



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112014016587-4 A2



(22) Data do Depósito: 04/01/2013

(43) Data da Publicação Nacional: 27/10/2020

(54) **Título:** CÉLULAS FÚNGICAS FILAMENTOSAS DEFICIENTES DE PROTEASE E MÉTODOS DE USO DAS MESMAS

(51) **Int. Cl.:** C12N 1/15; C12N 9/58; C12P 21/02.

(30) **Prioridade Unionista:** 05/01/2012 US 61/583,559.

(71) **Depositante(es):** NOVARTIS AG; GLYKOS FINLAND OY.

(72) **Inventor(es):** CHRISTOPHER LANDOWSKI; ANNE HUUSKONEN; JUHANI SAARINEN; ANN WESTERHOLM-PARVINEN; ANNE KANERVA; JARI NATUNEN; ANNA-LIISA HÄNNINEN; NOORA SALOVUORI; MERJA PENTTILÄ; MARKKU SALOHEIMO.

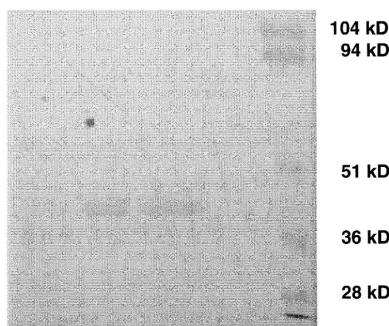
(86) **Pedido PCT:** PCT EP2013050126 de 04/01/2013

(87) **Publicação PCT:** WO 2013/102674 de 11/07/2013

(85) **Data da Fase Nacional:** 03/07/2014

(57) **Resumo:** CÉLULAS FÚNGICAS FILAMENTOSAS DEFICIENTES DE PROTEASE E MÉTODOS DE USO DAS MESMAS. A presente invenção refere-se a uma célula fúngica filamentosa compreendendo pelo menos três proteases endógenas tendo atividade reduzida e um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo, bem como a métodos para aprimorar a estabilidade de um polipeptídeo e de produção de um polipeptídeo heterólogo.

F1 F2 F3



Frações de pepstatina A

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"CÉLULAS FÚNGICAS FILAMENTOSAS DEFICIENTES DE PROTEASE E MÉTODOS DE USO DAS MESMAS"**.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se à composições e métodos úteis para a produção de proteínas heterólogas em células fúngicas filamentosas.

**ANTECEDENTES**

[002] Modificação pós-traducional de proteínas eucariotas, particularmente proteínas terapêuticas, tais como imunoglobulinas, muitas vezes é necessária para dobramento e função adequada de proteínas. Uma vez que sistemas de expressão procariotas convencionais carecem da maquinaria adequada necessária para tais modificações, sistemas de expressão alternativos têm de ser usados na produção destas proteínas terapêuticas. Mesmo onde proteínas eucariotas não tem modificações pós-traducionais, sistemas de expressão procariotas muitas vezes carecem de proteínas chaperona necessárias para dobramento apropriado. Levedura e fungos são opções atraentes para expressão de proteínas, uma vez que eles podem ser facilmente cultivados em larga escala em meios simples, o que permite baixos custos de produção e leveduras e fungos têm a maquinaria pós-traducional e chaperonas que desempenham funções similares àquelas encontradas em células de mamíferos. Além disso, estão disponíveis ferramentas para manipular a constituição genética relativamente simples de células de leveduras e fungos, bem como células eucariotas mais complexas, tais como células de mamíferos ou de insetos (De Pourcq et al., *Appl Microbiol Biotechnol*, 87 (5):1617-31). Apesar destas vantagens, muitas proteínas terapêuticas estão ainda sendo produzidas em células de mamíferos, as quais produzem proteínas terapêuticas com modificações pós-traducionais mais parecidas com as prote-



ínas humanas nativas, enquanto que as modificações pós-traducionais naturalmente produzidas por leveduras e fungos muitas vezes diferem daquelas encontradas em células de mamíferos.

[003] Para resolver essa deficiência, estão sendo desenvolvidas novas cepas de leveduras e fungos que produzem modificações pós-traducionais que se assemelham mais àquelas encontradas em proteínas humanas nativas. Assim, tem havido um interesse renovado no uso de células de leveduras e fungos para expressar proteínas mais complexas. No entanto, em virtude do foco da indústria sobre a tecnologia de cultura de células de mamíferos por tal longo período de tempo, os sistemas de expressão em células fúngicas, tal como *Trichoderma*, não são tão bem estabelecidos quanto a cultura de células de mamíferos e, portanto, sofrem de deficiências quando de expressão de proteínas de mamíferos.

[004] Assim, permanece uma necessidade na técnica por células fúngicas filamentosas aprimoradas, tais como células de fungo *Trichoderma*, que possam produzir de forma estável proteínas heterólogas, tais como imunoglobulinas, de preferência em altos níveis de expressão.

## **SUMÁRIO**

[005] São descritas aqui composições, incluindo células fúngicas filamentosas, tais como células fúngicas de *Trichoderma*, tendo atividade reduzida ou nenhuma detectável de pelo menos três proteases e que têm um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo que é produzido em níveis aumentados. São ainda descritos aqui métodos para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo heterólogo e métodos de preparo de polipeptídeos heterólogos nos quais as proteases não têm a atividade reduzida.

[006] Assim, um aspecto inclui células fúngicas filamentosas tendo atividade reduzida ou nenhuma detectável de pelo menos três pro-

teases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo produzido em um nível pelo menos duas vezes maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica filamentosa parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida. Em determinadas modalidades, quando a célula é uma célula de *Aspergillus*, a atividade total de protease é reduzida para 50% ou menos da atividade total de protease da célula de *Aspergillus* parental correspondente na qual a protease não tem atividade reduzida. Em outras modalidades, a atividade de protease total da célula fúngica filamentosa é reduzida para 49% ou menos, 31% ou menos da atividade de protease total da célula fúngica filamentosa parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida.

[007] Em determinadas modalidades, o nível de expressão de pelo menos três proteases é reduzido ou eliminado. Em determinadas modalidades, genes que codificam as três proteases compreendem, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, os três genes que codificam protease são *pep1*, *tsp1* e *slp1*. Em outras modalidades, os três genes que codificam protease são *gap1*, *slp1* e *pep1*.

[008] Em determinadas modalidades, as células fúngicas têm atividade reduzida ou nenhuma detectável de quatro proteases endógenas; genes que codificam as quatro proteases compreendem, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, os quatro genes que codificam proteases são *pep1*, *tsp1*, *slp1* e *gap1*.

[009] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, os três ou quatro genes que codifi-

cam proteases são selecionados de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp3*, *slp7*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, os três ou quatro genes que codificam proteases são selecionados de *pep1*, *pep3*, *pep4*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades, os três ou quatro genes que codificam proteases são selecionados de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *gap1*, *gap2*, *slp1*, *slp2* e *tsp1*.

[0010] Em outras modalidades, as células fúngicas têm atividade reduzida ou nenhuma detectável de cinco proteases endógenas; genes que codificam as cinco proteases compreendem, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, os cinco genes que codificam protease são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1* e *pep4*. Em outras modalidades, os cinco genes que codificam protease são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1* e *gap2*.

[0011] Em determinadas modalidades, as células fúngicas têm atividade reduzida ou nenhuma detectável de seis proteases endógenas; genes que codificam as seis proteases compreendem, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente. Em determinadas modalidades, a célula tem seis genes que codificam protease, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os seis genes que codificam proteases são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2* e *pep4*.

[0012] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, as células fúngicas têm três a seis proteases tendo atividade reduzida ou nenhuma detectável, cada uma das três a seis proteases selecionadas de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp3*, *gap1* e *gap2*.

[0013] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas

com as modalidades precedentes, a célula tem sete genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os sete genes que codificam proteases são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2*, *pep4* e *pep3*.

[0014] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula tem oito genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os genes que codificam as oito protease são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2*, *pep4*, *pep3* e *pep5*.

[0015] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica tem uma protease adicional tendo atividade reduzida, o gene que codifica a protease adicional compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e a protease adicional é selecionada de *pep7*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tpp1*, *gap2*, *slp3*, *slp5*, *slp6*, *slp7* e *slp8*.

[0016] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo de mamífero. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é glicosilado.

[0017] Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é selecionado de uma imunoglobulina, um anticorpo e seus fragmentos de ligação a antígeno, um fator de crescimento, um interferon, uma citocina e uma interleucina. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é uma imunoglobulina ou um anticorpo. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é selecionado de fator de crescimento 1 similar à insulina (**I**nsulin-like **G**rowth **F**actor 1-IGF1), hormônio de crescimento humano (**h**uman **G**rowth **H**ormone - hGH) e interferon alfa 2b (IFNa2b).

[0018] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo que não é de mamífero. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo que não é de mamífero é uma aminopeptidase, amilase, carboidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cutinase, desoxirribonuclease, esterase, alfa-galactosidase, beta-galactosidase, glucoamilase, alfa-glucosidase, beta-glucosidase, invertase, lacase, lipase, mutanase, oxidase, enzima pectinolítica, peroxidase, fosfatase, fitase, oxidase de polifenol, enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase ou xilanase.

[0019] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica contém adicionalmente atividade reduzida ou nenhuma detectável de ALG3, uma enzima manosil transferase. Em determinadas modalidades, o gene que codifica ALG3 contém uma mutação que reduz ou elimina a atividade correspondente. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica contém ainda um polinucleotídeo que codifica uma  $\alpha$ -1,2-manosidase.

[0020] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica tem uma mutação que reduz a expressão de uma protease desejada para ter atividade reduzida. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a mutação é uma deleção no gene que codifica a protease. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a mutação é uma deleção da porção do gene que codifica o domínio catalítico de protease. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica tem uma mutação pontual na porção do gene que codifica o domínio catalítico de protease.

[0021] Em outras modalidades, a redução ou eliminação da ativi-

dade de protease de uma ou mais proteases resulta de construtos de RNAi específicos para i) uma protease ou ii) duas ou mais proteases selecionadas do grupo que consiste em uma protease do tipo *pep*, uma protease de serina do tipo tripsina, uma protease de tipo *gap*, uma protease de sedolisina e uma protease do tipo *slp*. Em determinadas modalidades, os construtos de RNAi são específicos para *slp2*, *slp3*, *slp5* e/ou *slp6*.

[0022] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica contém ainda um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II. Em determinadas modalidades, o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II são codificados por um polinucleotídeo. Em determinadas modalidades, o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I é codificado por um primeiro polinucleotídeo e o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II é codificado por um segundo polinucleotídeo. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica contém ainda um polinucleotídeo que codifica uma manosidase II e/ou uma galactosil transferase. Em determinadas modalidades, a célula fúngica contém enzimas selecionadas do grupo que consiste em  $\alpha$ -1,2 manosidase, N-acetilglucosaminil transferase I, N-acetilglucosaminil transferase II, manosidase II e/ou galactosil transferase, as ditas enzimas ainda compreendendo um peptídeo de objetivação, por exemplo, um peptídeo de objetivação heterólogo para localização apropriada da enzima correspondente. Em determinadas modalidades, o peptídeo de objetivação é selecionado de SEQ ID NOs: 589-594.

[0023] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica é uma célula fúngi-

ca de *Trichoderma*, uma célula fúngica de *Myceliophthora*, uma célula fúngica de *Aspergillus*, uma célula fúngica de *Neurospora*, uma célula fúngica de *Fusarium* ou *Penicillium* ou uma célula fúngica de *Chrysosporium*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica é *Trichoderma reesei*.

[0024] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica é do tipo selvagem para protease pep4.

[0025] Outro aspecto inclui métodos para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo heterólogo por: a) fornecimento da célula fúngica filamentosa de qualquer uma das modalidades precedentes; e b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso, onde o polipeptídeo heterólogo tem estabilidade aumentada comparado com o polipeptídeo heterólogo produzido em uma célula fúngica filamentosa parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida, por exemplo, não contém as mutações dos genes que codificam as proteases. Outro aspecto inclui métodos de preparo de um polipeptídeo heterólogo por: a) fornecimento da célula fúngica filamentosa de qualquer uma das modalidades precedentes; b) cultura da célula hospedeira de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso; e c) purificação do polipeptídeo heterólogo. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica filamentosa adicional contém uma proteína veículo. Em determinadas modalidades, a proteína veículo é CBH1. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a cultura está em um meio que compreende um inibidor de protease. Em determinadas modalidades, a cultura está em um meio que tem um ou dois inibidores de protease selecionados de SBT1 e quimostatina. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo heterólogo-

go produzido de acordo com o método é um polipeptídeo de mamífero glicosilado e pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo consiste em N-glicana  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Em outras modalidades, o polipeptídeo heterólogo produzido de acordo com o método é um polipeptídeo de mamífero glicosilado e pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo consiste em N-glicana complexa. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo heterólogo produzido de acordo com o método é um polipeptídeo de mamífero glicosilado e pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo consiste em N-glicana híbrida. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo heterólogo produzido de acordo com o método é um polipeptídeo de mamífero glicosilado e pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo consiste em N-glicana G1 ou G2. Outro aspecto inclui os polipeptídeos heterólogos que podem ser obtidos por meio dos métodos conforme descrito acima.

[0026] Outro aspecto inclui células fúngicas de *Trichoderma* tendo atividade reduzida ou nenhuma detectável de pelo menos três proteases selecionadas de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *gap1* e *gap2*, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero produzido em um nível pelo menos duas vezes maior do que o nível de produção do



polipeptídeo em uma célula fúngica de *Trichoderma* parental correspondente.

[0027] Em determinadas modalidades, o nível de expressão de pelo menos três proteases é reduzido ou eliminado na célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades, os genes que codificam as pelo menos três proteases compreendem, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente na célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades, a célula fúngica de *Trichoderma* inclui três genes que codificam protease com uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease, os quais são selecionados de *gap1*, *slp1* e *pep1*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, o polipeptídeo de mamífero na célula fúngica de *Trichoderma* é um anticorpo ou seus fragmentos de ligação a antígeno ou uma imunoglobulina e as pelo menos três proteases são selecionadas de *pep1*, *pep3*, *pep4*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades, a célula fúngica de *Trichoderma* contém quatro genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os quatro genes que codificam protease com tais mutações são *pep1*, *tsp1*, *slp1* e *gap1*. Em determinadas modalidades, a célula fúngica de *Trichoderma* tem cinco genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os cinco genes que codificam protease com tais mutações são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1* e *pep4*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, o polipeptídeo de mamífero na célula fúngica de *Trichoderma* é um fator de crescimento, interferon, uma citocina ou interleucina e as três proteases com atividade reduzida são selecionadas de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *gap1*, *gap2*, *slp1*, *slp2*, *slp1* e

*tsp1*. Em determinadas modalidades, a célula fúngica de *Trichoderma* tem cinco genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os cinco genes que codificam protease com tais mutações são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades, a célula fúngica de *Trichoderma* tem seis genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os seis genes que codificam protease com tais mutações são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2* e *pep4*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica de *Trichoderma* tem sete genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente e os sete genes que codificam proteases são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2*, *pep4* e *pep3*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica de *Trichoderma* tem oito genes que codificam proteases, cada um dos quais compreende uma mutação que reduz a atividade de protease correspondente e os oito genes que codificam protease com tais mutações são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2*, *pep4*, *pep3* e *pep5*.

[0028] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica de *Trichoderma* contém ainda atividade reduzida ou não detectável de uma ou mais proteases adicionais. Em determinadas modalidades, o nível de expressão da uma ou mais proteases adicionais na célula fúngica de *Trichoderma* é reduzido ou eliminado. Em determinadas modalidades, genes que codificam uma ou mais proteases adicionais na célula fúngica de *Trichoderma* têm, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes,

os um ou mais genes que codificam protease são selecionados de *pep7*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tpp1*, *gap2*, *slp3*, *slp5*, *slp6*, *slp7* e *slp8*.

[0029] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica de *Trichoderma* contém ainda atividade reduzida ou nenhuma detectável de ALG3. Em determinadas modalidades, o gene que codifica ALG3 na célula fúngica de *Trichoderma* contém uma mutação que reduz ou elimina a atividade correspondente. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica de *Trichoderma* contém ainda um polinucleotídeo que codifica uma  $\alpha$ 1,2-manosidase. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a mutação reduz ou elimina a expressão do gene na célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a mutação é uma deleção do gene na célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a mutação é uma deleção da porção do gene que codifica o domínio catalítico de protease da célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a mutação é uma mutação pontual na porção do gene que codifica o domínio catalítico de protease da célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica de *Trichoderma* contém ainda um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II. Em determinadas modalidades, o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II são codificados por um polinucleotídeo da célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades, o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I

é codificado por um primeiro polinucleotídeo e o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II é codificado por um segundo polinucleotídeo da célula fúngica de *Trichoderma*. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica de *Trichoderma* contém ainda um polinucleotídeo que codifica uma manosidase II. Em determinadas modalidades, as proteases têm, cada uma, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 1, 17, 37, 58, 66, 82, 98, 118, 129, 166 e 182. Em determinadas modalidades, a atividade total de protease na célula fúngica de *Trichoderma* é reduzida para 49% ou menos, 31% ou menos da atividade total de protease do célula de *Trichoderma* parental correspondente, na qual as proteases não têm atividade reduzida. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero produzido em um nível pelo menos duas vezes maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica de *Trichoderma* parental correspondente. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, o polipeptídeo de mamífero é produzido por uma versão de comprimento total em um maior nível do que o nível de produção da versão de comprimento total do polipeptídeo em uma célula fúngica de *Trichoderma* parental correspondente.

[0030] Um outro aspecto inclui métodos para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo heterólogo por: a) fornecimento da célula fúngica de *Trichoderma* de qualquer uma das modalidades precedentes; e b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expres-

so, onde o polipeptídeo heterólogo tem estabilidade aumentada comparado com uma célula hospedeira que não contém as mutações dos genes que codificam as proteases. Outro aspecto inclui métodos de preparo de um polipeptídeo heterólogo por: a) fornecimento da célula fúngica de *Trichoderma* de qualquer uma das modalidades precedentes; b) cultura da célula hospedeira de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso; e c) purificação do polipeptídeo heterólogo. Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica filamentosa contém adicionalmente uma proteína veículo. Em determinadas modalidades, a proteína veículo é CBH1.

### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[0031] A Figura 1 representa um gel de PAGE que mostra frações eluídas a partir de purificação em coluna de afinidade de proteases aspárticas.

[0032] A Figura 2 representa um gel de PAGE que mostra os resultados de incubação de IgG com proteases aspárticas.

[0033] A Figura 3 representa análise de Southern blot mostrando a geração de cepas únicas com deleção de protease M181 e M195. A Figura 3A representa o sinal esperado de ORF de *pep1*:> 8 kb de M127 parental, nenhum sinal de transformantes. A Figura 3B representa o sinal esperado de 5'flanqueamento de *pep1*:> 8 kb de M127 parental, 4 kb de transformantes. A Figura 3C representa o sinal esperado de 3'flanqueamento de *pep1*:> 8 kb de M127 parental, 4,2 kb de transformantes.

[0034] A Figura 4 representa análise de Southern blot mostrando a geração de anticorpo rituximab na cepa M182 com deleção de *pep1*. A Figura 4A representa o sinal esperado de ORF de *pep1*:> 8 kb de M169 parental, nenhum sinal de transformantes. A Figura 4B representa o sinal esperado de *bar*. 1,0 + 1,7 kb de transformantes, 3,1 kb

de pTTv41, nada de M169. A Figura 4C representa o sinal esperado de *bar*. 1,8 + 2,8 kb de transformantes, 3,1 kb de pTTv41, nada de M169.

[0035] A Figura 5 representa um gel de proteína mostrando frações de pico de purificações de protease aspártica de uma cepa contendo *pep1* e uma cepa contendo  $\Delta pep1$ .

[0036] As Figuras 6A-B representam um imunoblot ilustrando que a exclusão de protease *pep2* da cepa de produção de rituximab M169 aprimorou a produção de cadeias (A) leve e (B) pesada no transformante 206A (cepa M455). As bandas que representam o fragmento de cadeia leve a 18 kD e o fragmento de cadeia pesada a 38 kD foram mais intensas na cepa M455 comparado com a cepa M169 parental.

[0037] A Figura 7 representa graficamente a atividade de protease do sobrenadante da cepa de produção de rituximab M169 e dos transformantes 98A, 116A, 198A, 201A, 206A e (M455) com deleção de protease *pep2*. Os transformantes 116A, 198A e 206A mostram atividade protease reduzida contra caseína em relação à sua cepa M169 parental.

[0038] A Figura 8 representa um imunoblot que mostra os efeitos da atividade de protease de PEP3 e PEP7 sobre a cadeia pesada de MAB01 e IGF-1 nativo. A Figura 8A representa os efeitos de atividade de protease sobre MAB01 em um pH de 5,5. A Figura 8B representa os efeitos de atividade de protease sobre MAB01 em um pH de 4,5. A Figura 8C representa os efeitos de atividade de protease sobre IGF-1 nativo em um pH de 4,5.

[0039] A Figura 9 representa um gel de PAGE que mostra protease contendo frações purificadas a partir de uma coluna de afinidade de peptídeo SIP.

[0040] A Figura 10 representa um imunoblot mostrando atividade de protease SIP sobre a cadeia pesada de MAB01.

[0041] A Figura 11 representa graficamente a atividade de protease contra caseína com e sem inibidores.

[0042] A Figura 12 representa um imunoblot mostrando os níveis de produção de cadeias pesada e leve de MAB01 após deleção de cada uma das proteases *slp1*, *slp2*, *slp3* e *gap1*. A Figura 12A mostra produção de cadeia pesada de MAB01. A Figura 12B mostra produção cadeia leve de MAB01.

[0043] A Figura 13 representa graficamente as vezes de aprimoramento na produção de cadeias pesada e leve de MAB01 após deleção de cada uma das proteases *slp1*, *slp2*, *slp3* e *gap1*. Cada barra representa a média a partir de vários dos clones mostrados na Figura 12.

[0044] A Figura 14 representa um imunoblot que mostra os níveis de produção de MAB01 a partir da cepa M244 com deleção de *gap2*. A Figura 14A mostra a produção de cadeia pesada (**Heavy Chain - HC**) de MAB01. A Figura 14B mostra a produção de cadeia leve (**Light Chain - LC**) de MAB01.

[0045] A Figura 15 representa um imunoblot que mostra os níveis de anticorpo MAB01 após incubação com o sobrenadante de *Pichia* contendo a protease GAP2.

[0046] A Figura 16 representa um imunoblot que mostra o nível de degradação de protease em IgG1 humana.

[0047] A Figura 17 representa os resultados de um zimograma do anticorpo MAB02 a partir de purificação por afinidade com uma coluna de aminobenzamidina (fracções purificadas) e de amostras de sobrenadante (sobrenadante).

[0048] A Figura 18 representa a geração da cepa M219 com deleção de protease dupla  $\Delta pep1\Delta tsp1$ . A Figura 18A representa o sinal esperado de ORF de *tsp1*: 6,4 kb de M196 parental. A Figura 18B representa o sinal esperado de 5'flanqueamento de *tsp1*: 3,9 kb de trans-

formantes, > 8 kb de M196, 3,9 kb de pTTv72. A Figura 18C representa o sinal esperado de 3'flanqueamento de *tsp1*: 2,8 kb de transformantes, > 8 kb de M196, 3,9 kb de pTTv72.

[0049] A Figura 19 representa análise de Southern blot mostrando a geração da cepa M194 com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta tsp2$ . A Figura 19A representa o sinal esperado de ORF de *tsp1*: kb de M181 parental. A Figura 19B representa o sinal esperado de *bar*. 1,4 + 2,5 kb de transformantes, 2,9 kb de pTTv42, nada de M181. A Figura 19C representa o sinal esperado de *bar*. 1,9 + 3,2 kb de transformantes, 2,9 kb de pTTv42, nada de M181.

[0050] A Figura 20 representa graficamente os dados de atividade de protease normalizados a partir de sobrenadantes de cultura de cada um dos sobrenadantes com deleção de protease e a cepa parental M124. A atividade de protease foi medida em um pH de 5,5 nas primeiras cinco cepas e em um pH de 4,5 nas últimas três cepas com deleção. A atividade de protease é contra caseína fluorescente verde. A cepa com deleção de seis proteases tem apenas 6% de atividade da cepa parental de tipo selvagem e a cepa com deleção de 7 proteases tinha cerca de 40% menos atividade do que cepa com deleção de 6 proteases.

[0051] A Figura 21A representa os resultados de um zimograma de MAB02 com frações purificadas em aminobenzamidina a partir dos sobrenadantes de fermentação. A Figura 21B representa um gel de SDS PAGE (7%) de frações purificadas em aminobenzamidina a partir dos sobrenadantes de fermentação.

[0052] A Figura 22 representa os resultados de um ensaio zimograma de MAB02 com frações purificadas por afinidade SBTI contendo proteases. As principais atividades proteolíticas aparecem em branco, onde a protease degradou o anticorpo MAB02. Fração 3 concentrada (cf3) e frações 1-4 não concentradas (fl-f4) foram passadas no gel de



zimograma.

[0053] A Figura 23 representa um gel de SDS PAGE mostrando frações purificadas por afinidade de SBTI contendo proteases. As frações cf3 e cf4 concentradas são mostradas no gel.

[0054] A Figura 24 ilustra uma imunoblot que mostra o nível de degradação de cadeia pesada de rituximab por proteases purificadas em SBTI.

[0055] A Figura 25 representa um imunoblot que mostra o nível de degradação de anticorpo quando incubado durante a noite com sobrenadantes de *Pichia* contendo subtilisina. A Figura 25A mostra a degradação de cadeia pesada de rituximab por protease. A Figura 25B mostra a degradação de cadeia pesada de MAB01 por protease.

[0056] A Figura 26 representa análise Southern blot que mostra a geração da cepa M277 com deleção tripla de protease. A Figura 26A representa o sinal esperado de ORF de *slp1*: 6,5 kb de parentais (M219, M228) apenas. A Figura 26B representa o sinal esperado de 5'flanqueamento de *slp1*: 6,5 kb de parentais, 3,3 kb de transformantes, 4,4 kb do plasmídeo de controle pTTv126. A Figura 26C representa o sinal esperado de 3'flanqueamento de *slp1*: 6,5 kb de parentais, 2,3 kb de transformantes, 4,4 kb do plasmídeo de controle pTTv126.

[0057] A Figura 27 representa um ensaio zimograma de MAB02 que mostra a atividade dos sobrenadantes da cepa com deleção de protease. Regiões brancas sobre o gel corado indicam uma área de atividade de protease.

[0058] A Figura 28 representa graficamente a atividade total de protease de sobrenadantes de cultura com deleção de protease comparado com a atividade de M124 de tipo selvagem.

[0059] A Figura 29 mostra análise Southern blot que mostra a geração da cepa M307 com deleção quádrupla de protease. a Figura 29A representa o sinal esperado de ORF de *gap1*: 4 kb de parental

(M277 2A = M306) apenas. A Figura 29B representa o sinal esperado de 5'flanqueamento de *gap1*: 5,5 kb de parental, 3,4 kb de transformantes, 4,1 kb do plasmídeo de controle pTTv117. A Figura 29C representa o sinal esperado de 3'flanqueamento de *gap1*: 5,5 kb de parental, 3,1 kb de transformantes, 4,1 kb do plasmídeo de controle pTTv117.

[0060] A Figura 30 representa graficamente a atividade total de protease em cepas com deleção tripla e quádrupla comparado com a cepa M124 de tipo selvagem.

[0061] A Figura 31 representa graficamente a atividade de protease ao longo do tempo entre a cepa M304 com deleção tripla e a cepa M371 com deleção quádrupla.

[0062] A Figura 32 representa análise Southern blot que mostra a geração da cepa M369 com deleção quádrupla de protease. A Figura 32A representa o sinal esperado de ORF de *gap2*: 4,9 kb de parental (M307). A Figura 32B representa o sinal esperado de 5'flanqueamento de *gap2*: 4,9 kb de parental, 2,3 kb de transformantes, 2,3 kb do plasmídeo de controle pTTv145. A Figura 32C representa o sinal esperado de 3'flanqueamento de *gap2*: 4,9 kb de parental, 3,8 kb de transformantes, 3,8 kb do plasmídeo de controle pTTv145. A Figura 32D representa análise Southern blot que mostra a geração de *pyr4*- a partir da cepa M369 com deleção quádrupla de protease, resultando na cepa M381 (clone 14). O sinal esperado é 5'flanqueamento de *gap2*: 1,5 kb de todas as cepas, 4,1 kb do plasmídeo de controle pTTv145. A Figura 32E representa análise Southern blot que mostra a geração de *pyr4*- a partir da cepa M369 com deleção quádrupla de protease, resultando na cepa M381 (clone 14). O sinal esperado é 3'flanqueamento de *gap2*: 3,6 kb de M307, 2,7 kb de M369 + clones *loopout*, 3,8 kb do plasmídeo de controle pTTv145.

[0063] A Figura 33 representa graficamente a atividade de protea-

se de sobrenadantes do dia 5 retirados de culturas em frasco de agitação feitos com a cepa M307 com deleção de 4 proteases, a cepa M369 com deleção de 5 proteases e os 6 transformantes com deleção de protease 10B, 44B, 97A, 97B e 120A. Caseína fluorescente foi incubada com os sobrenadantes diluídos em tampão de citrato, pH de 4,5, para detectar a atividade de protease.

[0064] A Figura 34 representa análise Southern blot que mostra a geração de cepas M396 e M400 com deleção de 6 proteases. A Figura 34A representa o sinal esperado de ORF de *pep4*: 6,3 kb de M307 e M369. A Figura 34B representa o sinal esperado de ORF de *pep4*: 6,3 kb de M307 e M369, nenhum sinal de transformantes. A Figura 34C representa o sinal esperado de 5'flanqueamento de *pep4*: 6,3 kb de M307 e M369, 4,8 kb de transformantes, 4,0 kb de pTTv181. A Figura 34D representa o sinal esperado de 3'flanqueamento *pep4*: 6,3 kb de M307 e M369, 2,1 kb de transformantes, 4,0 kb de pTTv181. A Figura 34E representa análise Southern blot que mostra a geração de *pyr4*- a partir de cepas M396 com deleção de 6 proteases. O sinal esperado é 3'flanqueamento de *pep4*: 6,3 kb de M307 e M369, 2,1 kb de transformantes repurificados, 4,9 kb dos clones *loopout*.

[0065] A Figura 35 representa um imunoblot que mostra a quantidade de fragmentos de cadeia pesada de rituximab criados *in vitro* por proteases de sobrenadante.

[0066] A Figura 36 representa um imunoblot que mostra a degradação de cadeia pesada e cadeia leve de amostras de sobrenadante de culturas tratadas com SBTI e controles não tratados. A Figura 36A mostra a degradação de cadeia pesada. A Figura 36B mostra a degradação de cadeia leve.

[0067] A Figura 37 representa um imunoblot que mostra o nível de degradação de cadeia pesada e cadeia leve de amostras de sobrenadante de culturas tratadas com quimostatina e pepstatina A ou de cul-

turas de controle não tratadas. A Figura 37A mostra a degradação de cadeia leve. A Figura 37B mostra a degradação de cadeia pesada.

[0068] A Figura 38 representa o processo de purificação de anticorpos a partir de sobrenadantes de cultura de *T. reesei*.

[0069] A Figura 39 representa um imunoblot que mostra a estabilidade aprimorada das cadeias pesada (**H**eavy **C**hain - HC) e leve (**L**ight **C**hain - LC) de anticorpo a partir de células de *T. reesei* contendo uma deleção da protease *pep1*. Três anticorpos modelo foram testados no sobrenadante em um grande frasco de agitação ( $\Delta pep1$  e M124) e sobrenadante de fermentação (pH de 5,5; 28 °C; 20 g/L de extrato de grão consumido, 60 g/L de lactose).

[0070] A Figura 40 mostra um imunoblot que mostra a produção aprimorada da cadeia pesada de rituximab (Rx) a partir de células de *T. reesei* contendo uma deleção da protease *tsp1*. Os transformantes 12-2A e 12-16A mostram claramente mais cadeia pesada comparado com a cepa parental.

[0071] A Figura 41 representa um imunoblot que mostra a degradação reduzida de cadeia pesada de MAB01 após incubação durante a noite com sobrenadante a cepa M277 com deleção tripla de protease. Após incubação durante a noite no sobrenadante de cultura do dia 5, havia 2,5 vezes mais cadeia pesada encontrada no sobrenadante com deleção tripla de protease comparado com o sobrenadante da cepa M124 de controle, a qual não tem deleções de protease. Quando incubado no sobrenadante de cultura de 7 dias, havia 4 vezes mais cadeia pesada encontrada no sobrenadante com deleção tripla de protease comparado com o sobrenadante da cepa M124 de controle.

[0072] A Figura 42 representa um estudo de degradação de proteínas modelo. Sobrenadante não diluído da cepa com deleção de 6 proteases foi usado em um pH de 4,2 para enriquecimento em proteínas modelo puras (0,05 µg/µl). Citrato de sódio a 50 mM, pH de 4,0, enri-

quecido em proteínas modelo (0,05 µg/µl) é mostrado como um controle de tampão. Os sobrenadantes enriquecido e de controle foram incubados durante 20 horas a 37 °C. 10 µ de cada amostra foram carregados em géis de SDS PAGE a 18%. O hGH migrou a 22 kD, o IFNa2b migrou a 19,4 kDa e o IGF1 migrou a 7,5 kD.

[0073] A Figura 43 representa a testagem de estabilidade da cadeia pesada de anticorpo MAB01 em sobrenadantes da cepa com deleção de 6 proteases. O anticorpo MAB01 estava presente no sobrenadante não diluído a 0,05 µg/µl. 10 µL de cada amostra foram carregados sobre um gel de SDS PAGE a 4-20%. A cadeia pesada era estável após uma incubação de 20 horas a 37 °C no sobrenadante da cepa com deleção de 6 proteases em um pH de 4,2. A cadeia pesada foi detectada com anticorpo anticadeia pesada de IgG AP-conjugado (Sigma #A3188) diluído a 1:30.000 em TBST. A cadeia pesada de comprimento total migrou a 50 kD sobre o gel.

[0074] A Figura 44 representa amostras de 4 dias de hormônio de crescimento humano culturas em 24 cavidades com e sem inibidores e suplementos. 12 µl de cada sobrenadante foram carregados. Anticorpo primário de camundongo anti-hGH da Acris, catálogo #AM00401PU-N (diluído a 2 µg/ml em TBST) e anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado da BioRad (#170-6520) diluído a 1:10000. Padrão de hGH (200 ng), Abeam catálogo #ab51232. A proteína hGH de comprimento total migra a 22 kD.

[0075] A Figura 45 representa uma filogenia de proteases aspárticas de *T. reesei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* e *A. niger*. O alinhamento foi criado com Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a árvore foi calculada usando a distância média com BLOSUM62.

[0076] A Figura 46 representa uma filogenia de proteases subtilisi-

na de *T. reesei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* e *A. niger*. O alinhamento foi criado com Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a árvore foi calculada usando a distância média com BLOSUM62. "pyr" significa pirolisina, "prKsf3" significa proteinase K, subfamília 3; prtA, prtK, prJ, prtF e prtBCI significam subfamílias conforme descrito em Bryant et al. (2009) *BMC Evolutionary Biology* 9: 168, doi:10.1186/1471-2148-9-168, Figura 5 e arquivo adicional N° 8.

[0077] A Figura 47 representa uma filogenia de proteases glutâmicas de *T. reesei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* e *A. niger*. O alinhamento foi criado com Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a árvore foi calculada usando a distância média com BLOSUM62.

[0078] A Figura 48 representa uma filogenia de proteases sedolisina de *T. reesei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *A. nidulans* e *A. niger*. O alinhamento foi criado com Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a árvore foi calculada usando a distância média com BLOSUM62. Uma vez que slp7 se assemelha às proteases sedolisina, ela está incluída na árvore. Sequências de *Aspergillus fumigatus* são incluídas para auxiliar na determinação das relações entre sedolisinas. As abreviaturas sedA/B/C/D/E na frente de cada protease são com base em Reichard et al. (2006) *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 72, páginas 1739-1748, Figura 4, a partir do qual pesquisa pelo BLAST com sedolisina de *A. fumigatus* pela protease correspondente foi recuperada.

[0079] Figura 49: A: Desenhos esquemáticos para os plasmídeos de expressão pTTv67 e pTTv99. A cadeia pesada de MAB01 está con-

tida dentro do vetor pTTv67 e a cadeia leve está contida dentro do vetor pTTv99. B: Desenho esquemático para o vetor de expressão pTTv223. As cadeias pesada e leve de MAB01 estão contidas dentro do vetor pTTv223.

[0080] Figura 50: A: Análise Western blot de produção de cadeias pesada e leve de MAB01 em um pH de 5,2 em uma fermentação descontínua da cepa M507 de produção de MAB01. Os anticorpos usados foram Sigma A3188 contra a cadeia pesada (blot à esquerda) e Sigma A3813 contra a cadeia leve (blot à direita), ambos em diluições de 1:10.000. Códigos de amostra denotam o tempo de fermentação em dias. 0,1 µl de sobrenadante foi colocado em cada *lane* em ambas as blots. B: Análise Western blot de produção de cadeias pesada e leve de MAB01 na fermentação descontínua da cepa M507 de produção de MAB01 em um pH de 5,5. Os anticorpos usados foram Sigma A3188 contra a cadeia pesada (blot à esquerda) e Sigma A3813 contra a cadeia leve (blot à direita), ambos em diluições de 1:10.000. Códigos de amostra denotam o tempo de fermentação em dias. 0,1 µl de sobrenadante foi colocado em cada *lane* em ambas as blots.

[0081] Figura 51. Análise Western blot de produção de cadeias pesada e leve de MAB01 em cepas M304 na fermentação descontínua de bio00503b em um pH de 5.5. Os anticorpos usados foram Sigma A3188 contra a cadeia pesada e Sigma A3813 contra a cadeia leve. No dia 8 a partir da fermentação de M304, bio00477b foi incluído como um controle. Códigos de amostra denotam o tempo de fermentação em dias. 0,1 µl de sobrenadante foi aplicado em ambas as blots. O imunoblot mais superior é a cadeia pesada e o imunoblot inferior é a cadeia leve.

[0082] Figura 52. O vetor de expressão pTTv204 RNAi.

[0083] Figura 53: Imunoblot que detecta a produção de cadeia pesada de MAB01 em cepas expressando RNAi que expressam RNAi

que causa *knockdown* de *slp2*.

[0084] A Figura 54A representa a quantificação do nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b a partir da amostra de 3 dias de fermentação de M401. 1  $\mu$ l/2  $\mu$ l/4  $\mu$ l do sobrenadante foram carregados em um gel de SDS PAGE a 4-20%. Immunoblot foi feito com anticorpo anti-IFN- $\alpha$  2b da Abeam (#ab9386) diluído a 1  $\mu$ g/ml em TBST. O anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado da BioRad (#170-6520) foi diluído a 1:5000 em TBST. Os padrões de proteína foram carregadas sobre o gel correspondente a 50 ng, 100 ng e 200 ng de IFN- $\alpha$  2b de comprimento total. Quantificação densitométrica foi feita com o software Totallab Quant TL100. Para a quantificação, a amostra de 2  $\mu$ l era mais representativa. Controle de IFN- $\alpha$  2b de comprimento total (100 ng) migra a 19,3 kD e IFN- $\alpha$  2b ligado a veículo a 70 kDa.

[0085] A Figura 54B descreve análise immunoblot para as amostras dos dias 3-6 de culturas de fermentação de M577 e M652. 0,2  $\mu$ l de sobrenadante de crescimento foram carregados a um gel de SDS PAGE a 4-20%. Immunoblot foi feito com anticorpo anti-IFN- $\alpha$  2b da Abeam (#ab9386) diluído a 1  $\mu$ g/ml em TBST. O anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado da BioRad (#170-6520) foi diluído a 1:5000 em TBST. Controle de IFN- $\alpha$  2b de comprimento total (100 ng) migra a 19,3 kD e IFN- $\alpha$  2b ligado a veículo a 70 kDa.

[0086] A Figura 55 representa a quantificação do nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b a partir das amostras do dia 4 (fermentação M577) e dia 3 (fermentação M652). 0,05  $\mu$ l e 0,1  $\mu$ l de sobrenadante foram carregados de cada amostra para um gel de SDS PAGE a 4-20%. Immunoblot foi feito com anticorpo anti-IFN- $\alpha$  2b da Abeam (#ab9386) diluído a 1  $\mu$ g/ml em TBST. Anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado da BioRad (#170-6520) foi diluído a 1:5000 em TBST. Os padrões de proteína foram carregados sobre o gel cor-



respondente a 50 ng, 100 ng e 200 ng de IFN- $\alpha$  2b de comprimento total. Quantificação densitométrica foi feita com o software Totallab Quant TL100. Para a quantificação, amostras de 0,1  $\mu$ l foram mais representativas. Controle de IFN- $\alpha$  2b de comprimento total (100 ng) migra a 19,3 kD e IFN- $\alpha$  2b ligado a veículo a 70 kDa.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

[0087] A presente invenção refere-se à métodos aprimorados de produção de polipeptídeos heterólogos recombinantes em células fúngicas filamentosas que têm atividade reduzida ou nenhuma de pelo menos três proteases. A presente invenção baseia-se, em parte, na descoberta surpreendente de que redução da atividade de uma combinação específica de proteases endógenas em células fúngicas filamentosas aumenta a expressão e estabilidade de uma variedade de proteínas heterólogas expressas de forma recombinante, tais como imunoglobulinas e fatores de crescimento. Embora outros tenham criado células fúngicas de *Trichoderma* com uma ou mais proteases inativadas, eles não forneceram orientação sobre quais proteases são mais relevantes para aumentar a expressão e estabilidade de tipos específicos de proteínas, tais como proteínas de mamíferos. Por exemplo, o documento WO2011/075677 descreve determinadas proteases que podem sobre *knockout* em *Trichoderma* e descreve ainda células fúngicas de *Trichoderma* que são deficientes em várias proteases. No entanto, o documento WO2011/075677 não fornece qualquer orientação sobre quais das proteases têm um impacto negativo sobre a expressão e estabilidade de proteínas de mamíferos, tais como imunoglobulinas ou fatores de crescimento, uma vez que nenhum exemplo de expressão de quaisquer proteínas de mamíferos é descrito no mesmo. Além disso, o documento WO2011/075677 descreve apenas expressão heteróloga de uma única proteína fúngica em cada uma de três diferentes cepas fúngicas deficientes em uma única protease. As-

sim, provavelmente aqueles versados na técnica interpretariam o documento WO2011/075677 como ensinando que inativação de cada protease única seria suficiente para produção de proteína heteróloga. Yoon et al. (2009, *Appl Microbiol Biotechnol* 82: 691-701, 2010: *Appl Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s00253-010-2937-0) reportaram a construção de entidades com inativação de gene de protease de cinco e dez vezes para produção de proteína heteróloga em *Aspergillus oryzae*. As células de entidades com inativação de 10 proteases aprimoraram o rendimento de produção de quimosina em apenas 3,8 vezes, apesar do número elevado de genes de protease inativados. Van den Hombergh et al. reportaram uma entidade com inativação tripla de genes de protease de *Aspergillus niger*. Embora os dados mostrem uma redução na atividade de protease, não há nenhum exemplo de qualquer produção de proteína de mamífero descrito no mesmo.

[0088] Os Requerentes mostram, surpreendentemente, que várias proteases são relevantes para redução de atividade total de protease, aumento de produção de proteínas heterólogas e estabilização das proteínas heterólogas após expressão em células fúngicas filamentosas, tais como células fúngicas de *Trichoderma*. Em particular, os inventores identificaram proteases que são, na verdade, expressas em células fúngicas de *Trichoderma* (em oposição a meramente serem codificadas no genoma) por meio de purificação destas proteases e determinação de quais têm atividades que são mais relevantes em degradação de proteínas heterólogas, tais como proteínas de mamíferos. Adicionalmente, os inventores confirmaram que deleção dos genes responsáveis pelas atividades de proteases em particular obteve uma redução substancial da atividade total de protease, a qual se correlaciona com um aumento na estabilização de proteína tanto em termos de quantidade quanto qualidade das proteínas produzidas em células fúngicas filamentosas contendo tais deleções e resultou em um au-

mento na produção de proteínas heterólogas de comprimento total nas células. Descobriu-se também que células fúngicas de *Trichoderma* modificadas para reduzir a atividade de pelo menos três genes de protease resultaram em um aumento sinérgico imprevisto na produção de proteínas de mamífero de comprimento total, tais como anticorpos, proteínas terapêuticas ou variantes de anticorpos, tais Fab ou anticorpos com um único domínio. Em outras palavras, a quantidade de proteínas de mamíferos de comprimento total produzida foi maior do que a soma das quantidades produzidas em células fúngicas de *Trichoderma* contendo apenas uma ou duas deleções de genes de protease. Assim, em contraste ao documento WO2011/075677, os inventores mostraram que produção de proteínas heterólogas em células fúngicas filamentosas intactas, tais como células fúngicas de *Trichoderma*, pode ser obtida por meio de redução ou deleção da atividade de pelo menos três proteases nas células.

[0089] Consequentemente, determinados aspectos da presente descrição fornece células fúngicas filamentosas que produzem níveis aumentados de uma proteína heteróloga por ter atividade reduzida ou nenhuma de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo produzido em um nível pelo menos duas vezes maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica filamentosa parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida. Em outras palavras, o aumento desejado do nível de produção de proteína heteróloga é determinável comparando-se o nível de produção da proteína heteróloga em uma célula fúngica filamentosa tendo atividade reduzida de pelo menos três proteases com aquele de uma célula fúngica filamentosa a qual não tem tal atividade reduzida, mas é, de outro modo, idêntica à célula que exhibe o nível aumentado.

[0090] Outros aspectos da presente descrição proporcionam métodos para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo heterólogo, por: a) fornecimento de uma célula fúngica filamentosa da presente descrição tendo atividade reduzida ou nenhuma de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo; e b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso, onde o polipeptídeo heterólogo tem estabilidade aumentada comparado com uma célula hospedeira que não contém as mutações dos genes que codificam as proteases.

[0091] Ainda outros aspectos da presente descrição proporcionam métodos de preparo de um polipeptídeo heterólogo por: a) fornecimento de uma célula fúngica filamentosa da presente descrição tendo atividade reduzida ou nenhuma de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo; b) cultura da célula hospedeira de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso; e c) purificação do polipeptídeo heterólogo.

[0092] Determinados aspectos da presente descrição também fornecem células fúngicas de *Trichoderma* que produzem níveis aumentados de um polipeptídeo de mamífero por ter atividade reduzida ou nenhuma de pelo menos três proteases selecionadas de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *gap1* e *gap2*, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero produzido em um nível pelo menos duas vezes maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica de *Trichoderma* parental correspondente na qual as proteases não têm a atividade reduzida. Em outras palavras, o aumento desejado no nível de produção de proteína heteróloga é determinável comparando-se o nível de produção da proteína heteróloga

em uma célula fúngica de *Trichoderma* tendo a atividade reduzida de pelo menos três proteases com aquele de uma célula fúngica de *Trichoderma* que não tem tal atividade reduzida mas é, de outro modo, idêntica à célula que exhibe o nível aumentado.

[0093] Outros aspectos da presente descrição proporcionam métodos para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo de mamífero por: a) fornecimento de uma célula fúngica de *Trichoderma* da presente descrição que tem atividade reduzida de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero; e b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo de mamífero seja expresso, onde o polipeptídeo de mamífero tem estabilidade aumentada comparado com uma célula hospedeira que não contém as mutações dos genes que codificam as proteases.

[0094] Outros aspectos da presente descrição proporcionam métodos de preparo de um polipeptídeo de mamífero por: a) fornecimento de uma célula fúngica de *Trichoderma* da presente descrição que tem atividade reduzida de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero; b) cultura da célula hospedeira de modo que o polipeptídeo de mamífero seja expresso; e c) purificação do polipeptídeo de mamífero.

### **Definições**

[0095] Conforme usado aqui, um "imunoglobulina" refere-se a uma proteína multimérica contendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve covalentemente acopladas juntas e capaz de se combinar especificamente com um antígeno. Moléculas de imunoglobulinas são uma grande família de moléculas que inclui vários tipos de moléculas, tais como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

[0096] Conforme usado aqui, um "anticorpo" refere-se à moléculas

de imunoglobulina intactas, bem como fragmentos dos mesmos, os quais são capazes de se ligar a um antígeno. Estes incluem moléculas de anticorpo híbridas (quiméricas) (vide, por exemplo, Winter et al., *Nature* 349: 293-99225, 1991; e Patente dos Estados Unidos N° 4.816.567); fragmentos F(ab')<sub>2</sub> e F(ab) e moléculas de Fv; heterodímeros não covalentes [227, 228]; moléculas de Fv com uma única cadeia (scFv) (vide, por exemplo, Huston et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5897-83, 1988); construtos de fragmentos de anticorpo diméricos e triméricos; minicorpos (vide, por exemplo, Pack et al., *Biochem* 31, 1579-1584, 1992; e Cumber et al., *J. Immunology* 149B, 120-26, 1992); moléculas de anticorpo humanizadas (vide, por exemplo, Riechmann et al., *Nature* 332, 323-27, 1988. Verhoeyan et al., *Science* 239, 1534-1536, 1988; e documento GB 2.276.169); e quaisquer fragmentos funcionais obtidos a partir de tais moléculas, bem como anticorpos obtidos através de processos não convencionais, tal como exibição em fagos. De preferência, os anticorpos são anticorpos monoclonais. Métodos de obtenção de anticorpos monoclonais são bem conhecidos na técnica.

[0097] Conforme usado aqui, um "peptídeo" e "polipeptídeo" são sequências de aminoácidos incluindo uma pluralidade de resíduos de aminoácidos polimerizados consecutivos. Para fins da presente invenção, tipicamente, peptídeos são aquelas moléculas que incluem até 50 resíduos de aminoácidos e polipeptídeos incluem mais de 50 resíduos de aminoácidos. O peptídeo ou polipeptídeo pode incluir resíduos de aminoácidos modificados, resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente não codificados por um códon e resíduos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente. Conforme usado aqui, "proteína" pode referir-se a um peptídeo ou um polipeptídeo de qualquer tamanho.

### ***Proteases da Invenção***

[0098] A invenção descrita aqui refere-se à células fúngicas fila-

mentosas, tais como células fúngicas de *Trichoderma*, que produzem níveis aumentados de um polipeptídeo heterólogo, tal como um polipeptídeo de mamífero, por terem atividade reduzida ou nenhuma detectável de pelo menos três proteases presentes nas células. Tais proteases encontradas em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo heterólogo normalmente catalisam a degradação significativa dos polipeptídeos recombinantes expressos. Assim, através de redução ou eliminação da atividade de proteases em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo heterólogo, a estabilidade do polipeptídeo expresso é aumentada, resultando em um aumento no nível de produção do polipeptídeo e, em algumas circunstâncias, aprimoramento de qualidade do polipeptídeo produzido (por exemplo, de comprimento total em vez de degradado).

[0099] Proteases incluem, sem limitação, proteases aspárticas, proteases de serina de tipo tripsina, proteases subtilisina, proteases glutâmicas e proteases sedolisina. Tais proteases podem ser identificadas e isoladas a partir de células fúngicas filamentosas e testadas para determinar se redução de sua atividade afeta a produção de um polipeptídeo recombinante a partir da célula fúngica filamentosa. Métodos para identificação e isolamento de proteases são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, cromatografia de afinidade, ensaios de zimograma e eletroforese em gel. Uma protease identificada pode, então, ser testada por meio de deleção do gene que codifica a protease identificada de uma célula fúngica filamentosa que expressa um polipeptídeo recombinante, tal como um polipeptídeo heterólogo ou de mamífero, e determinação se a deleção resulta em uma diminuição na atividade total de protease da célula, por exemplo, para um nível de 49% ou menos ou 31% ou menos, da atividade de protease total da célula fúngica filamentosa parental correspondente; e um aumento no nível de produção do polipeptídeo recombinante expresso,

por exemplo, duas vezes maior do que o nível de produção na célula fúngica filamentosa parental correspondente. Métodos para deleção de genes, medição de atividade total de protease e medição dos níveis de proteína produzida são bem conhecidos na técnica e incluem os métodos descritos aqui. A "célula fúngica filamentosa parental correspondente" refere-se à célula correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida ou eliminada.

### **Proteases Aspárticas**

[00100] Proteases aspárticas são enzimas que usam um resíduo de aspartato para hidrólise das ligações peptídicas em proteínas e polipeptídeos. Tipicamente, proteases aspárticas contêm dois resíduos de aspartato altamente conservados em seu sítio ativo os quais são otimamente ativos em pH ácido. Proteases aspárticas de organismos eucariotas, tais como fungos *Trichoderma*, incluem pepsinas, catepsinas e reninas. Tais proteases aspárticas têm uma estrutura com dois domínios, a qual acredita-se surgir de uma duplicação do gene ancestral. Consistente com tal evento de duplicação, a duplicação global de cada domínio é similar, embora as sequências dos dois domínios tenham começado a divergir. Cada domínio contribui com um dos resíduos de aspartato catalíticos. O sítio ativo está em uma fenda formada pelos dois domínios das proteases aspárticas. Proteases aspárticas eucariotas incluem ainda pontes de dissulfureto conservadas, o que pode auxiliar na identificação dos polipeptídeos como sendo proteases de ácido aspártico.

[00101] Nove proteases aspárticas foram identificados em células fúngicas de *Trichoderma*: *pep1* (tre74156); *pep2* (tre53961); *pep3* (tre121133); *pep4* (tre77579), *pep5* (tre81004), *pep7* (tre58669), *pep8* (tre122076), *pep11* (tre121306) e *pep12* (tre119876)).

### ***Pep1***

[00102] Exemplos de proteases *pep1* adequadas incluem, sem limi-



tação, *pep1* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 1), gi|11558498 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 2), gi|47027997 de *Trichoderma asperellum* (SEQ ID NO: 3), jgi|Triat21297887 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 4), jgi|TriviGv29\_8\_2181777 de *Trichoderma virens* (SEQ ID NO: 5), jgi|Trire21afm:Afu5g13300 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 6), gi|94730408 de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 7), gi|322712783 de *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO : 8), gi|46126795 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 9), gi|18448713 de *Fusarium venenatum* (SEQ ID NO: 10), gi|342879173 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 11), gi|320591399 de *Grosmannia clavigera* (SEQ ID NO: 12), gi|302422750 de *Verticillium alboatrum* (SEQ ID NO: 13), gi|116182964 de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO: 14), gi|85110723 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 15), gi|336463990 de *Neurospora tetrasperma* (SEQ ID NO: 16), gi|367030924 de *Myceliophthora thermophila* (SEQ ID NO: 491), gi|255953325 de *Penicillium chrysogenum* (SEQ ID NO: 492), gi|350639535 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 493), gi|67541436 de *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 494) e homólogos das mesmas.

[00103] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep1*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOS: 1-16, SEQ ID NOS: 491-494. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOS: 1-16, SEQ ID NOS: 491-494.

[00104] Em algumas modalidades, *pep1* é *pep1* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep1* de *T. Reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 1. Em outras modalidades, uma protease da pre-

sente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 1. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 1.

### **Pep2**

[00105] Exemplos de proteases *pep2* adequadas incluem, sem limitação, *pep2* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 182), jgi|Triat2|142040 de *T. Atroviride* (SEQ ID NO: 183), jgi|TriviGv29\_8\_2153481 de *T. virens* (SEQ ID NO: 184), gi|346326575 de *Cordyceps militaris* CM01 (SEQ ID NO: 185), gi|85111370 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 495) e homólogos das mesmas.

[00106] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep2*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 182-185, SEQ ID NO: 495. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 182-185, SEQ ID NO: 495.

[00107] Em algumas modalidades, *pep2* é *pep2* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep2* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 182. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 182. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 182.

### **Pep3**

[00108] Exemplos de proteases *pep3* adequadas incluem, sem limitação, *pep3* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 17), jgi|Triat2 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 18), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID NO: 19), gi|145583125 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 20), gi|51860175 de *Trichoderma asperellum* (SEQ ID NO: 21), gi|317025164 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 22), gi|159122534 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 23), gi|134054572 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 24), gi|346318620 de *Cordyceps militaris* (SEQ ID NO: 25), gi|310800156 de *Glomerella graminicola* (SEQ ID NO: 26), gi|342871221 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 27), gi|320591121 de *Grosmannia clavigera* (SEQ ID NO: 28), gi|12002205 de *Botryotinia fuckeliana* (SEQ ID NO: 29), gi|346997107 de *Thielavia terrestris* (SEQ ID NO: 30), gi|156055954 de *Sclerotinia sclerotiorum* (SEQ ID NO: 31), gi|116197829 de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO: 32), gi|336472132 de *Neurospora tetrasperma* (SEQ ID NO: 33), gi|85102020 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 34), gi|19467426 de *Neosartorya fischeri* (SEQ ID NO: 35), gi|212534792 de *Penicillium marneffe* (SEQ ID NO: 36), gi367025909 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 496), gi255947264 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 497), gi391870123 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 498) e homólogos das mesmas.

[00109] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep3*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 17-36, SEQ ID NOs: 496-498. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 17-36, SEQ ID NOs: 496-498.

[00110] Em algumas modalidades, *pep3* é *pep3* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep3* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 17. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos tendo 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 17. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 17.

#### **Pep4**

[00111] Exemplos de proteases *pep4* adequadas incluem, sem limitação, *pep4* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 37), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID NO: 38), jgi|Triat2 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 39), gi|193735605 de *Trichoderma aureoviride* (SEQ ID NO: 40), gi|145232965 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 41), gi|70999520 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 42), gi|121705756 de *Aspergillus clavatus* (SEQ ID NO: 43), gi|302899226 de *Nectria haematococca* (SEQ ID NO: 44), gi|310796316 de *Glomerella graminicola* (SEQ ID NO: 45), gi|346322842 de *Cordyceps militaris* (SEQ ID NO: 46), gi|46138535 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 47), gi|322708430 de *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO: 48), gi|342882947 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 49), gi|322700747 de *Metarhizium acridum* (SEQ ID NO: 50), gi|346973691 de *Verticillium dahliae* (SEQ ID NO: 51), gi|154309857 de *Botryotinia fuckeliana* (SEQ ID NO: 52), gi|116203505 de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO: 53), gi|347001590 de *Thielavia terrestris* (SEQ ID NO: 54), gi|39973863 de *M. oryzae* (SEQ ID NO: 55), gi|296417651 de *Tuber melanosporum* (SEQ ID NO: 56), gi|85094599 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 57), gi367031892 e gi255947264 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 499), gi255936729 e gi255947264 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 500), gi|69770745 e gi255947264 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 501), gi67524891 e gi255947264 de *A. nidulans*

(SEQ ID NO: 502) e homólogos das mesmas.

[00112] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep4*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 37-57, SEQ ID NOs: 499-502. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 37-57, SEQ ID NOs: 499-502.

[00113] Em algumas modalidades, a *pep4* é *pep4* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep4* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 37. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 37. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 37.

### ***Pep5***

[00114] Exemplos de genes de *pep5* adequados incluem, sem limitação, *pep5* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 58), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID NO: 59), jgi|Triat21277859 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 60), gi|322695806 de *Metarhizium acridum* (SEQ ID NO: 61), gi|156071418 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 62), gi|346324830 de *Cordyceps militaris* (SEQ ID NO: 63), gi|46124247 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 64), gi|346978752 de *Verticillium dahliae* (SEQ ID NO: 65), gi367019798 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 503) e homólogos das mesmas.

[00115] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep5*, tem

uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 58-65, SEQ ID NO: 503. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 58-65, SEQ ID NO: 503.

[00116] Em algumas modalidades, *pep5* é *pep5* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep5* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 58. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 58. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 58.

### ***Pep7***

[00117] Exemplos de genes de *pep7* adequados incluem, sem limitação, *pep7* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 186), jgi|Triat2 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 187), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *Trichoderma virens* (SEQ ID NO: 188), gi|310800487 de *Glomerella graminicola* (SEQ ID NO: 189), gi|322700577 de *Metarhizium acridum* (SEQ ID NO: 190), gi|347003264 de *Thielavia terrestris* (SEQ ID NO: 191), gi|171680938 de *Podospora anserina* (SEQ ID NO: 192), gi|340905460 de *Chaetomium thermophilum* (SEQ ID NO: 193), gi|346975960 de *Verticillium dahliae* (SEQ ID NO: 194), gi|347009870 e gi|367026634 de *Myceliophthora thermophila* (SEQ ID NO: 195), gi|85090078 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 196), gi|39948622 de *M. oryzae* (SEQ ID NO: 197), gi|16191517 de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO: 198), gi|39970765 de *M. oryzae* (SEQ ID NO: 199), gi|67522232 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 504), gi|350630464 de *A. niger* (SEQ ID NO: 505),

gi317138074 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 506) e homólogos das mesmas.

[00118] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep7*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 186-199, SEQ ID NOs: 504-506. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 186-199, SEQ ID NOS: 504-506.

[00119] Em algumas modalidades, *pep7* é *pep7* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep7* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 186. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 186. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 186.

### ***Pep8***

[00120] Exemplos de genes de *pep8* adequados incluem, sem limitação, *pep8* EGR48424 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 507), EHK19238 de *Trichoderma virens* (SEQ ID NO: 508), EHK40047 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 509), EG053367 de *Neurospora tetrasperma* (SEQ ID NO: 510), XP\_003658897 de *Myceliophthora thermophila* (SEQ ID NO: 511), XP\_965343 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 512), EFZ03501 de *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO: 513), XP\_003656869 de *Thielavia terrestris* (SEQ ID NO: 514 ), E-GU79769 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 515), XP\_381566 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 516), XP\_0037145401 de *M. oryzae*

(SEQ ID NO: 517), XP\_002557331 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 518), XP\_001822899.1 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 519), XP\_664091.1 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 520), EHA24387.1 de *A. niger* (SEQ ID NO: 521) e homólogos das mesmas.

[00121] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep8*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 507-521. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 507-521.

[00122] Em algumas modalidades, a *pep8* é *pep8* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep8* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 507. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 507. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 507.

### ***Pep11***

[00123] Exemplos de genes de *pep11* adequados incluem, sem limitação, *pep11* EGR49498 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 522), EHK26120 de *Trichoderma virens* (SEQ ID NO: 523), EHK41756 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 524), EKJ74550 de *Fusarium pseudograminearum* (SEQ ID NO: 525), EFY91821 de *Metarhizium acridum* (SEQ ID NO: 526), XP\_384151 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 527), XP\_003667387.1 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 528), XP\_960328.1 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 529) e homólogos das mesmas.



[00124] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep11*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 522-529. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 522-529.

[00125] Em algumas modalidades, *pep11* é *pep11* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep11* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 522. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 522. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 522.

### ***Pep12***

[00126] Exemplos de genes de *pep12* adequados incluem, sem limitação, *pep12* EGR52517 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 530), *pep12* EHK188591 de *Trichoderma virens* (SEQ ID NO: 531), *pep12* EHK45753 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 532), *pep12* EKJ733921 de *Fusarium pseudograminearum* (SEQ ID NO: 533), *pep12* XP\_388759 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 534), *pep12* EFY954891 de *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO: 535), XP\_964574.1 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 536), XP\_003659978.1 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 537) e homólogos das mesmas.

[00127] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *pep12*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 530-537. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 530-537.

[00128] Em algumas modalidades, *pep12* é *pep12* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *pep12* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 530. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 530. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 530.

### **Proteases de Serina de Tipo Tripsina**

[00129] Proteases de serina de tipo tripsina são enzimas com especificidade de substrato similar àquela da tripsina. Proteases de serina de tipo tripsina usam um resíduo de serina para hidrólise das ligações peptídicas em proteínas e polipeptídeos. Tipicamente, proteases de serina de tipo tripsina clivam ligações peptídicas após um resíduo de aminoácido positivamente carregado. Proteases de serina de tipo tripsina de organismos eucariotas, tais como fungos *Trichoderma*, incluem tripsina 1, tripsina 2 e mesotripsina. Tais proteases de serina de tipo tripsina contêm, em geral, uma tríade catalítica de três resíduos de aminoácidos (tais como histidina, aspartato e serina) que formam um relê de carga que serve para tornar o sítio ativo de serina nucleofílico. Proteases de serina de tipo tripsina eucariotas incluem ainda um "orifício de oxiânion" formado pelos átomos de hidrogênio de amida do esqueleto de glicina e serina, o qual pode ajudar na identificação de polipeptídeos como sendo proteases de serina de tipo tripsina.

[00130] Uma protease de serina de tipo tripsina foi identificada em células fúngicas de *Trichoderma*: *tsp1* (tre73897). Conforme discutido

abaixo, foi demonstrado que *tsp1* tem um impacto significativo sobre a expressão de polipeptídeos recombinantes, tais como imunoglobulinas.

[00131] Conforme discutido abaixo no Exemplo 3, proteases de serina foram purificadas a partir de *Trichoderma* e foi mostrado que têm múltiplas atividades de protease que degradam proteínas de mamíferos. Destas atividades, *tsp1* foi identificada como uma protease de serina de tipo tripsina. O gene de protease *tsp1* foi, então, deletado de células fúngicas de *Trichoderma* e foi demonstrado que deleção de *tsp1* obteve uma redução significativa na atividade total de protease, resultando em aumento de estabilização das proteínas de mamífero produzidas pelas células.

[00132] Exemplos de proteases *tsp1* adequadas incluem, sem limitação, *tsp1* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 66), jgi|Triat21298187 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 67), jgi|TriviGv29\_8\_2 (SEQ ID NO: 68), gi|145583579 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 69), gi|63025000 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 70), gi|156052735 de *Sclerotinia sclerotiorum* (SEQ ID NO: 71), gi|154314937 de *Botryotinia fuckeliana* (SEQ ID NO: 72), gi|169605891 de *Phaeosphaeria nodorum* (SEQ ID NO: 73), gi|312219044 de *Leptosphaeria maculans* (SEQ ID NO: 74), gi|37992773 de *Verticillium dahliae* (SEQ ID NO: 75), gi|1072114 de *Cochliobolus carbonum* (SEQ ID NO: 76), gi|322695345 de *Metarhizium acridum* (SEQ ID NO: 77), gi|4768909 de *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO: 78), gi|464963 (SEQ ID NO: 79), gi|46139299 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 80), *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO: 81), gi67523821 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 538) e homólogos das mesmas.

[00133] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *tsp1*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade

(por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 66-81, SEQ ID NO: 538. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 66-81, SEQ ID NO: 538.

[00134] Em algumas modalidades, a *tsp1* é *tsp1* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *tsp1* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 66. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 66. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 66.

### **Proteases Subtilisina**

[00135] Proteases subtilisina são enzimas com especificidade de substrato similar àquela da subtilisina. Proteases subtilisina usam um resíduo de serina para hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e polipeptídeos. Geralmente, proteases subtilisina são proteases de serina que contêm uma tríade catalítica de três aminoácidos, aspartato, histidina e serina. A disposição destes resíduos catalíticos é compartilhada com a subtilisina prototípica de *Bacillus licheniformis*. Proteases subtilisina de organismos eucariotas, tais como fungos *Trichoderma*, incluem furina, MBTPS1 e TPP2. Proteases subtilisina de eucariotas incluem ainda incluir um resíduo de ácido aspártico no orifício de oxidação. Protease subtilisina *slp7* se assemelha também à protease sedolisina *tpp1*.

[00136] Sete proteases subtilisina foram identificadas em células fúngicas de *Trichoderma*: *slp1* (tre51365); *slp1* (tre123244); *slp3* (tre123234); *slp5* (tre64719), *slp6* (tre121495), *slp7* (tre123865) e *slp8*

(tre58698).

### ***Slp1***

[00137] Exemplos de proteases *slp1* adequadas incluem, sem limitação, *slp1* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 82), jgi|Triat2 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 83), jgi|Triat2 de *Trichoderma atroviride* (SEQ ID NO: 84), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *Trichoderma virens* (SEQ ID NO: 85), gi|145583581 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 86), gi|322694632 de *Metarhizium acridum* (SEQ ID NO: 87), gi|342877080 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 88), gi|46139915 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 89), gi|170674476 de *Epichloe festucae* (SEQ ID NO: 90), gi|302893164 de *Nectria haematococca* (SEQ ID NO: 91), gi|336266150 de *Sordaria macrosporos* (SEQ ID NO: 92), gi|310797947 de *Glomerella graminicola* (SEQ ID NO: 93), gi|336469805 de *Neurospora tetrasperma* (SEQ ID NO: 94), gi|85086707 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 95), gi|145608997 de *M. oryzae* (SEQ ID NO: 96), gi|16208730 de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO: 97), gi367029081 de *M. thermophila* (SEQ ID NO : 539) e homólogos das mesmas.

[00138] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *slp1*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 82-97, SEQ ID NO: 539. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 82-97, SEQ ID NO: 539.

[00139] Em algumas modalidades, *slp1* é *slp1* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *slp1* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 82. Em outras modalidades, uma protease da pre-

sente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 82. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 82.

### ***Slp2***

[00140] Exemplos de proteases *slp2* adequadas incluem, sem limitação, *slp2* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 98), jgi|Triat2 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 99), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID NO: 100), gi|115111226 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 101), gi|70997972 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 102), gi|302915240 de *Nectria haematococca* (SEQ ID NO: 103), gi|46105128 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 104), gi|68165000 de *Isaria farinose* (SEQ ID NO: 105), gi|310797854 de *Glomerella graminicola* (SEQ ID NO: 106), gi|170674491 de *Epichloe festucae* (SEQ ID NO: 107), gi|322697754 de *Metarhizium acridum* (SEQ ID NO: 108), gi|147225254 de *Acremonium* sp. F11177 (SEQ ID NO: 109), gi|15808807 de *Ophiostoma piliferum* (SEQ ID NO: 110), gi|336463649 de *Neurospora tetrasperma* (SEQ ID NO: 111), gi|340992600 de *Chaetomium thermophilum* (SEQ ID NO: 112), gi|254351265 de *Metarhizium flavoviride* (SEQ ID NO: 113), gi|171680111 de *Podospora anserina* (SEQ ID NO: 114), gi|39943180 de *M. oryzae* (SEQ ID NO: 115), gi|156058540 de *Sclerotinia sclerotiorum* (SEQ ID NO: 116), gi|242790441 de *Talaromyces stipitatus* (SEQ ID NO: 117), gi|367021472 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 540), gi|45237646 de *A. niger* (SEQ ID NO: 541), gi|69780712 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 542), gi|255955889 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 543), gi|259489544 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 544), gi|85084841 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 545) e homólogos das mesmas.

[00141] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma

protease da presente descrição, tipicamente uma protease *slp2*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 98-117, SEQ ID NOs: 540-545. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 98-117, SEQ ID NOS: 540-545.

[00142] Em algumas modalidades, *slp2* é *slp2* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *slp2* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 98. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 98. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 98.

### ***Slp3***

[00143] Exemplos de proteases *slp3* adequadas incluem, sem limitação, *slp3* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 166), jgi|Triat2 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 167), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID NO: 168), gi|124295071 de *Hypocrea koningii* (SEQ ID NO: 169), gi|130750164 de *Purpureocillium lilacinum* (SEQ ID NO: 170), gi|16215677 de *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO: 171), gi|90655148 de *Hirsutella rhossiliensis* (SEQ ID NO: 172), gi|18542429 de *Tolypocladium inflatum* (SEQ ID NO: 173), gi|19171215 de *Metacordyceps chlamydosporia* (SEQ ID NO: 174), gi|346321368 de *Cordyceps militaris* (SEQ ID NO: 175), gi|628051 de *Fusarium* sp. (SEQ ID NO: 176), gi|336471881 de *Neurospora tetrasperma* (SEQ ID NO: 177), gi|16197403 de *Chaetomium globosum* (SEQ ID NO: 178), gi|85084841 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 179), gi|56201265 de

*Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 180), gi|46114268 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 181), gi367026259 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 546), gi67538776 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 547), gi|69771349 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 222), gi470729 de *A. niger* (SEQ ID NO: 223) e homólogos das mesmas.

[00144] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *slp3*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 166-181, SEQ ID NOs: 546-547, SEQ ID NOs: 222-223. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 166-181, SEQ ID NOs: 546-547, SEQ ID NOs: 222-223.

[00145] Em algumas modalidades, *slp3* é *slp3* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *slp3* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 166. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 166. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 166.

### ***Slp5***

[00146] Exemplos de proteases *slp5* adequadas incluem, sem limitação, *slp5* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 200), jgi|Triat2 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 201), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID NO: 202), gi|18161442 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 203), gi|342883549 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 204), gi|46135733 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 205), gi|310796396 de *Glomerella*



*graminicola* (SEQ ID NO: 206), gi|302927954 de *Nectria haematococca* (SEQ ID NO: 207), gi|346319783 de *Cordyceps militaris* (SEQ ID NO: 208), gi|85094084 de *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 209), gi|336467281 de *Neurospora tetrasperma* (SEQ ID NO: 210), gi|346971706 de *Verticillium dahliae* (SEQ ID NO: 211), gi|347001418 de *Thielavia terrestris* (SEQ ID NO: 212), gi|145605493 de *M. oryzae* (SEQ ID NO: 213), gi367032200 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 548), gi62816282 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 549) e homólogos das mesmas.

[00147] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *slp5*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 200-213, SEQ ID NOs: 548-549. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 200-213, SEQ ID NOS: 548-549.

[00148] Em algumas modalidades, *slp5* é *slp5* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *slp5* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 200. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO : 200. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 200.

### ***Slp6***

[00149] Exemplos de proteases *slp6* adequadas incluem, sem limitação, *slp6* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 214), jgi|Triat2 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 215), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID

NO: 216), gi|29421423 de *Hypocrea virens* (SEQ ID NO: 217), gi|145583127 de *Hypocrea lixii* (SEQ ID NO: 218), gi|30144643 de *Trichoderma hamatum* (SEQ ID NO: 219), gi|2295 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 220), gi|15391147 de *Aspergillus terreus* (SEQ ID NO: 221), gi|169771349 de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 222), gi|470729 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 223), gi|310794714 de *Glomerella graminicola* (SEQ ID NO: 224), gi|146114946 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 225), gi|342873942 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 226), gi|302884541 de *Nectria haematococca* (SEQ ID NO: 227), gi|19500190 de *Neosartorya fischeri* (SEQ ID NO: 228), gi|302413161 de *Verticillium alboatrum* (SEQ ID NO: 229), gi|310790144 de *Glomerella graminicola* (SEQ ID NO: 230), gi85090020 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 550) e homólogos dos mesmos.

[00150] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *slp6*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 214-230, SEQ ID NO: 550. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 214-230, SEQ ID NO: 550.

[00151] Em algumas modalidades, a *slp6* é *slp6* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *slp6* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 214. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 214. Em outras modalidades, a protease

tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 214.

### ***Slp7***

[00152] Exemplos de proteases *slp7* adequadas incluem, sem limitação, *slp7* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 231), jgi|Triat2 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 232), jgi|TriviGv29\_8\_2 de *T. virens* (SEQ ID NO: 233), gi|322710320 de *Metarhizium anisopliae* (SEQ ID NO: 234), gi|302915000 de *Nectria haematococca* (SEQ ID NO: 235), gi|347009020 e gi367024935 de *Myceliophthora thermophila* (SEQ ID NO: 236), gi|46137655 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO: 237), gi|346996549 de *Thielavia terrestris* (SEQ ID NO: 238), gi|145610733 de *M. oryzae* (SEQ ID NO: 239), gi67541991 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 551), gi255933786 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 552), gi317036543 de *A. niger* (SEQ ID NO: 553), gi|69782882 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 554), gi85109979 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 555) e homólogos das mesmas.

[00153] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *slp7*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 231-239, SEQ ID NOs: 551-555. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 231-239, SEQ ID NOs: 551-555.

[00154] Em algumas modalidades, *slp7* é *slp7* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *slp7* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 231. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou

mais) com SEQ ID NO: 231. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 231.

### ***Slp8***

[00155] Exemplos de proteases *slp8* adequadas incluem, sem limitação, *slp8* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 240), jgi|Triat2H98568 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 241), jgi|TriviGv29\_8\_2133902 de *T. virens* (SEQ ID NO: 242) e homólogos das mesmas.

[00156] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 240-242. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 240-242.

[00157] Em algumas modalidades, *slp8* é *slp8* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *slp8* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 240. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 240. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 240.

### **Proteases Glutâmicas**

[00158] Proteases glutâmicas são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas em proteínas e polipeptídeos. Proteases glutâmicas são insensíveis à pepstatina A e, assim, muitas vezes são referidas como proteases ácidas insensíveis à pepstatina. Embora proteases glutâmicas tenham sido agrupadas anteriormente com as proteases aspartáticas e muitas vezes conjuntamente referidas como proteases áci-

das, descobriu-se recentemente que proteases glutâmicas têm resíduos de sítio ativo muito diferentes das proteases aspárticas.

[00159] Duas proteases glutâmicas foram identificadas em células fúngicas de *Trichoderma*: *gap1* (tre69555) e *gap2* (treI06661).

### **Gap1**

[00160] Exemplos de proteases *gap1* adequadas incluem, sem limitação, *gap1* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 118), jgi|Triat2140863 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 119), jgi|TriviGv29\_8\_21192684 de *T. virens* (SEQ ID NO: 120), gi|238499183 de *Aspergillus flavus* (SEQ ID NO: 121), gi|145251555 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 122), gi|115491521 de *Aspergillus terreus* (SEQ ID NO: 123), gi|37154543 (SEQ ID NO: 124), gi|48425531 (SEQ ID NO: 125), gi|351873 (SEQ ID NO: 126), gi|346997245 de *Thielavia terrestris* (SEQ ID NO: 127), gi|255940586 de *Penicillium chrysogenum* (SEQ ID NO: 128), gi367026504 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 574), gi317150886 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 575), gi85097968 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 576), gi|31056 de *A. niger* (SEQ ID NO: 577), gi255930123 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 578), gi|45236956 de *A. niger* (SEQ ID NO: 579), gi|69772955 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 580), gi|45249222 de *A. niger* (SEQ ID NO: 581), gi67525839 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 582), gi|69785367 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 583), gi255955319 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 584), gi367019352 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 585), gi391863974 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 586), gi367024513 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 587) e homólogos das mesmas.

[00161] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *gap1*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma se-

quência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 118-128, SEQ ID NOS: 574-587. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 118-128, SEQ ID NOS: 574-587.

[00162] Em algumas modalidades, *gap1* é *gap1* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *gap1* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 118. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 118. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 118.

## **Gap2**

[00163] Exemplos de proteases *gap2* adequadas incluem, sem limitação, *gap2* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 129), jgi|Triat21298116 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 130), jgi|TriviGv29\_8\_2130331 de *T. virens* (SEQ ID NO: 131), jgi|TriviGv29\_8\_21225131 (SEQ ID NO: 132), gi|238499183 de *Aspergillus flavus* (SEQ ID NO: 133), gi|145251555 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 134), gi|67901056 de *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 135), gi|121711990 de *Aspergillus clavatus* (SEQ ID NO: 136), gi|70986250 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 137), gi|212534108 de *Penicillium marneffe* (SEQ ID NO: 138), gi|242789335 de *Talaromyces stipitatus* (SEQ ID NO: 139), gi|320591529 de *Grosmannia clavigera* (SEQ ID NO: 140), gi|19474281 de *Neosartorya fischeri* (SEQ ID NO: 141), gi|212527274 de *Penicillium marneffe* (SEQ ID NO: 142), gi|255940586 de *Penicillium chrysogenum* (SEQ ID NO: 143), gi|131056 (SEQ ID NO: 144), gi|367030275 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 588) e homólogos das mesmas.

[00164] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma

protease da presente descrição, tipicamente uma protease *gap2*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de SEQ ID NOs: 129-144, SEQ ID NO: 588. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 129-144, SEQ ID NO: 588.

[00165] Em algumas modalidades, *gap2* é *gap2* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *gap2* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 129. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 129. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 129.

### **Proteases Sedolisina**

[00166] Proteases sedolisina são enzimas que usam um resíduo de serina para hidrólise das ligações peptídicas em proteínas e polipeptídeos. Proteases sedolisina contêm, em geral, uma tríade catalítica única de serina, glutamato e aspartato. Proteases sedolisina também contêm um resíduo de aspartato no orifício de oxianion. Proteases sedolisina de organismos eucariotas, tais como fungos *Trichoderma*, incluem tripeptidil peptidase.

[00167] Exemplos de proteases *tpp1* adequadas incluem, sem limitação, *tpp1* de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 145), jgi|Triat2H88756 de *T. atroviride* (SEQ ID NO: 146), jgi|TriviGv29\_8\_21217176 de *T. virens* (SEQ ID NO: 147), gi|70993168 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 148), gi|169776800 de *Aspergillus oryzae* (SEQ ID NO: 149), gi|145236399 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 150), gi|121708799 de

*Aspergillus clavatus* (SEQ ID NO: 151), gi|145239871 de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 152), gi|121714541 de *Aspergillus clavatus* (SEQ ID NO: 153), gi|15387645 de *Aspergillus terreus* (SEQ ID NO: 154), gi|70982015 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID NO: 155), gi|156045898 de *Sclerotinia sclerotiorum* (SEQ ID NO: 156), gi|154321758 de *Botryotinia fuckeliana* (SEQ ID NO: 157), gi|19499774 de *Neosartorya fischeri* (SEQ ID NO: 158), gi|242798348 de *Talaromyces stipitatus* (SEQ ID NO: 159), gi|212541546 de *Penicillium marneffe* (SEQ ID NO: 160), gi|46114460 de *Gibberella zeae* (SEQ ID NO : 161), gi|342890694 de *Fusarium oxysporum* (SEQ ID NO: 162), gi|320592937 de *Grosmannia clavigera* (SEQ ID NO: 163), gi|302406186 de *Verticillium alboatrum* (SEQ ID NO: 164), gi|346971444 de *Verticillium dahliae* (SEQ ID NO: 165), CAE51075.1 de *A. fumigatus* (SEQ ID NO: 556), XP\_001820835.1 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 557), XP\_002564029.1 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 558), XP\_664805.1 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 559), XP\_002565814.1 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 560), XP\_003663689.1 de *M. thermophila* (SEQ ID NO: 561), XP\_958412.1 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 562), XP\_001394118.1 de *A. niger* (SEQ ID NO: 563), CAE17674.1 de *A. fumigatus* (SEQ ID NO: 564), XP\_001400873.1 de *A. niger* (SEQ ID NO: 565), CAE46473.1 de *A. fumigatus* (SEQ ID NO: 566), XP\_002373530.1 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 567), XP\_660624.1 de *A. nidulans* (SEQ ID NO: 568), XP\_002562943.1 de *P. chrysogenum* (SEQ ID NO: 569), CAE17675.1 de *A. fumigatus* (SEQ ID NO: 570), EAL86850.2 de *A. fumigatus* (SEQ ID NO: 571), XP\_9619570.1 de *N. crassa* (SEQ ID NO: 572), BAB97387.1 de *A. oryzae* (SEQ ID NO: 573) e homólogos das mesmas.

[00168] Consequentemente, em determinadas modalidades, uma protease da presente descrição, tipicamente uma protease *tpp1*, tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade



(por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 145-165, SEQ ID NOs: 556-573. Em algumas modalidades, a protease tem 100% de identidade com uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NOs: 145-165, SEQ ID NOs: 556-573.

[00169] Em algumas modalidades, *tpp1* é *tpp1* de *T. reesei*. A sequência de aminoácidos codificada por *tpp1* de *T. reesei* é apresentada em SEQ ID NO: 145. Em outras modalidades, uma protease da presente descrição tem uma sequência de aminoácidos que tem 50% ou mais de identidade (por exemplo, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou mais) com SEQ ID NO: 145. Em outras modalidades, a protease tem 100% de identidade com SEQ ID NO: 145.

### **Proteases Homólogas**

[00170] Outras modalidades da presente descrição referem-se à redução de atividade de proteases que são homólogas às proteases da presente descrição. "Homologia", conforme usado aqui, refere-se à similaridade de sequência entre uma sequência de referência e pelo menos um fragmento de uma segunda sequência. Homólogos podem ser identificados através de qualquer método conhecido na técnica, de preferência usando a ferramenta BLAST para comparar uma sequência de referência com uma única segunda sequência ou fragmento de uma sequência ou com um banco de dados de sequências. Conforme descrito abaixo, o BLAST comparará sequências com base na identidade e similaridade percentuais.

[00171] Os termos "idêntica" ou "identidade" percentual, no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas. Duas sequências estão "substancialmente idênticas" se duas

sequências têm uma percentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos que são os mesmos (isto é, 29% de identidade, opcionalmente, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% de identidade ao longo de uma região determinada ou, quando não especificado, ao longo de toda a sequência), quando comparadas e alinhadas para uma correspondência máxima sobre uma janela de comparação ou região designada, conforme medido usando um dos algoritmos de comparação de sequências a seguir ou por alinhamento manual e inspeção visual. Opcionalmente, a identidade existe ao longo de uma região que tem pelo menos cerca de 50 nucleotídeos (ou 10 aminoácidos) de comprimento ou, mais preferivelmente, ao longo de uma região que tem 100 a 500 ou 1000 ou mais nucleotídeos (ou 20, 50, 200 ou mais aminoácidos) de comprimento).

[00172] Para comparação de sequências, tipicamente, uma sequência atua como sequência de referência com a qual sequências de teste são comparadas. Quando se usa um algoritmo de comparação de sequências, as sequências teste e de referência são inseridas em um computador, coordenadas de subsequência são designadas se necessário e os parâmetros do programa de algoritmo de sequência são designados. Parâmetros de default do programa podem ser usados ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de sequências calcula, então, as identidades de sequência percentuais para as sequências de teste em relação à sequência de referência com base nos parâmetros do programa. Quando de comparação de duas sequências para identidade, não é necessário que as sequências sejam contíguas, mas qualquer lacuna traria consigo uma penalidade que reduziria a identidade percentual global. Para blastn, os parâmetros de default são penalidade por abertura de lacuna = 5 e penalidade por extensão de lacuna = 2. Para blastp, os parâ-

metros de default são penalidade por abertura de lacuna = 11 e penalidade por extensão de lacuna = 1.

[00173] Uma "janela de comparação", conforme usado aqui, inclui referência a um segmento de qualquer uma da série de posições contíguas incluindo, porém sem limitações, 20 a 600, usualmente cerca de 50 a cerca de 200, mais usualmente cerca de 100 a cerca de 150, na qual uma sequência pode ser comparada com uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas sequências serem perfeitamente alinhadas. Métodos de alinhamento de sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. Alinhamento ótimo de sequências para comparação pode ser realizado, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman (1981), pelo algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman e Wunsch (1970) *J Mol Biol* 48 (3): 443-453, pelo método de busca por similaridade de Pearson e Lipman (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (8): 2444-2448, por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no pacote de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou por alinhamento manual e inspeção visual [vide, por exemplo, Brent et al., (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou Ed)].

[00174] Dois exemplos de algoritmos que são adequados para determinar a identidade de sequência e similaridade de sequência percentuais são os algoritmos BLAST e BLAST 2.0, os quais são descritos em Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-3402 e Altschul et al. (1990) *J. Mol Biol* 215 (3): 403-410, respectivamente. Software para a realização de análises pelo BLAST está disponível ao público através do National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo envolve primeiramente identificação de pares de sequência de alta pontuação (**H**igh **S**coring sequence **P**airs - HSPs) ao identificar

palavras curtas de comprimento  $W$  na sequência de consulta as quais correspondem ou satisfazem alguma pontuação de limiar  $T$  de valor positivo quando alinhadas com uma palavra de mesmo comprimento em uma sequência de banco de dados.  $T$  é referido como o limiar de pontuação de palavra vizinha (Altschul et al., Supra). Estes acertos iniciais de palavras vizinhas funcionam como sementes para iniciar buscas para encontrar HSPs mais longos que as contenham. Os acertos de palavras são estendidos em ambas as direções ao longo de cada sequência, tão longe quanto a pontuação de alinhamento cumulativa possa ser aumentada. Pontuações cumulativas são calculadas usando, para sequências de nucleotídeos, os parâmetros  $M$  (pontuação de recompensa por um par de resíduos coincidentes; sempre  $> 0$ ) e  $N$  (pontuação de penalidade por resíduos não coincidentes; sempre  $< 0$ ). Para sequências de aminoácidos, uma matriz de pontuação é usada para calcular a pontuação cumulativa. Extensão dos acertos de palavra em cada direção são interrompidas quando: a pontuação de alinhamento cumulativa cai pela quantidade  $X$  de seu valor máximo atingido; a pontuação cumulativa vai para zero ou abaixo em virtude de acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos de pontuação negativa; ou a extremidade de qualquer sequência é atingida. Os parâmetros  $W$ ,  $T$  e  $X$  do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e velocidade de alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeos) usa, por default, um comprimento de palavra ( $W$ ) de 11, uma expectativa ( $E$ ) ou 10,  $M = 5$ ,  $N = -4$  e uma comparação de ambas as fitas. Para sequências de aminoácidos, o programa BLASTP usa, por default, um comprimento de palavra de 3 e expectativa ( $E$ ) de 10 e a matriz de pontuação BLOSUM62 [vide Henikoff e Henikoff, (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (22): 10915-10919], alinhamentos ( $B$ ) de 50, expectativa ( $E$ ) de 10,  $M = 5$ ,  $N = -4$  e uma comparação de ambas as fitas.

[00175] O algoritmo BLAST realiza também uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (vide, por exemplo, Karlin e Altschul (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (12): 5873-5877). Uma medida de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a menor probabilidade de soma ( $P(N)$ ), a qual fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma correspondência entre duas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos ocorreria por chance. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado similar a uma sequência de referência se a probabilidade da menor soma em uma comparação do ácido nucleico de teste com o ácido nucleico de referência é menor do que cerca de 0,2, mais preferivelmente menor do que cerca de 0,01 e, ainda mais preferivelmente, menor do que cerca 0,001.

[00176] Além da percentagem de identidade da sequência mencionada acima, outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo codificado pelo primeiro ácido nucleico é imunologicamente reativo de forma cruzada com anticorpos criados contra o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucleico, conforme descrito abaixo. Assim, um polipeptídeo é, tipicamente, substancialmente idêntico a um segundo polipeptídeo, por exemplo, onde os dois peptídeos diferem apenas por substituições conservativas. Outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos são substancialmente idênticas é que as duas moléculas ou seus complementos hibridizam um com o outro sob condições estringentes, conforme descrito abaixo. Ainda outra indicação de que duas sequências de ácidos nucleicos são substancialmente idênticas é que os mesmos iniciadores podem ser usados para amplificar a sequência.

[00177] Conforme descrito aqui, as proteases da presente descrição podem também incluir proteases que são variantes conservativamente modificadas de proteases codificadas pelos genes de protease

descritos acima. "Variantes conservativamente modificadas", conforme usado aqui, incluem substituições, deleções ou adições individuais de uma sequência de aminoácidos codificada que resultam em substituição de um aminoácido por outro aminoácido quimicamente similar. Tabelas de substituição conservativa que fornecem aminoácidos funcionalmente similares são bem conhecidas na técnica. Tais variantes conservativamente modificadas são além de e não excluem variantes polimórficas, homólogos entre espécies e alelos da descrição. Os oito grupos a seguir contêm aminoácidos que são substituições conservativas entre si: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); e 8) Cisteína (C), Metionina (M) (vide, por exemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

[00178] As Figuras 45-48 representam árvores filogenéticas de proteases aspártica, subtilisina, glutâmica e sedolisina de fungos filamentosos selecionados.

### ***Métodos de Redução de Atividade de Proteases da Invenção***

[00179] Outros aspectos da presente descrição referem-se à redução de atividade de proteases presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo heterólogo, tal como um polipeptídeo de mamífero.

[00180] A atividade de proteases presentes em células fúngicas filamentosas pode ser reduzida por meio de qualquer método conhecido por aqueles versados na técnica.

[00181] Em algumas modalidades, atividade reduzida de protease é obtida através de redução de expressão de protease, por exemplo, por modificação de promotor ou de RNAi.

[00182] Em outras modalidades, a atividade reduzida de protease é

obtida modificando-se o gene que codifica a protease. Exemplos de tais modificações incluem, sem limitação, uma mutação de *knockout*, uma mutação de truncamento, uma mutação pontual, uma mutação antisense, uma mutação por substituição, uma mutação por deslocamento de quadro, uma mutação de inserção, uma mutação de duplicação, uma mutação de amplificação, uma mutação de translocação ou uma mutação de inversão e que resulta em uma redução na atividade de protease correspondente. Métodos de geração de pelo menos uma mutação em um gene que codifica a protease de interesse são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, mutagênese e seleção aleatória, mutagênese sítio dirigida, mutagênese por PCR, mutagênese por inserção, mutagênese química e irradiação.

[00183] Em determinadas modalidades, uma porção do gene que codifica a protease é modificada, tal como a região que codifica o domínio catalítico, a região de codificação ou uma sequência de controle necessário para a expressão da região de codificação. Tal sequência de controle do gene pode ser uma sequência de promotor ou uma parte funcional da mesma, ou seja, uma parte que é suficiente para afetar a expressão do gene. Por exemplo, uma sequência de promotor pode ser inativada, resultando em ausência de expressão, ou um promotor mais fraco pode ser substituído pela sequência do promotor nativo para reduzir a expressão da sequência de codificação. Outras sequências de controle para uma possível modificação incluem, sem limitação, uma sequência líder, uma sequência de pró-peptídeo, uma sequência sinalizadora, um terminador de transcrição e um ativador de transcrição.

[00184] Os genes que codificam protease da presente descrição que estão presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo recombinante podem também ser modificados usando técnicas de deleção gênica para eliminar ou reduzir a expressão do

gene. Técnicas de deleção de genes permitem a remoção parcial ou completa do gene, assim, eliminando sua expressão. Em tais métodos, deleção do gene pode ser realizada através de recombinação homóloga usando um plasmídeo que foi construído de modo a conter continuamente as regiões 5' e 3' que flanqueiam o gene.

[00185] Os genes que codificam protease da presente descrição que estão presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo recombinante podem também ser modificados através de introdução, substituição e/ou remoção de um ou mais nucleotídeos no gene ou uma sequência de controle do mesmo necessária para transcrição ou tradução do gene. Por exemplo, nucleotídeos podem ser inseridos ou removidos para a introdução de um códon terminal, a remoção do códon inicial ou um deslocamento de quadro do quadro de leitura aberta. Tal modificação pode ser realizada por meio de métodos conhecidos na técnica incluindo, sem limitação, mutagênese sítio dirigida e mutagênese peR gerada (vide, por exemplo, Botstein e Shortie, 1985, *Science* 229: 4719; Lo et al., 1985, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 2285; Higuchi et al., 1988, *Nucleic Acids Research* 16: 7351; Shimada, 1996, *Meth. Mol. Biol.* 57: 157; Ho et al., 1989, *Gene* 77: 61; Horton et al., 1989, *Gene* 77: 61; e Sarkar e Sommer, 1990, *BioTechniques* 8: 404).

[00186] Além disso, os genes que codificam protease da presente descrição que estão presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo recombinante podem ser modificados por técnicas de ruptura gênica através de inserção, no gene, de um construto de ácido nucleico contendo um fragmento de ácido nucleico homólogo ao gene, o qual criará uma duplicação da região de homologia e incorporará o construto de DNA entre as regiões duplicadas. Tal ruptura gênica pode eliminar a expressão do gene se o construto inserido separa o promotor do gene da região de codificação ou interrompe a



sequência de codificação de modo que um produto gênico não funcional resulte. Um construto de ruptura pode ser simplesmente um gene marcador selecionável acompanhado por regiões 5' e 3' homólogas ao gene. O marcador selecionável permite identificação de transformantes contendo o gene rompido.

[00187] Genes que codificam protease da presente descrição que estão presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo recombinante podem também ser modificados pelo processo de conversão gênica (vide, por exemplo, Iglesias e Trautner, 1983, *Molecular General Genetics* 189: 573-76). Por exemplo, na conversão gênica, uma sequência de nucleotídeos que corresponde ao gene sofre mutação *in vitro* para produzir uma sequência de nucleotídeos defectiva a qual é, então, transformada em uma cepa de *Trichoderma* para produzir um gene defectivo. Através de recombinação homóloga, a sequência de nucleotídeos defectiva substitui o gene endógeno. Pode ser desejável que a sequência de nucleotídeos defectiva também contenha um marcador para seleção de transformantes contendo o gene defectivo.

[00188] Os genes que codificam protease da presente descrição que estão presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo recombinante podem também ser modificados por meio de técnicas antisense estabelecidas usando uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos do gene (vide, por exemplo, Parish e Stoker, 1997, *FEMS Microbiology Letters* 154: 151-157). Em particular, expressão do gene por células fúngicas filamentosas pode ser reduzida ou inativada mediante introdução de uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos do gene, a qual pode ser transcrita na cepa e é capaz de hibridizar com o mRNA produzido nas células. Sob condições que permitem que a sequência de nucleotídeos antisense complementar hibridi-

ze com o mRNA, a quantidade de proteína traduzida é reduzida ou eliminada.

[00189] Além disso, genes que codificam proteases da presente descrição que estão presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo recombinante podem também ser modificados por meio de técnicas de RNA de interferência (RNAi) estabelecidas (vide, por exemplo, documento WO 2005/056772 e documento WO 2008/080017).

[00190] Os genes que codificam protease da presente descrição que estão presentes em células fúngicas filamentosas que expressam um polipeptídeo recombinante podem também ser modificados através de mutagênese aleatória ou específica usando métodos bem conhecidos na técnica incluindo, sem limitação, mutagênese química (vide, por exemplo, Hopwood, *The Isolation of Mutants* em *Methods in Microbiology* (J.R. Norris e D.W. Ribbons, eds.) páginas 363-433, Academic Press, New York, 1970). Modificação do gene pode ser realizada submetendo as células fúngicas filamentosas à mutagênese e rastreamento de células mutantes nas quais a expressão do gene foi reduzida ou inativada. A mutagênese, a qual pode ser específica ou aleatória, pode ser realizada, por exemplo, mediante uso de um agente mutagênico físico ou químico adequado, uso de um oligonucleotídeo adequado, sujeição da sequência de DNA à mutagênese por gerada ou qualquer combinação dos mesmos. Exemplos de agentes físicos e químicos para mutagênese incluem, sem limitação, ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (**N-Methyl-N'-Nitro-N-NitrosoGuanidine** - MNNG), N-metil-N'-nitrosoguanidina (**N-methyl-N'-NiTrosoGuanidine** - NTG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, metano sulfonato de etila (**Ethyl Methane Sulphonate** - EMS), bissulfito de sódio, ácido fórmico e análogos de nucleotídeos. Quando estes agentes são usados, mutagênese é, tipicamente, realizada através de incuba-

ção das células de *Trichoderma* a sofrer mutagênese na presença do agente mutagênico de escolha sob condições adequadas e, então, selecionando mutantes que exibem expressão reduzida ou inexistente do gene.

[00191] Em determinadas modalidades, pelo menos uma mutação ou alteração em um gene que codifica protease da presente descrição resulta em uma protease modificada que não tem qualquer atividade de protease detectável. Em outras modalidades, pelo menos uma alteração de um gene que codifica protease da presente descrição resulta em uma protease modificada que tem pelo menos 25%, pelo menos 50% inferior, pelo menos, pelo menos 75%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400%, pelo menos 500%, pelo menos 600%, pelo menos 700%, pelo menos 800%, pelo menos 900%, pelo menos 1.000% ou um percentual maior de menos atividade de protease comparado com uma protease não modificada correspondente.

[00192] Em determinadas modalidades, por exemplo, em uma célula de *Trichoderma*, a pelo menos uma mutação ou alteração em um gene que codifica protease da presente descrição resulta em uma redução de atividade total de protease para 49% ou menos, tipicamente com uma mutação em pelo menos 2 genes de protease distintos ou de 31% ou menos, tipicamente com uma mutação em pelo menos 3 genes de protease distintos ou de 13% ou menos, tipicamente com uma mutação em pelo menos 4 genes de protease distintos ou de 10% ou menos, tipicamente com uma mutação em pelo menos 5 genes de protease distintos ou de 6,3% ou menos, tipicamente com uma mutação em pelo menos 6 genes de protease distintos ou de 5,5% ou menos, tipicamente com uma mutação em pelo menos 7 genes de protease distintos, da atividade de protease total da célula de *Trichoderma* parental correspondente.

***Polipeptídeos Heterólogos da Invenção***

[00193] A invenção refere-se ainda aqui ao aumento da produção de polipeptídeos heterólogos em células fúngicas filamentosas que expressam estes polipeptídeos heterólogos por meio de redução da atividade de proteases presentes nas células.

[00194] Conforme usado aqui, um "polipeptídeo heterólogo" refere-se a um polipeptídeo que não é encontrado naturalmente (ou seja, endógeno) em uma célula fúngica filamentosa da presente descrição ou que é expresso em um nível elevado em células fúngicas filamentosas quando comparado com a versão endógena do polipeptídeo. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo de mamífero. Em outras modalidades, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo que não é de mamífero.

**Polipeptídeos de Mamífero**

[00195] Polipeptídeos de mamífero da presente descrição podem ser qualquer polipeptídeo de mamífero que tem uma atividade biológica de interesse. Conforme usado aqui, um "polipeptídeo de mamífero" é um polipeptídeo que é expresso de forma nativa em um mamífero, um polipeptídeo que é derivado de um polipeptídeo que é expresso de forma nativa em um mamífero ou um fragmento do mesmo. Um polipeptídeo de mamífero também inclui peptídeos e oligopeptídeos que retêm atividade biológica. Polipeptídeos de mamífero da presente descrição podem também incluir dois ou mais polipeptídeos que são combinados para formar o produto codificado. Polipeptídeos de mamífero da presente descrição podem ainda incluir polipeptídeos de fusão os quais contêm uma combinação de sequências de aminoácidos parciais ou completas obtidas de pelo menos dois polipeptídeos diferentes. Polipeptídeos de mamífero podem também incluir variações alélicas que ocorrem naturalmente e modificadas de qualquer um dos polipeptídeos de mamífero descritos e polipeptídeos de mamífero híbridos.

[00196] O polipeptídeo de mamífero pode ser um polipeptídeo naturalmente glicosilado ou um polipeptídeo naturalmente não glicosilado.

[00197] Exemplos de polipeptídeos de mamífero adequados incluem, sem limitação, imunoglobulinas, anticorpos, antígenos, enzimas, peptídeos antimicrobianos, fatores de crescimento, hormônios, interferons, interleucinas, citocinas, imunodilatadores, neurotransmissores, receptores, proteínas repórter, proteínas estruturais e fatores de transcrição.

[00198] Exemplos específicos de polipeptídeos de mamífero adequados incluem, sem limitação, imunoglobulinas, cadeias pesadas de imunoglobulina, cadeias leves de imunoglobulinas, anticorpos monoclonais, anticorpos híbridos, fragmentos de anticorpos  $F(ab')_2$ , fragmentos de anticorpos  $F(ab)$ , moléculas  $F_v$ , anticorpos  $F_v$  com uma única cadeia, fragmentos de anticorpos, fragmentos de anticorpos dimericos e triméricos, fragmentos de anticorpos funcionais, imunoadesinas, fator de crescimento similar à insulina-1, hormônio de crescimento, insulina, interferon alfa 2b, fator 1 de crescimento de fibroblasto, albumina sérica humana, anticorpos e/ou fragmentos de anticorpos de camélídeo, anticorpos com um único domínio, anticorpos com um único domínio multiméricos e eritropoietina.

[00199] Outros exemplos de proteínas de mamífero adequadas incluem, sem limitação, uma oxidoredutase, uma transferase, uma hidrolase, uma liase, uma isomerase, uma ligase, uma aminopeptidase, uma amilase, uma carboidrase, uma carboxipeptidase, uma catalase, uma glicosil transferase, uma desoxirribonuclease, uma esterase, uma galactosidase, uma betagalactosidase, uma glicosidase, uma glucuronidase, uma glucuronil esterase, uma haloperoxidase, uma invertase, uma lipase, uma oxidase, uma fosfolipase, uma enzima proteolítica, uma ribonuclease, uma uroquinase, uma albumina, um colágeno, uma

tropoelastina e uma elastina.

### **Polipectídeos Que Não São de Mamífero**

[00200] Polipectídeos que não são de mamífero da presente descrição podem ser qualquer polipectídeo que não é de mamífero que tem uma atividade biológica de interesse. Conforme usado aqui, um "polipectídeo que não é de mamífero" é um polipectídeo que é expresso de forma nativa em um organismo não mamífero, tais como células fúngicas, um polipectídeo que é derivado de um polipectídeo que é expresso de forma nativa em um organismo não mamífero ou um fragmento do mesmo. Um polipectídeo que não é de mamífero também inclui peptídeos e oligopeptídeos que retêm atividade biológica. Polipectídeos que não são de mamífero da presente descrição podem também incluir dois ou mais polipectídeos que são combinados para formar o produto codificado. Polipectídeos que não são de mamífero da presente descrição podem ainda incluir polipectídeos de fusão os quais contêm uma combinação de sequências de aminoácidos parciais ou totais obtidas de pelo menos dois polipectídeos diferentes. Polipectídeos que não são de mamífero podem também incluir variações alélicas que ocorrem naturalmente e modificadas de qualquer um dos polipectídeos que não são de mamífero descritos e polipectídeos que não são de mamífero híbridos.

[00201] Exemplos de polipectídeos que não são de mamífero adequados incluem, sem limitação, aminopeptidases, amilases, carboidrases, carboxipeptidases, catalases, celulasas, quitinases, cutinases, desoxirribonucleases, esterases, alfa-galactosidase, beta-galactosidase, glucoamilases, alfa-glucosidases, beta-glucosidases, invertases, lacases, lipases, oxidases, mutanases, enzima pectinolítica, peroxidases, fosfolipases, fitases, polifenoloxidasas, enzimas proteolíticas, ribonucleases, transglutaminases e xilanases.

### **Produção de Polipectídeo Heterólogo**

[00202] Um polipeptídeo heterólogo de interesse é produzido por células fúngicas filamentosas da presente descrição contendo pelo menos três proteases tendo atividade reduzida por meio de cultura das células em um meio nutriente para produção do polipeptídeo heterólogo usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, as células podem ser cultivadas através de cultura em frasco de agitação, fermentação em pequena escala ou fermentação em larga escala (incluindo fermentações contínua, em batelada, descontínua ou em estado sólido) em fermentadores laboratoriais ou industriais realizada em um meio adequado e sob condições que permitam que o polipeptídeo seja expresso e/ou isolado. A cultura ocorre em um meio nutriente adequado compreendendo fontes de carbono e nitrogênio e sais inorgânicos usando procedimentos conhecidos na técnica. Meios adequados estão disponíveis a partir de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com composições publicadas (por exemplo, em catálogos da American Type Culture Collection). O polipeptídeo secretado pode ser recuperado diretamente do meio. Se o polipeptídeo não é secretado, ele pode ser obtido a partir de lisatos celulares.

[00203] Um polipeptídeo heterólogo de interesse produzido por uma célula fúngica filamentosa da presente descrição contendo pelo menos três proteases com atividade reduzida pode ser detectado usando métodos conhecidos na técnica que são específicos para o polipeptídeo heterólogo. Estes métodos de detecção podem incluir, sem limitação, uso de anticorpos específicos, cromatografia de líquido de alta eficiência, cromatografia em capilar, formação de um produto enzimático, desaparecimento de um substrato enzimático e SDS PAGE. Por exemplo, um ensaio enzimático pode ser usado para determinar a atividade de uma enzima. Procedimentos para determinação de atividade enzimática são conhecidos na técnica para muitas enzimas (vide, por exemplo, O. Schomburg e M. Salzmänn (eds.), *Enzyme Handbook*,

Springer-Verlag, New York, 1990).

[00204] O polipeptídeo heterólogo resultante pode ser isolado por meio de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um polipeptídeo heterólogo de interesse pode ser isolado do meio de cultura através de procedimentos convencionais incluindo, sem limitação, centrifugação, filtração, extração, secagem por pulverização, evaporação e precipitação. O polipeptídeo heterólogo isolado pode, então, ser posteriormente purificado por meio de uma variedade de procedimentos conhecidos na técnica incluindo, sem limitação, cromatografia (por exemplo, de permuta iônica, de afinidade, hidrofóbica, cromatofocagem e exclusão por tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focagem isoelétrica preparativa (**I**so**E**lectric **F**ocusing - IEF), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação com sulfato de amônio) ou extração (vide, por exemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson e Lars Ryden, editores, VCH Publishers, New York, 1989).

### **Preparo de Polinucleotídeos que Codificam Polipeptídeos Heterólogos**

[00205] Sequências dos polinucleotídeos heterólogos da presente descrição são preparadas por meio de qualquer método adequado conhecido na técnica incluindo, sem limitação, síntese química direta ou clonagem. Para síntese química direta, formação de um polímero de ácidos nucleicos envolve geralmente a adição sequencial de moléculas de nucleotídeo 3'-bloqueados e 5'-bloqueados ao grupo 5'-hidroxila terminal de uma cadeia nucleotídica em crescimento, em que cada adição é realizada por meio de ataque nucleofílico do grupo 5'-hidroxila terminal da cadeia em crescimento na posição 3' do monômero adicionado o qual é, tipicamente, um derivado de fósforo, tal como um fosfortriéster, fosforamidita ou similar. Tal metodologia é conhecida por aqueles versados na técnica e está descrita em textos e literatura pertinentes [por exemplo, em Matteucci et al., (1980) *Tetrahedron Lett* 21:



719-722; Patentes dos Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.500.707; 5.436.327; e 5.700.637]. Além disso, as sequências desejadas podem ser isoladas de fontes naturais através de divisão de DNA usando enzimas de restrição apropriadas, separação de fragmentos por eletroforese em gel e, então, recuperação da sequência de ácido nucleico desejada a partir do gel através de métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, tal como usando reações em cadeia de polimerase (**Polymerase Chain Reaction - PCR**; por exemplo, Patente dos Estados Unidos N<sup>o</sup> 4.683.195).

[00206] Cada polinucleotídeo heterólogo da presente descrição pode ser incorporado em um vetor de expressão. "Vetor de expressão" ou "vetor" refere-se a um composto e/ou composição que traduz, transforma ou infecta uma célula hospedeira, deste modo, fazendo com que a célula expresse outros ácidos nucleicos e/ou proteínas que não aqueles nativos à célula ou de uma maneira não nativa à célula. Um "vetor de expressão" contém uma sequência de ácidos nucleicos (comumente DNA ou RNA) a ser expressa pela célula hospedeira. Opcionalmente, o vetor de expressão também inclui materiais para auxiliar na obtenção de entrada do ácido nucleico na célula hospedeira, tal como um vírus, lipossoma, revestimento de proteínas ou similar. Os vetores de expressão considerados para uso na presente descrição incluem aqueles nos quais uma sequência de ácido nucleico pode ser inserida, juntamente com quaisquer elementos operacionais preferidos ou necessários. Além disso, o vetor de expressão deve ser um que possa ser transferido para uma célula hospedeira e reproduzido na mesma. Vetores de expressão preferidos são os plasmídeos, particularmente aqueles com os sítios de restrição que tenham sido bem documentados e que contenham os elementos operacionais preferidos ou necessários para transcrição da sequência de ácido nucleico. Tais plasmídeos, bem como outros vetores de expressão, são bem conhe-

cidos na técnica.

[00207] A incorporação de polinucleotídeos individuais pode ser realizada por meio de métodos conhecidos que incluem, por exemplo, uso de enzimas de restrição (tais como *BamHI*, *EcoRI*, *HhaI*, *XhoI*, *XmaI* e assim por diante) para clivar sítios específicos no vetor de expressão, por exemplo, plasmídeo. A enzima de restrição produz extremidades fita simples que podem ser tratadas termicamente com um polinucleotídeo tendo, ou sintetizado para ter, um término com uma sequência complementar às extremidades do vetor de expressão clivado. Recozimento é realizado usando uma enzima adequada, por exemplo, DNA ligase. Conforme será apreciado por aqueles versados na técnica, tanto o vetor de expressão quanto o polinucleotídeo desejado são, muitas vezes, clivados com a mesma enzima de restrição e, deste modo, asseguram que as extremidades do vetor de expressão e as extremidades do polinucleotídeo sejam complementares umas às outras. Além disso, ligantes de DNA podem ser usados para facilitar ligação das sequências de ácidos nucleicos em um vetor de expressão.

[00208] Uma série de polinucleotídeos individuais também podem ser combinados utilizando métodos que são conhecidos na técnica (por exemplo, Patente dos Estados Unidos N° 4.683. 195).

[00209] Por exemplo, cada um dos polinucleotídeos desejados pode ser gerado inicialmente em um PCR separada. Depois disso, iniciadores específicos são concebidos de modo que as extremidades dos produtos de PCR contenham sequências complementares. Quando os produtos de PCR são misturados, desnaturados e recozidos, fitas tendo as sequências correspondentes em suas extremidades 3' se sobrepõem e podem atuar como iniciadores umas para as outras. Extensão desta sobreposição pela DNA polimerase produz uma molécula na qual as sequências originais são "unidas" juntas. Desta maneira, uma

série de polinucleotídeos individuais podem ser "unidos" e subsequentemente transduzidos em uma célula hospedeira simultaneamente. Assim, expressão de cada um da pluralidade de polinucleotídeos é obtida.

[00210] Polinucleotídeos individuais ou polinucleotídeos "unidos" são, então, incorporados em um vetor de expressão. O presente relatório descritivo não está limitado em relação ao processo pelo qual o polinucleotídeo é incorporado no vetor de expressão. Aqueles versados na técnica estão familiarizados com as etapas necessárias para incorporação de um polinucleotídeo em um vetor de expressão. Um vetor de expressão típico contém o polinucleotídeo desejado precedido por uma ou mais regiões reguladoras, juntamente com um sítio de ligação ribossômico, por exemplo, uma sequência de nucleotídeos que tem 3-9 nucleotídeos de comprimento e localizado 3-11 nucleotídeos a montante do códon inicial em *E. coli*. Vide Shine e Dalgarno (1975) *Nature* 254 (5495): 34-38 e Steitz (1979) *Biological Regulation and Development* (ed. Goldberger, R. R), 1: 349-399 (Plenum, New York).

[00211] O termo "operativamente ligado", conforme usado aqui, refere-se a uma configuração na qual uma sequência de controle é colocada em uma posição adequada em relação à sequência de codificação da sequência de DNA ou polinucleotídeo, de modo que a sequência de controle dirige a expressão de um polipeptídeo.

[00212] Regiões reguladoras incluem, por exemplo, regiões que contêm um promotor e um operador. Um promotor é operativamente ligado ao polinucleotídeo desejado, deste modo, iniciando a transcrição do polinucleotídeo por meio de uma enzima RNA polimerase. Um operador é uma sequência de ácidos nucleicos adjacente ao promotor a qual contém um domínio de ligação à proteína onde uma proteína repressora pode se ligar. Na ausência de uma proteína repressora, a transcrição é iniciada por meio do promotor. Quando presente, a prote-

ína repressora específica para o domínio de ligação à proteína do operador se liga ao operador, deste modo, inibindo a transcrição. Assim, o controle de transcrição é obtido com base nas regiões reguladoras usadas em particular e na presença ou ausência da proteína repressora correspondente. Exemplos incluem promotores de lactose (proteína repressora Lad muda a conformação quando contatada com lactose, deste modo, impedindo que a proteína repressora Lad se ligue ao operador) e promotores de triptofano (quando em complexo com triptofano, a proteína repressora TrpR tem uma conformação que se liga ao operador; na ausência de triptofano, a proteína repressora TrpR tem uma conformação que não se liga ao operador). Outro exemplo é o promotor tac (vide de Boer *et al.*, (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80(1): 21-25). Conforme será apreciado por aqueles versados na técnica, estes e outros vetores de expressão podem ser usados na presente relatório descritivo e a presente descrição não está limitada a este respeito.

[00213] Embora qualquer vetor de expressão adequado possa ser usado para incorporar as sequências desejadas, vetores de expressão prontamente disponíveis incluem, sem limitação: plasmídeos, tais como pSC101, pBR322, pBBRMCS-3, PUR, pEX, pMR100, pCR4, pBAD24, pUC19, pRS426; e bacteriófagos, tais como fago M13 e fago X. Naturalmente, tais vetores de expressão podem ser adequado apenas para células hospedeiras particulares. Aquelles versados na técnica, no entanto, podem determinar facilmente, através de experimentação de rotina, se qualquer vetor de expressão particular é adequado para qualquer dada célula hospedeira. Por exemplo, o vetor de expressão pode ser introduzido na célula hospedeira a qual é, então, monitorada quanto à viabilidade e expressão das sequências contidas no vetor. Além disso, referência pode ser feita aos textos e literatura pertinentes, os quais descrevem vetores de expressão e sua adequa-

bilidade à qualquer célula hospedeira particular.

[00214] Vetores de expressão adequados para fins da presente invenção, incluindo expressão do polipeptídeo heterólogo, enzima e um ou mais domínios catalíticos desejados descritos aqui, incluem vetores de expressão contendo o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo heterólogo, enzima ou domínio(s) catalítico(s) desejados operativamente ligado a um promotor constitutivo ou um promotor indutível. Exemplos de promotores particularmente adequados para ligação operativa de tais polinucleotídeos incluem os promotores dos genes a seguir: *gpda*, *cbhl*, amilase TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilase neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilase de *Aspergillus niger* estável a ácido, glucoamilase de *Aspergillus niger* (*glaA*), *glaA* de *Aspergillus awamori*, lipase de *Rhizomucor miehei*, protease alcalina de *Aspergillus oryzae*, isomerase de triose fosfato de *Aspergillus oryzae*, acetamidase de *Aspergillus nidulans*, acetamidase de *Aspergillus oryzae*, protease de tripsina de *Fusarium oxysporum*, endo  $\alpha$ -L-arabinase (*abnA*) fúngica,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase A (*abfA*) fúngica,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase B (*abfB*) fúngica, xilanase (*xlnA*) fúngica, fitase fúngica, ATP-sintetase fúngica, subunidade 9 (*oliC*) fúngica, isomerase de triose de fosfato (*tpi*) fúngica, desidrogenase de álcool (*adhA*) fúngica,  $\alpha$ -amilase (*amy*) fúngica, amiloglucosidase (*glaA*) fúngica, acetamidase (*amdS*) fúngica, desidrogenase de gliceraldeído-3-fosfato (*gpd*) fúngica, desidrogenase de álcool de levedura, lactase de levedura, quinase de 3-fosfoglicerato de levedura, isomerase de triose de fosfato de levedura,  $\alpha$ -amilase bacteriana, *Spo2* e *SSO* bacteriana. Exemplos de tais vetores de expressão e promotores adequados também são descritos no documento PCT/EP2011/070956, todo o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência.

### **Composições Farmacêuticas Contendo Polipeptídeos Heterólo-**

**gos Produzidos Pelas Células Fúngicas Filamentosas da Invenção**

[00215] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica, contendo um ou mais polipeptídeos heterólogos de interesse, tais como polipeptídeos de mamíferos, produzidos pelas células fúngicas filamentosas da presente descrição que tem atividade reduzida de pelo menos três proteases e contendo ainda um polinucleotídeo recombinante que codifica o polipeptídeo heterólogo, formulados em conjunto com um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas da invenção também podem ser administradas em terapia combinada, ou seja, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia combinada pode incluir um polipeptídeo de mamífero de interesse combinado com pelo menos outro agente terapêutico.

[00216] Conforme aqui usado, "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardo de absorção e similares que sejam fisiologicamente compatíveis. De preferência, o veículo é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, administração espinhal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, isto é, o polipeptídeo de mamífero de interesse, pode ser revestido com um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que possam inativar o composto.

[00217] As composições farmacêuticas da invenção podem incluir um ou mais sais farmacêuticamente aceitáveis. Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto parental e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejáveis (vide, por exemplo, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição de

ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e similares, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos, tais como ácidos mono- e dicarboxílicos alifáticos, ácidos fenil alcanóicos substituídos ácidos hidróxi alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfônicos alifáticos e aromáticos e similares. Sais de adição de base incluem aqueles derivados de metais alcalino terrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

[00218] Uma composição farmacêutica da invenção também pode incluir também um antioxidante farmacêuticamente aceitável. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbila, hidroxianisola butilada (**Butylated HydroxyAnisole** - BHA), hidroxitolueno butilado (**Butylated HydroxyToluene** - BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol e similares; e (3) agentes de quelação de metais, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (**EthyleneDiamine Tetraacetic Acid** - EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e similares.

[00219] Exemplos de veículos aquosos e não aquosos adequados que podem ser usados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tais como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol e similares) e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tal como azeite, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etila. Fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, mediante uso de materiais de revestimento, tal como lecitina, mantendo o tama-

nho de partícula requerido no caso de dispersões e usando tensoativos.

[00220] Estas composições podem também conter adjuvantes tais como conservantes, agentes de umedecimento, agentes de emulsificação e agentes de dispersão. Prevenção da presença de microorganismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização quanto inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e similares. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disso, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser obtido por meio de inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

[00221] Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós-estéreis para preparo extemporâneo de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o composto ativo, seu uso nas composições farmacêuticas da invenção é considerado. Compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

[00222] As composições terapêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para concentração elevada de fármaco. O veículo pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e similares) e misturas adequadas dos mesmos. Fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, mediante uso de um revestimento, tal como lecitina, mantendo



o tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e usando tensoativos. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Absorção prolongada das composições injetáveis pode ser obtida incluindo, na composição, um agente que retarda a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

[00223] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido de esterilização por microfiltração. Geralmente, dispersões são preparadas por meio de incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós-estéreis para preparo de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparo são secagem sob vácuo e secagem por congelamento (liofilização), os quais produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração.

[00224] A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única variará dependendo do indivíduo a ser tratado e do modo de administração em particular. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material veículo para produzir uma forma de dosagem única será, em geral, a quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, fora dos cem por cento, esta quantidade variará entre cerca de 0,01 por cento a cerca de noventa e nove por cento de ingrediente ativo, de preferência de cerca de 0,1 por cento a cerca de 70 por cento, mais preferivelmente de cerca de 1 por cento a cerca de 30 por cento de ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacologicamente aceitável.

[00225] Os regimes de dosagem são ajustados para conferir a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolus pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de dosagem unitária, conforme usado aqui, refere-se à unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o excipiente farmacêutico requerido. A especificação para as formas de dosagem unitária da invenção são orientadas por e diretamente dependentes de (a) as características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico a ser alcançado em particular e (b) as limitações inerentes na técnica de composição de tal composto ativo para o tratamento de sensibilidade em indivíduos.

[00226] Para a administração de um polipeptídeo de mamífero de interesse, em particular onde o polipeptídeo de mamífero é um anticorpo, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e, mais usualmente, 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal do hospedeiro. Por exemplo, as dosagens podem ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal ou na faixa de 1-10 mg/kg. Um regime de tratamento exemplificativo envolve a administração uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez a cada quatro semanas, uma vez por mês, uma vez a cada 3 meses ou uma vez a cada três a seis meses. Alguns esquemas de dosagem para um anticorpo podem incluir de 1 mg/kg de peso corporal

ou 3 mg/kg de peso corporal através de administração intravenosa, com o anticorpo sendo fornecido usando um dos esquemas de dosagem a seguir: (i) a cada quatro semanas para seis doses, então, a cada três meses; (ii) a cada três semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal uma vez, seguido por 1 mg/kg de peso corporal de três em três semanas.

[00227] Alternativamente, um polipeptídeo de mamífero de interesse pode ser administrado como uma formulação com liberação sustentada e, neste caso, é necessária uma administração menos frequente. A dosagem e frequência variam dependendo da meia-vida da substância administrada ao paciente. Em geral, anticorpos humanos exibem uma meia-vida mais longa, seguido por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente pouco frequentes durante um longo período de tempo. Alguns pacientes continuam a receber tratamento para o resto de suas vidas. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente elevada em intervalos relativamente curtos algumas vezes é necessário, até que a progressão da doença seja reduzida ou terminada e, de preferência, até que o paciente apresente melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Depois disso, pode ser administrado um regime profilático ao paciente.

[00228] Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente descrição podem ser variados, de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração em particular, sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma

variedade de fatores, incluindo a atividade de farmacocinética das composições da presente invenção empregadas em particular ou o éster, sal ou amida, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto a ser usado em particular, a duração de tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições empregadas em particular, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente a ser tratado e fatores similares bem conhecidos na técnica médica.

[00229] Uma "dose terapeuticamente eficaz" de uma imunoglobulina da presente descrição resulta, de preferência, em uma diminuição na gravidade dos sintomas da doença, aumento da frequência e duração dos períodos sem sintomas da doença ou uma prevenção de insuficiência ou incapacidade em virtude de aflição pela doença. Por exemplo, para o tratamento de tumores, uma "dose terapeuticamente eficaz", de preferência, inibe o crescimento celular ou o crescimento do tumor em pelo menos cerca de 20%, mais preferivelmente em pelo menos cerca de 40%, ainda mais preferivelmente em pelo menos cerca de 60% e, mais preferivelmente, em pelo menos cerca de 80% em relação a indivíduos não tratados. A capacidade de um composto de inibir o crescimento do tumor pode ser avaliada em um sistema modelo animal preditivo de eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando a capacidade de inibição do composto por meio de ensaios *in vitro* conhecidos por aqueles versados na técnica. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor ou, de outra forma, melhorar os sintomas em um indivíduo. Aqueles versados na técnica serão capazes de determinar tais quantidades com base em fatores tais como o tamanho do indivíduo, a gravidade dos sintomas do indivíduo e a composição ou via de adminis-

tração selecionada em particular.

[00230] A composição da presente descrição pode ser administrada através de uma ou mais vias de administração usando um ou mais de uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Conforme será apreciado por aqueles versados na técnica, a via e/ou modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Determinadas vias de administração de porções de ligação da invenção incluem administração intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutânea, espinhal ou outra via de administração parenteral, por exemplo, por injeção ou infusão. A frase "administração parenteral", conforme usado aqui, significa modos de administração diferentes de administração entérica e administração tópica, geralmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural, intra-esternal e intraorbital.

[00231] Alternativamente, um polipeptídeo de mamífero de acordo com a presente descrição pode ser administrado através de uma via não parenteral, tal como vias de administração tópica, epidérmica ou mucosal, por exemplo, por via intranasal, oral, vaginal, retal, sublingual ou tópica.

[00232] Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão o composto contra liberação rápida, tal como uma formulação com liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de distribuição microencapsulados. Polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, podem ser usados, tais como acetato de etileno vinila, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, polior-toésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para preparo de tais formulações são patenteados ou geralmente conhecidos por aqueles

versados na técnica (vide, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

[00233] Composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma determinada modalidade, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção sem agulha hipodérmica, tal como os dispositivos descritos nas Patentes dos Estados Unidos N<sup>os</sup> 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; ou 4.596.556. Exemplos de implantes bem conhecidos e módulos úteis na presente invenção incluem: Patente dos Estados Unidos N° 4.487.603, a qual descreve uma bomba de microinfusão implantável para distribuição de medicação em uma taxa controlada; Patente dos Estados Unidos N° 4.486.194, a qual descreve um dispositivo terapêutico para administrar medicamentos através da pele; Patente dos Estados Unidos N° 4.447.233, a qual descreve uma bomba de infusão de medicação para o fornecimento de medicamentos em uma taxa de infusão precisa; Patente dos Estados Unidos N° 4.447.224, a qual descreve um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para fornecimento contínuo de fármacos; Patente dos Estados Unidos N° 4.439.196, a qual descreve um sistema de administração de fármaco osmótico com compartimentos com múltiplas câmaras; e Patente dos Estados Unidos N° 4.475.196, a qual descreve um sistema de distribuição de fármaco osmótico.

[00234] Em determinadas modalidades, uso de polipeptídeos de mamífero de acordo com a presente descrição é para o tratamento de qualquer doença que possa ser tratada com anticorpos terapêuticos.

#### ***Células Fúngicas Filamentosas da Invenção***

[00235] A presente invenção refere-se também ao aumento dos níveis de produção de polipeptídeos heterólogos, tais como polipeptí-

deos de mamíferos, em células fúngicas filamentosas por meio de redução ou eliminação de atividade de pelo menos três proteases encontradas em células que expressam polipeptídeos heterólogos e que catalisam a degradação de polipeptídeos heterólogos. Redução ou eliminação de atividade de proteases encontradas nas células fúngicas filamentosas que expressam polipeptídeos heterólogos aumenta a estabilidade dos polipeptídeos recombinantes expressos, resultando em um aumento do nível de produção de polipeptídeos heterólogos. A atividade de proteases presentes nas células fúngicas filamentosas pode ser reduzida, por exemplo, modificando-se genes que codificam as proteases.

[00236] "Células fúngicas filamentosas" incluem células de todas as formas filamentosas da subdivisão Eumycota e Oomycota (conforme definido por Hawksworth et al., em Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edição, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido). Células fúngicas filamentosas são, geralmente, caracterizadas por uma parede micelial composta por quitina, celulose, glucana, quitosana, manana e outros polissacarídeos complexos. Crescimento vegetativo é por alongamento hifal e o catabolismo de carbono é obrigatoriamente aeróbico. Em contraste, crescimento vegetativo por leveduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, é por brotamento de um talo unicelular e o catabolismo de carbono pode ser fermentativo.

[00237] Qualquer célula fúngica filamentosa pode ser usada na presente descrição, contanto que ela permaneça viável após ter sido transformada com uma sequência de ácidos nucleicos e/ou ter sido modificada ou sofrido mutação para diminuir a atividade de protease. De preferência, a célula fúngica filamentosa não é adversamente afetada pela transdução das sequências de ácidos nucleicos necessárias, a subsequente expressão de proteínas (por exemplo, proteínas de

mamífero) ou os intermediários resultantes.

[00238] Exemplos de células fúngicas filamentosas apropriadas incluem, sem limitação, células de uma cepa de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Scytalidium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* ou *Trichoderma*. Em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa é de uma cepa de *Trichoderma* sp., *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Chrysosporium*, *Chrysosporium lucknowense*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia* ou *Tolypocladium*.

[00239] As células fúngicas de *Aspergillus* da presente descrição podem incluir, sem limitação, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus terreus*.

[00240] As células fúngicas de *Neurospora* da presente descrição podem incluir, sem limitação, *Neurospora crassa*.

[00241] Em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa não é uma célula de *Aspergillus*.

[00242] Em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa é selecionada do grupo que consiste em *Trichoderma* (*T. reesei*), *Neurospora* (*N. crassa*), *Penicillium* (*P. chrysogenum*), *Aspergillus* (*A. nidulans*, *A. niger* e *A. oryzae*), *Myceliophthora* (*M. thermophila*) e *Chrysosporium* (*C. lucknowense*).

[00243] Em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa é uma célula fúngica de *Trichoderma*. Células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição podem ser derivadas de uma cepa de *Trichoderma* de tipo selvagem ou um mutante da mesma. Exemplos



de células fúngicas de *Trichoderma* adequadas incluem, sem limitação, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma virens*, *Trichoderma viride*; e a forma sexual alternativa das mesmas (isto é, *Hypocrea*).

[00244] Métodos gerais para ruptura de genes e cultura de células fúngicas filamentosas são descritos, por exemplo, para *Penicillium* em Kopke *et al.* (2010) Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT Recombination System in Filamentous Fungi For Marker Recycling and Construction of Knockout Strains Devoid of Heterologous Genes. *Appl Environ Microbiol.* 76(14): 4664-74. doi: 10.1128/AEM.00670-10, para *Aspergillus* em Maruyama e Kitamoto (2011), Targeted Gene Disruption in Koji Mold *Aspergillus oryzae*, em James A. Williams (ed.), Strain Engineering: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 765, DOI 10.1007/978-1-61779-197-0\_27; para *Neurospora* em Collopy *et al.* (2010) High-throughput Construction of Gene Deletion Cassettes For Generation of *Neurospora Crassa* Knockout Strains. *Methods Mol Biol.* 2010; 638: 33-40. doi: 10.1007/978-1-60761-611-5-3; e para *Myceliophthora* ou *Chrysosporium* no documento PCT/NL2010/000045 e documento PCT/EP98/06496.

### **Componentes da Célula Fúngica Filamentosa**

[00245] Determinados aspectos da presente descrição referem-se à células fúngicas filamentosas tendo atividade reduzida ou nenhuma detectável de pelo menos três proteases e tendo um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo que é produzido em níveis aumentados, por exemplo, níveis pelo menos duas vezes aumentados. Outros aspectos da presente descrição referem-se à células fúngicas de *Trichoderma* que não têm atividade de protease detectável de pelo menos três proteases selecionadas de *pep1*, *pep2*,

*pep3, pep4, pep5, pep8, pep11, pep12, tsp1, slp1, slp2, slp7, gap1 e gap2*, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero produzido em um nível pelo menos 2 vezes maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica de *Trichoderma* parental correspondente. Em determinadas modalidades, as células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* têm atividade reduzida ou nenhuma de pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos seis, pelo menos sete, pelo menos oito, pelo menos nove, pelo menos dez, pelo menos onze, pelo menos doze ou mais proteases.

### ***Expressão Reduzida de Proteases***

[00246] A atividade reduzida das pelo menos três proteases em células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição pode ser o resultado de expressão reduzida ou inexistente das proteases. Em algumas modalidades, a expressão reduzida ou inexistente das pelo menos três proteases é o resultado de uma modificação do domínio catalítico, da região de codificação ou uma sequência de controle necessária para expressão da região de codificação dos genes que codificam cada uma das proteases. Em outras modalidades, a expressão reduzida ou inexistente das proteases é o resultado da introdução, substituição e/ou remoção de um ou mais nucleotídeos nos genes ou uma sequência de controle dos mesmos necessária para transcrição ou tradução dos genes que codificam cada uma das proteases.

[00247] Em outras modalidades, a expressão reduzida ou inexistente das proteases é o resultado de inserção, nos genes que codificam cada uma das proteases, de construtos de ácido nucleico de ruptura contendo, cada um, um fragmento de ácido nucleico homólogo a cada um dos genes, o qual criará uma duplicação da região de homologia e incorporará o construto de DNA entre as regiões duplicadas.

Em outras modalidades, a expressão reduzida ou inexistente das proteases é o resultado de conversão gênica dos genes que codificam cada uma das proteases. Em ainda outras modalidades, a expressão reduzida ou inexistente das proteases é o resultado de polinucleotídeos antisenso ou construtos de RNAi que são específicos para cada um dos genes que codificam cada uma das proteases. Em uma modalidade, um construto de RNAi é específico para um gene que codifica uma protease aspártica, tal como uma protease do tipo *pep*, uma protease de serina do tipo tripsina, tal como uma *tsp1*, uma protease glutâmica, tal como uma protease do tipo *gap*, uma protease subtilisina, tal como uma protease de tipo *sip*, ou uma protease sedolisina, tal como uma protease *tpp1* ou *slp7*. Em uma modalidade, um construto de RNAi é específico para o gene que codifica uma protease de tipo *sip*. Em uma modalidade, um construto de RNAi é específico para o gene que codifica *slp2*, *slp3*, *slp5* ou *slp6*. Em uma modalidade, um construto de RNAi é específico para duas ou mais proteases. Em uma modalidade, duas ou mais proteases são qualquer uma das proteases de tipo *pep*, qualquer uma das proteases de serina de tipo tripsina, qualquer uma das proteases de tipo *sip*, qualquer uma das proteases de tipo *gap* e/ou qualquer um das proteases sedolisina. Em uma modalidade, duas ou mais proteases são *slp2*, *slp3*, *slp5* e/ou *slp6*. Em uma modalidade, o construto de RNAi compreende qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos da Tabela 22.2.

[00248] Em algumas modalidades, os genes que codificam as proteases contêm, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente. Em outras modalidades, a mutação reduz ou elimina a expressão de cada uma das proteases. Em outras modalidades, a mutação é uma mutação *knockout*, uma mutação de truncamento, uma mutação pontual, uma mutação antisenso, uma mutação por substituição, uma mutação por deslocamento do quadro,

uma mutação por inserção, uma mutação por duplicação, uma mutação por amplificação, uma mutação por translocação, uma mutação por inversão que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente.

[00249] Em algumas modalidades, a mutação é uma deleção do gene que codifica a protease. Em outras modalidades, a mutação é uma deleção da porção do gene que codifica a protease que codifica o domínio catalítico de protease. Em ainda outras modalidades, a mutação é uma mutação pontual na porção do gene que codifica a protease que codifica o domínio catalítico de protease.

### ***Combinações de Genes de Protease***

[00250] As células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição podem conter pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos seis, pelo menos sete, pelo menos oito, pelo menos nove, pelo menos dez ou mais proteases aspárticas, proteases de serina de tipo tripsina, proteases subtilisina e/ou proteases glutâmicas. Em determinadas modalidades, as proteases são codificadas por genes de protease de tipo *pep*, genes de protease de tipo *gap* ou genes de proteases de tipo *sip*. Em algumas modalidades, os genes de protease de tipo *pep* são selecionados de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *pep11* e *pep12*. Em outras modalidades, os genes de protease de tipo *gap* são selecionados de *gap1* e *gap2*. Em outras modalidades, os genes de protease de tipo *sip* são selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3* e *slp7*; ou são selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *slp5*, *slp6*, *slp7* e *slp8*. Em determinadas modalidades preferidas, o gene de protease de tipo *sip* é *slp1*.

[00251] Em outras modalidades, as proteases são codificadas por genes selecionados de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep7*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp3*, *slp5*, *slp6*, *slp7*, *slp8*, *gap1*, *gap2* e *tpp1*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por

exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de pelo menos três ou pelo menos quatro genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp3*, *slp7*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de pelo menos três genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *tsp1* e *slp1*. Em outras modalidades, a célula fúngica filamentosa, tal como uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de pelo menos três genes que codificam protease selecionados de *gap1*, *slp1* e *pep 1*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1* e *gap1*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1* e *pep4*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4* e *slp1*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1* e *slp3*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1*, *slp3* e *pep3*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecio-

nados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1*, *slp3*, *pep3* e *pep2*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1*, *slp3*, *pep3*, *pep2* e *pep5*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1*, *slp3*, *pep3*, *pep2*, *pep5* e *tsp1*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1*, *slp3*, *pep3*, *pep2*, *pep5*, *tsp1* e *slp7*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1*, *slp3*, *pep3*, *pep2*, *pep5*, *tsp1*, *slp7* e *slp8*. Em algumas modalidades, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, tem níveis de expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp1*, *slp3*, *pep3*, *pep2*, *pep5*, *tsp1*, *slp7*, *slp8* e *gap2*.

[00252] Em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa tem pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos seis, pelo menos sete, pelo menos oito, pelo menos nove, pelo menos dez ou mais proteases com atividade reduzida de protease, em que as proteases correspondentes com atividade de tipo selvagem têm, cada uma, uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo

menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntica às sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1-16; 17-36; 37-57; 58-65; 66-81; 82-97; 98-117; 118-128; 129-144; 166-181; 182-185; ou SEQ ID NOs: 491-588. Em modalidades onde a célula fúngica filamentosa é uma célula fúngica de *Trichoderma* com atividade reduzida de protease uma ou mais proteases em que as proteases correspondentes com atividade de tipo selvagem têm, cada uma, uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% idêntica às sequências de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1, 17, 37, 58, 66, 82, 98, 118, 129, 166 ou 182; ou SEQ ID NO: 507, SEQ ID NO: 522 ou SEQ ID NO: 530.

### ***Polipectídeos Heterólogos***

[00253] As células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição contêm um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo de mamífero. Em outras modalidades, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo que não é de mamífero.

[00254] Em modalidades em que a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero, o polipeptídeo de mamífero pode ser um polipeptídeo de mamífero não glicosilado, um polipeptídeo de mamífero glicosilado ou combinações dos mesmos incluindo, sem limitação, uma imunoglobulina, um anticorpo, um fator de crescimento e um interferon. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é uma imunoglobulina ou um anticorpo. Em modalidades em que a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo, a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma

célula fúngica de *Trichoderma*, pode ter expressão reduzida ou inexistente de pelo menos três ou pelo menos quatro genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *pep3*, *pep4*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp7*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades preferidas, a célula, por exemplo, uma célula fúngica de *Trichoderma*, contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *tsp1*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *pep3*, *pep2*, *pep5* e *gap2*. Em determinadas modalidades preferidas, a célula, por exemplo, uma célula fúngica de *Trichoderma*, contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida ou inexistente de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *tsp1*, *slp1* e *gap1*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1* e *pep4*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2* e *slp3*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3* e *tsp1*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *tsp1* e *pep1*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *tsp1*, *pep1* e *gap1*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleo-



tídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *tsp1*, *pep1*, *gap1* e *pep4*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *tsp1*, *pep1*, *gap1*, *pep4* e *pep3*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *tsp1*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *pep3* e *pep2*. Em outras modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica uma imunoglobulina ou anticorpo e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *slp3*, *tsp1*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *pep3*, *pep2* e *pep5*.

[00255] Em outras modalidades, a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina ou interleucina. Em modalidades em que a célula fúngica filamentosa, por exemplo, uma célula fúngica de *Trichoderma*, contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina, a célula fúngica filamentosa pode ter expressão reduzida ou inexistente de pelo menos três ou pelo quatro genes que codificam pelo menos uma protease selecionada de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *gap1*, *gap2*, *slp1*, *slp2*, *slp7* e *tsp1*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica hu-

mana ou interleucina e reduziu a expressão de genes que codificam protease selecionados de *slp1*, *slp2*, *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp7*, *pep2*, *pep3*, *pep5*, *tsp1* e *gap2*. Em outras modalidades, a célula, por exemplo, uma célula fúngica de *Trichoderma*, contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2* e *pep4*. Em uma outra modalidade, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento e expressão reduzida de genes de protease de tipo *pep* selecionados de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4* e *pep5*. Em determinadas modalidades preferidas, o fator de crescimento é IGF-1 ou o interferon é interferon- $\alpha$  2b. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1* e *pep4*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1*, *pep4* e *slp7*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp7* e *slp2*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp7*, *slp2* e *pep2*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator

de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp7*, *slp2*, *pep2* e *pep3*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp7*, *slp2*, *pep2*, *pep3* e *pep5*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp7*, *slp2*, *pep2*, *pep3*, *pep5* e *slp1*. Em determinadas modalidades, a célula contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um fator de crescimento, interferon, citocina, albumina sérica humana ou interleucina e tem expressão reduzida de genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *gap1*, *pep4*, *slp7*, *slp2*, *pep2*, *pep3*, *pep5*, *slp1* e *tsp1*.

[00256] Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é produzido em um nível que é pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 60 vezes, pelo menos 70 vezes, pelo menos 75 vezes, pelo menos 80 vezes, pelo menos 90 vezes, pelo menos 100 vezes ou maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica filamentosa parental correspondente sem atividade de protease reduzida. Em outras modalidades, o polipeptídeo de mamífero é produzido em uma versão de comprimento total em um nível mais elevado do que o nível de produção da versão de comprimento total do poli-

peptídeo em uma célula fúngica filamentosa parental correspondente.

[00257] Em modalidades em que a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo que não é de mamífero, o polipeptídeo que não é de mamífero pode ser uma aminopeptidase, amilase, carbohidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cutinase, desoxirribonuclease, esterase, alfa-galactosidase, beta-galactosidase, glucoamilase, alfa-glucosidase, beta-glucosidase, invertase, lacases, lipase, mutanase, oxidase, uma enzima pectinolítica, peroxidase, fosfolipase, fitase, oxidase de polifenol, uma enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase ou xilanaase. Em modalidades em que a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo que não é de mamífero, a célula fúngica filamentosa pode ter expressão reduzida ou inexistente detectável de pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco ou pelo menos seis genes que codificam protease selecionados de *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp3*, *gap1* e *gap2*. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo que não é de mamífero é produzido em um nível que é pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 60 vezes, pelo menos 70 vezes, pelo menos 75 vezes, pelo menos 80 vezes, pelo menos 90 vezes, pelo menos 100 vezes ou maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica filamentosa parental correspondente. Em outras modalidades, o polipeptídeo que não é mamífero é produzido em uma versão de comprimento total em um nível mais elevado do que o nível de produção da versão de comprimento total do polipeptídeo em uma célula fúngica filamentosa parental cor-

respondente.

### ***Atividade Reduzida de Proteases Adicionais***

[00258] Em algumas modalidades, as células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição também têm atividade reduzida de uma ou mais proteases adicionais. Em determinadas modalidades, o nível de expressão de uma ou mais proteases adicionais é reduzido. Em determinadas modalidades preferidas, os genes que codificam uma ou mais proteases adicionais compreendem, cada um, uma mutação que reduz a atividade de protease correspondente. Os um ou mais genes que codificam protease podem ser *pep7*, *tpp1*, *gap2*, *slp3*, *slp5*, *slp6*, *slp7* ou *slp8*.

[00259] Em determinadas modalidades, quando a célula fúngica filamentosa é uma célula de *Aspergillus*, a atividade total de protease é reduzida para 50% ou menos da atividade total de protease na célula de *Aspergillus* parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida.

[00260] Em determinadas modalidades, a atividade total de protease é reduzida na célula da presente descrição, por exemplo, uma célula de *Trichoderma*, para 49% ou menos, 31% ou menos, 13% ou menos, 10% ou menos ou 6,3% menos ou 5,5% ou menos da atividade total de protease na célula filamentosa fúngica parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida.

### ***Modificações Recombinantes Adicionais***

[00261] Em determinadas modalidades, as células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição também têm atividade reduzida de uma doliquil-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-doliquil manosil transferase. doliquil-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-doliquil manosil transferase (EC 2.4.1.130) transfere um resíduo de alfa-D-manosila de doliquil-fosfato D-manose em um oligossacarídeo ligado a lipídio da membrana. Tipicamente, a

enzima doliquil-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-doliquil manosil transferase é codificada por um gene *alg3*. Assim, em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa tem reduzida atividade de ALG3, que é a atividade codificada pelo gene *alg3*. Em algumas modalidades, o gene *alg3* contém uma mutação que reduz a atividade de ALG3 correspondente. Em determinadas modalidades, o gene *alg3* é deletado da célula fúngica filamentosa.

[00262] Em outras modalidades, as células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição contêm também um polinucleotídeo que codifica uma  $\alpha$ 1,2-manosidase. O polinucleotídeo que codifica a  $\alpha$ 1,2-manosidase pode ser endógeno na célula hospedeira ou pode ser heterólogo em relação à célula hospedeira. Estes polinucleotídeos são especialmente úteis para uma célula fúngica filamentosa que expressa glicanas com alto teor de manose transferidas do Golgi para o ER sem clivagem de exo- $\alpha$ -2-manosidase eficaz. A  $\alpha$ 1,2-manosidase pode ser uma enzima manosidase de tipo I pertencente à família 47 de hidrolases de glicosídeo ([cazy.org/GH47\\_all.html](http://cazy.org/GH47_all.html)). Em determinadas modalidades, a  $\alpha$ 1,2-manosidase é uma enzima listada em [cazy.org/GH47\\_characterized.html](http://cazy.org/GH47_characterized.html). Em particular, a  $\alpha$ 1,2-manosidase pode ser uma enzima do tipo ER que cliva glicoproteínas, tais como enzimas na subfamília de enzimas  $\alpha$ -manosidase I de ER (EC 3.2.1.113). Exemplos de tais enzimas incluem  $\alpha$ -2-manosidase IB humana (AAC26169), uma combinação de enzimas manosidases de ER de mamíferos ou de um fungo filamentoso, tal como  $\alpha$ 1,2-manosidase (MDS1) (AAF34579 de *T. reesei*; Maras M et al., *J Biotech.* 77, 2000, 255). Para expressão em ER/Golgi, o domínio catalítico da manosidase é, tipicamente, fundido com um peptídeo de objetivação, tal como HDEL, KDEL ou parte de uma proteína do ER ou Golgi proximal ou expressa com estruturas de objetivação de ER endógenas de um ani-

mal ou enzima manosidase I de planta; vide, por exemplo, Callewaert et al., Use of HDEL-Tagged *Trichoderma reesei* Mannosyl Oligosaccharide 1,2- $\alpha$ -D-Mannosidase for N-glycan Engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* 503: 173-178.

[00263] Em outras modalidades, as células fúngicas filamentosas ou células fúngicas de *Trichoderma* da presente descrição contêm também um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II. Tais domínios catalíticos são úteis para expressão de N-glicanas complexas em células que não são de mamífera. N-acetilglucosaminil transferase I (GlcNAc-TI; GnTI; EC 2.4.1.101) catalisa a reação de UDP-N-acetil-D-glucosamina + 3-( $\alpha$ -D-manosil)- $\beta$ -D-manosil-R  $\rightleftharpoons$  UDP + 3-(2-(N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil)- $\alpha$ -D-manosil)- $\beta$ -D-manosil-R, onde R representa o restante do oligossacarídeo N-ligado no receptor de glicana. Um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I é qualquer porção de uma enzima N-acetilglucosaminil transferase I que é capaz de catalisar esta reação. N-acetilglucosaminil transferase II (GlcNAc-TII; GnTII; EC 2.4.1.143) catalisa a reação de UDP-N-acetil-D-glucosamina + 6-( $\alpha$ -D-manosil)- $\beta$ -D-manosil-R  $\rightleftharpoons$  UDP + 6-(2-(N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil)- $\alpha$ -D-manosil)- $\beta$ -D-manosil-R, onde R representa o restante do oligossacarídeo N-ligado no receptor de glicana. Um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II é qualquer porção de uma enzima N-acetilglucosaminil transferase II que é capaz de catalisar esta reação. Exemplos de domínios catalíticos de N-acetilglucosaminil transferase I e domínios catalíticos de N-acetilglucosaminil transferase II adequados podem ser encontrados no Pedido de Patente Internacional N° PCT/EP2011/07095 6. O domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II podem ser codificados por um polinucleotídeo. Em determinadas modalidades, o polinucleotídeo codifica

uma proteína de fusão que contém o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II. Alternativamente, o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I pode ser codificado por um primeiro polinucleotídeo e o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II pode ser codificado por um segundo polinucleotídeo.

[00264] Em modalidades em que a célula fúngica filamentosa ou célula de *Trichoderma* contém um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II, a célula pode também conter um polinucleotídeo que codifica uma manosidase II. Enzimas manosidase II são capazes de clivar estruturas man5 de GlcNAcMan5 para gerar GlcNAcMan3 e, se combinada com a ação de um domínio catalítico de GnTII, geram GO; e, ainda, com ação de um domínio catalítico de uma galactosil transferase, geram G1 e G2. Em determinadas modalidades, enzimas manosidase de tipo II pertencem à família 38 de hidrolases de glicosídeo ([cazy.org/GH38\\_all.html](http://cazy.org/GH38_all.html)). Exemplos de tais enzimas incluem enzima AAC50302 humana, enzima de *D. melanogaster* (Van den Elsen J.M. et al (2001) *EMBO J.* 20: 3008-3017), aquelas com estrutura 3D de acordo com a referência 1HTY no PDB e outras citadas com o domínio catalítico no PDB. Para expressão em ER/Golgi, o domínio catalítico de manosidase é, tipicamente, fundido com um peptídeo de objetivação N-terminal, por exemplo, usando os peptídeos de objetivação listados no Pedido de Patente Internacional Nº PCT/EP2011/070956 ou de SEQ ID NOs: 589-594. Após transformação com o domínio catalítico de uma manosidase de tipo II, uma cepa que produz efetivamente GlcNAc2Man3, GlcNAcMan3 ou GO é selecionada.

[00265] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica filamentosa contém



ainda um polinucleotídeo que codifica um transportador de UDP-GlcNAc.

[00266] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, a célula fúngica filamentosa contém ainda um polinucleotídeo que codifica uma  $\beta$ -1,4-galactosil transferase. Geralmente,  $\beta$ -1,4-galactosil transferases pertencem à família 7 de glicosil transferase CAZy ([cazy.org/GT7\\_all.html](http://cazy.org/GT7_all.html)). Exemplos de enzimas  $\beta$ 4GalT úteis incluem  $\beta$ 4GalT1, por exemplo, enzima AAA30534.1 bovina de *Bos taurus* (Shaper N.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (6), 1573-1577 (1986)), enzima humana (Guo S. et al., *Glycobiology* 2001, 11: 813-20) e enzima AAA37297 de *Mus musculus* (Shaper, N.L. et al., 1998 *J. Biol. Chem.* 263 (21), 10420 -10428). Em determinadas modalidades da invenção em que a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo que codifica uma galactosil transferase, a célula fúngica filamentosa também contém um polinucleotídeo que codifica uma 4-epimerase de UDP-Gal e/ou transportador de UDP-Gal. Em determinadas modalidades da invenção em que a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo que codifica uma galactosil transferase, lactose pode ser usada como fonte de carbono, em vez de glicose, quando de cultura da célula hospedeira. O meio de cultura pode estar entre um pH de 4,5 e 7,0 ou entre 5,0 e 6,5. Em determinadas modalidades da invenção em que a célula fúngica filamentosa contém um polinucleotídeo que codifica uma galactosil transferase e, opcionalmente, um polinucleotídeo que codifica uma 4-epimerase de UDP-Gal e/ou transportador de UDP-Gal, um cátion bivalente, tal como  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ , pode ser adicionado ao meio de cultura de células.

[00267] Em determinadas modalidades que podem ser combinadas com as modalidades precedentes, o nível de atividade de alfa-1,6-manosil- transferase na célula hospedeira é reduzido comparado com o nível de atividade em uma célula hospedeira de tipo selvagem. Em

determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa tem um nível reduzido de expressão de um gene *och1* comparado com o nível de expressão de uma célula fúngica filamentosa de tipo selvagem.

[00268] Outro aspecto inclui métodos de produção de uma N-glicana Man3GlcNAc2 [isto é, Man $\alpha$ 3(Man $\alpha$ 6)Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc] em uma célula fúngica filamentosa, incluindo as etapas de fornecimento de uma célula fúngica filamentosa com um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo e um nível reduzido de atividade de uma manosil transferase *alg3* comparado com o nível de atividade em uma célula fúngica filamentosa de tipo selvagem e cultura da célula fúngica filamentosa para produzir uma glicana Man3GlcNAc2, onde as glicanas Man3GlcNAc2 constituem pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (% em mol) de N-glicanas neutras secretadas pelas células fúngicas filamentosas. Em determinadas modalidades, N-glicana Man3GlcNAc2 representa pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, em menos 90% ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo heterólogo.

[00269] Outro aspecto inclui métodos de produção de uma N-glicana complexa (por exemplo, uma N-glicana que compreende uma estrutura GlcNAc2Man3 terminal), por exemplo, GlcNAc2Man3GlcNAc2 glicana (isto é, GO, ou seja, GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3(GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6)Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc) em uma célula fúngica filamentosa, incluindo as etapas de fornecimento de uma célula fúngica filamentosa com um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo, um nível reduzido de atividade de manosil transferase *alg3* comparado com o nível de atividade em uma célula fúngica filamentosa de tipo selvagem e compreendendo ainda

um polinucleotídeo que codifica um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e um polinucleotídeo que codifica um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II e cultura da célula fúngica filamentosa para produzir N-glicanas complexas, por exemplo, GlcNAc2Man3GlcNAc2 glicana, em que a GlcNAc2Man3GlcNAc2 glicana constitui pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (% em mol) de N-glicanas neutras secretadas pelas células fúngicas filamentosas. Em determinadas modalidades, a N-glicana complexa, por exemplo, GlcNAc2Man3GlcNAc2 glicana, representa pelo menos 5%, pelo menos 10 %, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo. Em determinadas modalidades, as ditas N-glicanas complexas são GlcNAcMan3 e/ou GlcNAc2Man3.

[00270] Outro aspecto inclui métodos de produção de uma N-glicana G1 ou G2 ou mistura das mesmas, por exemplo, GalGlcNAc2Man3GlcNAc2 (isto é, G1, ou seja, Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3(GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6)Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc) ou GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3(Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6)Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc) e/ou Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2 (isto é, G2, ou seja, Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3(Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 6)Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc) glicana em uma célula fúngica filamentosa, incluindo as etapas de fornecimento de uma célula fúngica filamentosa com um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo e um nível reduzido de atividade de uma manosil transferase alg3 comparado com o nível de atividade em uma célula fúngica filamentosa de tipo selvagem e ainda compreendendo um polinucleotídeo que codifica um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I, um polinucleo-

tídeo que codifica um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II e um polinucleotídeo que codifica um domínio catalítico de GalT e cultura da célula fúngica filamentosa para produzir a N-glicana G1 ou G2 ou mistura das mesmas, em que a glicana G1 constitui pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60 %, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (% em mol) de N-glicanas neutras secretadas pelas células fúngicas filamentosas ou em que a glicana G2 representa pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (% em mol) dos N-glicanas neutras secretadas pelas células fúngicas filamentosas. Em determinadas modalidades, a glicana G1 constitui pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90 % ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo. Em determinadas modalidades, a glicana G2 constitui pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90 % ou 100% (mol %) do total de N-glicanas do polipeptídeo.

[00271] Em determinadas modalidades, o método de produção de uma N-glicana complexa gerará uma mistura de diferentes glicanas. As N-glicanas complexas ou Man3GlcNAc2 podem constituir pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, em menos de 80%), ou, pelo menos, 90% ou mais de tal mistura de glicanas. Em determinadas modalidades, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%), ou,

pelo menos, 90% ou mais das N-glicanas do polipeptídeo consistem em tal mistura de glicanas. Em determinadas modalidades, o método de produção de uma N-glicana complexa e G1 e/ou G2 gerará uma mistura de diferentes glicanas. A N-glicana complexa, Man3GlcNAc2, G1 e/ou G2 pode constituir pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%), ou, pelo menos, 90% ou mais de tal mistura de glicanas. Em determinadas modalidades, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90% ou mais das N-glicanas do polipeptídeo consistem em uma mistura de tais glicanas.

[00272] Em determinadas modalidades, métodos de produção de uma N-glicana híbrida são desejáveis. Conforme usado aqui, o termo "híbrida" significa uma glicana contendo tanto resíduos de manose terminais não substituídos (como presentes em glicanas com alto teor de manose) quanto resíduos de manose substituídos com uma ligação de N-acetilglucosamina, por exemplo, GlcNAc $\beta$ 2Man $\alpha$ 3[Man $\alpha$ 3(Man $\alpha$ 6) Man $\alpha$ 6]Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc. Em tais modalidades, uma célula fúngica filamentosa que expressa Man5 (isto é, Man $\alpha$ 3[Man $\alpha$ (Man $\alpha$ 6)Man $\alpha$ 6]Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc), tal como uma cepa de *T. reesei*, é transformada com um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo e um polinucleotídeo que codifica um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e a célula fúngica filamentosa é cultivada para produzir a N-glicana híbrida, onde a N-glicana híbrida constitui pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (mol %) das N-glicanas neutras secretadas pela célula fúngica filamentosa. Em determinadas modalidades, pelo

menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, em menos 80%, pelo menos 90% ou 100% (% em mol) das N-glicanas do polipeptídeo consistem em N-glicanas híbridas.

[00273] As N-glicanas Man3GlcNAc2, complexas, híbridas, G1 e G2 podem ser ligadas a uma molécula selecionada de um aminoácido, um peptídeo e um polipeptídeo. Em determinadas modalidades, as N-glicanas Man3GlcNAc2, complexas, híbridas, G1 e G2 são ligadas a um polipeptídeo heterólogo. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo heterólogo é uma proteína glicosilada. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo glicosilado é um polipeptídeo de mamífero. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo.

[00274] Em determinadas modalidades, glicosil transferase ou, por exemplo, glicosil hidrolases GnTI, GnTII ou Gal ou, por exemplo,  $\alpha$ 1,2-manosidase ou manosidase II, incluem um peptídeo de objetivação ligado aos domínios catalíticos. O termo "ligado", conforme usado aqui, significa que dois polímeros de resíduos de aminoácidos, no caso de um polipeptídeo, ou dois polímeros de nucleotídeos, no caso de um polinucleotídeo, são acoplados diretamente um ao lado do outro ou estão dentro do mesmo polipeptídeo ou polinucleotídeo, mas são separados por intermédio de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos. Um "peptídeo de objetivação", conforme usado aqui, refere-se a qualquer número de resíduos de aminoácidos consecutivos da proteína recombinante que são capazes de localizar a proteína recombinante no retículo endoplasmático (**E**ndoplasmic **R**eticulum - ER) ou aparelho de Golgi (Golgi) dentro da célula fúngica filamentosa. O peptídeo de objetivação pode ser N-terminal ou C-terminal aos domínios catalíticos. Em determinadas modalidades, o peptídeo de objetivação é N-terminal aos domínios catalíticos. Em determinadas modalidades, o

peptídeo de objetivação permite ligação direta à membrana do ER ou Golgi. Componentes do peptídeo de objetivação podem se originar de qualquer enzima que normalmente reside no ER ou aparelho de Golgi. Tais enzimas incluem manosidases, manosil transferases, glicosil transferases, proteínas de Golgi de tipo 2 e enzimas MNN2, MNN4, MNN6, MNN9, MNN10, MNS1, KRE2, VAN1 e OCH1. Peptídeos de objetivação adequados são descritos no Pedido de Patente Internacional N° PCT/EP2011/070956. Em uma modalidade, o peptídeo de objetivação de GnTI ou GnTII é uma enzima GnTII humana. Em outras modalidades, o peptídeo de objetivação é derivado de *Kre2*, de tipo *Kre2*, *Och1*, *Anp1* e *Van1* de *Trichoderma*. Em uma modalidade, o peptídeo de objetivação é selecionado do grupo de SEQ ID NOs: 589-594.

### ***Usos de Células Fúngicas Filamentosas da Invenção***

[00275] A invenção refere-se aqui ainda a métodos de uso de qualquer uma das células fúngicas filamentosas da presente descrição, tais como células fúngicas de *Trichoderma*, que têm pouca ou nenhuma atividade de protease de pelo menos três proteases e que contêm um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo, tal como um polipeptídeo de mamífero, que é produzido em níveis aumentados para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo heterólogo e para produzir um polipeptídeo heterólogo. Métodos para medição de estabilidade de proteínas e para produção de um polipeptídeo heterólogo são bem conhecidos e incluem, sem limitação, todas as técnicas e métodos descritos na presente descrição.

[00276] Deste modo, determinadas modalidades da presente descrição referem-se a métodos para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo heterólogo por: a) fornecimento de uma célula fúngica filamentosa da presente descrição tendo atividade reduzida ou inexistente de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um

polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo; e b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso, onde o polipeptídeo heterólogo tem estabilidade aumentada comparado com uma célula hospedeira que não contém as mutações dos genes que codificam as proteases. Outras modalidades da presente descrição referem-se a métodos para aprimorar a estabilidade do polipeptídeo de mamífero por: a) fornecimento de uma célula fúngica de *Trichoderma* da presente descrição tendo atividade reduzida ou inexistente de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo de mamífero; e b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo de mamífero seja expresso, em que o polipeptídeo de mamífero tem estabilidade aumentada comparado com uma célula hospedeira que não contém as mutações dos genes que codificam as proteases. A célula fúngica filamentosa ou célula fúngica de *Trichoderma* pode ser qualquer célula descrita na seção intitulada "Células Fúngicas Filamentosas da Invenção". Métodos de medição de estabilidade do polipeptídeo e para cultura de células fúngicas filamentosas e células fúngicas de *Trichoderma* são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, todas as técnicas e métodos descritos na presente descrição.

[00277] Em determinadas modalidades, a estabilidade do polipeptídeo heterólogo ou polipeptídeo de mamífero é aumentada em pelo menos 2 vezes, pelo menos 3 vezes, pelo menos 4 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 6 vezes, em pelo menos 7 vezes, pelo menos 8 vezes, pelo menos 9 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 15 vezes, pelo menos 20 vezes, pelo menos 25 vezes, pelo menos 30 vezes, pelo menos 40 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 60 vezes, pelo menos 70 vezes, pelo menos 75 vezes, pelo menos 80 vezes, pelo menos 90 vezes, pelo menos 100 vezes ou maior comparado



com um polipeptídeo heterólogo ou polipeptídeo de mamífero expresso em uma célula fúngica filamentosa ou célula fúngica de *Trichoderma* parental correspondente.

[00278] Outras modalidades da presente descrição referem-se a métodos de preparo de um polipeptídeo heterólogo por: a) fornecimento de uma célula fúngica filamentosa da presente descrição tendo atividade reduzida ou inexistente de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo; b) cultura da célula hospedeira de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso; e c) purificação do polipeptídeo heterólogo. Outras modalidades da presente descrição referem-se a métodos de preparo de um polipeptídeo de mamífero por: a) fornecimento de uma célula fúngica de *Trichoderma* da presente descrição tendo atividade reduzida ou inexistente de pelo menos três proteases, onde a célula contém adicionalmente um polinucleotídeo recombinante que codifica um mamífero polipeptídeo; b) cultura da célula hospedeira de modo que o polipeptídeo de mamífero seja expresso; e c) purificação do polipeptídeo de mamífero. A célula fúngica filamentosa ou célula fúngica de *Trichoderma* pode ser qualquer célula descrita na seção intitulada "Células Fúngicas Filamentosas da Invenção". Métodos de cultura de células fúngicas filamentosas e células fúngicas de *Trichoderma* e purificação de polipeptídeos são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, todas as técnicas e métodos descritos na presente descrição.

[00279] Em determinadas modalidades, a célula fúngica filamentosa ou célula fúngica de *Trichoderma* é cultivada em uma faixa de pH selecionada de um pH de 3,5 a 7; um pH de 3,5 a 6,5; um pH de 4 a 6; um pH de 4,3 a 5,7; um pH de 4,4 a 5,6; e um pH de 4,5 a 5,5. Em determinadas modalidades, para a produção de um anticorpo, a célula fúngica filamentosa ou célula fúngica de *Trichoderma* é cultivada em

uma faixa de pH selecionada de um pH de 4,7 a 6,5; um pH de 4,8 a 6,0; um pH de 4,9 a 5,9; e um pH de 5,0 a 5,8.

[00280] Em algumas modalidades, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo de mamífero. Em outras modalidades, o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo que não é de mamífero.

[00281] Em determinadas modalidades, o polipeptídeo de mamífero é selecionado de uma imunoglobulina, uma cadeia pesada de imunoglobulina, uma cadeia leve de imunoglobulina, um anticorpo monoclonal, um anticorpo híbrido, um fragmento de anticorpo  $F(ab')_2$ , um fragmento de anticorpo  $F(ab)$ , uma molécula de  $F_v$ , um anticorpo  $F_v$  com uma única cadeia, um fragmento de anticorpo dimérico, um fragmento de anticorpo trimérico, um fragmento de anticorpo funcional, um anticorpo com um único domínio, anticorpos com um único domínio multiméricos, uma imunoadesina, fator de crescimento 1 similar à insulina, um hormônio de crescimento, insulina e eritropoietina. Em outras modalidades, a proteína de mamífero é uma imunoglobulina ou fator de crescimento 1 similar à insulina. Em ainda outras modalidades, a proteína de mamífero é um anticorpo. Em outras modalidades, o rendimento do polipeptídeo de mamífero é de pelo menos 0,5, pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4 ou pelo menos 5 gramas por litro. Em determinadas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo de mamífero, opcionalmente, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em outras modalidades, o rendimento do anticorpo é de pelo menos 0,5, pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4 ou pelo menos 5 gramas por litro. Em ainda outras modalidades, o polipeptídeo de mamífero é um fator de crescimento ou uma citocina. Em outras modalidades, o rendimento do fator de crescimento ou citocina é de pelo menos 0,1, pelo menos 0,2, pelo menos 0,3, pelo menos 0,4, pelo menos 0,5, pelo menos 1, pelo menos 1,5, pelo menos 2, pelo menos 3, em pelo menos 4 ou pelo menos 5 gramas por litro. Em outras mo-

dalidades, o polipeptídeo é um anticorpo de mamífero e o anticorpo contém pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de um C-término e N-término de anticorpo natural sem resíduos de aminoácidos adicionais. Em outras modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo de mamífero e o anticorpo contém pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou pelo menos 98% de um C-término e N-término de anticorpo natural que não carecem de quaisquer resíduos de aminoácidos C-terminais ou N-terminais.

[00282] Em determinadas modalidades onde o polipeptídeo de mamífero é purificado a partir de cultura de células, a cultura contendo o polipeptídeo de mamífero contém fragmentos de polipeptídeos que compõem uma percentagem em massa que é menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10% da massa dos polipeptídeos produzidos. Em determinadas modalidades preferidas, o polipeptídeo de mamífero é um anticorpo e os fragmentos polipeptídicos são fragmentos de cadeias pesadas e/ou fragmentos de cadeia leve. Em outras modalidades em que o polipeptídeo de mamífero é um anticorpo e o anticorpo é purificado a partir de cultura de células, a cultura contendo o anticorpo contém cadeias pesadas livres e/ou cadeias leves livres que constituem uma percentagem em massa que é menos de 50%, menos de 40 %, menos de 30%, menos de 20% ou menos de 10% da massa do anticorpo produzido. Métodos para determinar a percentagem em massa de fragmentos de polipeptídeos são bem conhecidos na técnica e incluem medição de intensidade de sinal a partir de um gel de SDS.

[00283] De acordo com outras modalidades, o polipeptídeo que não é de mamífero é selecionado de uma aminopeptidase, amilase, carboidrase, carboxipeptidase, catalase, celulase, quitinase, cutinase, desoxirribonuclease, esterase, alfa-galactosidase, beta-galactosidase,

glucoamilase, alfa-glucosidase, beta-glucosidase, invertase, lacases, lipases, mutanase, oxidase, uma enzima pectinolítica, peroxidase, fosfolipase, fitase, oxidase de polifenol, uma enzima proteolítica, ribonuclease, transglutaminase e xilanase.

[00284] Em determinadas modalidades de qualquer um dos métodos descritos, o método inclui ainda a etapa de fornecimento de um ou mais, dois ou mais, três ou mais, quatro ou mais ou cinco ou mais inibidores de protease. Em determinadas modalidades, os inibidores de proteases são peptídeos que são coexpressos com o polipeptídeo de mamífero. Em outras modalidades, os inibidores inibem pelo menos duas, pelo menos três ou pelo menos quatro proteases de uma família de proteases selecionada de proteases aspárticas, proteases de serina do tipo tripsina, proteases subtilisina e proteases glutâmicas.

[00285] Em determinadas modalidades de qualquer um dos métodos descritos, a célula fúngica filamentosa ou célula fúngica de *Trichoderma* também contém uma proteína veículo. Conforme usado aqui, uma "proteína veículo" é parte de uma proteína que é endógena para e altamente secretada por uma célula fúngica filamentosa ou célula fúngica de *Trichoderma*. Proteínas veículo adequadas incluem, sem limitação, aquelas de mananase I de *T. reesei* (Man5A ou MANI), celobiohidrolase II de *T. reesei* (Cel6A ou CBHII) (vide, por exemplo, Paloheimo et al., *Appl Environ Microbiol*, Dezembro de 2003; 69 (12): 7073-7082) ou celobiohidrolase I de *T. reesei* (CBHI). Em algumas modalidades, a proteína veículo é CBH1. Em outras modalidades, a proteína veículo é uma proteína CBH1 truncada de *T. reesei* que inclui a região central de CBH1 e parte da região de ligação a CBH1. Em algumas modalidades, um veículo, tal como uma celobiohidrolase ou fragmento da mesma, é fundido com uma cadeia leve de anticorpo e/ou uma cadeia pesada de anticorpo. Em algumas modalidades, um veículo, tal como uma celobiohidrolase ou fragmento da mesma, é fundido ao fa-

tor de crescimento 1 similar à insulina, hormônio de crescimento, insulina, interferon alfa 2b, fator 1 de crescimento de fibroblasto ou albumina sérica humana. Em algumas modalidades, um polipeptídeo de fusão de veículo-anticorpo compreende um sítio de clivagem Kex2. Em determinadas modalidades, Kex2 ou outra enzima de clivagem veículo é endógena a uma célula fúngica filamentosa. Em determinadas modalidades, a protease de clivagem veículo é heteróloga à célula fúngica filamentosa, por exemplo, outra proteína Kex2 derivada de levedura ou uma protease TEV. Em determinadas modalidades, a enzima de clivagem veículo é superexpressa.

[00286] Deverá ser entendido que, embora a invenção tenha sido descrita em conjunto com determinadas modalidades específicas da mesma, a descrição precedente se destina a ilustrar e não limitar o âmbito da invenção. Outros aspectos, vantagens e modificações dentro do âmbito da invenção serão evidentes aqueles versados na técnica à qual pertence a invenção.

[00287] A invenção tendo sido descrita, os exemplos a seguir são oferecidos para ilustrar a invenção por meio de ilustração, não como forma de limitação.

## **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1 - IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES ASPÁRTICAS EM *TRICHODERMA REESEI***

[00288] Este exemplo demonstra a capacidade de proteases aspárticas de sobrenadantes de cultura de *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) de degradar cadeias pesadas e cadeias leves de anticorpo.

#### **Purificação de Protease Aspártica**

[00289] Descobriu-se que a atividade de protease em sobrenadantes de *T. reesei* poderia ser inibida com o inibidor de protease aspártica pepstatina A. Portanto, pepstatina A (Sigma #P2032) foi ligada à esferas de agarose através de um ligante de diaminodipropilamina e

foi usado como uma resina de afinidade para purificação. O sobrenadante de fermentação descontínua de *T. reesei* (15 ml) foi usado para ligar as proteases à resina em 35 ml de tampão contendo acetato de sódio a 50 mM, NaCl a 0,2 M, pH de 3,0. A coluna foi lavada com o mesmo tampão de ligação e a proteína ligada foi removida com tampão de eluição (Tris-HCl a 50 mM, NaCl a 1 M, pH de 8,5). Frações de 0,5 ml foram coletadas. No total, 42 µg de protease foram purificados. A fração do pico continha 0,04 µg de proteína/µl. 30 µl de cada fração foram misturados com 6 µL de tampão de amostra de Laemmli contendo β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos antes de serem carregadas em um gel de PAGE a 4-15% (gel pré-fundido Mini-Protean TGX da BioRad) juntamente com uma ampla variedade de marcadores de peso molecular pré-corados (BioRad). O gel foi passado em tampão contínuo para SDS PAGE durante 30 minutos a 100 V e depois corado com corante azul GelCode (Thermo Scientific).

[00290] Uma banda dupla de 42 kD foi purificada na coluna de afinidade de pepstatina A (Figura 1) e foi excisada do gel de SDS PAGE e submetida à digestão com tripsina em-gel com tripsina modificada para grau de sequenciamento (Promega #V5111). Os peptídeos resultantes foram, então, extraídos do gel e purificados por C18 ZipTip (Millipore #ZTC18M096). Os peptídeos purificados foram analisados por LC-MS/MS em um TOF de quadrupolo ESI-híbrido QSTAR Pulsar (AB Sciex).

[00291] Esta análise resultou na identificação de 4 proteases aspartáticas que têm pesos moleculares muito similares. As proteases identificadas incluíam: *pep1* (Tre74156; 42,7 kD, 42% de cobertura de sequência), *pep2* (Tre53961; 42,4 kD, 15% de cobertura de sequência), *pep3* (Tre121133; 49 kD, 6% de cobertura sequência) e *pep5* (Tre81004; 45 kD, 9% de cobertura sequência). Estas proteases as-

párticas migraram com um peso molecular similar no gel de PAGE. Sua similaridade de sequência de aminoácidos está entre 51%-64%.

[00292] Proteína (0,8 µg) da fração de pico (F3) foi, então, incubada com IgG (50 µg/ml) em tampão de citrato de sódio (50 mM, pH de 5,5) a 37 °C durante 20 horas (Figura 2). A proteína foi incubada na presença ou na ausência de pepstatina A a 10 µM. A mistura de anticorpos foi combinada com tampão de amostra de Laemmli e aquecida a 95 °C durante 5 minutos. Estas amostras foram, então, carregadas em um gel de PAGE a 4-15% (gel pré-fundido Mini-Protean TGX da BioRad), juntamente com uma ampla variedade de marcadores de peso molecular pré-corados (BioRad). O gel foi passado em tampão contínuo para SDS PAGE durante 30 minutos a 100 V. A IgG não foi reduzida antes de ser passada no gel. IgG de tamanho completo migra um pouco acima do marcador de 200 kDa. Conforme pode ser visto no gel não reduzido na Figura 2, proteases aspárticas foram capazes de produzir degradação leve de IgG. Além disso, a degradação de IgG foi inibida pela pepstatina A. A atividade de protease aspártica foi mais limitada em um pH de 5,5 do que em um pH ácido, onde ela tinha atividade máxima.

### **Análise de Deleção de *pep1***

[00293] A protease aspártica *pep1* foi, então, testada para determinar sua abundância em *T. reesei*. Isto foi realizado por meio de purificação de proteases aspárticas de amostras de sobrenadante derivadas da cepa M182 com deleção de *pep1*. A cepa M182 com deleção de *pep1* também produz o anticorpo rituximab.

[00294] A cepa M181 com deleção de *pep1* feita na cepa de base M124 foi cultivada em culturas em frascos de agitação grandes juntamente com frascos de controle com M124. As culturas foram cultivadas em 300 ml de TrMM com 4 g/L de lactose, 2 g/L de extrato de grão consumido e PIPPS a 100 mM, pH de 5,5. Três diferentes anticorpos

modelos foram incubados (concentração final de 0,05 µg/µl) nos sobrenadantes de cultura em frasco de agitação (diluídos a 2 mg/ml em tampão de citrato de sódio, pH de 5,5) da cepa com deleção de *pep1* e sua cepa parental M124 e, como uma comparação, em um sobrenadante de cultura de fermentação da cepa parental. Amostras de sobrenadante (30 µl) de culturas do dia 5 contendo anticorpo foram carregadas em um gel de SDS PAGE a 4-15% e transferidas para nitrocelulose para imunoblot com um anticorpo anticadeia pesada AP-conjugado (Sigma #A3188) ou anticorpo anticadeia leve AP-conjugado (Sigma #A3813) diluído a 1:30.000 em TBST. Quando incubado com anticorpo durante a noite por 18 horas, o sobrenadante  $\Delta pep1$  degradou menos da proteína de cadeia pesada comparado com a cepa de controle M124 ou sobrenadante de fermentação (pH de 5,5; 28 °C, 20 g/L de extrato de grão consumido, 60 g/L de lactose) (Figura 39). A cadeia pesada foi mais suscetível à degradação comparado com a cadeia leve. O maior efeito de estabilização foi evidente para as cadeias pesadas de rituximab e MAB01. Na cadeia pesada, dois produtos de degradação distintos podem ser vistos a ~48 kD e ~38 kD (Figura 39). Houve apenas uma melhora leve na estabilidade da proteína de cadeia leve no sobrenadante  $\Delta pep1$  comparado com os controles (Figura 39).

### ***Geração de Plasmídeo com Deleção de *pep1****

[00295] O primeiro construto com deleção de *pep1* (TreID74156) foi concebido para permitir remoção do marcador de seleção do genoma de *Trichoderma reesei* após uma integração bem sucedida e, deste modo, reciclagem do marcador de seleção para subsequente inativação de genes de protease. Nesta abordagem, a reciclagem do marcador, ou seja, remoção do gene *pyr4* do construto com deleção, se assemelha aos assim denominados cassetes desintegradores desenvolvidos para leveduras (Hartl, L. e Seiboth, B., 2005, *Curr Genet*



48: 204-211 e Alani, E. et al., 1987, *Genetics* 116: 541-545). Cassetes desintegradores similares também foram desenvolvidos para fungos filamentosos, incluindo *Hypocrea jecorina* (anamorfo: *T. reesei*) (Hartl, L. e Seiboth, B., 2005, *Curr Genet* 48: 204-211).

[00296] O número TrelD refere-se ao número de identificação um gene de protease em particular do banco de dados de genoma de *Trichoderma reesei* v2.0 do Joint Genome Institute. Iniciadores para construção de plasmídeos com deleção foram concebidos "a olho nu" ou usando o software Primer3 (website Primer3, Rozen e Skaletsky (2000) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, páginas 365-386).

[00297] O princípio do cassete desintegrador usando *pyr4* como o gene marcador é o seguinte: *pyr4*, que codifica descarboxilase de orotidina-5'-monofosfato (OMP) de *T. reesei* (Smith, J.L. et al., 1991, *Current Genetics* 19: 27-33) é necessário para síntese da uridina. Cepas deficientes na atividade de descarboxilase de OMP são incapazes de crescer em meio mínimo sem suplementação de uridina (isto é, são auxotróficos para uridina). O uso de ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) na geração de mutantes desprovidos de atividade de descarboxilase de OMP (cepas *pyr4*-) baseia-se na conversão de 5-FOA em um intermediário tóxico 5-fluoro-UMP pela descarboxilase de OMP. Portanto, células as quais têm um gene *pyr4* com mutação são resistentes ao 5-FOA mas, além disso, também são auxotróficas para uridina. A resistência ao 5-FOA pode, em princípio, resultar também de uma mutação em outro gene (*pyr2*, fosforibosil transferase de orotato) e, portanto, os mutantes espontâneos obtidos com esta seleção devem ser verificados quanto ao genótipo *pyr4*- através de complementação do mutante com o gene *pyr4*. Uma vez que tenha sofrido mutação, o gene *pyr4* pode ser usado como um marcador de seleção auxotrófica em *T. reesei*. No nosso cassete desintegrador, *pyr4* é seguido por uma repeti-

ção direta de 308 pb da região 5' não traduzida (5'UTR) de *pyr4* e circundado por regiões de flanqueamento 5' e 3' do gene a ser suprimido. Integração do cassete de deleção é selecionada através da função de *pyr4*. Remoção do marcador *pyr4* é, então, forçada na presença de 5-FOA por meio de recombinação entre as duas regiões homólogas (repetição direta de 5'UTR), resultando em *looping* do marcador de seleção e permitindo a utilização do mesmo cassete desintegrador (*pyr4 loopout*) em ciclos sucessivos deleções gênicas. Após *looping*, apenas a sequência de 308 pb de 5'UTR permanece no *locus*.

[00298] Assim, o marcador de seleção *pyr4* e o fragmento de repetição direta 5' (308 pb de 5'UTR de *pyr4*) foram produzidos por PCR usando o plasmídeo pARO502 (contendo uma cópia genômica de *pyr4* de *T. reesei*) como um modelo. Amplificação por PCR foi realizada com polimerase Phusion e tampão HF ou tampão GC ou com polimerase Dynazyme EXT. As condições de reação variavam com base no fragmento a ser amplificado. Ambos os fragmentos continham sequências de sobreposição de 40 pb necessárias para clonar o plasmídeo com o cassete de *loopout* usando recombinação homóloga em levedura (vide abaixo). Para permitir possíveis etapas de clonagem adicionais, um sítio de digestão *AscI* foi colocado entre o marcador *pyr4* e a repetição direta 5' e *NotI* para envolver o cassete desintegrador completo.

[00299] 1066 pb da região de flanqueamento 5' e 1037 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados como a base do plasmídeo com deleção de *pep1*. Os fragmentos foram produzidos por PCR. Os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com um kit de extração de gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. DNA modelo usado na amplificação das regiões de flanqueamento era da cepa QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem (ATCC13631).

[00300] Para o sistema de recombinação homóloga de levedura usado na clonagem, sequências que se sobrepõem ao vetor e ao marcador de seleção foram colocadas em iniciadores de PCR apropriados. Para permitir interrupção do marcador no construto, sítios de restrição *NotI* foram introduzidos entre as regiões de flanqueamento e o marcador de seleção. Sítios de restrição *PmeI* foram colocados entre o vetor e as regiões de flanqueamento para remoção de sequência do vetor antes de transformação em *T. reesei*. O esqueleto de vetor pRS426 foi digerido com enzimas de restrição (*EcoRI* e *XhoI*). Os fragmentos de restrição foram, então, separados por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração de gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais.

[00301] Para construir o plasmídeo com deleção, o esqueleto do vetor e o marcador adequado e fragmentos da região flanqueando foram transformados em *Saccharomyces cerevisiae* (cepa H3488/FY834). O protocolo de transformação de levedura foi baseado no método de recombinação homóloga de levedura descrito no material de workshop para *knockouts* em *Neurospora* de Colot e Collopy (website do Dartmouth *Neurospora* Genome Protocols) e no protocolo de laboratório Gietz (University of Manitoba, website do laboratório Gietz). O DNA de plasmídeo dos transformantes de levedura foi recuperado por transformação em *Escherichia coli*. Alguns clones foram cultivados, o DNA de plasmídeo foi isolado e digerido para rastreio de recombinação correta usando métodos de laboratório convencionais. Alguns clones com tamanhos de inserto corretos foram sequenciados e armazenados.

[00302] O primeiro plasmídeo com deleção de *pep1* (plasmídeo pTTv41, Tabela 1.1) usou outro marcador de seleção, *bar*, um construto sintético que traz uma N-acetil transferase de fosfinotricina de *Streptomyces* ssp. (GenBank ID: AF013602.1, Sweigard et al., 1997, *Fungal*

*Genet News* 144: 52-53). A região de flanqueamento e fragmentos marcadores foram produzidos por PCR e montados em um plasmídeo usando o método de recombinação de levedura descrito acima. Para clonar o segundo plasmídeo com deleção de *pep1* (pTTv71, Tabela 1.1), o marcador *bar* foi removido do plasmídeo com deleção pTTv41 através de digestão com *NotI* e substituído pelo cassete desintegrador de *pyr4* descrito acima usando o sistema de recombinação homóloga de levedura. Estes plasmídeos com deleção para *pep1* (pTTv41 e pTTv71) resultam em deleção de 1874 pb no *locus* de *pep1* e cobrem a sequência de codificação completa de PEP1.

**Tabela 1.1: Iniciadores para geração de plasmídeos com deleção de *pep1***

**Plasmídeo pTTv41 com deleção de *pep1* (TrelD74156), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
5flanqfw	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC- GTTTAAACGTATTGCGATGAGCAGC AGA (SEQ ID NO: 243)
5flanqrev	ATCCACTTAACGTTACTGAAATCTGGTCTCCTA- ACCCACCAAG (SEQ ID NO: 244)
3flanqfw	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTCTGTGAAAT- GAGGTCCCTTCC (SEQ ID NO: 245)
3flanqrev	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA- AGCGTTTAAACCAAACGCAGCAGAAAC CATA (SEQ ID NO: 246)
PTfwd	GATTCAGTAACGTTAAGTGGATGCGGC- GCGACAGAAGATGATATTGAAG (SEQ ID NO: 247)
PTrev	GACAGAAGATGATATTGAAGGAGGCGGC- GCTTAAGTGGATCCCGGTGAC

(SEQ ID NO: 248)

---

**Plasmídeo pTTv71 com deleção de *pep1* (TrelD74156), esqueleto de vetor pTTv41**


---

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>
T315_pyr4_f or	GGTGGGTTAGGAGACCAGATTTTCAGTAA- GTAAAGTGGATGCGGCCGCCTAGC ATCGACTACTGCTGC (SEQ ID NO: 249)
T316_pyr4_ rev	GCAGCAGTAGTCGATGCTAGGCGCGCCA- GCAAAGATACACATCAA (SEQ ID NO: 250)
T317_pyr4_l oop_for	TTGATGTGTATCTTTGCATGGCGCGCCT- GCATCGACTACTGCTGC (SEQ ID NO: 251)
T318_pyr4_l oop_ rev	AGGGACCTCATTTCACAGACAGAAG- TGATATTGAAGGAGGCGGCCGCGGCT G ATGAGGCTGAGAGAG (SEQ ID NO: 252)

---

**Geração de cepas M181 e M195 com deleção de *pep1***


---

[00303] Para permitir reciclagem do marcador de seleção e permitir eliminação rápida de subsequentes genes de protease, *pep1* foi deletada de M127 (mutante *pyr4*- da cepa M124 básica) usando o cassete desintegrador de *pyr4* descrito acima. Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv71 ( $\Delta pep1$ -*pyr4*) foi digerido com *PmeI* e o fragmento correto foi purificado a partir de um gel de agarose usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5 µg do cassete de deleção de *pep1* foram usados para transformar a cepa M127. Preparo de protoplastos e transformação para seleção de *pyr4* foram realizados essencialmente de acordo com métodos em Penttilä et al. (1987, *Gene* 61: 155-164) e Gruber et al. (1990, *Curr. Genet.* 18: 71-76).

[00304] 200 clones foram escolhidos como listras seletivas. 24 transformantes de crescimento rápido como listras seletivas foram rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 1.2 para integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Sete entidades com ruptura putativas foram purificadas em clones com uma única célula. Deleção de *pep1* foi verificada por meio de análises de Southern destes clones (Figura 3A) usando métodos de laboratório convencionais. DNA para análise de Southern foi extraído com o kit Easy-DNA para isolamento de DNA genômico (Invitrogen). Análises de Southern foram realizadas essencialmente de acordo com o protocolo para hibridizações homólogas em Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory manual. 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press) usando marcação radioativa ( $^{32}\text{P}$ ), os kits HexaLabel Plus ou DecaLabel Plus (Fermentas). Esquemas de digestão para Southern foram concebidos usando o software Sci Ed Central for Windows 95 (Clone Manager 5 for Windows 95) ou Geneious Pro 5.3.6 (website da Geneious). Análises de Southern também verificaram que quatro dos clones eram integrantes individuais (Figuras 3B e 3C). Três clones indicaram integração múltipla ou imprecisa do cassete de deleção e foram descartados. Dois clones puros foram designados com números de cepa M181 (9-20A-1) e M195 (9-35A-1).

***Geração de cepa M182 com deleção de pep1 que produz rituximab***

[00305] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv41 ( $\Delta pep1\text{-bar}$ ) foi digerido com PmeI e o fragmento correto foi purificado do gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu\text{g}$  do cassete de deleção de *pep1* foram usados para transformar a cepa M169 (expressando anticorpo rituximab humanizado). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados de acordo com os métodos descritos em Penttilä et al. (1987) e Avalos et al. (1989).

[00306] Cerca de 100 clones foram escolhidos como listras seletivas. 24 transformantes de crescimento rápido como listras seletivas foram rastreados por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 1.2) quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Oito entidades com ruptura putativas foram purificadas em clones com uma única célula. Deleção de *pep1* foi verificada por meio de análise de Southern de cinco clones (Figura 4A) usando métodos de laboratório convencionais descritos acima para M181 e M195. Análises de Southern também verificaram que quatro dos clones eram integrantes individuais (Figuras 4B e 4C). Um clone indicou integração múltipla ou imprecisa do cassete de deleção e foi descartado. Um clone puro (11-1A) foi designado com número de cepa M182.

**Tabela 1.2: Iniciadores para rastreio de integração de construtos com deleção de *pep1***

**Para rastreio de integração de pTTv41**

**Iniciador Sequência**

T075_ 74156_5int	TCGCTGTAACGAACTTCTGT (SEQ ID NO: 253)
T032_ Bar_loppu_for	CATTGTTGACCTCCACTAGC (SEQ ID NO: 254)
T076_ 74156_3int	GCTGCTGATCGGACATTTTT (SEQ ID NO: 255)
T031_ Bar_alku_rev2	GTTTCTGGCAGCTGGACT (SEQ ID NO: 256)

**Para rastreio de integração de pTTv71**

Primer	Sequence
T075_ 74156_5int	TCGCTGTAACGAACTTCTGT (SEQ ID NO: 257)
T027_ Pyr4_orf_start_rev	TGCGTCGCCGTCTCGCTCCT (SEQ ID NO: 258)

---

**Para rastreio de deleção de ORF de *pep1***


---

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>
T077_ 74156_5orf_pcr	CGACGATCTACAGCCATCTG (SEQ ID NO: 259)
T078_ 74156_3orf_pcr	ACCCAAAGCGTCCTTCATTA (SEQ ID NO: 260)

---

**Análise da cepa M182 com deleção de *pep1* que produz rituximab**

[00307] A cepa M182 foi crescida em meio mínimo para *Trichoderma* (TrMM) suplementado com 20 g/l de extrato de grão consumido, 60 g/l de lactose e 8,1 g/l de casaminoácidos em um pH de 5,5 e 28 °C. Sete microgramas de protease aspártica foram recuperados a partir de 15 ml de sobrenadante. Quando as frações purificadas foram passadas em um gel de SDS PAGE a 4-15% (gel pré-fundido Mini-Protean TGX da BioRad), a banda com peso molecular de 42 kD observada anteriormente na cepa parental tinha desaparecido (Figura 5). Apenas uma banda fraca em torno de 40 kDa pode ser vista. A banda de 40 kD pode corresponder à proteases aspárticas menores. Uma segunda purificação foi feita a partir de um sobrenadante de cultura onde *pep1* estava presente. A cepa M169 produziu rituximab e não continha uma deleção de protease *pep1*. A cepa foi cultivada em meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 20 g/l de extrato de grão consumido, 60 g/l de lactose e 8,1 g/l de casaminoácidos em um pH de 5,5 e 28 °C. 17 µg de protease aspártica foram purificados a partir de 15 ml de sobrenadante e mostraram uma banda de 42 KD no gel de SDS PAGE (Figura 5). De acordo com esta análise, cerca de 10 µg de protease *pep1* são produzidos por 15 ml de sobrenadante de cultura. Isto é, cerca de 60% da protease aspártica total e apenas cerca de 0,04% do teor total de proteína no sobrenadante. Estes dados demonstram que *pep1* é a protease aspártica mais abundante em *T. reesei*.



### **Análise de Outras Proteases Aspárticas**

[00308] A deleção de *pep2* mostrou apenas uma ligeira melhora na produção de cadeia pesada de anticorpo e redução da atividade total de protease (Figuras 6 e 7).

[00309] Portanto, *pep3* e *pep5* eram as próximas proteases importantes a serem deletadas, especialmente em uma cepa com deleção tripla *pep1/tsp1/tsp1*, uma vez que elas contribuem adicionalmente com até metade da atividade de protease restante em um sobrenadante da cepa com deleção tripla.

### ***Geração de Plasmídeo com Deleção de pep2***

[00310] O plasmídeo pTTv96 com deleção de protease aspártica *pep2* (TreID0053961) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de *pep1* acima. 920 pb da região de flanqueamento 5' e 1081 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo com deleção de *pep2*. Fragmentos da região de flanqueamento foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 1.3. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. DNA modelo usado na PCR das regiões de flanqueamento era da cepa QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem. O cassete *bar* foi obtido a partir de pTTv41 através de digestão com *NotI*. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com *EcoRI/XhoI*, conforme para pTTv41 acima. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito para pTTv41 acima. Este plasmídeo com deleção de *pep2* (pTTv96) resulta em uma deleção de 1437 pb no *locus* de *pep2* e abrange a sequência de codificação completa de PEP2.

**Tabela 1.3: Iniciadores para geração do plasmídeo com deleção de pep2**

Iniciador	Sequência
5'flanq	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC-
fw_vetor	ACGGTTTAAACTTCAGTTGTGGCA TCTCAGC (SEQ ID NO: 261)
5'flanq	GCCAAGCCCCAAAAAGTGCTCCTTCA-
rev_promotor	TATCATCTTCTGTCGCGGCCGCGG de GAAGCAAGTTTCGAAGTG (SEQ ID NO: 262)
cassete	
marcador	
3'flanq	CCCGTCACCGAGATCTGATCCGTCA-
fw_termino de cas-	CGGGATCCACTTAAGCGGCCGCA ATGGATGAGGTGTGGCTTC (SEQ ID NO: 263)
sete marcador	
3'flanq	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA-
rev_vetor	AGCGTTTAAACTCCTCACCGAAG AGCAAGTC (SEQ ID NO: 264)

**Geração da cepa M455 com deleção de pep2 que produz rituximab**

[00311] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv96 ( $\Delta pep2$ -bar) foi digerido com *PmeI* e o fragmento correto foi purificado a partir de um gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 6  $\mu$ g do cassete de deleção de *pep2* foram usados para transformar a cepa M169 (que expressa anticorpo rituximab humanizado). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados conforme descrito para M182 acima usando seleção com *bar*.

[00312] Mais de 200 clones foram escolhidos como listras seletivas. 29 transformantes cresceram bem como segundas listras. Os 10

melhores transformantes que crescem rapidamente como listras seletivas foram rastreados quanto à integração correta por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 1.4 por meio de métodos de laboratório convencionais. O cassete de deleção foi integrado corretamente em 9 dos 10 clones analisados. O quadro de leitura aberta foi excluído em 9 dos 10 transformantes analisados por PCR. Cinco entidades com ruptura foram purificadas em clones com uma única célula. Um transformante puro (206A) foi designado com número de cepa M455.

**Tabela 1.4: Iniciadores para rastreio de integração de construtos com deleção de *pep2*.**

**Para rastreio de integração de pTTv96**

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>
5'flanq fw_vetor	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-GTTTAAACTTCAGTTGTGGCA TCTCAGC (SEQ ID NO: 265)
TO32_Bar_loppu_for	CATTGTTGACCTCCACTAGC (SEQ ID NO: 266)
TO30_Bar_alku_rev	CGTCACCGAGATCTGATCC (SEQ ID NO: 267)
3'flanq rev_vetor	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG-GTTTAAACTCCTCACCGAAG AGCAAGTC (SEQ ID NO: 268)

**Para rastreio de deleção de ORF de *pep2***

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>
T601_pep2 fwd	GACGTGGTACGACAACATCG (SEQ ID NO: 269)
T623_pep2 rev	TATCAAGGTACCGGGGACAG (SEQ ID NO: 270)

***Análise da produção de rituximab pela cepa com deleção de *pep2****

[00313] A cepa M455, 4 outros transformantes com deleção de *pep2* e a cepa M169 parental que produz rituximab foram cultivados em culturas em frascos agitados em meio mínimo para *Trichoderma*

(TrMM), suplementado com 20 g/l de extrato de grãos consumidos, 40 g/l de lactose, PIPPS a 100 mM e 8,1 g/l de casaminoácidos em um pH de 5,5 e 28 °C. Para analisar o efeito sobre a produção de rituximab, 30 µl de sobrenadante de amostras de cultura do dia 5 foram submetidos a imunoblot. A cadeia pesada foi detectada com anticorpo anticadeia pesada AP-conjugado (Sigma #A3188) diluído a 1:10000 em TBST. A cadeia leve foi detectada com anticorpo anticadeia leve kappa AP-conjugado (Sigma #A3813). Uma ligeira melhora na produção de cadeia pesada foi observada no transformante 206A (Figura 6). A cadeia pesada foi fragmentada, mas a cadeia de comprimento completo e o fragmento de 38 kD foram ligeiramente aprimorados em relação à coloração do parental. Além disso, a atividade total de protease foi medida com caseína succinilada (kit de ensaio de protease Quanti-Cleave, Pierce #23263) de acordo com o protocolo do fabricante. Transformante 206A/M455 mostrou a maior diminuição na atividade de protease comparado com a atividade da cepa parental M169 (Figura 7). A atividade total protease no sobrenadante foi reduzida em 10% para M455.

#### ***Análise de proteases aspárticas expressas em Pichia***

[00314] As proteases aspárticas *pep3* (tre121133) e *pep7* (tre58669) de *T. reesei* expressas a partir de *Pichia* também foram testadas *in vitro*, medindo-se a degradação de anticorpo MAB01 e IGF-1. Degradação de MAB01 e IGF-1 por *pep3* e *pep7* foi analisada por imunoblot. As proteases aspárticas foram produzidas em sobrenadantes de *Pichia*. Sobrenadantes de *Pichia* foram diluídos para uma concentração de 1x e, então, misturados com tampão de citrato de sódio a 50 mM, pH de 5,5. MAB01 foi adicionado a cada reação, de modo que a concentração final fosse de 0,05 µg/µl. IGF-1 foi adicionado a cada reação de modo que a concentração final fosse de 0,30 µg/µl. Dez microlitros de cada uma das misturas de reação foram, então, coletados

e adicionados a 3 µl de tampão de amostra de Laemmli com β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 95 °C durante 5 minutos antes de serem carregadas em um gel de PAGE A 4-15% (gel pré-fundido Mini-Protean da BioRad), juntamente com um marcador de peso molecular pré-corado All Blue Precision Plus (BioRad). O gel de PAGE foi passado durante 30 minutos a 200V. As proteínas no gel foram, então, eletrotransferidas para um filtro de nitrocelulose a 100 V durante 1 hora. O filtro de nitrocelulose contendo proteína foi, então, bloqueado com 5% de leite em pó em solução salina tamponada com Tris com Tween a 0,1% (TBST), durante 1 hora sob agitação em temperatura ambiente. As membranas bloqueadas foram, então, hibridizadas com o anticorpo. As membranas contendo MAB01 foram hibridizadas com um anticorpo anticadeia pesada de IgG AP-conjugado (Sigma #A3188) diluído a 1:30.000 em TBST. As amostras de IGF-1 foram analisadas usando um anticorpo primário anti-IGF-1 (1:2000 em TBST) e anticorpo secundário anti-IgG AP-conjugado (1:5000 em TBST). Todas as incubações de anticorpo foram realizadas durante 1 hora em temperatura ambiente em um agitador. As membranas foram, então, lavadas com 3 trocas de TBST durante 20 minutos cada no agitador. As membranas foram reveladas com substrato de fosfatase alcalina BCIP/NBT (Promega #S3771) durante até 5 minutos. Conforme mostrado na Figura 8, a protease *pep3* tinha baixa atividade de degradação de MAB01 em um pH de 5,5 após incubação durante a noite a 37 °C, mas a atividade foi superior em um pH de 4,5. A protease *pep7* tinha apenas atividade de degradação de anticorpo mínima em um pH de 4,5.

### **Isolamento de Proteases Aspárticas Adicionais Usando Peptídeo SIP**

[00315] Várias proteases aspárticas adicionais foram isoladas da cepa M277 com deleção tripla de protease de *T. reesei* (*pep1*, *tsp1*,

*tsp1*). A cepa M277 não expressa proteínas heterólogas. A cepa com deleção M277 foi gerada conforme descrito no Exemplo 4 abaixo. A cepa foi cultivada em meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 20 g/l de extrato de grão consumido, 60 g/l de lactose e 9 g/l de casaminoácidos em um pH de 5,5 e 28 °C. As proteases aspárticas foram isoladas por meio de purificação de afinidade usando o peptídeo SIP (Ac-Phe-Lys-Phe-(AHPPA)-Leu-Arg-NH<sub>2</sub>) (Kataoka Y. et al. 2005 *FEBS Letters* 579, páginas 2991-2994). O peptídeo SIP foi conjugado com resina de agarose ativada com NHS (Pierce #26196) usando o protocolo fornecido pelo fabricante. A resina de afinidade de SIP foi usada para purificar as proteases. Sobrenadante de fermentação (15 mL) da cepa M277 de *T. reesei* foi, então, usado para proteases de ligação em lotes à resina em 35 ml de tampão contendo acetato de sódio a 50 mM, NaCl a 0,2 M, pH de 3,0 (a partir de condições de fermentação de pH de 5,5 28 °C; 9 g/l de casaminoácidos, 20 g/L de extrato de grão consumido, 60 g/L de lactose). A coluna foi lavada com o mesmo tampão de ligação e a proteína ligada removida com tampão de eluição (Tris-HCl a 50 mM, NaCl a 1 M, pH de 8,5). Frações de 0,5 ml foram, então, coletadas.

[00316] 30 µl de cada fração purificada foram, então, passados em um gel de SDS PAGE a 4-15% (gel pré-fundido Mini-Protean TGX da BioRad) e coradas durante a noite com azul GelCode (Thermo Scientific). O gel de SDS PAGE mostrou bandas predominantes de cerca de 42 kDa e uma banda fraca em torno de 25 kDa (Figura 9). As bandas do gel foram, então, cortadas e submetidas à digestão com tripsina em-gel com tripsina modificada para grau de sequenciamento (Promega #V5111). Os peptídeos resultantes foram extraídos do gel e purificados por C18 ZipTip (Millipore #ZTC18M096). Os peptídeos purificados foram analisados por LC-MS/MS em um TOF com quadrupolo E-SI-híbrido QSTAR Pulsar (AB Sciex). Esta análise revelou que PEP2,

PEP3, PEP4 e PEP5 estavam presentes na amostra, juntamente com GAP1 e SLP2. Acredita-se que a banda fraca de cerca de 25 kDa corresponde à protease glutâmica GAP1.

[00317] As proteases SIP-purificadas foram, então, testadas quanto à sua capacidade de degradar a cadeia pesada do anticorpo MAB01. As proteases SIP-purificadas foram incubadas durante a noite com MAB01 em uma concentração final de 0,05 µg/µl em tampão de citrato de sódio a 37 °C. As amostras foram incubadas em um pH de 4,0 e pH de 5,5 e na presença e na ausência de um peptídeo inibidor de SIP. As reações foram coletadas depois. As amostras coletadas foram analisadas por imunoblot com um anticorpo anticadeia pesada de IgG AP-conjugado (Sigma A3188) diluído a 1:30.000 em TBST. Os resultados de imunoblot mostraram que as proteases tinham alta atividade de protease contra a cadeia pesada de MAB01 quando incubadas em um pH de 4,0 e atividade reduzida em um pH de 5,5 (Figura 10). Além disso, tanto a atividade de protease aspártica quanto glutâmica foram inibidas por incubação com o peptídeo SIP (Figura 10).

#### ***Análise de Proteases Aspárticas SIP-purificadas***

[00318] A atividade de protease foi, então, testada contra caseína na presença e na ausência de inibidores de protease. A atividade de protease contra caseína foi testada usando o kit de ensaio de protease EnzChek (Molecular Probes #E6638, substrato de caseína fluorescente verde). A solução estoque de trabalho foi preparada diluindo o estoque para 10 µg/ml em citrato de sódio a 50 mM, pH de 5,5. As frações de protease purificadas (10 µl) foram diluídas com 40 µl de citrato de sódio, pH de 5,5. 100 µl do substrato diluído foram combinados com as frações de protease diluídas em uma placa de amostras com 96 cavidades. A placa foi, então, coberta e mantida a 37 °C durante uma a três horas. Leituras de fluorescência foram feitas em uma, duas e três horas com um leitor de placas fluorescente Varioskan (Thermo Scienti-

fic) com excitação a 485 nm e emissão a 530 nm.

[00319] O peptídeo inibidor SIP, pepstatina A, peptídeo LIP, SBTI e quimostatina foram usados como inibidores. O peptídeo inibidor SIP inibiu tanto proteases aspárticas quanto glutâmicas; pepstatina A inibiu apenas proteases aspárticas; peptídeo LIP inibiu apenas protease glutâmica; SBTI foi capaz de inibir SLP2 e PEP4 e quimostatina inibiu SLP2. SIP, LIP e pepstatina A foram usados em uma concentração de 60  $\mu$ M e SBTI foi usado em uma concentração de 200  $\mu$ g/ml. Para diferenciar entre proteases aspárticas e glutâmicas, pepstatina A foi usada como inibidor, uma vez que ela não inibe proteases glutâmicas.

[00320] Quando a digestão de caseína foi estudada, uma grande parte da atividade de protease SIP foi inibida pela pepstatina A (Figura 11). Os resultados de estudos de degradação de caseína sugeriram que uma grande parte da atividade em um pH de 5,5 nas frações purificadas se origina de proteases aspárticas. O peptídeo LIP, o qual é o pró-peptídeo de GAP1, inibiu a atividade de protease ligeiramente menos comparado com inibidor SIP. O SBTI e quimostatina foram capazes de inibir a protease SLP2 na amostra purificada.

[00321] Estes resultados sustentam a conclusão de que há 4 proteases aspárticas presentes na fração de SIP (PEP2, PEP3, PEP4 E PEP5).

## **EXEMPLO 2 - IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES GLUTÂMICAS**

[00322] Este exemplo demonstra a capacidade das proteases glutâmicas de sobrenadantes de cultura de *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) de degradar cadeias pesadas e cadeias leves de anticorpo.

### **Análise de Deleção de *gap1***

[00323] Foi previamente determinado que existem quatro sequências de protease glutâmica no genoma de *T. reesei*. A protease glutâmica mais abundante é *gap1* (tre69555), conforme determinado por caracterização de perfil de transcrição. Deste modo, a protease *gap1*



foi purificada a partir do sobrenadante de *T. reesei* por meio de cromatografia de afinidade de peptídeos SIP, conforme descrito no Exemplo 1.

[00324] Uma deleção de *gap1* foi, então, gerada usando a cepa M244 de *T. reesei* que produz anticorpo MAB01 ( $\Delta pep1$ ).

### ***Geração de plasmídeo com deleção de gap1***

[00325] O plasmídeo pTTv117 com deleção de protease glutâmica *gap1* (TreID69555) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de *pep1* no Exemplo 1. 1000 pb de região de flanqueamento 5' e 1100 pb região de região de flanqueamento 3' foram selecionados como a base do plasmídeo com deleção de *gap1*. Fragmentos da região de flanqueamento foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 2.1. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. DNA modelo usado na PCR das regiões de flanqueamento era da cepa QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem. O cassete desintegrador de *pyr4* foi obtido a partir de pTTv71 através de digestão com *NotI*. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com *EcoRI/XhoI*, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de *gap1* (pTTv117) resultou em uma deleção de 1037 pb no *locus* de *gap1* e cobre a sequência de codificação completa de GAP1.

**Tabela 2.1: Iniciadores para geração do plasmídeo com deleção de *gap1***

**Plasmídeo pTTv117 com deleção de *gap1* (TrelD69555), esqueleto de vetor pRS426**

<b>Inicia-</b>	<b>Sequência</b>
<b>dor</b>	
Inicia-	GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTT-
dor JJ-	TCCCAGTCACGACGGTTTAAAC
045	ACCTCATGAGGGACTATGG (SEQ ID NO: 271)
Inicia-	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGC-
dor JJ-	GTAGTCGATGCTAGGCGGCCG
046	CCAAGAAGAGGCAGAGGGTAAT (SEQ ID NO: 272)
Inicia-	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTC-
dor JJ-	CAGCCTCATCAGCCGCGGCCGC
047	CTATACATACTGATGATACA (SEQ ID NO: 273)
Inicia-	TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT-
dor JJ-	ACACAGGAAACAGCGTTTAAA
048	CGCCCCATGTATGGACTCTAC (SEQ ID NO: 274)

**Geração da cepa M296 com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta gap1$  que produz MAB01**

[00326] Para gerar a cepa que produz anticorpo MAB01 para as deleções duplas de protease, a cepa M181 com deleção de *pep1* (Exemplo 1) foi transformada com construtos de cadeias pesada e leve de MAB01 (pTTv98 + pTTv67) usando higromicina e acetamida na seleção. Esta cepa que produz MAB01 com deleção de *pep1* foi designada com o número M244. Remoção do cassete desintegrador de *p-pyr4* do locus de *pep1* foi realizada essencialmente conforme descrito no Exemplo 3 abaixo para M195 (na geração da cepa M219 com deleção dupla de protease). Esta cepa *pyr4-* foi designada com o número M285 e usada como a parental para a subsequente deleção de prote-

ase.

[00327] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv1 17 ( $\Delta gap1-pyr4$ ) foi digerido com *PmeI* e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção de *gap1* foram usados para transformar a cepa M285 (*pyr4*- de cepa M244 que produz anticorpo MAB01, com base na cepa M181  $\Delta pep1$ ). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados usando seleção com *pyr4* essencialmente conforme descrito para as cepas M181 e M195 com deleção de *pep1* no Exemplo 1.

[00328] Colônias das placas de transformação foram escoletadas como listras seletivas. Os clones em crescimento rápido como listras seletivas foram rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 2.2 quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Entidades com ruptura putativas foram purificadas em clones com uma única célula.

**Tabela 2.2: Iniciadores para rastreio de integração de *gap1* e pureza de cepa**

**Para rastreio de integração de pTTv117**

Iniciador	Sequência
T052_ <i>gap1</i> _5rastreio_F	CTCAGAAAGGTTGTAGTTGTGA (SEQ ID NO: 275)
T026_ <i>Pyr4</i> _orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 276)
T053_ <i>gap1</i> _3rastreio_R	GATGTTGTGTTTTTCAGTCTGCA (SEQ ID NO: 277)
T028_ <i>Pyr4</i> _flanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 278)

**Para rastreio de deleção de *gap1* ORF**

T109_ <i>gap1</i> _ORF_F	ATGTTTCATCGCTGGCGTCG (SEQ ID NO: 279)
T110_ <i>gap1</i> _ORF_R	CTAAACGTAAGAGCAGGTCAA (SEQ ID NO: 280)

[00329] **Análise de cepa com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta gap1$  que produz MAB01**

[00330] A cepa dupla deleção ( $\Delta pep1\Delta gap1$ ) foi cultivada em uma

cultura em frasco de agitação de 2 litros contendo 300 ml de meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 40 g/l de lactose, 20 g/l de extrato de grão consumido e 9 g/l de casaminoácidos e tamponada em um pH de 5,5 com PIPPS a 100 mM. A cepa  $\Delta gap1$  foi, então, testada quanto à produção de cadeia pesada e cadeia leve de MAB01 (Figura 12). A cepa  $\Delta gap1$  foi comparada com cepas tendo deleções em cada uma de *slp1*, *slp2* e *slp3*. A cepa M244  $\Delta pep1$  foi usada como controle. As amostras foram de culturas em frasco de agitação grande de 7 dias. As amostras foram analisadas através de imunoblot com anticorpo anticadeia pesada (Sigma #A3188) ou anticadeia leve (Sigma #A3812) de IgG AP-conjugado (Figura 12). A deleção de *gap1* resultou em uma melhora de 2 vezes na produção de cadeia pesada e uma melhora de 1,6 vezes na produção de cadeia leve comparado com a cepa M244 de controle (Figura 13).

### **Análise de Deleção de *gap2***

[00331] Com base nos dados de perfil de transcrição gerados a partir da cepa M194 de *Trichoderma reesei*, a segunda protease glutâmica mais abundante foi identificada como *gap2* (tre106661). Assim, a protease *gap2* também foi deletada da cepa M244 ( $\Delta pep1$ ) usando o construto com deleção pTTV145.

### **Geração de plasmídeo com deleção de *gap2***

[00332] O plasmídeo pTTv145 com deleção da protease glutâmica *gap2* (TreID106661) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de *pep1* no Exemplo 1. 1021 pb de região de flanqueamento 5' e 1010 pb de região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo com deleção de *gap2*. Neste plasmídeo o fragmento de repetição direta do cassete desintegrador de *pyr4* foi trocado de 5'UTR de *pyr4* para 320 pb da repetição direta a partir da extremidade da região de flanqueamento 5' de *gap2* e nenhum sítio *AscI* foi adicionado entre *pyr4* e a repetição direta

5'. Este tipo de cassete desintegrador não deverá deixar qualquer sequência adicional ao *locus* do gene deletado após excisão. Os fragmentos foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 2.3. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. DNA modelo usado na PCR das regiões de flanqueamento de *T. reesei* foi a cepa QM6a de tipo selvagem. O gene marcador *pyr4* foi obtido a partir de pHH05 através de digestão com *NotI*. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com *EcoRI/XhoI*, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de *gap2* (pTTv145) resulta em uma deleção de 944 pb no *locus* de *gap2* e cobre a sequência de codificação completa de *GAP2*.

**Tabela 2.3: Iniciadores para gerar plasmídeo com deleção de *gap2***  
**Plasmídeo pTTv145 com deleção de *gap2* (TreID106661), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T101_ <i>gap2</i> _5flanq_F_ pRS426	GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGT- CACGACGGTT  TAAACGCTACTACGCGAGCAAGTG (SEQ ID NO: 281)
T102_ <i>gap2</i> _5flanq_R_ <i>pyr4</i>	GGAAGTGTGGCGATTGGGA- GAATTTTCGTGCGATCGCGGCGGC CGCCGGATGAAGATGTGCAGTTG (SEQ ID NO: 282)
T103 <i>gap2</i> -loop_F_ <i>pyr4</i>	AGGGAACATATCACCTCGGGCATTTTT- CATTTGGTAGGCGGC CGCTAAGATATCTTCAAGCTTATGCG (SEQ ID NO: 283)

T104 $gap2$ -loop_R	CGGATGAAGATGTGCAGTTG (SEQ ID NO: 284)
T105 $gap2$ _3flanq_F_lo op	TGTCTCACTTCCACCCATCTCAACTGCACATCTT CATCCGAGCA ACAACATGAGGTTTCGAA (SEQ ID NO: 285)
T106_ $gap2$ _3flanq_R_ pRS426	CCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAA- CAATTTACAGTTT AAACACAACGCATGTCCAGCTTTTG (SEQ ID NO: 286)

***Geração de cepas com deleção dupla M360  $\Delta pep1\Delta gap2$  que produzem MAB01***

[00333] Para gerar a cepa que produz anticorpo MAB01 para deleções duplas de protease, a cepa M181 com deleção de *pep1* (Exemplo 1) foi transformada com construtos de cadeias pesada e leve de MAB01 (pTTv98 + pTTv67) usando higromicina e acetamida na seleção. A remoção do cassete desintegrador de *pyr4* do *locus* de *pep1* foi realizada essencialmente conforme descrito no Exemplo 3 abaixo para M195 (na geração da cepa M219 com deleção dupla de protease). Esta cepa *pyr4*- foi designada com o número M285 e usada como parental para subsequente deleção de protease.

***Geração de cepas M360 com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta gap2$  que produzem MAB01***

[00334] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv145 ( $\Delta gap2$ -*pyr4*) foi digerido com *PmeI* e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção de *gap2* foram usados para transformar a cepa M285 (*pyr4*- da cepa M244 que produz anticorpo MAB01, com base na cepa M181  $\Delta pep1$ ). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados usando seleção com *pyr4* essencialmente conforme descrito para as cepas M181 e M195 no Exemplo 1.

[00335] As colônias das placas de transformação foram coletadas

como listras seletivas. Os clones em crescimento rápido como listras seletivas foram rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 2.4 quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Entidades com ruptura putativas foram purificadas em clones com uma única célula.

**Tabela 2.4: Iniciadores para rastreio de integração de *gap2* e pureza de cepa.**

**Para rastreio de integração de pTTv145**

Iniciador	Sequência
T048_gap2_5rastreio_F	GCTTGGCATCACGGAAGCT (SEQ ID NO: 287)
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 288)
T049_gap2_3 rastreio_R	TTGACAAGAAAGGTCCGGTTG (SEQ ID NO: 289)
T028_Pyr4_flanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 290)

**Para rastreio de deleção de ORF de *gap2***

T107\_gap2\_ORF\_FATGGATGCTATCCGAGCCAG (SEQ ID NO: 291)

T108\_gap2\_ORF\_RCTATTCATACTCAACAGTCACA (SEQ ID NO: 292)

**Análise da cepa com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta gap2$  que produz MAB01**

[00336] Vários transformantes de deleção foram produzidos. Os sobrenadantes de cultura a partir destes transformantes foram passados em um gel de SDS PAGE A 4-15% e, então, a cadeia pesada do anticorpo MAB01 foi analisada por imunoblot com um anticorpo anticadeia pesada AP-conjugado (Sigma #A3188) e a cadeia leve foi detectada com um anticorpo anticadeia leve AP-conjugado (Sigma #A3812). Os resultados do imunoblot demonstram que a deleção de

*gap2* resultou em um aumento de várias vezes na produção de cadeias pesada e leve de MAb01 (Figura 14).

### ***Análise de gap2 expressa em Pichia***

[00337] Os sobrenadantes de *Pichia* contendo *gap2* de *Trichoderma reesei* também foram estudados *in vitro*. O sobrenadante contendo *gap2* e anticorpo MAB01 foram diluídos em tampões de citrato de sódio ajustado para um pH de 4,0, 4,5, 5,0 e 5,5 e incubados durante 20 horas a 37 °C. Amostras foram coletadas a 0 minutos e após 20 horas. Produção de cadeia pesada de MAB01 foi analisada por imunoblot usando um anticorpo anticadeia pesada de IgG AP-conjugado (Sigma #A3188). Os resultados do imunoblot demonstram que *gap2* tinha uma atividade proteolítica máxima contra a cadeia pesada MAB01 em um pH de 4,0 (Figura 15). Embora a atividade de protease *gap2* tenha sido reduzida em um pH de 5,5 (Figura 15), acima de 4 dias ela foi capaz de demonstrar uma atividade significativa sobre a cadeia pesada. A protease *gap2* produziu produtos de degradação em torno de 25 kDa, indicando que ela tem atividade proteolítica na região de dobradiça da cadeia pesada.

### **Exemplo 3 - IDENTIFICAÇÃO DE PROTEASES DE SERINA**

[00338] Este exemplo demonstra a capacidade das proteases de serina de *Trichoderma reesei* (T. reesei) de degradar as cadeias pesadas e cadeias leves de anticorpo.

### ***Purificação de Protease de Serina***

[00339] As proteases de serina incluem uma grande família de proteases que foi identificada como enzimas de degradação de anticorpos. Deste modo, proteases de serina foram purificadas a partir do sobrenadante de *Trichoderma*. As proteases de serina foram primeiro purificadas por afinidade a partir dos sobrenadantes de cultura de fermentação, com uma resina de fluxo rápido de p-aminobenzamidina Sepharose 4 (GE Healthcare #17-5123-10). 15 ml do sobrenadante da



cultura de fermentação descontínua foram ligados à resina em 35 ml de tampão de ligação (Tris-HCl a 0,05 M, NaCl a 0,5 M, pH de 7,4). Após empacotamento e lavagem da coluna com o mesmo tampão de ligação, a coluna foi eluída com glicina a 0,05 M, pH de 3,0. As frações foram, então, neutralizadas com Tris-HCl a 1 M, pH de 8,8.

[00340] Um total de 1,7 mg de proteína foi purificado a partir da coluna de afinidade. Quando as frações de pico foram passadas em um gel de SDS PAGE a 4-15%, várias bandas principais (~ 110 kD, 53 kD, 39 kD, 29 kD) e muitas outras bandas menores foram observadas. A mistura de proteína da fração do pico (F4) foi, então, testada quanto à atividade de protease por meio de incubação de uma amostra de F4 com IgG1 humana em tampão de citrato de sódio (50 mM, pH de 5,5) a 37 °C durante 20 horas. As amostras foram incubadas na presença e na ausência do inibidor de protease de serina PMSF (5 mM). As amostras incubadas foram, então, analisadas por imunoblot com um anticorpo anti-cadeia pesada de IgG AP-conjugado (Sigma #A3188) e um anticorpo anti-cadeia leve de IgG AP-conjugado (Sigma #A3812) diluído a 1:30000 em TBST. Os resultados do imunoblot mostraram que a fração F4 de proteína purificada degradou completamente a IgG (Figura 16). Além disso, tratamento com PMSF foi capaz de inibir a maior parte da degradação, o que indica que a atividade de protease na fração F4 responsável pela degradação de IgG era predominantemente a atividade de protease de serina.

[00341] A fim de identificar as proteínas nas quais as frações purificadas exibiram atividade de protease, as frações de pico foram passadas em um gel para zimograma de SDS PAGE para IgG (0,5 mg/ml de MAB02) (12%). As frações purificadas e as amostras de sobrenadantes não purificadas foram passadas no gel de zimograma sob condições de desnaturação. Após passagem no gel, as proteínas no gel foram renaturadas através de incubação do gel em Triton X-100 a 1%

para remover o SDS. O gel de zimograma foi, então, deixado incubar durante a noite em tampão de reação (citrato de sódio a 50 mM, pH de 5,5) de modo que as proteases pudessem degradar a IgG no gel. O gel foi, então, corado com azul GelCode para revelar o grau de coloração de IgG. Proteases ativas produziram uma banda clara, sem coloração (Figura 17).

[00342] Havia duas bandas claras visíveis sobre o gel de zimograma de IgG de cerca de 29 kD e 65 kD. No entanto, a banda de 29 kD era muito mais predominante, sugerindo que ela pode ser responsável pela maior parte da atividade de protease de serina na amostra. Estas bandas foram as duas únicas visíveis na amostra de sobrenadante não purificada e eram mais pronunciadas nas frações purificadas (Figura 17). Quando a amostra de protease foi pré-tratada com PMSF, um inibidor de protease de serina conhecido, as bandas brancas claras apareceram em cinza ou não eram visíveis, o que indica que as bandas correspondem à enzimas protease de serina (Figura 17).

[00343] ***Identificação de protease de serina slp1 de 29 kD***

[00344] A partir de um gel de SDS PAGE correspondente sem MAB02, a banda de 29 kDa foi cortada do gel e submetida à digestão com tripsina em-gel com tripsina modificada para grau de sequenciamento (Promega #V5111). Nas frações purificadas, a banda de 29 kD foi observada como uma banda de proteína distinta. Esta banda distinta foi, então, isolada. Os peptídeos resultantes foram extraídos do gel e purificados por C18 ZipTip (Millipore #ZTC18M096). Os peptídeos purificados foram analisados por LC-MS/MS em um TOF com quadrupolo ESI-híbrido QSTAR Pulsar (AB Sciex). A análise de massa resultante identificou claramente a banda de 29 kDa como a protease de serina do tipo tripsina slp1 (tre73897, cobertura de sequência de 35%).

***Análise de deleção de slp1***

[00345] O gene slp1 que codifica (tsp1) foi, então, excluído da cepa

M169 que produz anticorpo rituximab para criar M183 ( $\Delta$ tsp1). Culturas em frasco de agitação foram feitas com M169 e os transformantes da cepa com deleção slp1 para medir o efeito sobre a expressão do rituximab. As culturas foram cultivadas em 300 ml de TrMM com 4 g/L de lactose, 2 g/L de extrato de grão consumido e PIPPS a 100 mM, pH de 5,5. Amostras de sobrenadante (30  $\mu$ l) do dia 5 foram carregadas em um gel de SDS PAGE a 4-15% e transferidas para nitrocelulose para imunoblot com um anticorpo anti-cadeia pesada AP-conjugado (Sigma #A3188) diluído a 1:10000 em TBST. Dois transformantes da cepa com deleção de slp1 mostraram um claro aumento na expressão de cadeia pesada de rituximab comparado com a cepa de controle parental (Figura 40).

[00346] O construto com deleção para o primeiro gene de protease, pep1 (TreID74156), foi concebido conforme descrito acima no Exemplo 1.

### ***Geração de plasmídeos com deleção de tsp1***

[00347] Os plasmídeos com deleção para protease de serina de tipo tripsina alcalina tsp1 (TreID71322/TreID73897, Dienes et al., 2007, Enz Microb Tech 40: 1087-1094), foram construídos essencialmente conforme descrito para os plasmídeos com deleção de pep1 no Exemplo 1. 953 pb da região de flanqueamento 5' e 926 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeos com deleção de slp1. Conforme para pep1, o primeiro plasmídeo com deleção de tsp1 (pTTv42) usou bar como o marcador de seleção. Os fragmentos da região de flanqueamento foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 3.1. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. DNA modelo usado em PCR das regiões de flanqueamento foi a cepa QM6a de *T. reesei* de tipo

selvagem. O marcador bar foi obtido a partir de pTTv41 (Exemplo 1) através de digestão com NotI. O esqueleto do vetor foi pRS426 digerido com EcoRV/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1.

[00348] Para clonar o segundo plasmídeo com deleção de *tsp1* (pTTv72), o marcador bar foi removido do plasmídeo com deleção pTTv42 através de digestão com NotI. O cassete desintegrador de *pyr4* foi obtido a partir de pTTv71 (Exemplo 1) através de digestão com NotI, ligado ao pTTv42 cortado com NotI e transformado em *E. coli* usando métodos de laboratório convencionais. Alguns transformantes foram cultivados, o DNA de plasmídeo isolado e digerido para rastreio de ligação correta e orientação do cassete desintegrador de *pyr4* usando métodos convencionais. Um clone com o tamanho de inserto e orientação corretos foi sequenciado e armazenado. Estes plasmídeos com deleção de *slp1* (pTTv42 e pTTv72) resultam em uma deleção de 1252 pb no locus de *slp1* e cobrem a sequência de codificação completa de *tsp1*.

**Tabela 3.1: Iniciadores para gerar plasmídeos com deleção de *slp1***

**Plasmídeo com deleção pTTv42 para *tsp1* (TreID71322/TreID73897), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T303_71322_5f	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC- ACGGTTTAACTGCTGTTGCTG TTTGTTGATG (SEQ ID NO: 293)
T304_71322_5r_pt	CCCGTCACCGAGATCTGATCCGTCACCG- GATCCACTTAAGCGGCCGC CTGTGGTGAGATCTCCAGACG (SEQ ID NO: 294)
T305_71322_	GCCAAGCCCCAAAAGTGCTCCTTCA-

3f_pt	TATCATCTTCTGTGCGGCCGC ACTGTGCCCAACAATAAGCAG (SEQ ID NO: 295)
T306_71322_3r	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA- AGCGTTTAAACCCAAGGCGCT GGCTGTTA (SEQ ID NO: 296)
<b>Plasmídeo com deleção pTTv72 para slp1 (TreID71322/TreID73897), esqueleto de pTTv42</b>	
Iniciador	Sequência
Nenhum novo iniciador, pTTv42 digerido com NotI e ligado com hph; fragmento pyr4-loopout de pTTv71	

***Geração de cepa M219 com deleção dupla de pep1tsp1***

[00349] Para reutilizar pyr4 como o marcador de seleção, remoção do cassete de desintegrador de pyr4 da cepa M195 com deleção de pep1 foi realizada. Os esporos foram espalhados em placas com meio mínimo contendo 20 g/l de glicose, 2 g/l de protease peptona, 1 ml/l de Triton X-100, uridina a 5 mM e 1,5 g/l de 5-FOA, pH de 4,8. Colônias resistentes ao 5-FOA foram escolhidas após 5-7 dias em NaCl a 0,9%, completamente suspensas em vórtice e filtradas através de uma pipeta com ponta cheia de algodão. Para purificar os clones em clones com uma única célula, os filtrados foram espalhados novamente nas placas descritas acima. Os clones purificados foram esporulados em placas contendo 39 g/l de agarose com dextrose de batata. Estes clones foram testados quanto à auxotrofia para uridina colocando os esporos em placas com meio mínimo (20 g/l de glicose, 1 mL/l de Triton X-100), onde nenhum crescimento foi observado, indicando que os clones selecionados eram pyr4-. Todos os clones foram posteriormente testados por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 3.2) quanto à remoção do cassete desintegrador e mostraram estar corretos. O clone (9-35A-1A-a), usado para gerar a cepa com deleção dupla de protease (M219), foi designado com o número de cepa M196

( $\Delta$ pep1, pyr4-).

[00350] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv72 ( $\Delta$ tsp1-pyr4) foi digerido com PmeI e o fragmento correto foi purificado a partir de um gel de agarose usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção de slp1 foram usados para transformar M196 ( $\Delta$ pep1, pyr4-). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados usando seleção com pyr4 essencialmente conforme descrito para as cepas M181 e M195 com deleção de pep1 no Exemplo 1.

[00351] Mais de 100 colônias foram escolhidas e 48 foram selecionadas por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 3.2 quanto à integração correta do cassete de deleção e também deleção de ORF de tsp1 usando métodos de laboratório convencionais. Quatro clones  $\Delta$ tsp1 putativos foram purificados em clones com uma única célula. Deleção de slp1 foi verificada por análises de Southern destes clones (Figura 18A), usando métodos de laboratório convencionais descritos no Exemplo 1 para M181 e M195. Análise de Sourthern também indicou que apenas quatro transformantes (dois clones paralelos de dois transformantes, clones 16-5AA, 16-5BA, 16-11AA, 16-11BA, Figuras 18B e 18C) eram integrantes individuais. Os outros clones foram determinados como trazendo cópias adicionais em outro lugar no genoma e foram descartados. Para excluir o sinal fraco visto na Figura 18 para a ORF de slp1 em transformantes que se originam a partir do gene slp1, a deleção de ORF de tsp1 foi confirmada por PCR usando os iniciadores na Tabela 3.2. Nenhum sinal para ORF de tsp1 foi obtido. O clone (16-5AA) usado na remoção do cassete desintegrador de pyr4 (e para gerar a cepa com deleção tripla M277) foi designado com o número de cepa M219 ( $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1).

***Geração de cepa M252 com deleções duplas  $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1 que produz MAB01***

[00352] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv42 ( $\Delta$ tsp1-bar) foi digerido com PmeI e o fragmento correto purificado a partir de gel de agarose usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete slp1 deleção foram usados para transformar a cepa M181 ( $\Delta$ pep1, Exemplo 1). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados usando seleção com bar essencialmente conforme descrito para a cepa M182 com deleção de pep1 no Exemplo 1.

[00353] As colônias que crescem sobre placas de transformação foram escolhidas como listras seletivas. Os clones em crescimento rápido como listras seletivas foram rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 3.2 quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Entidades com ruptura putativas foram purificadas em clones com uma única célula. Deleção de slp1 foi verificada por análises de Southern destes clones (Figura 19A), usando métodos de laboratório convencionais descritos no Exemplo 1 para M181 e M195. Todos os clones também foram verificados como sendo integrantes únicos (Figuras 19B e 19C). Um clone com deleção dupla de protease (13-172D) foi designado com o número M194.

**Tabela 3.2: Iniciadores para rastreio de remoção de cassete desintegrador de pyr4 e para rastreio de integração de tsp1 e pureza de cepa**

[00354] Para rastreio de remoção de cassete desintegrador de pyr4 de M195

T083_74156_5a_seq	GATCGACAAAGGTTCCAGCG (SEQ ID NO: 297)
T084_74156_3a_seq	AATTGTATCATTCCGAGGCT (SEQ ID NO: 298)
Para rastreio de integração de pTTv42	
Iniciador	Sequência

T307_71322_5int	CTGTTTGGCCCTCGAAACT (SEQ ID NO: 299)
T032_Bar_loppu_for	CATTGTTGACCTCCACTAGC (SEQ ID NO: 300)
T308_71322_3int	TTCGCCATCCAAATTTCTTC (SEQ ID NO: 301)
T031_Bar_alku_rev2	GTTTCTGGCAGCTGGACT (SEQ ID NO: 302)
Para rastreio de integração de pTTv72	
Iniciador	Sequência
T307_71322_5int	CTGTTTGGCCCTCGAAACT (SEQ ID NO: 303)
T027_Pyr4_orf_start_rev	TGCGTCGCCGTCTCGCTCCT (SEQ ID NO: 304)
T308_71322_3int	TTCGCCATCCAAATTTCTTC (SEQ ID NO: 305)
T028_Pyr4_flanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 306)
Para rastreio de deleção de ORF de slp7	
T309_71322_5orfpcr	CCCAAGTCGTCTCAGCTCTC (SEQ ID NO: 307)
T310_71322_3orfpcr	TCGAAGGCTTCAGTGAGGTAA (SEQ ID NO: 308)

[00355] A cepa M194 com deleção dupla de protease foi usada para gerar cepas M247 e M252 que expressam anticorpo MAB01 abaixo. Construção da cepa M247 foi realizada através de transformação de M194 com construtos de cadeias pesada e leve de MAB01 (pTTv101 + pTTv102). Cepa M252 foi construída transformando M194 com construtos de cadeias pesada e leve de MAB01 (pTTv99 + pTTv67). Ambas as transformações foram baseadas em seleção com higromicina e a-



cetamida.

***Análise da cepa M252 com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta tsp1$  que produz MAB01***

[00356] Foi mostrado que a cepa com deleção dupla ( $\Delta pep1\Delta tsp1$ ) que produz MAB01 produz 261 mg/l de anticorpo, com 43% de anticorpo de comprimento total, quando cultivada em um fermentador. A atividade de protease da cepa foi, então, testada por meio de crescimento da cepa em meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 20 g/l de extrato de grão consumido, 60 g/l de lactose e 9 g/l de caseína em um pH de 5,5 e 22 °C. A atividade total de protease contra caseína nesta cepa foi determinada como sendo 2,0 vezes menos do que a cepa M124 de tipo selvagem (Figura 20).

***Identificação de protease de serina  $slp1$  de 65 kD***

[00357] A protease que produz atividade em torno de 65 kDa foi mais difícil de identificar em virtude de seu baixo nível de expressão e da proximidade de tamanho com várias proteínas altamente expressas. As proteínas altamente expressas foram previamente identificadas como sendo CBHI, CBHII, CIP2 e xilanase 4. Aprimoramentos foram feitos para separar melhor a protease de 65 kD das proteínas altamente expressas. Os aprimoramentos incluíam o uso de uma percentagem mais baixa de gel (7%) no zimograma em gel de SDS PAGE padrão e géis de SDS PAGE para passagem das amostras um tempo mais longo, de modo que o marcador de peso molecular de 54 kD estivesse na parte inferior do gel. Adicionalmente, o sobrenadante de fermentação de um transformante de *T. reesei* que produz anticorpo rituximab também foi usado para purificar as proteases de serina. O transformante de anticorpo rituximab é a cepa M169 que produz rituximab e carece de deleções de protease. A cepa foi cultivada em meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 20 g/l de extrato de grãos consumidos e 60 g/l de lactose em um pH de 5,5 e 28 °C. A

CBHI produzida nesta cultura não tem o domínio de ligação à celulose; portanto, ela é cerca de 10 kD menor. No entanto, M169 não mostrou uma banda distinta que corresponde à protease de 65 kD (Figura 21). Assim, a região geral foi cortada e submetida à digestão com tripsina em-gel com tripsina modificada para grau de sequenciamento (Promega #V5 111). Os peptídeos resultantes foram extraídos do gel e purificados por C18 ZipTip (Millipore #ZTC18M096). Os peptídeos purificados foram analisados por LC-MS/MS em um TOF com quadrupolo E-SI-híbrido QSTAR Pulsar (AB Sciex).

[00358] A análise de peptídeos mostrou que a proteína com a segunda maior pontuação era a protease tre51365. A proteína com maior pontuação foi xilanase 4, a qual era um contaminante na amostra. A protease subtilisina tre51365, agora denominada slp1, foi encontrada em três amostras independentes de três purificações distintas. Na amostra com melhor pontuação, 6 peptídeos foram encontrados e sequenciados por LC-MS/MS. A cobertura sequência foi de 8%, uma vez que o gene codifica a protease nativa de 882 aminoácidos que compõe uma protease de 93 kD. Em zimografia, uma banda fraca a ~90 kD pode ser vista junto com blots até 65 kDa, sugerindo que a protease slp1 em si proteólise, mas mantém muito de sua atividade.

#### ***Geração de um plasmídeo com deleção de slp1***

[00359] O gene que codifica SLP1 (slp1) foi, então, deletado na cepa M244 que produz anticorpo MAB01 ( $\Delta$ pep1).

[00360] O plasmídeo com deleção da protease de tipo subtilisina slp1 (TreID51365) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1. 1094 pb da região de flanqueamento 5' e 1247 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados como a base do plasmídeo com deleção de slp1. Os fragmentos foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 3.3. Os produtos foram separados por meio de

eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Modelo usado em PCR das regiões de flaqueamento foi a cepa QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem. O cassete desintegrador de *pyr4* foi obtido a partir de pTTv71 (Exemplo 1) através de digestão com NotI. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de *slp1* (pTTv126) resulta em deleção de 2951 pb no locus de *slp1* e abrange a sequência de codificação completa de SLP1.

**Tabela 3.3: Iniciadores para geração de plasmídeo com deleção de *slp1***

**Plasmídeo com deleção pTTv126 para *slp1* (TreID51365), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
5flaqueamentofw_vet	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGT TTAAACATCTCGGAGT GATGCTTCCT (SEQ ID NO: 309)
s-lp1_5flaqueamentorev_pyr4Pro	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGTAG TCGATGCTAGGCGGCC GCATCAGACGAAACCAGACGAG (SEQ ID NO: 310)
s-lp1_3flaqfw_pyr4Term	CAACCAGCCGCGAGCCTCAGCCTCTCTCAGC CTCATCAGCCGCGGCCG CGCGAATCGAGTTGATGATTC (SEQ ID NO: 311)
3flaqueamentorev_vet	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGT TTAAACCTGGTTGGGA TCTGACCACT (SEQ ID NO: 312)

***Geração de cepas M298 e M299 com deleção  $\Delta pep1\Delta slp1$  que produzem MAB01***

[00361] Para gerar a cepa com deleções duplas de protease que produz MAB01, a cepa M181 com deleção de pep1 (no Exemplo 1) foi transformada com os construtos de cadeias pesada e leve de MAB01 (pTTv98 + pTTv67) usando seleção com higromicina e acetamida. A remoção do cassete desintegrador pyr4 do sítio de pep1 foi realizada essencialmente conforme descrito para M195 acima (na geração da cepa M219 com deleção dupla de protease). Esta cepa pyr4- foi designada com o número M285 e usada como parental para subsequente deleção de protease.

[00362] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv126 ( $\Delta slp1$  -pyr4) foi digerido com PmeI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qia-gen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção de slp1 foram usados para transformar M285 (pyr4- da cepa M244 que produz anticorpo MAB01, com base na cepa M181  $\Delta pep1$ ). Preparo de protoplas- tos e transformação foram realizados usando seleção com pyr4 es- sencialmente conforme descrito para as cepas M181 e M195 com de- leção de pep1 no Exemplo 1.

[00363] As colônias que crescem em placas de transformação fo- ram escolhidas como listras seletivas. Os clones em crescimento rápi- do como listras seletivas foram rastreados por PCR usando os inicia- dores listados na Tabela 3.4 quanto à integração correta usando mé- todos de laboratório convencionais. Entidades com ruptura putativas foram purificadas em clones com uma única célula.

**Tabela 3.4: Iniciadores para rastreio de integração de slp1 e pureza de cepa**

**Para rastreio de integração de pTTv126**

Iniciador	Sequência
T079_slp1_scrn_5forw	GCAGACAAACAGAGCAACGA (SEQ ID NO: 313)
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 314)
T080_slp1_scrn_3rev	TAGAGGGTGTCTGATGGAAGC (SEQ ID NO: 315)
T028_Pyr4_flanqueamento_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 316)
Para rastreio de deleção de ORF de slp1	
T081_slp1_orf_fw	GGTCTCTTCTTTGCCAGCAC (SEQ ID NO: 317)
T082_slp1_orf_rev	TGTCGCTGAACTGAATTTGC (SEQ ID NO: 318)

**Análise cepa M298/M299 com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta slp1$  que produz MAB01**

[00364] Deleção de slp1 na cepa M244 mostrou uma melhora esperada na produção de cadeias leve e pesada (Figuras 12 e 13). A cepa com deleção de slp1 ( $\Delta pep1 \Delta slp1$ ) foi cultivada em uma cultura em frasco de agitação de 2 litros contendo 300 ml de meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 40 g/l de lactose, 20 g/l de extrato de grão consumido e 9 g/l de casaminoácidos e tamponado em um pH de 5,5 com PIPPS a 100 mM. Conforme descrito no Exemplo 2 acima, os sobrenadantes de cultura foram separados em um gel de PAGE a 4-15% e imunoblot realizado para detectar as cadeias pesada e leve de MAB01. A cadeia pesada foi produzida em níveis que eram 2,8 vezes maiores do que os níveis de produção da cepa M244 (Figura 13). A

cadeia leve foi produzida em níveis que eram de 1,8 vezes maiores do que os níveis de produção da cepa M244 (Figura 13).

### ***Identificação de proteases de serina adicionais***

[00365] Proteases de serina que degradam anticorpos adicionais foram identificadas usando outros ligantes de afinidade. O inibidor de tripsina de soja (SBTI) estabiliza eficazmente as cadeias pesada e leve de anticorpo. Portanto, é capaz de inibir proteases que são responsáveis pela clivagem do anticorpo. Assim, de modo a identificar estas proteases, purificação por afinidade foi realizada com SBTI acoplado à agarose (Sigma #T0637).

[00366] A cepa M44 de *T. reesei* foi usada para identificar as proteases. A cepa M44 é uma cepa de tipo selvagem sem expressão de proteína heteróloga. A cepa M44 foi crescida em meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 20 g/l de extrato de grãos consumidos e 60 g/l de lactose em um pH de 5,5 e 28 °C. Uma amostra de 20 ml de sobrenadante de cultura de M44 a partir de uma amostra de 217 horas foi incubada com a resina de afinidade de agarose-SBTI (1 ml) em 30 ml de tampão de ligação (Tris a 50 mM, NaCl a 0,5 M, pH de 7,5) (pH de 5,5; 28 °C, 20 g/L de extrato de grão consumido, 60 g/L de lactose). A mistura de tampão de ligação/sobrenadante foi combinada em um tubo cônico de 50 ml e agitada em temperatura ambiente durante 1 hora. A mistura foi, então, adicionada a uma coluna de vidro e lavada com 200 ml de tampão de ligação. 50 ml de tampão com alto teor de sal (NaCl a 1 M) foram, então, usados para remover ainda mais as interações não específicas. Finalmente, a coluna foi lavada de novo com 100 ml de tampão de ligação/lavagem inicial. A coluna foi, então, eluída com benzamidina. HCl a 0,8 M em Tris a 50 mM, pH de 5,0. As frações foram coletadas em volumes de 0,5 ml e submetidas a um ensaio de proteína de Bradford usando o reagente da BioRad com imunoglobulina bovina como um padrão.

[00367] A partir de todas as frações coletadas, 190 µg de proteína foram purificados a partir da coluna de afinidade de SBTI. A fração de pico foi lavada em um filtro de centrifugação Vivaspin Ultrafiltration (Sartorius-Stedim) com corte de peso molecular de 10 kD para remover o inibidor benzamidina e a fração concentrada. As frações concentradas (CF3 e CF4) e frações não concentradas (F1-F4) foram carregadas em um gel de zimograma para MAB02 (conforme descrito acima) e em um gel de SDS PAGE regular para análise. Os resultados do zimograma mostram que há duas atividades proteolíticas visíveis (Figura 22). A banda mais predominante era visível em torno de 40 kDa e uma banda mais fraca era visível em torno de 26 kDa (Figura 22). No gel de zimograma, bandas de proteínas de coloração mais escura estavam nas bordas brancas de atividade do zimograma. Comparando-as com frações concentradas carregadas em um gel de SDS PAGE, estas bandas duplas poderiam ser vistas em torno de 38 kDa (Figura 23). O gel de PAGE era um gel com gradiente de 4-15% e o gel de zimograma era de 12%, de modo que os tamanhos relativos podem ser ligeiramente diferentes. No gel de PAGE, uma banda de proteína podia ser claramente vista na área de 26 kD, a qual correspondia ao tamanho da segunda atividade mais fraca no zimograma.

[00368] Para analisar ainda mais a atividade proteolítica da protease purificada de CF3, a fração foi testada quanto à sua capacidade de degradar a cadeia pesada do anticorpo rituximab. Uma amostra de 5 µl de CF3 foi incubada em tampão de citrato de sódio, pH de 5,5 com 0,05 µg/ml de rituximab. As amostras incubadas foram, então, analisadas por imunoblot usando um anticorpo anti-cadeia pesada de IgG humana AP-conjugado específico (Sigma #A3188) diluído a 1:30000 em TBST. Os resultados do imunoblot demonstram que as proteases degradaram imediatamente a cadeia pesada do anticorpo rituximab. A cadeia pesada de rituximab de comprimento total migrou um pouco

acima de 50 kDa, enquanto que o produto inicial de degradação tinha cerca de 45 kD (Figura 24). Além disso, incubação durante a noite gerou um produto adicional de 38 kD (Figura 24).

[00369] As proteases responsáveis pelas atividades no zimograma foram identificadas após sequenciamento de peptídeo por LC-MS/MS. Seções de gel contendo proteínas foram cortadas do gel de SDS PAGE mostrado na Figura 23 e submetidas à digestão com tripsina em-gel com tripsina modificada para grau de sequenciamento (Promega #V5111). Os peptídeos resultantes foram extraídos do gel e purificados por C18 ZipTip (Millipore #ZTC18M096). Os peptídeos purificados foram analisados por LC-MS/MS em um TOF com quadrupolo ESI-híbrido QSTAR Pulsar (AB Sciex).

[00370] A protease de maior pontuação era a protease de tipo subtilisina, slp2 (tre123244). Dois peptídeos de slp2 foram encontrados e sequenciados, cobrindo 6% da sequência de comprimento total. A protease slp2 de comprimento total tem 58 kD, mas é habitual que a protease ativa possa ter um tamanho menor.

[00371] Também outras proteases foram encontradas em regiões adjacentes. Análise da região abaixo de 26 kD identificou a protease de serina de tipo tripsina slp1 (tre73897). Isto correspondia à fraca atividade observada no zimograma. Conforme descrito acima, esta protease foi identificada através de purificação por afinidade com amino-benzamidina.

[00372] Além disso, toda a fração purificada por afinidade de SBTI foi digerida com tripsina na solução para determinar a totalidade do teor de protease da amostra. Outras proteases identificadas incluíam a protease slp7 tre123865 (60 kD); a protease pep4 tre77579 (42 kD); e a protease slp8 tre58698 (41 kD).

[00373] As proteases subtilisina slp5, slp6 e slp7 de *Trichoderma reesei* foram superproduzidas em sobrenadantes de *Pichia* para inves-



tigação de sua atividade contra as cadeias pesadas dos anticorpos rituximab e MAB01 (Figura 25). O sobrenadante com rituximab simulado foi comparado com os sobrenadantes contendo slp5 e slp6 (Figura 25A). O sobrenadante com MAB01 simulado foi comparado com os sobrenadantes contendo slp7 (Figura 25B). Rituximab e MAB01 foram adicionados aos sobrenadantes de *Pichia* contendo protease e incubados durante a noite a 37 °C. As amostras foram coletadas e analisadas por imunoblot com um anticorpo anti-cadeia pesada AP-conjugado. Esta análise revelou que a protease slp6 mostrou forte atividade de degradação na cadeia pesada de rituximab e degradação leve de MAB01, comparado com os sobrenadantes de controle simulados (Figura 25).

#### ***Geração de plasmídeos com deleção de slp2 e slp3***

[00374] Com base nos resultados acima, os genes de protease slp2 e slp3 foram, cada um, deletados da cepa M244 que produz anticorpo MAB01.

[00375] Os plasmídeos com deleção de proteases de tipo subtilisina slp2 (tre1D 123244) e slp3 (TreID123234) foram construídos essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1. 1000 pb da região de flaqueamento 5' e 1100 pb da região de flaqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo com deleção de slp2. Para slp3, foram selecionados 1000 pb da região de flaqueamento 5' e 1100 pb da região de flaqueamento 3'. Os fragmentos foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 3.5. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Modelo usado em PCR das regiões de flaqueamento foi a cepa QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem. O cassete desintegrador de pyr4 foi obtido a partir de pTTv71 (Exem-

plo 1) através de digestão com NotI. O esqueleto do vetor foi pRS426 digerido com EcoRV/XhoI, conforme no Exemplo 1. Os plasmídeos foram construídos usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. O plasmídeo com deleção de slp2 (pTTv115) resulta em uma deleção de 2114 pb no locus de slp2 e abrange a sequência de codificação completa de SLP2. O plasmídeo com deleção de slp3 (pTTv116) resulta em uma deleção de 1597 pb no locus de slp3 e abrange a sequência de codificação completa de SLP3.

**Tabela 3.5: Iniciadores usados para os plasmídeos**

**Plasmídeo pTTv115 com deleção de slp2 (TreID123244), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
JJ-037 iniciador	GATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTT-TCCCAGTCACGACGGTTTAAA CGCAGTCTATCC-CATCCCTG (SEQ ID NO: 319)
JJ-038 iniciador	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGT-GTCGATGCTAGGCGGCC GCGCGGATGATGAAGGA-AGAAG (SEQ ID NO: 320)
JJ-039 iniciador	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTC-CAGCCTCATCAGCCGCGGCCG CAACAGCTGTTCG-CACGCGTG (SEQ ID NO: 321)
JJ-040 iniciador	TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT-ACACAGGAAACAGCGTTTAAA CGGCTGGG-CATTGGGGCCG (SEQ ID NO: 322)
Plasmídeo pTTv116 com deleção de slp3 (TreID123234), esqueleto de vetor pRS426	
Iniciador	Sequência
JJ-041 iniciador	GATTAAGTTGGGTAAACGCCAGGGTT-TCCCAGTCACGACGGTTTAAA CAAACAAGGCACAA-

	AGGCCTG (SEQ ID NO: 323)
JJ-042 iniciador	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGTA - CGATGCTAGGCGGCC GCATCCAAGGATGAGGAGA- AC (SEQ ID NO: 324)
JJ-043 iniciador	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTC- CAGCCTCATCAGCCGCGGCCG CACCTAATGGTTTCTTCGTTTTTC (SEQ ID NO: 325)
JJ-044 iniciador	TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT- ACACAGGAAACAGCGTTTAAA CCGGTCCGA- AGGGTGTTTTGG (SEQ ID NO: 326)

***Geração de cepas M292 e M295 com deleção  $\Delta pep1\Delta slp2$  e  $\Delta pep1\Delta slp3$  que produzem MAB01***

[00376] Para gerar a cepa com deleções duplas de protease que produz anticorpo MAB01, a cepa M181 com deleção de pep1 (no Exemplo 1) foi transformada com os construtos de cadeias pesada e leve de MAB01 (pTTv98 + pTTv67) usando seleção com higromicina e acetamida. A remoção do cassete desintegrador de pyr4 do locus de pep1 foi realizada essencialmente conforme descrito para M195 acima (na geração da cepa M219 com deleção dupla de protease). Esta cepa pyr4- foi designada com o número M285 e usada como parental para as subseqüentes deleções de protease.

[00377] Para remover a sequência do vetor, os plasmídeos pTTv115 ( $\Delta slp2$ -pyr4) e pTTv116 ( $\Delta slp3$ -pyr4) foram digeridos com PmeI e os fragmentos corretos purificados a partir de um gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5 µg de cassete de deleção foram usados para transformar M285 (pyr4- da cepa M244 que produz anticorpo MAB01 com base na cepa M181  $\Delta pep1$ ) separadamente. Preparo de protoplastos e transformação foram realizados usando seleção com pyr4 essencialmente conforme descrito para as cepas M181 e M195 com deleção de pep1 no Exem-

plo 1.

[00378] As colônias que crescem em placas de transformação foram escolhidas como listras seletivas. Os clones em crescimento rápido como listras seletivas foram rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 3.6 quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Entidades com ruptura putativas foram purificadas em clones com uma única célula. Nenhum clone puro foi obtido, mesmo após etapas repetidas de purificação.

**Tabela 3.6: Iniciadores para rastreio de integração de slp2 (pTTv115) e slp3 (pTTv116) e pureza de cepa**  
**Para rastreio de integração de pTTv115**

Iniciador	Sequência
T054_slp2_5rastreo_F	GATGCACCGCTGCGGCC (SEQ ID NO: 327)
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 328)
T028_Pyr4_flanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 329)
T055_slp2_3rastreo_R	GGCGTTGCTCCCCATGCG (SEQ ID NO: 330)
Para rastreio de deleção de ORF de slp2	
T111_slp2_ORF_F	ATGCGGTCCGTTGTCGCC (SEQ ID NO: 331)
T112_slp2_ORF_R	TTACTCGGAGAGCTCAGAGA (SEQ ID NO: 332)
Para rastreio de integração de pTTv116	
Iniciador	Sequência
T056_slp3_5rastreo_F	GTGAATGGGTGGCAACATGA (SEQ ID NO: 333)
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 334)

	334)
T028_Pyr4_flanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 335)
T057_slp3_3 rastreio_R	CATCAAGTTGACCACCATTGT (SEQ ID NO: 336)
Para rastreio de deleção de ORF de slp3	
T113_slp3_ORF_F	ATGCGGTTGTCCGTCCTCC (SEQ ID NO: 337)
T114_slp3_ORF_R	TTAACCGGAAGGGTTGCCGT (SEQ ID NO: 338)

***Análise de cepas M292 e M295 com deleção dupla  $\Delta pep1\Delta slp2$  e  $\Delta pep1\Delta slp3$  que produzem MAB01***

[00379] A cepa M292 ( $\Delta pep1\Delta slp2$ ) e a cepa M295 ( $\Delta pep1\Delta slp3$ ) foram cultivadas juntamente com seus transformantes irmãos em um frasco de cultura 2 litros em agitação contendo 300 ml de meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com 40 g/l de lactose, 20 g/l de extrato de grãos consumidos e 9 g/l de casaminoácidos e tamponado em um pH de 5,5 com PIPPS a 100 mM. Os sobrenadantes de cultura foram separados em um gel de SDS PAGE a 4-15% e imunoblot foi realizado para detectar a cadeia pesada e cadeia leve de MAB01. Os resultados mostram que ambas as deleções melhoraram a estabilidade de MAB01 (Figuras 12 e 13). A deleção  $\Delta slp2$  aprimorou a expressão da cadeia pesada de MAB01 em cultura em frasco de agitação em cerca de 2,4 vezes no dia 7, comparado com a cepa M244 parental (Figura 13).  $\Delta slp3$  aprimorou a expressão da cadeia pesada de MAB01 em grandes frascos de agitação em cerca de 1,5 vezes e expressão de cadeia leve de MAB01 em cerca de 1,7 vezes comparado com a cepa M244 parental (Figura 13). Além disso, quando comparado com  $\Delta slp3$  e  $\Delta gap1$ ,  $\Delta slp2$  mostrou o maior aumento na expressão da cadeia pesada de MAB01 em relação à expressão da cadeia pesada

MAB01 na cepa M244 (Figura 13).

[00380] Quando *slp2* foi deletada da cepa M306 com deleção múltipla ( $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1$ ), deleção de *slp2* resultou em uma redução na esporulação e crescimento mais lento comparado com a cepa parental.

#### **Exemplo 4 - CEPAS DE TRICHODERMA COM DELEÇÕES MÚLTIPLAS DE PROTEASE**

[00381] Este exemplo demonstra o aumento da produção de anticorpos e a estabilidade a partir de *Trichoderma reesei* (*T. reesei*) cepas contendo múltiplas deleções dos genes de protease acima identificados nos Exemplos 1-3.

##### ***Geração de Triplo Deleção Strain $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1$***

[00382] A cepa de *T. reesei* com uma deleção tripla  $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1$  foi gerada e testada para a melhora na produção de anticorpos. A cepa também foi usado para novas rodadas de eliminações protease.

##### ***Geração de triplo protease deleção cepa M277***

[00383] Para gerar uma cepa de protease triplo deleção sem marcador, o looping do marcador *pyr4* foi aplicada a cepa M219, essencialmente conforme descrito acima para o looping *outpyr4* da única cepa de protease deleção  $\Delta pep1$ . Três etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas. Clones finais foram verificadas para o looping *ofpyr4* por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 3.1); há sinais específicos foram observados com iniciadores de recozimento com a parte enrolada para fora do *pyr4*. O looping foi ainda verificada por plaqueamento das clones em placas de meio mínimo com ou sem 5 mM uridina. O clone usado para gerar o triplo protease cepa com deleção foi designado com número de cepa M228 ( $\Delta pep1 \Delta tsp1$ , *pyr4* ~).

[00384] O plasmídeo com deleção pTTv126 para o terceiro gene da protease, subtilisina como protease slp1 (TreID51365) é descrito acima (Tabela 3.3). Esta plasmídeo com deleção resultando em 2951 pb deleção no locus slp1 e abrange a sequência de codificação completa de slp1

[00385] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv126 (LOOPOUT  $\Delta$ slp1 -pyr4) foi digerido com PmeI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete slp1 deleção foi usada para transformar M228 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1, pyr4<sup>-</sup>) acima. Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195, usando seleção pyr4.

[00386] 200 clones foram escolhidos como primeiras listras. 48 destas listras foram rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.1 quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Cinco putativos entidades com ruptura protease triplos ( $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1) foram purificadas em clones com uma única célula. Deleção de slp1 foi verificada por análises do sul dos cinco clones (Figura 26A). As análises de Southern foram realizadas conforme descrito no Exemplo 1. Análises de Southern também verificou-se que três dos clones eram integrantes individuais (Figuras 26B e 26C). Os outros dois clones foram mostrados para realizar cópias adicionais em outro lugar no genoma e foram descartados. O clone usado na remoção da, cassete desintegrador de pyr4 (e para gerar a protease deleção quádruplo cepa M307 abaixo) foi designado com o número de cepa M277 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1).

**Tabela 4.1: Iniciadores para remoção de triagem ofpyri cassete Blaster e para rastreio slp1 integração e pureza de cepa.**

**Para remoção de triagem de cassete desintegrador de pyr4 do**

**M219**

Sequence Primer

T307\_71322\_5int CTGTTTGGCCCTCGAAACT (SEQ ID NO: 339)

T026\_Pyr4\_orf\_5rev2 CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 340)

T308\_71322\_3int TTCGCCATCCAAATTTCTTC (SEQ ID NO: 341)

T028\_Pyr4\_flanqueamento\_rev CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 342)

**Para a integração de triagem de pTTv126**

Sequence Primer

T079\_slp1\_scrn\_5forw GCAGACAAACAGAGCAACGA (SEQ ID NO: 343)

T026\_Pyr4\_orf\_5rev2 CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 344)

T080\_slp1\_scrn\_3rev TAGAGGGTGTTCGATGGAAGC (SEQ ID NO: 345)

T028\_Pyr4\_flanqueamento\_rev CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 346)

**Para rastreio de deleção slp1 ORF**

T081\_slp1\_orf\_fw GGTCTCTTCTTTGCCAGCAC (SEQ ID NO: 347)

T082\_slp1\_orf\_rev TGTCGCTGAACTGAATTTGC (SEQ ID NO: 348)

***Geração de que produz MAB01 tripla deleção protease cepa M304***

[00387] Para gerar a cepa produtora de anticorpos MAB01 para a terceira deleção da protease, os pep11tsp1 dupla protease cepa com deleção M194 (Exemplo 3) foi transformado com construtos de cadeias pesada e leve de MAB01 (pTTv99 + pTTv67) usando higromicina e acetamida na seleção. Esta cepa MAB01 com PEP1/tsp1double, deleção foi designado com o número M252. A remoção do desintegrador do cassete pyr4 PEP1 sítio foi realizada essencialmente conforme descrito no Exemplo 3 para M195 (na geração cepa M219 com dele-



ção dupla de protease). Este pyr4 ~ cepa foi designado com o número M284 e usada como parental para subsequente deleção de protease.

[00388] A terceira deleção de protease para M284 foi obtido usando deleção slp1 construir pTTv128. Isto construto contém um cassete KEX2 superexpressão nativa direcionados para o locus slp1. A transformação foi levada a cabo essencialmente de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam a seleção pyr4. A cepa resultante é o que produz MAB01 tripla cepa protease deleção M304.

### ***Análise de que produz MAB01 Triplo Protease Cepa com deleção M304***

[00389] A deleção triplo protease anticorpo ( $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1 } \Delta\text{slp1}$  ) que produz MAB01 cepa M304 foi mostrado para produzir o anticorpo MAB01 com rendimentos de até 3,5 g/L de cultura (pH de 5,5; 28 → 22 °C, 60 g/L grão gasto, 30 g/L de glucose, 60 g/L de lactose + alimentação de lactose) e a qualidade do produto até 84% de IgG de comprimento total (vide Exemplo 6 abaixo). A atividade de protease da cepa foi também testada pelo crescimento da cepa de Trichoderma em meio mínimo suplementado com 60 g/l sólido de grão consumido, 30 g/l de glucose e 60 g/l de lactose em um pH de 5,5. A cultura foi crescida a 30 °C e, então, transferido para 22 °C durante a fase de produção. O cultivo fedbatch foi feito com uma alimentação de lactose. A atividade total de protease contra caseína nesta cepa foi determinada ser de cerca de 3,2 vezes menor comparado com a cepa de tipo selvagem M124 (Figura 20).

### ***Comparação entre individuais, duplos, triplos e de cepa com deleções***

[00390] A atividade de protease relativa de sobrenadantes de cultura a partir da deleção única protease ( $\Delta\text{pep1}$ ) cepa M181 (vide Exemplo 1), a eliminação dupla de protease ( $\Delta\text{pep1 } \Delta\text{tsp1}$  ) cepa M219 (vide

Exemplo 3) e à deleção de protease tripla ( $\Delta\text{pep1 } \Delta\text{tsp1 } \Delta\text{slp1}$ ) cepa M277 foram comparados. Essas cepas de deleção foram comparados com a linhagem selvagem M124. As três cepas de protease de eliminação foram cultivadas em frascos de agitação de 2 litros com 300 ml TrMM contendo 40g/l de lactose, 20 g/l de extrato de grão consumido e PIPPS a 100 mM em um pH de 5,5. As amostras foram tomadas nos dias 3, 5, 7 e 10. Dia 7 amostras de sobrenadante de cultura de M124, M181, M219, M277 e foram cada um diluídos 1:2 em tampão de citrato de sódio (50 mM, pH de 5,5) e 30  $\mu\text{l}$  foram carregados em um zimograma de gel de SDS PAGE 12% contendo MAB02. O gel de SDS PAGE foi realizada a 100 V durante 45 minutos. O gel foi, então, incubado em 2,5% de Triton X-100 durante uma hora, antes de ser lavado várias vezes com o tampão de reação (citrato de sódio a 50 mM, pH de 5,5). O gel de zimograma foi, então, deixada durante a noite agitação no tampão de reação. Na manhã seguinte o gel foi corado com reagente de coloração GelCode azul. Regiões onde o anticorpo MAB02 foi degradadas mostrou-se como manchas brancas na gel manchado azul.

[00391] Dois proteólise foi visto no controle M124 e M181 amostras  $\Delta\text{pep1}$  (Figura 27). O mais predominam atividade foi observada entre 65-90 kDa, o que corresponde a slp1. A atividade mais fraca foi visto cerca de 28 kDa, que corresponde a slp1. Como era de esperar, a cepa M219  $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1}$  não produziu uma banda zimograma aos 28 kD. Da mesma forma, a cepa M277  $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1 } \Delta\text{slp1}$  não produziu ou atividade zimograma. O tamanho ativa de slp1 parece ser variável, uma vez que ainda estava ativo quando foi cortado até 65 kD, embora o seu tamanho adulto é de 90 kD. A variação do tamanho pode ser visto na Figura 27.

[00392] A atividade total protease contra caseína succinilado de culturas sobrenadante do M181, M219, M277 e cepas de eliminação

também foi medida a partir de dia 3, dia 5 e no dia 7 amostras. Os sobrenadantes foram primeiro diluídas a 2 mg/ml de proteína total em citrato de sódio a 50 mM, pH de 5,5, antes de serem ensaiadas. 50 µl do sobrenadante diluído foi carregado para uma placa de 96 cavidades e 50 µl de caseína succinilada foi adicionado para iniciar a reação. Um controle de fundo com tampão, em vez de caseína, foi usado para cada amostra. Após a adição de caseína a reação da protease foi deixada prosseguir durante 1 hora a 37 °C. Para desenvolver a reação de 50 µl de reagente TNBSA foi adicionado a cada cavidade e a placa foi incubada durante 16 horas a 37 °C. A absorvância a 450 nm foi medida para o conjunto do prato. O sinal de fundo não específica é subtraído a partir de medição de atividade de protease específica. Conforme mostrado na Figura 28, as amostras de sobrenadante a partir de três cepas de protease de deleção continha menos do que a atividade de protease M124 cepa selvagem.

[00393] O sobrenadante das culturas de M277 e M124 (dias 5 e 7), foi diluída para 6 mg/ml em tampão citrato de sódio a 50 mM. Para estes sobrenadantes diluídos anticorpo MAB01 foi enriquecida para uma concentração final de 0,05 µg/ul. Estas reações foram incubadas a 37 °C durante a noite. As reações foram amostrados no tempo zero, 1 hora e durante a incubação durante a noite. As amostras de 20 µl foram carregados em um gel de SDS PAGE a 4-15% e correr a 200 volts durante 40 minutos. O gel foi transferido a 100 volts durante 1 hora para nitrocelulose para imunoblot. A membrana foi bloqueada com 5% de leite em TBST durante uma hora. A cadeia pesada de MAB01 foi detectada com um anti-cadeia pesada de anticorpo AP-conjugado (Sigma #A3188) diluída 1:30000 em TBST. Depois de lavar a membrana com TBST, a blot foi desenvolvida com o substrato de AP (Promega). Comparando as amostras incubadas durante a noite era claramente evidente que a cadeia pesada mais degradada no sobrena-

dante da cepa M124. O M124 não contém exclusões protease. Com 3 eliminações de protease, a cepa M277 produzido MAB01 cadeia pesada que foi significativamente estável. No dia 5, foi 2,5 vezes mais de cadeia pesada no sobrenadante M277 após incubação durante a noite. Com o sobrenadante dia 7, houve 4-fold cadeia mais pesada visíveis (Figura 41).

### ***Quadruple Strain Deleção M307***

[00394] A cepa M307 com uma deleção quadruple  $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1$  foi gerado e usado para novas rodadas de eliminações protease.

### ***Geração de quadruple protease deleção cepa M307***

[00395] Para gerar um quádruplo deleção protease cepa sem marcador, a remoção do cassete de desintegrador de *pyr4* foi aplicada a cepa M277, essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção de the *pyr4* cassete desintegrador da única cepa de protease deleção M195 ( $\Delta pep1$ ). Três etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas. Os clones finais foram verificados para remoção do cassete de desintegrador por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.2, com métodos normais de laboratório. Não há sinais específicos foram observados com iniciadores de reconhecimento com a peça removida do *pyr4*. A remoção foi novamente verificado por plaqueamento de clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. O clone usado para gerar o quádruplo cepa protease deleção foi designado com número de cepa M306 ( $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1$ , *pyr4* ~).

[00396] O plasmídeo com deleção pTTv1 17 para o quarto gene de protease, *gap1* protease glutâmica (TreID69555) é descrita no Exemplo 2 (Tabela 2.1). Esta deleção resulta em um plasmídeo pb deleção

1,037 no locus gap1 e abrange a sequência de codificação completa de Gap1.

[00397] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv1 17 ( $\Delta$ gap1-pyr4) foi digerido com PmeI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção de gap1 foi usada para transformar M306 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1, pyr4 ~) acima. Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo L Para obter as cepas M181 e M195 que usam a seleção pyr4.

[00398] 150 clones foram escolhidos como primeiras listras. 48 destas listras foram rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.2 quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. Oito putativos entidades com ruptura protease quádruplos ( $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1) foram purificadas em clones com uma única célula. Deleção de gap1 foi verificada por análises do sul dos oito clones (Figura 29a). As análises de Southern foram realizadas conforme descrito no Exemplo 1. Análises de Southern também verificou-se que três dos clones eram integrantes individuais (Figuras 29B e 29C). Os outros cinco clones foram mostrados para realizar cópias adicionais em outro lugar no genoma e foram descartados. O clone usado na remoção do cassete de pyr4 desintegrador (e para gerar a protease deleção quádruplo cepa M369 abaixo) foi designado com o número de cepa M307 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1).

**Tabela 4.2: Iniciadores para remoção de triagem ofpyri cassete Blaster e para rastreio integração gap1 e pureza de cepa.**

**Para remoção de triagem de cassete desintegrador de pyr4 do M277**

Sequence Primer

T079\_slp1\_scrn\_5forw

GCAGACAAACAGAGCAACGA

(SEQ ID NO: 349)

T026\_Pyr4\_orf\_5rev2 CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 350)

T080\_slp1\_scrn\_3rev TAGAGGGTGTCTGATGGAAGC (SEQ ID NO: 351)

T028\_Pyr4\_flanqueamento\_rev CATCCTCAAGGCCTCA-GAC (SEQ ID NO: 352)

**Para a integração de triagem de pTTv117**

Sequence Primer

T052\_gap1\_5rastreo\_F CTCAGAAAGGTTGTAGTTGTGA (SEQ ID NO: 353)

T026\_Pyr4\_orf\_5rev2 CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 354)

T053\_gap1\_3rastreo\_R GATGTTGTGTTTTTCAGTCTGCA (SEQ ID NO: 355)

T028\_Pyr4\_flanqueamento\_rev CATCCTCAAGGCCTCA-GAC (SEQ ID NO: 356)

**Para rastrear a deleção de gap/ORF**

T109\_gap1\_ORF\_F ATGTTTCATCGCTGGCGTCG (SEQ ID NO: 357)

T110\_gap1\_ORF\_R CTAAACGTAAGAGCAGGTCAA (SEQ ID NO: 358)

***Geração ofque produz MAB01 quadruple cepa protease deleção M371***

[00399] Para gerar quádruplo protease cepa com deleção com a produção de anticorpos MAB01, remoção do, pyr4 cassete desintegrador do locus slp1 da cepa M304 foi realizado essencialmente conforme descrito no Exemplo 3 para M195 (na geração cepa M219 com deleção dupla de protease). Este pyr4 ~ cepa foi designado com o número M317 e usada como parental para subsequente deleção de protease.

[00400] A quarta eliminação protease para M317 foi obtida usando gap1 deleção construir pTTv1 17. A transformação foi levada a cabo essencialmente de acordo com o protocolo descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam a seleção pyr4. A cepa resultante é o quádruplo que produz MAB01 cepa protease deleção M371.

***Análise de quadruple cepa protease deleção***

[00401] A atividade de protease total de sobrenadante de cultura da deleção cepa quadruple M307 foi, então, medida e comparada com sobrenadante de cultura da deleção cepa tripla M277 eo M124 linhagem selvagem. Cada cepa foi cultivada em 2 frascos agitados litros com 300 ml TrMM contendo 40 g/l de lactose, 20 g/l gasto extrato de grãos e PIPPS a 100 mM pH de 5,5. Dia 7 amostras de sobrenadante foram tomadas para o ensaio total de protease. As concentrações de proteína total dos sobrenadantes foram medidas usando o ensaio BCA com imunoglobulina bovina como padrão. Os sobrenadantes foram diluídos em série 1:2 em tampão de citrato de sódio em um pH de 5,5. Os sobrenadantes diluídos foram adicionados à marcado por fluorescência substrato de caseína e incubados a 37 °C. A fluorescência foi medida após 1 hora a 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. Os resultados mostraram que a taxa de atividade de protease da deleção cepa tripla M277 foi 3 vezes menor do que a linhagem selvagem M124 ea deleção cepa quadruple M307 era 8 vezes menor do que a linhagem selvagem M124 (Figura 30).

[00402] Além disso, a Figura 20 resume a atividade total da protease contra caseína do M188 única cepa de eliminação, o M219 cepa dupla eliminação, o M277 tripla cepa, eliminação, eo M307 quadruple deleção cepa em relação ao tipo selvagem M124 cepa. Thepep1 único deleção reduziu a atividade de protease por 1,7 vezes, o PEP1/tsp1 dupla deleção reduziu a atividade de protease por 2 vezes, o PEP1/tsp1/tsp1 eliminação tripla reduziu a atividade de protease de

3,2 vezes e os PEP1/tsp1/tsp1/gap1 deleção quadruple reduziu a atividade de protease de 7,8 vezes comparado com o tipo selvagem M124 cepa (Figura 20).

[00403] O anticorpo que produz MAB01 cepa M371 contém uma deleção quadruple  $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1$ . A cepa foi cultivada no fermentador e comparada com a eliminação MAB01 triplo cepa produtora sob as mesmas condições. O cultivo descontínuo foi realizada com a cepa M371 que produziu MAB01 e foi com PEP1, slp1, slp1 e deleções da protease kex2 gap1 e superexpressão. A cepa foi cultivada em meio mínimo para Trichoderma, suplementado com 40 g/l sólido de grão consumido, 40 g/l de glucose e 40 g/l de lactose em um pH de 5,5. A cultura foi crescida a 30 °C e, então, transferido para 22 °C durante a fase de produção. O cultivo descontínuo foi realizada com a cepa M304 que produziu MAB01 e foi com PEP1, slp1 e deleções da protease kex2 slp1 e superexpressão. A cepa foi cultivada em meio mínimo para Trichoderma, suplementado com 40 g/l sólido de grão consumido, 40 g/l de glucose e 40 g/l de lactose em um pH de 5,5. A cultura foi crescida a 30 °C e, então, transferido para 22 °C durante a fase de produção.

[00404] O rendimento de anticorpo de comprimento total calculado foi de 20% mais elevada na cepa gap1 eliminação a partir da amostra do dia 6. Sob as mesmas condições, a cepa de deleção quádruplo produziu 1,9 g/L (897 mg/L de anticorpo de comprimento total) e o triplo deleções cepa produziu 1,3 g/L (731 mg/L de anticorpo de comprimento total). A partir dos sobrenadantes de fermentador, a atividade total de protease contra caseína foi medido. As amostras de sobrenadante foram diluídas em tampão de citrato de sódio, pH de 5,5, de modo que a concentração de proteína total foi de 0,15 mg/mL para todas as amostras. Para este sobrenadante diluída 10 µg/ml de caseína BODIPY foi adicionado para iniciar o ensaio de protease. As amostras



de cada dia de cultivo foram comparados entre as duas cepas diferentes. Os resultados mostram que não foi até 30% menos do total de atividade de protease na cepa gap1 deleção no dia 5 (figura 31). No dia 6, a atividade de protease foi de 20% mais baixa, o que se correlaciona com o aumento de 20% no rendimento de anticorpo em que dia.

### ***Quíntuplo Strain Deleção***

[00405] A cepa M369 com uma deleção quintuplicar  $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1 \Delta gap2$  foi gerado e usado para novas rodadas de eliminações protease.

### ***Geração de quintuplicar protease deleção cepa M369***

[00406] Para gerar um quíntuplo deleção protease cepa sem marcador, a remoção do cassete de pyr4 desintegrador foi aplicada a cepa M307, essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção de pyr4 cassete desintegrador da única cepa protease deleção M195 ( $\Delta pep1$ ). Três etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas. Os clones finais foram verificados para remoção do cassete de desintegrador por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.3, com métodos normais de laboratório. Não há sinais específicos foram observados com iniciadores de recozimento com a peça removida do cassete pyr4 Blaster. A remoção foi novamente verificado por plaqueamento de clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. O clone usado para gerar o quíntuplo protease cepa com deleção foi designado com número de cepa M321 ( $\Delta pep1 \Delta tsp1$  como IPL  $\Delta gap1$ , pyr4 ~).

[00407] O plasmídeo com deleção pTTv145 para o quinto gene da protease, gap2 protease glutâmica (TreID106661) é descrita no Exemplo 2 (Tabela 2.3). Esta deleção de plasmídeo resulta em uma deleção 944 pb no locus gap2 e abrange a sequência de codificação completa

de GAP2.

[00408] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv145 (LOOPOUT  $\Delta$ gap2-pyr4) foi digerido com PmeI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete gap2 deleção foi usada para transformar M321 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1, pyr4 ~) acima. Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam a seleção pyr4.

[00409] 100 clones foram escolhidos como primeiras listras. Todas as 20 faixas de crescimento foram testados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.3 quanto à integração correta usando métodos de laboratório convencionais. 10 entidades com ruptura protease quintuplo putativos ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1  $\Delta$ gap2) foram purificadas em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR. Apenas um clone purificado foi negativo para a ORF gap2. A deleção gap2 foi verificada por análises Sul do clone (Figura 32A). As análises de Southern foram realizadas conforme descrito no Exemplo 1. Southern também as análises indicaram o clone apresenta uma cópia adicional do cassete de deleção em outro lugar no genoma ou tem alguns rearranjos internos em que o locus (Figuras 32B e 32C). Uma vez que este foi o único quintuplicar clone protease deleção obtido foi selecionado para uso posterior (Figuras 32D e 32E). O clone 14 foi o clone usado para remoção do cassete de pyr4 desintegrador e para gerar a protease de 6 vezes cepas de deleção M396 e M400 abaixo (Figura 32E). Este clone foi designado com número de cepa M369 ( $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2).

**Tabela 4.3: Iniciadores para remoção de triagem ofpyri cassete Blaster e para rastreio integração gap2 e pureza de cepa.**

**Para remoção de triagem de cassete desintegrador de pyr4 do**

**M307**

Sequence Primer

T052\_gap1\_5rastreo\_F CTCAGAAAGGTTGTAGTTGTGA  
(SEQ ID NO: 359)

T026\_Pyr4\_orf\_5rev2 CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ  
ID NO: 360)

T053\_gap1\_3rastreo\_R GATGTTGTGTTTTTCAGTCTGCA  
(SEQ ID NO: 361)

T028\_Pyr4\_flanqueamento\_rev CATCCTCAAGGCCTCA-  
GAC (SEQ ID NO: 362)

**Para a integração de triagem de pTTv145**

Sequence Primer

T048\_gap2\_5rastreo\_F GCTTGGCATCACGGAAGCT  
(SEQ ID NO: 363)

T026\_Pyr4\_orf\_5rev2 CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ  
ID NO: 364)

T049\_gap2\_3 rastreo\_R TTGACAAGAAAGGTCCGGTTG  
(SEQ ID NO: 365)

T028\_Pyr4\_flanqueamento\_rev CATCCTCAAGGCCTCA-  
GAC (SEQ ID NO: 366)

**Para rastreo deleção oigap2 ORF**

T107\_gap2\_ORF\_F ATGGATGCTATCCGAGCCAG (SEQ  
ID NO: 367)

T108\_gap2\_ORF\_R CTATTCATACTCAACAGTCACA  
(SEQ ID NO: 368)

***Análise de quintuplicar cepa protease deleção***

[00410] A atividade de protease da cepa M369 foi medida contra a cepa parental M307. A deleção protease gap2 resultou em 23% menos atividade protease contra caseína (Figura 33).

***6-Fold Strain Deleção***

[00411] A 6 vezes protease deleção cepa ter eliminações

[00412]  $\Delta\text{pep1 } \Delta\text{tsp1 } \Delta\text{slp1 } \Delta\text{gap1 } \Delta\text{gap2}\Delta\text{pep4}$  foi gerado e usado para novas rodadas de protease

[00413] exclusões.

### ***Plasmídeos de pep4 Geração de eliminação***

[00414] O plasmídeo com deleção pTTv181 para o sexto gene da protease, pep4 protease aspártica (TreID77579) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv71 em  $\Delta\text{pep1}$ . Exemplo 1. 959 pb da região de flanqueamento 5' e 992 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados na base da, plasmídeo pep4 deleção. Como forpep1, o primeiro plasmídeo de eliminação pep4 (pTTv43, Tabela 4.4) realizou um outro marcador de seleção, bar, que foi substituído com o cassete pyr4 Blaster. O cassete foi obtida a partir de desintegrador pTTv71 através de digestão com NotI, ligado com NotI cortado pTTv43, e, então, transformado em E. coli usando métodos padrão. Algumas transformantes foram cultivados, o DNA de plasmídeo isolado e digerido para rastreio de ligação correta e orientação do cassete desintegrador de pyr4 usando métodos de laboratório convencionais. Um clone com o tamanho da inserção correta e orientação foi sequenciado e armazenado (pTTv73, Tabela 4.4). O cassete Blaster foi mudado um pouco mais uma vez: o fragmento de repetição direta usada na remoção ofpyr4 foi alterada de 308 pb ofpyr4 5'UTR de 300 pb repetição direta a partir do final de pep4 região de flanqueamento 5' (como em pTTv145, gap2-pyr4). Isto foi feito através da remoção do cassete existente desintegrador de pyr4 de pTTv73 digestão com NotI. O gene pyr4 foi amplificado por PCR usando pTTv73 como um modelo, usando os iniciadores na Tabela 4.4. Para o sistema de recombinação homóloga de levedura usado na clonagem, as sequências que se sobrepõem para o vetor foram colocadas para os iniciadores de PCR adequados. Para permitir interruptor marcador no constru-

to, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do marcador de seleção e pyr4 para clonagem adicional os passos de um sítio AscI foi introduzido entre a repetição pep4 direta das regiões de flaqueamento 5' e 3'. Este tipo de cassete desintegrador não deve deixar qualquer sequência adicional para o locus do gene deletado após a excisão. Os 300 pb pep4 5'diret repetição foi amplificado por PCR usando o T. reesei QM6a cepa selvagem como molde. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Alguns dos clones obtidos a partir da recombinação foram cultivadas e o DNA de plasmídeo foi isolado e digerido para rastreo de recombinação correta usando métodos padrão. Estes plasmídeos com deleção para pep4 (pTTv43, pTTv73 e pTTv181, Tabela 4.4) resultam em uma deleção pb 1413 em thepep4 locus e cobrir a sequência de codificação completa de PEP4.

**Tabela 4.4: Iniciadores para plasmídeos deleção generatingpep4. Plasmídeo com deleção pTTv43 para pep4 (TreID77579), vetor backbone pRS426**

Sequence Primer  
T298\_77579\_5f  
GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGTTTAACTCAGGTC  
AACCACCGAGGAC (SEQ ID NO: 369)  
T299\_77579\_5r\_pt  
CCCGTCACCGAGATCTGATCCGTCACCGGGATCCACTTAAGCGG  
CCGCTGAATGGGATGGTTTCGATTG (SEQ ID NO: 370)  
T300\_77579\_3f\_pt  
GCCAAGCCCCAAAAGTGCTCCTTCAATATCATCTTCTGTGCGGG  
CCGCAGGTAGACGCTTTGCGAGTG (SEQ ID NO: 371)  
T301\_77579\_3r GCGGATAACAATTTACACAGGAAA-

CAGCGTTTAACTGAACT GACGCGGACTGA (SEQ ID NO: 372)

**Plasmídeo com deleção pTTv73 para pep4 (TreID77579),  
pTTv43 vetor backbone**

Sequence Primer

há novos iniciadores, pTTv43 digerido com Not I e ligado com fragmento pyr4-LOOPOUT de pTTv71

**Plasmídeo com deleção pTTv181 para pep4  
(TreID77579), pTTv73 vetor backbone**

Sequence Primer

T209\_pyr4\_f\_recpep4\_5f

AAGTTCCCTTCCTCTGGCAGCAATCGAACCATCCCATTTCAGCGG  
CCGCCTAGCATCGACTACTGCTGC (SEQ ID NO: 373)

T210\_pyr4\_r CATGCAAAGATACACATCAA (SEQ ID NO:  
374)

T21

I\_pep4\_loop\_f\_recpyr4

TGATTGTACCCCAGCTGCGATTGATGTGTATCTTTGCATGGCGG  
CCGCTCAATGTTGACTGCCCCAGG (SEQ ID NO: 375)

T212\_pep4\_loop\_r\_recpep4\_3

f

GCACTTCTTAGATACACACACACTCGCAAAGCGTCTACCTGGCG  
CGCCTGAATGGGATGGTTCGATTG (SEQ ID NO: 376)

***Geração de 6-fold cepas protease deleção M396 e M400***

[00415] Para gerar uma protease de 6 vezes cepa com deleção sem marcador, a remoção do marcador pyr4 foi aplicada a cepa M369, essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção ofpyr4 cassette desintegrador da cepa M195 ( $\Delta$ pep1). Três etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas. Os clones finais foram verificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.5, com métodos normais de laboratório. Sinais correspondendo à remoção bem sucedida do cassette desintegrador foi obtida para to-

dos os clones. A remoção foi novamente verificado por plaqueamento de clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. Análises do sul de seis *pyr4* putativo clones ~ verificada a remoção do cassete Blaster para três clones. Além disso, as análises de Southern revelaram que estes três clones que perderam os sinais adicionais observados para os flancos *gap2* em pai M369. Portanto, estes clones deve ter a organização genômica esperado no locus *gap2*. O clone usado para gerar a 6 vezes protease cepa com deleção foi designado com o número de cepa M381 ( $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1}\Delta\text{slp1}\Delta\text{gap1}\Delta\text{gap2}$ , *pyr4* ~).

[00416] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv181 (LOOPOUT  $\Delta\text{pep4-pyr4}$ ) foi digerido com PmeI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando o QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5 µg do cassete *pep4* deleção foi usada para transformar M381 ( $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1}\Delta\text{slp1}\Delta\text{gap1}\Delta\text{gap2}$ , *pyr4* ~). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam a seleção *pyr4*.

[00417] Mais de 200 transformantes foram escolhidos como primeiras listras. 32 faixas de crescimento foram testados por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 4.5) quanto à integração correta. Sete clones deu os sinais esperados e foram purificados para os clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.5. Deleção de *pep4* foi verificada por meio de análises de Southern a partir de cinco clones (Figuras 34A e 34B), usando métodos de laboratório convencionais descritos no Exemplo 3 para M181 e M195. Analisa Sul também indicou que todos os transformantes (Figuras 34C e 34D) eram integrantes individuais. Para excluir que o sinal fraco visto na triagem da PCR para o *pep4* ORF em transformantes que se originam de gene PEP4, três clones

foram purificados através de passos mais unicelulares e reanalisados por hibridações do Sul e PCR. Sem sinal para pep4 ORF foi obtida a partir de qualquer análise indicando pureza de cepa. Clone 25-120A usado para remoção do, cassete desintegrador de pyr4 (e na geração de 7 vezes da protease cepa com deleção) foi designado com o número de cepa M396 e o clone repurificado 25-120A-um com o número de cepa M400.

**Tabela 4.5: Iniciadores para triagem remoção ofpyrf cassete desintegrador do M369 e para rastreio integração pep4 e pureza de cepa.**

**Para remoção de triagem de cassete desintegrador de pyr4 do M369**

Sequence Primer  
 T222\_ \_gap2\_5f\_f2 GGCAGGTCGCAGAGCAAGACA  
 (SEQ ID NO: 377)  
 T049\_ \_gap2\_3 rastreio\_R TTGACAAGAA-  
 AGGTCCGGTTG (SEQ ID NO: 378)

**Para a integração de triagem de pTTv181**

Sequence Primer  
 T302\_ \_77579\_5int GATTCATCACAGGGGCAGTC (SEQ  
 ID NO: 379)  
 T027\_ \_Pyr4\_orf\_start\_rev TGCGTCGCCGTCTCGCTCCT  
 (SEQ ID NO: 380)  
 T415\_ \_77579\_3 tela ACGCCGTTGCTGAGCCTTG (SEQ  
 ID NO: 381)  
 T061\_ \_pyr4\_orf\_rastreio\_2F TTAGGCGACCTCTTTTTC-  
 CA (SEQ ID NO: 382)

**Para rastreio de deleção pep4 ORF**

T416\_77579\_probeF GAGCCCATCATCAACACCTC (SEQ  
 ID NO: 383)  
 T417\_77579\_probeR TGCCAAGGTCGTAGACGGA (SEQ



ID NO: 384)

***A análise da atividade de proteases nos 4 -, 5 - e de 6 vezes de protease de cepa com deleções***

[00418] A protease deleção quadruple cepa M307, a protease deleção quintuplicar cepa M369 e os de 6 vezes de protease deleção transformantes de deformação foram cultivadas em culturas em frascos agitados. As amostras de sobrenadante retiradas de grandes culturas em frasco de agitação cresceram em TrMM com 20 g/L de grão consumido e 40 g/L de lactose tamponada com PIPPS a 100 mM em um pH de 4,8. O pH foi de -4,25 no dia 5. Os 6 transformantes protease eliminação testadas não foram a cepa final, por isso havia alguma variação devido à pureza dos esporos. Estes foram alguns dos melhores transformantes, mas purificação de esporos foi feito posteriormente. Os dias 5 sobrenadantes foram diluídos 1:3 em 50 mM de tampão de citrato de sódio pH 4,5. Para este sobrenadante diluído BODIPY FL caseína (10 µg/ml) e incubou-se em conjunto a 37 °C durante 4 horas. Para a atividade de protease do ensaio foi realizado conforme descrito no protocolo do fabricante (kit de protease enzCheck ensaio #E6638, Molecular Probes). Os resultados da atividade de protease pode ser visto na Figura 33.

[00419] Houve uma pequena redução na atividade de protease quando a protease deleção quintuplicar cepa M369 foi cultivado sob condições ácidas. A deleção gap2 na cepa proporcionou uma redução de 23% na atividade de protease contra caseína. Na protease deleção de 6 vezes cepas do pep4 protease aspártico foi eliminado nos 5 transformantes estudados. A aprimor transformante mostrou uma redução de 35% em relação a cepa parental M369.

***Geração de 7-Fold Strain Deleção***

[00420] O 7 vezes protease deleção cepa ter eliminações

[00421]  $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1} \Delta\text{slp1} \Delta\text{gap1} \Delta\text{gap2}\Delta\text{pep4}\Delta\text{pep3}$  foi gerado e

usado para novas rodadas de protease exclusões.

### ***Plasmídeos de pep3 Geração de eliminação***

[00422] O primeiro plasmídeo de deleção pTTv188 para o sétimo gene da protease, pep3 protease aspártica (TreID121133) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo  $\Delta$ pep1 pTTv41 no Exemplo 1. 1.215 pb da região de flanqueamento 5' de 1082 pb e de região de flanqueamento 3' foram selecionados como a base do, pep3 plasmídeo com deleção. Como para gap2 (pTTv145) and pep4 (pTTv181) plasmídeos com deleção acima, neste plasmídeo o fragmento de repetição direta é uma excepa de 300 pb a partir da extremidade de pep3 região de flanqueamento 5'. Os fragmentos foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.6. Como para pTTv181 ( $\Delta$ pep4-pyr4) acima, para permitir alterar marcador no construto, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do marcador de seleção e pyr4 para clonagem adicional os passos de um sítio Ascl foi introduzido entre o e repita pep3 5'diret 3'flanqueamento. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Molde usado em PCR das regiões de flanqueamento o de T. reesei foi a cepa QM6a de tipo selvagem. O gene marcador pyr4 foi obtido a partir de digestão com pTTv181 NotI. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1.

[00423] O segundo plasmídeo eliminação para o protease pep3 aspártico (TreID121133), pTTv192, foi construído usando o plasmídeo pTTv188 acima como esqueleto. Esse segundo plasmídeo transporta um KEX2 nativa (TreID123156) cassete superexpressão e usa gene acetamidase (amdS) a partir de Aspergillus nidulans como marcador

de seleção. O cassete Blaster pyr4 foi removido pTTv188 com NotI-AscI dupla digestão. Os fragmentos de promotor de cDNA1 (modelo: pTHN3 plasmídeo DNA), kex2 nativa (modelo: DNA genômico QM6a T. reesei), trpC terminator (modelo: pHH02 plasmídeo DNA) e marcador AMDS (modelo: pHHOI plasmídeo DNA) foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.6. Como para pTTv188 acima, para permitir alterar marcador no construto, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do marcador de seleção amdS. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1.

[00424] O terceiro plasmídeo com deleção de o proteasepep3 aspártico (TreID121133), pTTv205, foi construído usando o plasmídeo pTTv192 acima como esqueleto. O marcador amdS foi removido pTTv192 digestão com NotI. Fragmentos de uma novo cassete de pyr4 desintegrador (situado após o cassete de superexpressão de KEX2) foram produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.6. NestO cassete desintegrador, a repetição direta é um trecho de 300 pb a partir do início da, pep3 3 'que flanqueiam a região e o sítioi-zado antes do gene pyr4. Como para pTTv192 acima, para permitir alterar marcador no construto, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete desintegrador de pyr4. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1.

[00425] Estes plasmídeos com deleção para pep3 (pTTv188,

pTTv192 e pTTv205, Tabela 4.6) resultam em uma deleção pb 2590 no locus pep3 e cobrir a sequência de codificação completa de pep3.

**Tabela 4.6: Iniciadores para plasmídeos deleção geração pep3.**

**Plasmídeo com deleção pTTv188 para pep3 (TreID121133), vetor backbone pRS426**

Sequence Primer

T346\_pep3\_5f\_for GGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGT-CACGACGGTTTAAACGTCGA GCCCCCTGGACACCT (SEQ ID NO: 385)

T347\_pep3\_5f\_rev GCGCTGGCAACGAGAGCAGAG-CAGCAGTAGTCGATGCTAGGCG GCCGCCATCGCCGTCGCGGACATGA (SEQ ID NO: 386)

T348\_pep3\_loop\_for TGATTGTACCCCAGCTGCGATTGATGTGTATCTTTGCATGGCGGCCGCTCGACGTTGTATCTGCACTC (SEQ ID NO: 387)

T349\_pep3\_loop\_rev GTACGTTCTGATTGCCAACTACG-GACCAGACCAGGGCTCCGGC GCGCCCATCGCCGTCGCGGACATGA (SEQ ID NO: 388)

T350\_pep3\_3f\_for GGAGCCCTGGTCTGGTCCGT (SEQ ID NO: 389)

T351\_pep3\_3f\_rev AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGTTTAAACACGCGCTTCAACATGCCCA (SEQ ID NO: 390)

**Plasmídeo com deleção pTTv192 para pep3 (TreID121133), vetor backbone pTTv188**

Sequence Primer

T389\_cDNApromoter\_ k \_pep3flan GCTGGCCGCTGGGA-ATAGCGTCATGTCCGCGACGGCGATGGAA

TTCGGTCTGAAGGACGT (SEQ ID NO: 391)

T138\_cDNA1\_Rev GTTGAGAGAAGTTGTTGGATTG (SEQ ID NO: 392)

T139\_123561For\_cDNA1

AACCAAAGACTTTTTGATCAATCCAACAACCTTCTCTCAACATGA  
AGATTTTCCTCGATCCTTG (SEQ ID NO: 393)

123561Rev TCAGCGCCGTAACCTCTGC (SEQ ID NO:  
394)

trpCtermFor\_123561 TGATGGTGATGAGGCGGAAAAG-  
CAGAGGTTACGGCGCTGAGGA

TCCACTTAACGTTACTGA (SEQ ID NO: 395)

T3 90\_trpCtermR\_AmdS  
TCTCTCAAAGGAAGAATCCCTTCAGGGTTGCGTTTCCAGTGCGG  
CCGCTCTCCTTCTAGAAAGAAGGATTA (SEQ ID NO: 396)

T391\_AmdS\_endR ACTGGAAACGCAACCCTGAA (SEQ  
ID NO: 397)

T3 90\_trpCtermR\_AmdS TCTGATTGCCAACTACGGAC-  
CAGACCAGGGCTCCGGCGCGGCG GCCGCTAGATCTACG (SEQ  
ID NO: 398)

**Plasmídeo com deleção pTTv205 para pep3  
(TreID121133), vetor backbone pTTv192**

Sequence Primer

T428\_pep3\_3flanqueamentoDR\_F-trpCterm  
GTACACTTGTTTAGAGGTAATCCTTCTTTCTAGAAGGAGAGCGG  
CCGCGGAGCCCTGGTCTGGTCC (SEQ ID NO: 399)

T429\_pep3\_3flanqueamentoDR\_R-pyr4 GCGCTGGCA-  
ACGAGAGCAGAGCAGCAGTAGTCGATGCTAGAAG CT-  
GACGGGCGTCAACG (SEQ ID NO: 400)

T094\_pyr4\_F TAGCATCGACTACTGCTGC (SEQ ID NO:  
401)

T430\_pyr4\_R-pep3\_3flanqueamento GTACGTTCT-  
GATTGCCAACTACGGACCAGACCAGGGCTCCGCG GCCGC-  
CATGCAAAGATACACATCAATC (SEQ ID NO: 402)

***Geração de 7-dobragem cepas de deleção de protease***

[00426] Para gerar uma protease de 7 vezes cepa com deleção sem marcador, a remoção do marcador pyr4 foi aplicado para a deleção de 6 vezes cepa M396, essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção de, pyr4 cassette desintegrador da cepa M195 ( $\Delta$ pep1). Quatro etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas.

[00427] Os clones finais foram verificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.7, com métodos normais de laboratório. Sinais correspondendo à remoção bem sucedida do cassette desintegrador foi obtido. A remoção do cassette desintegrador foi adicionalmente verificada colocando-se os clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. As análises de Southern de clones de quatro pyr4 putativo ~ verificou-se a remoção do cassette de desintegrador para todos os clones (Figura 34E). O clone (25-120A-62) usados para produzir a 7-vezes protease cepa com deleção foi designado com o número de cepa M402 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1  $\Delta$ gap2 $\Delta$ pep4, pyr4 ~).

[00428] Dois transformações paralelas foram realizadas; uma com a deleção de construir pTTv188 (standardpep3 deleção) e o outro com pTTv205 (KEX2 superexpressão incluídos). Para remover sequência vetor, plasmídeos pTTv188 e pTTv205 foram digeridos com PmeI eo fragmentos corretos purificados a partir de gel de agarose usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

[00429] Aproximadamente 5  $\mu$ g de cassette ou deleção foi usada para transformar M402 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1  $\Delta$ gap2 $\Delta$ pep4, pyr4 ~). Preparo de protoplastos e transformação foram realizada essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195

usando pyr4 seleção.

[00430] Os transformantes foram escolhidos como primeiras listras. Listras em crescimento foram testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 4.7) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.7.

[00431] A deleção de pep3 foi verificada por meio de análises de Southern de clones selecionados usando os métodos descritos no Exemplo 1. Clones escolhidos foram usadas para remoção do cassete de pyr4 desintegrador e na geração de cepas de deleção de protease 8 vezes (Figura 34E).

**Tabela 4.7: Iniciadores para triagem remoção ofpyrf cassete desintegrador do M396 e para rastreio integração pep3 e pureza de cepa.**

**Para remoção de triagem de cassete desintegrador de pyr4 do M396**

Sequence Primer

T302\_\_77579\_5int GATTCATCACAGGGGCGAGTC (SEQ ID NO: 403)

T214\_\_pep4\_3f\_seq\_rl CCGCTCTCAAAGTGCCCAA (SEQ ID NO: 404)

**Para a integração de triagem de pTTv188**

Sequence Primer

T625\_\_pep3\_5int\_new ACGTGAAGTTGCCCATCAA (SEQ ID NO: 405)

T026\_\_Pyr4\_orf\_5rev2 CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 406)

T626\_\_pep3\_3int\_new GACCAATGGCTTCACGAAGT (SEQ ID NO: 407)

T061\_\_pyr4\_orf\_rastreio\_2F TTAGGCGACCTCTTTTCCA (SEQ ID

NO: 408)

### **Para a integração de triagem de pTTv205**

Sequence Primer

T625\_ \_pep3\_5int\_new ACGTGAAGTTGCCCATCAA (SEQ ID NO: 409)

T140\_ \_cDNA lpromoter\_seqRI TAACTTGTACGCTCTCAGTTTCGAG (SEQ ID NO: 410)

T626\_ \_pep3\_3int\_new GACCAATGGCTTCACGAAGT (SEQ ID NO: 411)

T061 \_pyr4\_orf\_rastreio\_

2F TTAGGCGACCTCTTTTCCA (SEQ ID NO: 412)

### **Para rastreio de deleção pep3 ORF**

Sequence Primer

T352\_ \_pep3\_orf\_for CAGCAGCACCGCATCCACCA (SEQ ID NO: 413)

T353\_pep3\_orf\_rev GCCGAATCGCTGGTTGCCCT (SEQ ID NO: 414)

T753\_pep3\_orf\_for2 ATGGAAGCCATCCTCCAGG (SEQ ID NO: 415)

T754\_pep3\_orf\_rev2 TGGATCATGTTGGCGACG (SEQ ID NO: 416)

T855\_pep3\_orf\_f3 GTAAGACGCCCCGTCTC (SEQ ID NO: 417)

### ***Geração de 8-Fold Strain Deleção***

A cepa com deleção de protease 8 vezes ter eliminações  $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1  $\Delta$ gap2 $\Delta$ pep4 $\Delta$ pep3 $\Delta$ pep5 é gerado.

### ***De pep5 Geração plasmídeo com deleção***

[00432] O primeiro plasmídeo de deleção do gene da protease do oitavo, pep5 protease aspártica (TreID81004) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo  $\Delta$ pep1 pTTv41 no Exemplo 1, mas um segundo cassete de marcador de seleção adicional {bar, Exemplo 1) foi colocado a seguir ao gene pyr4 criar um plasmídeo com deleção com um cassete desintegrador com marcador de se-



leção duplo. O sistema de marcador duplo permite a) o uso, por exemplo, de bar (ou hph, um cassete de resistência à higromicina) como marcador de resistência inicial e seleção mais rápida; b) transformação ofpyr4 + cepas (sem a necessidade de gerar pyr4 ~ antes da transformação); e c) a remoção de ambos os marcadores dos transformantes usando ácido 5-fluoro-orótico (conforme na remoção do cassete desintegrador pyr4 padrão) e mutagênese simultânea do pyr4 endógeno, resultando em sem marcador, pyr4 ~ cepa.

[00433] O segundo plasmídeo com deleção de protease pep5 aspártico (TreID81004), pTTv229, foi construído usando o plasmídeo pTTv202 acima como esqueleto. O marcador duplo pyr4-bar foi removido pTTv202 através de digestão com NotI. O gene marcador pyr4 foi obtido a partir de 81 pTTv1 digestão com NotI. A clonagem do plasmídeo pTTv229 foi feita com ligação padrão usando DNA ligase T4, em temperatura ambiente. Parte da mistura de ligação foi transformada em E. coli com eletroporação. Alguns clones foram cultivados, o DNA de plasmídeo foi isolado e digerido para rastreio de ligação correta usando métodos de laboratório convencionais. Ligação correta e orientação do marcador foram ainda verificadas por meio de sequenciamento. Estes plasmídeos com deleção para pep5 (pTTv202 e pTTv229, Tabela 4.8) resultam em uma deleção pb 1687 no locus pep5 e cobrir a sequência de codificação completa de Pep5.

[00434] 1348 pb de região de flanqueamento 5' e de 1164 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados na base da, plasmídeo pep5 deleção. Um trecho de 300 pb a partir da extremidade de pep5 5'flanqueamento foi usado como fragmento de repetição direta. Estes fragmentos, bem como a segundo cassete de marcador de seleção, a barra (Exemplo 1), foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.8. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados

do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Para permitir remoção do cassete completo marcador duplo, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete de marcador de duas vezes e um sítio de AsiSI entre os dois marcadores de seleção. Um sítio AscI foi introduzido entre a repetição pep5 direta das regiões de flanqueamento 5' e 3'. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O marcador de seleção pyr4 foi obtido a partir de pTTv181 ( $\Delta$ pep4-pir acima) através de digestão com NotI. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de pep5 (pTTv202, Tabela 4.8) resulta em uma deleção 1687 pb no locus pep5 e abrange a sequência de codificação completa de Pep5.

**Tabela 4.8: Iniciadores para generating pep5 plasmídeo com deleção.**

**Plasmídeo com deleção pTTv202 para pep5 (TreID81004), vetor backbone pRS426**

Sequence Primer

T372\_pep5\_5f\_for GGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC-  
GACGGTTTAAACGGAGG CTGCGACACCGTCTG (SEQ ID NO: 418)

T373\_pep5\_5f\_rev GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAG-  
TAGTCGATGCTAGGCG GCCGCCCGGCCTGAAACGACCTCCC  
(SEQ ID NO: 419)

T376\_pep5\_5DR\_for  
CCCGTCACCGAGATCTGATCCGTCACCGGGATCCACTTAAGCGG  
CCGCGAGAGAGAAACAAAACAGTG (SEQ ID NO: 420)

T377\_pep5\_5DR\_rev  
ACATTCCGACCGTTTACTGATCCAAGCCGTGCAACCGACTGGCG  
CGCCCCGGCCTGAAACGACCTCCC (SEQ ID NO: 421)

T378\_pep5\_3f\_for AGTCGGTTGCACGGCTTGGA (SEQ ID NO: 422)

T379\_pep5\_3f\_rev AGCGGATAACAATTTACACAGGAAA-  
CAGCGTTTAAACGAGAC GGACGCCTGCACCAC (SEQ ID NO: 423)

T3 74\_bar\_recpyr4\_for2

TGATTGTACCCCAGCTGCGATTGATGTGTATCTTTGCATGGCGA  
TCGCGACAGAAGATGATATTGAAG (SEQ ID NO: 424)

T375\_bar\_rev TTAAGTGGATCCCGGTGACG (SEQ ID NO: 425)

**Plasmídeo com deleção pTTv229 para pep5 (TreID81004), vetor backbone pTTv202**

Sequence Primer

há novos iniciadores, pTTv202 digerido com NotI e ligado com fragmento pyr4 de pTTv181

***Geração de cepa com deleção de protease 8 vezes***

[00435] Para gerar uma protease de 8 vezes cepa com deleção sem marcador, a remoção do marcador pyr4 foi aplicada para a eliminação cepa M486 7 vezes (34-14A-um, pTTv205 em M402) essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção do, pyr4 cassette desintegrador da cepa M195 ( $\Delta$ pep1).

**Quatro consecutivo**

[00436] Etapas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas.

[00437] Os clones finais foram verificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.9, com métodos normais de laboratório. Sinais correspondendo à remoção bem sucedida do cassette desintegrador foram obtidos para a maioria dos clones. A remoção do cassette desintegrador foi adicionalmente verificada colocando-se os clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. Análises do sul da pyr4 putativo ~ clones verificou a remoção do cassette Blaster.

[00438] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo foi digeri-

do com pTTv229 PmeI + XbaI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qia-gen). Aproximadamente 5 µg do cassete de deleção foram usados para transformar um clone de cepa com deleção de protease 8 vezes ( $\Delta\text{pep1 } \Delta\text{tsp1 } \Delta\text{slp1 } \Delta\text{gap1 } \Delta\text{gap2} \Delta\text{pep4} \Delta\text{pep3, pyr4 } \sim$ ). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 MI e 95 que usam a seleção pyr4.

[00439] Os transformantes foram escolhidos como primeiras listras. Listras que crescem são testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 4.9) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados são purificadas em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 4.9. Deleção de pep5 é verificada por meio de análises de Southern de clones selecionados usando os métodos descritos no Exemplo 1.

**Tabela 4.9: Iniciadores para remoção de triagem ofpyri cassete desintegrador de cepa de 7 vezes e para rastreio integração pep5 e pureza de cepa.**

**Para remoção de triagem de cassete desintegrador de pyr4 do M486 e pureza de cepa**

Sequence Primer

T047\_trpC\_term\_end\_F CCTATGAGTCGTTTACCCAGA (SEQ ID NO: 426)

T854\_pep3\_3f\_r2 TGGCCGAGTCTATGCGTA (SEQ ID NO: 427)

T488\_pyr4\_5utr\_rev GGAGTTGCTTTAATGTCGGG (SEQ ID NO: 428)

A 61 \_pyr4\_orf\_rastreio\_2F TTAGGCGACCTCTTTTCCA (SEQ ID NO: 429)

T855\_pep3\_orf\_f3 GTAAGACGCCCCGTCTC (SEQ ID NO: 430)

T754\_pep3\_orf\_rev2 TGGATCATGTTGGCGACG (SEQ ID NO: 431)

**Para a integração de triagem de pTTv229**

Sequence Primer

T627\_pep5\_5int\_new GTCGAAGATGTCCTCGAGAT (SEQ ID NO: 432)

T488\_pyr4\_5utr\_rev GGAGTTGCTTTAATGTCGGG (SEQ ID NO: 433)

A 61 \_pyr4\_orf\_rastreio\_2F TTAGGCGACCTCTTTTCCA (SEQ ID NO: 434)

T628\_pep5\_3int\_new TAGTCCATGCCGAACTGC (SEQ ID NO: 435)

**Para rastreio de deleção pep5 ORF**

Sequence Primer

T418\_pep5\_orf\_for CCGGACCTGCACCGCAAGTT (SEQ ID NO: 436)

T419\_pep5\_orf\_rev AGGGCAATGTCGCCAGCAC (SEQ ID NO: 437)

T859\_pep5\_orf\_f2 GACCTGCACCGCAAGTT (SEQ ID NO: 438)

T860\_pep5\_orf\_f3 GTCGAGCGTCTGATATTCAC (SEQ ID NO: 439)

T861\_pep5\_orf\_r2 GACGGAGACCTCCCACA (SEQ ID NO: 440)

**Exemplo 5 - Melhora da produção de anticorpos com inibidores de protease**

[00440] Este exemplo demonstra a capacidade dos inibidores de protease para aumentar a produção de anticorpos de comprimento total em *Trichoderma reesei* cepas de produção.

[00441] Com base no conhecimento de que a cadeia pesada é clivada por proteases tripsina e chymotryptic, os inibidores destas duas classes de enzimas foram testadas contra a degradação do anticorpo, tanto in vitro e em experiências de cultura, usando um anticorpo de *T. reesei* produzindo cepa. O inibidor de tripsina de inibidores de soja (SBTI) e quimostatina foram testadas, uma vez que tenham sido previamente demonstrado em experiências in vitro, para estabilizar as cadeias pesadas de anticorpo.

***No tratamento inibidor in vitro***

[00442] Quimostatina e SBTI foram analisados in vitro com o so-

brenadante de cultura. Sobrenadante a partir de um lote de cultura fermentador alimentado foi diluído a 6 mg/ml com tampão de citrato de sódio pH de 5,5 (pH de 5,5; de 28 °C, 20 g/L de extrato de grão consumido, 60 g/L de lactose). O cultivo fedbatch foi realizada com o tipo selvagem *T. reesei* cepa M44, que não contém a expressão da proteína heteróloga. A cepa foi cultivada em meio mínimo para *Trichoderma* suplementado com extrato de grãos de 20 g/l gasto e 60 g/l de lactose em um pH de 5,5 e 28 °C.

[00443] Para este sobrenadante de 0,05 µg/ul diluída de rituximab, 100 µM de quimostatina, 1 mg/ml de SBTI ou uma combinação de ambos os inibidores foram adicionados de um volume total de 50 µl e amostradas às 0, 1 e 19 horas a avaliar a degradação precoce e tardia da cadeia pesada do anticorpo rituximab. Os produtos resultantes da cadeia pesada foram analisados por imunoblot usando e anti-cadeia pesada de anticorpo AP-conjugado (Sigma #A3188) diluída 1:30000 em TBST (Figura 35). Os produtos de degradação iniciais gerados a partir da cadeia pesada foram de aproximadamente 42 kDa e 38 kDa, as quais eram vistas na pista de controle não tratado por 1 hora (Figura 35). Fragmentos adicionais foram geradas após 19 horas, os dois principais produtos permaneceu. Tratamento quimostatina inibiu a produção inicial do fragmento 42 kDa, enquanto que o tratamento de SBTI inibiu o fragmento de 38 kD de formação (Figura 35). A combinação dos dois compostos inibiram a cerca de 96% da degradação inicial da cadeia pesada e cerca de 75% da degradação após 19 horas (Figura 35). Estes resultados demonstram que os dois inibidores foram capazes de estabilizar eficazmente a cadeia pesada do anticorpo rituximab.

#### ***Tratamento de T. reesei com culturas Inibidores***

[00444] A eficácia dos inibidores foi também testada com o anticorpo rituximab cepa produtora, o qual contém uma sequência de ligação e a deleção VALEKR PEP1. Esta cepa foi cultivada em triplicado, em

frascos pequenos, tanto em presença ou ausência de quimostatina, SBTI ou pepstatina A. Os pequenos frascos de agitação continham 50 ml de TrMM mais de lactose (40 g/l), de extrato de grãos consumidos (20 g/l) e tampão com PIPPS a 100 mM em um pH de 5,5. O inibidor de SBTI foi adicionado à cultura em concentrações finais de 100, quer  $\mu\text{g/ml}$  ou 500  $\mu\text{g/ml}$ . Quimostatina foi usado a 100  $\mu\text{M}$ , e pepstatina A foi usado a 10  $\mu\text{M}$ . Cada um dos três inibidores de foi adicionado às culturas diariamente no dia 2, 3, 4 e 5.

[00445] O crescimento das culturas foi seguido por pH diariamente a partir do dia 2 até ao dia 7. Para as culturas cultivadas com SBTI não houve diferenças significativas no pH das culturas comparado com os controles não tratados. No PIPPS tamponada culturas, a diminuição do pH a partir de um pH inicial de 5,5 até um pH de 4,8, após o dia 6. Com quimostatina e pepstatina A, as culturas foram monitorizados até ao dia 7. No dia 7, o pH médio para os frascos de controle era 4,6, enquanto que o pH médio de quimostatina culturas tratadas foi de 4,9 e o pH médio de pepstatina A culturas tratadas foi de 5,0. Assim, para as culturas tratadas com a quimostatina e pepstatina A, houve uma pequena redução no crescimento.

[00446] Amostras de sobrenadante de cultura (30  $\mu\text{l}$ ) também foram coletados nos dias 3, 4 e 5 para análise da produção de anticorpos. A análise foi realizada por imunomanchas, usando anti-IgG conjugado de anticorpo de cadeia pesada de AP (Sigma #A3188) e uma cadeia leve de anticorpo anti-conjugado de AP (Sigma #A3812). Cada anticorpo foi diluído a 1:30000 em TBST. A cadeia pesada rituximab comprimento total é de cerca de 51 kD, a cadeia leve rituximab fusão CHBI é de cerca de 100 kD e da cadeia leve rituximab livre é de cerca de 28 kD.

[00447] Os resultados da análise de imunoblot de amostras de sobrenadante de cultura tratados com SBTI são mostrados na Figura 36.

Em todos os dias da amostra foi de cadeia pesada de comprimento rituximab mais completo e mais de 38 kD produto de degradação presentes no SBTI tratadas culturas do que em culturas não tratadas. No dia 5 rituximab produção da cadeia pesada foi várias vezes superior no SBTI culturas tratadas do que nas culturas não tratadas (Fig, 36A). Assim, o uso de SBTI teve um efeito positivo sobre a melhora da produção de rituximab cadeia pesada. Houve também uma pequena melhora na produção global da cadeia de luz rituximab, em particular com a transportadora obrigado cadeia leve (Figura 36B).

[00448] Os resultados da análise de imunoblot de amostras de sobrenadante de cultura tratados com quimostatina e pepstatina A são mostrados na Figura 37. Quimostatina culturas tratadas apresentaram resultados similares aos observados com SBTI (Figura 37). A cadeia pesada rituximab foi estabilizada no dia 5 (Figura 37B). Quando comparado com as culturas de controle não tratadas, aumentou a quimostatina quantidade de cadeia pesada rituximab comprimento total produzido, embora o principal produto de degradação em 38 kD ainda foi visto.

[00449] No geral, parece que o tratamento SBTI foi mais eficaz em promover a produção de proteína mais elevado do que o tratamento quimostatina. Entretanto, o tratamento quimostatina produziu uma cadeia pesada rituximab comprimento total superior a proporção de fragmento. Como pode ser visto na Figura 37B, a terceira amostra de quimostatina cultura mostrou aproximadamente 90% da cadeia pesada de comprimento total de rituximab comparado com 10% de fragmento de cadeia pesada. Assim, a combinação de SBTI e tratamento quimostatina seria muito benéfica para atingir maiores rendimentos de produção de anticorpos.

#### **Exemplo 6 - Produção de anticorpos de *T. reesei***

[00450] Este exemplo quantifica a quantidade de anticorpos produ-



zidos nas cepas de deleção de protease T. reesei descritos acima nos Exemplos 1-4.

### ***Anticorpo purificação***

[00451] Os sobrenadantes de cultura de cada uma das cepas de deleção de protease T. reesei listados na Tabela 6.1 foram filtrados através de 0,45 µm filtro de seringa e ajustado à composição do tampão de ligação pela adição de 1/50 de volume de fosfato de sódio 1 M, pH 7, antes da purificação. A coluna de afinidade foi ligada a um purificador AKTA e a purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Foram usadas as seguintes condições de cromatografia: taxa de fluxo, 1 ml/min; detecção a 280 nm; septo de injeção, 5 µl; tampão A, fosfato de sódio 20 mM, pH 7; tampão B, 0,1 M glicina-HCl, pH 2,7. Run isocrática com tampão A foi conduzido até o início da eluição, que foi realizado com 5 µl de tampão B. A coluna foi equilibrada com pelo menos 5 µl de tampão A antes de cada análise. 1 µl de sobrenadante de cultura foi injetada para funcionamentos quantitativos. Frações de 0,5 µl foram coletadas em tubos contendo 40 µl de Tris 0,5 M, pH 9, durante o passo de eluição. O anticorpo foi eluído acentuadamente em duas frações, que foram reunidas em uma amostra de 1 µl. A partir das amostras com as maiores áreas de pico entre cada série de amostras (fermentação), uma corrida com 5-10 µl de volume de injeção foi realizada para obter amostra mais concentrada para análise de filtração em gel.

[00452] Para a quantificação, uma série de diluições padrão foi preparada de anticorpo e executar em 1 µl de volume de coluna de Proteína G HiTrap similar para as amostras analisadas. A curva padrão (10-500 µg) foi estabelecido das áreas dos picos medidos a 280 nm e usado para a quantificação da MAB01 ou rituximab anticorpos isolados a partir dos sobrenadantes de cultura. A qualidade das amostras purificadas foi verificada por SDS PAGE.

### ***Gel Filtração Perfis de Prot G amostras purificadas***

[00453] A 250 \ x \ de amostra de cada MAB01 purificada e anti-corpo rituximab foi administrado em solução salina tamponada com Tris (Tris 25 mM, NaCl 140 mM e KC1 3 mM, pH 7,4) em uma coluna Superdex 200 10/300 GL gel coluna de filtração (Amersham Biosciences), ligada a um sistema AKTA purificador de HPLC. A taxa de fluxo foi de 0,75 ml/min e a absorvância foi medida a 280 nm. Frações (0,75 ml) foram coletadas durante todo o prazo. As frações que mostraram apenas um pico foram concentrados e caracterizado em um gel de SDS PAGE padrão (Figura 38). A percentagem de cada pico eluído foi calculada dividindo a área do pico com a área total da amostra medida a 280 nm.

[00454] O processo de purificação de anticorpos está mostrada na Figura 38.

### ***Anticorpo Quantificação***

[00455] As quantidades de anticorpos produzidos pelas cepas de deleção de protease T. reesei são resumidos na Tabela 6.1.

**Tabela 6.1: Síntese da quantidade e da qualidade dos anticorpos produzidos por culturas do fermentador em bruto a partir de sobrenadante de cepas de T. reesei descritos nos Exemplos.**

Proteína heteróloga	quantidade	Aprotease	Cultura total de
mAb	(mg/L)	A quantidade total de mAb	comprimento total (mg/L)

Notas/Condições

Frasco MAB02	nenhum	agitar	3	n/a
Frasco	nenhum	trepidação	Rituximab	9 n/a
Rituximab	nenhum	fermentação	21	n/a cepa M187; pH de 5,5;
	28 °C;	9 g/l		
	casaminoácidos;	20 g/L		
	extrato de grãos	consumidos,	60	

g/L de lactose

Proteína heteróloga quantidade A protease Cultura total de mAb

(mg/L) A quantidade total de mAb comprimento total (mg/L)

Notas/Condições

Frasco nenhum trepidação Rituximab 3 n/a cepa M189

MAB01 PEP1 fermentação 160 3 pH 4,8; 28 °C; 9 g/l casaminoácidos; 20 g/L extrato de grãos consumidos, 60 g/L de lactose

Fermentação Rituximab PEP1 152

237 66 n/em um pH de 5,2; 22 °C; 9 g/l casaminoácidos; 20 g/L

extrato de grãos consumidos, 60 g/L de lactose e pH de 5,2; 30 → 22 °C; 40 g/L gasto

cereais, 60 g/L de glucose

PEP1 MAB01, slp1 fermentação 67 n/em um pH de 5,2; 22 °C; 9 g/l

casaminoácidos; 20 g/L

extrato de grãos consumidos, 60 g/L de lactose

MAB01 PEP1 fermentação 205 n/a cepa M244; pH de 5,5; 28 → 22 °C; 9 g/l casaminoácidos; 20 g/L de extrato de grãos consumidos, 60 g/L de lactose +

Quimostatina + SBTI;

Transportador livre LC.

MAB01 PEP1 slp1 fermentação 261 <130 cepa M247; pH de 5,5;

22 °C; 9 g/l

casaminoácidos; 20 g/L

extrato de grãos consumidos, 60

g/L de lactose

MAB01 PEP1 slp2 fermentação 202 221 60 67 cepa M292;

pH de 5,5;

30 → 22 °C; 20 g/L gasto

extrato de grãos, 60 g/L

lactose ou de pH de 5,5; 30 -

22 °C; 40 g/L gasto

cereais, 30 g/L de glucose

MAB01 PEP1 slp3 fermentação 93 n/a cepa M295; pH de

5,5;

22 °C; 9 g/L

casaminoácidos; 20 g/L

extrato de grãos consumidos, 60

g/L de lactose

MAB01 PEP1 gap1 fermentação 107 n/em um pH de 5, 5,

22 °C; 9g/L casaminoácidos; 20 g/L de extrato de grãos consumidos,

60

Proteína heteróloga quantidade A protease Cultura total de  
mAb

(mg/L) A quantidade total de mAb comprimento total (mg/L)

Notas/Condições

g/L de lactose

MAB01 PEP1 slp1 fermentação 136 19 cepa M298; pH de

5,5;

28 → 22 °C; 9 g/L

casaminoácidos; 20 g/L

extrato de grãos consumidos, 60

g/L de lactose

MAB01 PEP1 slp1 fermentação 94 n/a cepa M299; pH de 5,5;

22 °C; 9 g/L

casaminoácidos; 20 g/L

extrato de grãos consumidos, 60

g/L de lactose

MAB01 PEP1 slp1 slp1 fermentação 2159 3500 1200

1344 1471

2500

822

731 cepa M304; pH de 5,5;

30 → 22 °C; 40 g/L gasto

cereais, 40 g/L de glicose,

40 g/L de lactose ou de pH

5,5; 28 → 22 °C; 60 g/L

grão gasto, 30 g/L

glucose, 60 g/L de lactose

+ Alimentação lactose ou pH

5,5; 30 → 22 °C; 50 g/L

grão gasto, 30 g/L

glucose ou de pH de 5,5; 30 -

22 °C; 40 g/L gasto

cereais, 40 g/L de glicose,

40 g/L de lactose

MAB01 PEP1 slp1 slp1 gap1 fermentação 1965 897 cepa M371, pH de 5,5;

30 → 22 °C; 40 g/L gasto

cereais, 40 g/L de glicose,

40 g/L de lactose

[00456] Em Tabela 6.1, a quantidade total de anticorpo (mAb) é a

quantidade de proteína que foi purificada a partir do sobrenadante da cultura. Depois da purificação da proteína, o anticorpo foi administrado em cromatografia de deleção de tamanho para medir a quantidade de anticorpo de comprimento total montado. Este montante foi, então, dito como "Full mAb".

[00457] Conforme demonstrado na Tabela 6.1, a cepa M304 deleção triplo ( $\Delta\text{pep1 } \Delta\text{tsp1 } \Delta\text{slp1}$ ) obteve um rendimento de anticorpo de 3500 mg/L de IgG total, com 2500 mg/L estar corretamente montado em pleno comprimento anticorpo MAB01. Isto corresponde a 71% do anticorpo de comprimento total. A melhora na porcentagem de anticorpos de comprimento total foi resultado da eliminação slp1. Em contraste com a cepa M304, M247 a eliminação dupla cepa ( $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1}$ ) obteve um rendimento de 43% da produção de anticorpo de comprimento total (pH de 5,5, 22 °C; 9 g/l casaminoácidos, 20 g /L de extrato de grão consumido, 60 g/L de lactose). Assim, pode ser visto diretamente que a adição da deleção  $\Delta\text{slp1}$  aumenta a qualidade do produto de forma significativa (25%).

***Melhora da qualidade de anticorpos em M507 MAB01 cepa de produção***

[00458] Duas cepas de produção MAB01 foram produzidos, M304 em um fundo de deleção 3 protease e M507 em um fundo 7 protease deleção. A cepa M304 foi construído com cassetes separadas para a cadeia pesada e leve (Figura 49). A cadeia pesada foi integrado o locus cbh1 e da cadeia leve para o locus EGLL. A cepa M507 foi realizada através da integração de um cassete contendo o conjunto da cadeia dentro do locus de CBHI pesada e leve (Figura 49). MAB01 conjunto vetor orienta as cadeias pesadas e leves em direcções opostas. A cadeia leve usa sítio de clivagem da NVISKR e a cadeia pesada usa o sítio de clivagem DGETVVKR. A cepa M304 tem 3 proteases PEP1, slp1 e slp1 excluídos. O M507 tem 7 proteases PEP1, slp1, slp1, gap1,

gap2, pep4, pep3 excluído. Ambas as cepas de sobre-expressar a protease kex2.

[00459] O MAB01 bidirecional conjunto vetor pTTv223 foi transformado para a protease deleção sete vezes cepa M486 com superexpressão kex2 usando transformação de protoplastos padrão. Os transformantes foram selecionados em placas de acetamida-triton e primeiras listras foram rastreadas por PCR para a 5' e 3' de integração do marcador amdS para o locus de cbh1. Transformantes duplos positivos foram purificados através de cultivos de esporos individuais e ações de esporos foram gerados em placas DP suplementadas com ampicilina.

[00460] As cepas M304 e M507 foram cultivadas em fermentadores com 30 g/l de glucose, 60 g/l de grão consumido, 60 g/l de lactose com alimentação de lactose a 28 °C e transferido para 22 °C no final da cultura. A cepa M507 foi cultivado em um pH de 5,2 (cultivo bio00541b) e pH de 5,5 (cultivo bio00543b). A cepa M304 foi cultivado em um pH de 5,5 (cultivo bio00503b). A fermentação M304 amostra bio00477b foi incluído como um controle no imunoblot bio00503b. O cultivo bio00477b foi feito com a mesma condições que as descritas para bio00503b médio.

[00461] A cepa M507 foi cultivada em ambos pH de 5,2 e pH de 5,5 para estudar o efeito do pH sobre a produção de anticorpos. As amostras do sobrenadante da fermentação de pH de 5,2 foram analisadas por Western blot e mostrado na Figura 50A e amostras de 5,5 a fermentação o pH, mostrados na Figura 50B. O anticorpo produzido parecia bastante similar em ambos os cultivos M507. Havia um pouco mais de cadeia leve no pH 5.2 condições. Em ambas as culturas foram fragmentos de cadeia pesada. A cepa M304 foi cultivado em um pH de 5,5 e os resultados podem ser vistos na Figura 51. A quantidade de cadeia pesada de comprimento total produzida cai após o dia 7 na ce-

pa M304. A quantidade de cadeia pesada vai para baixo após o dia 9 na cepa M507. A outra diferença entre as cepas é a quantidade de cadeia leve produzida. M304 produziu significativamente mais.

[00462] As concentrações de imunoglobulina purificada em proteína G das três pistas de fermentação pode ser vista na Tabela 6.2. A maior concentração total de anticorpos para a cepa M304 foi de 3,1 g/l no dia 9. As maiores concentrações para a cepa M507 foram no dia 10, 3,0 g/l em um pH de 5,2 e 2,8 g/l em um pH de 5,5. Após cromatografia por exclusão de tamanho, a quantidade de anticorpo de comprimento total foi calculada para cada amostra (Tabela 6.3). A maior quantidade de anticorpo de comprimento total foi de 2,0 g/l para ambas as fermentações de M507 no dia 8 (pH de 5,2) e dia 9 (pH de 5,5). M304 produziu um nível similar de 2,0 g/l de anticorpos de comprimento total no dia 8.

**Tabela 6.2: Concentração total de anticorpo determinada após purificação em proteína G a partir de amostras de cultura**

Ab total	M304	M507	M507
	bio00503b	bio00541b	bio00543b
	pH de 5,5	pH de 5,2	pH de 5,5
Dia	mg/L	mg/L	mg/L
5	2300	1200	1164
6	2800	1427	1454
7	3000	2211	2116
8	3000	2745	2455
9	3100	2721	2709
10	2100	2995	2808
11		2702	2164

[00463] A diferença entre as cepas M304 e M507 se torna evidente quando se considera a percentagem de anticorpo de comprimento total produzido durante o curso de tempo das culturas. A percentagem



de anticorpos de comprimento total foi maior com a cepa M507 comparado com a cepa M304. A cepa M507 cultivada em um pH de 5,5 produziu o anticorpo de maior qualidade, até 78%, sendo de comprimento total no dia 7. Em M304 foi de 68% no dia 6 mas, então, a qualidade do produto diminui comparado com M507. O produto de M507 foi 73% de comprimento total até o dia 9.

**Tabela 6.3: Concentração de anticorpo de comprimento total foi calculada após cromatografia por exclusão de tamanho**

Ab de comprimento total	M304	M507	M507
	bio00503b	bio00541b	bio00543b
	pH de 5,5	pH de 5,2	pH de 5,5
Dia	mg/L	mg/L	mg/L
6	1900	1062	1074
7	2000	1557	1645
8	2000	1998	1859
9	1700	1924	1988
10	900	1871	1806

**Tabela 6.4: Percentagem de anticorpo de comprimento total produzido durante o curso de tempo das culturas**

% comprimento total	M304	M507	M507
	bio00503b	bio00541b	bio00543b
	pH de 5,5	pH de 5,2	pH de 5,5
Dia	%	%	%
6	68	74	74
7	67	70	78
8	60	73	76
9	56	71	73
10	44	62	64

***Medições de atividade de protease***

[00464] A atividade de protease no sobrenadante foi comparada

entre as cepas M304 e M507 crescidas sob as mesmas condições. As culturas Triab62 e Triab67 foram crescidas em um pH de 5,5, em 30 g/l de glicose, 60 g/l de lactose, 20 g/l de grão integral consumido, 20 g/l de extrato de grão consumido com alimentação de lactose a 28 °C e trocadas para 22 °C ao final da cultura.

[00465] As concentrações de proteína foram determinadas a partir de todas as amostras de sobrenadante dos dias 2-7. Todos os sobrenadantes foram diluídos em tampão de citrato de sódio, pH de 5,5, de modo que todas as amostras tinham uma concentração total de proteína de 0,625 mg/ml. 100 µl de todos os sobrenadantes diluídos foram adicionados a uma placa preta com 96 cavidades usando três cavidades repetidas por amostra. 100 µl de estoque de caseína FL diluído (10 µg/ml) feito em tampão de citrato de sódio, pH de 5,5, foram adicionados a cada cavidade contendo sobrenadante. As placas foram incubadas cobertas com um saco de plástico a 37 °C. A fluorescência das cavidades foi medida após 2, 3 e 4 horas. As leituras foram feitas no leitor de placas fluorescente Varioskan usando excitação a 485 nm e emissão a 530 nm.

[00466] A atividade de protease no sobrenadante da cepa M507 com deleção de protease 7 vezes foi 2 a 2,5 vezes mais baixa do que M304 (deleção de protease 3 vezes), vide Tabela 6.5. As proteases ácidas deletadas (gap1, gap2, pep4, pep3) contribuem para este aprimoramento. A atividade de protease em geral da cepa com deleção 7 vezes é visivelmente inferior com o substrato de caseína. Estes dados se correlacionam geralmente com os resultados observados com anticorpo de comprimento total. Menor atividade protease leva a anticorpos de maior qualidade.

**Tabela 6.5: Atividade de protease em sobrenadante de fermentação de culturas em pH de 5,5. Caseína foi usada como substrato para as medições**

	M304	M507
	Triab62	Triab67
Dia	pH de 5,5	pH de 5,5
1	1,4	1,3
2	8,5	1,8
3	67,4	4,1
4	98,8	38,8
5	102,3	48,3
6	83,3	54,6
7	103,1	54,5
8	109,8	55,3
9	120,9	61,1
10	134,9	70,0
11	148,0	76,2

**Exemplo 7 - PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS QUE NÃO SÃO ANTI-CORPOS**

[00467] A estabilidade de protease de proteínas modelo IGF1, hGH e IFNa2b foi analisada colocando-as em sobrenadante da cepa M400 com deleção de protease 6 vezes ( $\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1}\Delta\text{slp1}\Delta\text{gap1}\Delta\text{gap2}\Delta\text{pep4}$ ). O sobrenadante foi coletado de um grande frasco de cultura em agitação CAH15. O sobrenadante não diluído do frasco de cultura em agitação CAH15 foi incubado com as proteínas modelo purificadas com e sem os inibidores pepstatina A (50  $\mu\text{M}$ ) e SBTI (0,2 mg/ml) durante 20 horas a 37 °C. O sobrenadante de cultura de 5 dias estava em um pH de cerca de 4,2. A reação contendo 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína modelo foi coletada após 20 horas. Citrato de sódio a 50 mM, pH de 4,0, enriquecido com proteínas modelo (0,05

µg/µl) foi usado como um controle de tampão.

[00468] De cada reação, 10 µl foram carregados em gel de SDS PAGE a 18% e passados durante 30 minutos a 200 V. As proteínas no gel foram transferidas para nitrocelulose para imunoblot. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada durante 1 hora em temperatura ambiente com 5% de leite em tampão de TBST. As blots individuais foram hibridizadas com o anticorpo primário específico para detectar a proteína modelo apropriada durante 1 hora em temperatura ambiente em um agitador. O anticorpo anti-IGF1 de camundongo (R&D Systems #mab291) foi usado a 2 µg/ml diluído em TBST. O anticorpo anti-rhGH de camundongo (Abeam #ab51232) foi usado a 2 µg/ml diluído em TBST. O anticorpo anti-IFNa2b de camundongo (Abeam #ab9386) foi usado a 1 µg/ml diluído em TBST. Após lavar as membranas de blot rapidamente com TBST, o anticorpo secundário foi adicionado durante 1 hora em temperatura ambiente com agitação. Um anticorpo secundário de cabra anti-camundongo AP-conjugado (Biorad #170-6520) foi diluído a 1:10000 em TBST.

[00469] Quando incubada durante a noite no sobrenadante, proteínas de comprimento total foram observadas para hGH, IFNa2b e IGF1, embora a maioria parecesse estar degradada (Figura 42). Houve um produto de degradação predominante de hormônio de crescimento humano e IFNa2b de cerca de 15 kD. No entanto, estas 3 proteínas modelo foram notavelmente estabilizadas após tratamento do sobrenadante com o inibidor de protease aspártica pepstatina A. Este inibidor bloqueou as principais proteases responsáveis pela maior parte da atividade de protease. SBTI conferiu apenas um pequeno benefício para a estabilidade do produto. Embora o valor ótimo de pH para SBTI fosse maior do que usado no experimento (pH de 4,2 versus pH ótimo de 8,0) e, assim, a ligação destes inibidores às proteases alvo pode não ser mais eficiente.

[00470] A pepstatina A inibe eficazmente as proteases aspárticas. Sabe-se, a partir de estudos de purificação por afinidade com pepstatina A, que as proteases aspárticas restantes no sobrenadante são pep2, pep3 e pep5. Portanto, se as duas ou três proteases aspárticas restantes forem deletadas do sobrenadante, ele estará praticamente livre de atividade de protease aspártica. Para produção destas proteínas modelo, as proteases aspárticas pep2, pep3 e pep5 seriam consideradas as principais proteases.

[00471] Este mesmo experimento foi feito com MAB01 para investigar sua estabilidade no sobrenadante com deleção de 6 proteases com e sem inibidores (Figura 43). As amostras foram coletadas conforme descrito acima e imunoblot realizado com um anticorpo anti-cadeia pesada AP-conjugado (Sigma #A3188). Após 20 horas de incubação, não houve degradação das cadeias pesadas significativamente. Não houve benefício óbvio pelo uso de inibidores. O anticorpo era estável neste sobrenadante em pH de 4,2. A produção de MAB01 sob condições mais ácidas, tal como um pH de 4,5 provavelmente melhoraria o rendimento de produção ou pelo menos reduziria a quantidade de clivagem de cadeia pesada que ocorreria.

[00472] Para avaliar quais inibidores estabilizariam melhor a produção de hGH, culturas em 24 cavidades destas cepas foram realizadas. A cepa M369 que produz hormônio de crescimento humano ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1 $\Delta$ slp1 $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2) foi cultivada juntamente com os componentes individuais ou com combinações dos seguintes: inibidor de tripsina e subtilisina SBTI, inibidor de protease ácida peptídeo SIP, inibidor de protease ácida peptídeo LIP, inibidor de protease aspártica peptídeo livre de pepstatina A, pepstatina A imobilizada em esferas de agarose, inibidor de tripsina e subtilisina BBI de feijão de lima, inibidor de subtilisina quimostatina e BSA. Três cavidades independentes foram escolhidas para cavidades de controle, onde nenhum inibidor ou

suplemento foram adicionados. Estas duas cepas foram cultivadas em 3 ml de TrMM com citrato de diamônio sem sulfato de amônio, PIPPS a 100 mM, 20 g/L de extrato de grãos consumidos, 40 g/L de lactose ajustado para um pH de 4,5. As placas com 24 cavidades foram agitadas a 800 rpm, 85% de umidade e 28 °C. As culturas foram crescidas durante 6 dias e cobertas com uma membrana permeável ao ar.

[00473] Os inibidores foram adicionados primeiro no dia 1 e, então, diariamente começando no dia 3. Amostras de 100 µl foram retiradas das cavidades de cultura, começando no dia 3. O micélio foi centrifugado durante 5 minutos a 13k e o sobrenadante coletado. Do sobrenadante de cultura, 12 µl foram carregados em um gel de SDS PAGE a 4-20% e imunoblot feito em nitrocelulose com o anticorpo anti-hGH de camundongo (2 µg/ml) e anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado diluído a 1:10000 em TBST.

[00474] No dia 4, hormônio do crescimento humano ainda pode ser visto no sobrenadante de cultura em todas as três lanes de controle (Figura 44). Duas das lanes de controle mostram uma banda fraca e uma lane de controle mostra uma banda clara. O efeito dos inibidores e suplementos foi imediatamente observado. Os inibidores/suplementos que tiveram um grande efeito estão destacados em vermelho e aqueles com o melhor efeito têm um asterisco. Pepstatina A teve um efeito negativo sobre a produção de hormônio de crescimento. Quando usada a 5 ou 20 µM, a produção de hGH parecia estar ausente. Ela parece ter algum efeito tóxico sobre a produção. Só quando a pepstatina foi imobilizada em esferas de agarose este efeito foi anulado. Um dos melhores tratamentos foi esferas de pepstatina A mais 0,2 mg/ml de SBTI (vide o terceiro asterisco na blot na Figura 44). Com apenas SBTI (0,2 mg/ml) não houve aprimoramento na produção, mas houve uma grande banda de degradação presente a 18 kD, a qual parece ser produzida pela ação de proteases aspárticas.

Conforme esperado, este produto de degradação foi reduzido pela adição de esferas de pepstatina A ou o peptídeo inibidor SIP. O peptídeo SIP foi benéfico mesmo quando usado sozinho a 20 ou 50  $\mu\text{M}$ . Houve um aumento notável na quantidade de hGH quando o peptídeo SIP foi usado, mas o maior aprimoramento ocorreu quando usado em combinação com SBTI ou BSA. Quando quimostatina a 5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  foi usada, ela também aprimorou a quantidade de produtos de comprimento total observados. Complementação da cultura com BSA (0,25%) apenas ajuda na produção, mas não impediu que um grande produto de degradação se formasse.

[00475] Estimando os níveis de expressão em relação à amostra de controle a 200 ng, as cavidades de controle produziram entre 3-6 mg/L de hGH, o tratamento com BSA (0,25%)/SIP (50  $\mu\text{M}$ )/SBTI (0,2 mg/ml) produziu 24,5 mg/L, o tratamento com SIP (50  $\mu\text{M}$ )/SBTI (0,2 mg/ml) produziu 26,6 mg/L e a adição de esferas de pepstatina A/SBTI (0,2 mg/ml) produziu 24,5 mg/L de hGH. Portanto, uso de uma combinação de inibidores e aditivos funcionou melhor para aumentar os níveis de produção em pelo menos quatro vezes. O parâmetro crítico foi incluir um inibidor de protease aspártica na mistura.

#### **Exemplo 8 - GERAÇÃO DE T. REESEI DEFICIENTE EM PEP7**

[00476] O plasmídeo com deleção de protease aspártica pep7 (TreID58669) é construído essencialmente conforme descrito por o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1. 1062 pb da região de flanqueamento 5' e 1121 pb da região de flanqueamento 3' são selecionados como a base do plasmídeo com deleção de pep7. Os fragmentos são produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 8.1. Os produtos são separados por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos são isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Modelo a ser usado em PCR das regiões de flanqueamento é da cepa

QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem. O cassete desintegrador de *pyr4* é obtido a partir de pTTv71 (Exemplo 1) através de digestão com NotI. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo é construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de *pep7* resulta em deleção no locus de *pep7* e abrange a sequência de codificação completa de PEP7.

**Tabela 8.1: Iniciadores para a geração de plasmídeos com deleção de *pep7***

**Plasmídeo com deleção de *slp7* (TreID58669), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
5flanqfw_pRS426	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC- ACGGTTTAAACCATAAACTTGCGCAGTC GAA (SEQ ID NO: 441)
5flanqrev_pyr4	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGT- GTCGATGCTAGGCGGCCGCTTCT AGGATGGAGCGCTTG (SEQ ID NO: 442)
3flanqfw_pyr4	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTC- CAGCCTCATCAGCCGCGGCCGCAGACGG CTTCTTCCAAAACA (SEQ ID NO: 443)
3flanqrev_pRS426	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA- AGCGTTTAAACCCCCAGGGAGGCTATTC TAC (SEQ ID NO: 444)

**Para rastreo de integração de cassete de deleção de *pep7***

Iniciador	Sequência
scrn_5forw	CTTTCCAAGCGTTTGAGTCC (SEQ ID NO: 445)
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 446)



scrn_3rev	GCGTGTTTTATCCTGGTGCT (SEQ ID NO: 447)
T028_Pyr4_flanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 448)
Para rastreio de deleção de ORF de pep7	
orf_fw	CACCTCCGTCGATGAGTTTT (SEQ ID NO: 449)
orf_rev	AGAAGAAGGTGGTGGTGGTG (SEQ ID NO: 450)

#### **Exemplo 9 - GERAÇÃO DE T. REESEI DEFICIENTE EM slp5**

[00477] O plasmídeo com deleção de protease aspártica slp5 (TreID64719) é construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1. 1044 pb da região de flanqueamento 5' e 1003 pb da região de flanqueamento 3' são selecionados como a base do plasmídeo com deleção de slp5. Os fragmentos são produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 9.1. Os produtos são separados por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos são isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Modelo a ser usado em PCR das regiões de flanqueamento é da cepa QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem. O cassete desintegrador de pyr4 é obtido a partir de pTTv71 (Exemplo 1) através de digestão com NotI. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo é construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de slp5 resulta em deleção no locus de slp5 e abrange a sequência de codificação completa de slp5.

**Tabela 9.1: Iniciadores para geração de plasmídeos com deleção de slp5**

**Plasmídeo com deleção de slp5 (TreID64719), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
5flanqfw_pRS426	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC- GTTTAAACGTTTGAGCATTCTCCCA AGC (SEQ ID NO: 451)
5flanqrev_pyr4	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGT- GTCGATGCTAGGCGGCCGCCGCCA TTTTGAAGAAGATGC (SEQ ID NO: 452)
3flanqfw_pyr4	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTCTCA- CCTCATCAGCCGCGGCCGCATGCTC CCTCGTCATTAAGC (SEQ ID NO: 453)
3flanqrev_pRS426	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA- AGCGTTTAAACACAACACCTTCTCCGAC ACC (SEQ ID NO: 454)
Para rastreo de integração de cassete de deleção de slp5	
Iniciador	Sequência
scrn_5forw	ATGCCCAAGTTTCGTACCTG (SEQ ID NO: 455)
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 456)
scrn_3rev	GGCGCATTCAGAAGAAGAAC (SEQ ID NO: 457)
T028_Pyr4_orf_anq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 458)
Para rastreo de deleção de ORF de slp5	
orf_fw	CACTTGATGAACGCTGGCTA (SEQ ID NO: 459)
orf_rev	CGTAATGGCGTTGTTGACAG (SEQ ID NO: 460)

**Exemplo 10 - GERAÇÃO DE T. REESEI DEFICIENTE EM slp6**

[00478] O plasmídeo com deleção de protease aspártica slp6

(TreID121495) é construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1. 1192 pb da região de flanqueamento 5' e 1114 pb da região de flanqueamento 3' são selecionados como a base do plasmídeo com deleção de slp6. Os fragmentos são produzidos por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 10.1. Os produtos são separados por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos são isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Modelo a ser usado em PCR das regiões de flanqueamento é da cepa QM6a de *T. reesei* de tipo selvagem. O cassete desintegrador de pyr4 é obtido a partir de pTTv71 (Exemplo 1) através de digestão com NotI. O esqueleto de vetor era pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo é construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de slp6 resulta na deleção no locus de slp6 e abrange a sequência de codificação completa de slp6.

**Tabela 10.1: Iniciadores para geração de plasmídeos com deleção de slp6**

**Plasmídeo com deleção de slp6 (TreID121495), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
5flanqfw_pRS426	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-GTTTAAACGAGGCAGCCAAAAAGT GAAG (SEQ ID NO: 461)
5flanqrev_pyr4	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGT-GTCGATGCTAGGCGGCCGCTGAAA GAAGGCAGGACCAGT (SEQ ID NO: 462)
3flanqfw_pyr4	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTCTCA-CCTCATCAGCCGCGGCCGCAAGAGG CTCGGACA-AAGACA (SEQ ID NO: 463)

3flanqrev_pR S426	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG- GTTTAAACGATCGTGGTGCACGAG ACTA (SEQ ID NO: 464)
For rastreio de integração de cassete de deleção de slp6	
Iniciador	Sequência
scrn_5forw	GCACTGCGTTGCCTTTCTAT (SEQ ID NO: 465)
T026_Pyr4_or f_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA (SEQ ID NO: 466)
scrn_3rev	GAAAGCATGGCTCGTTTCTC (SEQ ID NO: 467)
T028_Pyr4__f lanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 468)
Para rastreio de deleção de ORF de slp6	
orf_fw	ACCCGGCTCAACTAGCTACA (SEQ ID NO: 469)
orf_rev	AGCTGGCCTTTCGTTACAGA (SEQ ID NO: 470)

### **Exemplo 11 - GERAÇÃO DE T. REESEI DEFICIENTES EM slp7**

#### ***Geração de plasmídeo com deleção de slp7***

[00479] O plasmídeo pTTv269 com deleção de protease de serina slp7 (tre123865) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1, exceto que o marcador usado para seleção foi pyr4-hgh de pTTv194.

[00480] 949 pb da região de flanqueamento 5' e 1025 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo pTTv269 com deleção de slp7. Estes fragmentos foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 11.1. Modelo usado em PCR das regiões de flanqueamento foi a cepa QM6a de T. reesei de tipo selvagem. Os produtos foram separados por meio de eletrofo-

rese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O cassete de pyr4-hgh foi obtido a partir de pTTv194 ( $\Delta$ pep4-pyr4-hgh) através de digestão com NotI. Para permitir remoção do cassete de marcador, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com digerido EcoRV/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo pTTv269 foi construído com região de flanqueamento 3', região de flanqueamento 5', marcador pyr4-hgh e esqueleto de vetor usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de slp7 (pTTv269, Tabela 11.1) resulta em uma deleção de 2019 pb no locus de slp7 e abrange a sequência de codificação completa de slp7.

**Tabela 11.1: Iniciadores para geração de plasmídeos com deleção de slp7**

**Plasmídeo com deleção pTTv269 ( $\Delta$ slp7-pyr4-hgh), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T1088_slp7_5fl kfw_vector	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC- GTTTAAACTCCCATATGCCTCTTGAAGG
T1089_slp7_5fl krev_pyr4Prom	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGTAGTCG ATGCTAGGCGGCCGCTTTGCAGCAA- GATGTCGTTC (SEQ ID NO: 472)
T1090_slp7_3fl kfw_pyr4loop	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTCTCAGCCTCA TCAGCCGCGG CCGCTGGGTGATAAGCTTGGGTTT
T1091_slp7_3fl krev_vetor	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGTTTAA ACATCATGA TGACCCATCGACA

**Exemplo 12 - GERAÇÃO DE T. REESEI DEFICIENTE EM slp8**

***Geração de plasmídeo com deleção de slp8***

[00481] O plasmídeo pTTv330 com deleção de protease de tipo subtilisina slp8 (tre58698) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1, exceto que o marcador usado para seleção foi um marcador duplo pyr4-hph.

[00482] 975 pb da região de flanqueamento 5' e 1038 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo com deleção de slp8. Um trecho de 298 pb a partir da extremidade de flanqueamento 5' de slp8 foi usado como fragmento de repetição direta. Estes fragmentos foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 12.1. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O cassete de pyr4-hph foi obtido a partir de pTTv210 ( $\Delta$ sepl-pyr4-hph) através de digestão com NotI. Para permitir remoção do cassete completo marcador duplo, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete marcador duplo. Um sítio AscI foi introduzido entre a repetição direta das regiões de flanqueamento 5' e 3' de slp8. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de slp8 (pTTv330, Tabela 12.1) resulta em uma deleção de 1433 pb no locus de slp8 e cobre a sequência de codificação completa de slp8.

**Tabela 12.1: Iniciadores para geração de plasmídeo com deleção de slp8.**

**Plasmídeo com deleção pTTv330 ( $\Delta$ slp8-pyr4-hph), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T1203_slp8_5f _f	GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGT- CACGACG GTTTAAACATCGTGCTTGGGCTATTCTG
T1204_slp8_5f _r	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAGTAGTC- GATGCTAG GCGGCCGCGGAAAGACGCCAGAAAGAAA
T1205_slp8_5d r_f	GTACACTTGTTTAGAGGTAATCCTTCTTTCTAGA- AGGAGA GCGGCCGCGCTCGATGTGGATGATACT
T1206_slp8_5d r_r	ATCTATACTGTCTGCACCAAAGTACAACAACG- CAAA CCGGGCGCGCCGGAAAGACGCCAGAAAGAAA
T1207_slp8_3f _f	CGGTTTGCGTTGTTGTACTT
T1208_slp8_3f _r	TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGA- AACAGC GTTTAAACACAACCCAACGTTCTCTCGT

### **Exemplo 13 - PROTEASES HOMÓLOGAS**

[00483] Homólogos de pep1, pep2, pep3, pep4, pep5 e pep7; tsp1; tsp1, slp2, slp3, slp5, slp6, slp7 e slp8; gap1 e gap2 de *T. reesei*; e homólogos de tpp1 foram identificados a partir de outros organismos.

[00484] Pesquisas pelo BLAST foram conduzidas usando o banco de dados de aminoácidos não redundante do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando sequências de aminoácidos de proteases de *Trichoderma reesei* como consultas. Alternativamente,

pesquisas pelo FASTA foram conduzidas com o UniProt Knowledgebase do European Bioinformatics Institute (EBI). Pesquisas pelo BLAST com *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride* foram realizadas usando o site do DOE Joint Genome Institute (*Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride*, Gv29-8 v2.0 e v2.0, respectivamente). Sequências coincidentes em pesquisas pelo BLAST foram alinhadas usando a ferramenta de alinhamento ClustalW2 fornecida pelo EBI. Árvores filogenéticas também foram geradas usando alinhamentos de sequências.

[00485] As Figuras 45 descreve uma árvore filogenética de proteases aspárticas de fungos filamentosos selecionados.

[00486] A Figura 46 mostra uma árvore filogenética de proteases subtilisina de fungos filamentosos selecionados.

[00487] A Figura 47 mostra uma árvore filogenética de proteases glutâmicas de fungos filamentosos selecionados.

[00488] A Figura 48 mostra uma árvore filogenética de proteases sedolisina de fungos filamentosos selecionados.

#### **Exemplo 14 - GERAÇÃO DE CEPAS COM DELEÇÃO DE PROTEASE 9 VEZES**

**Geração de cepa com deleção de protease 9 vezes com deleções**

**$\Delta\text{pep1}\Delta\text{tsp1}\Delta\text{slp1}\Delta\text{gap1}\Delta\text{gap2}\Delta\text{pep4}\Delta\text{pep3}\Delta\text{pep5}\Delta\text{pep2}$**

**Geração de novos plasmídeos com deleção de pep2**

[00489] O primeiro plasmídeo com deleção de protease aspártica pep2 (tre0053961), pTTv213, foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41  $\Delta\text{pep1}$  no Exemplo 1, mas um segundo cassete de marcador de seleção adicional trazendo um gene de fosfotransferase de higromicina (hph), foi colocado depois do gene p-yr4 para criar um plasmídeo com deleção com um cassete desintegrador com marcador de seleção duplo. O sistema de marcador duplo permite a) o uso, por exemplo, de hph como o marcador de resistência



inicial e seleção mais rápida; b) transformação de cepas pyr4<sup>+</sup> (sem a necessidade de gerar pyr4<sup>-</sup> antes da transformação); e c) a remoção de ambos os marcadores dos transformantes usando ácido 5-fluororótico (conforme na remoção do cassete desintegrador pyr4 padrão) e mutagênese simultânea de pyr4 endógeno, resultando na cepa sem marcador pyr<sup>-</sup>. Além do marcador duplo, o primeiro plasmídeo com deleção também continha um cassete de superexpressão de kex2 nativo (tre123561; promotor de cDNA1, terminador cbh2).

[00490] O segundo plasmídeo com deleção de protease aspártica pep2 (tre0053961), pTTv232, foi construído usando o plasmídeo pTTv213 acima como esqueleto. O cassete de superexpressão de kex2 (pcDNA1-kex2-tcbh2) foi removido através de digestão de pTTv213 com Ascl. A clonagem do plasmídeo pTTv232 foi feita com ligação padrão (auto-ligação) usando DNA ligase T4, em temperatura ambiente. Parte da mistura de ligação foi transformada em E. coli com eletroporação. Alguns clones foram cultivados, o DNA de plasmídeo foi isolado e digerido para rastreio de ligação correta usando métodos de laboratório convencionais. Ligação correta foi ainda verificada por meio de sequenciamento.

[00491] O terceiro plasmídeo com deleção de protease aspártica pep2 (tre0053961), pTTv246, foi construído usando o plasmídeo pTTv232 acima como esqueleto. O marcador duplo pyr4-hph foi removido de pTTv232 através de digestão com NotI. O gene marcador pyr4 foi obtido a partir de pTTv181 ( $\Delta$ pep4-py4r acima) através de digestão com NotI. A clonagem do plasmídeo pTTv246 foi feita com ligação padrão usando DNA ligase T4, em temperatura ambiente. Parte da mistura de ligação foi transformada em E. coli com eletroporação. Alguns clones foram cultivados, o DNA de plasmídeo foi isolado e digerido para rastreio de ligação correta usando métodos de laboratório convencionais. Ligação correta e orientação do marcador foram ainda verifi-

çadas por meio de sequenciamento.

[00492] 1000 pb de região de flanqueamento 5' e 1020 pb de região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeos com deleção de pep2. Um trecho de 300 pb a partir da extremidade de flanqueamento 5' de pep2 foi usado como fragmento de repetição direta. Estes fragmentos, bem como o segundo cassete de marcador de seleção (hph), promotor de cDNA1, gene kex2 nativo e terminador c-bh2 foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 14.1. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O marcador de seleção pyr4 foi obtido a partir de pTTv181 ( $\Delta$ pep4-pyr4 acima) através de digestão com NotI. Para permitir remoção do cassete de marcador duplo inteiro em pTTv213, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete de marcador de duas vezes e um sítio Swal entre os dois marcadores de seleção. Sítios AscI foram introduzidos em ambos os lados do cassete de superexpressão de kex2 (repetição entre repetição direta nas regiões de flanqueamento 5' e 3' de pep2). Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo pTTv213 foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Estes plasmídeos com deleção de pep2 (pTTv213, pTTv232 e pTTv246, Tabela 14.1) resultam em uma deleção de 1580 pb no locus de pep2 e cobrem a sequência de codificação completa de PEP2.

**Tabela 14.1: Iniciadores para geração de plasmídeos com deleção de pep2**

**Plasmídeo com deleção pTTv213, esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T431_pep2-5flanqF-pRS426	GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCA GTCACGACGGTTT AAACCGGTTGTCCATTT- CATCCTTC
T629_pep2_5f_rev_pyr4	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAG- TAGTCGATGCTAGGCG GCCGCGGGGAAG- CAAGTTTCGAAGT
T630_pep2_5DR_for_trpC	GTACACTTGTTTAGAGGTAATCCTTCTTTCTA GAAGGAGAGCGG CCGCCTC- CACGCTCTTGGCCAC
T631_pep2_5DR_rev_cDNA1	GTCATTAAGTCCATCATTCCACGTCCTTCAGA CCGAATTCGGCGC GCCGGGGAAGCA- AGTTTCGAAGT
T632_pep2_3f_for_tcbh2	ATGATGCCTTTGCAGAAATGGCTTGCTCGCT GACTGATACGGCG CGCCTATCGCGAAAG- TAGCCAATA
T633_pep2_3f_rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCG TTTAAACCATCCT TTTCCTCACCACGA
T491_hph_recpyr4_for3	TGATTGTACCCAGCTGCGATTGATGTGTAT CTTTGCATGATTTA AATTCTCCTTAGCTCTG- TACAGT
T492_hph_rev2	GCGGCCGCTCTCCTTCTAGAAAGAAGGA
T495_cDNA1_for	GAATTCGGTCTGAAGGACGT
T138_cDNA1_Rev	GTTGAGAGAAGTTGTTGGATTG
T139_123561For_cDNA1	AACCAAAGACTTTTTGATCAATCCAACAACCTT CTCTCAACATGA

	AGATTTCTCGATCCTTG
T516_123561Rev	TCAGCGCCGTAACCTCTGC
T496_tcbh2_for	TGATGGTGATGAGGCGGAAAAGCAGAGGT- TACGGCGCTGAGGC TTTCGTGACCGGGCTTC
T497_tcbh2_rev	GTATCAGTCAGCGAGCAAGC
<b>Plasmídeo com deleção pTTv232</b>	
Iniciador	Sequência
Nenhum novo iniciador, pTTv213 digerido com Ascl (para remover o cassete de superexpressão kex2) e auto-ligado	
<b>Plasmídeo com deleção pTTv246</b>	
Iniciador	Sequência
Nenhum novo iniciador, pTTv232 digerido com NotI e ligado com p-pyr4/fragmento NotI de TTv181	

***Geração de cepa com deleção de protease 9 vezes com pep2 (tre53961); M574***

[00493] Para gerar a cepa com deleção de protease 9 vezes sem marcador, a remoção do marcador pyr4 foi aplicada à cepa M504 com deleção de protease 8 vezes (38-48A, pTTv229 em M496) essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção do cassete desintegrador pyr4 da cepa M195 ( $\Delta$ pep1). Etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas.

[00494] Os clones finais foram verificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 14.2 usando métodos de laboratório convencionais. Sinais correspondendo à remoção bem sucedida do cassete desintegrador foram obtidos para a maioria dos clones. A remoção do cassete desintegrador foi adicionalmente verificada colocando-se os clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. A

cepa resultante usada na geração de cepa com deleção de protease 9 vezes foi designada com número de cepa M521.

[00495] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv246 ( $\Delta$ pep2-pyr4) foi digerido com MssI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção foram usados para transformar um clone da cepa com deleção de protease 8 vezes M521 ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1 $\Delta$ slp1 $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2 $\Delta$ pep4 $\Delta$ pep3 $\Delta$ pep5, pyr4-). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam seleção com pyr4.

[00496] Os transformantes foram escolhidos como primeiras listras. Listras em crescimento foram testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 14.2) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 14.2. Deleção de pep2 foi verificada por meio de análises de Southern de clones selecionados (dados não mostrados), usando os métodos descritos no Exemplo 1. Clone 41-45G foi designado com o número de cepa M574.

**Tabela 14.2: Iniciadores para rastreo de remoção de cassete desintegrador pyr da cepa com deleção de protease 8 vezes e para rastreo de integração pTTv246/ $\Delta$ pep2-pyr4 e pureza de cepa**  
**Para rastreo de remoção de cassete desintegrador pyr4 de M504 e pureza de cepa**

Iniciador	Sequência
T858_pep5_5f_f3	GGAATCGTCACCAAGGAG
T755_pep5_3f_rev3	CTTCTGGTGACATTCCGAC
T627_pep5_5int_new	GTCGAAGATGTCCTCGAGAT
T488_pyr4_5utr_rev	GGAGTTGCTTTAATGTCGGG

T860_pep5_orf_f3	GTCGAGCGTCTGATATTCAC
T861_pep5_orf_r2	GACGGAGACCTCCCACA
<b>Para rastreio de integração de pTTv246 (<math>\Delta</math>pep2-pyr4)</b>	
Iniciador	Sequência
T596_pep2 fwd 5'flanq rastreio	CCTCTGCGTTGAGCAACATA
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA
T061 _pyr4_orf_rastreio_2F	TTAGGCGACCTCTTTTTCCA
T600_pep2 rev 3'flanq rastreio	CGAAAGCGTGGAGTCTTCTC
<b>Para rastreio de deleção de ORF de pep2 (tre53961)</b>	
T601_pep2 fwd	GACGTGGTACGACAACATCG
T623_pep2 rev	TATCAAGGTACCGGGGACAG
T1 077_pep2_orf_probef2	AACAAAGCCTTCACAGGCC
T1078_pep2_orf_prober2	TGAGGCTCCTTCCAACCTTTT

***Geração de cepa com deleção de protease 9 vezes com deleções  $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1 $\Delta$ slp1 $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2 $\Delta$ pep4 $\Delta$ pep3 $\Delta$ pep5 $\Delta$ pep12***

***Geração de plasmídeos com deleção de pep12***

[00497] O primeiro plasmídeo com deleção de protease aspártica pep12 (tre119876), pTTv209, foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41  $\Delta$ pep1 no Exemplo 1, mas um segundo cassete de marcador de seleção adicional, um construto sintético trazendo um gene de N-acetil-transferase de fosfinotricina (bar) de *Streptomyces ssp.*, foi colocado após o gene pyr4 para criar um plasmídeo com deleção com um cassete desintegrador com marcador de seleção duplo. O sistema de marcador duplo permite a) o uso, por exemplo, de bar como o marcador de resistência inicial e seleção mais rápida; b) transformação de cepas pyr4+ (sem a necessidade de gerar pyr4- antes de transformação); e c) a remoção de ambos os marcadores dos transformantes usando ácido 5-fluoro-orótico (conforme na remoção do cassete desintegrador pyr4 padrão) e mutagênese simultânea de pyr4 endógeno, resultando na cepa sem marcador pyr4-.

[00498] O segundo plasmídeo com deleção de protease aspártica pep12 (tre1 19876), pTTv245, foi construído usando o plasmídeo pTTv209 acima como esqueleto. O marcador duplo pyr4-bar foi removido de pTTv209 através de digestão com NotI. O novo gene marcador pyr4 foi obtido a partir de pTTv181 ( $\Delta$ pep4-pyr4 acima) através de digestão com NotI. A clonagem do plasmídeo pTTv245 foi feita com ligação padrão usando DNA ligase T4, em temperatura ambiente. Parte da mistura de ligação foi transformada em *E. coli* com eletroporação. Alguns clones foram cultivados, o DNA de plasmídeo foi isolado e digerido para rastreio de ligação correta usando métodos de laboratório convencionais. Ligação correta e orientação do marcador foram ainda verificadas por meio de sequenciamento.

[00499] 1019 pb de região de flanqueamento 5' e 895 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeos com deleção de pep12. Um trecho de 300 pb a partir da extremidade de flanqueamento 5' de pep12 foi usado como fragmento de repetição direta. Estes fragmentos foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 14.3. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O marcador duplo (pyr4-bar) foi digerido do pTTv202 ( $\Delta$ pep5-pyr4-bar) com NotI. Para permitir remoção do cassete completo marcador duplo, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete marcador duplo. Um sítio AscI foi introduzido entre a repetição direta das regiões de flanqueamento 5' e 3' de pep12. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo pTTv209 foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Estes plasmídeos com deleção de pep12 (pTTv209 e pTTv245, Tabela 14.3) resultam em uma deleção de 2198

pb no locus de pep12 e cobrem a sequência de codificação completa de PEP12.

**Tabela 14.3: Iniciadores para geração de plasmídeos com deleção de pep12.**

**Plasmídeo pTTv209 com deleção ( $\Delta$ pep12-pyr4-bar), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T477_pep12_5f_for	GGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC- GACGGTTTAAAC CGACAGCACGTTGTGTGCTCC
T478_pep12_5f_rev	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAG- TAGTCGATGCTA GGCGGCCGCTGGAGACCCAGCAGCCAGCA
T479_pep12_DR_for	CCCGTCACCGAGATCTGATCCGTCACCGG- GATCCACTTAA GCGGCCGCTCAGAGGGAGGCTGCCCAAC
T480_pep12_DR_rev	GAGACTCGAACAAGACATCTTTGC- GACCTCGTCCAC GGCGGCGCGCCTGGAGACCCAGCAGC- CAGCA
T481_pep12_3f_for	GCCGTGGACGAGGTCGCAAA
T482_pep12_3f_rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGAAA- CAGCGTTTAAAC CCCTGCGCCCTCTTCTGCAC

**Plasmídeo com deleção pTTv245 ( $\Delta$ pep12-pyr4)**

Iniciador	Sequência
Nenhum iniciador novo, digerido com NotI e ligado com fragmento p-pyr4 de pTTv181	

**Geração da cepa com deleção de protease 9 vezes com pep12 (tre1 19876); M575**



[00500] Para gerar a cepa com deleção de protease 9 vezes sem marcador, remoção do marcador pyr4 foi aplicada à cepa M504 com deleção de protease 8 vezes (38-48A, pTTv229 em M496) essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção do cassete desintegrador pyr4 da cepa M195 ( $\Delta$ pep1). Etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas.

[00501] Os clones finais foram verificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 14.4 usando métodos de laboratório convencionais. Sinais correspondendo à remoção bem sucedida do cassete desintegrador foram obtidos para a maioria dos clones. A remoção do cassete desintegrador foi adicionalmente verificada colocando-se os clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. A cepa resultante usada na geração da cepa com deleção de protease 9 vezes foi designado com número de cepa M521.

[00502] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv245 ( $\Delta$ pep12-pyr4) foi digerido com MssI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção foram usados para transformar um clone da cepa M521 com deleção de protease 8 vezes ( $\Delta$ pep1  $\Delta$ tsp1 $\Delta$ slp1 $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2 $\Delta$ pep4 $\Delta$ pep3 $\Delta$ pep5, pyr4-). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam seleção com pyr4.

[00503] Os transformantes foram escolhidos como primeiras listras. Listras em crescimento foram testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 14.4) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores lis-

tados na Tabela 14.4. Análise de deleção de pep12 de clones selecionados foi verificada por Southern (dados não mostrados) usando métodos descritos no Exemplo 1. Clone 42-45B foi designado com o número de cepa M575.

**Tabela 14.4: Iniciadores para rastreo de remoção do cassete desintegrador pyr da cepa com deleção de protease 8 vezes e para rastreo de integração pTTv245/ $\Delta$ pep12-pyr4 e pureza de cepa**  
**Para rastreo de remoção de cassete desintegrador pyr4 de M504 e pureza de cepa**

Iniciador	Sequência
T858_pep5_5f_f3	GGAATCGTCACCAAGGAG
T755_pep5_3f_rev3	CTTCTGGTGACATTCCGAC
T627_pep5_5int_new	GTCGAAGATGTCCTCGAGAT
T488_pyr4_5utr_rev	GGAGTTGCTTTAATGTCGGG
T860_pep5_orf_f3	GTCGAGCGTCTGATATTAC
T861_pep5_orf_r2	GACGGAGACCTCCCACA
<b>Para rastreo de integração de pTTv245 (<math>\Delta</math>pep12-pyr4)</b>	
Iniciador	Sequência
T517_pep12_5int	AGCAGTCCACCTGCTCAAAA
T026_Pyr4_orf_5rev2	CCATGAGCTTGAACAGGTAA
T061_pyr4_orf_rastreio_2F	TTAGGCGACCTCTTTTCCA
T518_pep12_3int	GATTACACCAATGAGTCGG
<b>Para rastreo de deleção de ORF de pep12 (tre119876)</b>	
T486_pep 12_orf_probef	CCCCGACTTTGCCCCGTCAC
T487_pep12_orf_prober	TCGTCAGAGTCGTGCCCCGT
T1057_pep12_orf_probef2	GCGCAGCTAATGTCCTCTGT
T1058_pep 12_orf_prober2	TTGTTGAGCCAGAGTCGAGA

**Exemplo 15 - PRODUÇÃO DA CEPA COM DELEÇÃO DE PROTEASE 10 VEZES**

**Geração de cepa com deleção de protease 10 vezes tendo deleções**  $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1 \Delta gap2 \Delta pep4$   $\Delta pep3$

$\Delta pep5 \Delta pep2 \Delta pep11$

**Geração de plasmídeo com deleção de pep11**

[00504] O plasmídeo pTTv312 com deleção de protease aspártica pep11 (tre121306) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1.

[00505] 956 pb da região de flanqueamento 5' e 943 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados na base no plasmídeo com deleção de pep1. Um trecho de 307 pb a partir da extremidade de flanqueamento 5' de pep11 foi usado como fragmento de repetição direta. Estes fragmentos foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 15.1. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O cassete pyr4 foi obtido a partir de pTTv181 ( $\Delta pep4$ -pyr4 acima) através de digestão com NotI. Para permitir remoção do cassete de marcador, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete. Um sítio AscI foi introduzido entre a repetição direta das regiões de flanqueamento 5' e 3' de pep11. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de pep11 (pTTv312, Tabela 15.1) resulta em deleção de 2624 pb no locus de pep11 e cobre a sequência de codificação completa de PEP11.

**Tabela 15.1: Iniciadores para gerar os plasmídeos com deleção de pep11**

**Plasmídeo com deleção pTTv312 ( $\Delta pep11$ -pyr4), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador			Sequência
T1009_pep1 l_5flkfw_vec tor			GTAACGCCAGGGTTTTCCCAAGT- CACGACGGTTTAAAC ATGAGCGTGATCGACAAGTG
T1010_pep1 1_	_5flkrev _	_pyr4Pro m	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAG- CAGCAGTAGTCGATGCTAG GCGGCCGCCCTCTGAGGTCGA- GATGGAG
T1144_pep1 1.	_5dr_for		TGATTGTACCCAGCTGCGATT- GATGTGTATCTTTGCAT GGCGGCCGCACGACTAATATC- CACTGCCG
T1145_pep1 1.	_5dr_rev		AACCAAAGTGTACAATGCT- CATCTCGTATTCACATGCAAA GGCGCGCCCCTCTGAGGTCGA- GATGGAG
T1146_pep1 1.	_3f_for		TTTGCATGTGAATACGAGATGA
T1012_pep1 1.	_3flkrev _	vetor	GCGGATAACAATTTACACACAG- GAAACAGCGTTTAAAC TGCTCGATCCTACTCCAAGG

***Geração de cepa com deleção de protease 10 vezes com pep11 (tre121306); M658***

[00506] Para gerar uma cepa com deleção de protease de 10 vezes sem marcador, remoção do marcador pyr4 foi aplicada à cepa M574 com deleção de protease 9 vezes (41-45G, pTTv246 em M521) essencialmente conforme descrito no Exemplo 3, para remoção do cassete desintegrador pyr4 da cepa M195 ( $\Delta$ pep1). Etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas.

[00507] Os clones finais foram verificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 15.2 usando métodos de laboratório convencionais. Sinais correspondendo à remoção bem sucedida do cassete desintegrador foram obtidos para a maioria dos clones. A remoção do cassete desintegrador foi adicionalmente verificada colocando-se os clones em placas com meio mínimo com ou sem uridina a 5 mM. Não houve crescimento nas placas sem suplementação com uridina. A cepa resultante usada na geração da cepa com deleção de protease 10 vezes foi designada com número de cepa M597.

[00508] Para remover a sequência do vetor, o plasmídeo pTTv312 ( $\Delta$ pep11-pyr4) foi digerido com MssI e o fragmento correto purificado a partir de um gel de agarose usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção foram usados para transformar um clone da cepa M597 com deleção de protease 9 vezes ( $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1 $\Delta$ slp1 $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2 $\Delta$ pep4 $\Delta$ pep3 $\Delta$ pep5 $\Delta$ pep2, pyr4-). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam a seleção com pyr4.

[00509] Os transformantes foram escolhidos como primeiras listras. Listras em crescimento foram testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 15.2) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 15.2. Deleção de pep11 foi verificada por meio de análises de Southern de clones selecionados (dados não mostrados), usando os métodos descritos no Exemplo 1. Clone 47-62B foi designado com o número de cepa M632. Uma etapa de purificação de uma única célula adicional foi aplicada à cepa M632 obter a cepa M658 com deleção de protease 10 vezes.

**Tabela 15.2: Iniciadores para rastreo de remoção de cassete de-**

**sintegrador pyr4 da cepa com deleção de protease 9 vezes e para rastreio de integração pTTv312/ $\Delta$ pep11-pyr4 e pureza de cepa**  
**Para rastreio de remoção de cassete desintegrador pyr4 de M574 e pureza de cepa**

Iniciador	Sequência
T1162_pep2_5f_f2	CTGTAAAGGCAGCATCGG
T1163_pep2_3f_r2	TCAGAACGGCTTCAATCATT
T1162_pep2_5f_f2	CTGTAAAGGCAGCATCGG
T488_pyr4_5utr_rev	GGAGTTGCTTTAATGTCGGG
T601_pep2 fwd	GACGTGGTACGACAACATCG
T623_pep2 rev	TATCAAGGTACCGGGGACAG
Para rastreio de integração de pTTv312 ( $\Delta$ pep11-pyr4)	
Iniciador	Sequência
T1013_pep11_rastreio_5flk_fwd	TTACGACTCGATCCCTGTCC
T488_pyr4_5utr_rev	GGAGTTGCTTTAATGTCGGG
T061 _pyr4_orf_rastreio_2F	TTAGGCGACCTCTTTTTCCA
T1016_pep11_rastreio_3flk_rev	GCCGCTAGGATCGTGATAAG
Para rastreio de deleção de ORF de pep11	
T1017_pep11_orf_fwd	GTGTCCCAGGACGACAACCTT
T1018_pep11_orf_rev	TGAAGGTTGCAGTGATCTCG

#### **Exemplo 16 - GERAÇÃO DE PLASMÍDEO COM DELEÇÃO DE TPP1**

[00510] O plasmídeo pTTv331 com deleção de tripeptidil peptidase tpp1 (tre82623) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1, exceto que o marcador usado para seleção foi um marcador duplo pyr4-hph.

[00511] 1245 pb de região de flanqueamento 5' e 1025 pb de região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo com deleção de tpp1. Um trecho de 311 pb a partir da extremidade de flanqueamento 5' de tpp1 foi usado como fragmento de repetição dire-

ta. Estes fragmentos foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 16.1. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O cassete de pyr4-hph foi obtido a partir de pTTv210 ( $\Delta$ sepl-pyr4-hph) através de digestão com NotI. Para permitir remoção do cassete completo marcador duplo, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete marcador duplo. Um sítio AscI foi introduzido entre a repetição direta direta das regiões de flanqueamento 5' e 3' de tpp1. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de tpp1 (pTTv331, Tabela 16.1) resulta em deleção de 2152 pb no locus de tpp1 e cobre sequência de codificação completa de TPP1.

**Tabela 16.1: Iniciadores para gerar plasmídeo com deleção de tpp1**

**Plasmídeo com deleção pTTv331 ( $\Delta$ tpp1-pyr4-hph), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T311_82623_5fo r	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGGTT- TAAAC CGCATTACGAATGCACAAAG
T1190_tpp1_5f_r ev2	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAG- TAGTCGATGCTA GGCGGCCGCCCATGTCAGCTCAGACCAAT
T1191_tpp1_5dr _for	GTACACTTGTTTAGAGGTAATCCTTCTTTCTA- GAAGGAGA GCGGCCGCGAGGCCCTGGACTGCTAGTTT
T1192_tpp1_5dr	CGAGCCATCCGCCGCGGCCCTATATTC-

_rev	CACCCGAGTCCT CGGCGCGCCCCATGTCAGCTCAGACCAAT
T1193_tpp1_3f_f or2	GAGGACTCGGGTGGGAATATAGG
T314_82623_3re v	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGTT- TAAAC TTGGTCTTGAATGAAAGGTGTG

### **Exemplo 17 - GERAÇÃO DE PLASMÍDEOS COM DELEÇÃO DE PEP8**

[00512] Outro plasmídeo pTTv319 com deleção de protease aspártica pep8 (tre122076) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1.

[00513] O segundo plasmídeo com deleção de protease aspártica pep8 (tre122076), pTTv328, foi construído usando o plasmídeo pTTv319 acima como o esqueleto. O marcador pyr4 foi removido de pTTv319 através de digestão com NotI. O cassete pyr4-hph foi obtido a partir de pTTv210 ( $\Delta$ sepl-pyr4-hph) através de digestão com NotI. Clonagem do plasmídeo pTTv328 foi feita com ligação padrão usando DNA ligase T4, em temperatura ambiente. Parte da mistura de ligação foi transformada em *E. coli* com eletroporação. Alguns clones foram cultivados, o DNA de plasmídeo foi isolado e digerido para rastreio de ligação correta usando métodos de laboratório convencionais. Ligação correta e orientação do marcador foram ainda verificadas por meio de sequenciamento.

[00514] 1095 pb de região de flanqueamento 5' e 988 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeos com deleção de pep8. Um trecho de 324 pb a partir da extremidade de flanqueamento 5' de pep8 foi usado como fragmento de repetição direta. Estes fragmentos foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 17.1. Os produtos foram separados por meio de



eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O marcador de seleção *pyr4* usado em pTTv319 foi obtido a partir de pTTv181 ( $\Delta$ pep4-*pyr4* acima) através de digestão com NotI. Para permitir remoção do cassete de marcador *pyr4*, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete. Um sítio AscI foi introduzido entre a repetição direta da região de flanqueamento 5' e região de flanqueamento 3' de *pep8*. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo pTTv319 foi construído usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Esses plasmídeos com deleção de *pep8* (pTTv319 e pTTv328, Tabela 17.1) resultam em uma deleção 1543 pb no locus de *pep8* e abrangem a sequência de codificação completa de PEP8.

**Tabela 17.1: Iniciadores para gerar plasmídeo com deleção de *pep8***

**Plasmídeo com deleção pTTv319 ( $\Delta$ pep8-*pyr4*), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T1019_pep8_5flkfw_vector	GTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAC- GACGGTTTAAAC AGGTTTGGGTTGTGAGATCG
T1020_pep8_5flkrev_pyr4Prom	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAG- TAGTCGATGCTA GGCGGCCGCGCGCAA- AGCTACTGGGCTAT
T1167_pep8_5DR_for	TGATTGTACCCAGCTGCGATTGATGTG- TATCTTTGCAT GGCGGCCGCTCTGCTCTGCTCTGTTCTGC
T1168_pep8_5DR_rev	AAAGTTCGTCAAAGAGCACTCA- TAGGGCTGAGAAAA GC-

	CAGGCGCGCCGCGCAAAGCTACTGGGC-TAT
T1169_pep8_3f_for2	TGGCTTTTCTCAGCCCTATG
T1022_pep8_3flkrev_v ector	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA- CAGCGTTTAAAC CAATGTGTGCCTGTTTTTCG
Plasmídeo com deleção pTTv328 ( $\Delta$ pep8-pyr4-hph)	
Iniciador	Sequência
Nenhum iniciador novo, pTTv319 digerido com NotI e ligado com fragmento pyr4-hph de pTTv210	

[00515] O terceiro plasmídeo com deleção pTTv266 para protease aspártica pep8 (tre122076) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de pep1 no Exemplo 1, exceto que o marcador usado para seleção foi pyr4-hgh de pTTv194.

[00516] 1095 pb da região de flanqueamento 5' e 988 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo pTTv266 com deleção de pep8. Estes fragmentos foram amplificados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 17.2. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O marcador de seleção pyr4-hgh usado em pTTv266 foi obtido a partir de pTTv194 ( $\Delta$ pep4-pir-HGH acima) através de digestão com NotI. Para permitir remoção do cassete de marcador pyr4-hgh, sítios de restrição NotI foram introduzidos em ambos os lados do cassete. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com EcoRI/XhoI, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo pTTv266 foi construído com região de flanqueamento 3', região de flanqueamento 5', marcador pyr4-hgh e esqueleto de vetor usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no

Exemplo 1. Os plasmídeos com deleção de pep8 (pTTv266, Tabela 17.2) resultam em uma deleção de 1543 pb no locus de pep8 e cobrem a sequência de codificação completa de pep8.

**Tabela 17.2: Iniciadores para geração de plasmídeo com deleção de pep8**

**Plasmídeo com deleção pTTv266 ( $\Delta$ pep8-pyr4-hgh), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador	Sequência
T1019_pep8_5flkfw_vector	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC- GACGGTTTAAACAGGTTT GGGTTGTGAGATCG
T1020_pep8_5flkrev_pyr4Prom	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAGCAG- TAGTCGATGCTAGG CGGCCGCGCGCAA- AGCTACTGGGCTAT
TI 02 l_pep8_3flkfw_pyr41o op	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTCT- CAGCCTCATCAGCCGC GGCCGCTGGCTTTTCTCAGCCCTATG
T1022_pep8_3flkrev_vector	GCGGATAACAATTTACACAGGAAA- CAGCGTTTAAACCAATG TGTGCCTGTTTTTCG

**Exemplo 18 - GERAÇÃO DE DELEÇÕES DE PROTEASE EM CEPAS QUE PRODUZEM INTERFERON**

**Geração de Cepa com deleção de protease 5 vezes que produz IFN- $\alpha$  2b**

[00517] Para gerar a cepa com deleção de protease cinco vezes que produz IFN- $\alpha$  2b, a cepa M369 com deleção de protease cinco vezes  $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2 a foi transformada com o cassete de expressão de IFN- $\alpha$  2b (pTTv173) usando higromicina na seleção. Esta cepa com deleção de protease 5 vezes  $\Delta$ pep1 $\Delta$ tsp1  $\Delta$ slp1  $\Delta$ gap1 $\Delta$ gap2 que produz IFN- $\alpha$  2b foi designada com o número M401.

***Análise da cepa M401 com deleção de protease 5 vezes que produz IFN- $\alpha$  2b***

[00518] Para estudar o nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b, a cepa M401 com deleção de protease de 5 vezes ( $\Delta pep1\Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1\Delta gap2$ ) que produz IFN- $\alpha$  2b foi cultivada sob condições de cultura de pH de 4,5; 28  $\rightarrow$  22 °C; 30 g/l de glicose, 60 g/l de lactose, 20 g/l de grãos integrais consumidos e 20 g/l de extrato de grão consumido. Para analisar o nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b, a amostra de cultura do dia 3 foi submetida a imunoblot quantitativo (Figura 54A). As amostras foram analisadas por meio de comparação com uma curva padrão para IFN- $\alpha$  2b e quantificação densitométrica foi feita com o software Totallab Quant TL100. Imunoblot foi realizado com anticorpo anti-IFN- $\alpha$  2b da Abeam (#ab9386) diluído a 1  $\mu$ g/ml em TBST. O anticorpo secundário foi anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado da Bio-Rad (#170-6520) diluído a 1:5000 em TBST. Os padrões de proteína foram carregados sobre o gel correspondendo a 50 ng, 100 ng, 200 ng e 400 ng de IFN- $\alpha$  2b. A análise mostrou que M401 produziu IFN- $\alpha$  2b com rendimentos de até 51,9 mg/l e 52% do produto foram clivados da molécula veículo.

**Geração de cepa M577 com deleção de protease 8 vezes que produz IFN- $\alpha$  2b**

[00519] Para gerar a cepa com deleção de protease 8 vezes que produz IFN- $\alpha$  2b, a cepa M504 com deleção de protease 8 vezes  $\Delta pep1\Delta tsp1\Delta slp1 \Delta gap1\Delta gap2\Delta pep4\Delta pep3\Delta pep5$  foi transformada com cassete de expressão de IFN- $\alpha$  2b (pTTv254) usando acetamida na seleção. Esta cepa com deleção de protease 8 vezes  $\Delta pep1\Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1\Delta gap2\Delta pep4\Delta pep3\Delta pep5$  que produz IFN- $\alpha$  2b foi designada com o número M577.

***Análise de cepa M577 com deleção de protease 8 vezes que produz IFN- $\alpha$  2b***

[00520] Para estudar o nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b, a cepa M577 com deleção de protease 8 vezes ( $\Delta pep1\Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1\Delta gap2\Delta pep4\Delta pep3\Delta pep5$ ) que produz IFN- $\alpha$  2b foi cultivada sob condições de pH de 4,5; 28  $\rightarrow$  22 °C; 2% de extrato de levedura, 4% de celulose, 8% de celobiose e 4% de sorbose. Para estudar a expressão de IFN- $\alpha$  2b, as amostras de fermentação de M577 foram submetidas a imunoblot (Figura 54B). Para analisar o nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b, a amostra de cultura do dia 4 foi submetida a imunoblot quantitativo (Figura 55). A amostra foi analisada por meio de comparação com uma curva padrão para IFN- $\alpha$  2b e quantificação densitométrica foi feita com o software Totallab Quant TL100. Imunoblot foi realizado com anticorpo anti-IFN- $\alpha$  2b da Abeam (#ab9386) diluído a 1  $\mu$ g/ml em TBST. O anticorpo secundário era anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado da Bio-Rad (#170-6520) diluído a 1:5000 em TBST. Os padrões de proteína foram carregados sobre o gel correspondendo a 50 ng, 100 ng e 200 ng de IFN- $\alpha$  2b. A análise mostrou que M577 produziu IFN- $\alpha$  2b com rendimentos de até 1780 mg/l e 66,5% do produto foram clivados da molécula veículo. A cepa M577 com deleção de protease 8 vezes produziu 34 vezes mais IFN- $\alpha$  2b do que cepa M401 com deleção de protease 5 vezes.

#### **Geração da cepa M652 com deleção de protease 9 vezes que produz IFN- $\alpha$ 2b**

[00521] Para gerar a cepa com deleção de protease 9 vezes que produz IFN- $\alpha$  2b, a cepa M574 com deleção de protease 9 vezes  $\Delta pep1\Delta tsp1\Delta slp1 \Delta gap1\Delta gap2\Delta pep4\Delta pep3\Delta pep5\Delta pep2$  foi transformada com cassete de expressão de IFN- $\alpha$  2b (pTTv173) usando higromicina na seleção. Esta cepa com deleção de protease 9 vezes  $\Delta pep1\Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1\Delta gap2\Delta pep4\Delta pep3\Delta pep5\Delta pep2$  que produz IFN- $\alpha$  2b foi designada com o número M652.

**Análise da cepa M652 com deleção de protease 9 vezes que produz IFN- $\alpha$  2b**

[00522] Para estudar o nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b, a cepa M652 com deleção de protease 8 vezes ( $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1 \Delta gap2 \Delta pep4 \Delta pep3 \Delta pep5 \Delta pep2$ ) que produz IFN- $\alpha$  1b foi cultivada sob condições de pH de 4,5; 28  $\rightarrow$  22 °C; 2% de extrato de levedura, 4% de celulose, 8% de celobiose e 4% de sorbose. Para estudar a expressão de IFN- $\alpha$  2b, as amostras de fermentação de M652 foram submetidas a imunoblot (Figura 54B). Para analisar o nível de expressão de IFN- $\alpha$  2b, a amostra de cultura do dia 3 foi submetida a imunoblot quantitativo (Figura 55). A amostra foi analisada por meio de comparação com uma curva padrão para IFN- $\alpha$  2b e quantificação densitométrica foi feita com o software Totallab Quant TL100. Imunoblot foi realizado com anticorpo anti-IFN- $\alpha$  2b da Abeam (#ab9386) diluído a 1  $\mu$ g/ml em TBST. O anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo AP-conjugado da Bio-Rad (#170-6520) diluído a 1:5000 em TBST. Os padrões de proteína foram carregados sobre o gel correspondendo a 50 ng, 100 ng e 200 ng de IFN- $\alpha$  2b. A análise mostrou que M652 produziu IFN- $\alpha$  2b com rendimentos de até 1928 mg/l e 85% do produto foram clivados da molécula veículo. A cepa M652 com deleção de protease 9 vezes produziu ligeiramente mais do que a cepa M577 com deleção de protease 8 vezes e 37 vezes mais IFN- $\alpha$  2b do que cepa M401 com deleção de protease 5 vezes.

**Geração cepa M670 com deleção de protease 9 vezes com *pep8* (*tre122076*) deletado da cepa M577 que produz interferon**

[00523] Para remover o cassete de deleção, o plasmídeo pTTv266 ( $\Delta pep8-pyr4-hgh$ ) foi digerido com *PmeI* e o fragmento correto foi purificado usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção foram usados para transformar a cepa M577 com deleção de protease 8 vezes

( $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1 \Delta gap2 \Delta pep4 \Delta pep3 \Delta pep5$ ). A cepa M577 produz interferon alfa 2b. Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1, usando seleção com higromicina.

[00524] Os transformantes foram coletados e cultivados em placas de seleção. Listras em crescimento foram testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 18.1) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 18.1. Clone 82-9 foi designado com número de cepa M670.

**Tabela 18.1: Iniciadores para rastreio de integração pTTv266/ $\Delta pep8$ -pyr4-hgh e pureza de cepa**

**Para rastreio de integração de pTTv266 ( $\Delta pep8$ -pyr4-hgh)**

Iniciador	Sequência
T1023_ <i>pep8</i> _rastreio_5flk_fwd	TTTATCCGCTTCCACGACAC
T1084_ rastreio_5flk_pyr_rev	TCTTGAGCACGACAATCGAC
T1015_ rastreio_3flk_hygro_fwd	GCATGGTTGCCTAGTGAATG
T1024_ <i>pep8</i> _rastreio_3flk_rev	CGATGGTGAAGTCAATGTGG

**Para rastreio de deleção de ORF de *pep8***

T1025_ <i>pep8</i> _orf_fwd	GGCGATTACTTCCAGGACAA
T1026_ <i>pep8</i> _orf_rev	CAATGGCAATCTGGTTGTTG

**Geração de plasmídeo com deleção de *pep11***

[00525] O plasmídeo pTTv268 com deleção de protease aspártica *pep11* (tre121306) foi construído essencialmente conforme descrito para o plasmídeo pTTv41 com deleção de *pep1* no Exemplo 1, exceto que o marcador usado para seleção foi *pyr4-hgh* de pTTv194.

[00526] 956 pb da região de flanqueamento 5' e 957 pb da região de flanqueamento 3' foram selecionados com base no plasmídeo pTTv268 com deleção de *pep1*. Estes fragmentos foram amplificados

por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 18.2. Os produtos foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados do gel com o kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. O cassete de *pyr4-hgh* foi obtido a partir de pTTv194 ( $\Delta$ *pep-pyr4-hgh*) através de digestão com *NotI*. Para permitir remoção do cassete de marcador, sítios de restrição *NotI* foram introduzidos em ambos os lados do cassete. Esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com *EcoRI/XhoI*, conforme no Exemplo 1. O plasmídeo foi construído. O plasmídeo pTTv268 foi construído com região de flanqueamento 3', região de flanqueamento 5', marcador *pyr4-hgh* e esqueleto de vetor usando o método de recombinação homóloga de levedura descrito no Exemplo 1. Este plasmídeo com deleção de *pep11* (pTTv268, Tabela 18.2) resulta em uma deleção no *locus* de *pep11* e abrange a sequência de codificação completa de *pep11*.

**Tabela 18.2: Iniciadores para gerar os plasmídeos com deleção de *pep11***

**Plasmídeo pTTv268 com deleção ( $\Delta$ *pep11-pyr4-hgh*), esqueleto de vetor pRS426**

Iniciador		Sequência
T1009_pep 11_	5flkfw_vetor	GTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC- GACGGTTTAAAC ATGAGCGTGATCGACAAGTG
T1010_pep 11_om	5flkrev_pyr4 Pr	GCGCTGGCAACGAGAGCAGAGCAG- CAGTAGTCGATGCTAG GCGGCCGCCCTCTGAGGTCGAGATG- GAG
T1011_pep 11_	3flkfw_pyr4lo op	CAACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTCTC AGCCTCATCAGCCGCGG CCGCTTTGCATGTGAATACGAGATGA



---

T1012\_pegp11\_3flkrev\_veto GCGGATAACAATTTACACACAGGAAA-  
 11\_ r CAGCGTTTAAAC  
 TGCTCGATCCTACTCCAAGG

---

[00527] Para remover o cassete de deleção, o plasmídeo pTTv268 ( $\Delta pep11$ -*pyr4-hgh*) foi digerido com *PmeI* e o fragmento correto foi purificado usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5 µg do cassete de deleção foram usados para transformar a cepa M577 com deleção de protease 8 vezes ( $\Delta pep1\Delta tsp1\Delta slp1\Delta gap1\Delta gap2\Delta pep4\Delta pep3\Delta pep5$ ). A cepa M577 produz interferon alfa 2b. Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1, usando seleção com higromicina.

[00528] Os transformantes foram coletados e cultivados em placas de seleção. Listras em crescimento foram testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 18.3) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 18.3. Clone 33-9 foi designado com número de cepa M672.

**Tabela 18.3: Iniciadores para rastreio de integração pTTv268/ $\Delta pep11$ -*pyr4-hgh* e pureza de cepa**

**Para rastreio de integração de pTTv268 ( $\Delta pep11$ -*pyr4-hgh*)**

Iniciador	Sequência
T1013_pegp11_rastreio_5flk_fwd	TTACGACTCGATCCCTGTCC
T1084_rastreio_5flk_pyr_rev	TCTTGAGCACGACAATCGAC
T1015_rastreio_3flk_hygro_fwd	GCATGGTTGCCTAGTGAATG
T1016_pegp11_rastreio_3flk_rev	GCCGCTAGGATCGTGATAAG

**Para rastreio de deleção de ORF de *pegp11***

T1017_pegp11_orf_fwd	GTGTCCCAGGACGACAACCTT
T1018_pegp11_orf_rev	TGAAGGTTGCAGTGATCTCG

---

***Geração de cepa M673 com deleção de protease 9 vezes com slp7 (tre123865) deletado da cepa M577 que produz interferon***

[00529] Para remover o cassete de deleção, o plasmídeo pTTv269 ( $\Delta slp7$ -pyr4-hgh) foi digerido com *PmeI* e o fragmento correto foi purificado usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção foram usados para transformar a cepa M577 com deleção de protease 8 vezes ( $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1 \Delta gap2 \Delta pep4 \Delta pep3 \Delta pep5$ ). A cepa M577 produz interferon alfa 2b. Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1, usando seleção com higromicina.

[00530] Os transformantes foram coletados e colocados sobre placas de seleção. Listras em crescimento foram rastreadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 18.4) quanto à integração correta. Clones que fornecem os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 18.4. Clone 5-64 foi designado com número de cepa M673.

**Tabela 18.4: Iniciadores para rastreio de integração pTTv269/ $\Delta slp7$ -pyr4-hgh e pureza de cepa.**

**Para rastreio de integração de pTTv269 ( $\Delta slp7$ -pyr4-hgh)**

Iniciador	Sequência
T1092_slp7_rastreio_5flk_fwd	TTGGTTTGAACAGCTGCAAG
T1084_rastreio_5flk_pyr_rev	TCTTGAGCACGACAATCGAC
T1015_rastreio_3flk_hygro_fwd	GCATGGTTGCCTAGTGAATG
T109 3_slp7_rastreio_3flk_rev	ATGGTCAGCCAGAACCTGAC

**Para rastreio de deleção de ORF de *slp7***

T1094_slp7_orf_fwd	TCTTGAGCCGTTTCTCGAAT
T1095_slp7_orf_rev	CCGCTCTTAGATCGATGGTC

**Exemplo 19 - GERAÇÃO DE CEPAS M627 E M629 QUE PRODUZ**

**ZEM GO**

[00531] Vetores pTTg156 e pTTg173 foram construídos adicionando o cassete de seleção com marcador duplo (gene marcador de resistência à higromicina (*hph*) entre promotor *pkil* e terminador *cbh2*, além do cassete de expressão de *pyr4*) aos vetores intermediários pTTg145 e pTTg146. Os intermediários foram construídos por clonagem através de recombinação de levedura, cassetes de marcador foram adicionados por clonagem convencional através de digestão e ligação com *NotI*.

[00532] A estratégia de geração de fragmentos para vetores intermediários é apresentada na Tabela 19.1 abaixo. Iniciadores usados para geração de fragmento estão listados na Tabela 19.2 abaixo. Uma vez que os fragmentos para pTTg145 e pTTg146 foram construídos de acordo com o plano na Tabela 19.1, eles foram eletroporados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* FY834 para montagem de plasmídeo por meio de recombinação homóloga. As células de levedura foram cultivadas em SC-ura para cultura de 2-3 dias a 30 °C. As colônias foram, então, reunidas das placas e o plasmídeo reunido foi purificado com o método de extração com fenol/clorofórmio. Agrupamentos de plasmídeos foram transformados em células de *E. coli* competentes por eletroporação. As células eletroporadas foram colocadas em placas de seleção com LB + amp, cultivadas a 37 °C durante a noite e as colônias foram rastreadas por PCR. As colônias positivas foram, então, cultivadas em placas frescas como culturas puras, as colônias individuais foram cultivadas em meio líquido LB + amp e vetores intermediários pTTg145 e pTTg146 potenciais foram purificados de acordo com protocolos padrões. Os plasmídeos foram analisados através de análise de restrição e as sequências foram verificadas por meio de sequenciamento.

[00533] Cassete de marcador foi, então, adicionado aos vetores

por meio de digestão convencional com *NotI* de pTTg163 e ligação em intermediários pTTg145 e pTTg146 linearizados com *NotI*.

**Tabela 19.1: Estratégia de construção de vetores intermediários pTTg145-pTTg149. pTTv141 e pTTv11 são descritos no Pedido de Patente Internacional N° PCT/EP2011/070956. Os plasmídeos pTTg124 e pTTv225 foram usados para a construção dos fragmentos especificados na tabela abaixo.**

Código de vetor	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Fragmento 4
pTTg145 (intermediário para pTTg156)	pTTv141 cortado com <i>NotI</i>	Produto de PCR de pTTg124, modelo GP364, GP334 > sequência de promotor de pCDNA e sobreposição à GnTI	pTTv11 cortado com <i>SacII/NdeI</i>	Produto de PCR de pTTv11, modelo GP342, GP358
pTTg146 (intermediário para pTTg173)	pTTv141 cortado com <i>NotI</i>	Produto de PCR de pTTv225, modelo GP395, GP334 > sequência do promotor de pCDNA com líder Kre2 e sobreposição à GnTI	Produto de PCR de pTTv11, modelo GP340, GP336	n/a

**Tabela 19.2: Iniciadores usados para a construção de vetores intermediários pTT145-pTTg149**

Código	Sequências 5' > 3'
GP364	TCTCCACTCGACCTGCAGGCATGCGCGATCGCGCGGCCGAAT CGGTCTGAAGGACGTGG
GP334	TGGCGCCCCACAGCACAAGCCCTGCAGACTGCTTCTTCAGCATGT TGAGAGAAGTTGTTGG
GP395	CATCTCCACTCGACCTGCAGGCATGCGCGATCGCGCGGCCGAAT TCGGTCTGAAGGACGTGG
GP340	GGGGATGCCCTGTCGAGCCAGCGGGGGAGGGTGCCCACCGCCG CCCCTCCCGCCCAGCCG
GP336	GAAGGTGGTTTTTGCCTGTATAAGC- AGCCATCCGGCATACTGCCCCGCG GCCGCCCTGCAGTGCAGGATCTGC
GP342	TGGCGCCCCCACCAGCTGGGAGGGCTATGATCCCAGCTGGAATTA GCATATGATTAATTAAGG
GP358	GGTTTTTGCCTGTATAAGCCAGCCATCCGGCATACTGCCCCGCGGCC GCAGTGCAGGATCTGC

[00534] A cepa M507 de *Trichoderma reesei* que expressa MAB01 com deleção de protease de 7 vezes foi transformada com os fragmentos *PmeI* de pTTg156 e pTTg173 que objetivam o *locus* de *alg3*. Quantidade variável de transformantes (100-170 dependendo do construto) foram colocadas em placas seletivas. Com base em rastreio por PCR com o kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes F-130), clones com resultado positivo referentes à integração 5' e 3' foram selecionados para colocação de esporos únicos e novo rastreio quanto à integração e deleção de *alg3* (5 clones da transformação de pTTg156, 3 clones da transformação de pTTg173). Iniciadores usados para seleção são listados na Tabela 19.3 abaixo.

[00535] Cepas rastreadas por PCR foram finalmente submetidas à cultura em frasco de agitação e análise de glicanas. Cepas finais foram denominadas M629 (transformante pTTg173) e M627 (transfor-

mante pTTg156).

**Tabela 19.3: Iniciadores usados para rastreo de integração de alg3 em M507 pTTg156 e pTTg173**

Código	Descrição	Sequência 5' - 3'
GP488	Rastreo de integração 5' de alg3, direto, fora do flanq	GATGTTGCGCCTGGGTTGAC
GP495	Rastreo de integração 5' de alg3, reverso de pGPDA	CTTCTTATTGATTTGAGCC
GP490	Rastreo de integração 3' de alg3, reverso, fora do flanq	GATTGTCATGGTGTACGTGA
GP497	Rastreo de integração 3' de alg3, direto do terminador cbh1	GAGCCGCATCGCATAG
GP491	Orf de alg3, direto (produto de 1492 pb)	GCGTCACTCATCAAACTGC
GP492	alg3 orf, reverse (produto de 1492 pb)	CTTCGGCTTCGATGTTTCA

**Fermentação em WSG de cepas M627 e M629 e análise de glicana**

[00536] As cepas M627 e M629 de *T. reesei* foram fermentadas em 4% de WSG, 2% de glicose, 4% de celobiose, 6% de lactose, pH de 5,5 e amostragem foi realizada nos dias 3-6. As titulações de anticorpos estão mostradas na Tabela 19.4.

[00537] Para análise de N-glicanas, MAB01 foi purificado a partir de sobrenadantes de cultura usando placas com filtro com 96 cavidades HP MultiTrap de Proteína G (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de anticorpos foram determinadas através de absorbância de UV contra uma curva padrão para MAB01.

[00538] N-glicanas foram liberadas de anticorpo precipitado com EtOH e desnaturado com SDS usando PNGase F (Prozyme Inc.) em

tampão de fosfato de sódio a 20 mM, pH de 7,3, em reação durante a noite a 37 °C. As N-glicanas liberadas foram purificadas com Hypersep C-18 e Hypersep Hypercarb (Thermo Scientific) e analisadas com MALDI-TOF MS. Os resultados são apresentados na Tabela 19.6. Nas cepas M627 e M629, os níveis de GO variavam entre 24,3% a 41,7%; nenhum GO foi observado na cepa M507.

#### **Cultura em WSG em frascos de agitação das cepas M627 e M629 e análise de glicana**

[00539] As cepas M627 e M629 de *T. reesei* foram cultivadas em frascos de agitação em TrMM, 4% de lactose, 2% de SGE, PIPPS a 100 mM, pH de 5,5, a 28 °C. Amostragem foi feita no dia 5.

[00540] Para análise de N-glicanas, MAB01 foi purificado a partir de sobrenadantes de cultura usando placas com filtro com 96 cavidades HP MultiTrap de Proteína G (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de anticorpos em eluentes de proteína G foram determinadas através de absorbância de UV contra uma curva padrão para MAB01 (Tabela 19.5). As titulações em meio de cultura não foram medidas.

[00541] Liberação de N-glicanas foi realizada conforme acima, os resultados são apresentados na Tabela 19.7. Os níveis GO foram de 21,1 e 56,9% para M627 e M629, respectivamente.

**Tabela 19.4: Titulações de anticorpos em sobrenadantes de culturas de fermentação de cepas M627 e M629 fermentadas em meio WSG**

Cepa	Titulação (g/l)			
	dia 3	dia 4	dia 5	dia 6
M627	0,294	0,580	0,813	0,818
M629	0,292	0,538	0,755	0,821

[00542] **Tabela 19.5: Concentrações de anticorpo em eluentes de Proteína G de cepas M627 e M629 cultivadas em meio WSG em**

**frascos de agitação**

<b>Cepa</b>	<b>Titulação (g/l) em eluente de proteína G</b>
	<b>dia 5</b>
M507	0,303
M627	0,105
M629	0,103

**Tabela 19.6: Proporções relativas de N-glicanas neutras de anti-corpo purificado de cepas**

			<b>M627</b>				<b>M629</b>			
			<b>d3</b>	<b>d4</b>	<b>d5</b>	<b>d6</b>	<b>d3</b>	<b>d4</b>	<b>d5</b>	<b>d6</b>
<b>Composição</b>	<b>Curta</b>	<b>m/z</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Hex3HexNAc2	Man3	933,31	3,7	7,9	10,6	11,5	2,6	6,6	11,5	12,2
Hex4HexNAc2	Man4	1095,37	2,1	1,9	2,2	1,9	1,6	1,8	2,1	2,2
Hex3HexNAc3	GnMan3	1136,40	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0	0,2	0,4	0,1
Hex5HexNAc2	Man5	1257,42	1,4	1,7	1,3	1,4	1,5	1,3	1,3	1,0
Hex3HexNAc4	GO	1339,48	31,7	32,6	28,3	25,0	41,7	40,0	42,9	24,3
Hex6HexNAc2	Hex6	1419,48	60,0	55,5	57,2	60,0	51,6	49,9	41,3	59,8
Hex7HexNAc2	Hex7	1581,53	1,1	0,3	0,3	0,2	0,9	0,3	0,4	0,4
Hex8HexNAc2	Hex8	1743,58	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabela 19.7: Proporções relativas de N-glicanas neutras de anti-corpo purificado no dia 5 das cepas M627 e M629 cultivadas em meio WSG em frascos de agitação**

			<b>M627</b>	<b>M629</b>
<b>Composição</b>	<b>Curta</b>	<b>m/z</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
Hex3HexNAc2	Man3	933,31	47,9	7,2
Hex4HexNAc2	Man4	1095,37	2,5	2,0
Hex3HexNAc3	GnMan3	1136,40	0,0	0,8
Hex5HexNAc2	Man5	1257,42	0,0	1,4
Hex3HexNAc4	GO	1339,48	21,1	56,9
Hex6HexNAc2	Hex6	1419,48	28,4	31,4



Hex7HexNAc2	Hex7	1581,53	0,0	0,4
Hex8HexNAc2	Hex8	1743,58	0,0	0,0

**Exemplo 20 - GERAÇÃO DE CEPAS QUE PRODUZEM GLCNAC-MAN5 COM DIFERENTES PROMOTORES**

[00543] Os vetores para GnTI com diferentes promotores são descritos na Tabela 20.1. Os vetores foram objetivados ao *locus* de *egl2* de *T. reesei*.

**Tabela 20.1: Descrição de vetores de GnTI humana com diferentes promotores**

pTTg153	pcDNA1-Kre2-GnTI para Egl2
pTTg167	Pcbh1-Kre2-GnTI para Egl2
pTTg168	pgpdA-Kre2-GnTI para Egl2
pTTg170	pgpdA-GnTI para Egl2
pTTg171	pcbhl-Kre2-GnTI para Egl2 (GnTI inativa)

**Materiais e Métodos**

[00544] A estratégia para a geração de fragmentos de vetores da Tabela 20.1 é apresentada na Tabela 20.2 e os iniciadores usados para a geração de fragmentos são listados na Tabela 20.3. Os fragmentos foram amplificados por PCR e os produtos foram purificados do gel de agarose. Vetor pTTg152 digerido foi purificado do gel. Todas as amplificações por PCR foram realizadas com polimerase Phusion de alta fidelidade (Finnzymes). Fragmentos de pTTg153-pTTg171 foram eletroporados na levedura *Saccharomyces cerevisiae* FY834 para montagem de plasmídeo por recombinação homóloga. As células de levedura foram cultivadas em SC-ura para cultura de 2-3 dias a 30 °C. As colônias foram, então, reunidas das placas e plasmídeo reunido foi purificado com o método de extração com fenol/clorofórmio, conforme rotineiro. O agrupamento de plasmídeos foi transformado em células de *E. coli* competentes por eletroporação. As células eletroporadas foram colocadas em placas de seleção com LB + amp, cultivadas 37

°C durante a noite e as colônias foram rastreadas por PCR. As colônias positivas foram, então, cultivadas em placas frescas como culturas puras, colônias individuais foram cultivadas em meio líquido LB + amp e vetores pTTg153-pTTg171 potenciais foram purificados de acordo com protocolos padrões. Os plasmídeos foram analisados por análise de restrição e as sequências foram verificadas por sequenciamento.

**Tabela 20.2: Estratégia de construção de vetores. Vetores pTTv225, pTTv77, pTTg91 foram usados para a construção dos fragmentos especificados em baixo. Vetores pTTv110, pTTv141, pTTv11 e pTTv13 são descritos no Pedido de Patente Internacional N° PCT/EP2011/070956**

Código de vetor	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Fragmento 4
pTTg153	Produto de PCR de pTTv225, modelo GP346, GP471	Produto de PCR de pTTv11, modelo GP472, GP345	Produto de PCR de pTTv77, modelo GP348, GP349, > sequência de fragmento de região de flaqueamento 3' de egl2	pTTv77 cortado com ClaI e FseI
pTTg167	Produto de PCR de pTTv110, modelo GP337, GP338	Produto de PCR de pTTv225, modelo GP335, GP402 > promotor de cDNA1 - amplificação de fragmento de sinalização de	Produto de PCR de pTTv11, modelo GP472, GP345	pTTg152 cortado com FseI e AscI

		objetivação de Kre2		
pTTg168	Produto de PCR de pTTv141, modelo GP343, GP347	Produto de PCR de pTTv225, modelo GP335, GP402	Produto de PCR de pTTv11, modelo GP472, GP345	pTTg152 cor-tado com Fsel e Ascl
pTTg170	Produto de PCR de pTTv13, modelo GP343, GP399	pTTg152 cor-tado com Fsel e Sall	n/a	n/a
pTTg171	Produto de PCR de pTTv110, modelo GP400, GP401	Produto de PCR de pTTv225, modelo GP335, GP402	Produto de PCR de pTTg91, modelo GP403, GP404, amplifi-cação de fragment de Gntl inativa	pTTg152 cor-tado com Fsel e Sall

**Tabela 20.3: Iniciadores usados para a construção de vetores da Tabela 20.2**

Códi-go	Sequência 5' > 3'
GP335	ATGGCGTCAACAAATGCGCGCTATGT
GP337	ATTCACACTCTCAGAATAAATTCAT- GCCAATTTGACAGGCCGGCCATTCTCACGGT GAATGTAGGCCTTTTGTA
GP338	TTAGTAGATAGCGCACATAGCGCGCATTTGTTGACGCCATGCGGTTGACT - ATTGGG TTTCTGTGCCTCAAAAGAT
GP343	CACACTCTCAGAATAAATTCATCGCCAATTTGACAGGCCGGCCGCCCTTG - TATCTCT ACACACAGGCTCAA
GP345	CTGCAGTGCAGGATCTGCATATATG
GP346	TTATTCACACTCTCAGAATAAATTC- TCGCCAATTTGACAGGCCGGCCACTAGTGGT CTGAAGGACGTGG
GP347	TTAGTAGATAGCGCACATAGCGCGCATTTGTTGACGCCATCTGATGTCTG - CTCAAG CGGGGTA
GP348	AGGACCTTAATTAATCATATATGCA-

	ATCCTGCACTGCAGGCGGCCGCACTCTGA GCTGAATGCAGAAGC
GP349	CTTGACCTCGGAGAAAGTTACCCTC- TTTTGTCAGACACGATCGATTTCACAGAT GGAAAGAAGAAAGG
GP399	AATACCGCCGCACTGGCCGTAGTGA- ACTGGGTAGGTCGACTAATTCCAGCTGGG ATCATA
GP400	CACACTCTCAGAATAAATTCATCGCCAATTTGACAGGCCGGCCAATTCTC - ACGGTG AATGTA
GP401	TTAGTAGATAGCGCACATAGCGCGCATTTGTTGACGCCATGCGGTTGACT - ATTGGG
GP402	TTCGAGGGCCGGGAGCGATGCCGA
GP403	GGCTTCAACGACCTCGTCGGCATCG- TCCCGGCCCTCGAAACGCGCCCAGCACCT GGCA
GP404	ATACCGCCGCACTGGCCGTAGTGAG- CTGGGTAGGTCGACTAATTCCAGCTAGGA TCATA
GP471	AGAATACCGGATTACTGATCCGGAGAATACTTTGTAAATAGCGGCCGCGG - CTGATG AGGCTGAGAGAGG
GP472	CAACGACCTCGTCGGCATCGCTCCC- GCCCTCGAATGAACGGGGATGCCCTGTCTG AGC

[00545] A cepa M507 de *Trichoderma reesei* que expressa MAB01 com deleção de protease de 7 vezes foi transformada com os fragmentos *Pmel* de vetores pTTg153-pTTg171 objetivados ao *locus* de *egl2*. Quantidade variável de transformantes foram colocadas sobre em placas seletivas. Com base em rastreamento por PCR com kit Phire Plant Direct PCR (Finnzymes F-130), clones com resultados positivos referentes à integração 5' e 3' foram selecionados para placas com esporos únicos e novo rastreamento quanto à integração e deleção de *egl2*. Cepas selecionadas por PCR foram finalmente submetidas à cultura em frasco de agitação e análise de glicanas.

***Culturas em frascos de agitação de cepas M507 transformadas com GnTI e construtos de promotor***

[00546] A cepa M507 transformada com vetores das Tabelas 20.1 e 20.2 foram cultivadas em frascos de agitação em TrMM, 4% de lactose, 2% de SGE, PIPPS a 100 mM, pH de 5,5, a 28 °C e amostragem foi realizada no dia 5. Um construto de GnTI inativo foi testado para determinar possíveis efeitos de glicanas GlcNAcMan5 sobre o crescimento de *T. reesei*.

[00547] Para análise de N-glicanas, MAB01 foi purificado, as concentrações foram determinadas e N-glicanas analisadas com MALDI-TOF MS conforme descrito acima. Análise de N-glicanas de MAB01 mostrou que os níveis de GnMan5 variavam de 8 a 79,2% das glicanas totais (Tabelas 20.4 e 20.5A e B). A GnTI inativa produziu glicosilação de tipo selvagem, conforme esperado.

**Tabela 20.4: Construtos GnTI e concentrações de anticorpos. Números de cepa para clones selecionados são fornecidos entre parênteses na coluna "Clones".**

Focus/vector	Clones	Titulação de anticorpo g/L em eluente de ProtG
pTTg167	33-6A	0,15
	33-6B (M704)	0,14
pTTg168	34-6A	0,53
	34-45A(M706)	0,51
pTTg170	1A	0,55
	2A(M710)	0,73
pTTg171	2A	0,7
	6A(M712)	0,55
pTTg153	11A	1,03
	23A(M702)	0,99
M507		0,68

**Tabelas 20.5A e B: Proporções relativas de N-glicanas neutras de MAB01 no dia 5**

Tabela A			1A	2A (pTTg170)	34- 6A	34- 45A	33- 6A	33- 6B
Composição	Curta	m/z	%	%	%	%	%	%
Hex3HexNAc2	Man3	933,31	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex4HexNAc2	Man4	1095,37	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex5HexNAc2	Man5	1257,42	85,0	74,3	24,5	19,6	5,0	5,8
Hex3HexNAc4	GO	1339,48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex6HexNAc2	Man6	1419,48	5,7	5,5	13,4	10,3	5,9	7,2
Hex5HexNAc3	GnMan5	1460,50	2,5	10,8	42,9	56,7	79,2	77,9
Hex7HexNAc2	Man7	1581,53	3,7	5,2	11,0	8,0	5,6	5,1
Hex8HexNAc2	Man8	1743,58	2,2	2,8	6,0	4,3	4,4	4,0
Hex9HexNAc2	Man9	1905,63	0,9	1,4	2,0	1,1	0,0	0,0
Hex10HexNAc2	Man10	2067,69	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0

Tabela B			2A (pTTg171)	6A	11A	23A
Composição	Curta	m/z	%	%	%	%
Hex3HexNAc2	Man3	933,31	0,0	0,0	0,0	1,6
Hex4HexNAc2	Man4	1095,37	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex5HexNAc2	Man5	1257,42	85,7	89,5	71,8	70,1
Hex3HexNAc4	GO	1339,48	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex6HexNAc2	Man6	1419,48	6,1	4,3	10,5	7,2
Hex5HexNAc3	GnMan5	1460,50	0,0	0,0	8,0	12,2
Hex7HexNAc2	Man7	1581,53	4,8	3,6	6,4	5,5
Hex8HexNAc2	Man8	1743,58	2,8	1,9	2,6	2,4
Hex9HexNAc2	Man9	1905,63	0,6	0,7	0,7	1,0
Hex10HexNAc2	Man10	2067,69	0,0	0,0	0,0	0,0

***Culturas em fermentador da cepa M507 transformada com construtos de GnTI***

[00548] As cepas M702, M704, M706, M710, M712, M716 e M507 de *T. reesei* foram fermentadas em 4% de WSG, 2% de Glc, 4% de

celobiose, 6% de lactose, pH de 5,5 e amostragem foi realizada nos dias 3-6. As titulações de anticorpos são mostradas na Tabela 20.6. N-glicanas foram liberadas e analisadas conforme descrito acima usando PNGase F.

[00549] Análise de N-glicanas de MAB01 mostrou que os níveis de GnMan5 variavam de 1,8 a 68,5% das glicanas totais (Tabelas 20.7 A, B e C). A GnTI inativa produziu glicosilação de tipo selvagem, conforme esperado, assim como a cepa M507 de controle.

**Tabela 20.6: Concentrações de anticorpos MAB01**

Cepa	Titulação g/l			
	d3	d4	d5	d6
M702	1,23	1,72	2,14	2,34
M704	0,299	0,399	0,415	0,479
M706	0,293	1,04	1,65	2,04
M710	0,951	1,09	1,32	1,69
M712	1,34	1,93	2,34	2,4
M716	0,16	0,519	1,11	1,69
M507	1,04	1,81	2,24	2,3

**Tabelas 20.7 A, B e C: Proporções relativas de N-glicanas neutras sobre MAB01 nos dias 3, 4, 5 e 6**

			M702				M704				M706			
			d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6
Composição	Curta	m/z	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Hex4HexNAc2	Man4	1095,4	0,0	0,5	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,5	0,5
Hex5HexNAc2	Man5	1257,4	36,0	46,8	55,7	72,1	9,7	12,9	16,1	20,3	21,6	45,5	63,3	70,5
Hex6HexNAc2	Man6	1419,5	11,5	12,1	9,8	6,2	9,2	7,2	5,6	10,1	13,0	8,6	7,8	5,5
Hex5HexNAc3	Gn-Man5	1460,5	40,5	29,7	25,1	14,8	67,5	68,5	64,9	51,9	45,7	39,2	22,2	17,1

Hex7HexNAc2	Man7	1581,5	7,6	6,8	5,3	4,6	8,4	6,8	6,9	9,1	11,9	4,1	3,5	3,3
Hex8HexNAc2	Man8	1743,6	3,7	3,2	2,8	2,2	4,2	3,7	5,2	5,1	5,8	2,1	2,0	2,2
Hex9HexNAc2	Man9	1905,6	0,8	0,8	0,7	0,0	1,0	0,8	1,1	3,4	1,5	0,5	0,4	0,4
Hex10HexNAc2	Man 10	2067,7	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,2	0,3

Tabela B			M710				M712			
			d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6
Composição	Curta	m\z	%	%	%	%	%	%	%	%
Hex4HexNAc2	Man4	1095,4	0,4	0,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
Hex5HexNAc2	Man5	1257,4	72,0	72,6	78,5	84,2	76,7	85,0	85,6	89,8
Hex6HexNAc2	Man6	1419,5	13,9	13,4	11,0	6,3	12,4	8,4	7,6	4,2
Hex5HexNAc3	GnMan5	1460,5	2,5	3,3	2,1	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex7HexNAc2	Man7	1581,5	7,5	6,8	5,0	3,6	7,4	4,4	4,1	3,3
Hex8HexNAc2	Man8	1743,6	3,3	2,9	2,6	1,8	2,7	2,1	1,9	2,1
Hex9HexNAc2	Man9	1905,6	0,5	0,6	0,4	0,5	0,7	0,0	0,4	0,6
Hex10HexNAc2	Man 10	2067,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela C			M716				M507			
			d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6
Composição	Curta	m\z	%	%	%	%	%	%	%	%
Hex4HexNAc2	Man4	1095,4	0,0	0,0	0,3	0,4	0,0	0,4	0,0	0,0
Hex5HexNAc2	Man5	1257,4	62,1	73,8	84,8	85,5	70,7	79,5	87,3	89,6
Hex6HexNAc2	Man6	1419,5	14,9	10,0	7,2	7,8	17,2	12,5	8,1	5,4
Hex5HexNAc3	GnMan5	1460,5	4,3	4,2	1,8	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex7HexNAc2	Man7	1581,5	12,8	8,0	4,2	3,0	8,8	5,0	3,5	2,6
Hex8HexNAc2	Man8	1743,6	5,1	3,4	1,5	1,2	2,8	2,1	1,1	1,9
Hex9HexNAc2	Man9	1905,6	0,8	0,6	0,4	0,3	0,5	0,5	0,0	0,4
Hex10HexNAc2	Man 10	2067,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

### Exemplo 21 - GERAÇÃO DE CEPAS QUE PRODUZEM GLCNAC-MAN5 COM DIFERENTES PEPTIDEOS DE OBJETIVAÇÃO

#### Geração de plasmídeos



[00550] Os plasmídeos usados na geração de cepas de GNT1 com diferentes peptídeos de objetivação de Golgi (pTTv274, pTTv275, pTTv276, pTTv278, pTTv279, pTTv280) foram todos baseados no plasmídeo parental em comum pTTv265 que contém GNT1 humana (P26572) com um truncamento N-terminal de 38 aminoácidos. A linhagem de pTTv265 está resumida na Tabela 21.1.

**Tabela 21.1: Linhagem de plasmídeos com peptídeo de objetivação de Golgi pTTv274, pTTv275, pTTv276, pTTv278, pTTv279, pTTv280. Peptídeo de objetivação de Golgi foram adicionados aos plasmídeos de geração pTTv265 mencionados acima**

Plasmídeo	Conteúdo
pTTv77	Flanqueamento 5' e 3' de <i>egl2</i> , promotor de <i>cbh1</i> , marcador de loopout <i>pyr4</i> , esqueleto de pRS426
pTTv256	Promotor trocado para pTTv77: <i>cbh1</i> para <i>gpdA</i>
pTTv264	Marcador de seleção trocado para pTTv256: loopout de <i>pyr4</i> para higromicina
pTTv265	GNT1 humana (del38 aa) adicionada ao pTTv264

#### **Descrição Passo a Passo de Geração de Plasmídeos**

[00551] Plasmídeo pTTv77 contém regiões de flanqueamento 5' e 3' de *egl2* (tre120312) para integração objetivada ao genoma de *T. reesei* e o promotor de *cbh1* para expressão do gene. Integração do plasmídeo pTTv77 ao genoma resulta em deleção de 2456 pb no *locus* de *egl2*. Regiões de 1020 pb e 1024 pb do *locus* de *egl2* foram amplificadas para flanqueamento 5' e 3'. 2176 pb do *locus* de *cbh1* foram amplificados para o fragmento de promotor. Modelo usado nas reações de PCR foi o DNA genômico de *T. reesei*. Iniciadores usados em reações de PCR são mostrados na Tabela 21.2. O cassete desintegrador de *pyr4* era um fragmento *NotI* de pTTv71 descrito acima e o esqueleto de vetor foi pRS426 digerido com *EcoRI/XhoI* descrito acima. Todos os fragmentos foram purificados através de métodos de

laboratório convencionais e o plasmídeo foi clonado pelo método de recombinação de levedura conforme descrito nos Exemplos. Após recuperação de plasmídeo de *E. coli*, alguns clones foram verificados quanto à recombinação correta. Clone armazenado foi verificado por sequenciamento.

**Tabela 21.2: Iniciadores usados na clonagem de pTTv77**

Nome Iniciador	Iniciador sequência
T575_egl2_5'flanq_F	GATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGT- CACGACG GTTTAAACTCCAAAGTTCCTGTCTTCTCC
T576_egl2_5'flanq_R	TGTCAAATTGGCGATGAATTTAT
T577_egl2-cbh1_prom+term_F	TTATTCACACTCTCAGAATAAATTCATCGCCAATTT- GACA GGCCGGCCGGGTAGGAATTGTCACTCAAG
T572_cbh1_prom+term_R	GCAACGAGAGCAGAGCAGCAGTAGTCGATGCTAG GCGGCCGCGGCCGCTCATCGTCTTGACAGCAATGC
T578_egl2_3'flanq_F	ACCAGCCGCAGCCTCAGCCTCTCTCAGCCTCAT- CAGCCGC GCGGCCGCCACTCTGAGCTGAATGCAGA
T579_egl2_3'flanq_R	CCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT- CACA GTTTAAACGCGCTGCCTCCACGATGT

[00552] O plasmídeo pTTv256 é baseado no plasmídeo pTTv11. No plasmídeo pTTv256, o promotor de *cbh1* foi trocado para *gpdA*. Para clonar pTTv256, o plasmídeo pTTv11 foi digerido com *FseI/PacI* para liberar o promotor de *cbh1*. Novo promotor, *gpdA* de *A. Nidulans*, foi liberado do plasmídeo com digestão por *FseI/PacI*. Purificação de fragmento e clonagem foram realizadas usando métodos de laboratório convencionais. Alguns clones foram verificados quanto à ligação correta. Clone armazenado foi verificado por sequenciamento.

[00553] O plasmídeo pTTv264 é baseado no plasmídeo pTTv256. Em pTTv264, o marcador de seleção foi trocado do cassete desintegrador de *pyr4* para o marcador de seleção *hygR*. Para clonar pTTv264, o plasmídeo pTTv256 foi digerido com *NotI* para liberar o cassete desintegrador de *pyr4*. Marcador *hygR* foi amplificado por

PCR usando pRLMex30 modificado como um modelo com os iniciadores mostrados na Tabela 21.3. Todos os fragmentos foram purificados usando métodos de laboratório convencionais e o plasmídeo foi clonado pelo método de recombinação de levedura descrito nos Exemplos. Após recuperação de plasmídeo de *E. coli*, alguns clones foram verificados quanto à recombinação correta e o clone armazenado foi verificado por sequenciamento.

**Tabela 21.3: Iniciadores usados na clonagem de pTTv264**

Nome do iniciador	Sequência do iniciador
<b>T974-</b>	GACCAACTTGTCCGTTGCGAGGCCA-
<b>Cbh1t+NotI+promotor</b>	ACTTGCATTGCTGT
<b>PKI na extremidade 5'</b>	CAAGACGATGAGCGGCCGCATA- ACGGTGAGACTAGCGGC
<b>T942_pTTv256_3'end+NotI+tcbh2_rev</b>	ATACAAACGTTGGCGAGGCTTCTG- CATTGAGCTCAGAGTG GCGGCCGCGTGCTGCGGAATCAT- TATCATCTG

[00554] O plasmídeo pTTv265 é baseado no plasmídeo pTTv264 descrito acima. Em pTTv265, GNT1 humana com truncamento N-terminal de 114 ácidos nucleicos (38 aminoácidos) foi adicionado sob o promotor *gpdA*. Para clonar pTTv265, o plasmídeo pTTv264 foi linearizado com *PacI*. GNT1 humana foi amplificada por PCR a partir do plasmídeo sintético pTTv1 trazendo um gene de GNT1 humana de comprimento total (P26572, pTTv11 é também descrito no Pedido de Patente Internacional Nº PCT/EP2011/070956). Os iniciadores usados para a amplificação são mostrados na Tabela 21.4. Todos os fragmentos foram purificados usando métodos de laboratório convencionais. O plasmídeo foi clonado pelo método de recombinação de levedura descrito acima. Após recuperação do plasmídeo de *E. coli*, alguns clones

foram verificados quanto à recombinação correta e o clone armazenado foi verificado por sequenciamento.

**Tabela 21.4: Iniciadores usados na clonagem de pTTv265**

Nome do iniciador	Sequência do iniciador
<b>T943_</b>	GCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCA-
<b>GPDAp+TC+Pacl+GNT1_</b>	GACATCA
<b>F</b>	TCTTAATTAATCAGTCAGCGCTCTCGATGGC
<b>T944_</b>	<b>C-</b> CCAATACCGCCGCACTGGCCGTAGTGA-
<b>bh1t(pTTv256)+Swal+GNT</b>	GACTGGGTAG
<b>1_R</b>	GTCATTAAATCTAATTC- CAGCTGGGATCATAG

[00555] A sequência de aminoácidos de GnTI truncada de 38 aminoácidos no plasmídeo pTTv11 para construção de pTTv265.

SVSALDGPASLTREVIRLAQDAEV-  
LERQRGLLQQIGDALSSQRGRVPTAAP PAQPRVPVTPAPAVIPIL-  
VIACDRSTVRRCLDKLLHYRPSAELFPIIVSQDCGHEETAQAIA  
SYGSAVTHIRQPDLSIAVPPDHRK-  
QGYKIRHYRWALGQVFRQFRFPAAVVEDDL  
EVAPDFFEYFRATYPLLKADPSLWC-  
SAWNDNGKEQMVDASRPELLYRTDFFPGLGWL  
LLAELWAELEPKWPKAFWDDWMRRP-  
QRQGRACIRPEISRTMTFGRKGVSHGQFFDQH  
LKFIKLNQQFVHFTQLDLSYLQREA-  
DRDFLARVYGAPQLQVEKVRTNDRKELGEVRV  
QYTGRDSFKAFKALGVMDDLKSGV-  
RAGYRGIVTFQFRGRRVHLAPPPTWEGYDPSW  
N

[00556] Os plasmídeos pTTv274, pTTv275, pTTv276, pTTv278, pTTv279 e pTTv280 foram todos baseados no plasmídeo pTTv265 descrito acima. Nestes plasmídeos, diferentes peptídeos que objetivam Golgi foram adicionados para preceder o gene de GNTI humana N-terminalmente truncado. Para clonar estes plasmídeos, pTTv265 foi

linearizado com *PacI*. Diferentes peptídeos que objetivam Golgi foram amplificados por PCR usando os iniciadores mostrados na Tabela 21.5a. DNA modelo para GNT2 (pTTv274) foi o plasmídeo sintético trazendo gene de GNT2 humana com códon humanizado do Pedido de Patente Internacional N° PCT/EP2011/070956). Modelo para outros peptídeos que objetivam Golgi (pTTv276, pTTv278, pTTv279, pTTv280) foi DNA genômico de *T. reesei*. KRE2 (pTTv275) foi produzido por PCR usando os iniciadores de reconhecimento na Tabela 21.5A. Todos os fragmentos foram purificados através de métodos de laboratório convencionais e os plasmídeos foram clonados por meio do método de recombinação de levedura, conforme descrito nos Exemplos. Após recuperação de plasmídeo de *E. coli*, alguns clones de cada clonagem foram verificados quanto à recombinação correta e os clones armazenados foram verificados através de sequenciamento.

**Tabela 21.5A: Iniciadores usados para a produção de peptídeos de objetivação de Golgi em pTTv274, pTTv275, pTTv276, pTTv278, pTTv279 e pTTv280**

Plasmídeo	Iniciador	Sequência de Iniciador
pTTv274	T945_GNT2-gts-f	GCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT CATCATGCGCTTCCGAATCTACAAG
	T946_GNT2-gts-r	GGGTGAGGCTGGCGGGGTCGCCATCGAGAGCGCTG ACTGAGGGGTGATCCCCTCCCCTG
pTTv275	T1117_KRE2-gts-r	GCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT CATCATGGCGTCAACAAATGCGCGCTATGTGCGCTAT CTACTAATCGCCTTCTTCACAATCC
	T1118_KRE2-gts-cds-mid-F	TACTAATCGCCTTCTTCACAATCCTCGTCTTCTACTTTG TCTCCAATTCAAAGTATGAGGGCGTCGATCTCAACAA GGGCACCTT
	T1119_KRE2-gts-cds-R	GGGTGAGGCTGGCGGGGTCGCCATCGAGAGCGCTGA CTGACTTTGGTGTCGTCTTGGTCGAATCCGGAGCTGTG AAGGTGCCCTTGTTGAGATCGACGC
	T1120_gpdAp3prim-F	GCAGCTTGACTAACAGCTAC
	T1121 GNT1	GGGTGAGGCTGGCGGGGTC

Plasmídeo	Iniciador	Sequência de Iniciador
	5end-R	
pTTv276	T949_KRE2-like-gts-f	GCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT CATCATGGCCATTGCCCGGCCGGT
	T950_KRE2-like-gts-r	GGGTGAGGCTGGCGGGGTGCGCCATCGAGAGCGCTG ACTGAGCCCGTGGCTATCAAGAAGAAGAC
	T953_Och1-gts-f	GCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT CATCATGTTGAATCCACGCCGCG
pTTv278	T954_Och1-gts-r	GGGTGAGGCTGGCGGGGTGCGCCATCGAGAGCGCTG ACTGAGGACGTCGAGGCCGATTCTG
	T955_Anpl1-gts-f	GCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT CATCATGATGCCACGGCATCACTC
	T956_Anpl1-gts-r	GGGTGAGGCTGGCGGGGTGCGCCATCGAGAGCGCTG ACTGATTCTGAGCTTCAGGTCATCGT
pTTv280	T957_Van1-gts-f	GCAGCTTGACTAACAGCTACCCCGCTTGAGCAGACAT CATCATGCTGCTCCCCAAGGGCG
	T958_Van1-gts-r	GGGTGAGGCTGGCGGGGTGCGCCATCGAGAGCGCTG ACTGACTCAGATGCCGAAGTGGACAC

**Tabela 21.5B: Sequências de aminoácidos de peptídeos de objetivação em plasmídeos na Tabela 21.5**

Plasmídeo	Proteína	TreID	Sequência de aminoácidos
pTTv274	GNT2		MRFRYYKRKVLILTLVVAACGFVLWSSNGRQR
	humana		KNEALAPPLLDAAEPARGAGGRGDHP (SEQ ID-NO:589)
pTTv275	KRE2	21576	MASTNARYVRYLLIAFFTLVFYFVSNSKYEGV DLNKGFTAPDSTKTPK (SEQ ID NO:590)
pTTv276	Tipo	69211	MAIARPVRLGGLAAILWCFFLYQLLRPSSSY
	KRE2		NSPGDRYINFERDPNLDPTG (SEQ ID NO:591)
pTTv278	Och1	65646	MLNPRRALIAAAFILTVFFLISRSHNSEASTS (SEQ ID NO:592)
pTTv279	Anpl1	82551	MMPRHHSNGFSNGYPRADTFEISPHRFQPR TLPPHRKRKRTAIRVGIAVVVLVLVWFGQPR SVASLISLGILSGYDDLKLE (SEQ ID NO:593)
pTTv280	Van1	81211	MLLPKGGLDWSARAQIPPTRALWNAVTRTR FILLVGITGLILLWVRGVSTASASE (SEQ ID NO:594)

**Geração de Cepas com Diferentes Peptídeos que Objetivam Golgi**

**para GNT1**

[00557] Fragmentos para transformações foram liberados dos plasmídeos pTTv274 (GNT2), pTTv275 (KRE2), pTTv276 (tipo KRE2), pTTv278 (OCH1), pTTv279 (ANP1) e pTTv280 (VAN1) (Tabelas 21.5A e 21.5B) com *PmeI*. Todos os fragmentos foram transformados individualmente para a cepa M507 que expressa MAB01 e transformações de protoplastos foram realizadas essencialmente conforme descrito nos Exemplos para seleção com higromicina.

[00558] Clones que cresceram bem sobre listras seletivas foram selecionados para integração 5' e 3' no *locus* de *egl2*. Clones positivos para integração dupla foram adicionalmente rastreados quanto à perda de ORF de *egl2*. Os clones que fornecem os resultados desejados foram purificados através colocação em placa de esporos individuais e os clones derivados de esporos individuais foram verificados por PCR como sendo cepas de integração puras. Cepas resultantes são listadas na Tabela 21.6 a seguir.

**Tabela 21.6: Sumário das cepas com peptídeo que objetivam Golgi para GnTI**

<b>Cepa</b>	<b>Plasmídeo</b>	<b>Peptídeo de objetivação</b>	<b>TreID</b>
M607	pTTv274	GNT2 humana	-
M685	pTTv275	Kre2	21576
M610	pTTv276	Tipo Kre2	69211
M615	pTTv278	Och1	65646
M620	pTTv279	Anp1	82551
M622	pTTv280	Van1	81211

[00559] Fermentação de cepas M507, M607, M610, M615, M620, M622, M685 e análise de glicanas

[00560] As cepas M507, M607, M610, M615, M620, M622 e M685 de *T. reesei* foram fermentadas em 4% de grãos integrais consumidos, 2% de glicose, 4% de celobiose, 6% de lactose, pH de 5,5 e amostra-

gem foi realizada nos dias 3-6. As titulações de anticorpos são mostradas na Tabela 21.7. N-glicanas foram liberadas e analisadas conforme descrito acima usando PNGase F.

[00561] Análise de N-glicanas de MAB01 mostrou que os níveis de GnMan5 variavam entre 4 e 66% do total de glicanas (Tabelas 21.8 A, B e C). A cepa M507 de controle mostrou glicosilação de tipo selvagem, conforme esperado.

**Tabela 21.7: Concentrações de anticorpos de cepas com GnTI humano com diferentes peptídeos de objetivação**

Cepa	Titulação g/l			
	d3	d4	d5	d6
<b>M507</b>	0,882	1,54	1,94	2,09
<b>M607</b>	0,536	1,45	2,22	2,28
<b>M610</b>	0,352	1,04	1,87	2,19
<b>M615</b>	0,554	1,15	1,76	1,9
<b>M620</b>	0,559	1,24	1,95	2,21
<b>M622</b>	0,697	1,36	1,8	2,04
<b>M685</b>	0,388	1,05	1,94	2,44

**Tabelas 21.8 A, B e C: Proporções relativas de N-glicanas neutras de MAB01 nos dias 5, 3, 4 e 6 de cepas com GnTI humano com diferentes peptídeos alvo.**

			M507				M607				M610			
			d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6
Composição	Curta	m/z	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Hex4HexNAc 2	Man4	1095, 4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Hex5HexNAc 2	Man5	1257, 4	79, 3	89, 4	88, 4	93, 6	11, 5	24, 7	37, 0	42, 8	29, 4	44, 5	68, 8	74, 3
Hex4HexNAc 3	Gn- Man4	1298, 5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex6HexNAc	Man6	1419,	12,	7,0	7,0	3,9	8,8	7,4	4,0	2,5	7,0	6,3	6,2	2,9



2		5	3											
Hex5HexNAc 3	Gn- Man5	1460, 5	0,0	0,0	0,0	0,0	66, 1	59, 4	56, 0	49, 6	52, 5	44, 0	21, 1	18, 9
Hex7HexNAc 2	Man7	1581, 5	6,3	2,6	3,2	1,9	8,6	4,8	1,9	3,5	7,3	3,7	2,7	2,7
Hex6HexNAc 3	Gn- Man6	1622, 6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,7	0,0	0,0	1,0	0,4	0,0	0,0
Hex8HexNAc 2	Man8	1743, 6	1,6	1,0	1,2	0,7	2,8	2,2	0,9	1,2	2,1	1,1	1,1	0,8
Hex9HexNAc 2	Man9	1905, 6	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,2	0,2	0,4	0,7	0,0	0,1	0,2
Hex10HexNAc2	Man 10	2067, 7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela B			M615				M620			
			d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6
Composição	Curta	m\z	%	%	%	%	%	%	%	%
Hex4HexNAc2	Man4	1095,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Hex5HexNAc2	Man5	1257,4	21,7	36,4	54,1	51,5	22,0	35,5	50,8	63,9
Hex4HexNAc3	GnMan4	1298,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex6HexNAc2	Man6	1419,5	10,7	7,7	6,3	4,2	10,5	6,6	5,5	4,3
Hex5HexNAc3	GnMan5	1460,5	57,0	50,1	36,5	38,8	57,3	53,0	40,5	28,0
Hex7HexNAc2	Man7	1581,5	7,4	3,9	2,0	3,6	7,2	3,3	2,3	2,4
Hex6HexNAc3	GnMan6	1622,6	0,8	0,3	0,0	0,3	1,2	0,4	0,0	0,0
Hex8HexNAc2	Man8	1743,6	2,4	1,4	1,0	1,3	1,6	1,1	0,9	1,1
Hex9HexNAc2	Man9	1905,6	0,0	0,2	0,0	0,4	0,3	0,2	0,0	0,1
Hex10HexNAc2	Man 10	2067,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela C			M622				M685			
			d3	d4	d5	d6	d3	d4	d5	d6
Composição	Curta	m\z	%	%	%	%	%	%	%	%
Hex4HexNAc2	Man4	1095,4	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex5HexNAc2	Man5	1257,4	63,8	77,9	85,6	85,0	29,7	43,1	70,3	78,3
Hex4HexNAc3	GnMan4	1298,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Hex6HexNAc2	Man6	1419,5	15,0	9,1	7,3	4,9	6,5	6,5	5,2	3,8
Hex5HexNAc3	GnMan5	1460,5	6,4	7,8	4,1	4,9	56,3	44,9	21,7	14,7

Hex7HexNAc2	Man7	1581,5	10,7	4,0	2,3	3,5	4,8	3,7	2,0	2,1
Hex6HexNAc3	GnMan6	1622,6	0,5	0,0	0,0	0,0	0,9	0,3	0,0	0,0
Hex8HexNAc2	Man8	1743,6	3,3	1,1	0,6	1,2	1,9	1,2	0,7	1,1
Hex9HexNAc2	Man9	1905,6	0,3	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,0
Hex10HexNAc2	Man 10	2067,7	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0

### **Exemplo 22 - SILENCIAMENTO DE GENES *SLP* VIA RNAI E DELEÇÃO DE *SLP2***

[00562] Três construtos de silenciamento foram construídos para realizar *knockout* de expressão de *slp2* (tre123244). Estes construtos de RNAi contêm um promotor *gpdA*, integração objetivada para o *locus* de protease *pep2* (tre53961) e um marcador de *loopout* *pyr4* com repetição direta de *pep2* 3'. Duas sequências alvo curtas de 19 pb e uma sequência grande de 448 pb foram inseridas neste vetor para criar pTTv217, pTTv218 e pTTv263, respectivamente. Estes vetores foram concebidos para *knockdown* de expressão de *slp2* e reduzir sua atividade de protease. Os vetores de RNAi foram transformados na versão *pyr4* da cepa M507 que produz MAB01. O vetor pTTv204 é mostrado na Figura 52.

[00563] O vetor de expressão de RNAi pTTv204 foi linearizado com a enzima de restrição AsiSI. Os iniciadores T846 e T847 foram recozidos juntos e integrados através de recombinação de levedura no vetor pTTv204. Os iniciadores são mostrados na Tabela 22.1. A sequência alvo de 19 pares de base está contida no vetor pTTv217 resultante. Os iniciadores T848 e T849 foram recozidos juntos e integrados no vetor pTTv204 linearizado para criar o vetor de RNAi pTTv218. Este vetor contém uma sequência alvo de 19 pares de base. Os iniciadores são mostrados na Tabela 22.1. As sequências alvo são mostradas na Tabela 22.2.

[00564] O vetor pTTv263 foi feito em duas partes e integrado no vetor pTTv204. Os iniciadores T965 e T967 foram usados para amplificar um fragmento senso de 506 pares de bases, incluindo a sequência

intrônica de 58 pares de bases no gene *slp2*. O vetor pTTv204 foi aberto com a enzima de restrição *AsiI* e o fragmento senso de 506 pb foi integrado no vetor de levedura através de recombinação. Os iniciadores T1006 e T1007 foram usados para amplificar um fragmento anti-senso de 448 pares de base. O fragmento antisenso foi digerido com enzimas de restrição *AscI* e *FseI*. O vetor que inclui o fragmento de sentido, também foi digerido com *FseI* e *AscI*. O fragmento de vetor e fragmento antisenso foram ligados juntos para criar o vetor pTTv263. Os iniciadores são listados na Tabela 22.1. A sequência alvo é mostrada na Tabela 22.2.

[00565] Os vetores de RNAi pTTv217, pTTv218, pTTv263 foram digeridos com *PmeI* para liberar o cassete de expressão. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose e os fragmentos corretos foram isolados com um kit de extração em gel (Qiagen) usando métodos de laboratório convencionais. Aproximadamente 5 µg do cassete de expressão foram usados para transformar a cepa M507 que expressa anticorpo MAB01 (versão *pyr4*<sup>-</sup>). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam seleção com *pyr4*.

[00566] A sequência alvo curta no vetor pTTv217 foi concebida para afetar apenas especificamente *slp2*. A sequência alvo pTTv218 era homóloga a *slp3*, *slp5* e *slp6*. A grande sequência alvo de 448 pb no vetor pTTv263 era para afetar várias subtilisinas. As sequências alvo nestes vetores são listadas na Tabela 22.2. As cepas M665, M666 e M667 com *knockdown* resultantes foram cultivadas em culturas em pequena escala.

[00567] Vários transformantes pTTv217, pTTv218 e pTTv263 foram cultivados em culturas em 24 cavidades para comparar sua produção de MAB01 contra a cepa M507 de controle. As cepas foram cultivadas

em TrMM com citrato de diamônio sem sulfato de amônio, PIPPS a 100 mM, 2% de extrato de grãos consumidos, 4% de lactose em um pH de 5,5. Cavidades em duplicata foram usadas para cada transformante. Amostras das culturas em 24 cavidades coletadas no dia 6 foram usadas para imunoblot. O sobrenadante foi diluído com tampão de citrato de sódio, pH de 5,5, de modo que 0,5 µl de cada sobrenadante pudessem ser carregados no gel Criterion a 4-15%, misturado com LSB + BME e aquecido a 95 °C durante 5 minutos. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose com o mata-borrão Criterion a 100 volts durante 30 minutos. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 5% de leite em TBST durante 1 hora. A cadeia pesada foi detectada com anticorpo anticadeia pesada AP-conjugado (Sigma #A3188) diluído a 1:10000 em TBST. Após 1 hora de incubação com o anticorpo de detecção, a blot foi lavada com TBST e a membrana revelada com substrato AP (Promega).

[00568] Os resultados podem ser vistos na Figura 53. O transformante 217.12G produziu quantidades ligeiramente mais elevadas de cadeia pesada comparado com M507 ou o segundo transformante 217.12E. O aprimoramento mais notável foi observado com os transformantes pTTv218. Três transformantes foram significativamente melhores do que o controle. O 218.25F foi o destaque óbvio. Os resultados para os transformantes pTTv263 foram mais variáveis. Dois transformantes produziram muito pouca cadeia pesada de anticorpo. O transformante 263.11 OF pareceu produzir cadeia pesada duas vezes mais do que o controle.

[00569] Os construtos que tinham como alvo várias proteases foram mais bem sucedidos para aprimorar a expressão de cadeia pesada. Em geral, os transformantes pTTv218 foram consistentemente melhores do que a cepa M507 de controle. A falta de produção observada em dois dos transformantes pTTv263 indicou que o RNAi funcionou

muito bem. Quando o gene *slp2* foi deletado, o crescimento da cepa sofreu e, assim, a expressão de anticorpo reduziu também. Os transformantes 263.36A e 263.124C crescem muito mal e expressam muito pouco *slp2*. Isto foi confirmado por estudos em frasco de agitação e qPCR.

[00570] Medições de peso seco de culturas em frasco de agitação podem ser vistas na Tabela 22.5. As cepas foram cultivadas em TrMM com citrato de diamônio sem sulfato de amônio, PIPPS a 100 mM, 2% de extrato de grãos consumidos, 4% de lactose em um pH de 5,5. Frascos em duplicata foram usados para cada transformante. O transformante 263.124C tinha dificuldade de crescimento. Em geral, houve uma pequena redução da taxa de crescimento de todas as cepas que expressam RNAi. Este efeito pode estar relacionado a baixos níveis de expressão de *slp2*.

[00571] Para confirmar que a expressão *slp2* foi efetivamente reduzida pela expressão de RNAi, estudos de qPCR foram feitos com o micélio de estudo em frasco de agitação. O RNA foi purificado a partir de micélio cultivado em frasco de agitação, o cDNA foi sintetizado e análise por qPCR feita. A expressão de *slp2*, *slp3*, *slp5*, *slp6* e *gpd1* foi monitorada com iniciadores específicos para os genes. As "fold changes" foram medidas contra uma cepa de controle. A expressão foi normalizada com *gpd1*.

[00572] O transformante 263.124C mostrou a maior regulação negativa de *slp2* (Tabela 22.6). O grande RNAi induziu à regulação negativa de 36 vezes do gene *slp2*, até o ponto em que ele foi quase inativado. Os outros transformantes mostraram uma atividade de *knock-down* muito mais leve que variava de 1,2 a 2,5 vezes. O *knockdown* mais leve é mais preferido porque a cepa cresce melhor e pode produzir bons níveis de anticorpos.

[00573] Com dois transformantes, foi observado mais de perto co-

mo as outras subtilisinas eram afetadas pela expressão de RNAi. No transformante 263.124C, era evidente que *slp3* e *slp6* também sofreram *knockdown* em 6 e 2,3 vezes, respectivamente. Com a cepa 218.25F com *knockdown* mais leve, tanto *slp2* quanto *slp3* mostraram redução de expressão de 1,7 e 1,8 vezes.

### **Geração de cepa M646 com deleção de 8 vezes, Incluindo deleção de *slp2***

[00574] A cepa M646 com deleção de *slp2* foi feita transformando o cassete de deleção pTTv115 em M564 (versão *pyr4*- de M507). A cepa M564 *pyr4*- foi criada essencialmente conforme descrito no Exemplo 3 para remoção do cassete de desintegrador de *pyr4* da cepa M195 ( $\Delta pep1$ ). Etapas consecutivas de seleção com 5-FOA foram realizadas para assegurar que os clones selecionados fossem provenientes de células únicas.

[00575] O cassete de deleção contendo as regiões de flanqueamento de *slp2* e marcador *pyr4* foi removido do vetor através de digestão com *PmeI* e o fragmento correto foi purificado a partir de um gel de agarose usando um QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Aproximadamente 5  $\mu$ g do cassete de deleção foram usados para transformar a cepa M564 que produz MAB01 ( $\Delta pep1 \Delta tsp1 \Delta slp1 \Delta gap1 \Delta gap2 \Delta pep4 \Delta pep3$ , *pyr4*-). Preparo de protoplastos e transformação foram realizados essencialmente conforme descrito no Exemplo 1 para as cepas M181 e M195 que usam a seleção com *pyr4*.

[00576] Os transformantes foram escolhidos como primeiras listras. Listras em crescimento foram testadas por PCR (usando os iniciadores listados na Tabela 22.3) quanto à integração correta e perda de ORF de *slp2*. Clones que dão os sinais esperados foram purificados em clones com uma única célula e novamente rastreados por PCR usando os iniciadores listados na Tabela 22.3. O clone correto foi designado como cepa M646.

**Fermentação das cepas M507, M665, M666, M667 e M646**

[00577] A cepa M507 foi cultivada no fermentador de cultura Série FTR104 sob as mesmas condições que M665, M666, M667 e M646. M646 era a cepa com deleção de *s/p2*. M665, M666 e M667 eram cepas com silenciamento de RNAi. As culturas FTR104 foram crescidas em meio mínimo para *Trichoderma* (TrMM) mais 20 g/L de extrato de levedura, 40 g/L de celulose, 80 g/L de celobiose e 40 g/L de sorbose em um pH de 5,5. A temperatura foi trocada de 28 °C para 22 °C após 48 horas. As culturas foram crescidas durante 6 dias. Meio mínimo para *Trichoderma* contém 5 g/L de sulfato de amônio, 5 g/L de di-hidrogenofosfato de potássio, 1 ml/L de oligoelementos, 4,1 ml de cloreto de cálcio a 1 M por L e 2,4 ml de sulfato de magnésio a 1 M por L de meio.

[00578] As concentrações totais de anticorpos foram determinadas a partir dos dias 3-6. No dia 6, a cepa M667 atingiu 3,81 g/L, vide Tabela 22.8. Após o dia 5, a expressão de anticorpo caiu nas culturas de M507, M665 e M666. No dia 6, a cepa M507 produziu 2,2 g/L, M665 atingiu 2,7 g/L e M666 produziu 2,8 g/L. Assim, as cepas com as pequenas sequências alvo de RNAi produziram um pouco mais de anticorpo do que M507, indicando que o silenciamento funciona nestas cepas. A cepa M646 com deleção de *s/p2* cresceu mais lentamente do que as outras cepas. A cepa com deleção de *s/p2* produziu ligeiramente acima de 2 g/L no dia 6.

**Fermentação das cepas M507, M665, M666 e M667**

[00579] As cepas 217.12G (M665), 218.25F (M666) e 263.110F (M667) foram cultivadas em fermentadores de 1 L com 30 g/l de glicose, 60 g/l de lactose, 20 g/l de WSG, 20 g/l de SGE mais alimentação de lactose em um pH de 5,5 começando a 28 °C e indo para 22 °C ao final da cultura. A expressão de cadeias pesada e leve de MAB01 foi testada por imunoblot de amostras de sobrenadante coletadas em ca-

da dia da cultura. Os sobrenadantes foram diluídos em tampão de citrato, pH de 5,5, de modo que 0,1 µl fosse carregado por cavidade. LSB + BME foram adicionados e aquecidos juntos durante 5 minutos a 95 °C. As amostras foram carregadas em um gel de SD S PAGE Criterion a 4-15%. As proteínas foram transferidas para nitrocelulose com o mata-borrão Criterion a 100 volts durante 30 minutos. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com 5% de leite em TBST durante 1 hora. A cadeia pesada foi detectada com anticorpo anticadeia pesada (Sigma #A3188) e anticorpo anticadeia leve (Sigma #A3813) AP-conjugado diluído a 1:10000 em TBST. Após 1 hora de incubação com o anticorpo de detecção, a blot foi lavada com TBST e a membrana revelada com substrato AP (Promega).

[00580] A expressão total de anticorpo foi medida após purificação em proteína G e os valores são apresentados na Tabela 22.4, juntamente com os resultados de duas cepas de controle. A cepa M507 foi cultivada com e sem inibidor SBTI sob as mesmas condições. Os níveis de expressão de MAB01 na cepa M667 foram maiores do que aqueles medidos na cepa M507. No dia 9, por exemplo, o nível de expressão foi duas vezes mais elevado para M667. Os níveis de expressão observados com M667 se assemelhavam à cultura feita com adição de SBTI. As cepas M665 e M666 produziram níveis ligeiramente inferiores ou similares àqueles do controle. Houve um aumento evidente de 2 vezes na expressão de anticorpos comparado com a cepa M507 padrão.

[00581] A atividade de protease das culturas listadas na Tabela 22.4 foi medida a fim de determinar como as atividades totais de protease eram afetadas pelo RNAi. As medições de atividade de protease com caseína como substrato podem ser vistas na Tabela 22.9. As concentrações de proteína total de todas as amostras de sobrenadante foram medidas. A concentração de proteína total para todas as a-



mostras foi normalizada em tampão de citrato de sódio, pH de 5,5 para 0,625 mg/ml para todos os dias de cultura.

[00582] 100 µl de todos os sobrenadantes diluídos foram adicionados à placa com 96 cavidades. Três cavidades de réplica por amostra foram feitas. 100 µl de estoque de caseína FL diluído (10 µg/ml) em tampão citrato de sódio, pH de 5,5 foram adicionados. A solução de estoque caseína do frasco era 1000 µg/ml diluída em 200 µl de PBS. Para cada amostra, um controle de base foi incluído com 100 µl do sobrenadante diluído e 100 µl de tampão de citrato de sódio, pH de 5,5. As placas incubadas contendo sobrenadantes e substrato foram cobertas com um saco de plástico a 37 °C. A fluorescência foi medida nas placas ao final de 4 horas de incubação. As leituras foram feitas em um leitor de placas de fluorescência usando excitação a 485 nm e emissão a 530 nm.

[00583] A atividade de protease no sobrenadante da cepa M665 foi a mais baixa em geral. Ao longo da cultura, ela era quase metade daquela de M507. A atividade do vetor de hairpina M667 grande era baixa também, mas começou a diminuir após 5 dias, sendo mais baixa no dia 10. Isto foi onde a produção de anticorpos para a cepa M667 foi mais alta, no dia 10. Ao final da cultura, tanto os sobrenadantes de cultura M665 quanto M667 tinham metade da atividade de protease comparado com o controle M507. Quando a cultura de M507 foi suplementada com inibidor de protease SBTI, a atividade de protease também caiu do dia 6 até o dia 8 e permaneceu menor do que a cepa M507. A baixa atividade de protease ao final da cultura explica porque a cepa M667 produziu o dobro de anticorpo comparado com a cepa M507.

**Tabela 22.1: Iniciadores usados para criação dos vetores de silenciamento**

Iniciador	Sequência
T846_pTTv217_top	CTTGAGCAGTTAATTAATTTGAATGGCCGGCCGCACACTTTC AAG ATTGGCTTCAAGAGAGCCAATCTTGAAAGTGTGCTTGCGAT CGCG GATCCACTTAACGTTACTGAAATCAT
T847_pTTv217_inferior	ATGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGATCCGCGATCGCAAGCAC ACTT TCAAGATTGGCTCTCTTGAAGCCAATCTTGAAAGTGTGCGG CCGG
	CCATTCAAATTAATTAAGTCTCAAG
T848_pTTv218_superior	CTTGAGCAGTTAATTAATTTGAATGGCCGGCCGTACGGTGT GCC AAGAAGTTCAAGAGACTTCTTGGCAACACCGTACTTGCGAT CGCG GATCCACTTAACGTTACTGAAATCAT
T849_pTTv218_inferior	ATGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGATCCGCGATCGCAAGTAC GGTG TTGCCAAGAAGTCTCTTGAAGTCTTGGCAACACCGTACGG CCGG CCATTCAAATTAATTAAGTCTCAAG
T9 65_fw_senso_loop_AscI	CCGCTTGAGCAGTTAATTAATTTAAATGGCCGGCCTATATGG CGC GCCGTAAGTTTTGCACAGCCGC
T967_rev_senso_loop_as isl	GTCAAGCTGTTTGATGATTTTCAGTAACGTTAAGTGGATCCGC GAT CGCCGTAAGTCTGACGCCCTTGAC
T1006_rev_antisenso_Fs el	CCTTATTCCTTTGAACCTTT
T1007_fw_antisenso_Asc I	GCAACGTGCTCAGGAGTTGC

**Tabela 22.2: Sequências alvo nos vetores de RNAi**

Nome	Sequência alvo
pTTv217	GCACACTTTCAAGATTGGC
pTTv218	GTACGGTGTTGCCAAGAAG
pTTv263	GTTGAGTACATCGAGCGGACAGCA- TGTGCACACCATGCTTCCCCTCGAGTCCA AGGACAGCATCATCGTTGAGGACTC-

Nome	Sequência alvo
	TGCAACGGCGAGACGGAGAAGCAGGCTC CCTGGGGTCTTGCCCGTATCTCTCACCGAGA- ACGCTCAACTTTGGCTCCTTCAAC AAGTACCTCTACACCGCTGATGGTG- TGAGGGTGTTGATGCCTATGTCATTGACA CCGGCACCAACATCGAGCACGTCGA- TTTGAGGGTCGTGCCAAGTGGGGCAAGA CCATCCCTGCCGGCGATGAGGACGA- GACGGCAACGGCCACGGCACTCACTGCT CTGGTACCGTTGCTGGTAAGAAGTA- GGTGTGTTGCCAAGAAGGCCACGTCTACGC CGTCAAGGTGCTCCGATCCAACGGA- CCGGCACCATGTCTGACGTCGTCAGGGC GTCGAGTACG

**Tabela 22.3: Iniciadores para rastreamento de integração do cassete pTTv115/ $\Delta$ *slp2-pyr4* e pureza da cepa.**

**Para rastreamento de integração de pTTv115 ( $\Delta$ *slp2-pyr4*)**

Iniciador	Sequência
T054_ <i>slp2</i> _5rastreamento_F	GATGCACCGCTGCGGCC (SEQ ID NO: 327)
T1084_rastreamento_5flk_pyr_re	TCTTGAGCACGACAATCGAC

v

T055_ <i>slp2</i> _3rastreamento_R	GGCGTTGCTCCCCATGCG (SEQ ID NO: 330)
T028_ <i>Pyr4</i> _flanq_rev	CATCCTCAAGGCCTCAGAC (SEQ ID NO: 329)

**Para rastreamento de deleção de ORF de *slp2* (tre123244)**

T111_ <i>slp2</i> _ORF_F	ATGCGGTCCGTTGTCGCC (SEQ ID NO: 331)
T112_ <i>slp2</i> _ORF_R	TTACTCGGAGAGCTCAGAGA (SEQ ID NO: 332)

**Tabela 22.4: Níveis totais de expressão de anticorpo MAB01 a partir de culturas de fermentação de cepas com RNAi e cepas de controle. Imunoglobulinas purificadas em Proteína G**

mAB total (mg/L)	T86 M507	T89 M507 + SBTI	T113 M665	T114 M666	T115 M667
dia 6	581	987			

mAB total (mg/L)	<b>T86 M507</b>	<b>T89 M507 + SBTI</b>	<b>T113 M665</b>	<b>T114 M666</b>	<b>T115 M667</b>
dia 7	<b>719</b>	1415	485	436	<b>1217</b>
dia 8	<b>890</b>	1S95	744	518	<b>1471</b>
dia 9	<b>825</b>	1908	945	696	<b>1684</b>
dia 10	<b>1082</b>	1863	1025	787	<b>1835</b>
dia 11	1094	1769			

**Tabela 22.5: Medições de peso seco do micélio de cultura em frasco de agitação. Dois frascos foram cultivados para cada transformante e cepa de controle. As cepas estão expressando RNAi dirigido à redução de expressão de *slp2***

Peso seco				
	Dia 3	Dia 5	Dia 6	Dia 7
	gramas/20 ml	gramas/20 ml	gramas/20 ml	gramas/20 ml
217.12E	0,015	0,035	0,042	0,047
217.12E	0,022	0,035	0,049	0,047
218.25F	0,031	0,048	0,052	0,059
218.25F	0,038	0,046	0,051	0,056
218.67A	0,027	0,043	0,052	0,061
218.67A	0,024	0,046	0,051	0,059
263.110F	0,032	0,042	0,047	0,056
263.110F	0,025	0,049	0,043	
263.124C	0,002	0,009	0,020	0,020
263.124C	0,006	0,005	0,016	0,022
M507	0,038	0,049	0,060	0,063
M507	0,039	0,053		0,066

**Tabela 22.6: Regulação negativa de expressão de *slp2* em linhagens contendo construtos de RNAi**

Veze de regulação negativa de <i>slp2</i>	
217.12E	Sem alteração
218.25F	-1,8
218.67A	-1,2
263.110F	-2,5
263.124C	-36,3

**Tabela 22.7: Regulação negativa de expressão de *slp2*, *slp3*, *slp5* e *slp6* em cepas com construtos de RNAi**

Veze de regulação negativa de genes de <i>slp</i>				
	<i>slp2</i>	<i>slp3</i>	<i>slp5</i>	<i>slp6</i>
218.25F	-1,6	-1,8	Sem alteração	Sem alteração
263.124C	-31,1	-6,0	Sem alteração	-2,3

**Tabela 22.8: Culturas FTR104 foram crescidas em TrMM mais 20 g/L de extrato de levedura, 40 g/L de celulose, 80 g/L de celobiose e 40 g/L de sorbose em um pH de 5,5. A temperatura foi trocada de 28 °C para 22 °C após 48 horas. As titulações de anticorpos totais são expressas em g/L.**

Dia	M507	M646	M665	M666	M667
Ab total	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
3	1,4	0,7	1,5	1,5	1,5
4	2,6	1,3	2,6	2,8	2,8
5	3,1	1,8	3,4	3,5	3,6
6	2,2	2,0	2,7	2,8	3,8

**Tabela 22.9: Medições de atividade de protease de sobrenadantes de fermentação de cepas com RNAi e cepas de controle. Atividade de protease total em um pH de 5,5 com substrato de caseína**

Atividade de protease					
Unidades fluorescentes					
Dia	T86-M507	T89-M507 + SBTI	T113-M665	T114-M666	T115-M667
1	0,7	0,2	1,3	-0,6	1,1
2	2,1	1,1	-1,1	-0,8	1,4
3	16,7	23,4	1,1	6,6	17,5
4	18,7	18,7	8,6	15,0	17,5
5	19,4	18,1	12,7	19,0	19,0
6	19,7	21,7	10,6	19,3	16,9
7	19,5	17,3	10,5	21,3	15,8
8	17,6	14,3	10,4	21,9	13,5
9	19,9	14,9	10,8	21,4	11,8
10	21,6	17,3	13,9	21,8	10,3
11	23,8	20,2			

**EXEMPLO 23 - GERAÇÃO DE FRAGMENTOS DE ANTICORPO QUE EXPRESSAM CEPAS DE *TRICHODERMA REESEI***

[00584] Sete cepas de *Trichoderma reesei* foram geradas para expressar fragmentos de anticorpos (Fab, anticorpos com um único domínio multiméricos (sd-Ab's) e scFv) de diferentes bases com deleção de protease, conforme listado na Tabela 23. A arquitetura dos casetes de expressão genéticos aplicados para esta finalidade foi com base em elementos reguladores (promotor e terminador) do gene de celobiohidrolase I (*cbh1*). O domínio catalítico da proteína CBHI foi modificado para remover as sequências intrônicas e usado como parceiro de fusão para aumentar a expressão e secreção de um fragmento de anticorpo. Um motivo de reconhecimento para a protease Kex2 foi inserido entre os parceiros de fusão para promover liberação cosecreto-

ra dos fragmentos de anticorpos da proteína veículo CBHI. Os cassetes de expressão foram flanqueados por regiões homólogas para permitir integração objetivada ao *locus* de *cbh1* de *Trichoderma reesei*. Todo o construto foi armazenado em um vetor de clonagem.

[00585] A fim de preparar os cassetes de expressão de flanqueamento para transformação, os fragmentos correspondentes foram liberados de seus respectivos esqueletos de vetor por digestão de restrição com *PmeI* e purificados usando o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

[00586] Conforme listado na Tabela 23, as cepas de *T. reesei* com deleção de protease foram transformadas com os cassetes de expressão purificados usando transformação de protoplastos mediada por PEG. Os transformantes foram selecionados quanto à resistência à higromicina B ou prototrofia para acetamidase colocando em placas sobre meio de cultura contendo higromicina B como um agente seletivo ou acetamida como a única fonte de nitrogênio, respectivamente. Até 48 transformantes de cada foram rastreados por PCR quanto à integração homóloga do cassete de expressão no *locus* de *cbh1* usando um iniciador dianteiro fora do fragmento de região de flanqueando 5' do construto e o iniciador inverso dentro do domínio catalítico de CBH1 modificado (integração 5'), bem como um iniciador direto dentro marcador de seleção higromicina B ou a acetamidase, respectivamente, e um iniciador inverso fora da região de flanqueando 3' (integração 3'). A partir de cada transformação, cinco a sete transformantes independentes, para os quais rastreio por PCR provou integração correta do construto ao *locus* de *cbh1*, foram selecionados para purificação de um único esporo para obter clones mononucleares. Integração adequada do cassete de ruptura foi reconfirmada por PCR usando as mesmas combinações de iniciadores conforme descrito acima e a ausência do *locus* de CBH1 parental foi verificada usando uma combina-

ção de iniciadores que objetivam o quadro de leitura aberta de *cbh1*. Integração correta do cassete de ruptura foi também verificada para todos os clones aplicando hibridização de Southern. O DNA genômico dos clones mononucleares, bem como a cepa parental, foram digeridos de forma independente com duas combinações de enzimas de restrição diferentes e hibridizados contra as regiões de flanqueamento 5' e 3' do gene *cbh1* para confirmar a alteração do *locus* de *cbh1* conforme esperado.

### **Expressão e análise de titulação de fragmentos de anticorpos (Fabs, anticorpos com um único domínio e scFv)**

[00587] A expressão de fragmentos de anticorpos é facilitada pelo promotor de celobiohidrolase I. As cepas foram crescidas em fermentações descontínuas durante 7 dias em meio contendo 2% de extrato de levedura, 4% de celulose, 8% de celobiose, 4% de sorbose, 5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . O pH da cultura foi controlado em um pH de 5,5 (ajustado com  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e a temperatura foi mantida constante a 28 °C. As fermentações foram realizadas em quatro reatores com vaso de vidro de 2 L paralelos (DASGIP) com um volume de cultura de 1 L. Amostras de sobrenadante de cultura foram tiradas durante o curso das operações e armazenadas a -20 °C. As amostras foram coletadas diariamente a partir de todo o curso destas culturas e os níveis de produção foram analisados por meio de cromatografia de líquido de afinidade para todas as moléculas. Para cada fragmento de anticorpo, a titulação máxima, ID da cepa e base de deleção de protease são indicados na Tabela 23.



**Tabela 23. Níveis de expressão de diversos fragmentos de anticorpos:**

Fragmento de anti-corpo	Titulação (g/L)	Cepa	Cepa parental	Base de deleção	Clipping* (SEC após ALC)
FAB1	3,8	TR090	M307	4	~5%
FAB2	2,8	TR102	M400	6	~5%
FAB3	2,6	TR104	M400	6	nd
sdAb-1	1,9	TR066	M307	4	nd
sdAb-2	1,2	TR101	M400	6	~45%
scFV1-His	2,5	TR112	M400	6	nd
scFV2	2,5	TR111	M400	6	nd

percentagens previstas são aproximadas (~) ou não determinadas (nd)

### **Determinações de Titulação**

#### **Mabs e sdAb**

[00588] As concentrações de Mab e sdAb foram quantificadas por HPLC-cromatografia de Proteína A, a qual se bAsc/a em cromatografia de afinidade com detecção por UV. O domínio Fc de imunoglobulinas humanas da classe G (classe-subtipo: IgG1, IgG2, IgG4, exceto IgG3) se liga especificamente à proteína A, a qual está covalentemente ligada à fase estacionária. A afinidade de ligação de proteína A pelo domínio Fc é dependente do pH. Após ligação em um pH de 7,5, o anticorpo monoclonal foi eluído sob condições ácidas em um pH de 2,0 e detectado a 280 nm.

#### **Fab**

[00589] As concentrações de Fab foram quantificadas por HPLC-cromatografia de antilambda, a qual se bAsc/a em cromatografia de afinidade com detecção por UV. A cadeia lambda de fragmentos Fab humanos se liga especificamente a um ligante antilambda derivado de camélido o qual está covalentemente ligado à fase estacionária. Após

ligação em um pH de 7,5, o anticorpo monoclonal foi eluído sob condições ácidas em um pH 1,4 e detectado a 280 nm.

#### **scFV2**

[00590] As concentrações de scFV2 foram quantificadas por purificação em Proteína G HiTrap usando um sistema Avant da Akta e subsequente detecção por UV. A parte da cadeia leve kappa de scFV2 se liga especificamente ao ligante de proteína G que está covalentemente ligado à fase estacionária. Após ligação em um pH de 7,2, scFV2 foi eluído sob condições ácidas com HC1 a 0,1 mM e detectado a 280 nm.

#### **scFV1-His**

[00591] As concentrações de scFV1-His foram quantificadas por purificação HisTrap HP usando um sistema Avant da Akta e subsequente detecção por UV. O marcador de histidina da proteína se liga especificamente à Ni Sepharose. Após ligação, a proteína foi eluída usando imidazola a 500 mM e detectada a 280 nm.

## REIVINDICAÇÕES

1. Célula fúngica filamentosa compreendendo pelo menos três proteases endógenas tendo atividade reduzida e um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo é produzido em um nível pelo menos duas vezes maior do que o nível de produção do polipeptídeo em uma célula fúngica filamentosa parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida.

2. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que, quando a célula é uma célula de *Aspergillus*, a atividade total de protease é reduzida para 50% ou menos da atividade total de protease da célula de *Aspergillus* parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida.

3. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a atividade de protease total é reduzida para 49% ou menos, de preferência 31% ou menos, da atividade de protease total da célula fúngica filamentosa parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida.

4. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizada pelo fato de que pelo menos três genes que codificam proteases endógenas compreendem, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente.

5. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, caracterizada pelo fato de que pelo menos quatro genes que codificam proteases endógenas compreendem, cada um, uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente.

6. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a célula-

la fúngica é uma célula fúngica de *Trichoderma*, uma célula fúngica de *Myceliophthora*, uma célula fúngica de *Aspergillus*, uma célula fúngica de *Neurospora*, uma célula fúngica de *Penicillium* ou uma célula fúngica de *Chrysosporium*. anti

7. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a célula fúngica é de *Trichoderma reesei*.

8. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que a dita célula é de tipo selvagem para protease *pep4*.

9. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 6, 7 ou 8, caracterizada pelo fato de que a célula tem atividade de protease reduzida ou inexistente em pelo menos três das proteases a seguir: *pep1*, *tsp1* e *slp1* ou *gap1*, *slp1* e *pep1*.

10. Célula fúngica filamentosa, de acordo com uma das reivindicações 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que a célula tem atividade de protease reduzida ou inexistente detectável em pelo menos três ou quatro proteases selecionadas do grupo que consiste em *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp3*, *slp7*, *gap1* e *gap2*.

11. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que cada um dos genes que codificam as três ou quatro proteases com atividade reduzida ou inexistente de protease detectável compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente.

12. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que a célula tem atividade de protease reduzida ou inexistente em pelo menos oito proteases, cada um dos genes que codificam as oito proteases compreendendo uma mutação que reduz ou elimina a atividade de protease correspondente

e as oito proteases são *pep1*, *tsp1*, *slp1*, *gap1*, *gap2*, *pep4*, *pep3* e *pep5*.

13. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que a célula compreende três a seis proteases tendo atividade reduzida ou inexistente detectável e cada uma das três a seis proteases são selecionadas do grupo que consiste em *pep1*, *pep2*, *pep3*, *pep4*, *pep5*, *tsp1*, *slp1*, *slp2*, *slp3*, *gap1* e *gap2*.

14. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6-13, caracterizada pelo fato de que a célula compreende um gene que codifica uma protease adicional que compreende uma mutação que reduz a atividade de protease correspondente e a protease adicional é selecionada do grupo que consiste em *pep7*, *pep8*, *pep11*, *pep12*, *tpp1*, *gap2*, *slp3*, *slp5*, *slp6*, *slp7* e *slp8*.

15. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo heterólogo é um polipeptídeo de mamífero.

16. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de mamífero é glicosilado.

17. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de mamífero é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo e fragmentos de ligação a antígeno do mesmo, um fator de crescimento, um interferon, uma citocina e uma interleucina.

18. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo de mamífero é selecionado do grupo que consiste em fator de crescimento 1 similar à insulina (IGF1), hormônio de crescimento humano (hGH) e interferon alfa 2b (IFN $\alpha$ 2b).

19. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de que a célula fúngica compreende ainda ALG3 tendo atividade reduzida.

20. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o gene que codifica ALG3 compreende uma mutação que reduz ou elimina a atividade correspondente.

21. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-20, caracterizada pelo fato de que a célula fúngica compreende ainda um polinucleotídeo que codifica uma  $\alpha$ -1,2-manosidase.

22. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de ainda compreender um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e, opcionalmente, um domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II.

23. Célula fúngica filamentosa, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de ainda compreender um primeiro polinucleotídeo que codifica o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase I e, opcionalmente, um segundo polinucleotídeo que codifica o domínio catalítico de N-acetilglucosaminil transferase II.

24. Célula fúngica filamentosa, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato de ainda compreender um polinucleotídeo que codifica uma manosidase II e/ou uma galactosil transferase.

25. Método para aprimorar a estabilidade de um polipeptídeo compreendendo:

a) fornecimento da célula fúngica filamentosa, como definida em qualquer uma das reivindicações precedentes; e

b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo heterólogo

seja expresso,

caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo heterólogo e-xibe estabilidade aumentada comparado com o polipeptídeo heterólogo produzido em uma célula filamentosa fúngica parental correspondente na qual as proteases não têm atividade reduzida.

26. Método de produção de um polipeptídeo heterólogo, caracterizado pelo fato de compreender:

a) fornecimento da célula fúngica filamentosa, como definida em qualquer uma das reivindicações 1-24,

b) cultura da célula de modo que o polipeptídeo heterólogo seja expresso; e

c) purificação do polipeptídeo heterólogo.

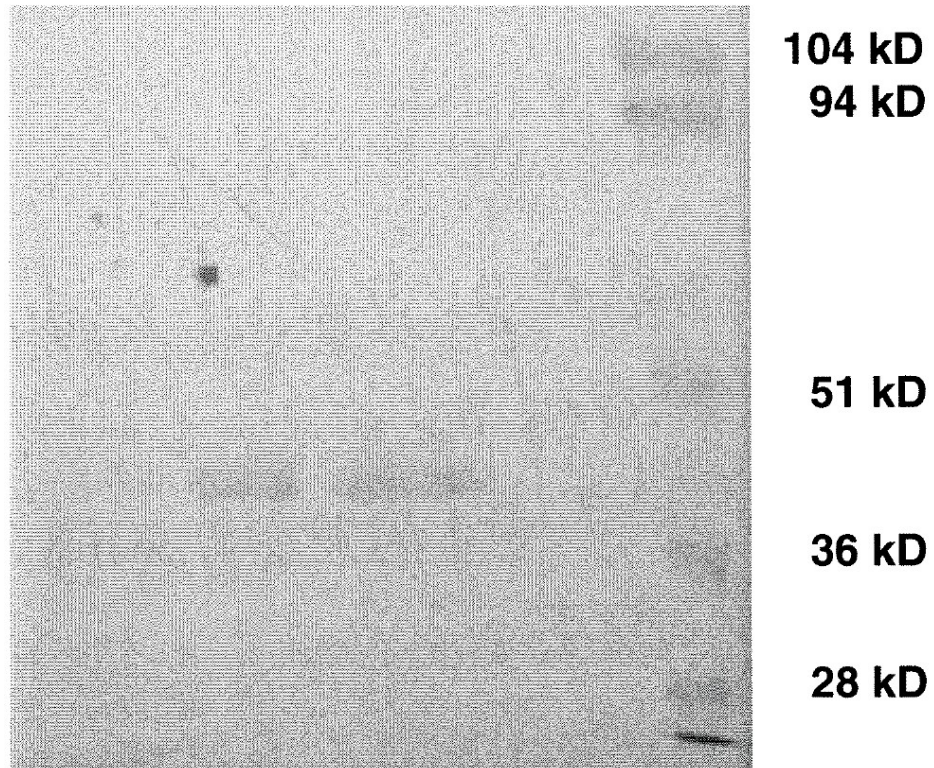
27. Método, de acordo com a reivindicação 25 ou reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que a célula fúngica filamentosa compreende ainda uma proteína veículo.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a proteína veículo é CBH1.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26-28, caracterizado pelo fato de que a cultura é em um meio que compreende um inibidor de protease.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26-29, caracterizado pelo fato de que a cultura é em um meio que compreende um ou dois inibidores de protease selecionados de SBT1 e quimostatina.

F1 F2 F3



Frações de pepstatina A

FIG. 1



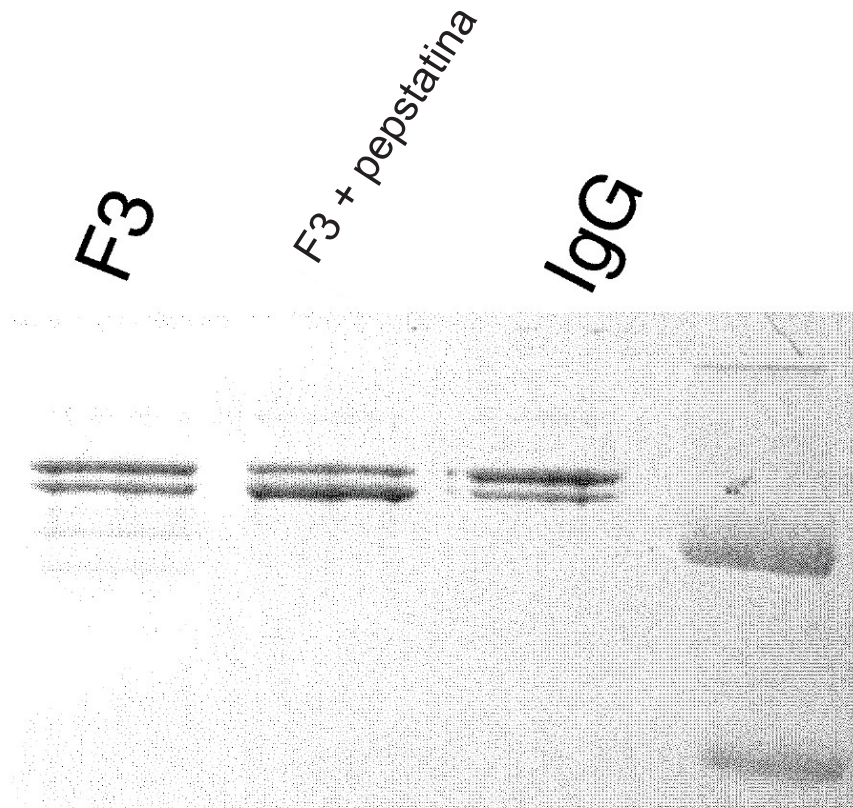
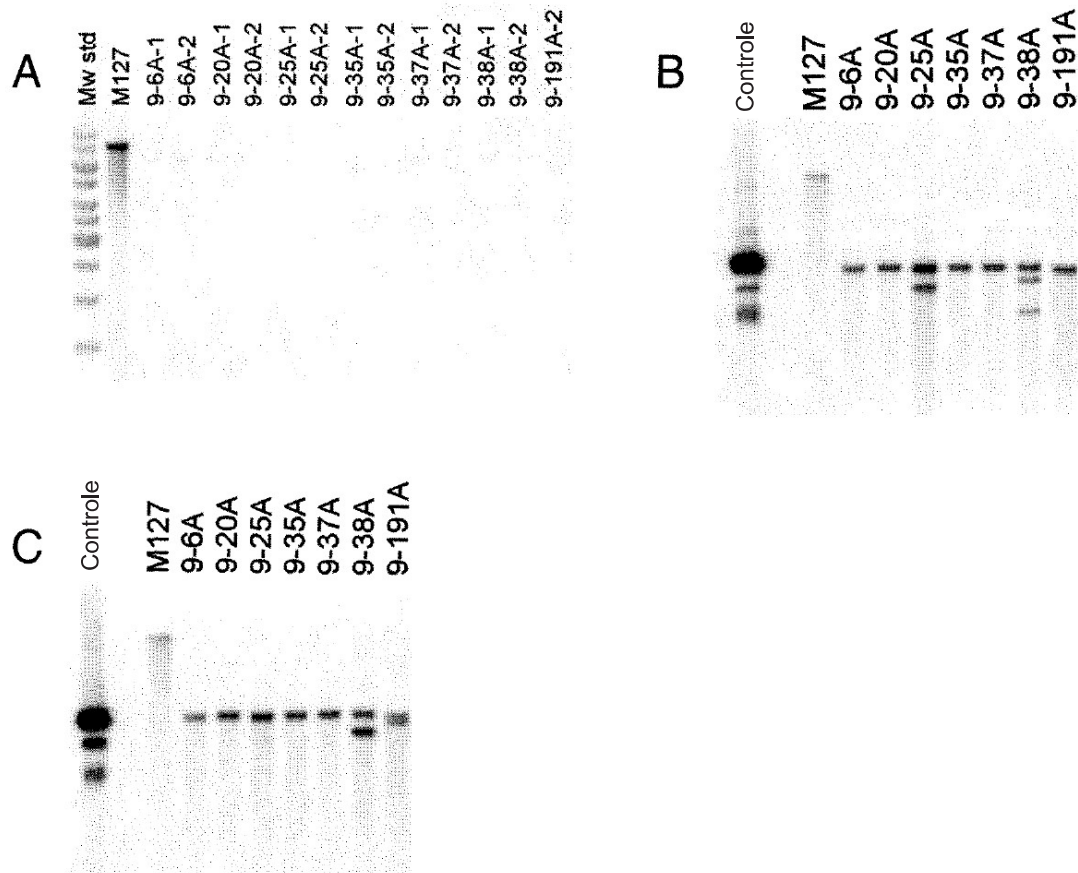


FIG. 2



Geração de cepas M181 e M195 com deleção de uma única protease

M181 = clone 9-20A-1 repurificado (isto é, originário de 9-20A)

M195 = clone 9-35A-1 repurificado (isto é, originário de 9-35A)

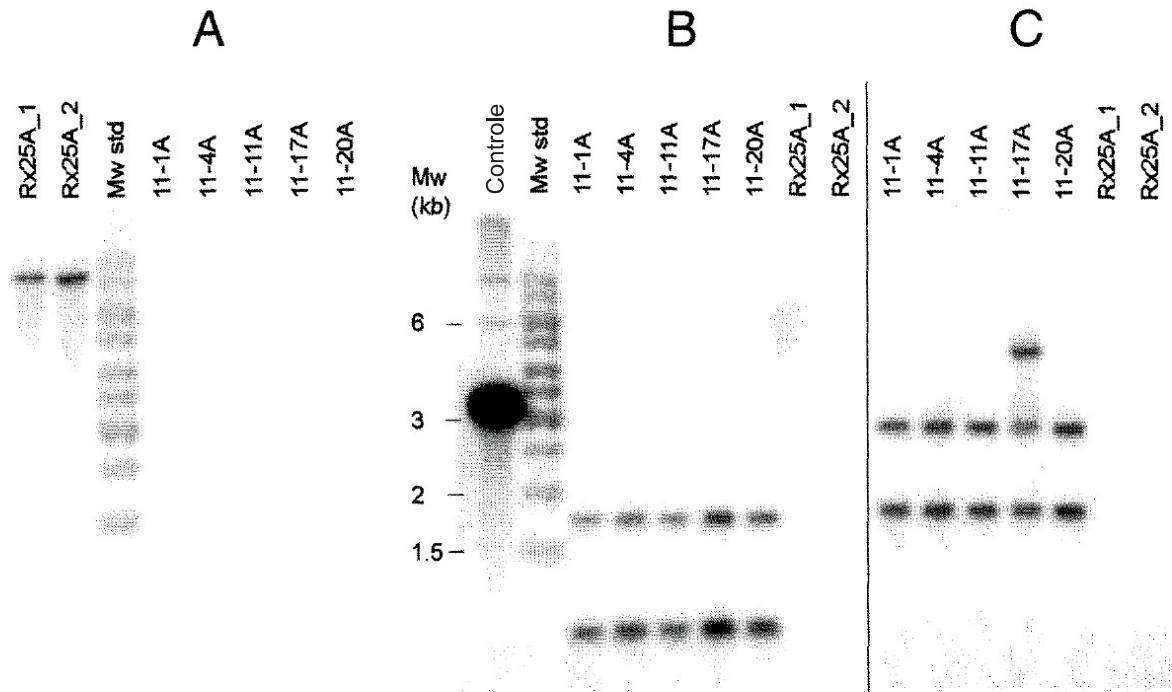
Sinais esperados:

A) ORF de *pep1*: >8 kb de M127 parental, nenhum sinal de transformantes

B) 5'flanqueamento de *pep1*: >8 kb de M127 parental, 4 kb de transformantes

C) 3'flanqueamento de *pep1*: >8 kb de M127 parental, 4,2 kb de transformantes

FIG. 3



Geração de rituximab, cepa M182 com deleção de *pep1*

M182 = 11-1A

M169, parental = Rx25A\_1

Sinais esperados:

A) ORF de *pep1*: >8 kb de M169 parental, nenhum sinal de transformantes

B) *bar*: 1,0 + 1,7 kb de transformantes, 3,1 kb de pTTv41, nada de m169

C) *bar*: 1,8 + 2,8 kb de transformantes, 3,1 kb de pTT441, nada de M169

FIG. 4

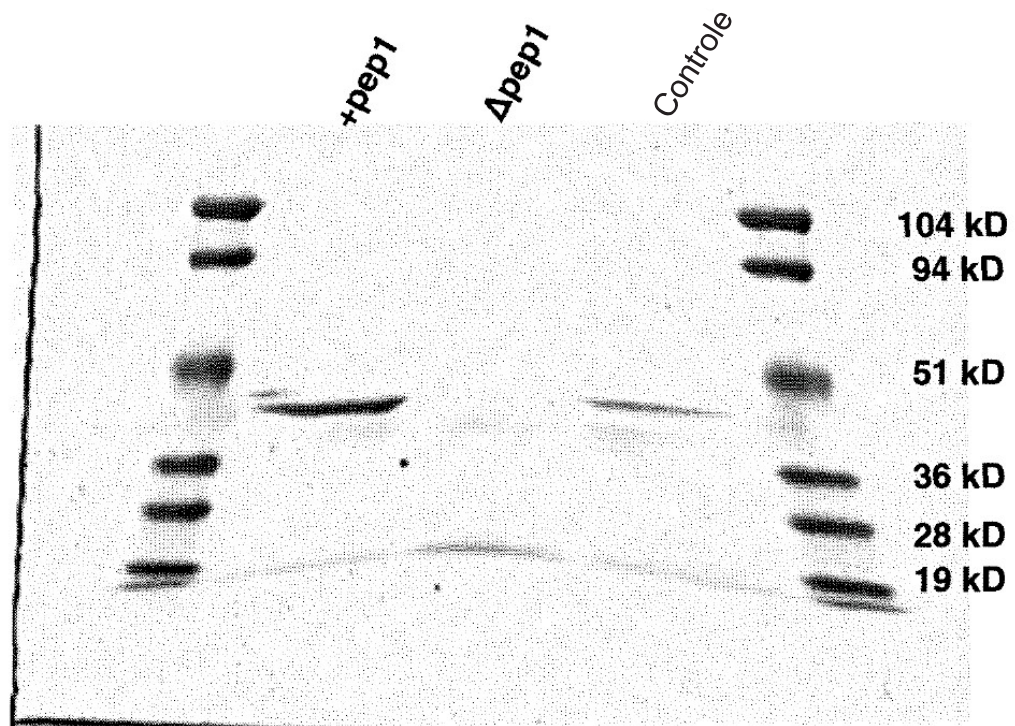


FIG. 5

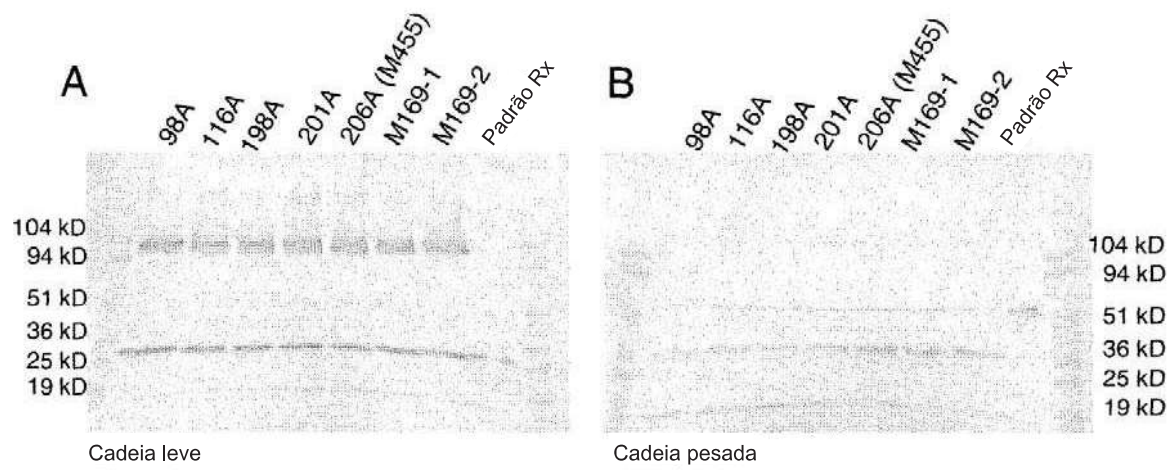


FIG. 6

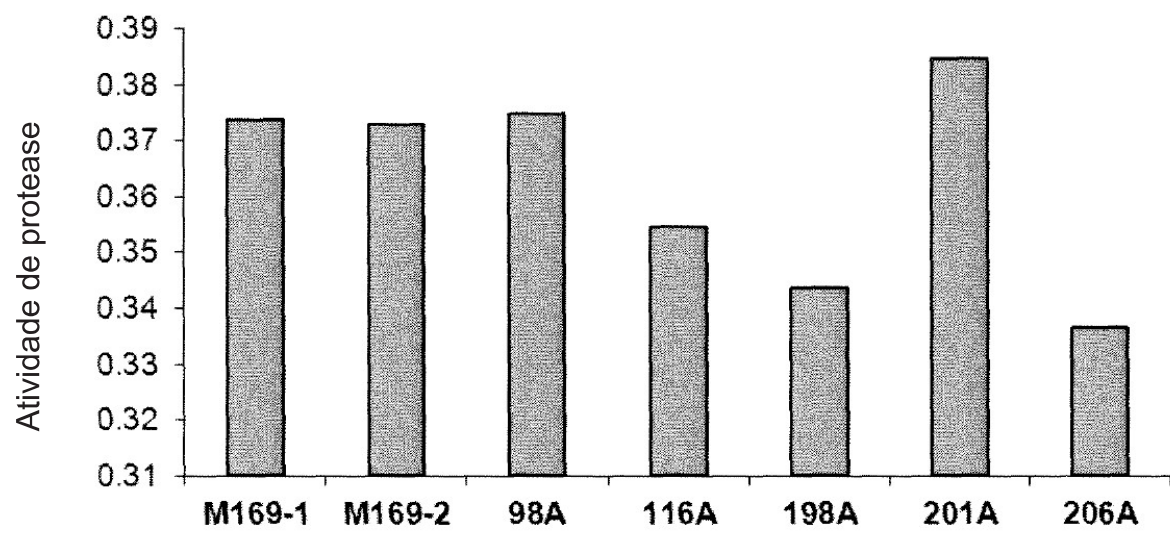


FIG. 7



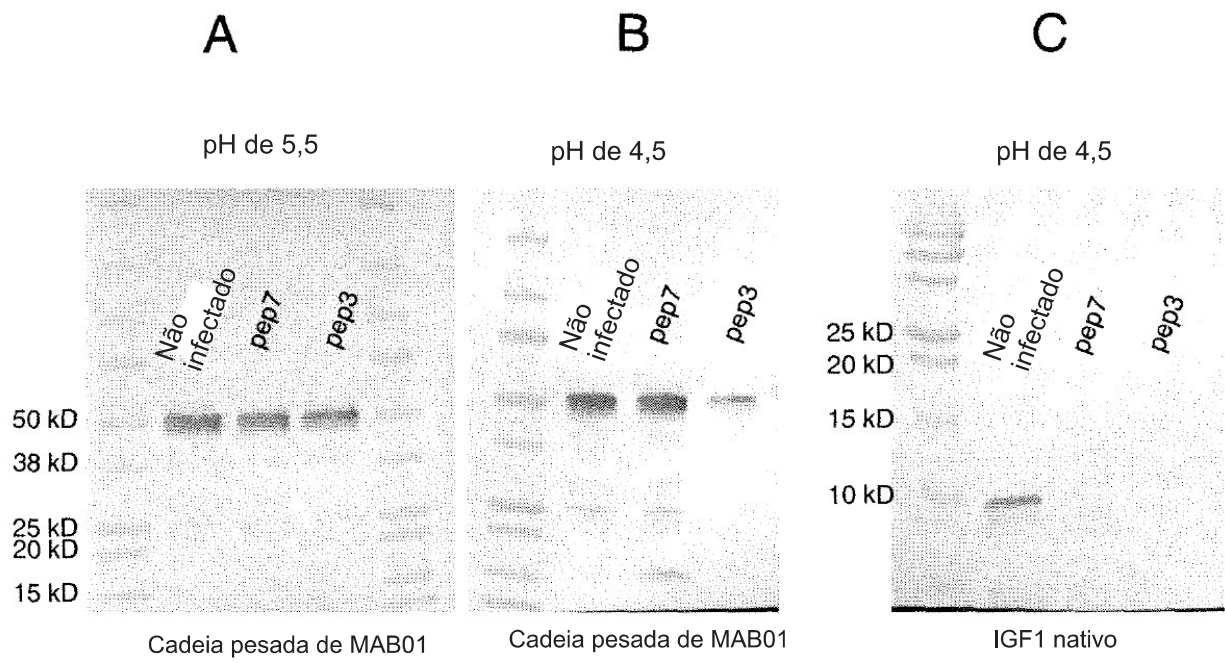


FIG. 8

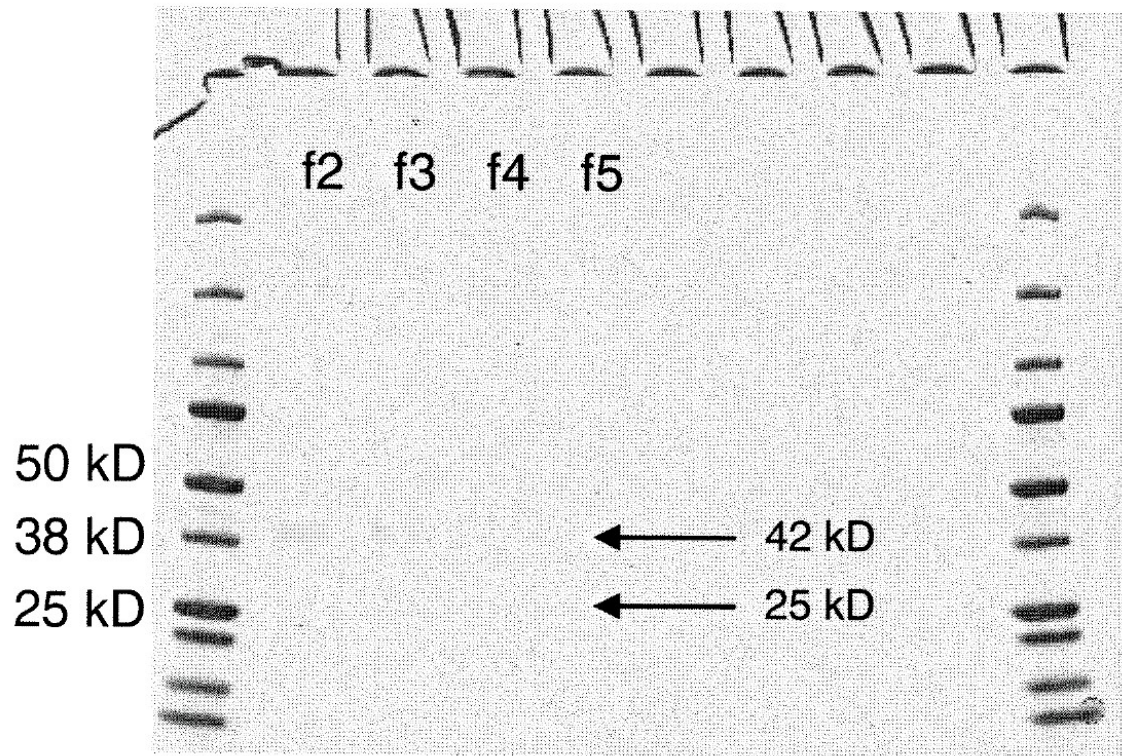


FIG. 9



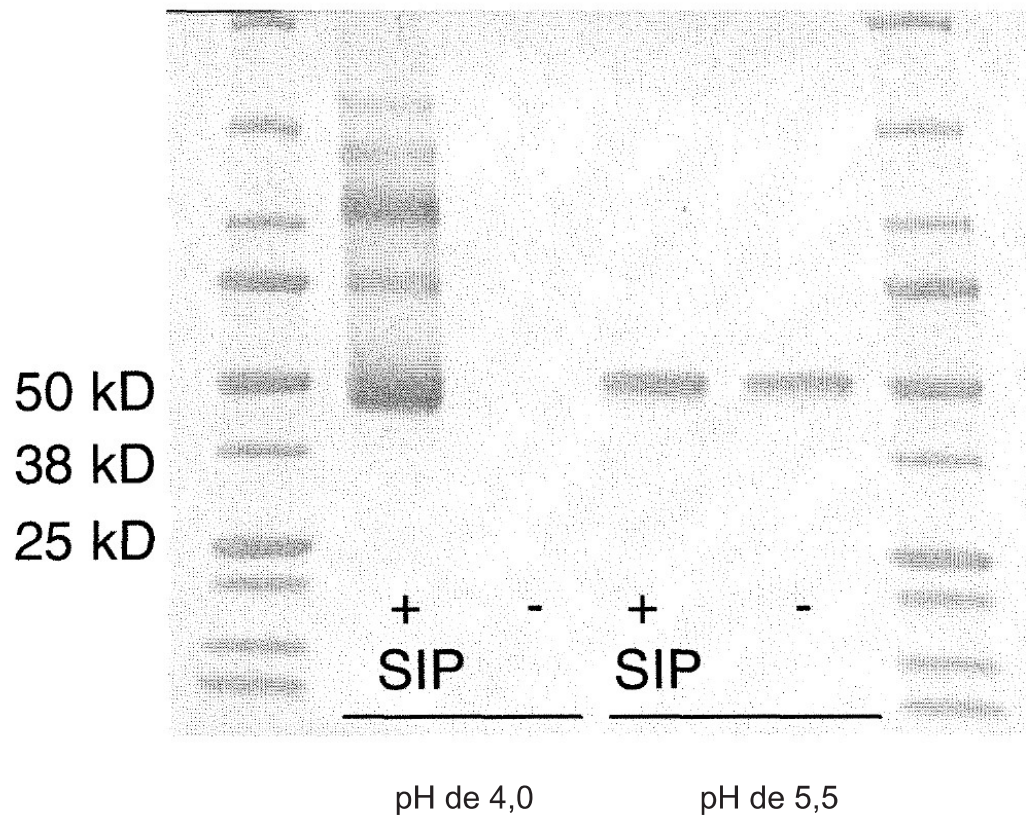


FIG. 10

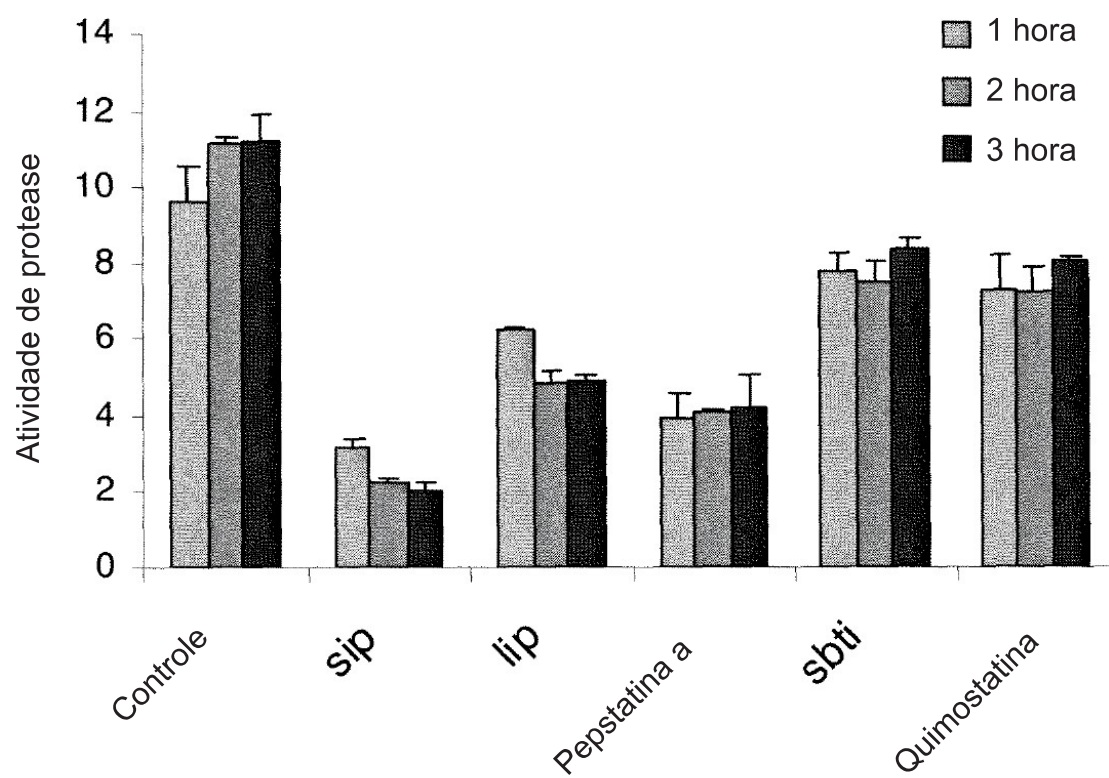
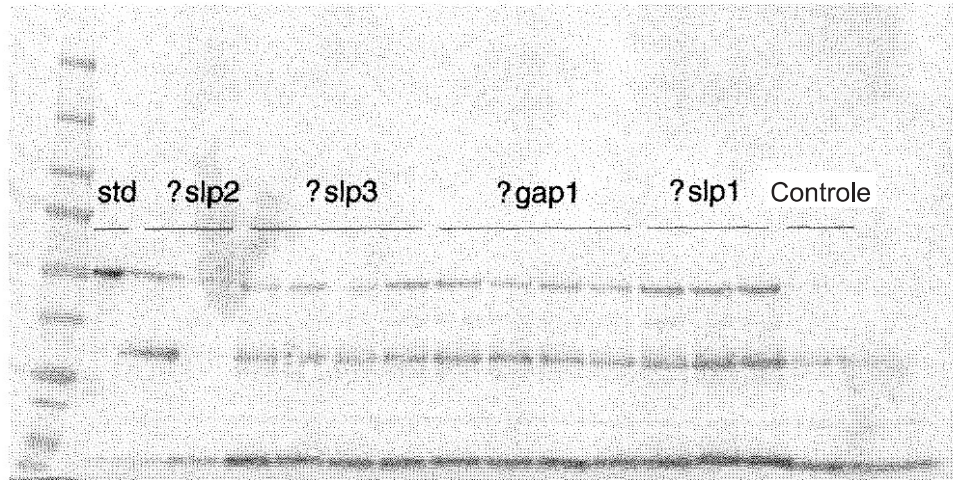


FIG. 11

Cadeia pesada de MAB01

A



Cadeia leve de MAB01

B

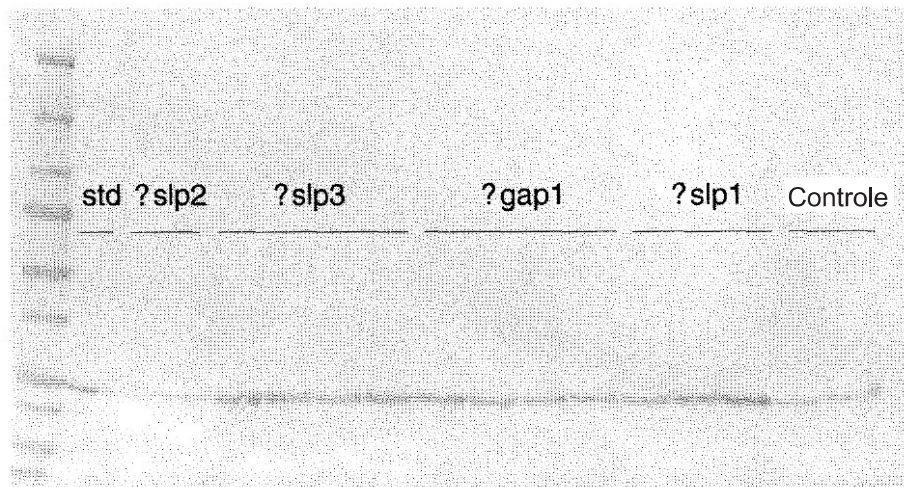


FIG. 12

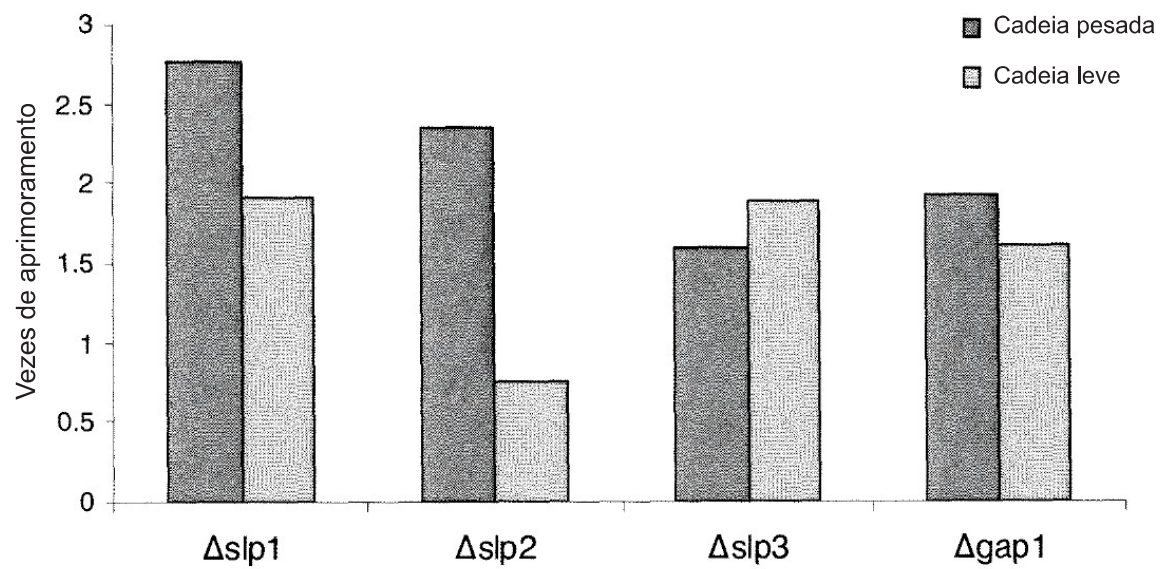


FIG. 13



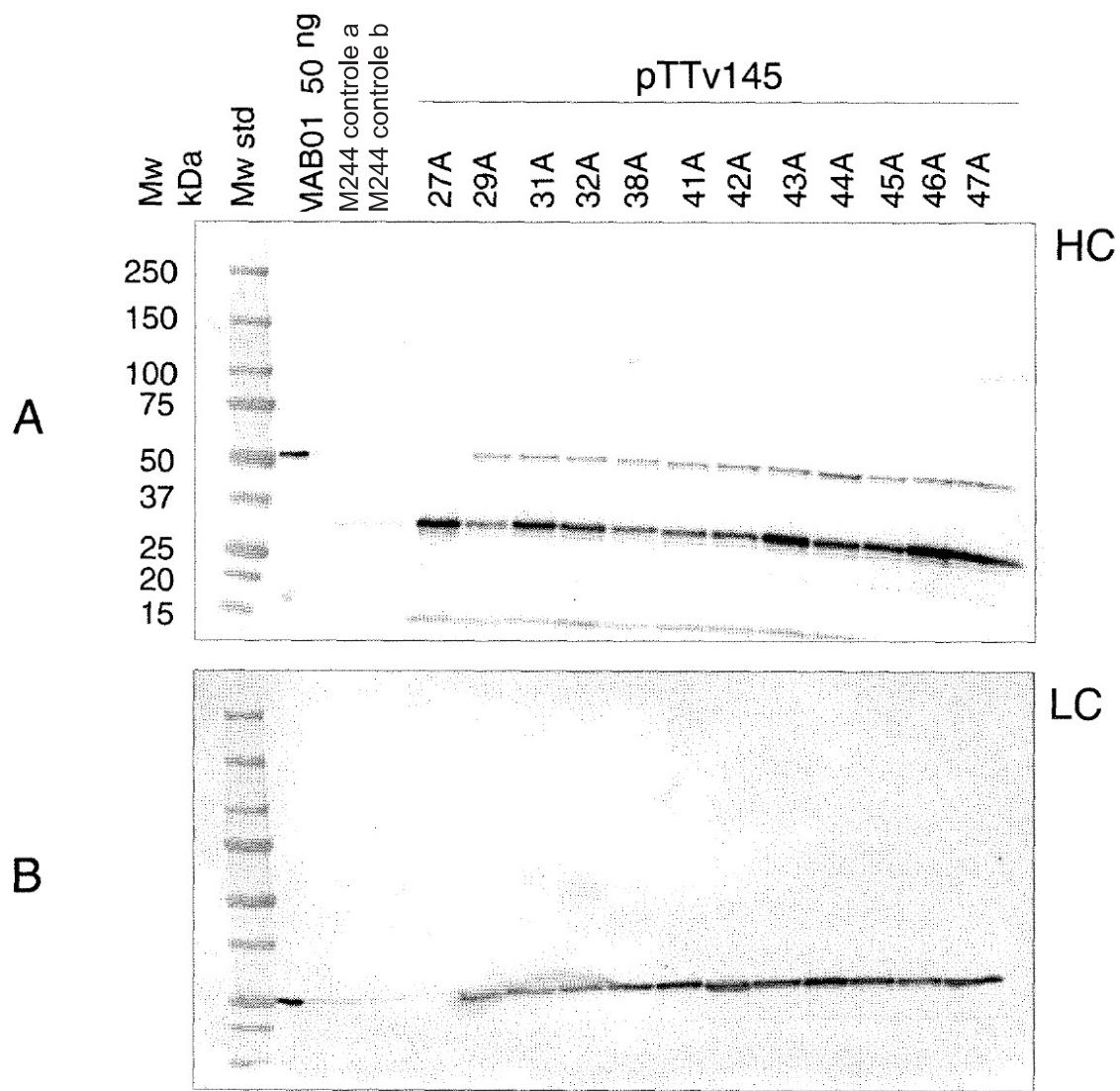


FIG. 14

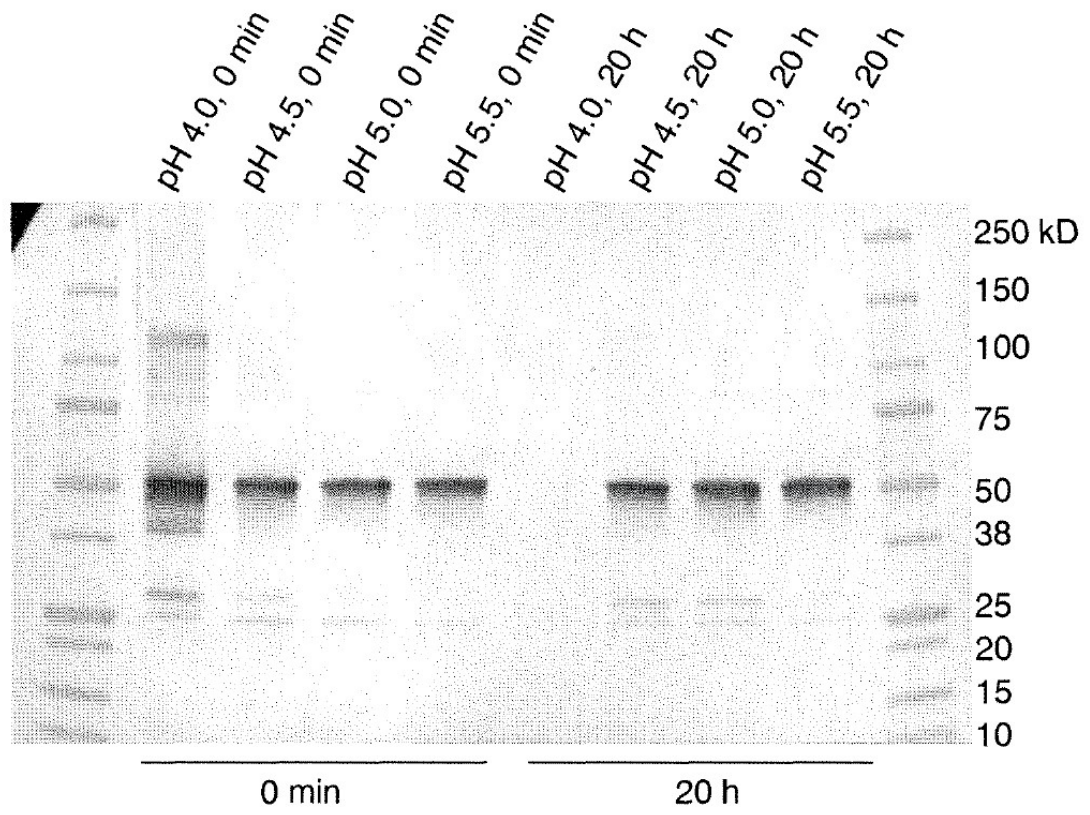


FIG. 15

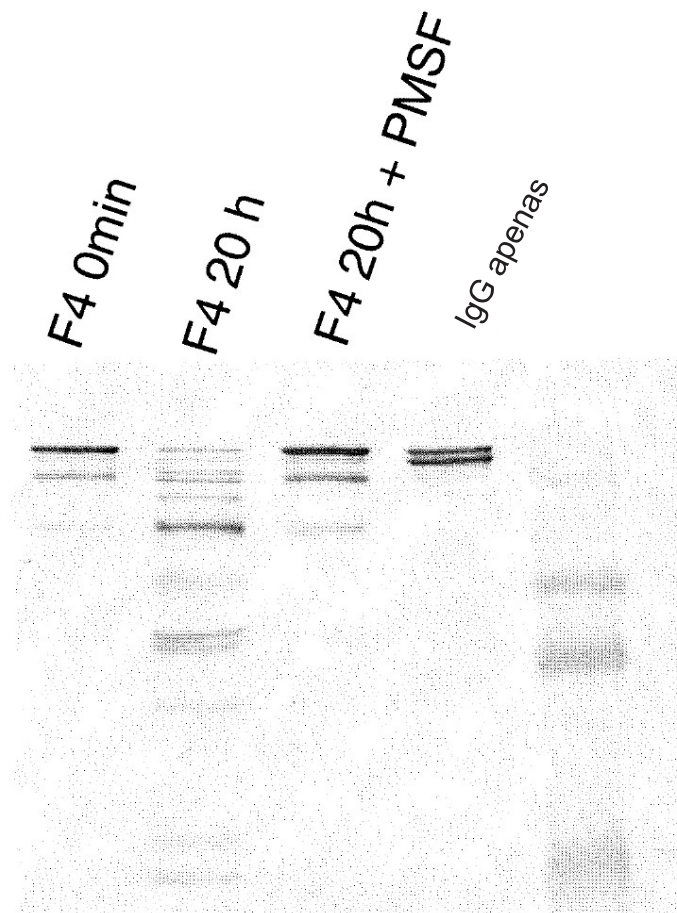


FIG. 16

17/58

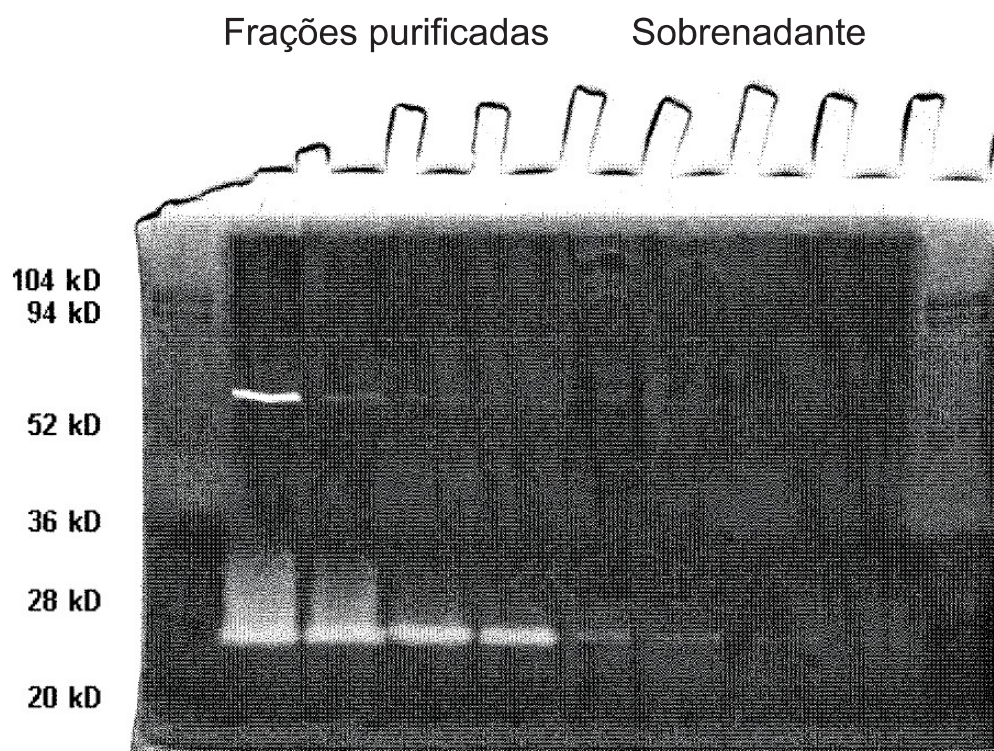


FIG. 17



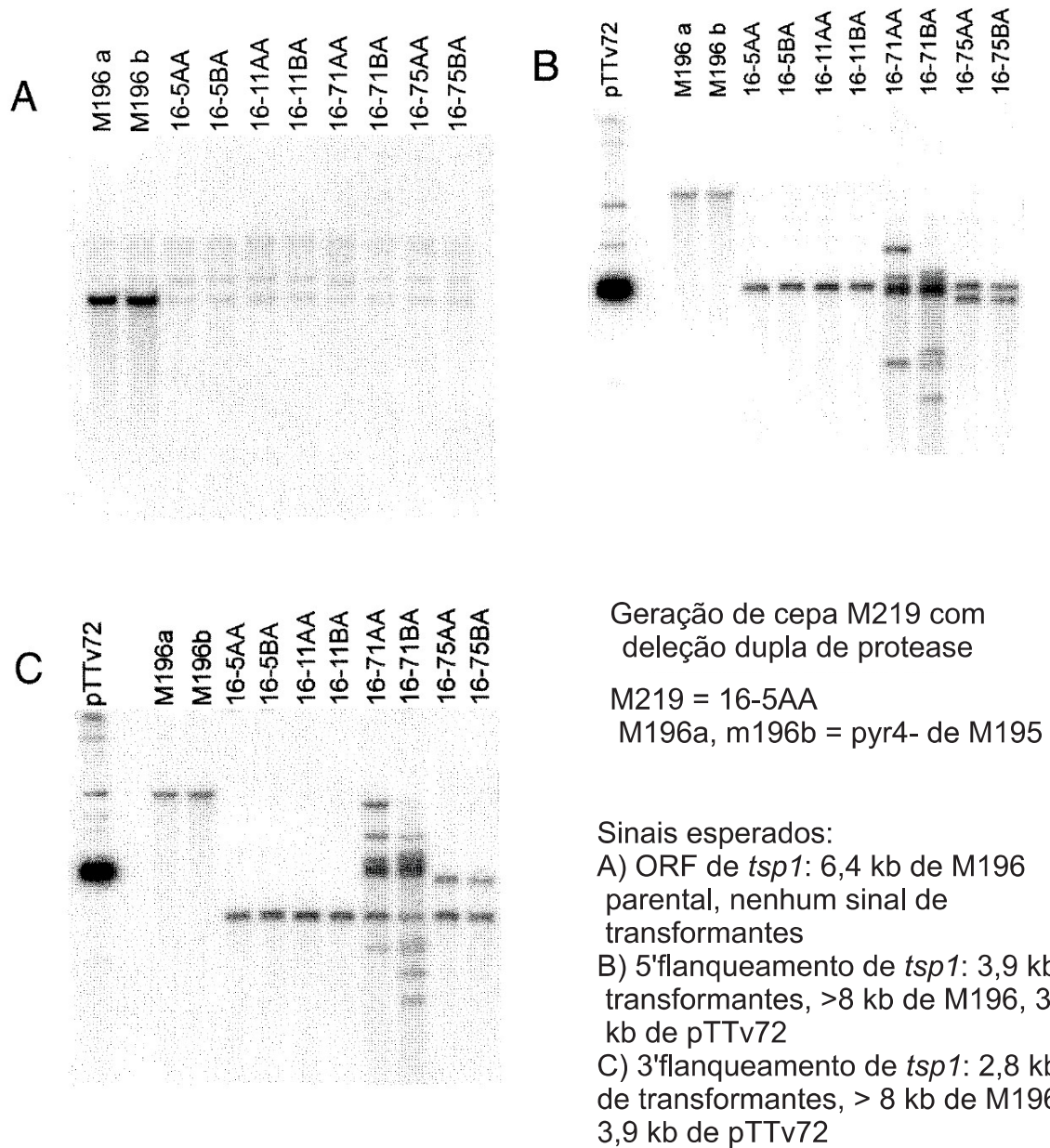
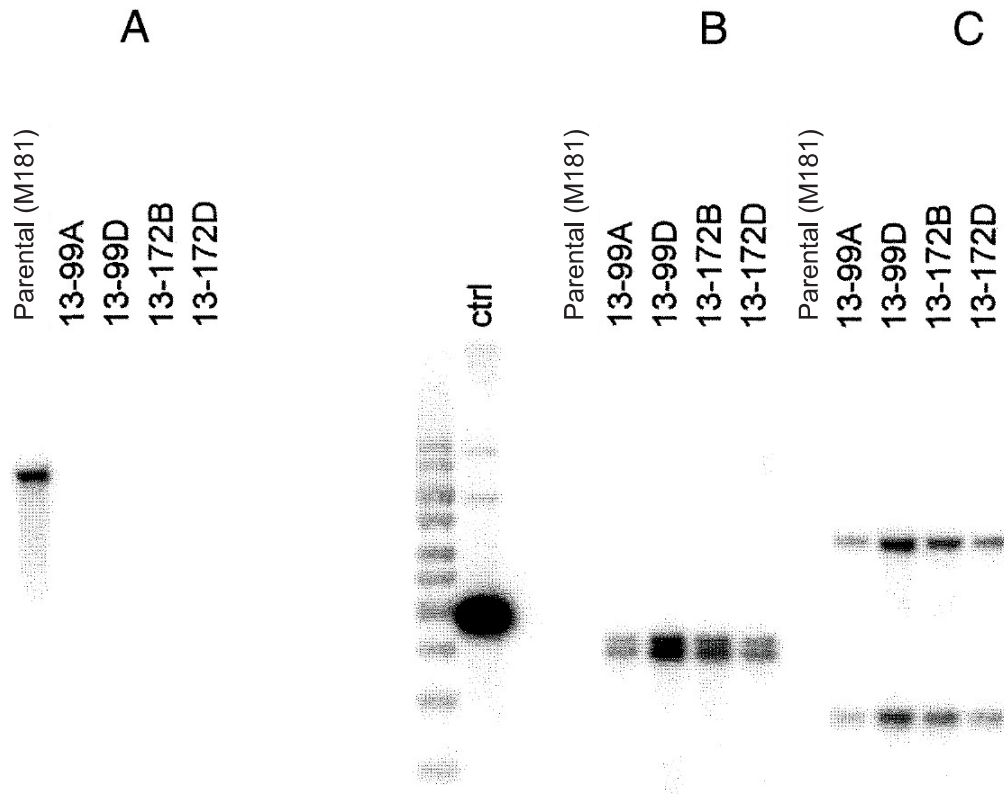


FIG. 18



Geração de cepa M194 com deleção de *pep1tsp2* (para transformações de MAB01)

M194 = 13-172D

M181 = parental

Sinais esperados:

A) ORF de *tsp1*: [em branco] kb de M181 parental, nenhum sinal de transformantes

B) *bar*: 1,4 + 2,5 kb de transformantes, 2,9 kb de pTTv42, nada de m181

c) *bar*: 1,9 + 3,2 kb de transformantes, 2,9 kb de pTTv42, nada de M181

FIG. 19

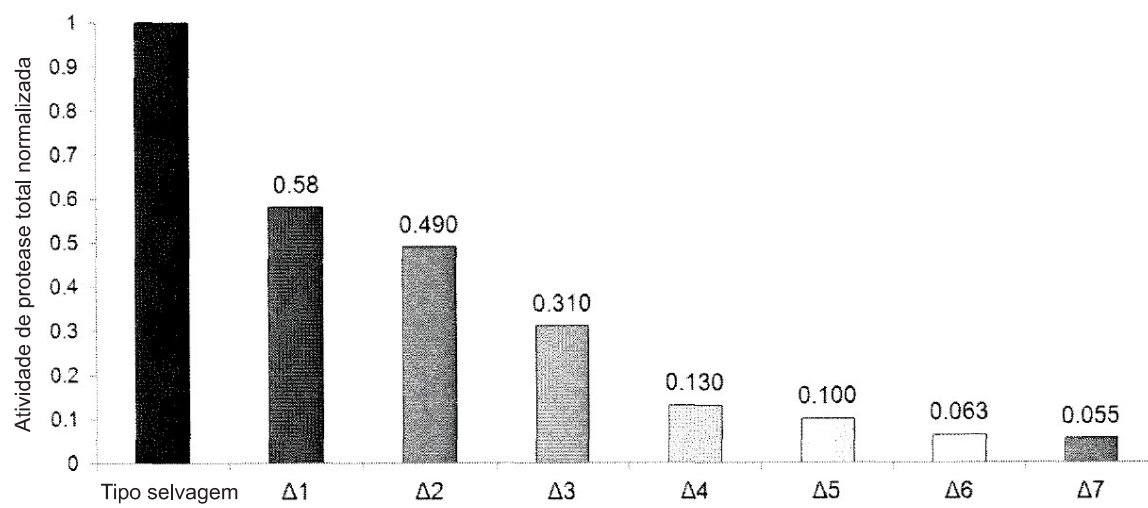


FIG. 20

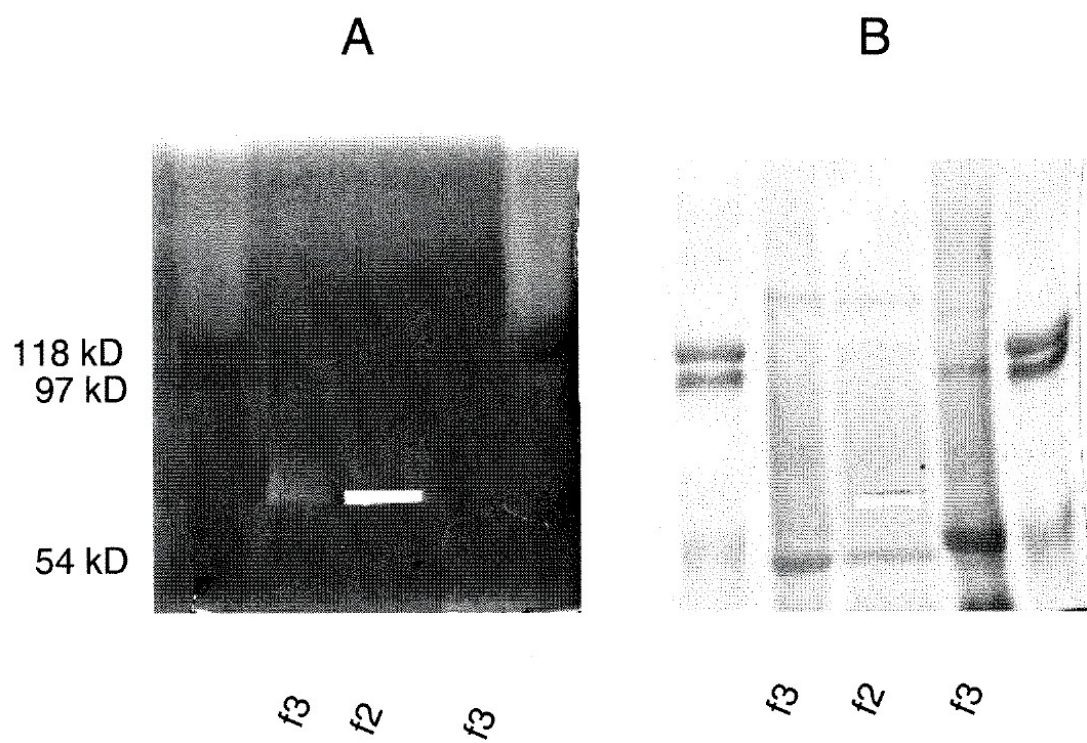


FIG. 21

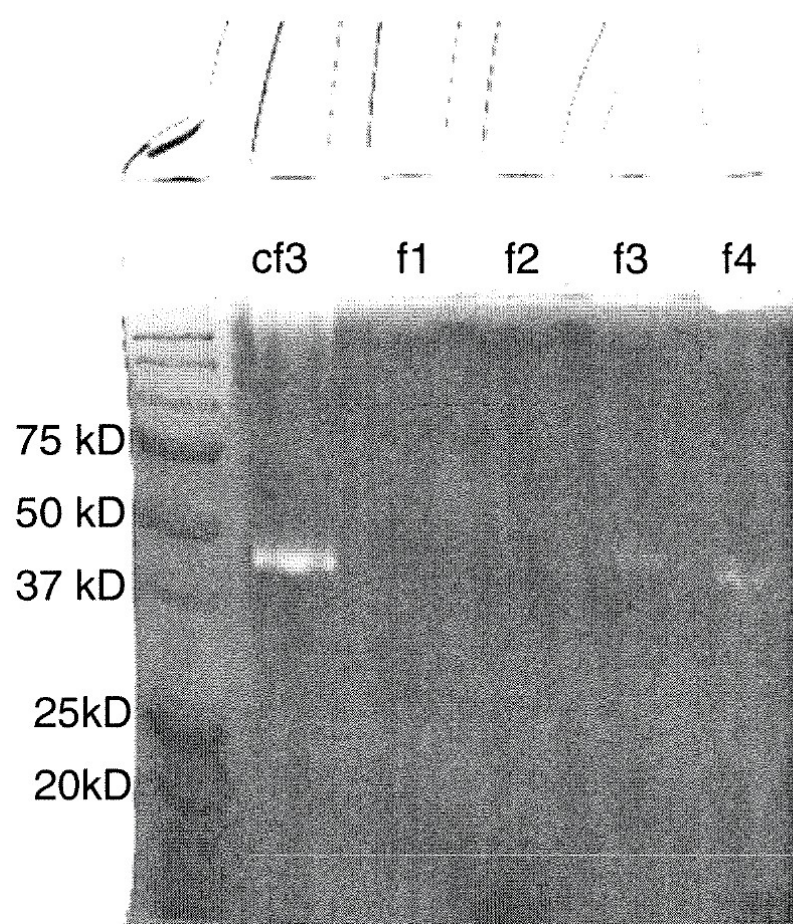


FIG. 22



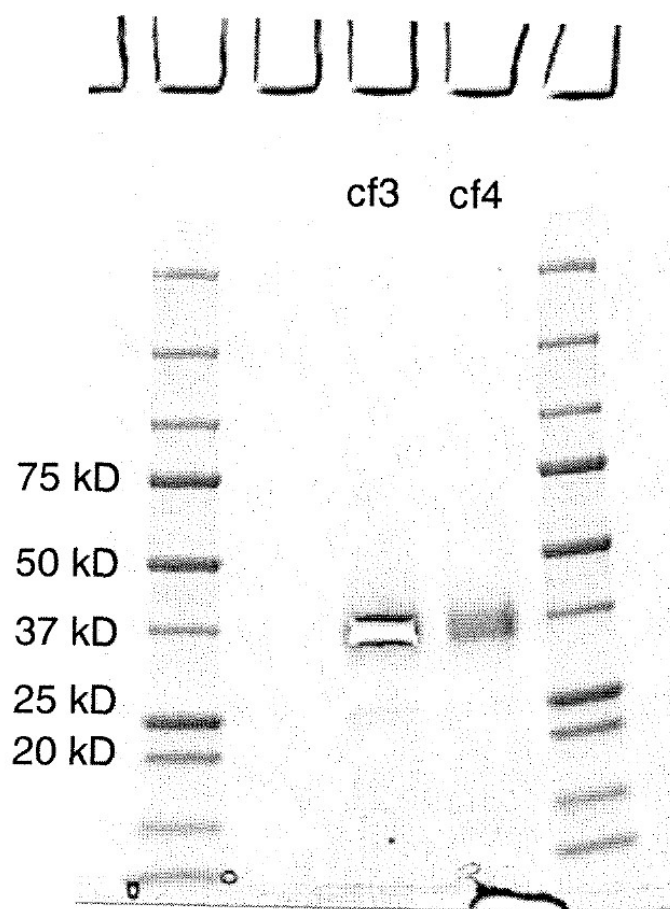


FIG. 23

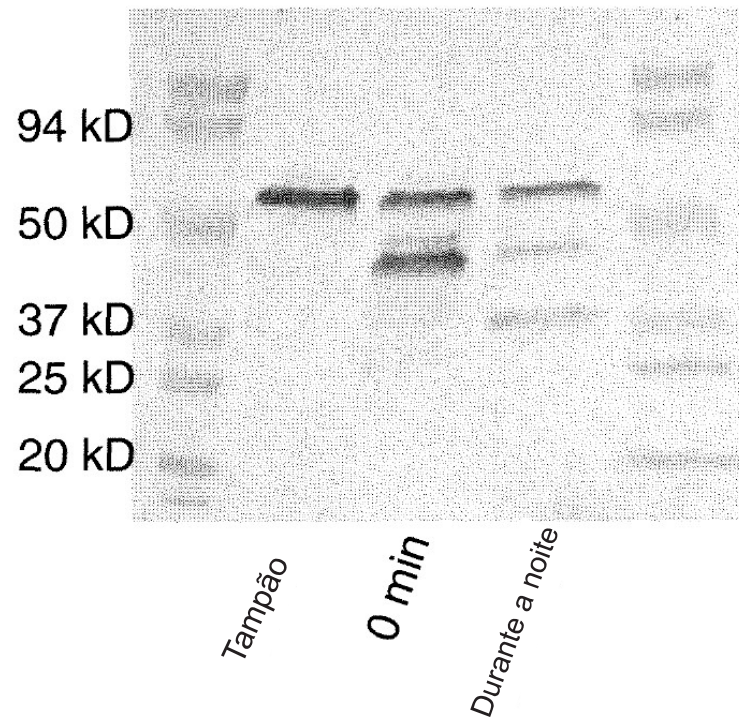


FIG. 24

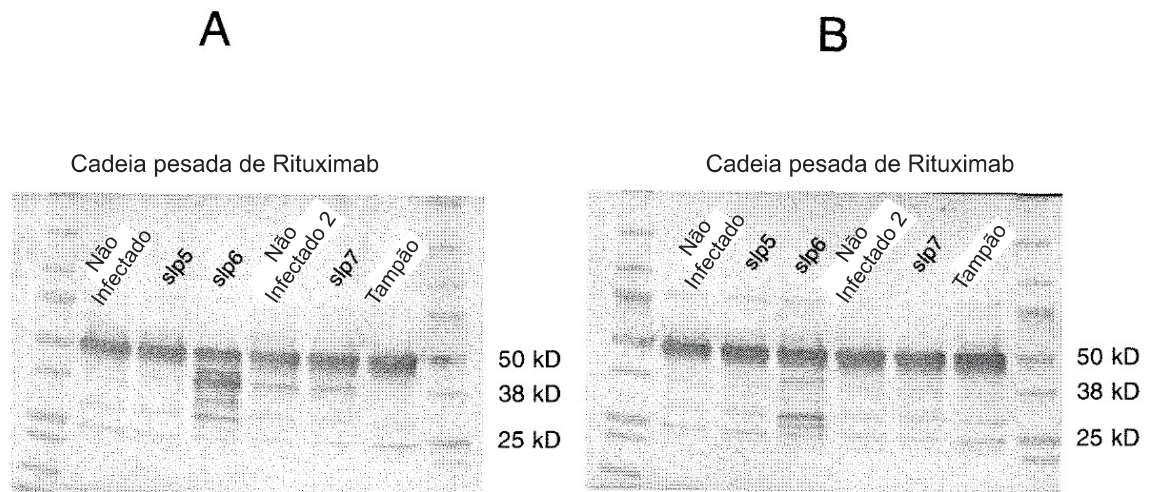


FIG. 25



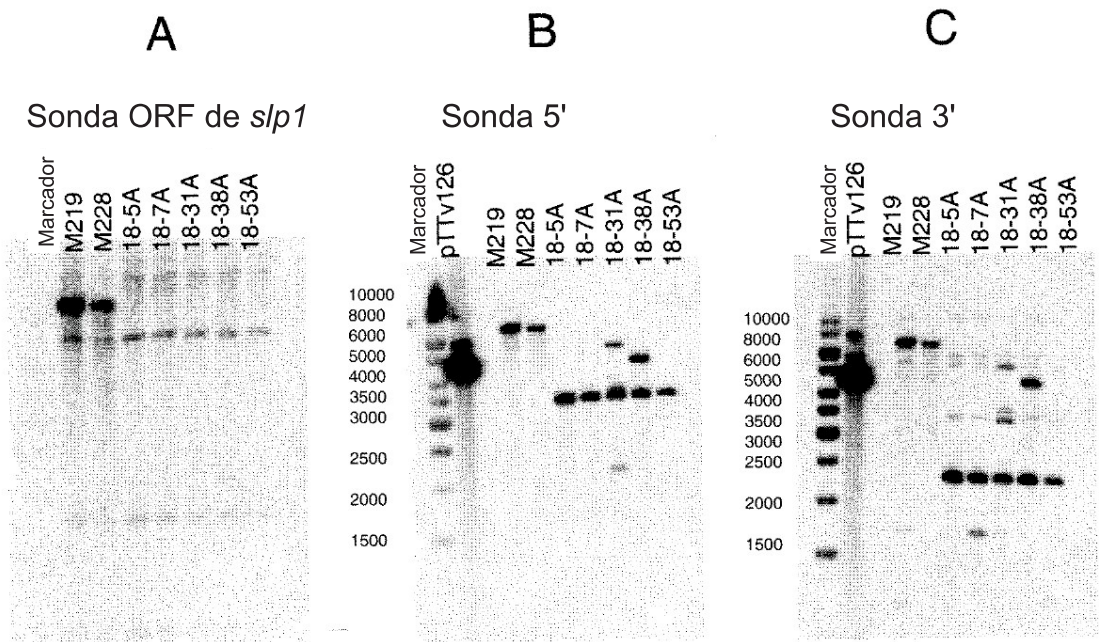


FIG. 26

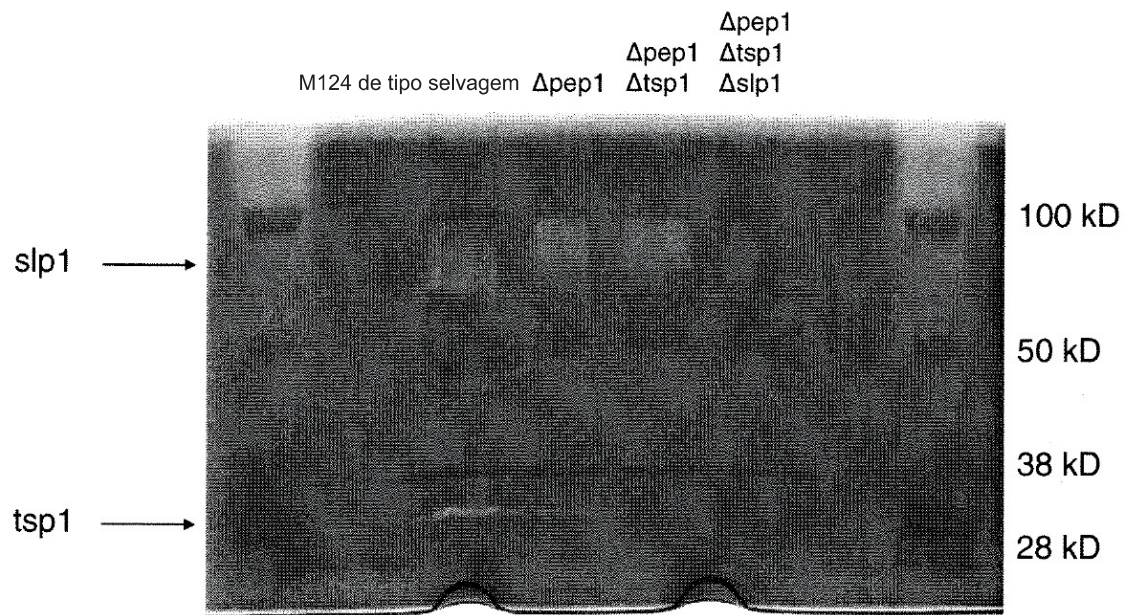


FIG. 27

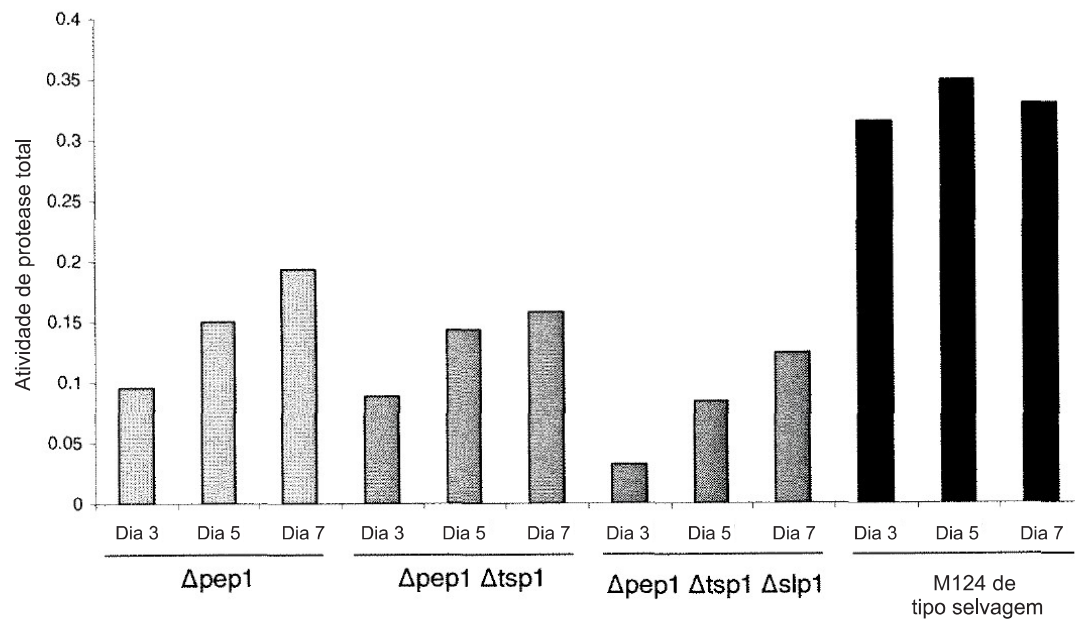


FIG. 28

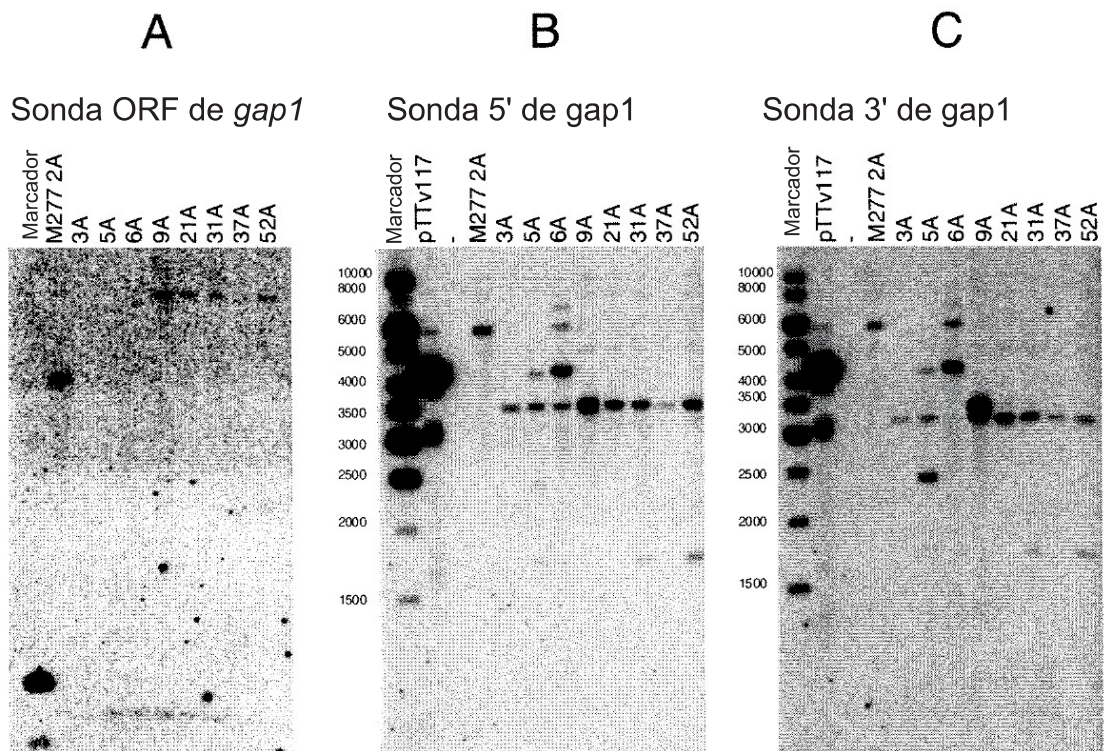


FIG. 29

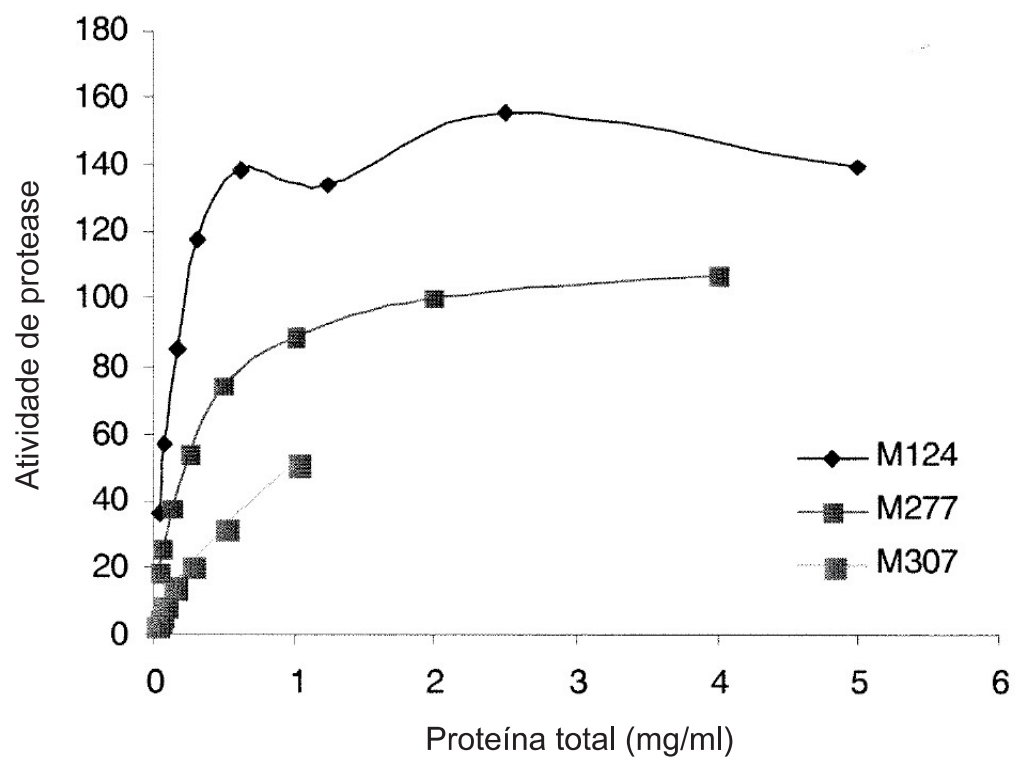


FIG. 30

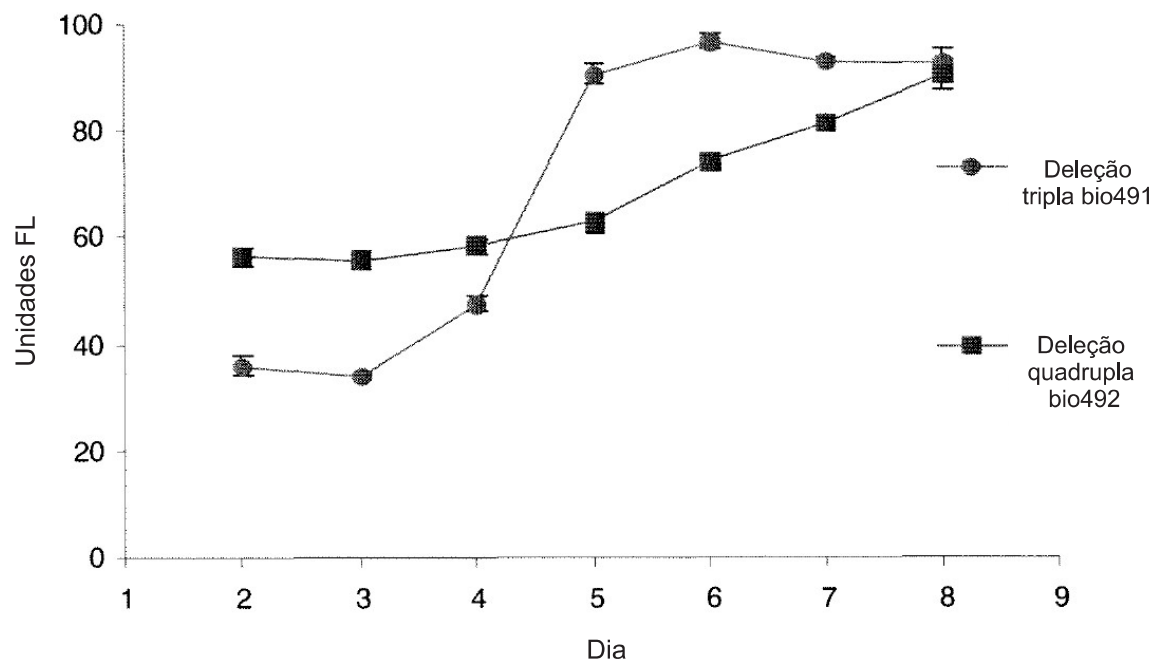
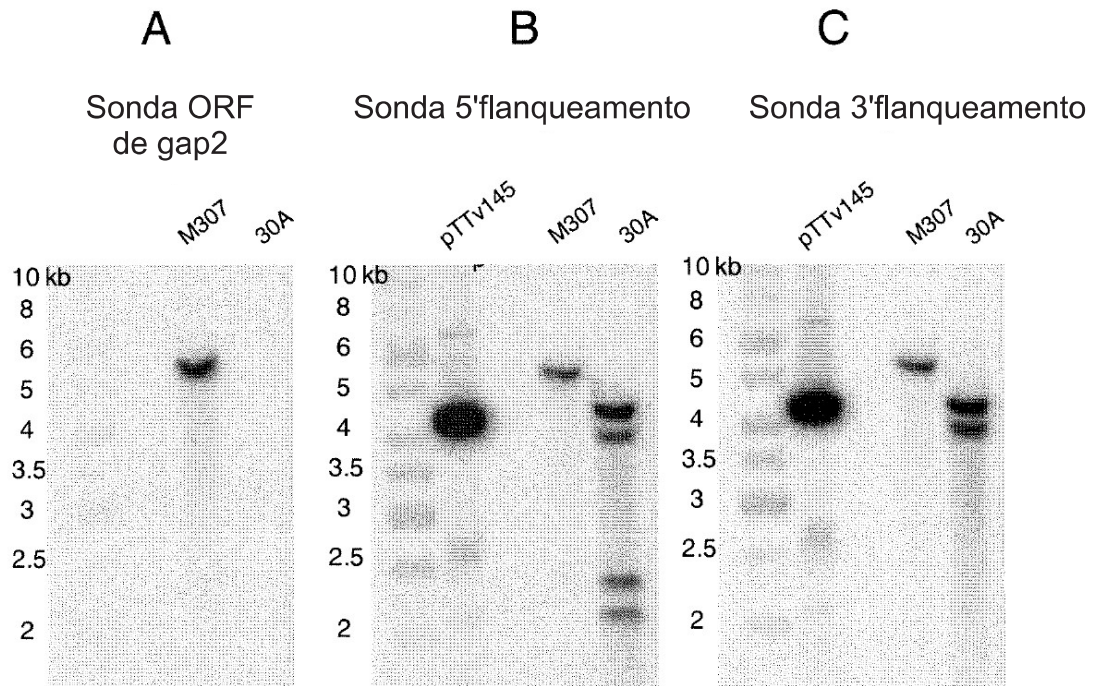


FIG. 31



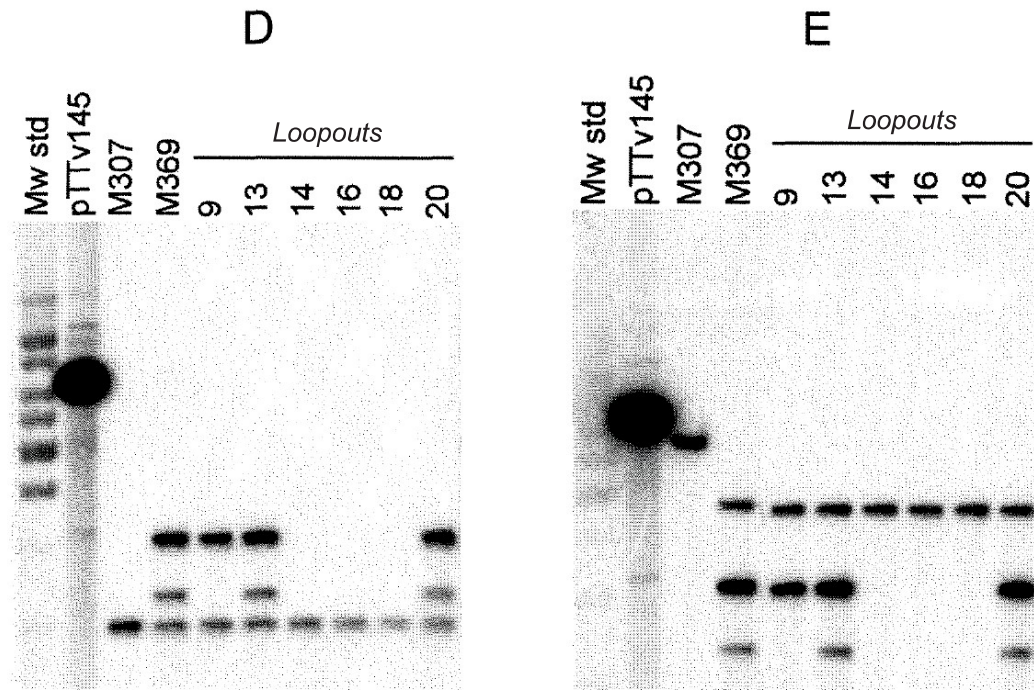


Geração de cepa M369 com deleção quintupla de protease, clone 7-30A = M369

Sinais esperados:

- A) ORF de *gap2*: 4,9 kb de parental (M307), nenhum sinal de transformante
- B) 5'flanqueamento de *gap2*: 4,9 kb de parental, 2,3 kb de transformante, 2,3 kb do plasmídeo de controle pTTv145
- C) 3'flanqueamento de *gap2*: 4,9 kb de parental, 3,8 kb de transformantes, 3,8 kb do plasmídeo de controle pTTv145

FIG. 32



Geração de pyr4- a partir da cepa M369 com deleção quártupla de protease, resultando na cepa M381 (clone 14)

Sinais esperados:

- D) 5'flanqueamento de gap2: 1,5 kb de todas as cepas, 4,1 kb do plasmídeo de controle pTTv145
- E) 3'flanqueamento de gap2: 3,6 kb de M307, 2,7 kb de M369 + clones *loopout*, 3,8 kb do plasmídeo de controle pTTv145

FIG. 32 cont.



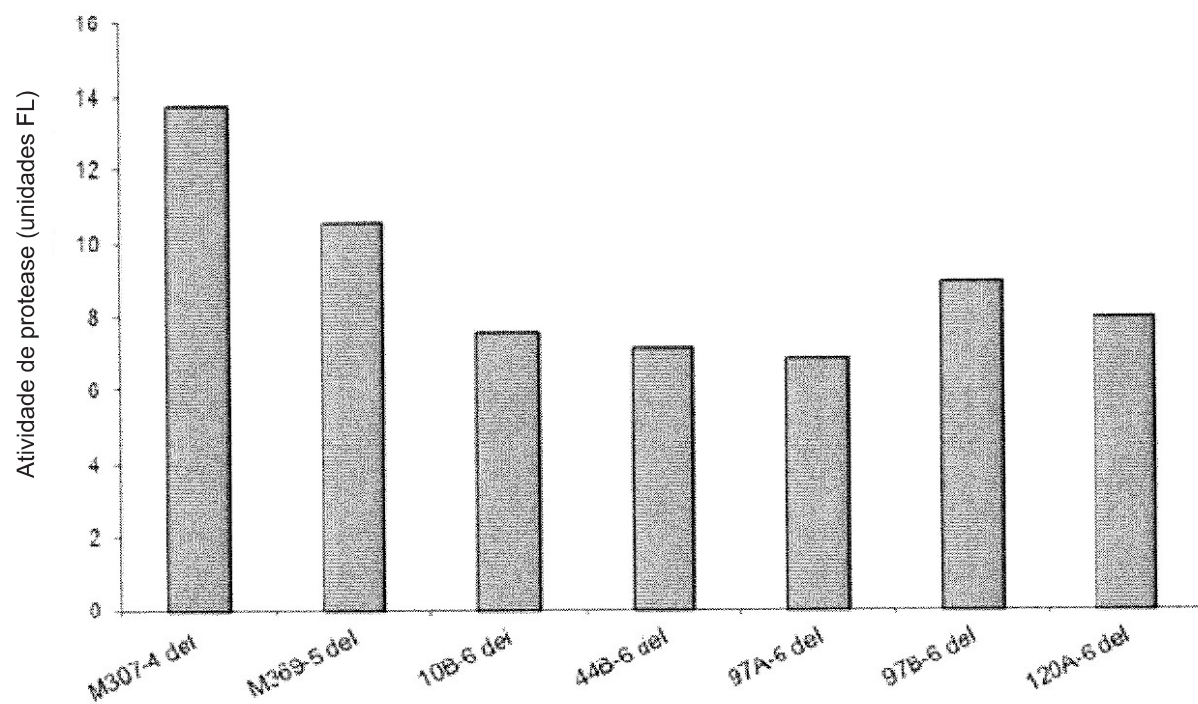
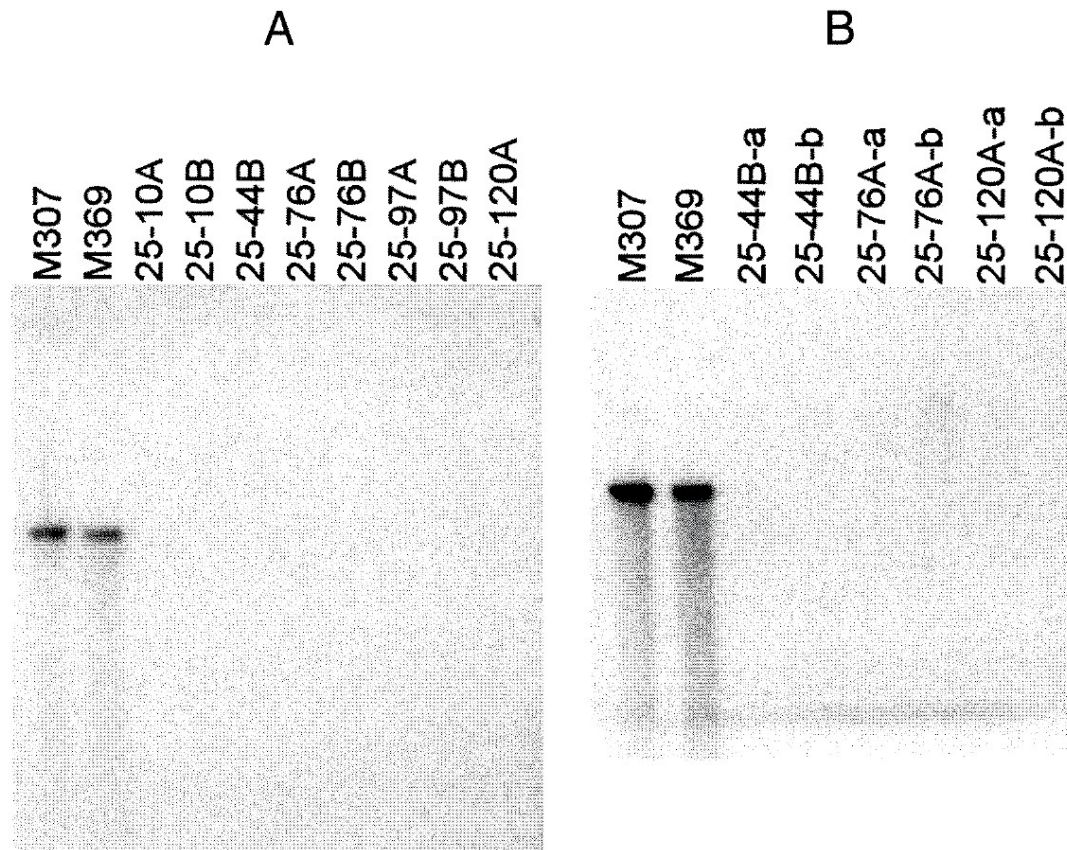


FIG. 33



Geração de cepas M396 e M400 com deleção de protease 6 vezes

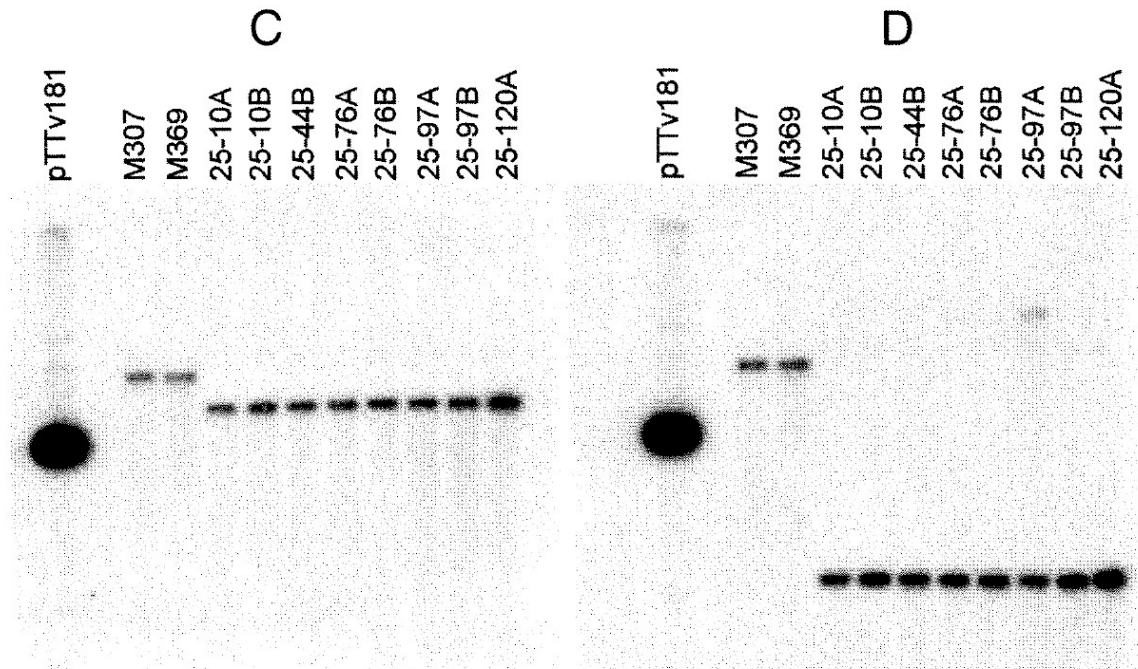
M396 = 25-120A

M400 = 25-120A-a, isto é, clone repurificado a partir de M396

Sinais esperados:

- Aa & Ab) ORF de pep4: 6,3 kb de M307 e M369, nenhum sinal de transformantes

FIG. 34

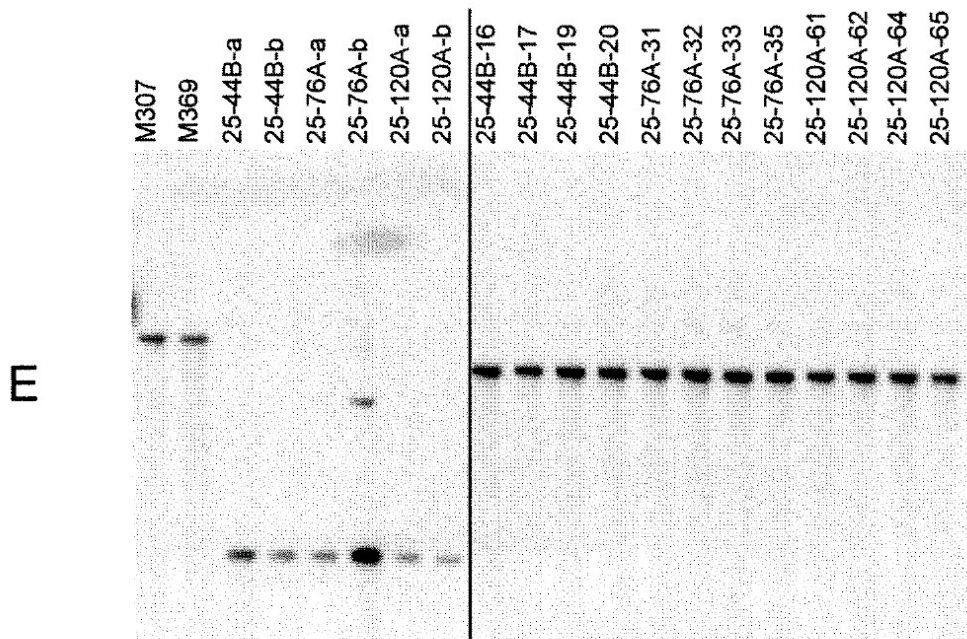


Geração de cepas M396 e M400 com deleção de protease 6 vezes  
M396 = 25-120A

Sinais esperados:

- B) 5'flanqueamento de pep4: 6,3 kb de M307 e M369, 4,8 kb de transformantes, 4,0 kb de pTTv181
- C) 3'flanqueamento de pep4: 6,3 kb de M307 e M269, 2,1 kb de transformantes, 4,0 kb de pTTv181

FIG. 34 cont.



Geração de *pyr4*<sup>-</sup> a partir de cepas M396 com deleção de protease 6 vezes  
M396 = 25-120A (> clone repurificado 25-120A-a = M400)

Sinais esperados:

- D) 3'flanqueamento de *pep4*: 6,3 kb de M307 e M369, 2,1 kb de transformantes purificados, 4,9 kb dos clones *loopout*

FIG. 34 cont.



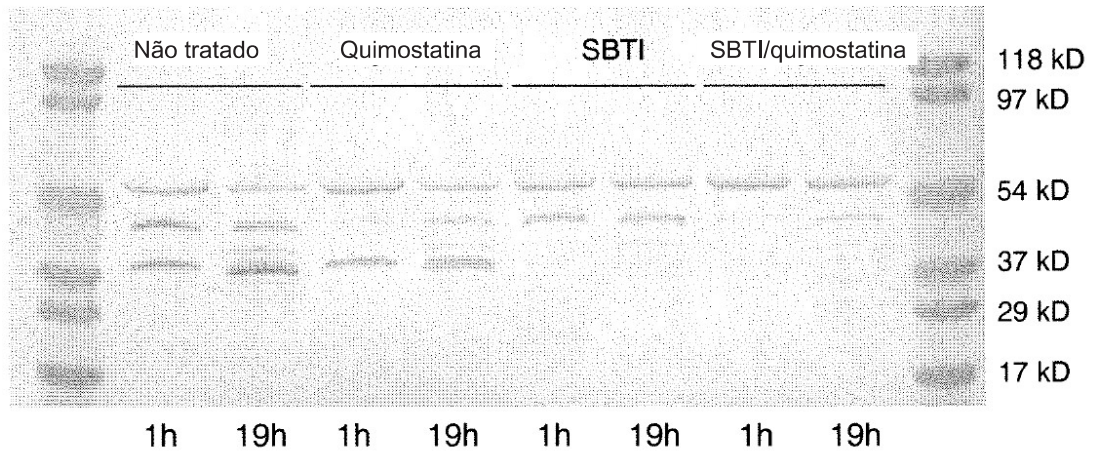


FIG. 35

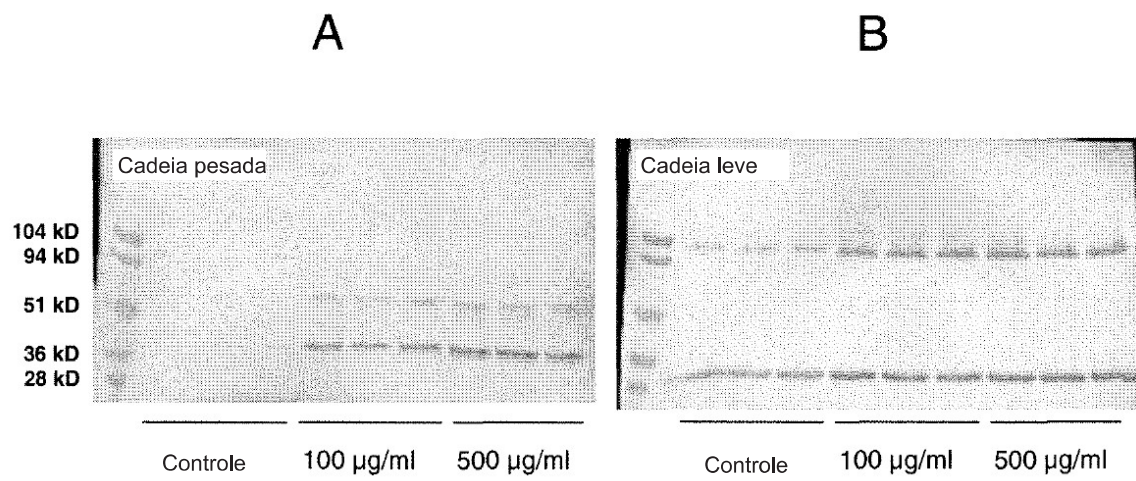


FIG. 36

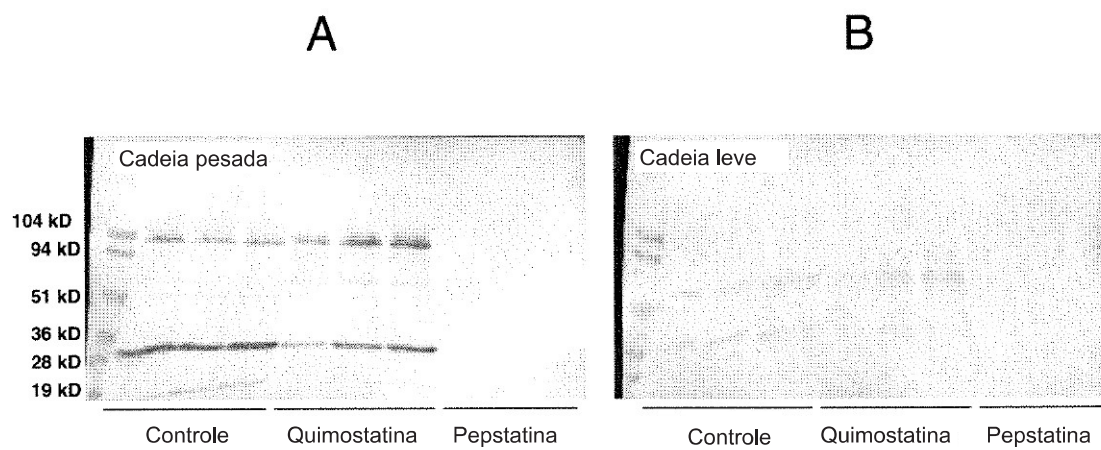


FIG. 37

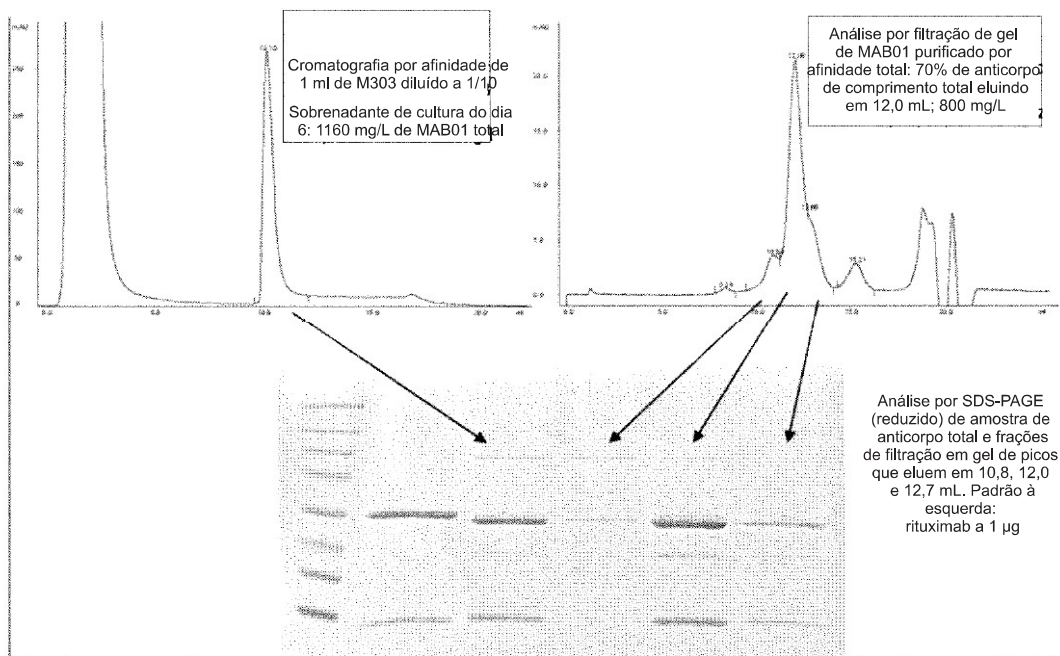
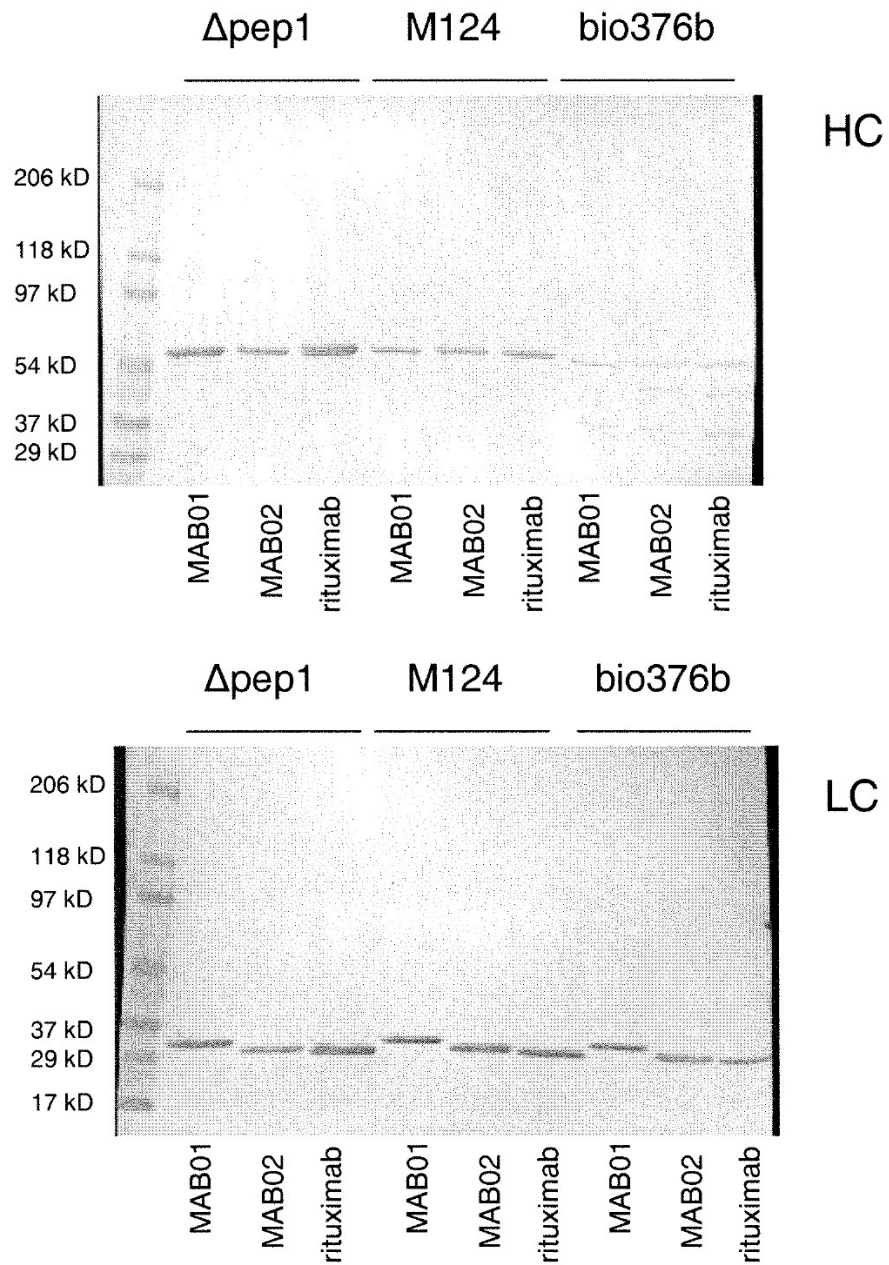


FIG. 38



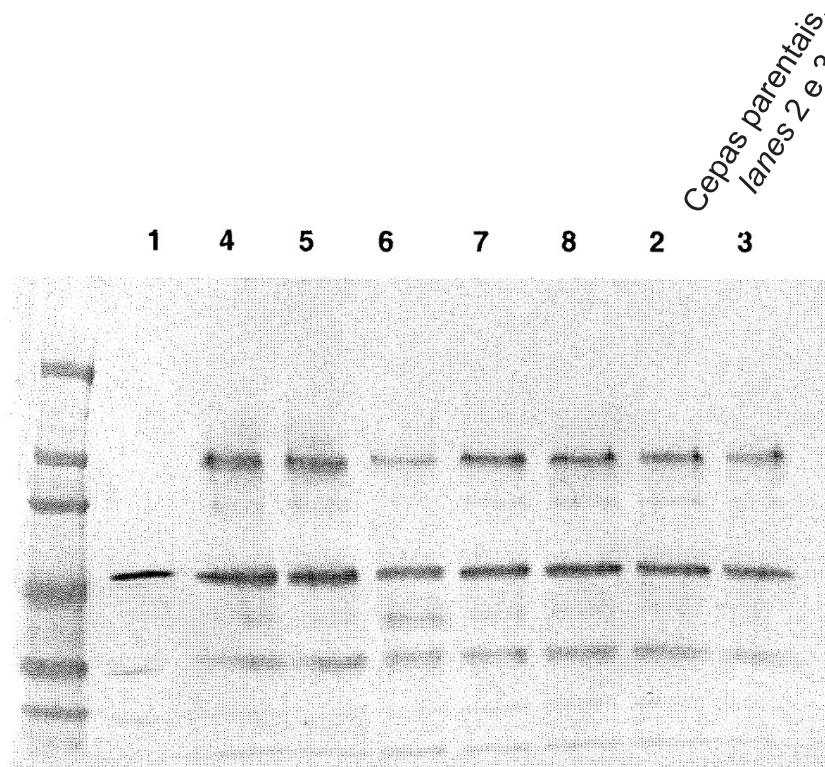
$\Delta$ pep1 aprimora a estabilidade de cadeia pesada



2 mg/ml de sobrenadante do grande frasco de agitação ( $\Delta$ pep1 e M124); 2 mg/ml de sobrenadante de fermentação descontínua; 18 horas de incubação a 37 °C em um pH de 5,5

FIG. 39

$\Delta$ tsp1 aprimora os níveis de produção de cadeia pesada de rituximab no dia 5

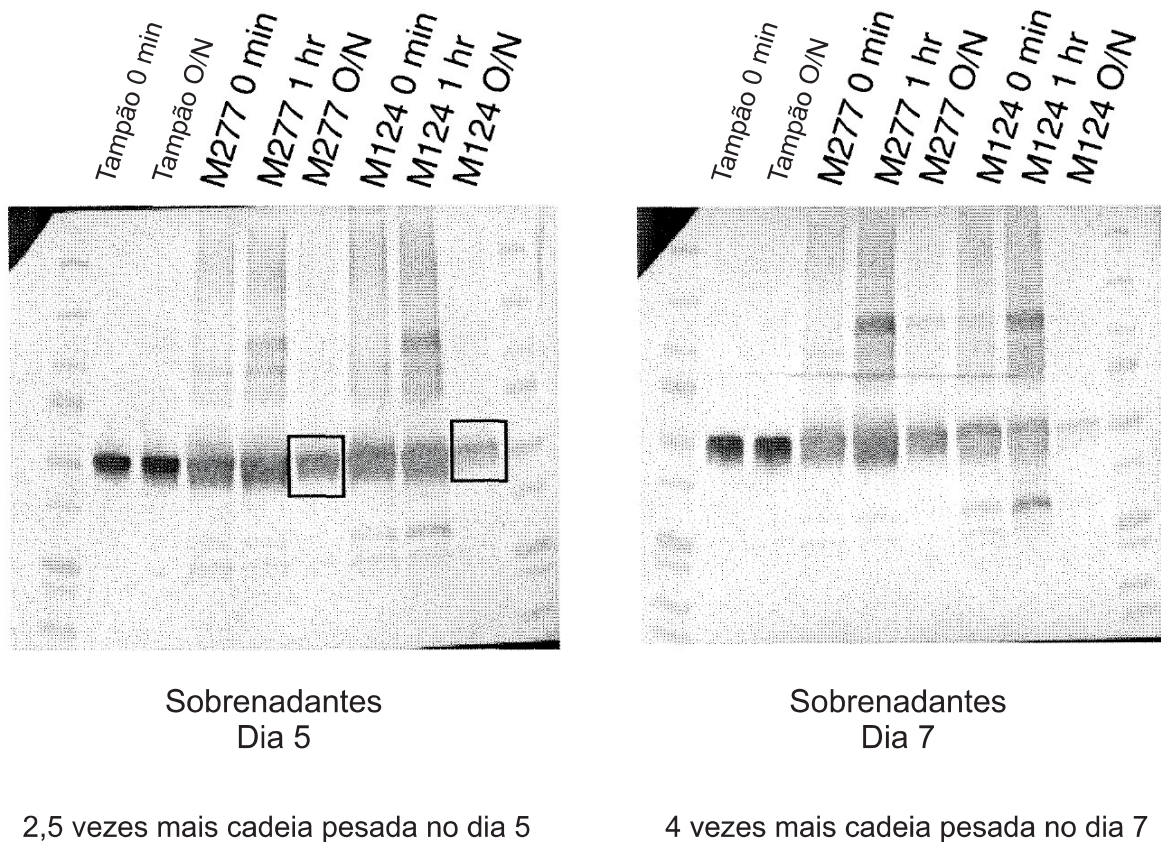


*Lanes:* 1) Controle Rx a 50 ng, 2 & 3) Cepas parental Rx 25A  $\Delta$ tsp1, 4) 12-2A, 5) 12-16A, 6) 12-19A, 7) 12-20A, 8) 12-34A

*Lanes:* 1) Controle Rx a 50 ng, 2 & 3) Cepas parental Rx 25A  $\Delta$ tsp1, 4) 12-2A, 5) 12-16A, 6) 12-19A, 7) 12-20A, 8) 12-34A

FIG. 40

Degradação de cadeia pesada de MAB01 é reduzida no sobrenadante da cepa M277 com deleção tripla



Sobrenadantes diluídos para 6 mg/ml, enriquecidos com MAB01 a 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  e incubados a 37 °C. M277 é  $\Delta\text{pep1 } \Delta\text{tsp1 } \Delta\text{slp1}$ ; M124 é cepa de controle contendo protease completa

FIG. 41

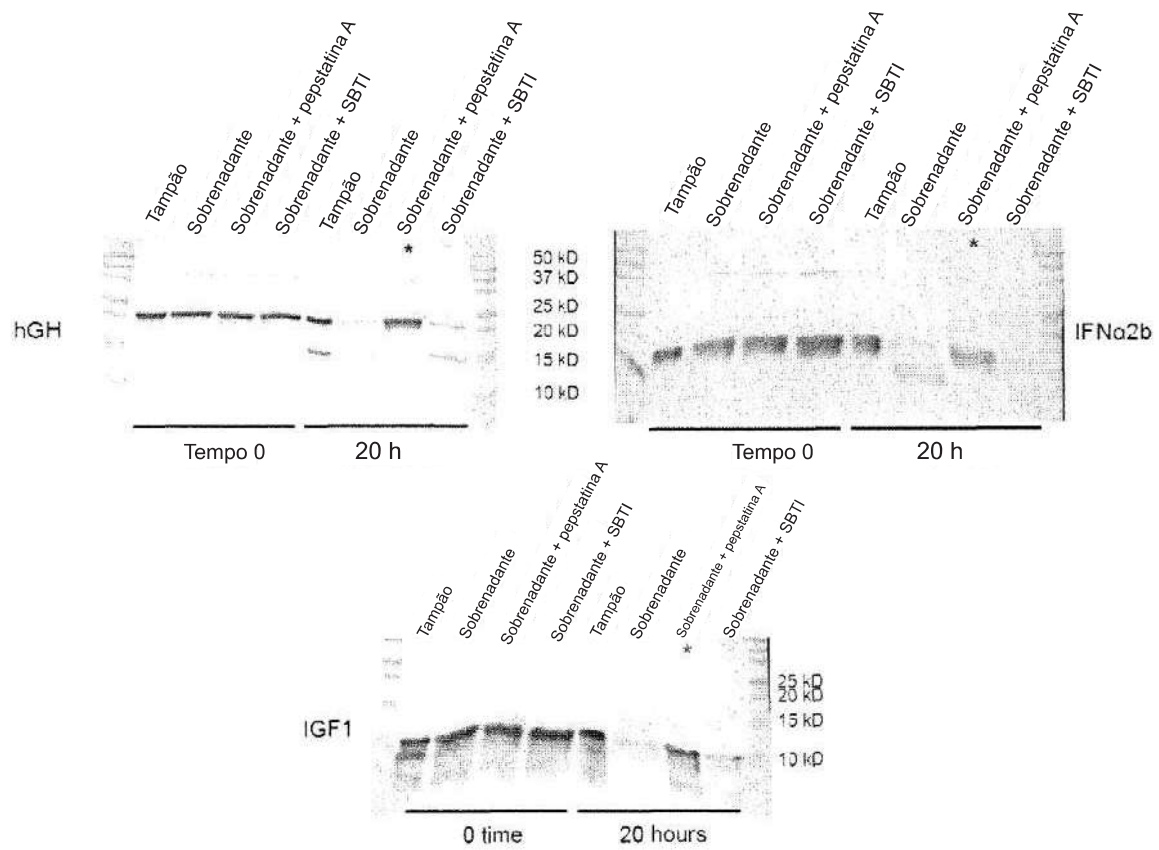


FIG. 42



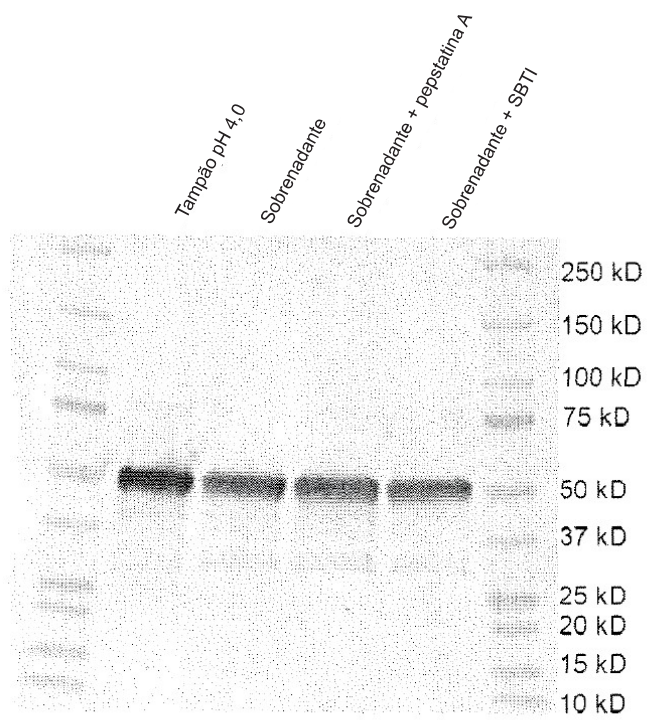


FIG. 43

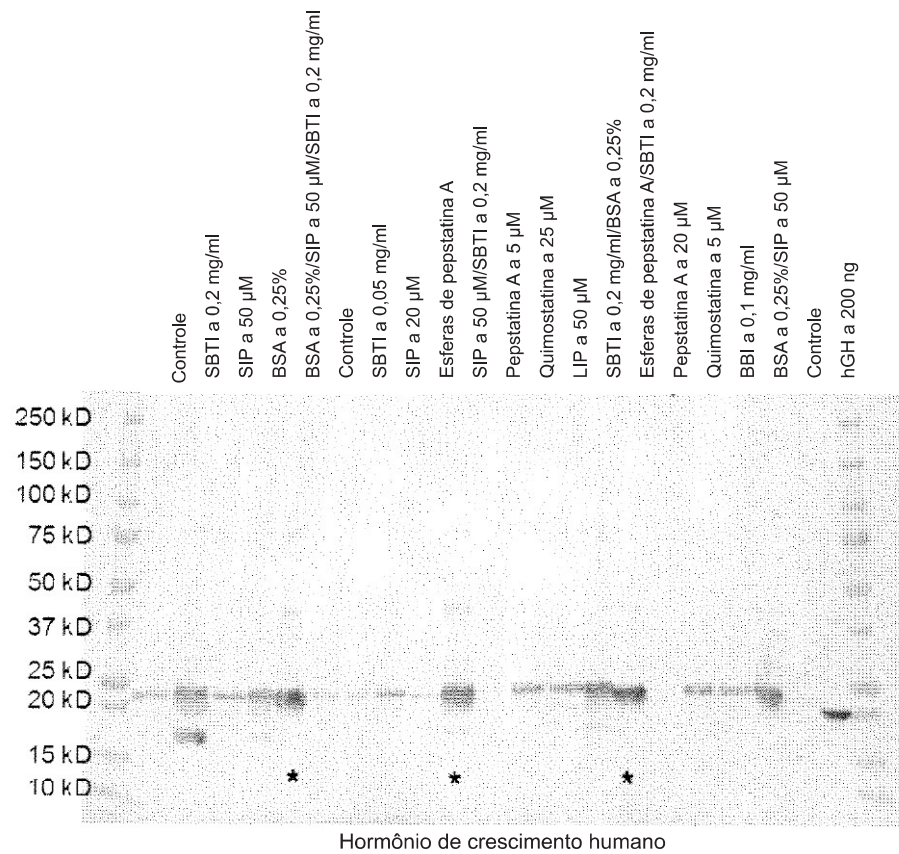


FIG. 44

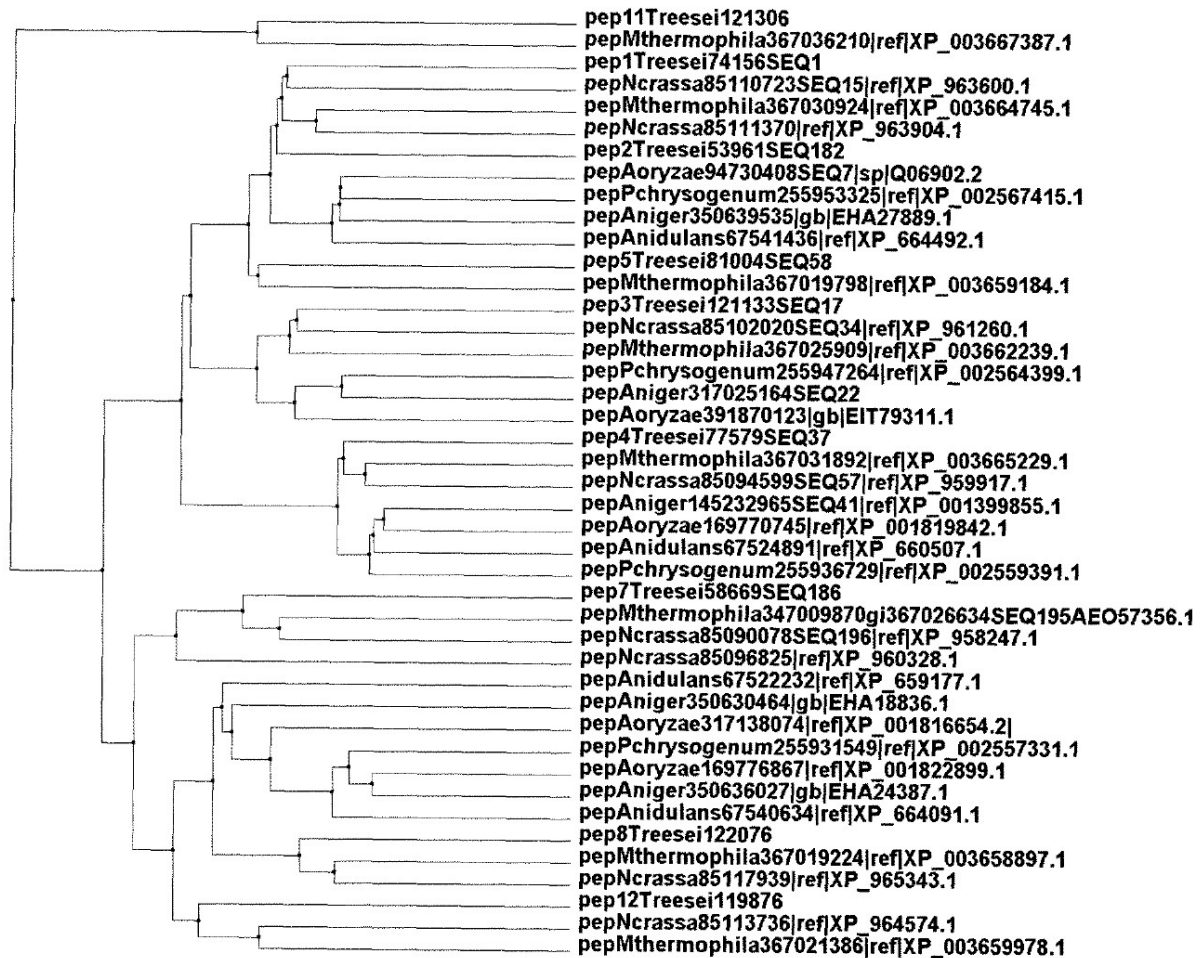


FIG. 45

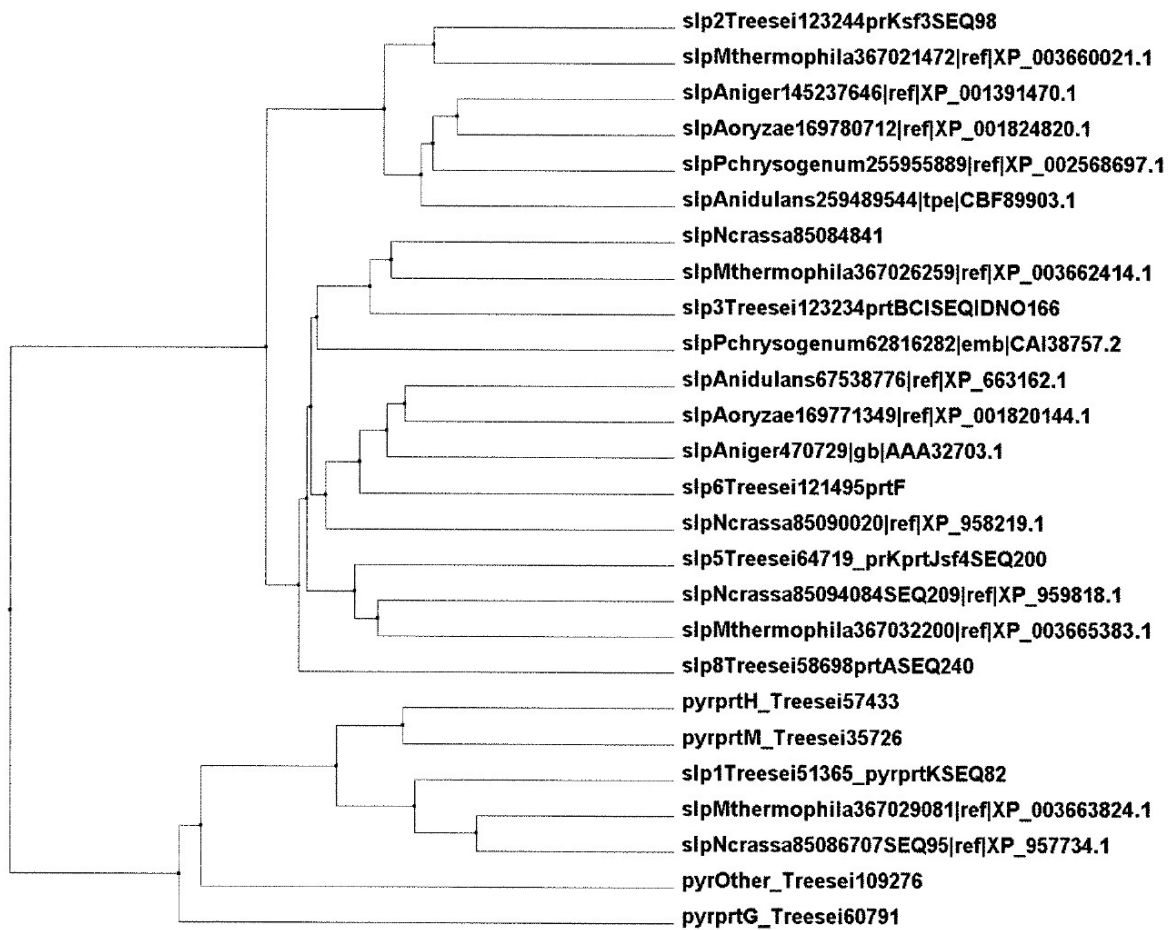


FIG. 46



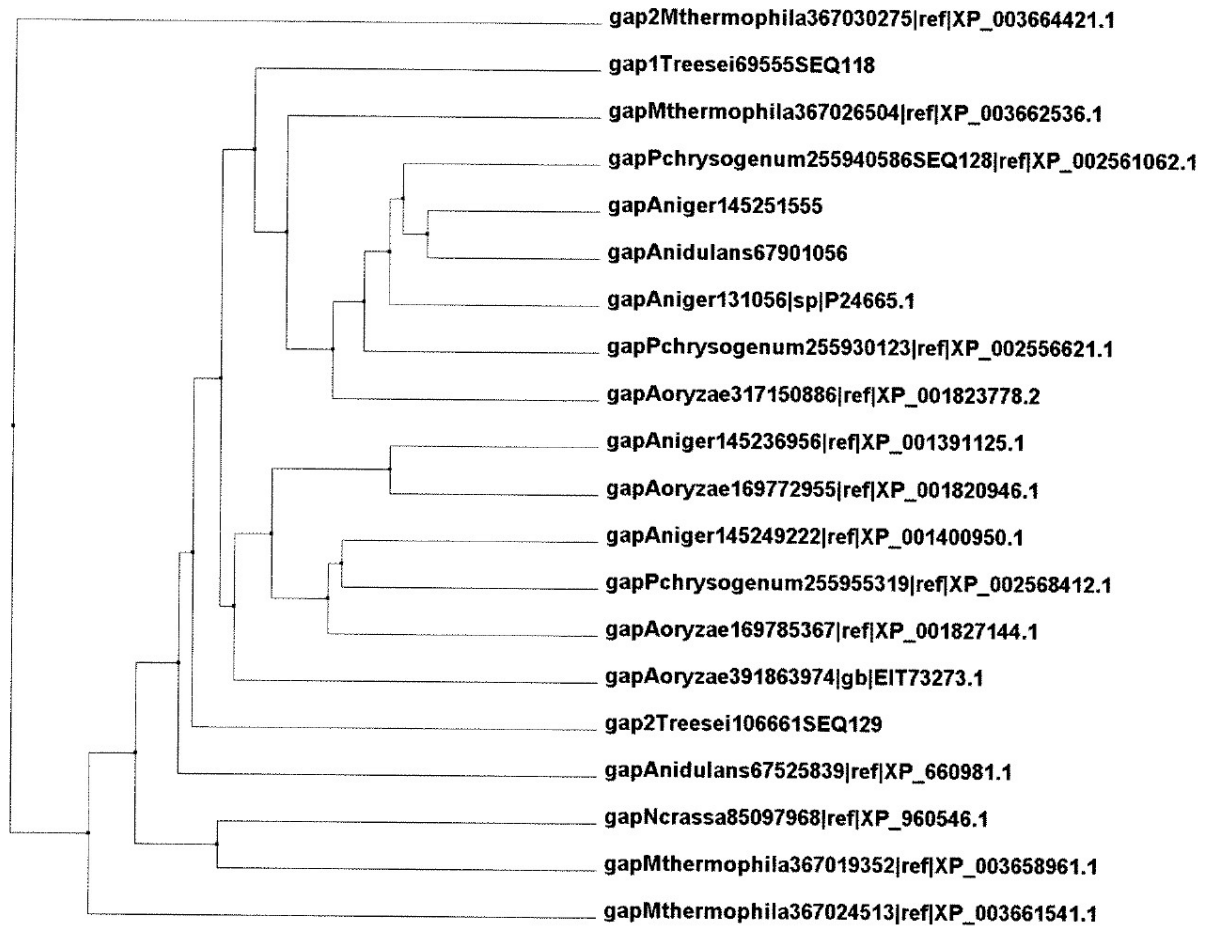


FIG. 47

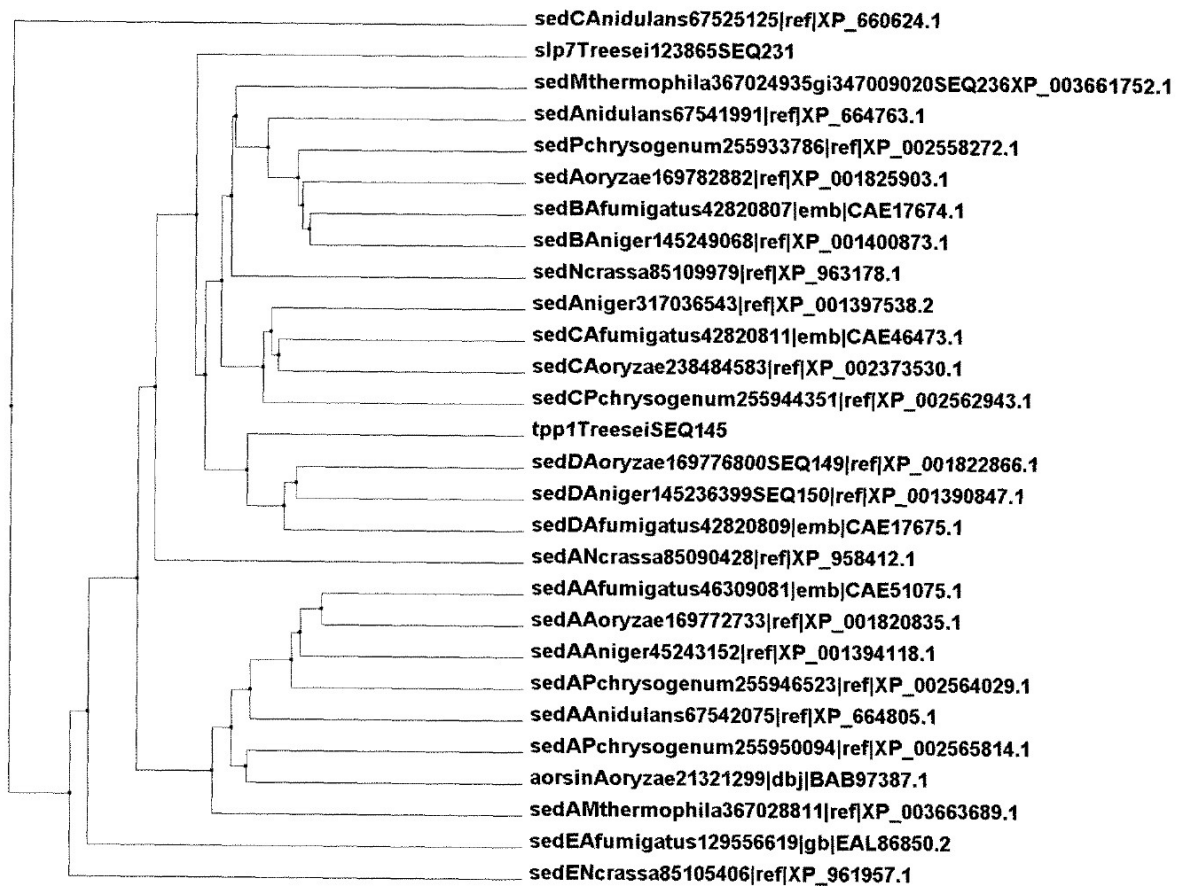


FIG. 48

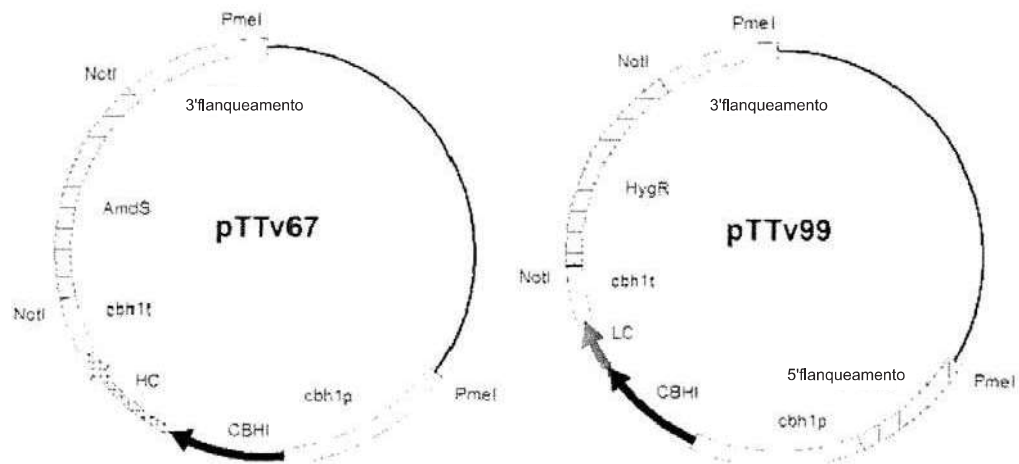


FIG. 49A

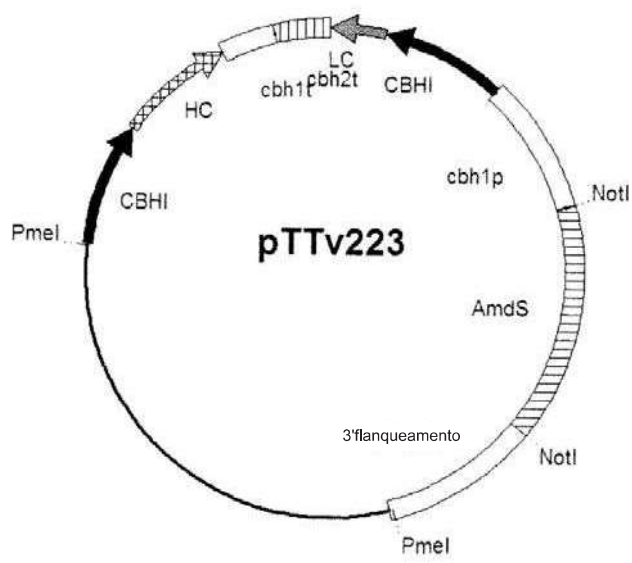


FIG. 49B

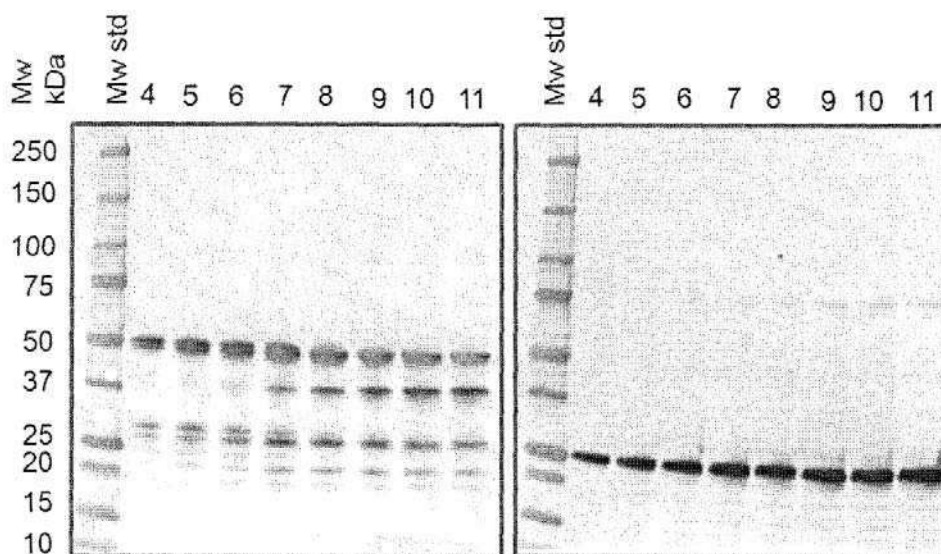


FIG. 50A

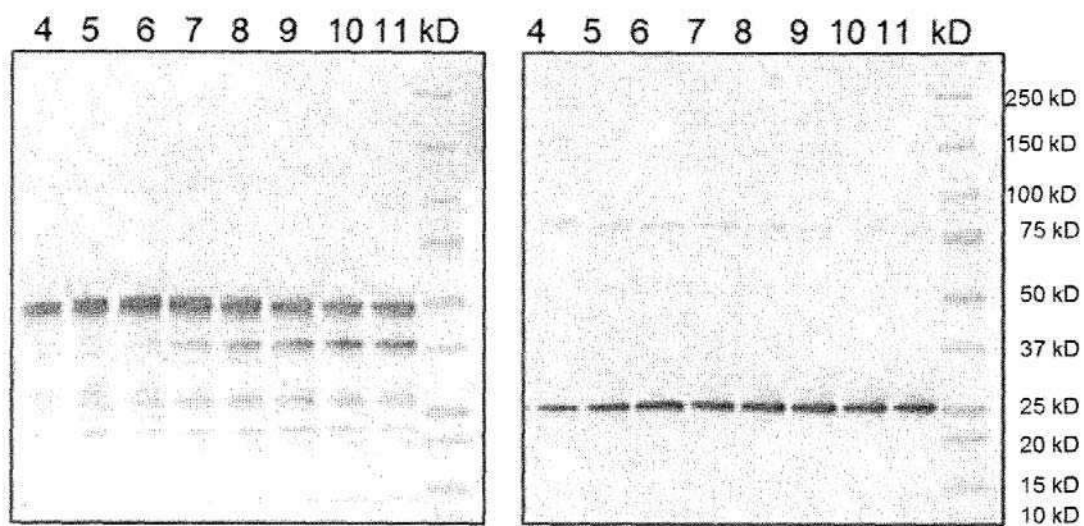


FIG. 50B

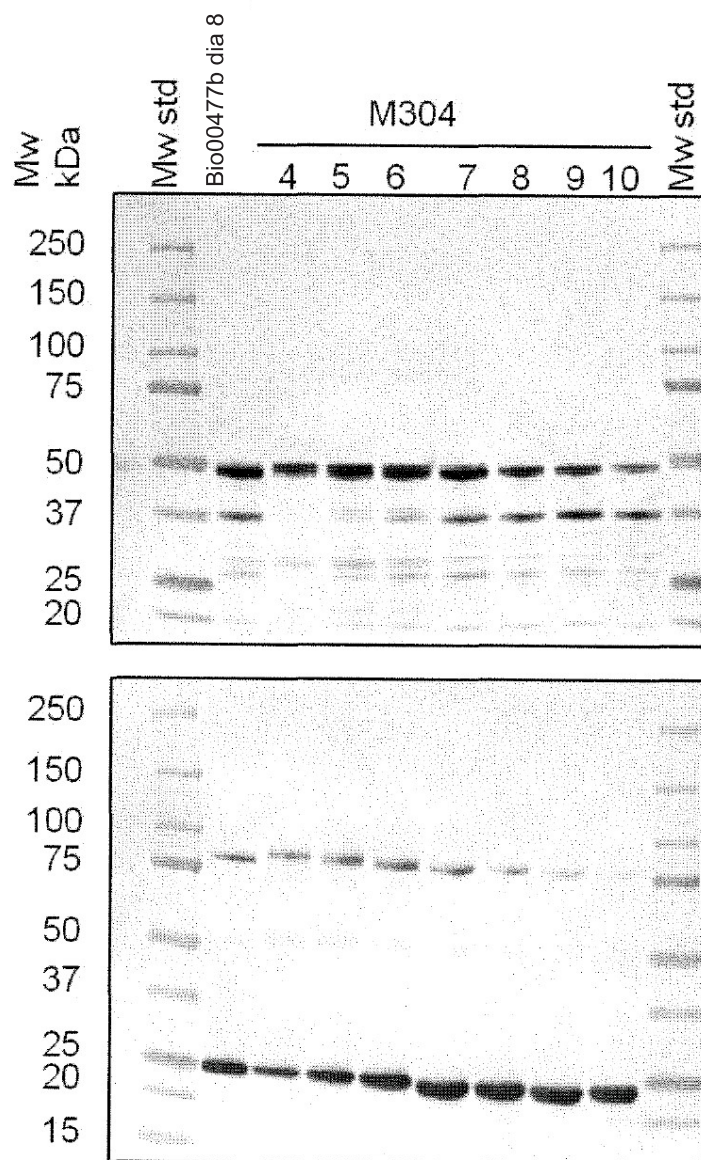


FIG. 51

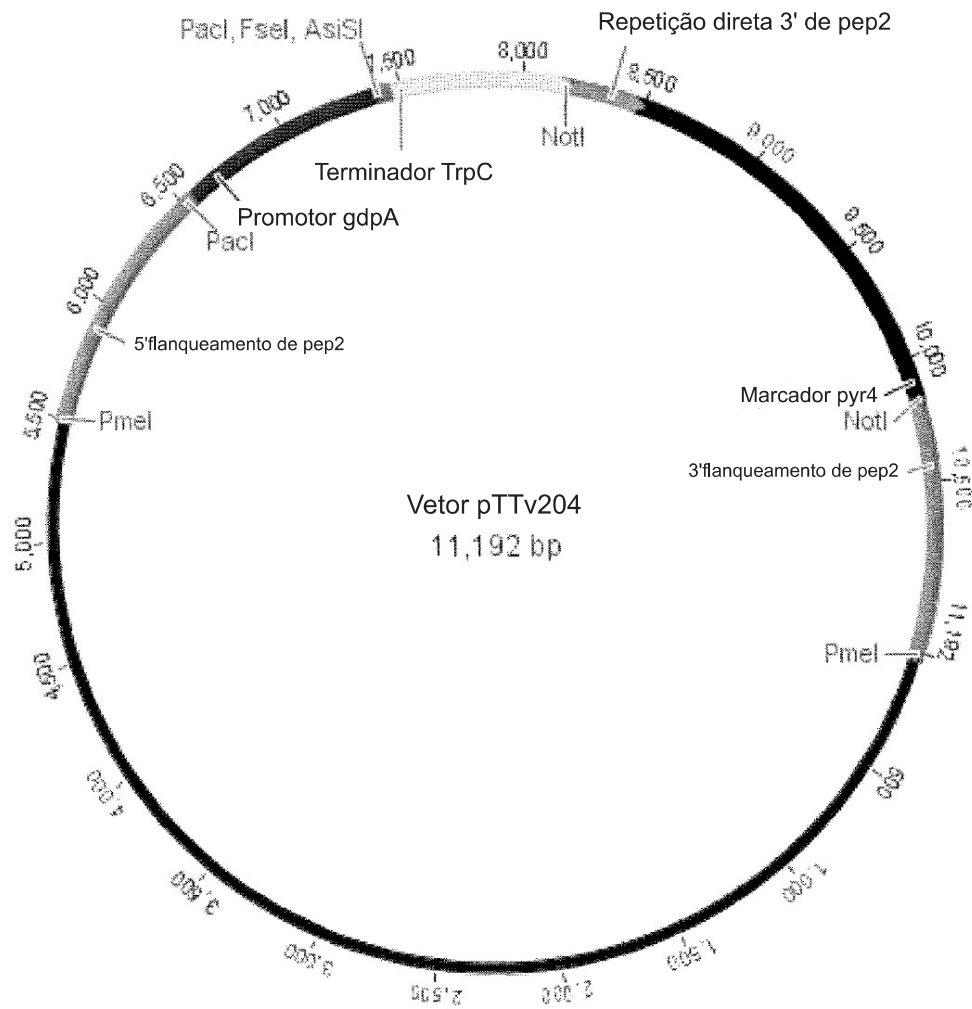


FIG. 52



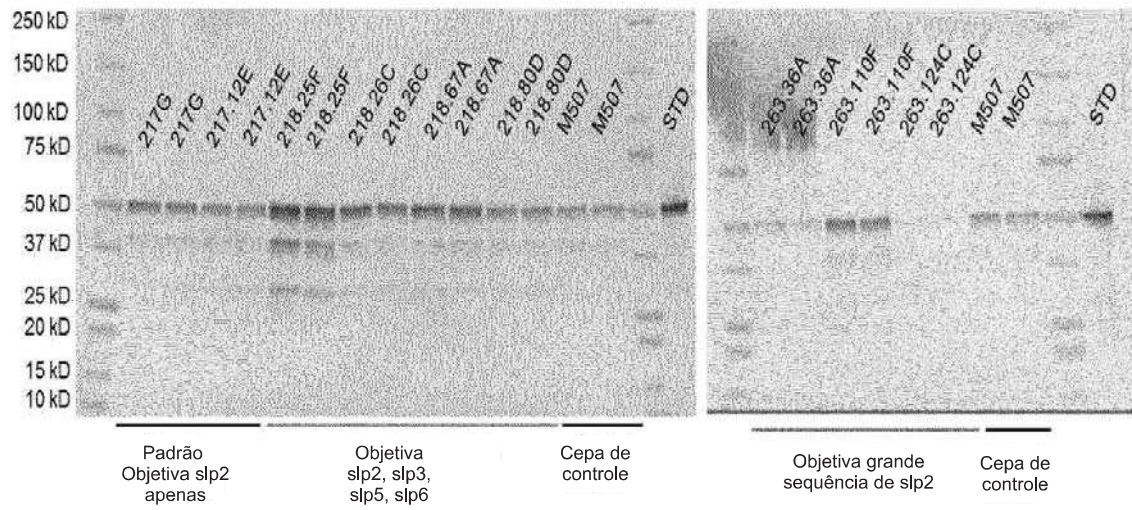


FIG. 53

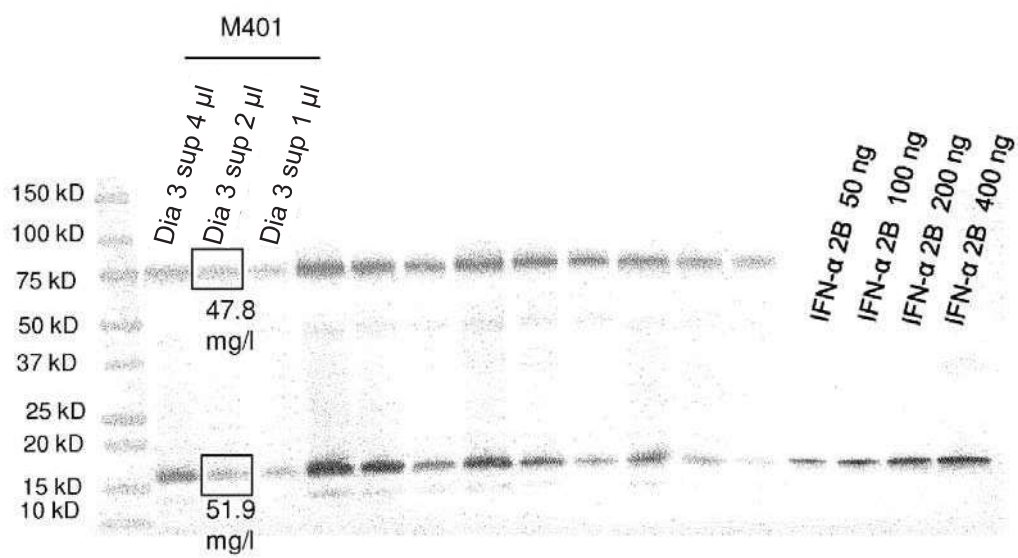
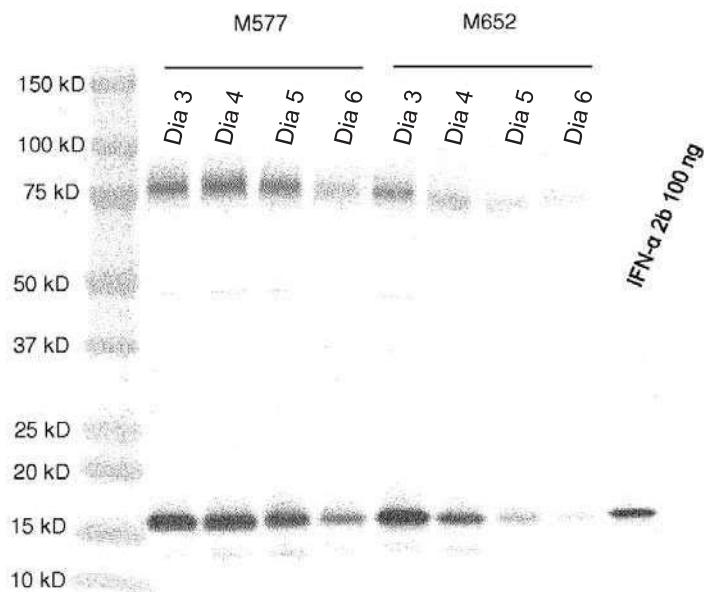
**A.****B.**

FIG. 54



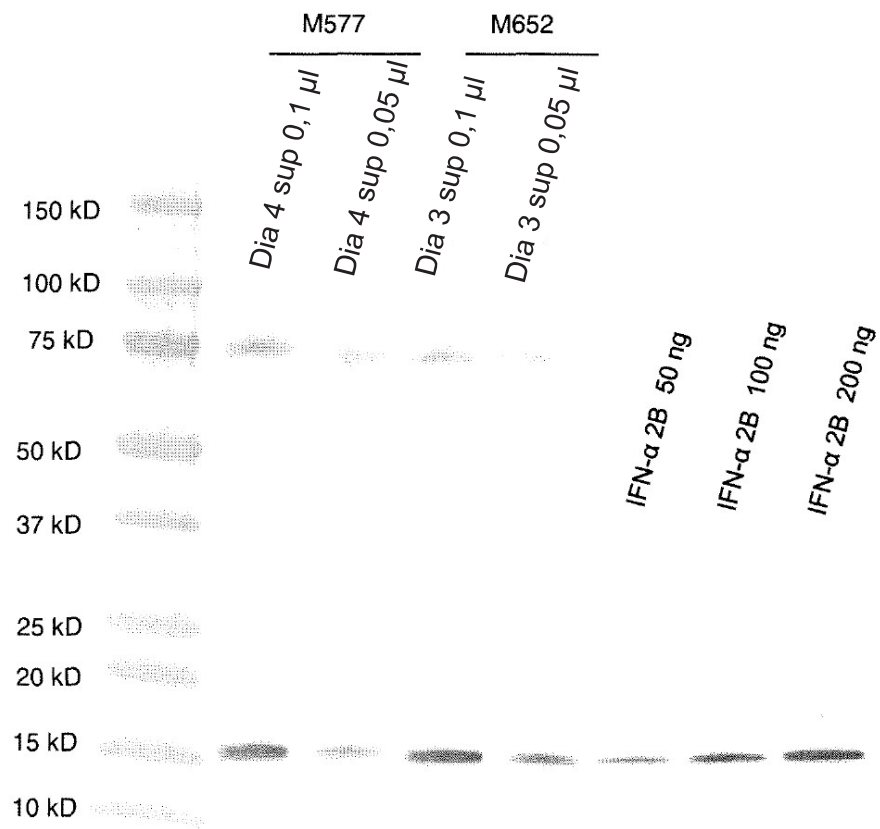


FIG. 55

## **RESUMO**

Patente de Invenção: **"CÉLULAS FÚNGICAS FILAMENTOSAS DEFICIENTES DE PROTEASE E MÉTODOS DE USO DAS MESMAS"**.

A presente invenção refere-se a uma célula fúngica filamentosa compreendendo pelo menos três proteases endógenas tendo atividade reduzida e um polinucleotídeo recombinante que codifica um polipeptídeo heterólogo, bem como a métodos para aprimorar a estabilidade de um polipeptídeo e de produção de um polipeptídeo heterólogo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

### **Código de Controle**

Campo 1



78D704A5C3ABE832

Campo 2



35B211A5BD64D96B

### **Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUENCIAS-P206577.txt
- Data de Geração do Código: 03-07-2014
- Hora de Geração do Código: 14:18:35
- Código de Controle:
  - Campo 1: 78D704A5C3ABE832
  - Campo 2: 35B211A5BD64D96B