

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97149850

C12N 15/85 (2006.01)

※ 申請日期： 97.12.19

C12N 15/12 (2006.01)

※IPC 分類： C12P 21/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P 35/00 (2006.01)

基於SM-蛋白質之分泌工程

A61P 37/00 (2006.01)

SM-PROTEIN BASED SECRETION ENGINEERING

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

德商百靈佳殷格翰製藥公司

BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA GMBH & CO. KG

代表人：(中文/英文)

1. 漢茲 哈蒙

HAMMANN, HEINZ

2. 麥可 康特

KOMPTER, MICHAEL

住居所或營業所地址：(中文/英文)

德國殷格翰市D-55216賓格街173號

BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN GERMANY

國 籍：(中文/英文)

德國 GERMANY

三、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 希特妥 高夫曼
KAUFMANN, HITTO
2. 艾瑞克 貝可
BECKER, ERIC
3. 羅爾 弗洛林
FLORIN, LORE
4. 馬丁 福森那格
FUSSENEGGER, MARTIN
5. 瑞-王 潘
PENG, REN-WANG
6. 喬伊 M 史達特
STUDTS, JOEY M.

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY
3. 德國 GERMANY
4. 瑞士 SWITZERLAND
5. 德國 GERMANY
6. 美國 U.S.A.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年12月20日；07150254.6

2. 歐洲專利機構；2008年03月17日；08152829.1

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於細胞培養技術之領域。其係關於一種製造蛋白質之方法以及一種產生新表現載體及宿主細胞以供生物醫藥製造之方法。本發明另外係關於醫藥組合物及治療方法。

【先前技術】

用於人類療法之生物醫藥品的市場繼續高速增長，有270種新穎生物醫藥品在臨床研究中正得到評估且估計在2003年出售了300億。生物醫藥品可自各種宿主細胞系統製造，該等宿主細胞系統包括細菌細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、植物細胞及哺乳動物細胞，包括衍生自人類之細胞株。目前，由於真核生物細胞之正確加工及修飾人類蛋白質之能力，因此自真核生物細胞製造愈來愈多數目之生物醫藥品。因此，自此等細胞成功且高產率地製造生物醫藥品係關鍵的且高度視用於方法中之重組單株細胞株之特徵而定。因此，急需產生具有改良特性之新穎宿主細胞系統且建立以高的比生產率培養生產細胞株之的方法作為高產率方法之基礎。

任何生物醫藥品製造方法之產率均很大程度上視當在方法條件下生長時生產細胞(producing cell)每次分泌之蛋白質產物之量而定。許多複雜之生物化學細胞內過程對於自真核生物細胞合成及分泌治療用蛋白質為必要的。所有此等步驟，諸如轉錄、RNA運輸、轉譯、轉譯後修飾及蛋白

質運輸在野生型宿主細胞株中均經嚴格調控且將影響衍生自此宿主之任何生產細胞株的比生產率。

在以往，大多數工程化方法係集中於推動諸如轉錄及轉譯之過程的分子網路以提高蛋白質製造中此等步驟之產率。然而，就任何多步驟製造過程而言，在過程鏈之早期步驟期間拓寬瓶頸均可能在遠處下游(尤其分泌途徑中之轉譯後)產生瓶頸。上至某一臨限，已報導生產細胞之比生產率係與產物基因轉錄量線性相關。

然而，進一步增強產物在mRNA水準之表現可引起蛋白質合成、摺疊或運輸機構之超負荷，導致蛋白質產物在細胞內累積。實務上，此現象可在目前製造過程中頻繁地觀察到。因此，製造細胞株之分泌運輸機構為用於新穎宿主細胞工程化策略之引人關注之目標。

對工程化所分泌之治療用蛋白質之細胞內運輸的首次研究係圍繞如結合蛋白BiP/GRP78及蛋白質二硫化異構酶(PDI)之分子伴隨蛋白的過度表現。伴隨蛋白為宿於內質網(ER)中且有助於新合成蛋白質之摺疊及組裝的細胞蛋白質。然而，與可預期之情況相反，已展示哺乳動物細胞中之BiP過度表現降低而非增大其所締合之蛋白質的分泌，而CHO細胞中之PDI過度表現產生與不同蛋白質產物抵觸之結果。描述在CHO細胞株中對於IFN- γ 製造之ER至順式高爾基體運輸問題之報告(Hooker等人，1999)支持此等驚人發現(增大細胞之蛋白質摺疊能力產生遠處下游製造瓶頸)之可能解釋。

總之，需要改良宿主細胞之分泌能力以便重組蛋白製。此與新穎轉錄增強技術及高力價方法組合可甚至變得更重要以防止轉譯後瓶頸及蛋白質產物之細胞內累積。然而，目前在通向分泌運輸機構之目標操作的道路上存在兩個主要障礙：關於基本調控機制之仍受限之瞭解及防止在分泌過程中瓶頸移至遠處下游之挑戰。

【發明內容】

本發明描述 Sec1/Munc18(SM)蛋白質家族之成員，尤其兩個成員，亦即 Munc-18c 及 Sly1，藉由聯合促進將所分泌蛋白質運輸至細胞表面及調節分泌小泡與細胞膜之融合中的若干後續步驟而在刺激總體胞吐作用中的新穎及驚人作用。本發明亦提供有效改良自真核生物細胞經由分泌途徑運輸之蛋白質之產量的方法。另外，其描述分泌途徑之目標操作用於治療疾病及發炎病況之用途。

蛋白質分泌為複雜之多步驟機制：蛋白質預定運輸至細胞外空間或將外部細胞膜首先以共轉譯方式運輸至內質網中。自此，將其封裝於脂質小泡中且運輸至高爾基體 (Golgi apparatus) 且最終自反式高爾基網路至細胞膜中，其中將其釋放至培養基中。

在各運輸步驟中，自小泡及目標膜之 SNARE[可溶性 NSF(N-乙基馬來醯亞胺敏感因子)附接受體]蛋白質均形成反式 SNARE 複合物，其構成發生融合所需之核心機構。為滿足在各種情況下之生理需求，SNARE 介導融合機構必須空間地且暫時地可調以自待適當整合之細胞內及細胞外來

源均獲得刺激。

Sec1/Munc18(SM)蛋白質似乎為調節SNARE蛋白質之關鍵。兩種SM蛋白質，Sly1及Munc18(包括a、b及c三種同功異型物)係與沿分泌途徑(ER-高爾基體-細胞膜)之小泡融合有關。Sly1為融合至內質網(ER)衍生COPII小泡之高爾基體所需且Munc18為融合至分泌小泡之細胞膜(PM)所需。

在本發明中，吾人分析Sly1及Munc18c對分泌途徑之生理影響且首次發現兩種SM蛋白質一致地刺激總體胞吐作用。Munc18c及Sly1之活化作用的分子機制可能亦保守。基於本文之發現，吾人開創了在哺乳動物細胞中產生增強之分泌的基於SM蛋白質之分泌工程設計。基於SM蛋白質之分泌工程設計表示代謝工程設計之新穎策略且為在工業中製造蛋白質醫藥品提供新穎平台。

在本發明中所述之方法在若干方面有利：

首先，吾人論證Munc-18c或Sly-1，或兩種蛋白質一起之異源表現為藉由提高宿主細胞之分泌能力來增強重組蛋白產量之策略。

關於工業應用，該研究藉由經由引入在分泌途徑中轉譯後發揮其作用之轉基因的基因工程設計來開拓避過此瓶頸之激勵人心的前景。此作為最新代高效表現載體之用途的特定相關性之出現可能引起生產細胞株內蛋白質摺疊、修飾及運輸機構之超負荷，因此降低其理論最大生產率。異源性引入SM家族之分泌增強蛋白質(諸如Munc18及/或

Sly1)可克服此限制。

第二，SM蛋白質係自酵母至人類保守進化：在酵母中，存在四種SM蛋白質(Sec1p、Sly1p、Vps33p及Vps45p)，在果蠅中有三種(ROP、Sly1及Vps33/康乃馨(carnation))，在蠕蟲中有六種(Unc-18以及5種根據基因組序列資料庫之其他基因)以及在脊椎動物中有七種蛋白質(Munc18-1、Munc18-2及Munc18-3、VPS45、VPS33-A及VPS33-B及Sly1)。鑒於跨物種之高保守程度，似乎極有可能將SM蛋白質用以調節在所有真核宿主細胞物種(自酵母歷經蠕蟲及昆蟲細胞至哺乳動物系統)中蛋白質之分泌及細胞表面表現。

第三，SM蛋白質家族之所有成員均展示在整個序列中之高序列相似性程度，表明其應顯示類似整體結構。另外，已為四個物種中九種SM基因描述了功能損失突變，其所有均引起小泡運輸及融合之嚴重損傷，表明SM蛋白質在小泡運輸及分泌過程中應起到類似及重要之作用。因此，吾人主張Munc18及/或Sly1對在本發明中所述之目的之適用性可同等地轉移至SM蛋白質家族之任何其他成員。

第四，藉由調節SNARE介導之小泡融合機構，SM蛋白質家族之成員係與自ER至高爾基體、自高爾基體至細胞膜之小泡運輸及最終胞吐融合(exocytotic fusion)之所有不同步驟均有關。因此，參與分泌運輸鏈之後續步驟的多種SM蛋白質之異源表現具有對跨膜蛋白之總體胞吐作用或細胞表面表現產生附加或甚至協同效應的潛力。另外，作

為藉由轉錄因子XBP-1異源性共表現之蛋白質運輸的起點之ER之同時工程設計進一步提高此分泌增強作用。

作為第五優勢，SM蛋白質亦影響分泌途徑之最後一個步驟，亦即小泡運輸至細胞膜，且藉此在不產生遠處下游瓶頸之風險的情況下促進蛋白質分泌。

總之，SM蛋白質在小泡介導蛋白質運輸(自ER至高爾基體及自高爾基體至細胞膜)之所有步驟中的參與使得Munc18c、Sly1及所有其他SM家族蛋白質均為用於目的在於增強真核生物細胞分泌能力之(多)基因工程化方法的極誘人及有希望之目標。

在本發明中所述之小泡介導蛋白質運輸之目標工程設計可具有廣泛應用。詳言之，兩種基本方法可為突出的：

- (i)過度表現SM蛋白質及/或增強SM蛋白質之活性以提高細胞之分泌運輸能力，或
- (ii)降低SM蛋白質活性及/或表現以作為降低癌細胞增殖及/或侵入之基因療法的手段。

SM蛋白質過度表現之適用性：

所述之本發明描述一種藉由SM家族蛋白質之過度表現改良細胞之總體蛋白質分泌能力來產生用於製造異源蛋白質之改良真核宿主細胞之方法。

此使得在基於真核生物細胞之製造過程中提高蛋白質產率。其藉此降低此等過程之物品的成本且同時降低需經製造以產生物質之批料之數目，該物質為治療用蛋白質之調查研究、診斷學、臨床研究或市場供應所需。本發明另外

加速藥物開發，因為產生足量的用於臨床前研究之物質常為關於時間表之關鍵工作包。

本發明可用以提高用於產生一或若干種用於診斷目的、研究目的(目標識別、先導識別(lead identification)、先導最佳化(lead optimization))或在市場或在臨床開發中製造治療用蛋白質的特異性蛋白質之所有真核生物細胞的蛋白質製造能力。

如在本申請案中所示，SM蛋白質之異源表現引起所有類別蛋白質(包括經分泌之酵素、生長因子及抗體)之產量增加。因為跨膜蛋白共用同一小泡介導運輸途徑(其係由SM蛋白質與SNARE之相互作用來調節)，所以此工程化方法同等地適用於改良跨膜蛋白之運輸及增強其在細胞表面上之豐度。

因此，本文所述之方法亦可用於學術及工業研究目的，其旨在表徵細胞表面受體之功能。舉例而言，其可用於表面蛋白之製造及後續純化、結晶及/或分析。另外，藉由所述方法產生之跨膜蛋白或表現此等蛋白質之細胞可用於篩選檢定，例如物質之篩選、孤兒受體之配位體的識別或在先導最佳化期間對改良效用之搜尋。因為細胞表面受體為藥物目標之主要類別，所以此對於新穎人類藥物療法之開發至關重要。

另外，本文所述之方法對於研究與細胞表面受體締合之細胞內信號複合物或分析細胞-細胞通訊(部分係由可溶性生長因子與在同一或另一細胞上之其相應受體的相互作用

所介導)而言可為有利的。

降低/抑制SM蛋白質表現及/或活性之適用性：

在本發明中，吾人提供SM表現降低引起可溶性細胞外蛋白質分泌降低之證據，如為Munc18c及Sly1所示。此使得SM蛋白質為治療性操作之誘人目標。

自正常健康細胞轉化為癌細胞的特點之一為自外源生長因子之存在獲得獨立。與正常細胞相反，腫瘤細胞能夠產生所有為其存活及自身增殖所必需之生長因子。除此自分泌機制之外，癌細胞常展示在其表面上生長因子受體之上調表現，其導致對自周圍組織中之細胞所分泌之旁分泌作用生長及存活因子的反應性增強。例如藉由使用shRNA-方法、siRNA-方法或反義RNA-方法，藉由靶向SM-蛋白質，如腫瘤細胞中之Sly-1及Munc18，可能以兩種方式破壞自分泌以及旁分泌生長-刺激及/或存活機制：(i)藉由降低生長因子運輸及分泌及(ii)藉由減少腫瘤細胞上相應生長因子-受體之量。藉此，生長刺激信號之量及癌細胞感知及響應此等信號之能力均將降低。抑制在癌細胞中之SM蛋白質表現或活性因此應代表防止癌細胞增殖及存活之強大手段。

SM蛋白質另外似乎為抑制腫瘤侵入及轉移之有效治療目標。在大多數類型之人類癌症的晚期，原發腫瘤產生先驅細胞(pioneer cell)，該等先驅細胞移出、侵入相鄰組織且行進至遠端位點，其中其可成功建立新群落(稱為轉移)。

作為組織侵入之先決條件，癌細胞表現整套蛋白酶，該等蛋白酶使其能夠經由周圍健康組織而遷移，穿過基膜，進入血流且最終侵入目標組織。將此等蛋白酶中的一些表示為膜結合蛋白質，例如MT-MMP及ADAM。由於其在基質重塑、生長因子排出(shedding)及腫瘤侵入中之關鍵作用，因此將蛋白酶本身討論作為癌症療法之藥物目標。吾人主張抑制腫瘤細胞中SM蛋白質表現及/或活性減少在目標細胞表面上之膜結合蛋白酶之量。此應降低或甚至損傷腫瘤細胞之侵入能力以及其對生長因子排出之能力，從而使得腫瘤侵入性及轉移潛力降低。因此，靶向SM家族之蛋白質提供防止晚期腫瘤發生，尤其自良性/實體節結轉化為侵襲性轉移腫瘤之新穎方式。

因此，對於治療應用而言，目標在於降低及/或抑制SM蛋白質之活性及/或表現。此可藉由核苷酸組合物來達成，將該核苷酸組合物用作藉由抑制SM蛋白質功能來治療疾病之人類治療劑，藉以該藥物包含經由結合其RNA之序列移動子(sequence motive)來特異性抑制SM蛋白質的shRNA、RNAi、siRNA或反義RNA。降低/抑制SM蛋白質活性/表現亦可藉由含有結合及沈默各別SM蛋白質基因之啟動子的核苷酸之藥物物質來達成。

另外，藥物物質或產物可包含抑制SM蛋白質之表現或活性的新穎化學實體或肽或蛋白質。在蛋白質為活性醫藥化合物之情況下，其可為(i)與SM蛋白質之啟動子結合藉此抑制其表現之蛋白質，(ii)與SM蛋白質或其相互作用搭

配物(例如，SNARE複合物內之突觸蛋白或蛋白質)結合藉此阻礙SM蛋白質與其結合搭配物之功能相互作用的蛋白質，(iii)類似於SM蛋白質但並不履行其功能之蛋白質，意謂"顯性負"SM蛋白質變異體，或(iv)充當SM蛋白質及其結合搭配物兩者之骨架從而使得蛋白質不可逆結合且形成穩定及非功能性蛋白複合物的蛋白質。

根據本發明，提供使用本發明之化合物的新穎方法。因此，本發明之化合物可用以治療癌症或其他異常增殖性疾病。癌症係以兩種方式分類：癌症起源之組織的類型(組織類型)及原發部位，或在體內癌症首先發生之位置。癌症發生之最常見部位包括皮膚、肺、女性乳房、前列腺、結腸及直腸、淋巴系統、子宮頸及子宮。

化合物因此適用於治療多種癌症，包括(但不限於)以下：

AIDS相關之癌症，諸如卡波氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)；骨相關癌症，諸如尤因(Ewing)家族腫瘤及骨肉瘤；腦相關癌症諸如成人腦瘤、兒童腦幹神經膠質瘤、兒童小腦星形細胞瘤、兒童大腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、兒童室管膜瘤、兒童神經管胚細胞瘤、兒童小腦幕上原始神經外胚層瘤、兒童視覺途徑及下丘腦神經膠質瘤及其他兒童腦瘤；乳癌；消化/胃腸相關癌症，諸如肛門癌、肝外膽管癌、胃腸類癌、結腸癌、食道癌、膽囊癌、成人原發性肝癌、兒童肝癌、胰腺癌、直腸癌、小腸癌及胃癌；內分泌相關癌症，諸如腎上腺皮質癌、胃腸類癌、胰島細胞癌

(內分泌腺)、副甲狀腺癌、嗜鉻細胞瘤、垂體瘤及甲狀腺癌；眼相關癌症，諸如眼內黑色素瘤及視網膜胚細胞瘤；泌尿生殖器相關癌症，諸如膀胱癌、腎臟(腎細胞)癌、陰莖癌、前列腺癌、移行細胞(transitional cell)腎盂及輸尿管癌、睪丸癌、尿道癌、韋爾姆斯氏瘤(Wilms' tumor)及其他兒童腎臟腫瘤；生殖細胞相關癌症，諸如兒童顱外生殖細胞腫瘤、性腺外生殖細胞腫瘤、卵巢生殖細胞腫瘤及睪丸癌；婦科相關癌症，諸如子宮頸癌、子宮內膜癌、妊娠期滋養細胞腫瘤(gestational trophoblastic tumor)、卵巢上皮癌、卵巢生殖細胞腫瘤、卵巢低惡性潛力腫瘤、子宮肉瘤、陰道癌及外陰癌；頭及頸部相關癌症，諸如下嚥癌(hypopharyngeal cancer)、喉癌、唇及口腔癌、原發灶隱匿之轉移性鱗狀頸癌、鼻咽癌、口咽癌、鼻竇及鼻腔癌、副甲狀腺癌及唾液腺癌；血液學/血液相關癌症，諸如白血病，諸如成人急性淋巴母細胞白血病、兒童急性淋巴母細胞白血病、成人急性骨髓白血病、兒童急性骨髓白血病、慢性淋巴細胞白血病、慢性骨髓白血病及毛細胞白血病；及淋巴瘤，諸如AIDS相關之淋巴瘤、皮膚T-細胞淋巴瘤、成人霍奇金氏淋巴瘤(adult Hodgkin's lymphoma)、兒童霍奇金氏淋巴瘤、懷孕期間霍奇金氏淋巴瘤、蕁樣真菌病、成人非霍奇金氏淋巴瘤、兒童非霍奇金氏淋巴瘤、懷孕期間非霍奇金氏淋巴瘤、原發性中樞神經系統淋巴瘤、賽謝症候群(Sezary syndrome)、皮膚T-細胞淋巴瘤及華氏巨球蛋白血症(Waldenström's

macroglobulinemia)及其他血液學/血液相關癌，諸如慢性脊髓增生病症、多發性骨髓瘤/漿細胞瘤、骨髓發育不良症候群及骨髓發育不良/骨髓增生病；肺相關癌症，諸如非小細胞肺癌及小細胞肺癌；肌肉骨骼相關癌症，諸如尤因氏家族腫瘤、骨肉瘤、骨惡性纖維組織細胞瘤、兒童橫紋肌肉瘤、成人軟組織肉瘤、兒童軟組織肉瘤及子宮肉瘤；神經相關癌症，諸如成人腦瘤、兒童腦瘤、腦幹神經膠質瘤、小腦星形細胞瘤、大腦星形細胞瘤/惡性神經膠質瘤、室管膜瘤、神經管胚細胞瘤、小腦幕上原始神經外胚層瘤、視覺途徑及下丘腦神經膠質瘤及其他腦瘤，諸如神經母細胞瘤、垂體瘤及原發性中樞神經系統淋巴瘤；呼吸道/胸相關癌症，諸如非小細胞肺癌、小細胞肺癌、惡性間皮瘤、胸腺瘤及胸腺癌；皮膚相關癌症，諸如皮膚T-細胞淋巴瘤、卡波氏肉瘤、黑色素瘤、梅克爾細胞癌(Merkel cell carcinoma)及皮膚癌。

此等病症已在人類中充分表徵，但於其他哺乳動物中亦以類似之病源學存在，且可藉由本發明之醫藥組合物來治療。

對於治療用途而言，可以治療有效量、以任何習知劑型、以任何習知方式來投與化合物。投與途徑包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、皮下、滑液內、藉由輸注、舌下、經皮、經口、局部或藉由吸入、錠劑、膠囊、囊片、液體、溶液、懸浮液、乳液、口含劑、糖漿、可復水散劑、顆粒、栓劑及經皮貼片劑。製備此等劑型之方法為已

知的（例如，參見，H.C. Ansel 及 N.G. Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems，第5版，Lea及Febiger (1990)）。治療有效量可由熟習此項技術者基於諸如體重、代謝及疾患嚴重性等因素來確定。活性化合物較佳以每公斤體重每日約1 mg至約500 mg來給藥。活性化合物更佳以每公斤體重每日約1 mg至約100 mg來給藥。

化合物可單獨或與佐劑組合投與，該等佐劑增強抑制劑之穩定性，促進在某些實施例中含有其之醫藥組合物的投與，提供增強之溶解或分散，提高抑制活性，提供輔助療法，及其類似情況。有利地，此等組合可利用較低劑量之活性成份，由此降低可能之毒性及不利副作用。

與根據本發明之化合物一起使用的醫藥學上可接受之載劑及佐劑包括(例如)離子交換劑、氧化鋁、硬脂酸鋁、卵磷脂、血清蛋白、緩衝物質、水、鹽或電解質及基於纖維素之物質。此並非可能之醫藥學上可接受之載劑及佐劑的完整清單，且一般技術者知道其他可能性，其在此項技術中為充分的。

總之，本發明描述藉由異源表現Munc18c、Sly1或SM蛋白質家族之其他成員及其組合來增強在真核生物細胞中蛋白質之分泌運輸的新穎方法。此方法尤其適用於以增強之製造能力產生最優化宿主細胞系統以便表現及製造重組蛋白產物。

Sec1/Munc18(SM)蛋白質為在細胞內蛋白質運輸中膜融

合所需的，但已長期提出其作用之性質為不同而非統一的，其部分係因為在SM蛋白質與SNARE之間相互作用之非均質性。在本發明中，吾人評估兩種SM蛋白質對分泌途徑之生理影響。基本發現在於在小泡融合至細胞膜及高爾基體中涉及之Munc18c及Sly1一致地刺激總體胞吐作用。

與此模型一致，吾人展示當敲除Sly1及Munc18c時，總體胞吐作用降低(圖3)。相反地，藉由過度表現造成的增加水準之Sly1提高分泌能力(圖4)。重要及令人驚訝地，Munc18c亦顯著刺激宿主細胞之分泌能力。為支持此，吾人論證Munc18c係與為融合至PM(細胞膜)而特異性化之SNARE複合物直接結合(圖5)。

先前研究指定Munc18c在胞吐作用中之抑制作用(Riento等人，2000; Kanda等人，2005; Tellam等人，1997; Thurmond等人，1998)，其與本發明之結果相抵觸。為提供Munc18c在運輸機構中之作用，詳言之其與由突觸蛋白4、SNAP-23及VAMP2組成之胞吐SNARE蛋白質之相互作用的分子理解，吾人報導免疫沈澱實驗。如圖5中所示，Munc18c-特異性抗體定量地使Munc18c連同顯著量之突觸蛋白4、SNAP-23及VAMP 2一起沈澱，表明Munc18c與此等SNARE之活體內締合，其促進在分泌途徑中的小泡-細胞器融合(Peng及Gallwitz, 2002; Shen等人，2007; Scott等人，2004)。此發現強調類似於與完全組裝之SNARE複合物結合且促進融合高爾基體之Sly1，Munc18c亦與SNARE

複合物直接相互作用，提示藉由促進SNARE介導之運輸機構之保守作用機制。

因此，Sly1及Munc18c功能之生理學作用及機制在SNARE介導分泌途徑中均為保守的。

當Sly1、Munc18c及通用細胞器擴增因子Xbp-1過度表現時，基於SM蛋白質之分泌工程增強多種蛋白質之胞吐作用，該等蛋白質包括酵素、生長激素及免疫治療單株抗體。

本申請案之資料論證一旦在相同細胞內兩種SM蛋白質同時過度表現即對蛋白質分泌有附加或甚至協同之效應，如為Munc18c及Sly1所示。吾等資料因此支持SM蛋白質在刺激SNARE介導運輸機構中之統一功能的模型且表示用於增強分泌之轉譯後工程設計的新穎策略。

總之，在本申請案中，吾人提供SM蛋白質在胞吐/分泌途徑中之統一活化作用的第一個驚人證據。基於此發現，吾人開創了基於SM蛋白質之轉譯後工程設計，藉由其成功達成增強之胞吐作用。

有效製造蛋白質治療劑對生物技術工業仍為大挑戰。迄今為止，已開發多種不同代謝工程設計策略。舉例而言，藉由增大轉錄(轉錄工程設計)；藉由調節哺乳動物細胞之轉譯效能(轉譯工程設計)；藉由提高特異性糖型(glycoform)之產量(糖基化工程設計)；藉由僅將代謝能重定向至產物形成(受控增殖技術)及藉由改良生產細胞株之生存力(抗細胞凋亡工程設計)。然而，基於和諧配合之

(orchestrated)分泌機構的代謝工程仍為難懂的。基於 Sly1 及 Munc18c 一致地刺激總體胞吐作用之發現，在本文中吾人首次報導引起哺乳動物細胞之分泌能力增強的基於 SM 蛋白質之轉譯後工程設計。該系統係與所用啟動子之表現組態、類型及啟動子介導轉錄量無關，使得其尤其適於工業製造重組蛋白及醫藥。

本發明另外提供藉由干擾 SM 蛋白質表現來抑制或降低蛋白質胞吐作用之手段。此將為治療癌症或發炎病況提供適用手段。

先前已描述，在真核生物細胞中，膜結合運輸小泡使蛋白質及脂質在亞細胞區室/細胞器之間穿梭。在各運輸步驟，自小泡及目標膜之 SNARE[可溶性 NSF(N-乙基馬來醯亞胺敏感因子)附接受體]蛋白質均形成反式 SNARE 複合物，其構成發生融合所需之核心機構。為滿足在各種情況下之生理需求，SNARE 介導融合機構必須在空間上暫時地可調以自待適當整合之細胞內及細胞外來源均獲得刺激。因此，關鍵在於活體內調節或微調 SNARE 功能以使膜融合之特異性及速度均不受損。Sec1/Munc18(SM)蛋白質可為調節 SNARE 蛋白質之關鍵。首先在酵母及線蟲中識別之 SM 蛋白質為融合所必需。除 SNARE 外幾乎不存在相互作用搭配物之事實已得出 SM 蛋白質係與 SNARE 蛋白質功能偶合之普遍觀點 (Gallwitz 及 Jahn, 2003; Jahn 等人, 2003; Toonen 及 Verhage, 2003)。然而，推廣 SM 蛋白質之功能模型的嘗試已顯著地受阻於其與 SNARE 相互作用之異質性

質。在獨特運輸步驟且在不同生物體中，單體突觸蛋白 (Dulubova等人，1999; Yang等人，2000; Peng及Gallwitz, 2002)、小泡相關SNARE(Li等人，2005; Carpp等人，2006; Peng及Gallwitz; 2004; Shen等人，2007)、異二聚體 t-SNARE複合物 (Scott等人，2004; Zilly等人，2006)以及三元完全組裝之SNARE複合物 (Carpp等人，2006; Peng及Gallwitz; 2004; Shen等人，2007; Togneri等人，2006; Carr等人，1999; Dulubova等人，2007)已展示易於與個別SM蛋白質結合。因此，已為膜融合中之SM蛋白質功能以正面及負面觀點解釋了此等相互作用之生理學意義。

因此，分子機制，尤其SM蛋白質在分泌途徑中之生理作用仍為未知的。舉例而言，Sly1係與單體突觸蛋白5、單體小泡結合SNARE及完全組裝之SNARE複合物相互作用 (Li等人，2005; Peng及Gallwitz; 2004)，且已展示正面影響形成SNARE複合物及融合特異性 (Peng及Gallwitz, 2002; Kosodo等人，2002)。

另一方面，先前研究指定Munc18蛋白質在膜融合及胞吐作用中之抑制作用：突觸小泡之經調節胞吐作用尤其需要之神經元特異性Munc18a呈現兩種與SNARE相互作用之功能對立：藉由與突觸蛋白1之封閉構形結合，由此抑制SNARE複合物組裝 (Dulubova等人，1999; Yang等人，2000)，且與完全組裝之SNARE複合物結合，因此促進膜融合 (Shen等人，2007; Dulubova等人，2007)。一致地，報導了Munc18a對胞吐作用之抑制及促進作用 (Wu等人，

1998; Verhage等人，2000; Voets等人，2001)。Munc18b及Munc18c在序列上與Munc18a同源但無所不在地表現。活體外資料表明Munc18c在SNARE結合方面類似於Munc18a (Latham等人，2006; D'Andrea-Merrins等人，2007)，且兩種蛋白質之結構為保守的 (Misura等人，2000; Hu等人，2007)。然而，遺傳學及生理學研究迄今為止已提供Munc18b及Munc18c在胞吐作用中之抑制作用的專有證據 (Riento等人，2000; Kanda等人，2005; Tellam等人，1997; Thurmond等人，1998)。舉例而言，1) 蠅類中Munc18a之過度表現抑制神經元傳輸 (Wu等人，1998)，2) 在Caco-2細胞中Munc18b之過度表現抑制流感病毒血球凝集素之頂端傳遞 (apical delivery) (Riento等人，2000)，3) Munc18c對突觸蛋白4與對VAMP2競爭結合 (Thurmond等人，1998)；4) 在脂肪細胞中經胰島素刺激GLUT小泡之易位係受Munc18c過度表現抑制但在無Munc18c小鼠中增強 (Tellam等人，1997; Thurmond等人，1998)。

與此等報導相反且與主導預想不同，在本申請案中，吾人藉由證明兩種蛋白質通常同等刺激胞吐作用來論證兩種SM蛋白質sly1及Munc18c之新穎及驚人之作用。藉由Munc18c及Sly1之活化作用的分子機制可能亦為保守的。基於此等驚人發現，吾人開創了在哺乳動物細胞中產生增強之分泌的基於SM蛋白質之分泌工程設計。基於SM蛋白質之分泌工程設計表示代謝工程之新穎策略且為在工業中製造蛋白質醫藥提供新穎平台。

詳言之，Sly1及Munc18c表現對哺乳動物細胞分泌能力之正面作用指出一種將增大分泌之哺乳動物生產細胞株工程化之新穎轉譯後方法。

在實例5中說明sly1與munc18c同時過度表現引起SEAP產量增大8倍，相比之下，藉由單獨之sly1或munc18c增大5倍。SAMY及VEGF₁₂₁之分泌亦增大(圖4b、4c)。sly1、munc18c及xbp-1全部之過度表現將SEAP、SAMY及VEGF之分泌分別增大10倍、12倍及8倍(圖4a、4b、4c)，明顯地說明在Sly1與Munc18c之間及在兩種SM蛋白質與通用細胞器擴增因子Xbp-1之間對分泌存在協同效應。

在實例6中進一步說明，藉由產生為sly1(CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃)或munc18c(CHO-Munc18c₈及CHO-Munc18c₉)之構成性表現而工程化的穩定CHO-K1衍生細胞株，CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃刺激SEAP分泌增加4倍及8倍(圖6a)及SAMY產量提高4倍及5倍(圖6b)。有趣地，產生較多SEAP之CHO-Sly1₂₃亦展示較高Sly1水準，表明SM與產物蛋白質之正相關性(圖6c)。類似地，為構成性munc18c表現轉殖基因之細胞(CHO-Munc18c₉)產生多9倍及6.5倍之SEAP及SAMY(圖6e及6f)且產生更多SEAP之CHO-Munc18c₉亦展示較高Munc18c水準(圖6d)。與親本CHO-K1相比，穩定細胞株CHO-Sly1-Munc18c₁(為構成性Sly1及Munc18c表現之兩重轉殖基因)及CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇(為構成性Sly1、Munc18c及Xbp-1表現之三重轉殖基因)展示高13倍及16倍之SEAP產量(圖6g)。

特定言之，基於SM蛋白質之分泌工程設計提高生產細胞株之抗體的比生產率。實例7藉由在原型生物醫藥製造方案中使用基於SM蛋白質之分泌工程設計以在CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃中(增大至多10倍)、在CHO-Sly1-Munc18c₁中(增大至多15倍)及在CHO-Sly1-Xbp-1₄中(增大至多13倍)及在CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇中(增大至多19倍)表現稱為利妥昔單抗(Rituximab)之單株抗人類CD20 IgG1來說明此(圖7a)。當在CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇中產生利妥昔單抗時，可達到至多40 pg/細胞/天之特別製造水準，與同基因對照細胞株相比，其對應於增大接近20倍(圖7a)。SDS-PAGE分析表明藉由CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇及野生型CHO-K1細胞產生之抗體為結構完整的且彼此不可區分(圖7b、7c)。自在CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇中產生之利妥昔單抗的N-鍵聯Fc寡糖之基於Maldi-TOF之糖基化概況分析(Glycoprofiling)揭示與原生生產細胞株相比無差異，表明基於SM/Xbp-1之分泌工程設計並不損害產物品質(圖7d及7e)。

【實施方式】

一般實施例"包含"涵蓋更特定之實施例"由...組成"。另外，單數及複數形式並非以限制方式使用。

在本發明期間所用之術語具有以下含義。

術語"基因"意謂去氧核酸(DNA)序列(例如，cDNA、基因組DNA或mRNA)。在本發明中，基因較佳係指人類DNA序列，但包括自其他哺乳動物物種(較佳為小鼠、倉鼠及

大鼠)之同等同源序列，以及自額外真核物種(包括雞、鴨、苔蘚、蠕蟲、蠅及酵母)之同源序列。

集合術語 "Sec1/Munc-18 蛋白質" 或 "SM 蛋白質" 或 "Sec1/Munc18 蛋白質群" 或 "SM-蛋白質" 或 "編碼 SM-蛋白質之基因" 或 "SM 家族" 包含 60-70 kDa 之親水性蛋白質之家族，其具有高的結構相似性程度且自酵母至人類保守進化。

Munc18 及 Sly1 兩者均屬於 Sec1/Munc18 蛋白質家族。此家族迄今進一步包括：

在酵母中：Sec1p、Sly1p、Vps33p 及 Vps45p

在果蠅中：ROP、Sly1 及 Vps33/康乃馨

在線蟲中：Unc-18 以及 5 種其他根據基因組序列資料庫之基因

在脊椎動物中：Munc18-1、Munc18-2 及 Munc18-3、VPS45、VPS33-A 及 VPS33-B 及 Sly1。

術語 SM-蛋白質亦涵蓋此等蛋白質之衍生物、突變體及片段，例如帶 flag-標籤、帶 HIS-標籤或帶另外標籤之 SM-蛋白質。頻繁地將此等衍生物例如用於蛋白質之簡易純化或分離或觀測。

SM 蛋白質展示在整個序列上之高同源性，表明其可能具有類似整體結構。另外，已為四個物種中九種 SM 基因描述了功能喪失突變，其均引起小泡運輸及融合之嚴重損傷，表明 SM 蛋白質在小泡運輸及分泌之過程中起到類似及重要之作用。

本發明之實例使用 Munc18及 Sly1作為模型蛋白質，然而，本發明可同樣轉移至SM蛋白質家族之其他成員。

另外，鑒於跨物種之高保守程度，SM蛋白質可用以調節在所有真核宿主細胞物種(自酵母歷經蠕蟲及昆蟲細胞至哺乳動物系統)中蛋白質之分泌及細胞表面表現。

在真核生物細胞中，膜結合運輸小泡使蛋白質及脂質在亞細胞區室/細胞器之間穿梭。細胞運輸小泡與細胞膜或與目標區室(諸如溶酶體、高爾基複合體或細胞膜)之融合係由SNARE[可溶性NSF(N-乙基馬來醯亞胺敏感因子)附接受體]蛋白質介導。為滿足細胞之生理需求且保持區室特异性膜組成，藉由Sec1/Munc18(SM)家族之小蛋白質來在空間上暫時地控制SNARE介導之融合機構。藉由與SNARE及突觸蛋白直接結合，SM蛋白質調節在細胞內區室/細胞器與細胞膜之間小泡介導運輸之所有步驟。

術語"Munc-18"或"Munc-18蛋白質"或"Munc-18蛋白質家族"包括存在於真核生物體中之所有Munc-18基因及基因產物/蛋白質。此清楚地包括三種Munc-18旁系同源物(paralog)，亦即Munc-18a(其亦稱為"Munc-18-1")、Munc-18b及Munc-18c，其已在脊椎動物中進化。更特定言之，術語"Munc-18c"係指人類基因及亦稱為"突觸蛋白結合蛋白3"(STXBP3)或"血小板Sec1蛋白質"(PSP)(SEQ-ID NO 39)之蛋白質Munc18c，包括在其他哺乳動物物種(包括小鼠、倉鼠、大鼠、狗及兔)中之其同源物。

術語"Sly-1"或"Sly-1蛋白質"係指所有自脊椎動物(較佳

為哺乳動物)中此等基因表現之Sly1基因及蛋白質。更特定言之，"Sly-1"係指人類Sly1蛋白質，亦稱為"含有Sec1家族結構域之蛋白質1"(SCFD1)或"突觸蛋白結合蛋白-1狀蛋白質2"(STXBP1L2)，SEQ-ID NO. 41。

術語"XBP-1"同樣係指XBP-1 DNA序列及所有自此基因表現之蛋白質，包括XBP-1拼接變異體。較佳地，XBP-1係指人類XBP-1序列且較佳係指XBP-1之拼接及活性形式，亦稱為"XBP-1"。已知轉錄因子XBP-1為分泌細胞分化以及維持ER穩態及擴增之關鍵調節子之一(Lee, 2005; Iwakoshi, 2003)。此等功能使得XBP-1為用於分泌工程方法之候選物。

更特定言之，"XBP-1"係指人類XBP-1蛋白質，SEQ-ID NO. 43。

術語"生產率"或"比生產率"描述藉由限定數目之細胞在限定時間內產生之特異性蛋白質之量。比生產率因此為細胞表現/合成/產生所關注之蛋白質的能力之定量量度。在工業製造中，通常將比生產率表示為每細胞及每天所產生之以皮克('pg/細胞*天'或'pcd')計的蛋白質之量。

測定所分泌蛋白質之"比生產率"的一種方法為藉由酶聯免疫吸附檢定(ELISA)來定量量測分泌至培養基中的所關注之蛋白質之量。出於此目的，將細胞以限定密度接種至新鮮培養基中。在限定時間之後，例如在24小時、48小時或72小時之後，對細胞培養液取樣且使其經受ELISA量測以測定所關注之蛋白質的力價。可藉由將力價除以平均細

胞數目及時間來測定比生產率。

藉由均勻時間解析螢光(HTRF[®])檢定來提供如何量測細胞"比生產率"之另一實例。

對於細胞內、膜相關或跨膜蛋白而言之細胞的"生產率"亦可藉由西方墨點法來偵測且定量。將細胞首先洗滌且隨後溶解於含有諸如Triton-X、NP-40或SDS之清潔劑或高鹽濃度之緩衝液中。接著將細胞溶胞物中之蛋白質藉由在SDS-PAGE上以尺寸分離，轉移至耐綸膜，其中所關注之蛋白質隨後藉由使用特異性抗體來偵測及觀測。

測定細胞之"比生產率"之另一方法為藉由針對所關注之蛋白質而提出之螢光標記抗體來免疫偵測所關注之蛋白質且在流式細胞儀中定量螢光信號。在細胞內蛋白質之情況下，首先將細胞固定於中例如三聚甲醛(paraformaldehyde)緩衝液中，且接著滲透以允許偵測抗體穿透至細胞中。可在無需事先固定或滲透的情況下對活細胞定量細胞表面蛋白。

細胞之"生產率"可另外藉由量測諸如綠螢光蛋白(GFP)之報導蛋白的表現來間接測定，該綠螢光蛋白係表現為具有所關注蛋白質之融合蛋白或來自與所關注蛋白質相同之mRNA作為二表現單元、三表現單元或多表現單元之部分。

術語"提高/增加生產率"包含增加/提高細胞之比生產率的方法。若生產率在所研究之細胞中較之各別對照細胞更高且若此差異為統計上顯著的，則比生產率增加或提高。

所研究之細胞可為經處理、轉染或基因修飾之細胞的非均質群體或純系細胞株；未經處理、未經轉染或未經修飾之細胞可充當對照細胞。在所分泌之所關注蛋白質的情形中，術語"提高/增加/改良之生產率"及"增強/提高/改良之胞吐作用"及"提高/增加/改良之分泌"具有相同含義且可互換使用。

術語"衍生物"通常包括適於實現本發明之預定用途的序列，其意謂該等序列介導細胞中分泌運輸之提高。

術語"衍生物"當用於本發明中時意謂在序列中與原始序列或其互補序列至少70%一致之多肽分子或核酸分子。多肽分子或核酸分子較佳在序列中與原始序列或其互補序列至少80%一致。多肽分子或核酸分子更佳在序列中與原始序列或其互補序列至少90%一致。最佳為在序列中與原始序列或其互補序列至少95%一致且顯示與原始序列相同或類似之對分泌之影響的多肽分子或核酸分子。

序列差異可基於自不同生物體之同源序列的差異。其亦可能基於藉由取代、插入或缺失一或多個核苷酸或胺基酸(較佳1、2、3、4、5、7、8、9或10個)之序列的目標修飾。可使用位點特異性突變及/或基於PCR之突變技術來製造缺失、插入或取代突變體。可藉由使用(例如)標準"對準"演算法，例如"BLAST"來測定參考序列之序列一致性。當其在其序列中配合在一起時，序列對準，且可借助於標準"對準"演算法來識別。

另外，在本發明中，術語"衍生物"意謂與其他核酸序列

雜交之核酸分子(單股或雙股)。雜交較佳在嚴格雜交及洗滌條件下進行(例如在65℃下在含有5x SSC之緩衝液中雜交；在42℃下使用0,2×SSC/0,1% SDS洗滌)。

術語"衍生物"另外意謂尤其在絲胺酸、蘇胺酸或酪胺酸位置處蛋白質缺失及/或插入突變體、磷酸化突變體，及帶有蛋白激酶C(PKC)或酪蛋白激酶II(CKII)之結合位點缺失的突變體。

術語"活性"描述且定量在細胞內或在活體外檢定中蛋白質之生物學功能。

量測SM蛋白質"活性"之一種檢定為例如用於模型蛋白、抗體或所關注之蛋白質的分泌檢定。將細胞以ss-HRP-Flag質體連同空載體或所研究之基因(諸如Munc-18c或Sly-1)一起共轉染。轉染後24 h以無血清培養基洗滌細胞且在0、1、3及6 h之後藉由一起培育澄清細胞上清液與ECL試劑對HRP分泌定量。以光度計(Lucy2, Anthos)在450 nm下進行量測。

偵測就SM蛋白質之功能結合而言之"活性"的另一方法將展示SM蛋白質與其已知相互作用搭配物之結合，例如Munc-18c與突觸蛋白-4之結合或Sly1與突觸蛋白-5之物理相互作用。SM蛋白質與其他蛋白質之結合可藉由免疫共沈澱來證明，例如使用與珠粒偶合之特異性抗體使SM蛋白質下沈(pull-down)，珠粒變性及之後藉由SDS-PAGE及西方墨點之免疫共沈澱蛋白質之分離及偵測。

SM蛋白質與另一蛋白質(例如，突觸蛋白)之直接結合可

進一步在酵母-二-雜交(yeast-two-hybrid)檢定中偵測。在此檢定中，兩種蛋白質在酵母細胞中以分別與轉錄因子之DNA結合域及轉錄活化域之融合蛋白的形式表現。兩種蛋白質之直接相互作用均引起轉錄因子重構，該轉錄因子之活性係以比色方式或藉由酵母細胞在選擇性條件下生長之能力來偵測。

藉由SM蛋白質與其結合搭配物之共免疫螢光法(co-immunofluorescence)及偵測其在細胞內之共定位來提供另一間接方法。

量測XBP-1之"活性"的一種方法為進行帶移實驗以偵測XBP-1轉錄因子與其DNA結合位點之結合。另一方法為偵測活性XBP-1拼接變異體自細胞溶質至核之易位。或者，XBP-1"活性"可藉由量測真正(bona fide)XBP-1目標基因(諸如結合蛋白(BiP))之一旦XBP-1異源表現後的誘導表現來間接證實。

在本發明之含義中"宿主細胞"為諸如倉鼠細胞之細胞，較佳為BHK21、BHK TK⁻、CHO、CHO Pro-5、CHO衍生之突變細胞株Lec1至Lec35、CHO-K1、CHO-DUKX、CHO-DUKX B1及CHO-DG44細胞或此等細胞株中任一者之衍生物/後代。尤其較佳為CHO-DG44、CHO-DUKX、CHO-K1及BHK21，且甚至更佳為CHO-DG44及CHO-DUKX細胞。在本發明之另一實施例中，宿主細胞亦意謂鼠類骨髓瘤細胞，較佳為NS0及Sp2/0細胞或此等細胞株中任一者之衍生物/後代。亦將可用於本發明含義中之鼠類

及倉鼠細胞之實例概括於表1中。然而，彼等細胞、其他哺乳動物細胞(包括(但不限於)人類、小鼠、大鼠、猴及齧齒動物細胞株，或真核生物細胞，包括(但不限於)酵母、昆蟲、植物及禽類細胞)之衍生物/後代亦可以本發明之含義使用，尤其對於製造生物醫藥蛋白質而言。

表1：真核生物生產細胞株

細胞株	順序編號
NS0	ECACC No. 85110503
Sp2/0-Ag14	ATCC CRL-1581
BHK21	ATCC CCL-10
BHK TK ⁻	ECACC No. 85011423
HaK	ATCC CCL-15
2254-62.2(BHK-21衍生物)	ATCC CRL-8544
CHO	ECACC No. 8505302
野生型CHO	ECACC 00102307
CHO-K1	ATCC CCL-61
CHO-DUKX (=CHO duk ⁻ , CHO/dhfr ⁻)	ATCC CRL-9096
CHO-DUKX B11	ATCC CRL-9010
CHO-DG44	(Urlaub等人，1983)
CHO Pro-5	ATCC CRL-1781
Lec13	(Stanley P.等人，1984)
V79	ATCC CCC-93
B14AF28-G3	ATCC CCL-14
HEK 293	ATCC CRL-1573
COS-7	ATCC CRL-1651
U266	ATCC TIB-196
HuNS1	ATCC CRL-8644
Per.C6	(Fallaux, F.J.等人，1998)
CHL	ECACC No. 87111906

宿主細胞當在無血清條件下建立、改適且完全培養，且

視情況在不含動物來源之任何蛋白質/肽之培養基中時為最佳。市售培養基，諸如Ham's F12(Sigma, Deisenhofen, Germany)、RPMI-1640(Sigma)、杜貝可改質之伊格爾培養基 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM; Sigma)、最低必需培養基(Minimal Essential Medium, MEM; Sigma)、伊斯科夫改質之杜貝可培養基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM; Sigma)、CD-CHO (Invitrogen, Carlsbad, CA)、CHO-S-Invitrogen、無血清CHO培養基(Sigma)及無蛋白質CHO培養基(Sigma)為例示性適當營養溶液。必要時任何培養基均可補充有多種化合物，其實例為激素及/或其他生長因子(諸如，胰島素、運鐵蛋白、表皮生長因子、胰島素樣生長因子)、鹽(諸如，氯化鈉、磷酸鈣、磷酸鎂)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷(諸如，腺苷、胸苷)、麩胺醯胺、葡萄糖或其他等效能源、抗生素、微量元素。亦可包括熟習此項技術者將已知之適當濃度的任何其他必要補充劑。在本發明中，使用無血清培養基較佳，但補充有合適量血清之培養基亦可用於培養宿主細胞。對於表現可選基因之經基因修飾之細胞的生長及選擇而言，將合適選擇劑添加至培養基中。

術語"蛋白質"可與胺基酸殘基序列或多肽互換使用且係指任何長度之胺基酸的聚合物。此等術語亦包括經由包括(但不限於)糖基化、乙醯化、磷酸化之反應或蛋白質處理而經轉譯後修飾之蛋白質。在分子保持其生物學功能活性之同時，可在多肽結構中產生修飾及改變(例如與其他蛋

白質融合)、胺基酸序列取代、缺失或插入。舉例而言，可在多肽或其基本核酸編碼序列中產生某些胺基酸序列取代且可獲得具有類似特性之蛋白質。

術語"多肽"意謂具有10個以上胺基酸之序列且術語"肽"意謂至多10個胺基酸長度之序列。

本發明適於產生用於製造生物醫藥多肽/蛋白質之宿主細胞。本發明尤其適於藉由展示增強之細胞生產率的細胞使大量不同之所關注基因高產率表現。

"所關注之基因"(GOI)、"所選序列"或"產物基因"在本文中具有相同含義且係指編碼所關注之產物或"所關注之蛋白質"(亦稱為"所需產物")的任何長度之聚核苷酸序列。所選序列可為全長或截短基因、融合或帶標籤基因，且可為cDNA、基因組DNA或DNA片段，較佳為cDNA。其可為原生序列，亦即天然存在之形式，或必要時可經突變或另外經修飾。此等修飾包括密碼子最佳化以最優化密碼子在所選宿主細胞、人類化或帶標籤中之用途。所選序列可編碼所分泌之細胞質、核、膜結合或細胞表面多肽。

"所關注之蛋白質"包括蛋白質、多肽、其片段、肽，其所有均可在所選宿主細胞中表現。所需蛋白質可為(例如)抗體、酵素、細胞激素、淋巴介質、黏著分子、受體及其衍生物或片段，及可充當促效劑或拮抗劑及/或具有治療或診斷用途之任何其他多肽。下文亦給出所需蛋白質/多肽之實例。

在諸如單株抗體之較複雜分子之情況下，GOI編碼兩個

抗體鏈中之一或兩者。

"所關注之產物"亦可為反義RNA、siRNA、RNAi或shRNA。

"所關注之蛋白質"或"所需蛋白質"為上述彼等者。特定言之，所需蛋白質/多肽或所關注之蛋白質例如為(但不限於)胰島素、胰島素樣生長因子、hGH、tPA、細胞激素(諸如介白素(IL)，例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18)、干擾素(IFN) α 、IFN β 、IFN γ 、IFN ω 或IFN τ 、腫瘤壞死因子(TNF)，諸如TNF α 及TNF β 、TNF γ 、TRAIL；G-CSF、GM-CSF、M-CSF、MCP-1及VEGF。亦包括製造紅血球生成素或任何其他激素生長因子。根據本發明之方法亦可有利地用於製造抗體或其片段。此等片段包括(例如)Fab片段(片段抗原-結合=Fab)。Fab片段係由藉由相鄰恆定區保持在一起之兩個鏈的可變區組成。此等者可藉由自習知抗體例如以木瓜酵素進行蛋白酶消化來形成，但在同時藉由基因工程亦可產生類似Fab片段。其他抗體片段包括F(ab')₂片段，其可藉由用胃蛋白酶之蛋白水解分裂來製備。

所關注之蛋白質較佳係自培養基中以分泌之多肽的形式回收，或若在無分泌信號情況下表現則其可自宿主細胞溶胞物中回收。有必要以獲得所關注之蛋白質的大體上均勻製劑之方式自其他重組蛋白及宿主細胞蛋白質純化所關注之蛋白質。作為第一步，自培養基或溶解物移除細胞及/

或微粒細胞碎片。此後例如藉由免疫親和或離子交換管柱分餾、乙醇沈澱、逆相HPLC、葡聚糖凝膠層析(Sephadex chromatography)、矽石層析或諸如DEAE之陽離子交換樹脂層析將所關注之產物自污染的可溶性蛋白質、多肽及核酸純化。一般而言，在此項技術中熟知教示熟習此項技術者如何純化由宿主細胞異源表現之蛋白質的方法。

使用基因工程方法，可能產生僅由重鏈之可變區(VH)及輕鏈之可變區(VL)組成的縮短抗體片段。將此等者稱為Fv片段(可變片段(Fragment variable)=可變部分之片段)。因為此等Fv片段缺乏兩個鏈藉由恆定鏈之半胱胺酸的共價鍵結，所以Fv片段經常為穩定的。有利的在於藉由短肽片段(例如，具有10至30個胺基酸，較佳15個胺基酸)鍵聯重鏈之可變區與輕鏈之可變區。以此方式，獲得由藉由肽連接子鍵聯之VH及VL組成的單一肽鏈。將此類抗體蛋白質稱為單鏈-Fv(scFv)。自先前技術已知此類scFv-抗體蛋白質之實例。

近年來，已開發各種策略用以製備呈多聚體衍生物之scFv。此尤其意欲產生具有改良之藥物動力學及生物分布特性以及具有提高之結合親和力的重組抗體。為達成scFv之多聚化，將scFv製備為具有多聚化結構域之融合蛋白。多聚化結構域可為(例如)IgG或捲曲螺旋結構(螺線結構)(諸如白胺酸-拉鏈域(*Leucin-zipper domain*))之CH3區域。然而，亦存在將scFv之VH/VL區域之間的相互作用用於多聚化(例如，雙功能抗體(diabodies)、三功能抗體

(tribodies)及五功能抗體(pentabodies))之策略。對於熟習此項技術者而言雙功能抗體意謂二價均二聚scFv衍生物。將scFv分子中之連接子縮短至5-10個胺基酸使得形成內部產生鏈間VH/VL疊加之均二聚體。雙功能抗體可另外藉由併入二硫橋(disulphide bridge)而穩定。自先前技術已知雙功能抗體-抗體蛋白質之實例。

對於熟習此項技術者而言微型抗體意謂二價均二聚scFv衍生物。其係由融合蛋白組成，該融合蛋白含有免疫球蛋白，較佳IgG，最佳呈二聚化區域形式(其經由鉸鏈區(例如，亦自IgG1)及連接區域來連接至scFv)之IgG1的CH3區域。自先前技術已知微型抗體-抗體蛋白質之實例。

對於熟習此項技術者而言三功能抗體意謂：三價均三聚scFv衍生物。VH-VL在無連接子序列之情況下直接融合之scFv衍生物使得形成三聚物。

對於熟習此項技術者而言，"骨架蛋白"意謂藉由基因選殖或藉由共轉譯過程與另一蛋白質或具有另一功能之蛋白質之部分偶合的蛋白質之任何功能域。

熟習此項技術者亦應熟悉具有二價、三價或四價結構且衍生自scFv之所謂微型抗體。藉由二聚、三聚或四聚捲曲螺旋結構進行多聚化。

據定義，即使所引入序列或基因與宿主細胞中之內源序列或基因一致，仍將任何引入宿主細胞中之序列或基因相對於宿主細胞稱作"異源序列"或"異源基因"或"轉殖基因"或"重組基因"。

甚至當所關注之序列為內源序列，但序列已(人工地/有意地/實驗地)被帶進細胞中且因此自不同於內源基因座之宿主基因組中之基因座表現時，將序列稱作"異源序列"。

甚至當所關注之序列(例如 cDNA)為(人工地/有意地/實驗地)再引入(=重組)之內源序列且此序列之表現係受調節序列之改變/修飾(例如，啟動子改變或藉由任何其他手段)之影響時，將序列稱作"異源序列"。

"異源"蛋白質因此為自異源序列表現之蛋白質。

可藉由使用"表現載體"，較佳真核生物，且甚至更佳哺乳動物表現載體將異源基因序列引入目標細胞中。用以構築載體之方法為熟習此項技術者所熟知且描述於各種公開案中。詳言之，在先前技術中已知用於構築合適載體之技術，包括描述功能組件，諸如啟動子、強化子、終止子(termination)及聚腺苷酸化信號、選擇標記、複製起點及拼接信號。載體可包括(但不限於)質體載體、噬菌粒(phagemid)、黏質體、人工/微型染色體(例如 ACE)或病毒載體，諸如桿狀病毒(baculovirus)、反轉錄病毒、腺病毒、腺聯病毒(adeno-associated virus)、疱疹單純型病毒、反轉錄病毒、噬菌體。真核生物表現載體通常亦將含有促進載體在細菌中繁殖(諸如複製起始)之原核序列及用於在細菌中選擇之抗生素抗性基因。在此項技術中熟知多種含有選殖位點(聚核苷酸可有效鍵聯至其中)之真核生物表現載體，且一些可購自諸如 Stratagene, La Jolla, CA; Invitrogen, Carlsbad, CA; Promega, Madison, WI 或 BD

Biosciences Clontech, Palo Alto, CA之公司。

在一較佳實施例中，表現載體包含至少一種核酸序列，該核酸序列為編碼所關注之肽/多肽/蛋白質之核苷酸序列的轉錄及轉譯所必需之調節序列。

如本文中所用之術語"表現"係指異源核酸序列在宿主細胞中之轉錄及/或轉譯。所需產物/所關注之蛋白質在宿主細胞中之表現程度可取決於存在於細胞中之相應mRNA之量，或藉由如在本發明實例中之所選序列編碼的所需多肽/所關注之蛋白質之量。舉例而言，自所選序列所轉錄之mRNA可藉由北方墨點雜交、核糖核酸酶RNA保護、與細胞RNA之原位雜交或藉由PCR來定量。由所選序列編碼之蛋白質可藉由以下各種方法來定量：例如藉由ELISA、藉由西方墨點法、藉由放射免疫檢定、藉由免疫沈澱、藉由檢定蛋白質之生物活性、藉由將蛋白質免疫染色，接著FACS分析或藉由均勻時間解析螢光(HTRF)檢定。

在本發明中，術語"表現"同樣係用於基因(意謂DNA序列)之情形中，以及DNA序列所轉譯之蛋白質產物之情形中。術語"基因"及"蛋白質"因此在表現之情形中可互換使用，例如"所關注之蛋白質之表現"及"所關注之基因之表現"可互換使用且兩個用語係指同一事實問題。在本發明中，此等術語較佳係指人類基因及蛋白質，但包括來自其他哺乳動物物種(較佳為小鼠、倉鼠及大鼠)之同等同源序列，以及來自額外真核物種(包括雞、鴨、苔蘚、蠕蟲、蠅及酵母)之同源序列。

如本文中所用之術語"實現"所關注之蛋白質的表現或"實現"所關注之蛋白質的分泌係指正面影響該事件或引起該事件。如本文中所用之此等術語較佳係指"增加表現"或"提高分泌"。

可藉由在此項技術中熟知之任何方法對真核宿主細胞進行以聚核苷酸或表現載體"轉染"，從而產生經基因修飾之細胞或轉殖基因細胞。轉染方法包括(但不限於)脂質體介導轉染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、聚陽離子(諸如DEAE-葡聚糖)介導轉染、原生質體融合、病毒感染及顯微注射。轉染較佳為穩定轉染。在特定宿主細胞株及細胞類型中提供異源基因之最佳轉染頻率及表現的轉染方法為有利的。可藉由常規程序確定合適方法。為了穩定轉染，將構築體整合至宿主細胞之基因組或人工染色體/微型染色體中或以游離基因方式(episomally)定位以便穩定地保持在宿主細胞內。

除非另作說明，否則本發明之實踐將採用細胞生物學、分子生物學、細胞培養、免疫學及在熟習此項技術者之技術中的類似學科之習知技術。在目前文獻中充分揭示此等技術。

本發明係關於在細胞中產生所關注之異源蛋白質的方法，其包含a)增加至少一種編碼SM-蛋白質之基因的表現或各別蛋白質或其至少一種衍生物、突變體或片段之活性，及b)實現該所關注之異源蛋白質的表現。

本發明特定言之係關於在細胞中產生所關注之異源蛋白

質的方法，其包含a)增加至少一種編碼來自SEC1/Munc18蛋白質群(SM-蛋白質)之蛋白質的基因之表現，及b)實現該所關注之異源蛋白質的表現。在方法步驟b)中所關注之蛋白質的分泌較佳得以提高。本發明因此較佳係關於在細胞中產生所關注之異源蛋白質的方法，其包含a)增加至少一種編碼來自SEC1/Munc18蛋白質群(SM-蛋白質)之蛋白質的基因之表現，及b)提高該所關注之異源蛋白質的分泌。

本發明較佳係關於在細胞中產生所關注之異源蛋白質的方法，其包含a)增加至少一種編碼選自SEC1/Munc18蛋白質群(SM-蛋白質)之蛋白質的基因之表現，該SEC1/Munc18蛋白質群係由以下各物組成：

Sec1p、Sly1p、Vps33p及Vps45p、ROP、Sly1及Vps33/康乃馨、Unc-18、Munc18-1、Munc18-2及Munc18-3、VPS45、VPS33-A、VPS33-B及Sly1，

及b)實現該所關注之異源蛋白質的表現，較佳增加該所關注之異源蛋白質的表現或尤其較佳其之分泌。

步驟a)中之蛋白質較佳係選自SEC1/Munc18蛋白質群(SM-蛋白質)，該群係由以下各物組成：Sec1p、Sly1p、Vps33p、Vps45p、Munc18-1、Munc18-2及Munc18-3、VPS45、VPS33-A及VPS33-B及Sly1。

步驟a)中之蛋白質更佳係選自SEC1/Munc18蛋白質群(SM-蛋白質)，該群係由Munc18-1、Munc18-2、Munc18-3、VPS45、VPS33-A及VPS33-B及Sly1組成。步驟a)中之

蛋白質最佳係選自 SEC1/Munc18 蛋白質群 (SM-蛋白質)，該群係由 Munc18-3/Munc18c 及 Sly-1 組成。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於步驟 a) 中之一基因編碼 Munc-18 蛋白質或 Munc-18 蛋白質家族成員。在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於步驟 a) 中之一基因編碼三種 Munc18 同功異型物，Munc18a、b 或 c 中之一者，較佳 Munc18c。

在本發明之另一特定實施例中，方法之特徵在於步驟 a) 中之一基因編碼 Munc18c (SEQ ID NO: 39)。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於步驟 a) 中之一基因編碼 Sly-1 蛋白質或 Sly-1 蛋白質家族成員，較佳 Sly-1。

在本發明之另一特定實施例中，方法之特徵在於步驟 a) 中之一基因編碼 Sly-1 (SEQ ID NO: 41)。

在本發明之一較佳實施例中，方法之特徵在於步驟 a) 包含增加至少兩種編碼 SM-蛋白質之基因的表現或活性，藉此該等 SM 蛋白質係與小泡運輸之兩個不同步驟有關。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於 a) 一基因編碼調節小泡與細胞膜之融合的 SM 蛋白質，b) 第二基因編碼調節小泡與高爾基複合體之融合的 SM 蛋白質。

在本發明之一尤其較佳實施例中，方法之特徵在於 Munc18c (SEQ ID NO: 39) 及 Sly-1 (SEQ ID NO: 41) 之表現或活性增加。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於步驟 a) 包含

a)增加編碼SM蛋白質家族之一成員的第一基因之表現或活性，b)第二基因編碼SM蛋白質家族之另一成員，及c)第三基因編碼XBP-1。

在本發明之一尤其較佳實施例中，方法之特徵在於Munc18c(SEQ ID NO: 39)、Sly-1(SEQ ID NO: 41)及XBP-1(SEQ ID NO: 43)之表現或活性增加。

本發明另外係關於將細胞工程化之方法，其包含a)將一或多種包含為至少兩種多肽編碼之核酸序列的載體系統引入細胞中，藉以i)至少一種第一核酸序列編碼SM-蛋白質或其衍生物、突變體或片段，及ii)第二核酸序列編碼所關注之蛋白質，b)在該細胞中表現該所關注之蛋白質及該至少一種SM-蛋白質或其衍生物、突變體或片段。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於將核酸序列依次引入該細胞中。

在本發明之另一特定實施例中，方法之特徵在於引入至少一種編碼SM蛋白質之核酸序列，隨後引入編碼該所關注之蛋白質的核酸序列。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於引入至少一種編碼所關注之蛋白質的核酸序列，隨後引入編碼該SM蛋白質的核酸序列。

在本發明之一較佳實施例中，方法之特徵在於將核酸序列同時引入該細胞中。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於SM-蛋白質為Munc-18同功異型物中之任一者，較佳為Munc-18c

(SEQ ID NO: 39)或 Sly-1(SEQ ID NO: 41)。

在本發明之一較佳實施例中，方法之特徵在於在步驟 a)i)中組合使用兩種SM-蛋白質，藉以該等SM蛋白質係與小泡運輸之兩個不同步驟有關。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於a)一基因編碼調節小泡與細胞膜之融合的SM蛋白質，b)第二基因編碼調節小泡與高爾基複合體之融合的SM蛋白質。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於組合使用之兩種SM-蛋白質為 Munc-18c(SEQ ID NO: 39)及 Sly-1(SEQ ID NO: 41)。

在本發明之一較佳實施例中，方法之特徵在於在步驟 a)i)中，將兩種SM-蛋白質與XBP-1組合使用。

在本發明之一尤其較佳實施例中，方法之特徵在於SM蛋白質為與XBP-1(SEQ ID NO: 43)組合之 Munc-18c(SEQ ID NO: 39)及 Sly-1(SEQ ID NO: 41)。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於該細胞為真核生物細胞，諸如酵母、植物、蠕蟲、昆蟲、禽類、魚、爬行動物或哺乳動物細胞。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於該細胞為真核生物細胞，較佳為脊椎動物細胞，最佳為哺乳動物細胞。

該脊椎動物細胞較佳為禽類細胞，諸如雞或鴨細胞。

在本發明之另一特定實施例中，方法之特徵在於該哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary，

CHO)、猴腎CV1、猴腎COS、人類晶狀體上皮PER.C6™、人類胚腎HEK293、人類骨髓瘤、人類羊水細胞(human amniocyte)、嬰兒倉鼠腎臟、非洲綠猴腎臟、人類宮頸癌、犬腎、水牛大鼠肝臟、人類肺臟、人類肝臟、小鼠乳腺腫瘤或骨髓瘤細胞、NS0、狗、豬或恆河猴細胞、大鼠、兔、貓、山羊細胞，較佳為CHO細胞。

在本發明之一較佳實施例中，方法之特徵在於該CHO細胞為野生型CHO、CHO K1、CHO DG44、CHO DUKX-B11、CHO Pro-5或由其衍生之突變體，包括CHO突變體Lec1至Lec35，較佳為CHO DG44。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於所關注之蛋白質為治療用蛋白質。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於所關注之蛋白質為膜或分泌蛋白，較佳為抗體或抗體片段。

在本發明之另一特定實施例中，方法之特徵在於抗體為單株、多株、哺乳動物、鼠類、嵌合、人類化、靈長化、靈長類、人類或其抗體片段或衍生物，諸如抗體、免疫球蛋白輕鏈、免疫球蛋白重鏈、免疫球蛋白輕鏈及重鏈、Fab、F(ab')₂、Fc、Fc-Fc融合蛋白、Fv、單鏈Fv、單結構域Fv、四價單鏈Fv、二硫鍵聯Fv、結構域缺失、微型抗體、雙功能抗體，或以上片段中一者與另一肽或多肽之融合多肽、Fc肽融合蛋白、Fc毒素融合蛋白、骨架蛋白。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於該異源SM蛋白質存在於包含至少一種SNARE蛋白質之小泡融合複合

物中。

在本發明之一特定實施例中，方法之特徵在於該異源SM蛋白質存在於包含至少一種SNARE蛋白質及突觸蛋白4或突觸蛋白5之小泡融合複合物中。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於在該細胞中該所關注之異源蛋白質的比生產率為每細胞每天至少5 pg，每細胞每天15 pg，每細胞每天20 pg，每細胞每天25 pg。

在本發明之另一實施例中，方法之特徵在於該方法引起該所關注之蛋白質在該細胞中與表現該所關注蛋白質之對照細胞相比提高之比細胞生產率，但藉以該對照細胞並不具有任何SM-蛋白質之增加之表現或活性。

在本發明之一較佳實施例中，方法之特徵在於生產率之提高為約5%至約10%、約11%至約20%、約21%至約30%、約31%至約40%、約41%至約50%、約51%至約60%、約61%至約70%、約71%至約80%、約81%至約90%、約91%至約100%、約101%至約149%、約150%至約199%、約200%至約299%、約300%至約499%，或約500%至約1000%。

本發明另外係關於一種提高所關注之膜或分泌蛋白在細胞中之比細胞生產率或力價的方法，其包含a)將一或多種包含為至少兩種多肽編碼之核酸序列的載體系統引入細胞中，藉以i)至少一種第一聚核苷酸編碼SM-蛋白質或其衍生物、突變體或片段，及ii)第二聚核苷酸編碼所關注之蛋

白質，及b)在該細胞中表現該所關注之蛋白質及該SM-蛋白質或其衍生物、突變體或片段。

本發明另外係關於包含編碼至少兩種多肽之表現單元的表現載體，藉以a)至少一種多肽為SM-蛋白質或其衍生物、突變體或片段，及b)第二多肽為所關注之蛋白質。

在本發明之一特定實施例中，表現載體之特徵在於所關注之蛋白質為治療用蛋白質，較佳為抗體或抗體片段。

在本發明之一較佳實施例中，表現載體之特徵在於抗體為單株、多株、哺乳動物、鼠類、嵌合、人類化、靈長化、靈長類、人類或其抗體片段或衍生物，諸如抗體、免疫球蛋白輕鏈、免疫球蛋白重鏈、免疫球蛋白輕鏈及重鏈、Fab、F(ab')₂、Fc、Fc-Fc融合蛋白、Fv、單鏈Fv、單結構域Fv、四價單鏈Fv、二硫鍵聯Fv、結構域缺失、微型抗體、雙功能抗體，或以上片段中之一者與另一肽或多肽之融合多肽、Fc肽融合蛋白、Fc毒素融合蛋白、骨架蛋白。

在本發明之另一實施例中，表現載體之特徵在於表現單元為多順反子，較佳為雙順反子。

在本發明之一特定實施例中，表現載體之特徵在於載體包含在圖8中所述之表現構築體的任一者。

在本發明之一較佳實施例中，表現載體之特徵在於載體包含至少一個配置如下之雙順反子表現單元：a)編碼SM蛋白質之基因，b)IRES元件及c)編碼SM蛋白質之第二基因。參見圖8d)。

在本發明之另一較佳實施例中，表現載體之特徵在於自分離之表現單元(圖8a)或自一種雙順反子單元(圖8b)編碼至少一種所關注之蛋白質(GOI)及一種SM蛋白質。在本發明之另一較佳實施例中，表現載體之特徵在於其包含自分離之表現卡匣(圖8c)編碼或以雙順反子而其中兩個基因經由一個IRES元件鍵聯(圖8d)編碼兩種SM蛋白質的基因。在本發明之另一實施例中，表現載體之特徵在於其編碼至少兩種SM蛋白質及一個所關注之基因(圖8e)或自一種多順反子表現單元編碼幾種SM蛋白質。

在本發明之一個較佳實施例中，表現載體之特徵在於SM-蛋白質為Munc-18同功異型物Munc a、b、c之一，較佳為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)。

在本發明之另一較佳實施例中，表現載體之特徵在於SM-蛋白質為Sly-1(SEQ ID NO: 41)。

在本發明之另一實施例中，表現載體之特徵在於組合使用至少兩種SM-蛋白質。

在本發明之一個特定實施例中，表現載體之特徵在於該至少兩種SM蛋白質涉及小泡運輸之兩個不同步驟。

在本發明之另一實施例中，表現載體之特徵在於a)一種SM蛋白質調節小泡與細胞膜之融合，b)第二SM蛋白質調節小泡與高爾基複合體之融合。

在本發明之一個較佳實施例中，表現載體之特徵在於SM蛋白質為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)及Sly-1(SEQ ID NO: 41)。

在本發明之另一較佳實施例中，表現載體之特徵在於至少兩種SM-蛋白質與XBP-1組合使用，較佳Munc-18c(SEQ ID NO: 39)及Sly-1(SEQ ID NO: 41)與XBP-1(SEQ ID NO: 43)組合。

本發明另外係關於表現至少兩種異源基因之細胞：a)至少一種編碼SM-蛋白質或其衍生物、突變體或片段之基因，及b)編碼所關注之蛋白質的基因。

在本發明之一特定實施例中，細胞之特徵在於所關注之蛋白質為治療用蛋白質，較佳為抗體或抗體片段。

在本發明之一較佳實施例中，細胞之特徵在於抗體為單株、多株、哺乳動物、鼠類、嵌合、人類化、靈長化、靈長類、人類或其抗體片段或衍生物，諸如抗體、免疫球蛋白輕鏈、免疫球蛋白重鏈、免疫球蛋白輕鏈及重鏈、Fab、F(ab')₂、Fc、Fc-Fc融合蛋白、Fv、單鏈Fv、單結構域Fv、四價單鏈Fv、二硫鍵聯Fv、結構域缺失、微型抗體、雙功能抗體，或以上片段中之一者與另一肽或多肽之融合多肽、Fc肽融合蛋白、Fc毒素融合蛋白、骨架蛋白。

在本發明之一特定實施例中，細胞之特徵在於SM蛋白質之表現量顯著在內源量以上，較佳10%。在本發明之另一實施例中，細胞之特徵在於該蛋白質之表現量係在內源量以上5%，較佳在內源量以上10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、120%、150%、175%、200%、300%、400%、500%、1000%。

在本發明之另一實施例中，細胞包含本發明之表現載體之任一者。

在本發明之一特定實施例中，細胞之特徵在於該細胞為真核生物細胞，較佳為脊椎動物細胞，最佳為哺乳動物細胞。尤其較佳為齧齒動物細胞。

在本發明之一較佳實施例中，細胞之特徵在於該真核生物細胞為禽類細胞。

在本發明之另一特定實施例中，細胞之特徵在於該哺乳動物細胞為齧齒動物細胞，較佳為倉鼠或鼠類細胞。在本發明之一較佳實施例中，細胞之特徵在於該哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)、猴腎CV1、猴腎COS、人類晶狀體上皮PER.C6™、人類骨髓瘤、人類羊水細胞、人類胚腎HEK293、嬰兒倉鼠腎臟、非洲綠猴腎臟、人類宮頸癌、犬腎、水牛大鼠肝臟、人類肺臟、人類肝臟、小鼠乳腺腫瘤或骨髓瘤細胞、NS0、狗、豬或恆河猴細胞、大鼠、兔、貓、山羊細胞，較佳為CHO細胞。

在本發明之另一較佳實施例中，細胞之特徵在於該CHO細胞為野生型CHO、CHO K1、CHO DG44、CHO DUKX-B11、CHO Pro-5或由其衍生之突變體，包括CHO突變體Lec1至Lec35，較佳為CHO DG44。

在本發明之一尤其較佳實施例中，細胞之特徵在於該細胞為CHO細胞，較佳為CHO DG44細胞。

本發明另外係關於所關注之蛋白質，較佳藉由任何本發明之方法產生的抗體。

本發明另外係關於一種醫藥組合物，其包含適用於阻斷或降低一或若干種SM-蛋白質之活性或表現(較佳為表現)之化合物及醫藥學上可接受之載劑。

在本發明之一特定實施例中，醫藥組合物之特徵在於化合物為聚核苷酸序列。聚核苷酸序列較佳為shRNA、RNAi、siRNA或反義-RNA，最佳為shRNA。

在本發明之另一特定實施例中，醫藥組合物之特徵在於SM-蛋白質為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)或Sly-1(SEQ ID NO: 41)或兩者之組合。

本發明另外係關於一種識別SM-蛋白質功能之調節劑的方法，其包含a)提供至少一種SM-蛋白質或其衍生物、突變體或片段，較佳為Munc-18c，b)使步驟a)之該SM-蛋白質與測試劑接觸，c)測定與細胞表面蛋白之增加或減少之蛋白質分泌或表現相關的效應。

本發明另外係關於一種治療癌症、自體免疫疾病及炎症之方法，其包含向有此需要之患者投與治療有效量之根據本發明之醫藥組合物。

本發明亦係關於一種包含應用根據本發明之醫藥組合物以治療癌症、自體免疫疾病及炎症之方法。

本發明亦係關於一種抑制或降低細胞增殖或遷移之方法，其包含使該細胞與根據本發明之醫藥組合物接觸。

本發明之可能治療應用包括防止諸如自細胞或組織之發炎性介體、生長因子、血管生成因子之蛋白質的分泌以在癌症療法、自體免疫疾病及炎症中控制細胞-細胞通訊，

或為了促進在懸浮液中生長及防止細胞聚集之目的藉由減少錨定跨膜蛋白之細胞表面存在來減少細胞附接。

本發明另外係關於SM-蛋白質或編碼SM-蛋白質之聚核苷酸在活體外細胞或組織培養系統中增加所關注之蛋白質的分泌及/或產量之用途。SM蛋白質較佳為Munc 18蛋白質，諸如Munc18c(SEQ ID NO: 39)。亦較佳的為Sly-1蛋白質，諸如Sly-1(SEQ ID NO: 41)。

本發明另外係關於本發明之任何方法、表現載體、細胞或醫藥組合物的診斷用途。

本發明另外係關於一種提高細胞之蛋白質分泌/將細胞工程化/在細胞中產生所關注之異源蛋白質的方法，其包含：

- a) 將人類 Sec1/Munc18 及 Sly1/SCFD1 選殖至表現載體(例如，哺乳動物 BI-HEX® 表現平台)中，藉以該等蛋白質可藉由一種或不同雙順反子/多順反子表現單元來編碼且藉以可在同一或不同質體上含有該等蛋白質，
- b) 以單獨或組合方式，同時或依次將該等構築體轉染至真核生物宿主細胞中，該等真核生物宿主細胞較佳為哺乳動物細胞，諸如 CHO、BHK、NS0、HEK293、PerC.6，
- c) 視情況：核對轉殖基因表現，
- d) 引入編碼所關注基因(GOI)之構築體，較佳為分泌蛋白或跨膜蛋白，
- e) 例如藉由 ELISA、西方墨點法或流式細胞儀進行 GOI 之表現分析。

或者，步驟(b+c)及(d+e)之順序可變化，藉此首先引入GOI，或步驟(b)及(d)可同時進行。

參考僅出於說明本發明之某些實施例之目的而包括於本文中之以下實例，將較易於理解上文一般描述之本發明。以下實例並非限制性的。其僅展示本發明之可能實施例。熟習此項技術者可易於調節條件以將其應用於其他實施例。

實驗

材料及方法

質體設計。

將寡核苷酸 ORP70 (5'-CGCGGATCCACCATGGCGGCGGCGGCGGCAGCG-3', SEQ ID NO 1)及 ORP71 (5'-CCGCTCGAGTTACTTTTGTCCAAGTTGTGACAACTG-3', SEQ ID NO 2)及經選殖 BamHI/XhoI 用至 pcDNA3.1 (Invitrogen) 中以產生 pRP24 (P_{hCMV} -sly1-pA_{SV40})，從而將人類 sly1 自 HEK-293 總 RNA 進行 RT-PCR 擴增。同樣地，將 munc18c 選殖 (ORP69, 5'-CGCGGATCCACCATGGCGCCGCGGTGGCAGAGAGG-3', SEQ ID NO 3; ORP66, 5'-CCCTCGAGCTATTCA TCTTTAATTAAGGAGAC-3', SEQ ID NO 4)，其產生 pRP17 (P_{hCMV} -munc18c-pA_{SV40})。藉由將 sly1 (使用 ORP29 (5'-CTCAGATCTGCGGCGGCGG CGGCAGCG-3', SEQ ID NO 5) 及 ORP30 (5'-ACCGTCGACCTTTTGTCCAAGTTGTGACAACTG-3', SEQ ID NO 6) 自 pRP24 經 PCR 擴增)、BglII/SalI 插入至 pEYFP-C1 (Clontech) 中來構築 pRP32 (P_{hCMV} -EYFP-

sly1-pA_{SV40})。藉由自 pRP17 切除 munc18c BamHI/XhoI 且將其 BglII/SalI 選殖至 pEYFP-C1 中來設計 pRP23 (P_{hCMV}-EYFP-munc18c-pA_{SV40})。藉由將 sly1(使用 ORP9 (5'-CGCGCGGCCGACCATGGCGGGCGGGCGGGCGGCAGCG-3', SEQ ID NO 7) 及 ORP10 (5'-CCGGGATCCTTACTTTTGTCCAAGTTGTGACAACCTG-3', SEQ ID NO 8) 經 PCR 擴增)、NotI/BamHI 插入至 pRP1 中來產生 pRP3, 該 pRP1 係藉由以 SmaI/XbaI GFP 置換賦予新黴素(neomycin)抗性之基因而自 pIRESneo(Clontech) 衍生, 使用 ORP5 (5'-CCCCCGGGATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3', SEQ ID NO 9) 及 ORP6 (5'-TTTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCC-3', SEQ ID NO 10) 自 pLEGFP-N1 (Clontech) 經 PCR 擴增。同樣地, 藉由將 munc18c(自 pRP17 (ORP15, 5'-CGCGCGGCCGACCATGGCGCCGCCGGTGGCAGAGAGG-3', SEQ ID NO 11; ORP16, 5'-CCGGATCCCTATTCATCTTTAATTAAGGAGAC-3', SEQ ID NO 12) 經 PCR 擴增)、NotI/BamHI 插入至 pRP1 中來構築 pRP4。藉由突觸蛋白 4 之 PCR 介導擴增 (ORP127, 5'-CCCAAGCTTTGCGCGACAGGACCCACGAG-3', SEQ ID NO 13; ORP128, 5'-CGCGTCGACTTATCCAACGGTTATGGTGATGCC-3', SEQ ID NO 14), 接著將 HindIII/SalI 選殖至 pECFP-C1 (Clontech) 中來構築 pRP29 (P_{hCMV}-ECFP-突觸蛋白 4-pA_{SV40})。同樣地, 將突觸蛋白 5 選殖 (ORP136, 5'-GGAAGATCTATCCCGCGGAAACGCTAC-3', SEQ ID NO 15; ORP137, 5'-CCCAAGCTTTCAAGCAAGGAAGACCAC-

3', SEQ ID NO 16), 其產生 pRP40 (P_{hCMV}-ECFP-突觸蛋白 5-pA_{SV40})。藉由將雙股 DNA 片段 BbsI/XbaI 插入 pmU6 中來選殖具有 sly1 特異性 shRNA 或 munc18c 特異性 shRNA 之表現載體：(i) sly1(shRNA_{sly1_1}; pRP5, 5'-TTTGGGAAGTAACT GGAAGATATTTTCAAGAGAAATATCTTCCAGTTTACTTCT TTTT-3', SEQ ID NO 23, 及 5'-CTAGAAAAAGAAGTAAA CTGGAAGATATTTCTCTTGAAAATATCTTCCAGTTTACTT C-3'; SEQ ID NO 24, shRNA_{sly1_2}; pRP6, 5'-TTTGGCAGTG AAAC TAGACAAGAAATTCAAGAGATTTCTTGTCTAGTTT CACTGCTTTTTT-3', SEQ ID NO 25 及 5'-CTAGAAAAAGCA GTGAAACTAGACAAGAAATCTCTTGAATTTCTTGTCTAG TTTC ACTGC-3'; SEQ ID NO 26 shRNA_{sly1_3}; pRP7, 5'- TTTGGGAGGCAACTACATTGAATATTTCAAGAGAATATTC AATGTAGTTGCCTCCTTTTTT-3', SEQ ID NO 27, 及 5'- CTAGAAAAAGGAGGCAACTACATTGAATATTCTCTTGAA ATATTCAATGTAGTTGCCTCC-3', SEQ ID NO 28); (ii) munc18c (shRNA_{munc18c_1}; pRP12, 5'-TTTGCACATGAATCTC AGGTGTATATTCAAGAGATATACACCTGAGATTCATGTGT TTTT-3', SEQ ID NO 29, 及 5'-CTAGAAAAACACATGA ATCTCAGGTGTATATCTCTTGAATATACACCTGAGATTCA TGTG-3', SEQ ID NO 30; shRNA_{munc18c_2}; pRP14, 5'- TTTGGCTTGAAGACTACTACAAGATTTCAAGAGAATCTT GTAGTAGTCTTCAAGCTTTTTT-3', SEQ ID NO 31, 及 5'- CTAGAAAAAGCTTGAAGACTACTACAAGATTCTCTTGAA

ATCTTGTAGTAGTCTTCAAGC-3', SEQ ID NO 32; shRNA_{munc18c_3}; pRP38, 5'-TTTGCGCCAGAAAC CCAGAG CTAATTTCAAGAGAATTAGCTCTGGGGTTTCTGGCGTTTTT -3', SEQ ID NO 33 , 及 5'-CTAGAAAAACGCCAGAAA CCCAGAGCTAATTCTCTTGAAATTAGCTCTGGGGTTTCTGG CG-3', SEQ ID NO 34; shRNA_{munc18c_4}; pRP39, 5'-TTTGGC TGAATAAACCCCAAGGATAATTCAAGAGATTATCCTTGGG TTTATTCAGCTTTTTT-3', SEQ ID NO 35 , 及 5'-CTAGAA AAAGCTGAATAAACCCCAAGGATAATCTCTTGAATTATCCT TGGGTTTATTCAGC-3', SEQ ID NO 360 ; (iii)對照 shRNA (pRP9, 5'-TTTGCACAAGCTGGAGTACAAC TACTTCAAGA GAGTAGTTGTACTCCAGCTTGTGTTTTT-3', SEQ ID NO 37 , 及 5'-CTAGAAAAACACAAGCTGGAGTACAAC TACTC TCTTGAAGTAGTTGTACTCCAGCTTGTG-3', SEQ ID NO 38)。

編碼人類胎盤鹼性磷酸酶(SEAP)之SEAP2對照物係購自 Clontech且之前49已描述具有嗜熱脂肪芽孢桿菌衍生之分泌 α -澱粉酶(SAMY)的pSS158。含有人類血管內皮生長因子121(VGEF121)之pWW276以及分別編碼人類IgG1利妥昔單抗之重鏈及輕鏈的pWW943及pWW946係由Wilfried Weber友情提供。之前已描述(Tigges及Fussenegger, 2006) xbp-1表現載體pcDNA3.1-Xbp-1(PhCMV-xbp-1-pASV40)。

細胞培養及轉染

a)黏附細胞之培養：

在 37°C 下在含有 5% CO₂之濕潤氣氛中，在補充有 5% FCS(PAN Biotech, Aidenbach, Germany；目錄號 3302，批號 P231902)之 ChoMaster HTS 培養基 (Cell Culture Technology, Gravesano, Switzerland)或杜貝可改質之伊格爾培養基(DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)中培養中國倉鼠卵巢(CHO-K1；ATCC CCL-61)及人類胚腎細胞(HEK-293；ATCC CRL-1573)。為了瞬間轉染，將 1×10^5 個細胞接種於 12 孔組織培養板之一個孔中且在 24 h 之後使用基於改質磷酸鈣之方案⁴⁷或 FuGENE6 轉染試劑 (Roche, Basel, Switzerland)進行轉染。使用表現及選擇載體以及抗生素之以下組合來產生為構成性轉殖基因表現而工程化之單轉殖基因穩定 CHO-K1 衍生物：(i) CHO-Sly1₁₆及 CHO-Sly1₂₃；pRP24；400 µg/ml G418 (Merck)；(ii) CHO-Munc18c₈及 CHO-Munc18c₉、pRP17；400 µg/ml G418。兩重轉殖基因細胞株 CHO-Sly1-Munc18c₁及 CHO-Sly1-Xbp1₄係藉由將 pRP17 與 Ppur (Clontech)、pcDNA3.1-Xbp-1³⁵與 pPUR 分別共轉染至 CHO-Sly1₂₃ 中，接著以 G418 及嘌呤黴素 (4 µg/ml) 進行純系選擇來構築。藉由將 pcDNA3.1-Xbp-1 與 pZeoSV2 (Invitrogen) 共轉染至 CHO-Sly1-Munc18c₁ 中，接著以 G418 (400 µg/ml)、嘌呤黴素 (4 µg/ml) 及博來黴素 (zeocin) (150 µg/ml) 進行選擇來產生使能夠構成性表現 sly1、munc18c 及 xbp-1 之三重轉殖基因細胞株 CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇。

b) 懸浮液培養物

將產生 CHO-DG44 細胞之單株抗體 (mAB) 的懸浮液培養物 (Urlaub 等人, 1986) 及其穩定轉染物培育於 BI 專屬化學定義之無血清培養基中。每 2-3 天轉種 (sub-cultivated) 晶種儲備培養物, 接種密度分別為 3×10^5 - 2×10^5 個細胞/毫升。使細胞生長於 T-燒瓶或搖瓶 (Nunc) 中。在 5% CO_2 、 37°C 及 120 rpm 下, 在濕潤培育箱 (Thermo) 中培育 T-燒瓶且在 Multitron HT 培育箱 (Infors) 中培育搖瓶。

藉由錐蟲藍排除 (trypan blue exclusion), 使用血球計來測定細胞濃度及生存力。

進料分批培養

將細胞以 3×10^5 個細胞/毫升接種於 1000 ml 搖瓶中, 於 250 ml 無抗生素或 MTX (Sigma-Aldrich, Germany) 之 BI-專屬製造培養基中。在 120 rpm 下, 在 37°C 及 5% CO_2 (稍後當細胞數目增加時將其降至 2%) 中攪拌培養物。每日測定包括 pH 值、葡萄糖及乳酸鹽濃度之培養參數且需要時使用 NaCO_3 將 pH 值調節至 pH 7.0。每 24 hr 添加 BI-專屬進料溶液。藉由錐蟲藍排除, 使用自動化 CEDEX 細胞定量系統 (Innovatis) 來測定細胞密度及生存力。收集來自細胞培養液之試樣且藉由 ELISA 使其經受力價量測。

為進行 ELISA, 使用抗人類 -Fc 片段之抗體 (Jackson Immuno Research Laboratories) 及共軛人類 κ 輕鏈 HRP (Sigma)。

將加重比生產率計算為在某天之產物濃度除以直至該時點之 "活細胞之積分" (IVC)。

RNA分離、RT-PCR及定量即時PCR

使用 NucleoSpin RNA II 套組 (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland)自哺乳動物細胞製備總RNA且以 TITANIUM™ One-Step RT-PCR套組(Clontech)根據製造商方案進行RT-PCR。seap、samy及vegf₁₂₁ mRNA之相對定量係以 Applied Biosystems 7500即時PCR裝置，使用25 µl含有 Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Warrington, UK)、100 ng cDNA、900 nM正向及反向引子(對seap (5'-AGGCCCCGGGACAGGAA-3', SEQ ID NO 17; 5'-GCCGTCCTTGAGCACATAGC-3', SEQ ID NO 18)、samy (5'-AAA GCTCAATATCTTCAAGCCATTC-3', SEQ ID NO 19; 5'-AACACGACATCGGCGTACACT-3', SEQ ID NO 20)及vegf₁₂₁ (5'-CTTGCTGCTCTACCTCCACCAT-3', SEQ ID NO 21; 5'-TGATTCTGCCCTCCTCCTTCT-3', SEQ ID NO 22)具有特異性)之反應液來進行。使用核糖體18s-RNA特異性轉錄物檢定(Applied Biosystems)將所有試樣均標準化且對所有擴增子(amplicons)均進行熔融曲線分析以證實不存在非特異性擴增。

共焦顯微法

在48 h之後將接種且轉染於塗佈聚離胺酸之玻璃載片上的HEK-293以磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌，以三聚甲醛(3% w/v)固定，以PBS再次洗滌，且藉由共焦顯微法分析。以Leica TCS SP1 (Leica, Heerbrugg, Switzerland)記錄影像且藉由Adobe Photoshop 10加以分析。

抗體、免疫沈澱及西方墨點法

在冰上將哺乳動物細胞溶解於溶胞緩衝液(50 mM Tris-HCL, pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM EDTA、1% Triton X-100)中。藉由在4°C下在14,000×g下離心10 min接著在4°C下與蛋白質A-瓊脂糖珠粒(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)一起培育30 min來獲得總蛋白質溶胞物。藉由在4°C下藉由旋轉隔夜使2 mg總蛋白質與親和性純化之Munc18c抗體(與蛋白質A-瓊脂糖偶合)混合於最終體積為500 µl之溶胞緩衝液中來進行免疫沈澱。接著以500 µl溶胞緩衝液將珠粒洗滌四次且藉由SDS-PAGE將蛋白質溶離且分離, 接著進行西方墨點分析。對Sly1具有特異性之抗體係由Jesse Hay(University of Montana, Missoula, MO, USA)友情提供。對Munc18a、突觸蛋白4及Vamp2具有特異性之抗體係購自Synaptic Systems(Goettingen, Germany)且抗Munc18b、Munc18c及p27^{Kip1}之抗體係來自Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)。使用ECL-Plus偵測試劑及HRP-共軛第二抗體(Amersham, Piscataway, NJ, USA)來觀測經塗墨之蛋白質。

蛋白質製造

在培養物中48 h之後, 使用標準化檢定來評估蛋白質製造: SEAP, 基於對硝基苯磷酸鹽之吸光時間過程; SAMY, 藍澱粉Phadebas[®]檢定(Pharmacia Upjohn, Peapack, NJ, 目錄號10-5380-32); VEGF₁₂₁, 藉由人類VEGF₁₂₁特

異性 ELISA(R&D System, Minneapolis, MN, 目錄號 DY293)及利妥昔單抗, 藉由 ELISA(Sigma, 目錄號 I2136 及 A0170)。

如下測定生長於懸浮液培養物中之細胞的抗體力價及比生產率：

以雙順反子載體轉染產生 CHO-DG44 之抗體以分析異源蛋白質表現對 mAb 生產率之影響。為評定晶粒儲備培養物之生產率, 自三個連續繼代收集來自細胞培養物上清液之試樣。接著藉由酶聯免疫吸附檢定(ELISA)來分析產物濃度。為進行 ELISA, 使用抗人類 -Fc 片段抗體(Jackson Immuno Research Laboratories)及共軛人類 κ 輕鏈 HRP(Sigma)。可如下來計算比生產率, 連同細胞密度及生存力：

$$qp = \frac{(mAb_{P+1} + mAb_P)}{2} \div \left((t_{P+1} - t_P) * \left(\frac{cc_{P+1} + cc_P}{2} \right) \right)$$

qp=比生產率(pg/細胞/天)

mAb=抗體濃度(mg/L)

t=時點(天)

cc=細胞計數($\times 10^6$ 細胞/毫升)

P=繼代

利妥昔單抗之 N-鍵聯糖基化概況

使用蛋白質 A-瓊脂糖來純化利妥昔單抗且將其以 10 mM 甘胺酸緩衝液(pH 2.8)溶離, 接著以 2 M Tris(pH 9.0)中

和。藉由 SDS-PAGE 證實純度/完整性。接著藉由在 37°C 下以 2 mM Tris(pH7) 中之 0.05 mU/mg 蛋白質進行 N-糖苷酶消化 (PNGaseF, EC 3.5.1.52, QA-Bio, San Mateo, CA) 歷時 3 h, 從而使寡糖自抗體中酶促釋放。在 150 mM 乙酸中培育所釋放之寡糖, 隨後以 DHB 作為基質 (Papac 等人, 1998), 使用 Autoflex MALDI/TOF (Bruker Daltonics, Faellanden, Switzerland), 以陽離子模式操作來進行 MALDI 分析。

HRP 運輸檢定

以編碼所分泌辣根過氧化酶 (ssHRP) 之構築體與空載體、Munc18c、Sly1 之表現構築體或編碼 Munc18c 及 Sly1 之雙順反子表現單元中之任一者來共轉染人類 HT1080 纖維肉瘤細胞。在轉染後 24 h 及 48 h 後, 自細胞培養液取樣且藉由一起培育澄清細胞上清液與 TMB 試劑 (BD Biosciences, Pharmingen) 來偵測報導蛋白質 ssHRP 之分泌。在 3 min 之後, 停止反應且以 ELISA 讀取器 (Spectra Rainbow Thermo) 在 450 nm 下量測吸收度以測定 ssHRP 力價。為進一步分析比生產率, 在最後一次量測之後將細胞膜蛋白酶化, 使用 CASY® 細胞計數器 (Schaerfe System) 來計數且藉由將 ssHRP 力價除以總細胞數目來計算比生產率。

實例

實例 1: 將 Sly1 及 Munc18c 沿分泌途徑在 HEK-293 中定位。

吾人使用基於 RT-PCR 之分析以描繪 SM 蛋白質 Sly1 及 Munc18 之同功異型物 (a、b、c) 在 HEK-293 中之表現。如在圖 1a 及 1b 中所示, sly1 (NM_016160) 及 munc18c (NM_

007269)表現較高且munc18b(NM_006949)以微量表現同時未能偵測到神經元特異性munc18a(NM_003165)之轉錄物。藉由西方墨點法(圖1c)來證實SM蛋白質概況。藉由在HEK-293中共表現YFP-Sly1(pRP32)與CFP-突觸蛋白5(pRP40)或YFP-Munc18c(pRP23)與CFP-突觸蛋白4(pRP29)來分析Sly1及主要Munc18同功異型物Munc18c之細胞內定位。突觸蛋白5為定位於高爾基體之Sly1結合SNARE且突觸蛋白4為與細胞膜結合之與Munc18c相互作用的SNARE。共焦顯微法展示Sly1顯示與突觸蛋白5在高爾基體處極緻密之核周共定位及Munc18c與突觸蛋白4之細胞膜共染色(co-stain)(圖1d)。此等結果證明Sly1及Munc18c在HEK-293中表現且定位於高爾基體與細胞膜，此係與其在各別細胞器處之兩個獨特融合步驟中之作用一致(Jahn等人，2003)。

實例2：Sly1及Munc18調節蛋白質分泌。

已知SM蛋白質控制對細胞內蛋白質運輸必需之小泡融合，但其對於蛋白質分泌之作用仍未知。為表徵Sly1及Munc18對總體胞吐作用之影響，吾人設計對此等SM蛋白質有特異性之shRNA。藉由以雙順反子Sly1-(pRP3; P_{hCMV}-sly1-IRES-eGFP-pA)及Munc18c-(pRP4; P_{hCMV}-munc18c-IRES-eGFP-pA)(編碼報導構築體)與特異性以及非特異性對照物shRNA共轉染之細胞的螢光顯微法來證明Sly1及Munc18c之敲除(圖2)。在HEK-293中證實個別shRNA敲除內源Sly1及Munc18c表現以達到至多70%之能力(圖3a及

3c)。為分析 Sly1 及 Munc18c 敲除對哺乳動物細胞之總體蛋白質分泌能力的影響，吾人將 pSEAP2 對照物及 pRP5 (shRNA_{sly1_1})、pRP6(shRNA_{sly1_2})、pRP7(shRNA_{sly1_3}) 或 pRP12(shRNA_{munc18c_1})、pRP14(shRNA_{munc18c_2})、pRP38(shRNA_{munc18c_3})、pRP39(shRNA_{munc18c_4}) 共轉染至 HEK-293 中且描繪培養物上清液中之 SEAP 水準。Sly1 及 Munc18c 敲除與 SEAP 製造減少之直接相關性表明此等 SM 蛋白質在哺乳動物分泌途徑中之重要作用(圖 3b 及 3d)。

實例 3：Sly1 及 Munc18c 之異位表現提高哺乳動物細胞之分泌能力。

在 Sly1 或 Munc18c 於 CHO-K1 中異位表現(圖 4a 4b、4c)之後，與用以推動產物基因轉錄之啟動子(P_{SV40}、P_{hCMV}、P_{EF1 α})無關地，SEAP、SAMY 或 VEGF₁₂₁之異源製造提高至多 5 倍。當使用 HEK-293 細胞時，亦觀察到類似結果(資料未展示)。因為 SEAP、SAMY 及 VEGF 之 mRNA 水準在存在或不存在提高之 Sly1、Munc18c 或兩者之情況下粗略地恆定(圖 4d)，所以異源蛋白質產量之提高係由轉譯後機制介導。吾等結果與主張在一系列細胞類型(包括脂肪細胞及肌細胞)中 Munc18 蛋白質對胞吐作用之抑制作用的先前研究(Riento 等人，2000; Kanda 等人，2005; Tellam 等人，1997; Thurmond 等人，1998)形成鮮明對比，且提供 Munc18c 及 Sly1 均促進總體胞吐作用之第一證據。

實例 4：SM 蛋白質及 Xbp-1 對分泌途徑之協同效應。

因為 Sly1 及 Munc18 以及 Xbp-1(最近已被識別為藉由增大

分泌細胞器之尺寸來提高蛋白質分泌 (Tigges 及 Fussenegger, 2006)) 在分泌途徑中具有不同目標，所以其可能能夠協同地提高蛋白質產量。因此吾人將 Sly1 編碼、Munc18c 編碼及 Xbp-1 編碼及含 SEAP、SAMY 及 VEGF₁₂₁ 之表現載體的不同組合共轉染至 CHO-K1 中且描繪培養物上清液中之報導蛋白質水準。如圖 4a 中所示，sly1 與 munc18c 之同時過度表現引起 SEAP 產量提高 8 倍，相比之下，藉由單獨之 sly1 或 munc18c 提高 5 倍。SAMY 及 VEGF₁₂₁ 之分泌亦增多 (圖 4b、4c)。sly1、munc18c 及 xbp-1 全部之過度表現將 SEAP、SAMY 及 VEGF 之分泌分別增多 10 倍、12 倍及 8 倍 (圖 4a、4b、4c)，明顯地說明在 Sly1 與 Munc18c 之間及在兩種 SM 蛋白質與通用細胞器擴增因子 Xbp-1 之間對分泌存在協同效應。

實例 5：SM 蛋白質藉由刺激 SNARE 介導之運輸機構來提高分泌能力。

先前研究指定 Munc18c 在胞吐作用中之抑制作用，其與在本文中報導之結果形成對比 (Riento 等人，2000; Kanda 等人，2005; Tellam 等人，1997; Thurmond 等人，1998)。為提供 Munc18c 在運輸機構中之作用，詳言之其與由突觸蛋白 4、SNAP-23 及 VAMP2 組成之胞吐 SNARE 蛋白質之相互作用的分子理解，吾人進行免疫沈澱實驗。如圖 5 中所示，Munc18c-特異性抗體定量地使 Munc18c 連同大量突觸蛋白 4、SNAP-23 及 VAMP 2 一起沈澱，表明 Munc18c 與此等 SNARE 之活體內締合，其促進小泡-細胞器在分泌途徑

中融合(Peng and Gallwitz, 2002; Shen等人, 2007; Scott等人, 2004)。此發現強調, 類似於與完全組裝之SNARE複合物結合且促進融合高爾基體之Sly1, Munc18c亦與SNARE複合物直接相互作用, 表明藉由促進SNARE介導之運輸機構的保守作用機制。

實例6：用於在哺乳動物細胞中提高分泌能力的哺乳動物細胞之基於SM蛋白質之工程設計。

Sly1及Munc18c表現對哺乳動物細胞分泌能力之正面效應指出一種將提高分泌之哺乳動物生產細胞株工程化之新穎轉譯後方法。因此吾人製造為sly1(CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃)或munc18c(CHO-Munc18c₈及CHO-Munc18c₉)之構成性表現而工程化的穩定CHO-K1衍生之細胞株。CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃刺激SEAP分泌提高4倍及8倍(圖6a)及SAMY產量增加4倍及5倍(圖6b)。有趣地, 產生較多SEAP之CHO-Sly1₂₃亦展示較高Sly1水準, 表明SM與產物蛋白質之正相關性(圖6c)。類似地, 為構成性munc18c表現轉殖基因之細胞(CHO-Munc18c₉)產生多9倍及6.5倍之SEAP及SAMY(圖6e及6f)且產生更多SEAP之CHO-Munc18₉亦展示較高Munc18c水準(圖6d)。與親本CHO-K1相比, 穩定細胞株CHO-Sly1-Munc18c₁(為構成性Sly1及Munc18c表現之兩重轉殖基因)及CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇(為構成性Sly1、Munc18c及Xbp-1表現之三重轉殖基因)展示高13倍及16倍之SEAP產量(圖6g)。

實例7：基於SM蛋白質之分泌工程設計提高生產細胞株之

抗體的比生產率。

為在原型生物醫藥製造方案中驗證基於SM蛋白質之分泌工程設計，吾人使稱為利妥昔單抗之單株抗人類CD20 IgG1在CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃中(增加至多10倍)、在CHO-Sly1-Munc18c₁中(增加至多15倍)及在CHO-Sly1-Xbp-1₄中(增加至多13倍)及在CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇中(增加至多19倍)表現(圖7a)。當在CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇中產生利妥昔單抗時，可達到至多40 pg/細胞/天之特別製造水準，與同基因對照細胞株相比，其對應於增加接近20倍(圖7a)。SDS-PAGE分析表明藉由CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇及野生型CHO-K1細胞產生之抗體為結構完整的且彼此不可區分(圖7b、7c)。自在CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇中產生之利妥昔單抗的N-鍵聯Fc寡糖之基於Maldi-TOF之糖基化概況分析揭示與原生生產細胞株相比無差異，表明基於SM/Xbp-1之分泌工程設計並不損害產物品質(圖7d及7e)。

實例8：基於SM蛋白質之分泌工程設計在製造過程中提高總抗體產率。

a)為測試SM蛋白質之異源表現是否亦可用以在工業製造之相關條件下提高治療用蛋白質分泌，以空載體(MOCK對照物)或編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(序列標識NO. 39)或兩種蛋白質之表現構築體作為雙順反子表現單元來穩定轉染產生分泌人類化抗CD44v6 IgG抗體BIWA 4之CHO細胞株(CHO DG44)的抗體。接著使細胞經受選擇以

獲得穩定細胞池(cell pool)。在六個後續繼代期間，自所有穩定細胞池之晶粒儲備培養物取得上清液，藉由ELISA測定MCP-1力價且將其除以細胞之平均數目以計算比生產率。在所有表現任一SM蛋白質之細胞中，與MOCK或未經轉染之細胞相比，IgG表現均顯著提高，藉以最高值係見於同時表現兩種SM蛋白質之細胞池中。

若使穩定轉染物經受分批醱酵或進料分批醱酵，則可獲得類似結果。每日量測總細胞數目及細胞生存力，且在第3天、第5天、第7天、第9天及第11天，自細胞培養液取樣以測定IgG力價及比生產率(圖10A、10B)。在此等條件下，與MOCK對照物及未經轉染之親本細胞株相比，SM蛋白質轉殖基因細胞展示類似生長特性。然而與MOCK對照物相比，在表現Sly1或Munc-18或同時表現兩種SM蛋白質之細胞中IgG比生產率顯著提高(高至多50%)(圖10A)，造成在製造過程中單株抗體力價明顯增大(圖10B)。

總而言之，此資料證明基於SM蛋白質之細胞工程方法對於以多種培養形式(包括串聯培養、生物反應器分批培養及進料分批培養)提高治療用蛋白質產量之適用性。

b)首先以編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(SEQ ID NO. 39)或兩種蛋白質一起之載體轉染CHO宿主細胞(CHO DG44)。使細胞經受選擇壓力且挑選演示SM蛋白質之異源表現的細胞株。隨後，此等細胞株及平行CHO DG 44野生型細胞係以編碼人類單株IgG型抗體作為所關注之基因表現構築體轉染。在第二輪選擇之後，自所有歷經六個後

續繼代之期間的穩定細胞池之晶粒儲備培養物取得上清液，藉由ELISA測定IgG力價且將其除以細胞之平均數目以計算比生產率。

最高值係見於具有兩種SM蛋白質之細胞池，接著見於表現單獨之Sly1或Munc-18的彼等者，其仍產生與不表現任一SM蛋白質之CHO DG-44細胞相比顯著更高之抗體力價。若使穩定轉染物經受分批醱酵或進料分批醱酵，則可獲得類似結果。在此等情況之每一者中，兩種SM蛋白質一起之過度表現引起抗體力價及比生產率均顯著提高。此表明單獨之Sly1或Munc-18之異源表現足以增強治療用抗體分泌。另外，兩種蛋白質之異源表現以組合形式聯合地以協同方式在瞬間以及穩定轉染之細胞株中增強總體胞吐作用。

實例9：SM蛋白質之過度表現提高纖維母細胞活化蛋白質 α (Fibroblast Activation Protein alpha, FAP)之生物醫藥蛋白質產量。

(a)以空載體(MOCK對照物)或編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(SEQ ID NO. 39)或兩種蛋白質作為雙順反子表現單元之表現構築體來轉染表現跨膜明膠酶纖維母細胞活化蛋白質 α (FAP)之人類纖維肉瘤細胞株(HT1080, ATCC CCL-121)。接著使細胞經受選擇以獲得穩定細胞池。自此等池之晶粒儲備培養物收集細胞且將其固定以便藉由FACS測定FAP表面表現或製備細胞溶胞物以便使用抗FAP抗體進行西方墨點法。與MOCK細胞相比，細胞表面上FAP之量

在所有表現SM蛋白質之細胞中均顯著增大，且在表現Sly1及Munc-18兩者之細胞中表現為最高。此等結果表明兩種SM蛋白質協同作用以為細胞-表面跨膜蛋白增強細胞之製造及運輸能力。

b)首先以編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(SEQ ID NO. 39)或兩種蛋白質一起之載體轉染人類HT1080或HEK293細胞。使細胞經受選擇壓力且挑選演示SM蛋白質之異源表現的細胞株。隨後，此等細胞株及平行HT1080或HEK293野生型細胞係以編碼FAP α 作為所關注之基因的載體轉染。在第二輪選擇之後，自所有穩定細胞池之培養物取得細胞且藉由FACS或西方墨點法來測定FAP之表現量。最高值係見於具有兩種SM蛋白質之細胞池，接著見於表現單獨之Sly1或Munc-18的彼等者，其仍表現與不表現任一SM蛋白質之親本細胞相比顯著更高之FAP水準。若使穩定轉染物適應於在懸浮液中生長且經受分批醱酵或進料分批醱酵，則可獲得類似結果。在此等情況之每一者中，兩種SM蛋白質一起之過度表現引起FAP表現顯著增多。此表明Sly1及Munc-18之異源表現引起跨膜蛋白之產量及細胞表面定位改良，藉以一旦異源引入組合之兩種蛋白質後，效應即為最高。

實例10：SM蛋白質之過度表現增大跨膜蛋白上皮生長因子受體(EGFR)之生物醫藥蛋白質產量。

(a)以空載體(MOCK對照物)或編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(SEQ ID NO. 39)或兩種蛋白質作為雙順反子表

現單元之表現構築體來轉染表現跨膜蛋白上皮生長因子受體(EGFR)之CHO細胞株(例如CHO-DG44)。接著使細胞經受選擇以獲得穩定細胞池。在四個後續繼代期間，自此等池之晶粒儲備培養物取得細胞，且藉由FACS或西方墨點法測定EGFR之表現量。與MOCK細胞相比，細胞表面上EGFR之量在所有表現SM蛋白質之細胞中均顯著增大，且在表現Sly1及Munc-18兩者之細胞中表現為最高。若使穩定轉染物經受分批醱酵或進料分批醱酵，則可獲得極類似結果。在此等情況之每一者中，Sly1或Munc-18之過度表現引起EGFR表現與對照物相比中等增加，而一旦Sly1與Munc-18同時過度表現後EGFR水準即顯著提高，表明兩種SM蛋白質協同作用以為細胞-表面跨膜蛋白以多種培養形式(包括串聯培養、生物反應器分批培養及進料分批培養)增強細胞之製造及運輸能力。

b)首先以編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(SEQ ID NO. 39)或兩種蛋白質一起之載體轉染CHO宿主細胞(CHO DG44)。使細胞經受選擇壓力且挑選演示SM蛋白質之異源表現的細胞株。隨後，此等細胞株及平行CHO DG 44野生型細胞係以編碼EGFR作為所關注之基因的載體轉染。在第二輪選擇之後，自六個連續繼代之所有穩定細胞池之晶粒儲備培養物取得細胞且藉由FACS或西方墨點法來測定EGFR之表現量。最高值係見於具有兩種SM蛋白質之細胞池，接著見於表現單獨之Sly1或Munc-18的彼等者，其仍表現與不表現任一SM蛋白質之CHO DG-44細胞相比顯著

更高之EGFR水準。若使穩定轉染物經受分批醱酵或進料分批醱酵，則可獲得類似結果。在此等情況之每一者中，兩種SM蛋白質一起之過度表現引起EGFR表現顯著增加。此表明 Sly1及Munc-18之異源表現引起跨膜蛋白之產量及細胞表面定位改良，藉以一旦異源引入組合之兩種蛋白質後，效應即為最高的。

實例 11：SM蛋白質之過度表現增大單核細胞化學引誘劑蛋白質1(MCP-1)之生物醫藥蛋白質產量。

(a)以空載體(MOCK對照物)或編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(SEQ ID NO. 39)或兩種蛋白質作為雙順反子表現單元之表現構築體來轉染分泌單核細胞化學引誘劑蛋白質1(MCP-1)之CHO細胞株(CHO DG44)。接著使細胞經受選擇以獲得穩定細胞池。在六個後續繼代期間，自所有穩定細胞池之晶粒儲備培養物取得上清液，藉由ELISA測定MCP-1力價且將其除以細胞之平均數目以計算比生產率。在所有表現任一SM蛋白質之細胞中，與MOCK或未經轉染之細胞相比，IgG表現均顯著增加，藉以最高值係見於同時表現兩種SM蛋白質之細胞池中。若使穩定轉染物經受分批醱酵或進料分批醱酵，則可獲得類似結果。在此等情況之每一者中，兩種SM蛋白質之過度表現引起MCP-1分泌增強，表明兩種SM蛋白質協同作用以多種培養形式(包括串聯培養、生物反應器分批培養及進料分批培養)改良細胞之蛋白質製造能力。

b)首先以編碼Sly1(SEQ ID NO. 41)或Munc-18(SEQ ID

NO. 39)或兩種蛋白質一起之載體轉染CHO宿主細胞(CHO DG44)。使細胞經受選擇壓力且挑選演示SM蛋白質之異源表現的細胞株。隨後，此等細胞株及平行CHO DG 44野生型細胞係以編碼單核細胞化學引誘劑蛋白質1(MCP-1)作為所關注之基因的載體轉染。在第二輪選擇之後，自所有歷經六個後續繼代之期間的穩定細胞池之晶粒儲備培養物取得上清液，藉由ELISA測定MCP-1力價且將其除以細胞之平均數目以計算比生產率。

最高值係見於具有兩種SM蛋白質之細胞池，接著見於表現單獨之Sly1或Munc-18的彼等者，其仍產生與不表現任一SM蛋白質之CHO DG-44細胞相比顯著更高之MCP-1力價。若使穩定轉染物經受分批醱酵或進料分批醱酵，則可獲得類似結果。在此等情況之每一者中，兩種SM蛋白質一起之過度表現引起MCP-1力價及比生產率均顯著提高。此表明單獨之Sly1或Munc-18之異源表現足以增強MCP-1分泌。然而，兩種蛋白質之異源表現以組合形式聯合地以協同方式在瞬間以及穩定轉染之細胞株中增強總體胞吐作用。

實例12：SM蛋白質增強自人類細胞之HRP分泌。

為解決SM蛋白質之過度表現是否亦可用以在非齧齒動物細胞、尤其人類細胞中增強分泌運輸之問題，吾人利用編碼所分泌辣根過氧化酶(ssHRP)之質體，其可用作構成性蛋白質分泌之報導物。

以編碼ssHRP之表現質體，與空載體(MOCK對照物)或編

碼 Sly1(SEQ ID NO. 41)、Munc18(SEQ ID NO. 39)或兩種蛋白質作為雙順反子表現單元之表現構築體來共轉染人類纖維肉瘤細胞株(HT1080, ATCC CCL-121)。轉染後24小時及48小時，自細胞培養物上清液取樣且分析過氧化酶活性。在量測之後，將細胞胰蛋白酶化且計數以測定細胞之比生產率。

在24小時之後，可在表現Munc18或Munc18與Sly1之細胞中偵測到與對照細胞相比ssHRP分泌之略微增強(圖9)。在轉染後48小時，與mock對照物相比，所有表現SM蛋白質之細胞均展示提高之ssHRP力價(圖9)。在自以Munc18轉染之細胞的試樣中量測到最高值，與對照試樣相比，其顯示HRP活性提高約1.4倍。與對照細胞相比，以Munc18或Sly1，或兩種SM蛋白質轉染之細胞的比生產率亦顯著提高(圖9)。

此證實兩種SM蛋白質均功能表現且增強自人類細胞之蛋白質分泌。

參考文獻清單

Ansel, H.C.及N.G. Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 第5版, Lea及Febiger (1990).

Carpp, L.N., Ciufo, L.F., Shanks, S.G., Boyd, A.及Bryant, N.J. The Sec1p/Munc18 protein Vps45p binds its cognate SNARE proteins via two distinct modes. J. Cell Biol. 173, 927-936 (2006).

- Carr, C.M., Grote, E., Munson, M., Hughson, F.M. 及 Novick, P. Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion. *J. Cell Biol.* 146, 333-344 (1999).
- D'Andrea-Merrins, M., Chang, L., Lam, A.D., Ernst, S.A. 及 Stuenkel, E.L. Munc18c interaction with Syntaxin 4 monomers and SNARE complex intermediates in GLUT4 vesicle trafficking. *J. Biol. Chem.* 282, 16553-16566 (2007).
- Dulubova, I. 等人 A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.* 18, 4372-4382 (1999).
- Dulubova, I. 等人 Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 2697-2702 (2007).
- Fallaux, F.J., Bout, A., Van Der Velde, I., Van Den Wollenberg, D.J.M., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., Van Ormondt, H., Van Der Eb, A.J., Valerio, D., Hoeben, R.C. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Human Gene Therapy*, 9 (13), 第 1909-1917 頁 (1998).
- Gallwitz, D. 及 Jahn, R. The riddle of the Sec1/Munc-18

- proteins - new twists added to their interactions with SNAREs. *Trends Biochem. Sci.* 28, 113-116 (2003).
- Hooker, A.D., Green, N.H., Baines, A.J., Bull, A.T., Jenkins, N., Strange, P.G. , 及 James, D.C.(1999). Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-gamma in Chinese hamster ovary and insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 559-572.
- Hu, S.H., Latham, C.F., Gee, C.L., James. D.E.及 Martin, J.L. Structure of the Munc18c/Syntaxin 4 N-peptide complex defines universal features of the N-peptide binding mode of Sec1/Munc18 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 8773-8778 (2007).
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H. , 及 Glimcher, L.H. (2003). The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev* 194, 29-38.
- Jahn, R., Lang, T.及 Sudhof, T.C. Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533 (2003).
- Kanda, H. 等人 Adipocyte from Munc18c-null mice show increased sensitivity to insulin-stimulated GLUT4 externalization. *J Clin Invest.* 115, 291-301 (2005).
- Kosodo, Y., Noda, Y., Adachi, H.及 Yoda, K. Binding of Sly1 to Sed5 enhances formation of the yeast early Golgi SNARE complex. *J. Cell Sci.* 115, 3683-3691

(2002).

Latham, C.F. 等人 Molecular dissection of the Munc18c/Syntaxin 4 interaction: implications for regulation of membrane trafficking. *Traffic* 7, 1408-1419 (2006).

Lee, A.H., Chu, G.C., Iwakoshi, N.N., 及 Glimcher, L.H. (2005). XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J.* 24, 4368-4380.

Li, Y., Gallwitz, D. 及 Peng, R. Structure-based functional analysis reveals a role for the SM protein Sly1p in retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 16, 3951-3962 (2005).

Misura, K.M., Scheller, R.H. 及 Weis, W.I. Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404, 355-362 (2000).

Peng, R. 及 Gallwitz, D. Multiple SNARE interactions of an SM protein: Sed5p/Sly1p binding is dispensable for transport. *EMBO J.* 23, 3939-3949 (2004).

Peng, R. 及 Gallwitz, D. Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. *J. Cell Biol.* 157, 645-655 (2002).

Riento, K., Kauppi, M., Keranen, S. 及 Olkkonen, V.M.

- Munc18-2, a functional partner of syntaxin 3, controls apical membrane trafficking in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 13476-13483 (2000).
- Scott, B.L. 等人 Sec1p directly stimulates SNARE-mediated membrane fusion in vitro. *J. Cell Biol.* 167, 75-85 (2004).
- Shen, J., Tareste, D.C., Paumet, F., Rothman, J.E. 及 Melia. T.J. Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins. *Cell* 128, 183-195 (2007).
- Stanley, P. Glycosylation mutants of animal cells. *Annu Rev Genet.* 18:525-52 (1984).
- Tellam, J.T. 等人 Characterization of Munc-18c and syntaxin-4 in 3T3-L1 adipocytes. Putative role in insulin-dependent movement of GLUT-4. *J. Biol. Chem.* 272, 6179-6186 (1997).
- Thurmond, D.C. 等人 Regulation of insulin-stimulated GLUT4 translocation by Munc18c in 3T3L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 33876-33883 (1998).
- Tigges, M. 及 Fussenegger, M. Xbp1-based engineering of secretory capacity enhances the productivity of Chinese hamster ovary cells. *Meta. Engineering.* 8, 264-272 (2006).
- Togneri, J., Cheng, Y.S., Munson, M., Hughson, F.M. 及 Carr, C.M. Specific SNARE complex binding mode of

- the Sec1/Munc-18 protein, Sec1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17730-17735 (2006).
- Toonen, R.F.及 Verhage, M. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* 13, 177-186 (2003).
- Urlaub, G., Kas, E., Carothers, A.M.,及 Chasin, L.A. (1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. *Cell* 33, 405-412.
- Urlaub, G., Mitchell, P.J., Kas, E., Chasin, L.A., Funanage, V.L., Myoda, T.T. , 及 Hamlin,J. (1986). Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions. *Somat. Cell Mol. Genet.* 12, 555-566.
- Verhage, M. 等人 Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869 (2000).
- Voets, T.等人 Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31, 581-591 (2001).
- Wu, M.N., Littleton, J.T., Bhat, M.A., Prokop, A.及 Bellen, H.J. ROP, the *Drosophila* Sec1 homolog, interacts with syntaxin and regulates neurotransmitter release in a dosage-dependent manner. *EMBO J.* 17, 127-139 (1998).
- Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L.C.Jr. , 及 Scheller,

R.H. nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A.
J. Cell Biol. 48, 247-252 (2000).

Zilly, F.E., Sorensen, J.B., Jahn, R.及 Lang, T. Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes. PLoS Biol. 4, e330 (2006).

【圖式簡單說明】

圖 1

Sly1及Munc18在HEK-293中之表現及定位。(a)及(b)將肌動蛋白用作內源對照物對sly1(a)及munc18(b)轉錄物進行基於RT-PCR之偵測。將1-Kb梯用作尺寸標準。(c)Munc18a/b/c之西方墨點(Western blot)。(d)展示Sly1及Munc18c在以YFP-Munc18c(pRP23)及CFP-突觸蛋白4(Stx4, pRP29)或YFP-Sly1(pRP32)及CFP-突觸蛋白5(Stx5, pRP40)之組轉染的HEK-293中之亞細胞定位的共焦顯微圖。箭頭表示Sly1與突觸蛋白5(上板)或Munc18c與突觸蛋白4(下板)之共定位(colocalization)。

圖 2

sly1及Munc18c之基於shRNA之敲除。(a)用作不同sly1特異性shRNA之sly1特異性敲除報導構築體之雙順反子sly1-/GFP-編碼之表現載體pRP3之示意圖。(b)以pRP3及不同shRNA-編碼之表現載體共轉染且培養48 h之CHO-K1的螢光顯微圖。(c)用作不同Munc18c特異性shRNA之Munc18c特異性敲除報導構築體之雙順反子Munc18c-/GFP-

編碼之表現載體 pRP4 之示意圖。(d) 以 pRP4 及不同 shRNA-編碼之表現載體共轉染且培養 48 h 之 HEK-293 的螢光顯微圖。

圖 3

sly1 及 munc18c 之基於 shRNA 之敲除降低總體胞吐作用。(a) 以靶向 sly1 之 shRNA 表現載體 (shRNA_{sly1}_1/2/3; pRP5-7) 轉染之 HEK-293 的 Sly1 特異性西方墨點。將親本載體 pmU6、對照物 shRNA 及 p27^{Kip1} 用作對照物。(b) 以 pSEAP2-對照物及不同 shRNA_{sly1} 表現載體共轉染 (48 h) 之 HEK-293 的 SEAP 表現概況。(c) 以靶向 munc18c 之 shRNA 表現載體 (shRNA_{munc18c}_1/2/3; pRP12, 14, 38, 39) 轉染之 HEK-293 的 Munc18c 特異性西方墨點。(d) 以 pSEAP2-對照物及不同 shRNA_{munc18} 表現載體共轉染之 HEK-293 的 SEAP 表現概況。

圖 4

Sly1 及 Munc18c 之異位表現轉錄後提高 CHO-K1 之蛋白質產量。(a-c) 以 SEAP (pSEAP1-對照物) (a)、SAMY (pSS158) (b) 或 VEGF₁₂₁ (pWW276) (c) 製造載體及 Sly1-(pRP24)、Munc18c-(pRP17) 及 Xbp-1 (pcDNA3.1-Xbp-1)-編碼表現載體 (之不同組合) 共轉染的 CHO-K1 之製造概況。(d) 在存在或不存在 SM 蛋白質表現之情況下，產物 mRNA 水準的基於定量 RT-PCR 之概況分析 (profiling)。

圖 5

Munc18c 與胞吐 SNARE 複合物之相互作用。在使用親和

性-純化、蛋白質A-瓊脂糖-偶合之抗Munc18c抗體使HEK-293溶胞物免疫沈澱之後，Munc18c、突觸蛋白4、SNAP-23及VAMP2/突觸泡蛋白2(SybII)之西方墨點分析。將未沈澱之蛋白質(上清液)以及Sly1用作對照物。

圖 6

基於SM蛋白質之分泌工程設計提高在CHO-K1衍生之細胞株中之異源蛋白質的產量。(a)培養48 h之為構成性Sly1及SEAP表現基因轉殖之穩定混合及純系CHO-K1衍生群體(CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃及CHO-Sly1_{混合})之SEAP產量。(b)以pSS158瞬時轉染之CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃及CHO-Sly1_{混合}之SAMY產量。(c)以p27^{Kip1}作為負載對照物(loading control)之CHO-K1、CHO-Sly1₁₆及CHO-Sly1₂₃之Sly1特異性西方墨點。(d)以p27^{Kip1}作為負載對照物之CHO-K1、CHO-Munc18c₈及CHO-Munc18c₉之Munc18c特異性西方墨點。(e)培養48 h之為構成性Munc18c及SEAP表現基因轉殖之穩定混合及純系CHO-K1衍生群體(CHO-Munc18c₈、CHO-Munc18c₉及CHO-Munc18c_{混合})之SEAP產量。(f)以pSS158瞬時轉染之CHO-Munc18c₈、CHO-Munc18c₉及CHO-Munc18c_{混合}之SAMY產量。(g)培養48 h之構成性表現Sly1及Munc18c(CHO-Sly1-Munc18c₁)、Sly1及Xbp-1(CHO-Sly1-Xbp1₄)及Sly1、Munc18c以及Xbp-1(CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇)之穩定細胞純系的SEAP產量概況。

圖 7

在分泌工程化 CHO-K1 衍生物中產生之利妥昔單抗的產量及糖基化概況分析。(a)不同分泌工程化 CHO-K1 衍生物之利妥昔單抗的比生產率。藉由基於 SM 蛋白質之代謝工程設計使得人類 IgG1 之分泌增加。(b、c)藉由非還原(b)及還原(c)SDS-PAGE 來分析自 CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇ 及 CHO-K1 細胞純化之利妥昔單抗。展示 IgG1 之標準蛋白質及重鏈及輕鏈(HC、LC)之分子量(KDa)。(d、e)在 CHO-K1 及分泌工程化 CHO-Sly1-Munc18c-Xbp-1₇ 中產生之利妥昔單抗的基於 MALDI-TOF 之糖基化概況分析。

圖 8

表現構築體之示意圖：

自分離之表現單元(a)或自一個雙順反子單元(b)編碼至少一種所關注之蛋白質(GOI)及一種 SM 蛋白質的載體。

包含自分離之表現卡匣(c)編碼，或以雙順反子而其中兩個基因經由一個 IRES 元件鍵聯(d)編碼兩種 SM 蛋白質的基因之表現載體。

編碼至少兩種 SM 蛋白質及一個所關注之基因(e)或自一個多順反子表現單元(f)編碼幾種 SM 蛋白質的表現載體。

圖 9

SM 蛋白質增強人類細胞之 HRP 分泌：

測量以所分泌之辣根過氧化酶(horseradish peroxidase, ssHRP)及空載體(Mock, 黑條)、Munc18c(灰條)、Sly1(陰影條)或編碼 Munc18c 及 Sly1 之雙順反子構築體(Munc-IRES-Sly, 條紋條)共轉染的人類 HT1080 細胞之上清液中

HRP 活性。相對於設定為 1.0 之 Mock 對照物，繪製在轉染後 24 h 及 48 h 測量之相對 ssHRP 力價以及比生產率之圖形。該等值對應於三份試樣之平均值，誤差條=SEM。

圖 10

SM 蛋白質在 IgG 生產細胞株中之過度表現提高比生產率及最終 IgG 力價。

(A) 穩定地表現空載體 (Mock) 或 Sly-1 (Sly1)、Munc-18c (Munc) 或兩種 SM 蛋白質 (Munc/Sly1) 之表現構築體之細胞的相對 IgG1 比生產率。自進料分批 (fed-batch) 製造過程期間之力價及活細胞計數計算生產率。該等條表示 $n=2$ (Mock) 至 $n=6$ 單株轉殖基因 IgG 生產細胞株之平均值，且相對於設定為 100% 之 Mock 細胞中之比生產率來描繪。

(B) 歷經 9 天進料分批醱酵過程穩定地表現所述構築體之穩定細胞群的 IgG 力價。

<110> 德國日靈佳般格翰製藥公司

<120> 基於SM-蛋白質之分泌工程

<130> P01-2308

<140> 097149850

<141> 2008-12-19

<150> 07150254.6; 08152829.1

<151> 2007-12-20; 2008-03-17

<160> 44

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP70

<400> 1

cgcggaatcca ccatggcggc ggcggcggca gcg

33

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP71

<400> 2

ccgctcgagc tacctttgtc caagttgtga caactg

36

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP69

<400> 3

cgcggaatcca ccatggcggc gccggtggca gagagg

36

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP66

<400> 4

ccctcgagc attcatcttt aattaaggag ac

32

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP29 5

<400> 5

cicagatctg cggcggcggc ggcagcg

27

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP30

<400> 6

accgtcgacc ttttgtccaa gtgtgacaa ctg

33

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP9

<400> 7

cgcgcggccg caccatggcg gcggcggcgg cagcg

35

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP10

<400> 8

ccgggatcct tacttttgtc caagtttga caactg

36

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP5

<400> 9

cccccgggat ggtgagcaag ggcgagg

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP6

<400> 10

tttctagatt acttgtacag ctctgtcc

27

<210> 11

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP15

<400> 11

cgcgcggccg caccatggcg ccgccggtgg cagagagg

38

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP16

<400> 12

ccggaiccct attcaccttt aattaaggag ac

32

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP127

<400> 13

cccaagcttt gcgcgacagg acccacgag

29

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP128

<400> 14

cgcgicgact tatccaacgg ttatggtgat gcc

33

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP136

<400> 15

ggaagatcta tcccgcgga acgctac

27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> ORP137

<400> 16

cccaagcttt caagcaagga agaccac

27

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> seap_正向

<400> 17

aggccccgga caggaa

16

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> seap_反向

<400> 18

gccgtccttg agcacatagc

20

<210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> samy_正向

<400> 19
 aaagctcaat atcttcaagc catic

25

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> samy_反向

<400> 20
 aacacgacat cggcgtacac t

21

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> vegf121_正向

<400> 21
 ctgtgtgtc tacctccacc at

22

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> vegf121_反向

<400> 22
 tgattctgcc ctctctcttc t

21

<210> 23
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP5-1_ shRNAslyl_1

<400> 23
 uuuggaagua aacuggaaga uuuuucaag agaaauaucu uccaauuacu uuuuuuu

57

<210> 24
 <211> 58
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP5-2_ shRNAslyl_1

<400> 24
 cuagaaaaag aaguaaacug gaagauuuu cucuugaaaa uaucuuccag uuuaucuc

58

<210> 25
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP6-1_ shRNAsly1_2

<400> 25
 uuuggcagug aaacuagaca agaaaaucaa gagauuucuu gucuaguuuc acugcuuuuu 60

<210> 26
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP6-2_ shRNAsly1_2

<400> 26
 cuagaaaaag cagugaaacu agacaagaaa ucucuugaau uucuugucua guuucacugc 60

<210> 27
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP7-1_ shRNAsly1_3

<400> 27
 uuuggggaggc aacuacauug aaauuuucaa gagaauauuc aauguaguug ccuccuuuuu 60

<210> 28
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP7-2_ shRNAsly1_3

<400> 28
 cuagaaaaag gaggcaacua cauugaauu ucucuugaaa uauucaaugu aguugccucc 60

<210> 29
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP12-1_shRNAmunc18c_1

<400> 29
 uuugcacaug aaucucaggu guauuuucaa gagauuaca ccugagaauuc auguguuuuu 60

<210> 30
 <211> 60
 <212> RNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> pRP12-2_shRNAmunc18c_1

<400> 30
 cuagaaaaac acaugaaucu cagguguaua ucucuugaau auacaccuga gauucaugug 60

<210> 31
 <211> 60
 <212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> pRP14-1_shRNAmunc18c_2

<400> 31

uuuggcuuga agacuacuac aagauuucaa gagaaucuug uaguagucuu caagcuuuuu 60

<210> 32

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> pRP14-2_shRNAmunc18c_2

<400> 32

cuagaaaaag cuugaagacu acuacaagau ucucuugaaa ucuuguagua gucuucaagc 60

<210> 33

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> pRP38-1_shRNAmunc18c_3

<400> 33

uuugcgccag aaaccagag cuaauuucaa gagaauuagc ucuggguuuc uggcguuuuu 60

<210> 34

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> pRP38-2_shRNAmunc18c_3

<400> 34

cuagaaaaac gccagaaacc cagagcuaau ucucuugaaa uuagcucugg guuucuggcg 60

<210> 35

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> pRP39-1_shRNAmunc18c_4

<400> 35

uuuggcugaa uaaaccaag gauaaaucaa gagauuaucc uuggguuuau ucagcuuuuu 60

<210> 36

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> pRP39-2_shRNAmunc18c_4

<400> 36

cuagaaaaag cugaauaaac ccaaggauaa ucucuugaau uauccuuggg uuuaucagc 60

<210> 37

<211> 60

<212> RNA

<213> 人工的

<220>

<223> pRP9-1_shRNAcontrol

<400> 37
uuugcacaag cuggaguaca acuacucaa gagaguagu guacuccagc uuguguuuuu 60

<210> 38
<211> 60
<212> RNA
<213> 人工的

<220>
<223> pRP9-1_shRNAcontrol

<400> 38
cuagaaaaac acaagcugga guacaacuac ucucuugaag uaguuguacu ccagcuugug 60

<210> 39
<211> 592
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Met Ala Pro Pro Val Ala Glu Arg Gly Leu Lys Ser Val Val Trp Gln
1 5 10 15

Lys Ile Lys Ala Thr Val Phe Asp Asp Cys Lys Lys Glu Gly Glu Trp
20 25 30

Lys Ile Met Leu Leu Asp Glu Phe Thr Thr Lys Leu Leu Ala Ser Cys
35 40 45

Cys Lys Met Thr Asp Leu Leu Glu Glu Gly Ile Thr Val Val Glu Asn
50 55 60

Ile Tyr Lys Asn Arg Glu Pro Val Arg Gln Met Lys Ala Leu Tyr Phe
65 70 75 80

Ile Thr Pro Thr Ser Lys Ser Val Asp Cys Phe Leu His Asp Phe Ala
85 90 95

Ser Lys Ser Glu Asn Lys Tyr Lys Ala Ala Tyr Ile Tyr Phe Thr Asp
100 105 110

Phe Cys Pro Asp Asn Leu Phe Asn Lys Ile Lys Ala Ser Cys Ser Lys
115 120 125

Ser Ile Arg Arg Cys Lys Glu Ile Asn Ile Ser Phe Ile Pro His Glu
130 135 140

Ser Gln Val Tyr Thr Leu Asp Val Pro Asp Ala Phe Tyr Tyr Cys Tyr
145 150 155 160

Ser Pro Asp Pro Gly Asn Ala Lys Gly Lys Asp Ala Ile Met Glu Thr
165 170 175

Met Ala Asp Gln Ile Val Thr Val Cys Ala Thr Leu Asp Glu Asn Pro
180 185 190

Gly Val Arg Tyr Lys Ser Lys Pro Leu Asp Asn Ala Ser Lys Leu Ala
195 200 205

Gln Leu Val Glu Lys Lys Leu Glu Asp Tyr Tyr Lys Ile Asp Glu Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ile Lys Gly Lys Thr His Ser Gln Leu Leu Ile Ile Asp Arg
 225 230 235 240
 Gly Phe Asp Pro Val Ser Thr Val Leu His Glu Leu Thr Phe Gln Ala
 245 250 255
 Met Ala Tyr Asp Leu Leu Pro Ile Glu Asn Asp Thr Tyr Lys Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Asp Gly Lys Glu Lys Glu Ala Ile Leu Glu Glu Glu Asp Asp Leu
 275 280 285
 Trp Val Arg Ile Arg His Arg His Ile Ala Val Val Leu Glu Glu Ile
 290 295 300
 Pro Lys Leu Met Lys Glu Ile Ser Ser Thr Lys Lys Ala Thr Glu Gly
 305 310 315 320
 Lys Thr Ser Leu Ser Ala Leu Thr Gln Leu Met Lys Lys Met Pro His
 325 330 335
 Phe Arg Lys Gln Ile Thr Lys Gln Val Val His Leu Asn Leu Ala Glu
 340 345 350
 Asp Cys Met Asn Lys Phe Lys Leu Asn Ile Glu Lys Leu Cys Lys Thr
 355 360 365
 Glu Gln Asp Leu Ala Leu Gly Thr Asp Ala Glu Gly Gln Lys Val Lys
 370 375 380
 Asp Ser Met Arg Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Asn Lys Asn His Asp
 385 390 395 400
 Asn Cys Asp Lys Ile Arg Ala Ile Leu Leu Tyr Ile Phe Ser Ile Asn
 405 410 415
 Gly Thr Thr Glu Glu Asn Leu Asp Arg Leu Ile Gln Asn Val Lys Ile
 420 425 430
 Glu Asn Glu Ser Asp Met Ile Arg Asn Trp Ser Tyr Leu Gly Val Pro
 435 440 445
 Ile Val Pro Gln Ser Gln Gln Gly Lys Pro Leu Arg Lys Asp Arg Ser
 450 455 460
 Ala Glu Glu Thr Phe Gln Leu Ser Arg Trp Thr Pro Phe Ile Lys Asp
 465 470 475 480
 Ile Met Glu Asp Ala Ile Asp Asn Arg Leu Asp Ser Lys Glu Trp Pro
 485 490 495
 Tyr Cys Ser Gln Cys Pro Ala Val Trp Asn Gly Ser Gly Ala Val Ser

500

505

510

Ala Arg Gln Lys Pro Arg Ala Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Lys Asn Gly
515 520 525

Ser Lys Leu Ile Val Phe Val Ile Gly Gly Ile Thr Tyr Ser Glu Val
530 535 540

Arg Cys Ala Tyr Glu Val Ser Gln Ala His Lys Ser Cys Glu Val Ile
545 550 555 560

Ile Gly Ser Thr His Val Leu Thr Pro Lys Lys Leu Leu Asp Asp Ile
565 570 575

Lys Met Leu Asn Lys Pro Lys Asp Lys Val Ser Leu Ile Lys Asp Glu
580 585 590

<210> 40
<211> 2522
<212> RNA
<213> 智人

<400> 40
acccaacgc cgcuucugcg gccaaaguag guugggagug gaagguggug gcugcugcuc 60
cgcagugucg ggaagauggc gccgccggug gcagagaggg ggcuaaagag cgucgugugg 120
cagaagauaa aagcaacagu guuugaugac ugcaagaaag aaggcgaaug gaagauaauug 180
cuuuuagaug aauuuaccac uaagcuuuug gcaucguguu gcaaaaugac agaucuucua 240
gaagaaggua uuacuguugu agagaauuuu uauaagaacc gugaaccugu cagacaaaug 300
aaagcucuuu auuucacac uccgacauca aagucuguag auuguuuuuu acaugauuuu 360
gcaaguaaaa cggagaacaa guauaaagca gcauauuuu acuuacuga cuuuugcccu 420
gauaaucucu uuaacaaaau uaaggcuucu ugcuccaagu caauaagaag auguaaagaa 480
auaaaauuu ccuucuuucc acaugaauu cagguguaua cucuugaugu accagaugca 540
uucuaauacu guuauagucc agaccuggu aaugcaaagg gaaaagaugc cauuauggaa 600
acaauggcug accagauagu uacagugugu gccaccuugg augaaaaucc cggaguaaga 660
uauaaaagua aaccucuaga uaaugccagu aagcuugcac agcuuguuga aaaaaagcuu 720
gaagacuacu acaagauuga ugaaaagagc cuaauaaagg guaaaacuca uucacagcuc 780
uuauaaauug aucguggcuu ugauccugug uccacugucc ugcaugaacu gaccuuucag 840
gcaauggcau augaucuacu accaaugag aaugauacau acaauauuaa aacagaugga 900
aaagaaaagg aggccauccu ugaagaagaa gaugaccucu ggguuagaau ugcacaucga 960
cauauugcgg uuuguuuga ggaaauuccc aagcuuuga aagaaauuuc aucaacaaag 1020
aaagcaacag aaggaaagac aucacuuagu gcucuuaacc agcugaugaa aaagaugccc 1080
cauuuccgaa aacagauuac uaagcaagu guccaucua acuuagcaga agauugcaug 1140
aauaaguuca agcuuaauu agaaaagcuc ugcaaaacug aacaggaccu ggcacuugga 1200
acugaugcag aaggacagaa ggugaagau uccaugcgag uacuccuucc aguucuauc 1260
aacaaaaauc augauaaauug ugauaaaaa agagcaauuc uacuuuauu cuucaguauu 1320
aauggaacua cggaagaaaa uuuggacagg ugauccaga auguaagau agaaaugag 1380

agugacauga uucguaacug gaguuaccuu gguguuccca uuguucccca aucucaacaa 1440
 ggcaaaccgu uaagaaagga ucggucugca gaagaaacuu uucagcucuc ucgguggaca 1500
 ccuuuuauca aagauuuau ggaggaugcu auugauaau gauuagauuc aaaagaauug 1560
 ccuuuuuuuu cccagugucc agcaguaugg aaugguucag gagcuguaag ugcucgccag 1620
 aaaccagag cuaauuuuuu agaagaccga aaaaauuggu caaagcugau uguuuuugua 1680
 auuggaggga ucacauacuc ugaagugcgu ugugcuuau aaguuuuca ggcacauaaa 1740
 uccugugaag uuauuuuug uucuacacau guuuuaacac caaaaagcu guuggaugau 1800
 auaaagauc ugaauaaacc caaggaauaa gucuccuua uaaaagauga auagcauuuc 1860
 uuuuuggagg guuuagagau ucuuacuaau auguugaacu aaaaauagaa gaaaauug 1920
 cugucaugua auuuuaacaa uguaaaaau uuauugaaau auggcuuuuc aaauacauuu 1980
 cuuaaggaac uguuuauau uauuacugga uuugucauu ugaauuuu aaauauugcu 2040
 gcugcuuugu agaugaugag aagaaauugu aaagugcuu cuaaaaggaa auuuuuucac 2100
 cuuuggagga gaauauaua gaguuguggg uauuuuuca cagccaccua uguacauacu 2160
 aaauaccuau uggauacuua uaucuaaaag ucucaugcug aaguauagu uuugggaaag 2220
 aaugauuuu auaaaagaga uuguaaaagu aaaaaacugu aauguauau guaugauaga 2280
 auuguuuccu cuaaguguag uuuuucuuuc aacuaaaau caguuuuangu guaaaaauu 2340
 ucagucuuu auagaaugg agugauuua caguguguac uguuuugcca cauacuucua 2400
 aagaacacaa uuuuauaua uuuugaauc auguanguu aaauuagaa accaaaauc 2460
 augaacauuc uaagagaaaa uaaauuaga auuuaaaaa uaaaaaaa aaaaaaaaa 2520
 aa 2522

<210> 41
 <211> 642
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 41

Met Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ser Ile Arg
1 5 10 15

Glu Arg Gln Thr Val Ala Leu Lys Arg Met Leu Asn Phe Asn Val Pro
20 25 30

His Ile Lys Asn Ser Thr Gly Glu Pro Val Trp Lys Val Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Arg Phe Gly Gln Asp Ile Ile Ser Pro Leu Leu Ser Val Lys Glu
50 55 60

Leu Arg Asp Met Gly Ile Thr Leu His Leu Leu His Ser Asp Arg
65 70 75 80

Asp Pro Ile Pro Asp Val Pro Ala Val Tyr Phe Val Met Pro Thr Glu
85 90 95

Glu Asn Ile Asp Arg Met Cys Gln Asp Leu Arg Asn Gln Leu Tyr Glu
100 105 110

Ser Tyr Tyr Leu Asn Phe Ile Ser Ala Ile Ser Arg Ser Lys Leu Glu
 115 120 125
 Asp Ile Ala Asn Ala Ala Leu Ala Ala Ser Ala Val Thr Gln Val Ala
 130 135 140
 Lys Val Phe Asp Gln Tyr Leu Asn Phe Ile Thr Leu Glu Asp Asp Met
 145 150 155 160
 Phe Val Leu Cys Asn Gln Asn Lys Glu Leu Val Ser Tyr Arg Ala Ile
 165 170 175
 Asn Arg Pro Asp Ile Thr Asp Thr Glu Met Glu Thr Val Met Asp Thr
 180 185 190
 Ile Val Asp Ser Leu Phe Cys Phe Phe Val Thr Leu Gly Ala Val Pro
 195 200 205
 Ile Ile Arg Cys Ser Arg Gly Thr Ala Ala Glu Met Val Ala Val Lys
 210 215 220
 Leu Asp Lys Lys Leu Arg Glu Asn Leu Arg Asp Ala Arg Asn Ser Leu
 225 230 235 240
 Phe Thr Gly Asp Thr Leu Gly Ala Gly Gln Phe Ser Phe Gln Arg Pro
 245 250 255
 Leu Leu Val Leu Val Asp Arg Asn Ile Asp Leu Ala Thr Pro Leu His
 260 265 270
 His Thr Trp Thr Tyr Gln Ala Leu Val His Asp Val Leu Asp Phe His
 275 280 285
 Leu Asn Arg Val Asn Leu Glu Glu Ser Ser Gly Val Glu Asn Ser Pro
 290 295 300
 Ala Gly Ala Arg Pro Lys Arg Lys Asn Lys Lys Ser Tyr Asp Leu Thr
 305 310 315 320
 Pro Val Asp Lys Phe Trp Gln Lys His Lys Gly Ser Pro Phe Pro Glu
 325 330 335
 Val Ala Glu Ser Val Gln Gln Glu Leu Glu Ser Tyr Arg Ala Gln Glu
 340 345 350
 Asp Glu Val Lys Arg Leu Lys Ser Ile Met Gly Leu Glu Gly Glu Asp
 355 360 365
 Glu Gly Ala Ile Ser Met Leu Ser Asp Asn Thr Ala Lys Leu Thr Ser
 370 375 380
 Ala Val Ser Ser Leu Pro Glu Leu Leu Glu Lys Lys Arg Leu Ile Asp
 385 390 395 400
 Leu His Thr Asn Val Ala Thr Ala Val Leu Glu His Ile Lys Ala Arg
 405 410 415

Lys Leu Asp Val Tyr Phe Glu Tyr Glu Glu Lys Ile Met Ser Lys Thr
420 425 430

Thr Leu Asp Lys Ser Leu Leu Asp Ile Ile Ser Asp Pro Asp Ala Gly
435 440 445

Thr Pro Glu Asp Lys Met Arg Leu Phe Leu Ile Tyr Tyr Ile Ser Thr
450 455 460

Gln Gln Ala Pro Ser Glu Ala Asp Leu Glu Gln Tyr Lys Lys Ala Leu
465 470 475 480

Thr Asp Ala Gly Cys Asn Leu Asn Pro Leu Gln Tyr Ile Lys Gln Trp
485 490 495

Lys Ala Phe Thr Lys Met Ala Ser Ala Pro Ala Ser Tyr Gly Ser Thr
500 505 510

Thr Thr Lys Pro Met Gly Leu Leu Ser Arg Val Met Asn Thr Gly Ser
515 520 525

Gln Phe Val Met Glu Gly Val Lys Asn Leu Val Leu Lys Gln Gln Asn
530 535 540

Leu Pro Val Thr Arg Ile Leu Asp Asn Leu Met Glu Met Lys Ser Asn
545 550 555 560

Pro Glu Thr Asp Asp Tyr Arg Tyr Phe Asp Pro Lys Met Leu Arg Gly
565 570 575

Asn Asp Ser Ser Val Pro Arg Asn Lys Asn Pro Phe Gln Glu Ala Ile
580 585 590

Val Phe Val Val Gly Gly Gly Asn Tyr Ile Glu Tyr Gln Asn Leu Val
595 600 605

Asp Tyr Ile Lys Gly Lys Gln Gly Lys His Ile Leu Tyr Gly Cys Ser
610 615 620

Glu Leu Phe Asn Ala Thr Gln Phe Ile Lys Gln Leu Ser Gln Leu Gly
625 630 635 640

Gln Lys

<210> 42
<211> 2172
<212> RNA
<213> 智人

<400> 42
gggcaguggc ucgugggagc caagauggcg gcggcggcgg cagcgacagc agcagcagca 60
gccagauuuc gggaaaggca gacaguggcu uugaagcgua uguugaauuu caaugugccu 120
cauauuaaaa acagcacagg agaaccagua uggaagguac ucauuuanga cagaauuggc 180
caagauauaa ucucuccucu gcuaucugug aaggagcuaa gagacauggg aaucacucug 240

caucugcuuu uacacucuga ucgagauccu auuccagaug uuccugcagu auacuuugua	300
augccaacug aagaaaaauu ugacagaaug ugccaggauu uucgaaaaua acuaauaugaa	360
ucauauuuuu uaaaauuuuu uucugcuauu ucaagaagua aacuggaaga uauugcaauu	420
gcagcguuag cagcuagugc aguaacacaa guagccaagg uuuuugacca auaucucaau	480
uuuauuacuu uggaagauga uauguuugua uuauuaaauc aaaaauagga gcuuguuua	540
uauugugcca uuaacaggcc agauaucaca gacacggaaa uggaacugcu uauugacacu	600
auaguugaca gccucuucug cuuuuuuguu acucugggug cuguuccuau aaucagaugu	660
ucaagaggaa cagcagcaga aaugguagca gugaaacuag acaagaaacu ucgagaaaau	720
cuaagagaug caagaaacag ucuuuuuaca ggugauacac uuggagcugg ccaauucagc	780
uuccagaggc ccuuuuuagu ccuuguugac agaaaacauag auuuggcaac uccuuuacau	840
cauacuugga cauaucaagc auugugucac gauguacugg auuuccauuu aaacaggguu	900
aaauuggaag aaucucagag aguggaaaac ucuccagcug gugcuagacc aaagagaaaa	960
aacaagaagu cuuauuauuu aacuccgguu guaaaauuu ggcaaaaaca uaaaggaagu	1020
ccauucccag aaguugcaga aucaguucag caagaacuag aaucuuacag agcacaggaa	1080
gaugagguca aacgacuuaa aagcauuuug ggacuagaag gggaagauga aggagccaua	1140
aguaugcuuu cugacaauac cgcuaagcua acaucagcug uuaguucuuu gccagaacuc	1200
cuugagaaaa aaagacuua ugaucuccau acaauugug ccacugcugu uuuaagaacu	1260
auaaaggcaa gaaaauugga uguauuuuu gaauugaag aaaaaauau gagcaaaacu	1320
acucuggaua aaucucuucu agauuaaua ucagaccugc augcaggaac uccagaagau	1380
aaaauagggu uguuucuuu cuauuuaua agcacacagc aagcaccuuc ugaggcugau	1440
uuggagcaau auaaaaaagc uuuaacugau gcaggauuca accuuauucc uuuaacauu	1500
aucaaacagu ggaaggcuuu uaccaagau gccucagcuc cggccagcua uggcagcacu	1560
accacuaaac caaugggucu uuuaucacga gucaugaaua caggauacac guuugugaug	1620
gaaggaguga agaaccuggu uuugaaacag caaaucucac cuguuacucg uauuuuggac	1680
aaucuuuugc agaugaaguc aaaccccgaa acugaugacu auagaauuuu ugaucccaa	1740
augcugcggg gcaaugacag cucaguuccc agaaaauaaa auccauucca agaggccauu	1800
guuuuugugg ugaggaggagg caacuacau gaauaucaga aucuuguuga cuacauaaag	1860
gggaaacaag gcaaacacau uuuaauugc ugcagugagc uuuuuuauuc uacacaguuc	1920
auaaaacagu ugucacaacu uggacaaaag uaacacagaa gaaccuuacu augauaauc	1980
acuuggaauug uggauaaaug uaaaaagaag aaaaguuaga agagcaauu guuuccuuc	2040
cuguuacagu guccuaacag ugaaaaucag aguuuuuuu uaaaauuuaa ggaaauuaa	2100
uacuuauau guauugauua aaagaaacau uucagaaaua aaaaaucaac auuguuaaaa	2160
aaaaaaaaaa aa	2172

<210> 43
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 43

Met Val Val Val Ala Ala Ala Pro Asn Pro Ala Asp Gly Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Leu Ser Gly Gln Pro Ala Ser Ala Ala Gly Ala Pro Ala
 20 25 30
 Gly Gln Ala Leu Pro Leu Met Val Pro Ala Gln Arg Gly Ala Ser Pro
 35 40 45
 Glu Ala Ala Ser Gly Gly Leu Pro Gln Ala Arg Lys Arg Gln Arg Leu
 50 55 60
 Thr His Leu Ser Pro Glu Glu Lys Ala Leu Arg Arg Lys Leu Lys Asn
 65 70 75 80
 Arg Val Ala Ala Gln Thr Ala Arg Asp Arg Lys Lys Ala Arg Met Ser
 85 90 95
 Glu Leu Glu Gln Gln Val Val Asp Leu Glu Glu Glu Asn Gln Lys Leu
 100 105 110
 Leu Leu Glu Asn Gln Leu Leu Arg Glu Lys Thr His Gly Leu Val Val
 115 120 125
 Glu Asn Gln Glu Leu Arg Gln Arg Leu Gly Met Asp Ala Leu Val Ala
 130 135 140
 Glu Glu Glu Ala Glu Ala Lys Gly Asn Glu Val Arg Pro Val Ala Gly
 145 150 155 160
 Ser Ala Glu Ser Ala Ala Gly Ala Gly Pro Val Val Thr Pro Pro Glu
 165 170 175
 His Leu Pro Met Asp Ser Gly Gly Ile Asp Ser Ser Asp Ser Glu Ser
 180 185 190
 Asp Ile Leu Leu Gly Ile Leu Asp Asn Leu Asp Pro Val Met Phe Phe
 195 200 205
 Lys Cys Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Val
 210 215 220
 Tyr Pro Glu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Gly Thr Ser Ser Ala Lys Leu Glu Ala Ile Asn Glu Leu Ile Arg Phe
 245 250 255
 Asp His Ile Tyr Thr Lys Pro Leu Val Leu Glu Ile Pro Ser Glu Thr
 260 265 270
 Glu Ser Gln Ala Asn Val Val Val Lys Ile Glu Glu Ala Pro Leu Ser
 275 280 285
 Pro Ser Glu Asn Asp His Pro Glu Phe Ile Val Ser Val Lys Glu Glu
 290 295 300

Pro Val Glu Asp Asp Leu Val Pro Glu Leu Gly Ile Ser Asn Leu Leu
305 310 315 320

Ser Ser Ser His Cys Pro Lys Pro Ser Ser Cys Leu Leu Asp Ala Tyr
325 330 335

Ser Asp Cys Gly Tyr Gly Gly Ser Leu Ser Pro Phe Ser Asp Met Ser
340 345 350

Ser Leu Leu Gly Val Asn His Ser Trp Glu Asp Thr Phe Ala Asn Glu
355 360 365

Leu Phe Pro Gln Leu Ile Ser Val
370 375

<210> 44
<211> 1131
<212> RNA
<213> 智人

<400> 44
augguggugg uggcagccgc gccgaacccg gccgacggga ccccuaaagu ucugcuucug 60
ucggggcagc ccgccuccgc cggcgagacc ccggccggcc agggccugcc gcucauggug 120
ccagcccaga gaggggcccag cccggaggca gcgagcgggg ggcuccccca ggcgcgcaag 180
cgacacgcc ucacgcaccu gagccccgag gagaaggcgc ugaggaggaa acugaaaaac 240
agaguagcag cucagacugc cagagaucga aagaaggcuc gaaugaguga gcuggaacag 300
caagugguag auuuagaaga agagaaccaa aaacuuuugc uagaaaauca gcuuuuacga 360
gagaaaaacuc auggccuugu aguugagaac caggaguuaa gacagcgcuu ggggauggau 420
gcccugguug cugaagagga ggcggaagcc aaggggaaug aagugaggcc aguggccggg 480
ucugcugagu ccgacgaggc ugacggccca guugucacc cuccagaaca ucuccccaug 540
gauucuggcg guauugacuc uucagauuca gagucugaua uccuguuggg cauucuggac 600
aacuuggacc cagucauguu cuucaaaucc cuuuccccag agccugccag ccuggaggag 660
cucccagagg ucuaccaga aggacccagu uccuuaccag ccucccuuc ucugucagug 720
gggacgucan cagccaagcu ggaagccauu aaugaacuaa uucguuuuga ccacauauau 780
accaagcccc uagucuuaga gauaccucuc gagacagaga gccaaacuaa ugugguagug 840
aaaaucgagg aagcaccuc cagccccuca gagaauauc acccugaauu cauugucua 900
gugaaggaag aaccuguaga agauggacc guuccggagc uggguaucuc aaucugcuu 960
ucauccagcc acugcccaaa gccaucuucc ugccuacugg augcuuacag ugacugugga 1020
uacggggguu cccuuuccc auucagugac auguccucuc ugcuuuggu aaaccauuc 1080
ugggaggaca cuuuugccaa ugaacucuuu cccagcuga uuagugucua a 1131

五、中文發明摘要：

本發明係關於細胞培養技術之領域。其描述一種藉由異源表現Munc18c、Sly1或SM蛋白質家族之其他成員來增強蛋白質在真核生物細胞中分泌運輸的新穎方法。此方法尤其適用於產生具有增強之製造能力之最優化宿主細胞系統以表現及製造重組蛋白質產物。

六、英文發明摘要：

The present invention concerns the field of cell culture technology. It describes a novel method for enhancing the secretory transport of proteins in eukaryotic cells by heterologous expression of Munc18c, Sly1 or other members of the SM protein family. This method is particularly useful for the generation of optimized host cell systems with enhanced production capacity for the expression and manufacture of recombinant protein products.

十、申請專利範圍：

1. 一種在細胞中產生所關注之異源蛋白質的方法，其包含：
 - a) 增加至少一種編碼來自 SEC1/Munc18 群蛋白質 (SM 蛋白質) 之蛋白質的基因之表現，及
 - b) 實現該所關注之異源蛋白質的表現。
2. 如請求項 1 之方法，其中在步驟 b) 中該所關注之異源蛋白質的表現增加，較佳在步驟 b) 中該所關注之異源蛋白質的分泌增加。
3. 如請求項 1 或 2 之方法，其中步驟 a) 中之一個基因編碼三種 Munc18 同功異型物 (isoforms)：Munc18a、b 或 c 之一，較佳為 Munc18c (SEQ ID NO: 39)。
4. 如請求項 1 或 2 之方法，其中步驟 a) 中之一個基因編碼 Sly-1 (SEQ ID NO: 41)。
5. 如請求項 1 或 2 之方法，其中步驟 a) 包含增加至少兩個編碼 SM-蛋白質之基因的表現，其中該等 SM 蛋白質係涉及小泡運輸之兩個不同步驟。
6. 如請求項 5 之方法，其中：
 - a) 一個基因編碼一種調節小泡與細胞膜融合的 SM 蛋白質，
 - b) 第二基因編碼一種調節小泡與高爾基複合體融合的 SM 蛋白質。
7. 如請求項 5 之方法，其中 Munc18c (SEQ ID NO: 39) 及 Sly-1 (SEQ ID NO: 41) 之表現增加。

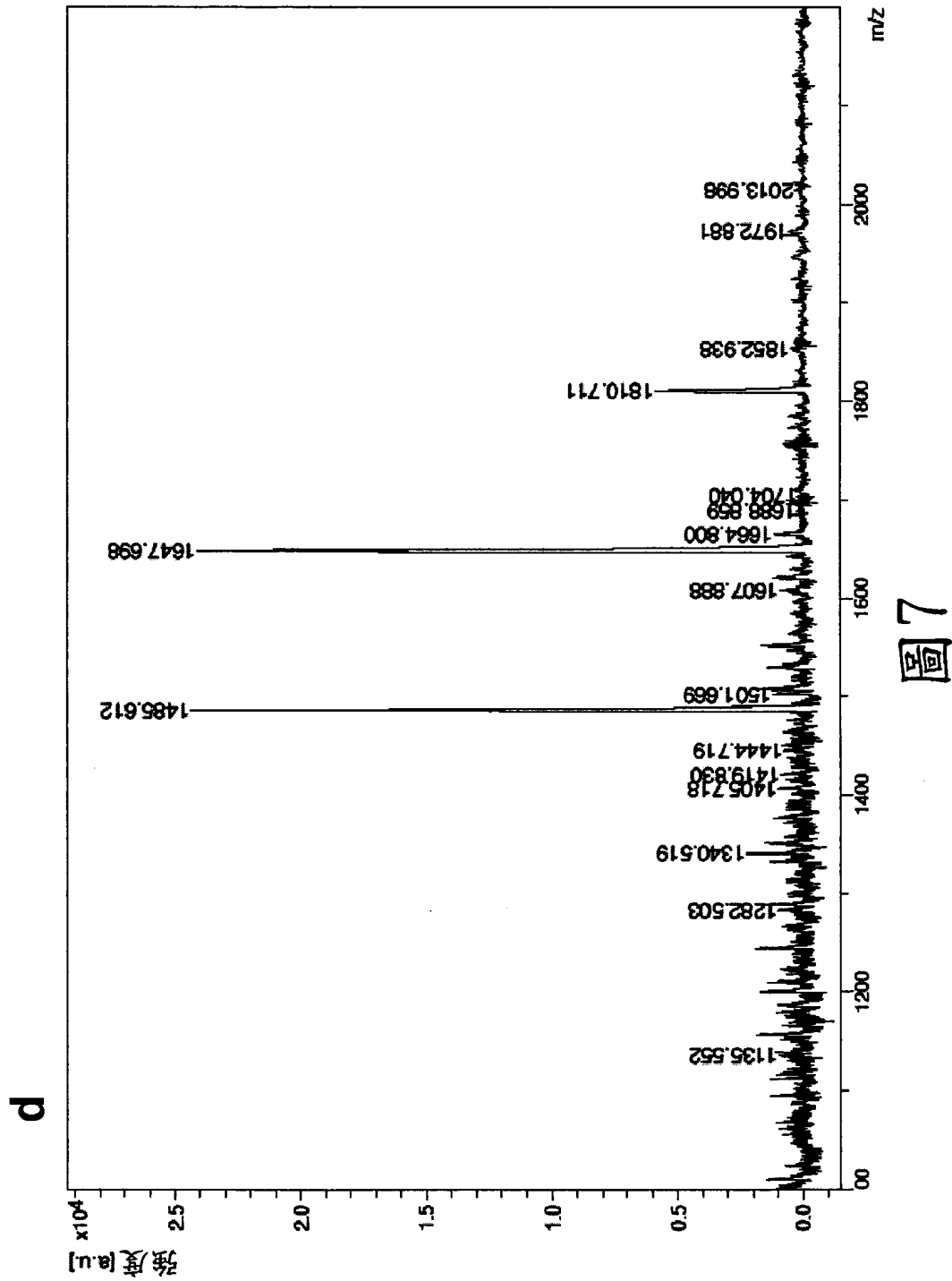
8. 如請求項1或2之方法，其中步驟a)包含：
 - i)增加編碼該SM蛋白質家族之一個成員的第一基因之表現，
 - ii)增加編碼該SM蛋白質家族之另一成員的第二基因之表現，及
 - iii)增加編碼XBP-1之第三基因的表現。
9. 如請求項8之方法，其中Munc18c(SEQ ID NO: 39)、Sly-1(SEQ ID NO: 41)及XBP-1(SEQ ID NO: 43)之表現增加。
10. 一種細胞工程化之方法，其包含：
 - a)將一或多種包含編碼至少兩種多肽之核酸序列的載體系統引入細胞中，其中
 - i)至少一種第一核酸序列編碼SM-蛋白質，及
 - ii)第二核酸序列編碼所關注之蛋白質，
 - b)表現該所關注之蛋白質及該至少一種SM-蛋白質。
11. 如請求項10之方法，其中該SM-蛋白質為Munc-18同功異型物之一，較佳為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)，或Sly-1(SEQ ID NO: 41)。
12. 如請求項10之方法，其中在步驟a)i)中組合使用兩種SM-蛋白質，其中該等SM蛋白質涉及小泡運輸之兩個不同步驟。
13. 如請求項12之方法，其中：
 - a)一個基因編碼一種調節小泡與細胞膜融合的SM蛋白質，

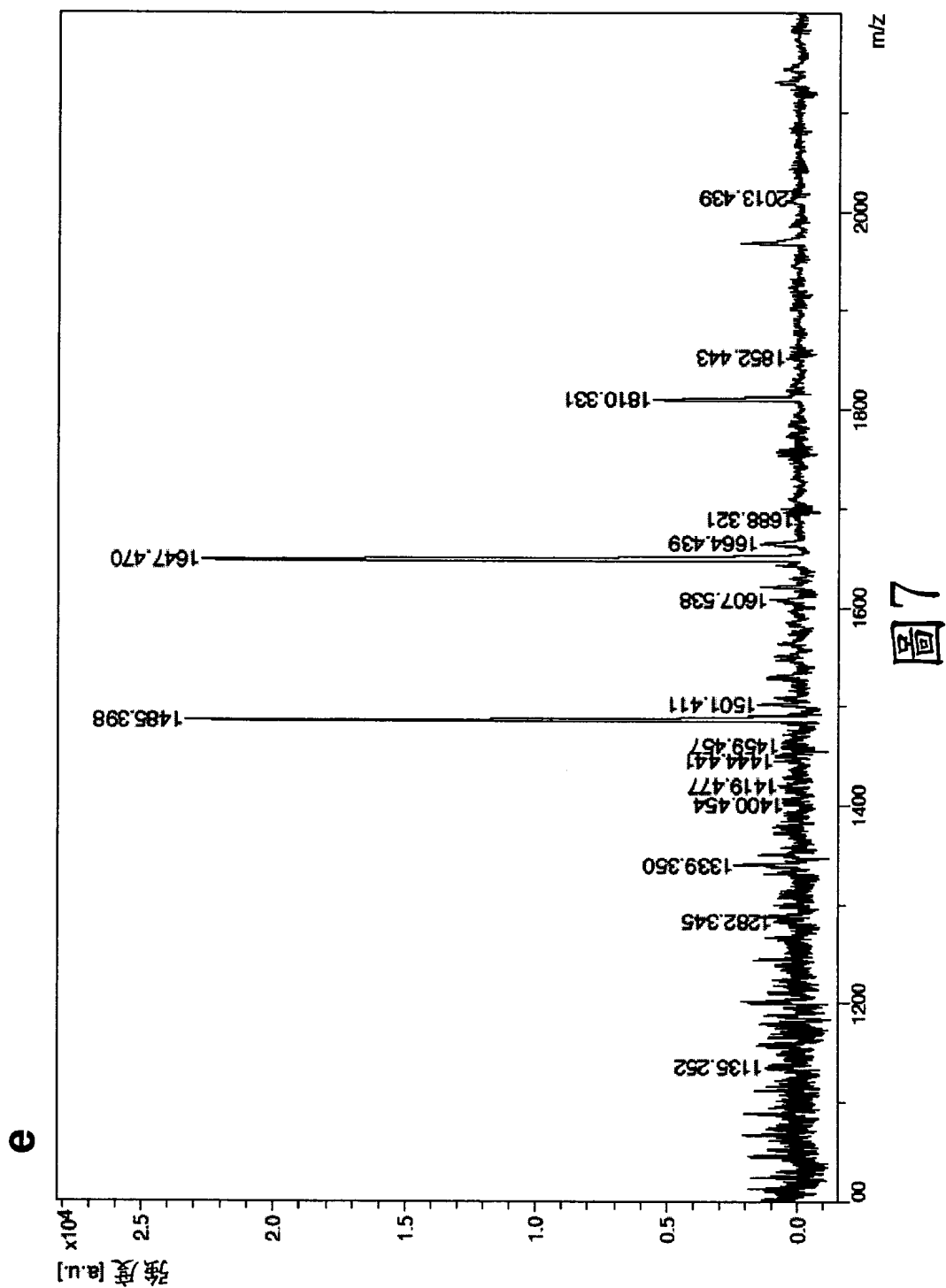
- b)第二基因編碼一種調節小泡與高爾基複合體融合的SM蛋白質。
14. 如請求項13之方法，其中組合使用之該兩種SM-蛋白質為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)及Sly-1(SEQ ID NO: 41)。
15. 如請求項10或12之方法，其中在步驟a)i)中兩種SM-蛋白質與XBP-1組合使用。
16. 如請求項15之方法，其中該等SM蛋白質為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)及Sly-1(SEQ ID NO: 41)與XBP-1(SEQ ID NO: 43)組合。
17. 如請求項1、2及10至14中任一項之方法，其中該細胞為真核生物細胞，較佳為脊椎動物細胞，最佳為哺乳動物細胞。
18. 如請求項1、2及10至14中任一項之方法，其中該所關注之蛋白質為治療用蛋白質。
19. 如請求項18之方法，其中該所關注之蛋白質為抗體或抗體片段。
20. 一種表現載體，其包含編碼至少兩種多肽之表現單元，其中
- a)至少一種多肽為SM-蛋白質，及
- b)第二多肽為所關注之蛋白質。
21. 如請求項20之表現載體，其中該所關注之蛋白質為治療用蛋白質，較佳為抗體或抗體片段。
22. 如請求項20或21之表現載體，其中該等表現單元為多順反子，較佳為雙順反子。

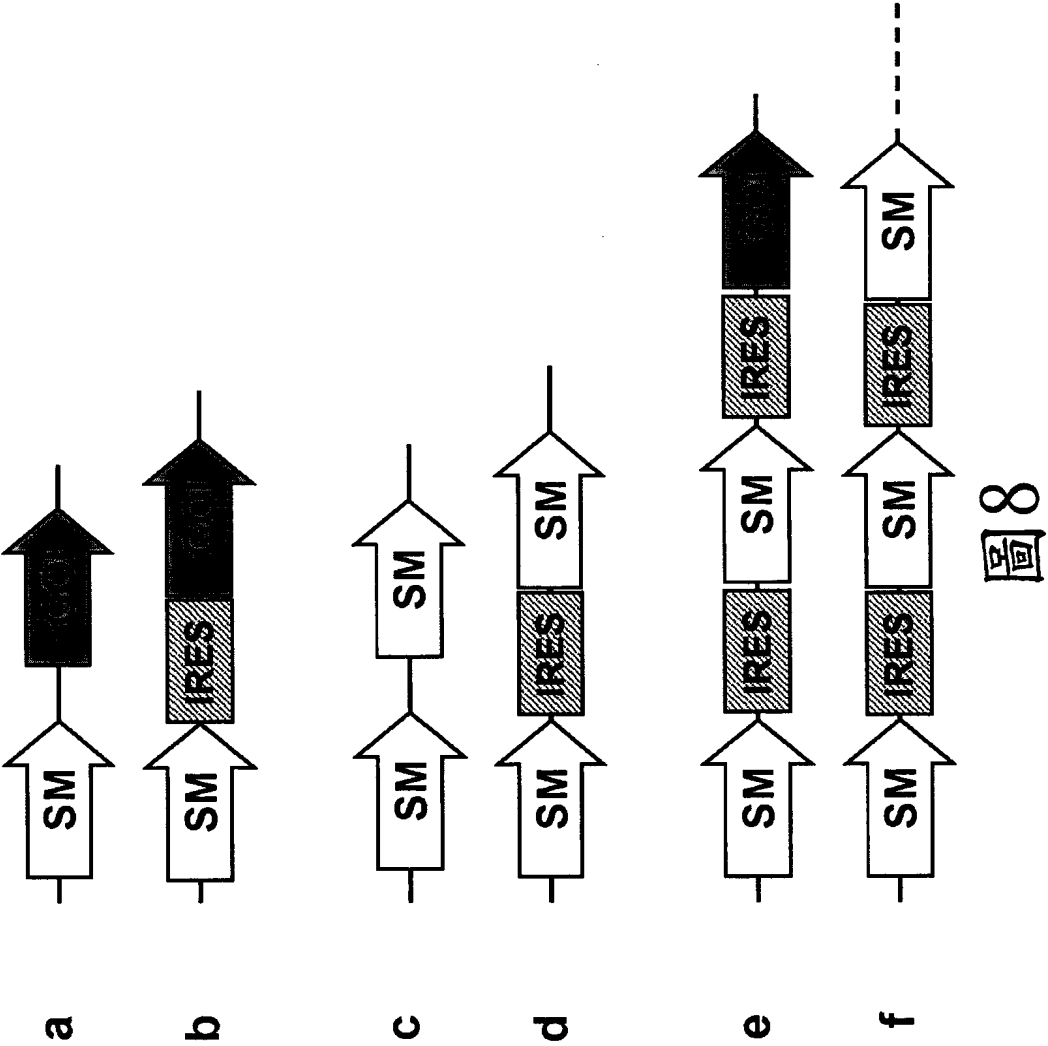
23. 如請求項20或21之表現載體，其中該SM-蛋白質為Munc-18同功異型物：Munc-18 a、b、c之一，較佳為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)。
24. 如請求項20或21之表現載體，其中該SM-蛋白質為Sly-1(SEQ ID NO: 41)。
25. 如請求項20或21之表現載體，其中組合使用至少兩種SM-蛋白質。
26. 如請求項25之表現載體，其中該載體包含至少一個配置如下之雙順反子表現單元：
 - a)一個編碼SM蛋白質之基因，
 - b)一個IRES元件及
 - c)編碼SM蛋白質之第二基因。
27. 如請求項20或21之表現載體，其中至少兩種SM-蛋白質與XBP-1組合使用，較佳為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)及Sly-1(SEQ ID NO: 41)與XBP-1(SEQ ID NO: 43)組合。
28. 一種細胞，其表現至少兩種異源基因：
 - a)至少一種編碼SM-蛋白質之基因，及
 - b)另一編碼所關注之蛋白質的基因。
29. 如請求項28之細胞，其中該所關注之蛋白質為治療用蛋白質，較佳為抗體或抗體片段。
30. 如請求項28或29之細胞，其中該SM蛋白質之表現量顯著高於內源量，較佳10%。
31. 如請求項28或29之細胞，其包含如請求項20至27中任一項之表現載體。

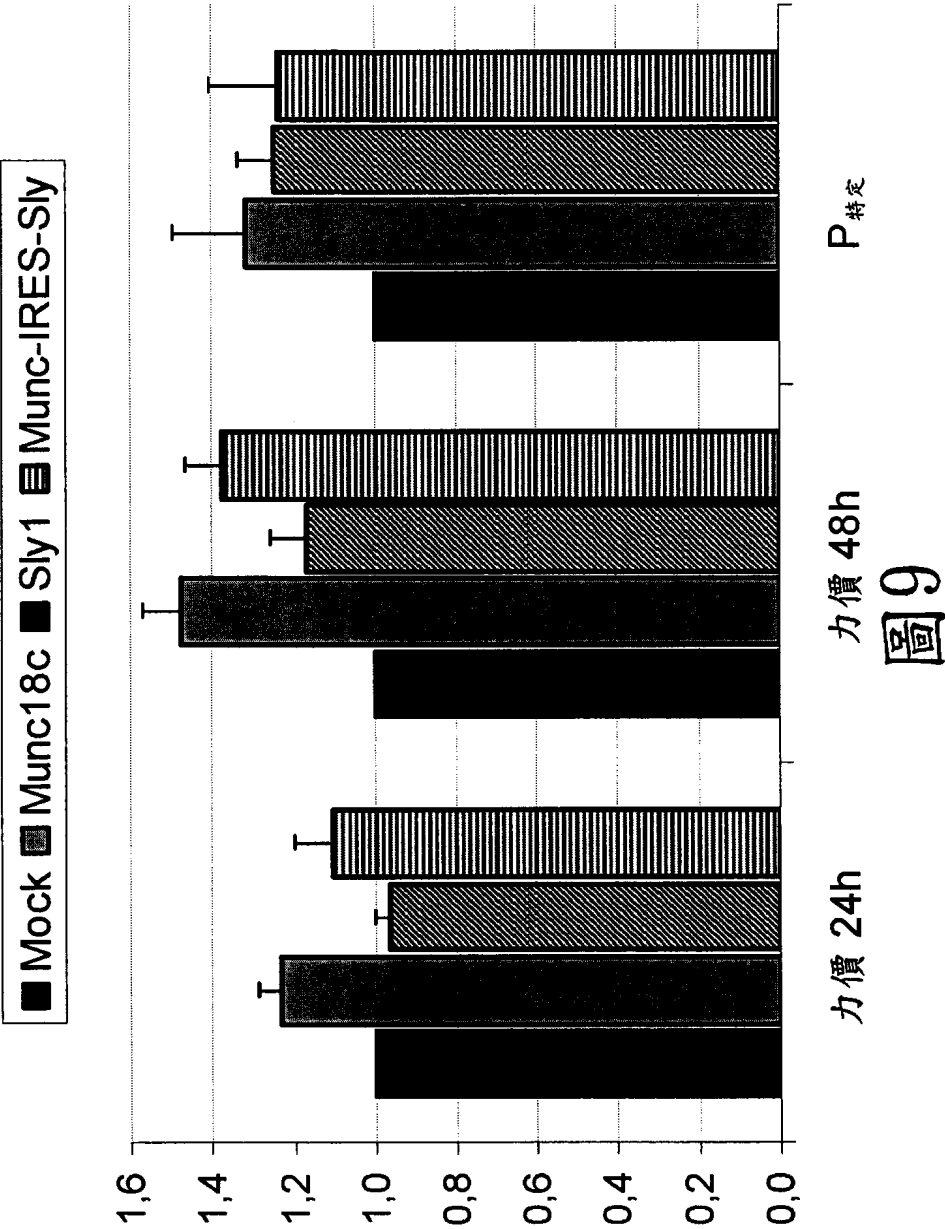
32. 如請求項28或29之細胞，其中該細胞為真核生物細胞，較佳為脊椎動物細胞，最佳為哺乳動物細胞。
33. 如請求項32之細胞，其中該細胞為CHO細胞，較佳為CHO DG44細胞。
34. 一種所關注之蛋白質，其較佳為藉由如請求項1至19中任一項之方法所產生之抗體。
35. 一種醫藥組合物，其包含一種適用於阻斷或降低一或多種SM-蛋白質之活性或表現的化合物，及醫藥學上可接受之載劑。
36. 如請求項35之醫藥組合物，其中該化合物為聚核苷酸序列。
37. 如請求項36之醫藥組合物，其中該聚核苷酸序列為shRNA、RNAi、siRNA或反義-RNA，較佳為shRNA。
38. 如請求項35至37中任一項之醫藥組合物，其中該SM-蛋白質為Munc-18c(SEQ ID NO: 39)或Sly-1(SEQ ID NO: 41)或該兩者之組合。
39. 一種識別SM-蛋白質功能調節劑的方法，其包含：
 - a)提供至少一種SM-蛋白質，較佳為Munc-18c，
 - b)使步驟a)之該SM-蛋白質與測試劑接觸，
 - c)測定增加或減少蛋白質分泌或細胞表面蛋白質之表現相關之影響。
40. 一種如請求項35至38中任一項之醫藥組合物的用途，其係用於製造治療有此需要之患者的癌症、自體免疫疾病及炎症之藥物。

41. 一種如請求項35至38中任一項之醫藥組合物的用途，其係用於製造抑制或降低細胞之增殖或遷移的藥物。
42. 一種SM-蛋白質或編碼SM-蛋白質之聚核苷酸在活體外細胞或組織培養系統中增加所關注之蛋白質之分泌及/或產生的用途。
43. 如請求項1、2及10至14中任一項之方法，其用於診斷。
44. 如請求項20或21之表現載體，其用於診斷。
45. 如請求項28或29之細胞，其用於診斷。
46. 如請求項35至37中任一項之醫藥組合物，其用於診斷。









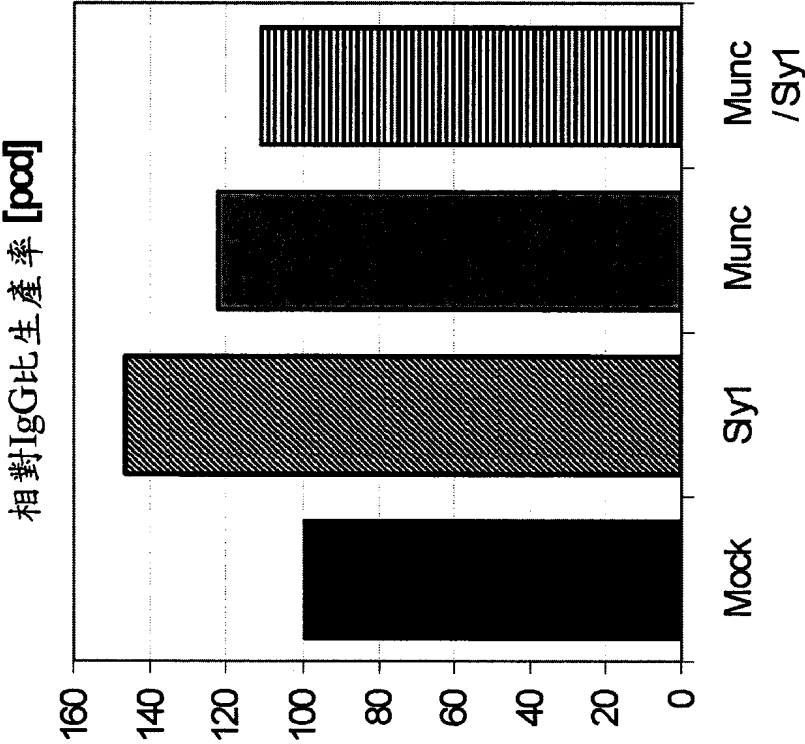


圖10A

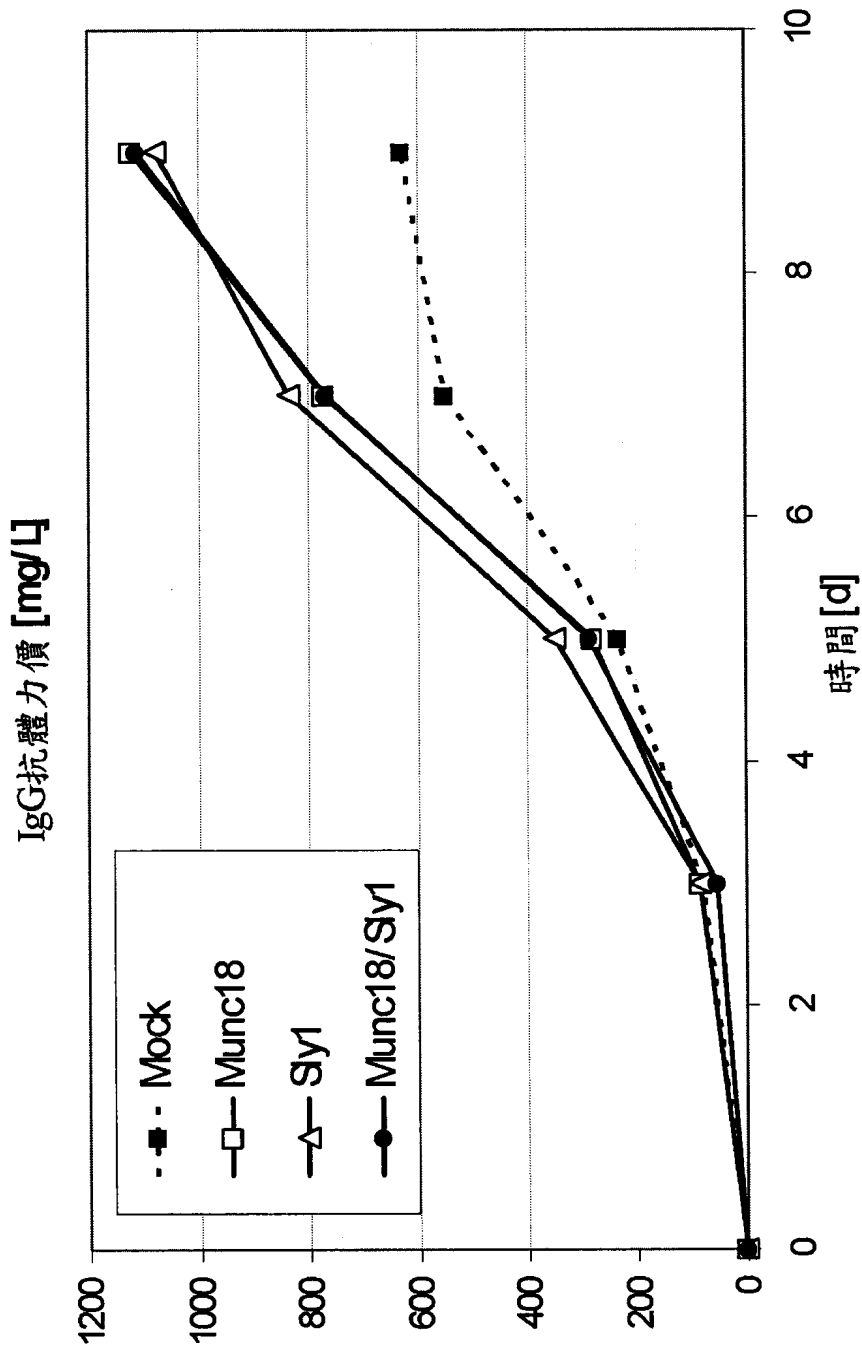


圖10B

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (7a) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)