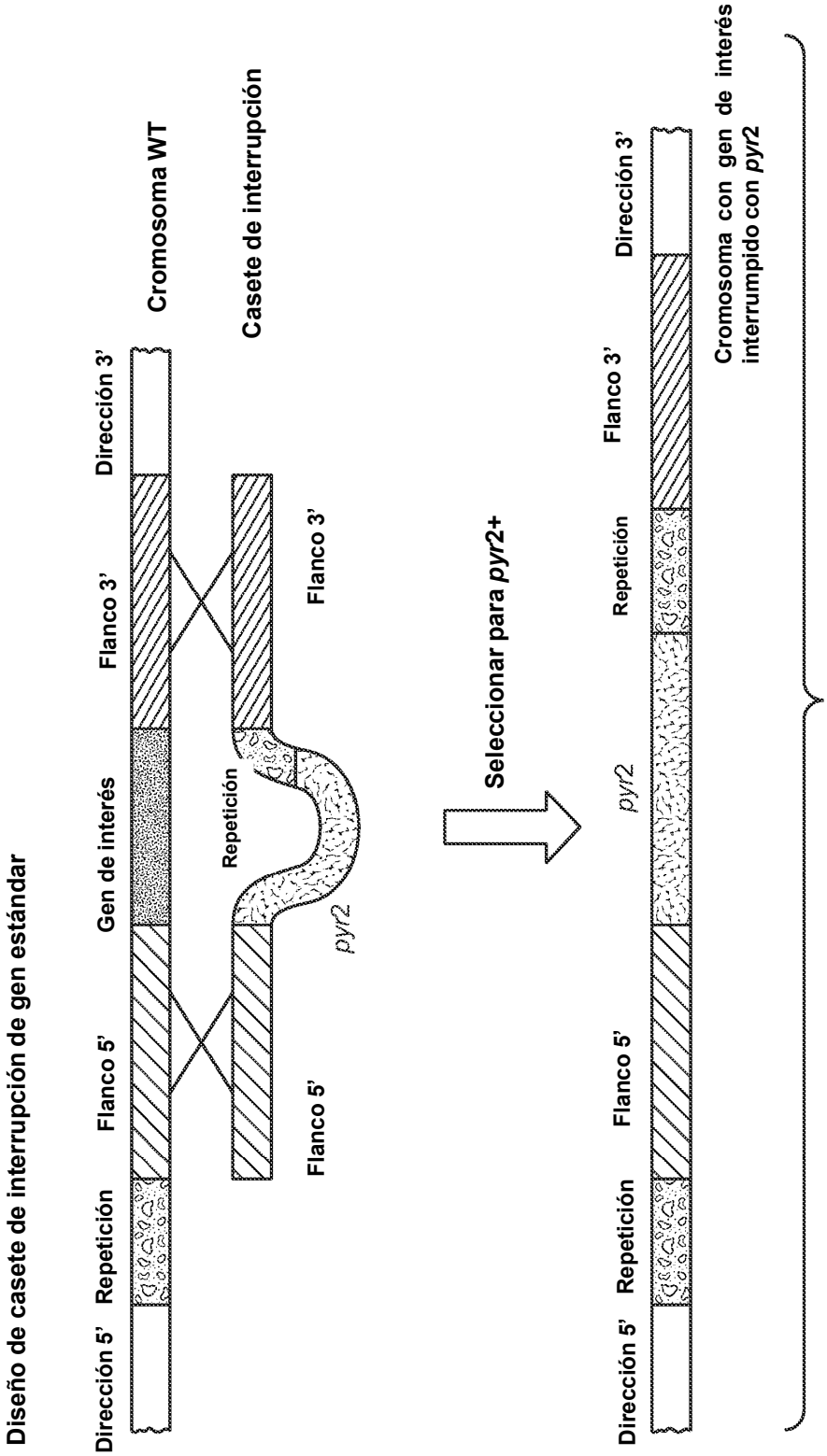
Diseño de casete de interrupción de gen estándar
Dirección 5'
Repetición
Flanco 5'
Gen de interés
Flanco 3'
Dirección 3'
Cromosoma WT
Casete de interrupción
Repetición
pyr2
Flanco 5'
Flanco 3'
Seleccionar para pyr2+
Dirección 5'
Repetición
Flanco 5'
pyr2
Repetición
Flanco 3'
Dirección 3'
Cromosoma con gen de interés interrumpido con pyr2

FIG. 1

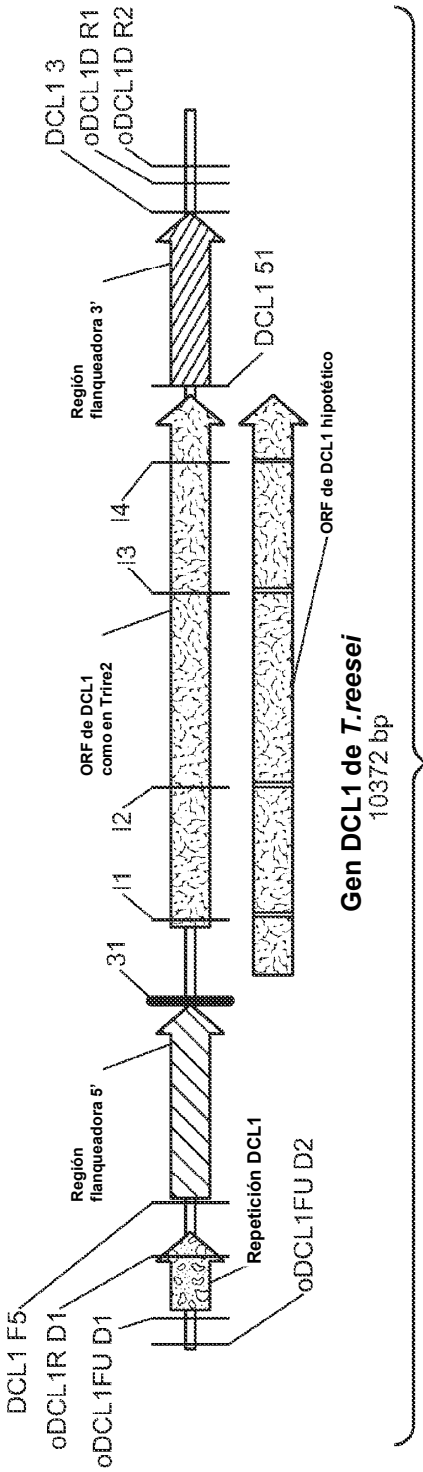
DCL1 F5
oDCL1R D1
oDCL1FU D1
Región flanqueadora 5'
Repetición DCL1
oDCL1FU D2
31
I1
I2
ORF de DCL1 como en Trire2
I3
I4
Región flanqueadora 3'
DCL1 3
oDCL1D R1
oDCL1D R2
DCL1 51
ORF de DCL1 hipotético
Gen DCL1 de T.reesei
10372 bp

FIG. 2

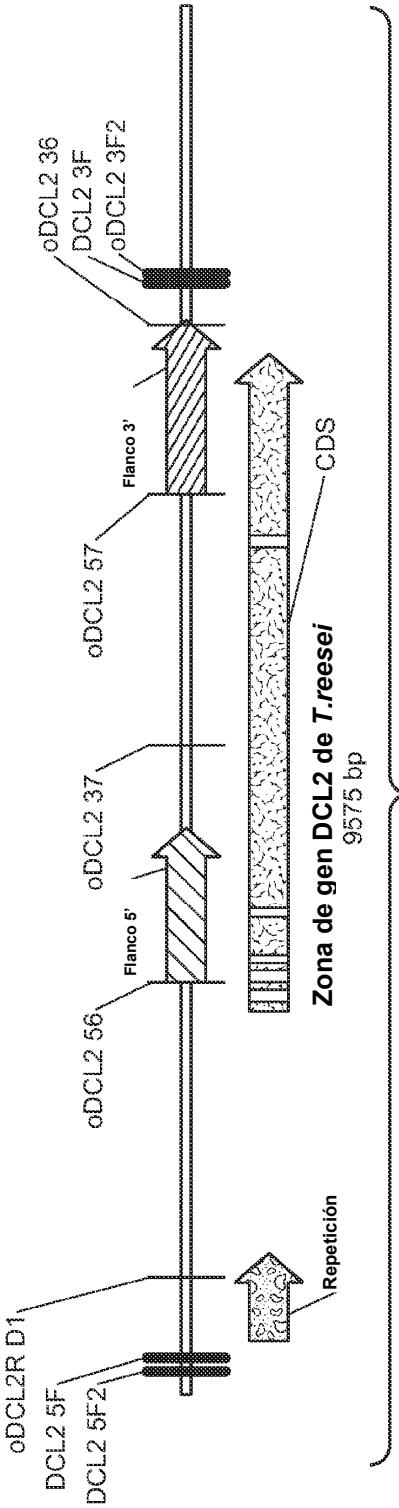
oDCL2R D1
DCL2 5F
DCL2 5F2
oDCL2 56
Flanco 5'
oDCL2 37
oDCL2 57
Flanco 3'
oDCL2 36
DCL2 3F
oDCL2 3F2
Repetición
CDS
Zona de gen DCL2 de T.reesei
9575 bp

FIG. 3

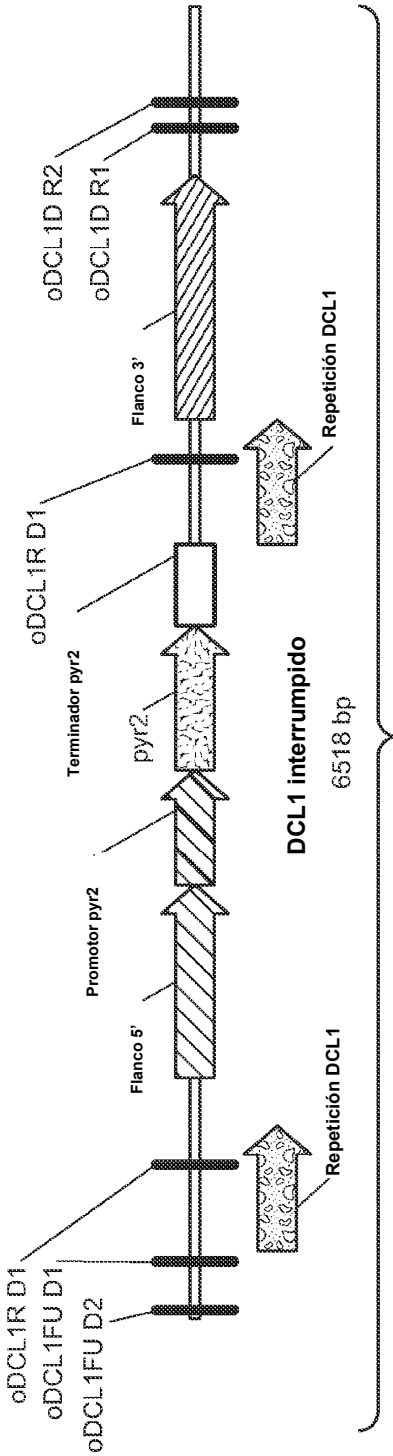
oDCL1R D1
oDCL1FU D1
oDCL1FU D2
Repetición DCL1
Flanco 5'
Promotor pyr2
pyr2
Terminador pyr2
oDCL1R D1
Flanco 3'
Repetición DCL1
oDCL1D R1
oDCL1D R2
DCL1 interrumpido
6518 bp

FIG. 4A

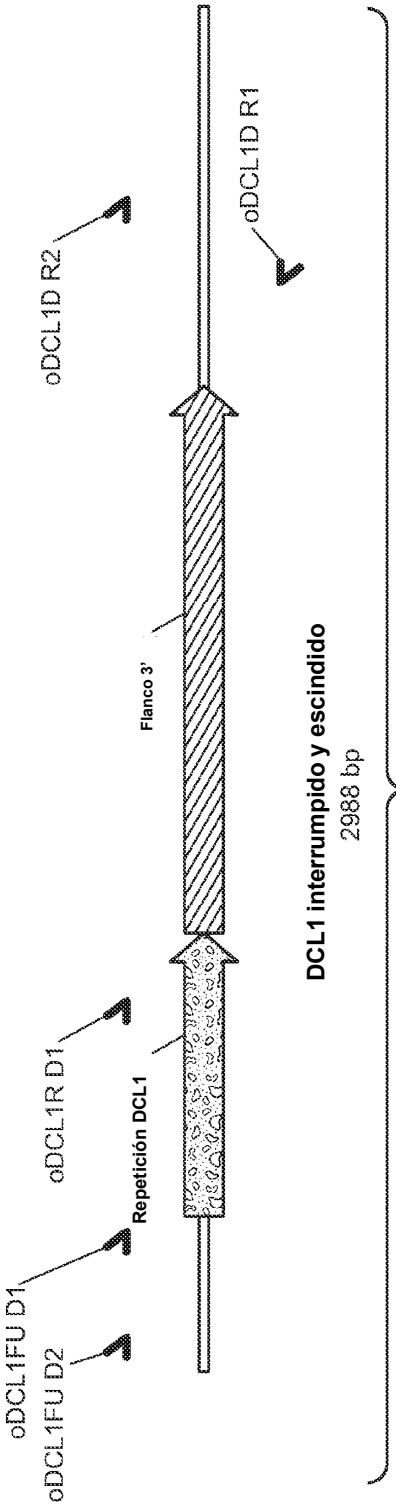
oDCL1FU D1
oDCL1FU D2
Repetición DCL1
oDCL1R D1
Flanco 3'
oDCL1D R1
oDCL1D R2
DCL1 interrumpido y escindido
2988 bp

FIG. 4B

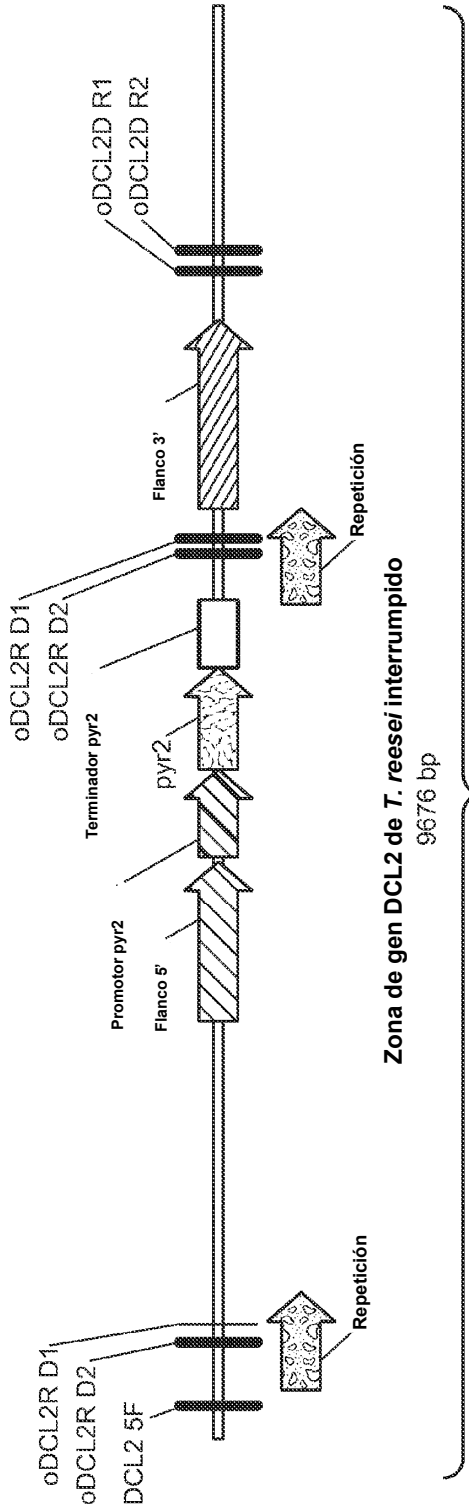
oDCL2R D1
oDCL2R D2
DCL2 5F
Repetición
Promotor pyr2
Flanco 5'
pyr2
Terminador pyr2
oDCL2R D1
oDCL2R D2
Flanco 3'
Repetición
oDCL2D R1
oDCL2D R2
Zona de gen DCL2 de T. reesei interrumpido
9676 bp

FIG. 5A

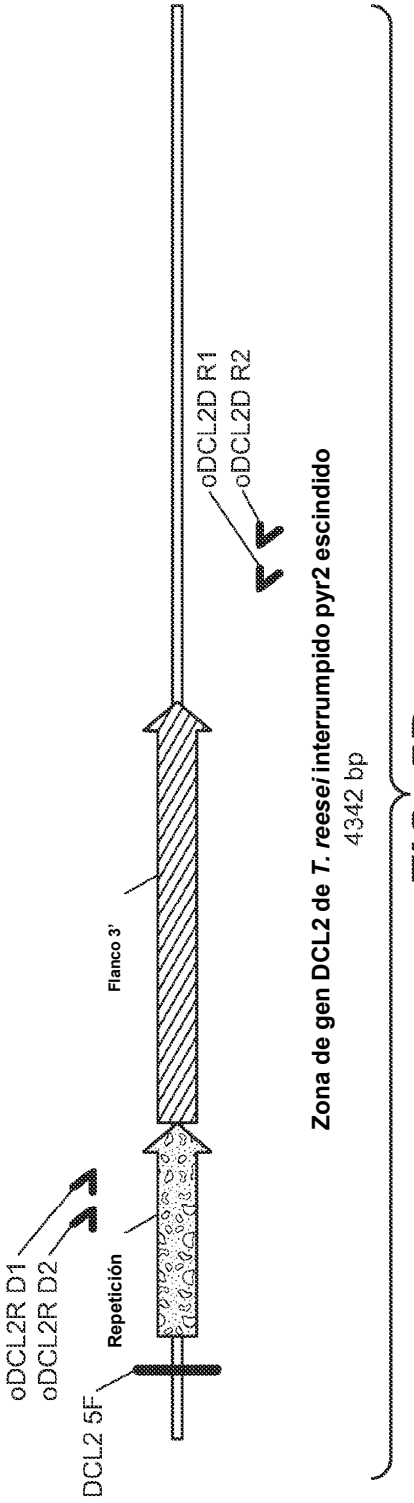
oDCL2R D1
oDCL2R D2
DCL2 5F
Repetición
Flanco 3'
oDCL2D R1
oDCL2D R2
Zona de gen DCL2 de T. reesei interrumpido pyr2 escindido
4342 bp

FIG. 5B

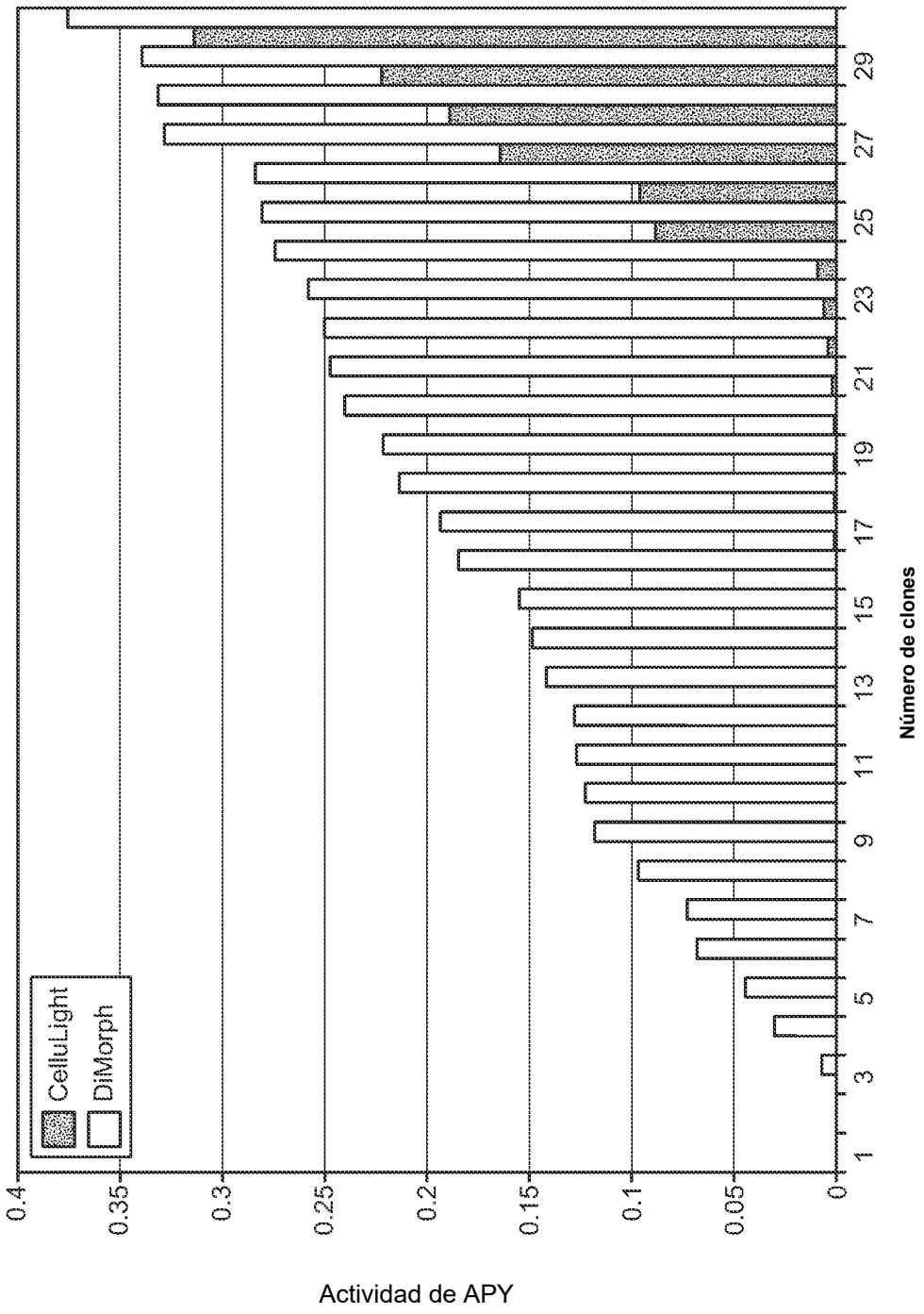
CelluLight
DiMorph
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
Número de clones
Actividad de APY

FIG. 6

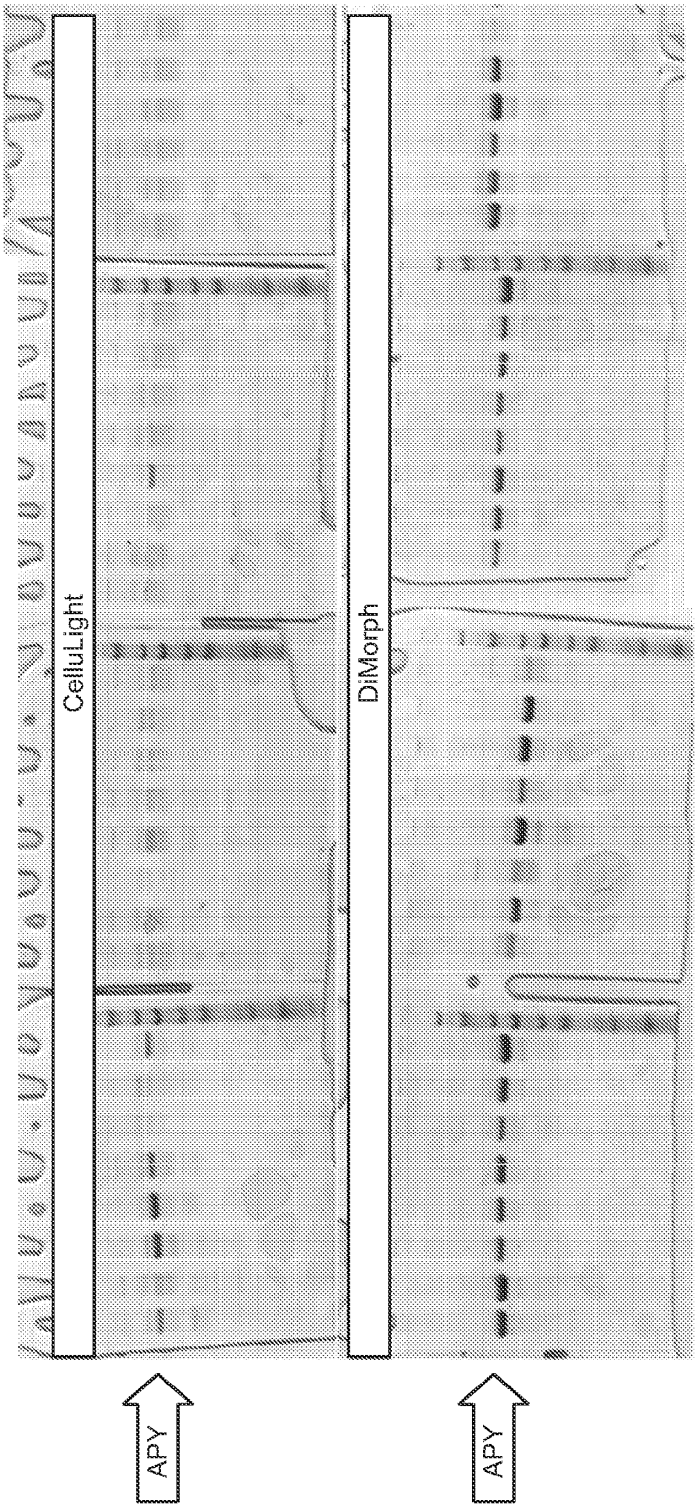

FIG. 7

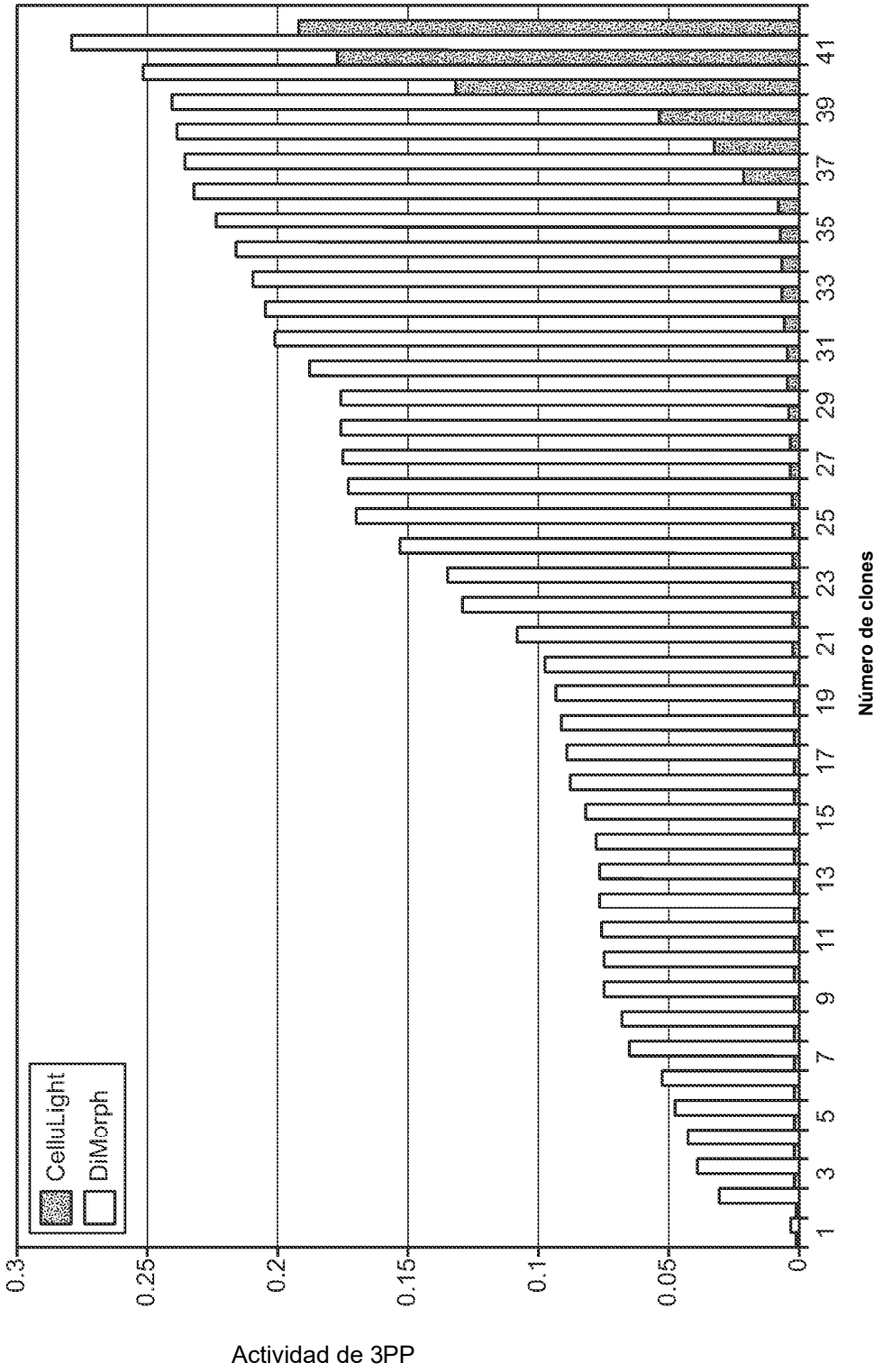
CelluLight
DiMorph
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
37
39
41
Número de clones
Actividad de 3PP

FIG. 8

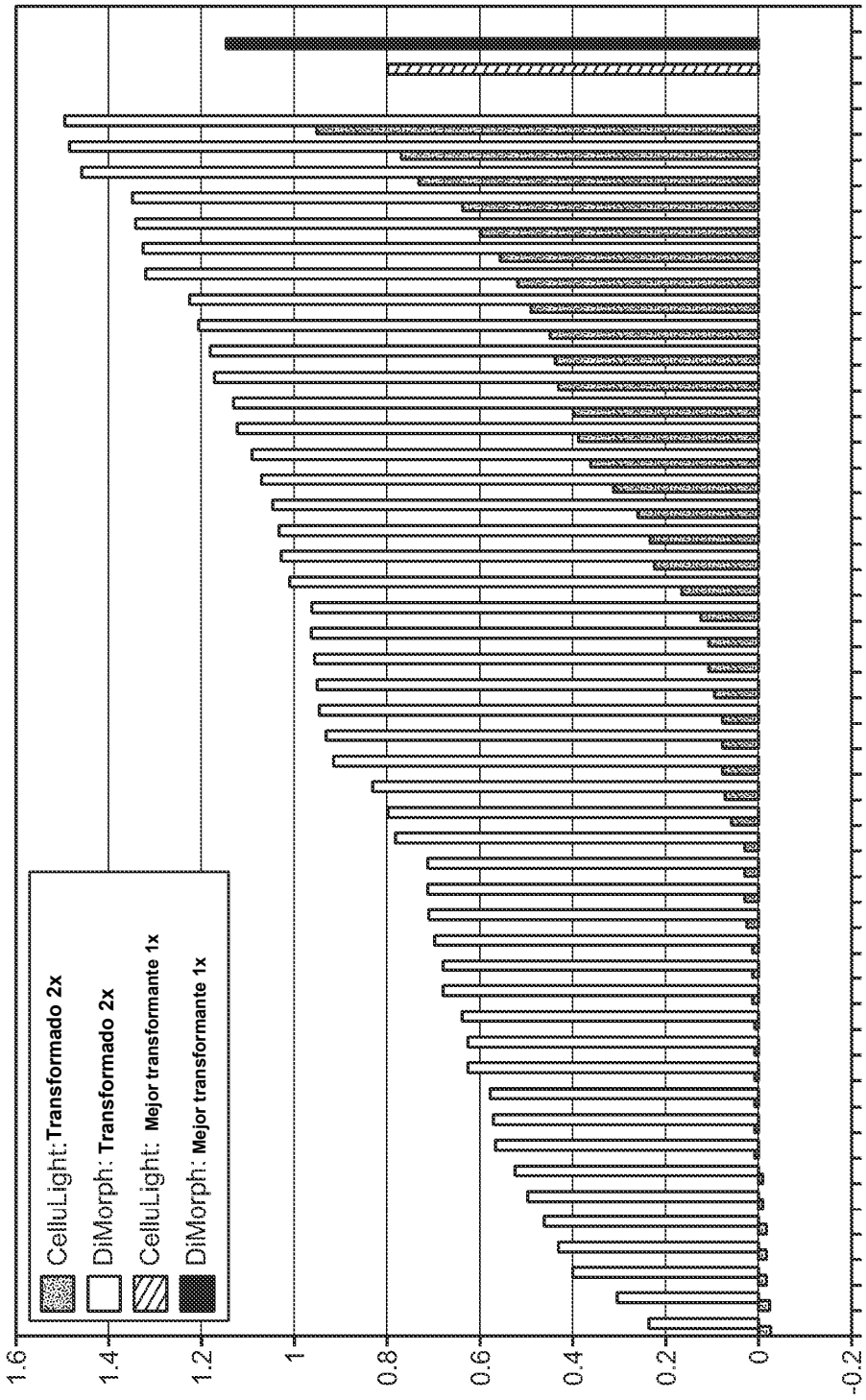
CelluLight: Transformado 2x
DiMorph: Transformado 2x
CelluLight: Mejor transformante 1x
DiMorph: Mejor transformante 1x
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
Actividad de APY
Número de clones

FIG. 9

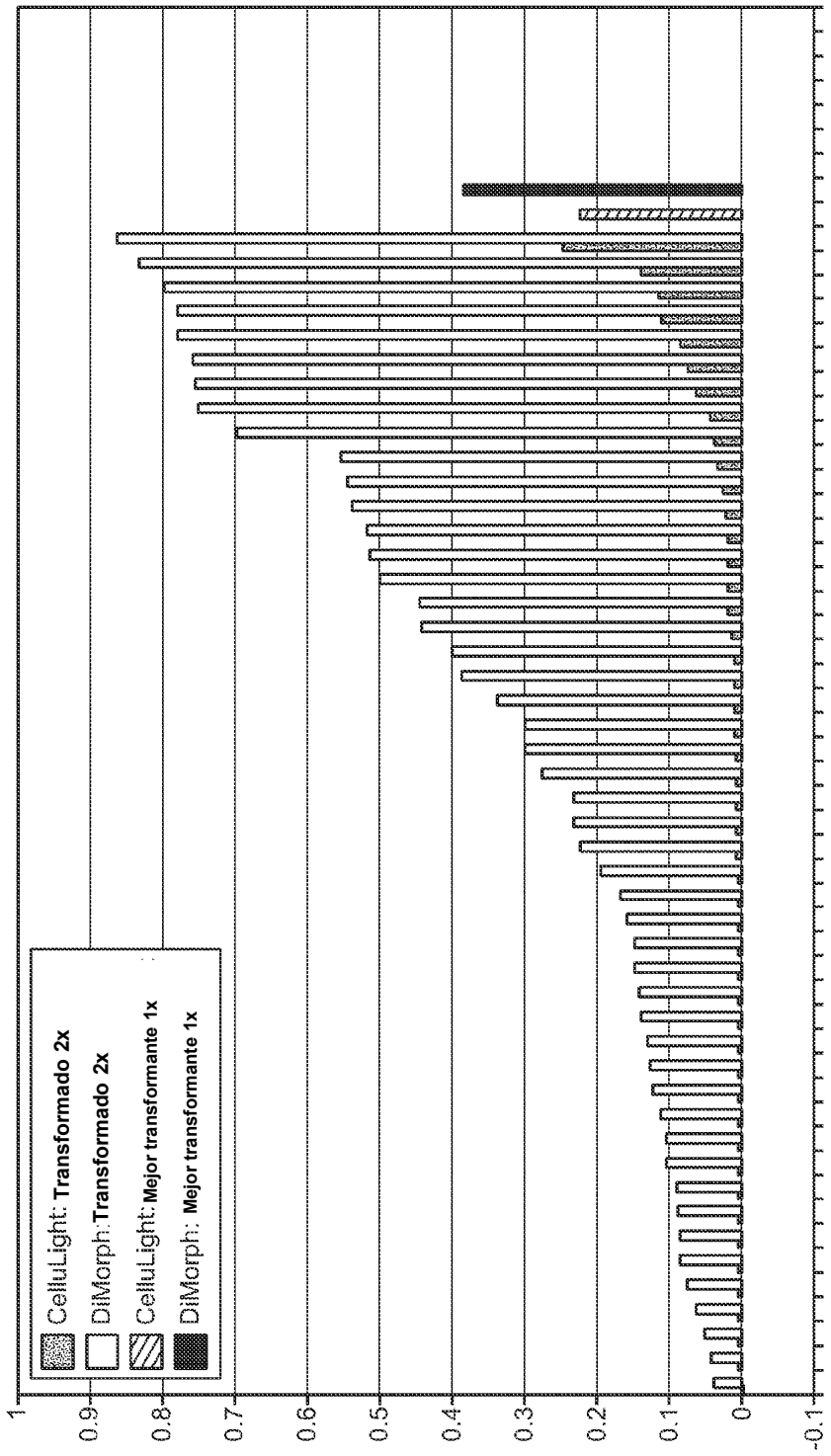
CelluLight: Transformado 2x
DiMorph: Transformado 2x
CelluLight: Mejor transformante 1x
DiMorph: Mejor transformante 1x
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
Actividad de APY
Número de clones

FIG. 10