

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380107983.9

[51] Int. Cl.

A01N 61/00 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

A01K 67/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100401896C

[22] 申请日 2003.12.9

[21] 申请号 200380107983.9

[30] 优先权

[32] 2002.12.9 [33] US [31] 60/431,949

[86] 国际申请 PCT/US2003/038915 2003.12.9

[87] 国际公布 WO2004/056310 英 2004.7.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.6.29

[73] 专利权人 儿童医院医疗中心

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 J·A·惠塞特 S·W·格拉瑟

[56] 参考文献

CN1160081A 1997.9.24

审查员 于保华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 70 页 附图 9 页

[54] 发明名称

诊断和治疗间质性肺病的方法

[57] 摘要

本发明提供了治疗受试者中的肺病的方法，其包括给需要这种治疗的受试者施用治疗有效量的包含 SP-C 治疗剂的制剂。优选地，SP-C 治疗剂是选自下述的试剂：分离的 SP-C 蛋白、编码 SP-C 蛋白的分离的核酸分子、能刺激该受体活性的 SP-C 受体特异性抗体、或其药学上可接受的组合物。本发明还提供了生产在表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因中具有定向破坏的小鼠的方法。本发明还提供了通过表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的定向破坏生产的转基因小鼠。本发明还提供了来自通过表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的定向破坏生产的转基因小鼠的细胞或细胞系。

1. 来自转基因小鼠的细胞或细胞系，其中所述细胞或细胞系在内源表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的编码序列中含有定向的破坏。

2. 权利要求 1 的细胞或细胞系，其中所述小鼠源自 129/Sv 小鼠系。

3. 权利要求 1 的细胞或细胞系，其中所述破坏是通过外显子 2 的插入性破坏造成的。

4. 权利要求 3 的细胞或细胞系，其中所述破坏至少包括位于野生型表面活性剂蛋白 C 基因外显子 2 中的 ApaL1 位点处的核苷酸位点 1667。

5. 权利要求 1 的细胞或细胞系，其中所述定向破坏是通过缺失表面活性剂蛋白 C 基因编码序列的至少 50 个连续核苷酸造成的。

6. 权利要求 1 的细胞或细胞系，其是未分化的细胞。

7. 权利要求 2 的细胞或细胞系，其中所述未分化的细胞选自：干细胞、胚胎干细胞、卵母细胞和胚细胞。

8. 生产在表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因中具有定向破坏的小鼠的方法，其包括下述步骤：

a. 建立敲除构建体，其包含 SP-C 基因的一部分，在该部分中，所述 SP-C 基因的内部部分被标记所替换，其中缺失了 SP-C 基因编码序列的至少 50 个连续核苷酸；

b. 将所述的敲除构建体转染进胚胎干细胞群中，并选择表达所述标记的转染 ES 细胞；

c. 将所述的转染 ES 细胞导入所述小鼠祖先的胚胎中；

d. 使所述的胚胎发育成熟，生成在其生殖系中具有敲除构建体的嵌合小鼠；

e. 繁殖所述的嵌合哺乳动物，生成在 SP-C 基因中具有定向破坏的杂合小鼠。

9. 表面活性剂蛋白 C 敲除构建体，其包含表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的一部分，其中所述 SP-C 基因的内部部分被替换为选择标记，且已经缺失了 SP-C 基因编码序列的至少 50 个连续核苷酸。

10. 权利要求 9 的 SP-C 敲除构建体，其中选择标记是编码选自下述的蛋白质的基因：胸苷激酶、新霉素磷酸转移酶和潮霉素 B 磷酸转移酶。

11. 权利要求 9 的 SP-C 敲除构建体，其中所述标记是新霉素抗性基因。

诊断和治疗间质性肺病的方法

本申请要求享有 2002 年 12 月 9 日提交的美国临时专利申请系列号 60/431,949 的优先权,其内容在这里整体引作参考。

本发明得到了国家健康研究所颁发的许可号 HL56387 和 HL50046 下的政府支持。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

本发明提供了哺乳动物,其中已经抑制了一个或多个肺表面活性剂蛋白(lung surfactant protein)基因的表达。更具体地,本发明涉及灭活性缺失表面活性剂蛋白 C 基因,以产生敲除的非人哺乳动物,其具有减少的或完全抑制的内源基因的表达。本发明提供了制备这样的敲除哺乳动物的方法、和使用敲除的哺乳动物评价治疗剂和治疗方案在治疗与肺表面活性剂蛋白途径中的混乱有关的疾病或障碍中的有效性的方法。

SP-C 是 34-35 个氨基酸的肽,其在肺泡的 II 型上皮细胞中选择性地表达[有关综述参见 1,2]。单个的 SP-C 基因位于人染色体 8 上,它与位于小鼠染色体 14 上的基因属同线基因。SP-C 基因能编码 197 或 191 个氨基酸的前蛋白(proSP-C),其是棕榈酰化、水解加工过的,经过粗面内质网和多泡体到片层体(其中储藏着表面活性剂)。SP-C 肽被分泌到气隙中,它在那里增强磷脂的稳定性和散布。SP-C 肽是高度疏水的,在 NH₂-端结构域含有 2 个半胱氨酸残基。这些半胱氨酸是棕榈酰化的,靠近一个延长的疏水域,在该疏水域中,23 个残基中的 19 个是缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。该疏水区域形成跨脂双层的 α -螺旋结构[3]。 α -螺旋域和半胱氨酸连接的棕榈酰基都与磷脂密切相关。SP-C 能破坏磷脂酰基链的包装,并增强磷脂向气-液界面处的单分子层和多分子层的聚集[4,5]。这些特征暗示了 SP-C 在促进磷脂在多层化膜之间的运动方面的结构作用。纯化的 SP-C 或合成的 SP-C 肽的生物功能是体外和体内高度

活性的，能增强脂类的表面活性剂性质，并恢复表面活性剂缺陷型动物的肺功能[6, 7]。这些结果表明，SP-C 在肺泡中磷脂膜的散布和稳定化方面起重要作用。

近期的研究显示 SP-C 在肺的体内平衡方面的意外作用，表明 SP-C 基因的突变与人的特发性间质性肺炎(IIP)有关[8, 9]。这些患者的肺病是常染色体显性遗传的。间质性肺炎包括各种肺病，包括脱皮间质性肺炎(DIP)、常见间质性肺炎(UIP)、非特异性间质性肺炎(NSIP)和其它的广泛地称作特发性间质性肺炎(IIP)的疾病[10]。患有这些疾病的个体通常存在进行性肺病，其伴有锻炼限制、呼吸急促和呼吸困难。由于 SP-C 前蛋白的突变会导致未完全加工的异常 proSP-C 肽的生成，仍不清楚到底是 SP-C 本身的缺少或是 proSP-C 或 SP-C 的错误折叠与这些患者中的 IIP 的发病机理有关[5]。通常，各种形式的 IIP 都与肺泡炎症、单核细胞巨噬细胞的肺浸润、肺泡结构的进行性损失和肺纤维化有关[10]。尚不清楚 IIP 的病理学所涉及的分子机制，尽管已经有了熟知的组织学和临床表现。

有两种基本类型的动物具有遗传操纵的基因组。传统的转基因哺乳动物具有修饰过的导入其基因组中的基因，该修饰过的基因可以是外源的或内源的。"敲除的"哺乳动物是一种特殊类型的转基因哺乳动物，其特征在于通过基因操纵抑制了内源基因的表达。通过删除该基因的一部分或将其替换为其它序列，产生无效等位基因，可以破坏特定的内源基因。对具有该无效等位基因的哺乳动物进行杂交，将生成缺失该基因活性拷贝的纯合哺乳动物。

已经开发了许多这样的哺乳动物，它们对于医药开发非常有用。例如，美国专利号 6, 245, 963 详述了脊髓性肌萎缩病的敲除转基因小鼠模型，美国专利号 6, 414, 219 详述了骨桥蛋白敲除小鼠。

SP-C 介导的肺病的转基因动物模型对于鉴别能够治疗或预防肺病的药物是非常有用的。

附图说明

图 1. SP-C(-/-)小鼠的肺组织病理学的发展。肺取自野生型同窝幼仔 (A, C, E) 或 SP-C(-/-) (B, D, F) 小鼠。在 20 cm 水压力下充气固定肺, 并用苏木精-曙红染色。在 2 月 (B)、6 月 (D) 和 12 月 (F) 龄中记录到气隙放大、可变的基质增厚和单核细胞浸润。导气道 (conducting airway) 血管周围的和细支气管周围的单核细胞浸润和上皮细胞发育异常如图 F 所示。显微照片 625x 代表了至少 3-5 只年龄相近的动物。

图 2. SP-C(-/-)小鼠的肺气肿。对照 (图 A) 和 SP-C(-/-) 小鼠 (图 B) 的肺组织学证实了 1 岁龄时肺泡大小的显著增加。在图 B 的中央和下面区域观察到了巨噬细胞浸润。

图 3. 重造来自 SP-C(-/-)小鼠的肺和其中增加的三色染色。显示了来自 6 月龄的野生型 (A, C, E) 和 SP-C(-/-) (B, D, F) 同窝幼仔的肺组织的 Mason 三色 (A, B)、地衣红 (C, D) 和 α -平滑肌肌动蛋白免疫染色 (E, F)。观察到了单核细胞浸润的气隙重造和稠密的蓝色着色 (箭头)。地衣红染色证实了许多重造的气隙中缺少弹性蛋白纤维 (D)。在 SP-C(-/-) 的肺薄壁组织的肺泡区域观察到了 α -平滑肌肌动蛋白染色 (箭头), 但是在野生型小鼠中没有观察到。

图 4. SP-C(-/-)小鼠的肺中的超结构异常。对 9 月龄的 SP-C(-/-) 小鼠进行了电子显微镜检查。在 SP-C(-/-) 小鼠的肺泡壁中观察到了显著的异常 (A)。II 型细胞是增生性的, 含有许多片层体一样的内容物, 在肺泡壁内观察到了胶原蛋白沉积。肺泡毛细血管被增厚的上皮下基质所围绕。导气道内衬有非典型形态的发育异常的上皮细胞 (B)。在无纤毛的柱状柱状上皮细胞中, 观察到了许多细胞病变的致密细胞器, 可能代表着非典型的线粒体。肺泡巨噬细胞是增生性的, 有些含有致密的晶体 (顶层细胞, C)。观察到了其它的含有过量的表面活性剂脂质的结构, 包括片层体和管状髓磷脂结构。在 SP-C(-/-) 小鼠的小管中观察到了肺血管异常。血管在许多肺泡中被阻塞或不存在。沿着异常血管的内膜不断观察到了异常的膜鼓泡 (D)。

图 5. SP-C(-/-)小鼠中的肺泡巨噬细胞浸润。在 6 月龄的野生型 (A) 和 SP-C(-/-) (B) 小鼠中评价了 MAC-3 免疫染色。观察到了与严重肺气

肿有关的 MAC-3 染色细胞的广泛浸润(B)。显微照片(625x)代表了至少 5 只 SP-C(-/-)小鼠和对照。用甲苯胺-蓝对野生型(C)和 SP-C(-/-) (D)小鼠的半薄切片进行了染色,证实了肺泡和肺泡巨噬细胞的异常。在肺泡衬面的增生性 II 型细胞和积累在气隙中的许多肺泡巨噬细胞中观察到了脂质内容物。

图 6. 2 月龄的 SP-C(-/-)小鼠的导气道中上皮细胞发育异常和 MUC5A/C 染色。H&E 染色(A, B)或 MUC5A/C 免疫组织化学(C, D)后观察来自野生型(A, C)或 SP-C(-/-) (B, D)的导气道。在 SP-C(-/-)小鼠的大和小的导气道中观察到了上皮细胞发育异常。异常的上皮细胞是肥厚的,具有假复层上皮细胞的异常点。尽管在野生型小鼠罕见 MUC5A/C 染色的细胞(C),但在支气管和细支气管中观察到了 MUC5A/C 的广泛染色(D),且在 SP-C(-/-)小鼠的周边肺薄壁组织中偶尔观察到(未显示)。图 A, B: 625x 放大率;图 C, D: 1250x 放大率。

图 7. 压力-容积分析证实了 SP-C(-/-)小鼠的增加的肺容积。在气管切开的 10-12 月龄野生型和 SP-C(-/-)小鼠中测试了压力-容积曲线,每组 $n=5$ 。在 SP-C(-/-)小鼠中,观察到了高压下显著增加的肺容积, $*p<0.01$ 。

图 8. SP-C(-/-)小鼠中的磷脂(SatPC)和表面活性剂蛋白。A: 在野生型和 SP-C(-/-)小鼠中,确定了 BALF、BAL 后的肺组织以及 BALF 和组织部分(全部)的总和中 SatPC 库的大小。与 15 月龄的野生型小鼠相比,SP-C(-/-)小鼠的 BALF 中的 SatPC 增加了 60%,在组织和全部中增加了 2 倍。B: 通过蛋白印迹,估计了 BALF 中的表面活性剂蛋白的量,为相对于 SatPC 的量。将野生型小鼠的值设定为标准值 1。SP-C(-/-)小鼠中的 SP-A 和 SP-D 是增加的。C: 将 BALF 中的 SP-A、SP-B 和 SP-D 的库大小/体重设定为野生型小鼠的标准值 1。尽管 SP-C(-/-)小鼠中的 SP-B 水平未变化,SP-A 和 SP-D 却是增加的。平均值 $\pm$ 标准偏差。 $*p<0.05$ 。

图 9. 来自 SP-C(-/-)小鼠的巨噬细胞生成的金属蛋白酶活性增加。通过对来自 SP-C(-/-) (泳道 1)和 SP-C(+/+) (泳道 2)的肺泡巨噬细胞的条件培养基进行酶谱作图,评价了 MMP 活性。在来自 SP-C(-/-)小

鼠的培养基中,蛋白酶活性 72 kd (MMP-2)和 105 kd (MMP-9)是增加的(箭头)。在来自 SP-C(-/-)小鼠的条件培养基中,与 MMP-12 的大小相一致的 55 kd 微弱条带也是增加的(箭头)。凝胶与来自 4 个独立实验的观察值一致。

发明内容

在 129JSV 同类品系中生成 SP-C(-/-)小鼠导致了惊人的发现,即 SP-C 的遗传性消除会造成进行性的严重肺纤维化、粘蛋白基因 MUC5 在导气道中的表达、导气道中的上皮细胞发育异常、肺气肿、肺泡血管重造和右心肥大。令人惊奇地,观察到了在缺少有关的表面活性剂浓度异常的情况下发展的严重肺病理学,并且从 SP-C(-/-)小鼠的肺分离出的肺表面活性剂的表面性质改变很小。这些发现证实了特异性地缺少 SP-C/proSP-C 本身会造成严重的肺病。

在具有显性遗传的 SP-C 基因突变(导致生成错误折叠的前蛋白,并破坏正常蛋白的表达)的人中, proSP-C 或 SP-C 本身的缺失也会造成肺病。肺病的病理学包括特发性肺纤维化(IPF)、脱皮间质性肺炎(DIP)、常见间质性肺炎(UIP)、非特异性间质性肺炎(NSIP)和其它形式的间质性肺病。

本发明提供了使用免疫组织化学、ELISA、蛋白印迹、质谱和蛋白测序,基于组织中或灌洗肺材料中 SP-C 或 proSP-C 的缺乏进行诊断筛选的应用。

本发明还公开了 proSP-C 或 SP-C 的置换(无论是通过基因转移载体以表达正常的等位基因,还是将蛋白质置换为纯化的 SP-C、proSP-C 或重组 SP-C 或重组 proSP-C 或 SP-C 或 proSP-C 类似物)有利于治疗这些肺病。可通过药学上有用的含有表面活性剂样磷脂(包括磷脂酰基甘油、磷脂酰基胆碱)的制品以气雾剂或吸入剂形式施用 SP-C。

本发明还提供了 SP-C(-/-)小鼠,其可以为测试间质肺病的疗法、检测在 SP-C(-/-)小鼠中观察到的会促进或造成严重肺病的被活化或受到抑制的分子途径提供模型。

本发明提供了生产具有表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的定位破坏的小鼠的方法。本发明还提供了通过定位破坏表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因生成的转基因小鼠。本发明还提供了来自通过定位破坏表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因而生成的转基因小鼠的细胞或细胞系。本发明还提供了表面活性剂蛋白 C 敲除构建体, 其包含表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的一部分, 其中所述 SP-C 基因的内部部分被替换为选择标记, 且已经缺失了 SP-C 基因编码序列的至少 50 个连续核苷酸。优选地, SP-C 缺陷型 (SP-C^{-/-}) 小鼠会发展成严重的进行性肺病, 其组织学特征与间质性肺炎相一致。

SP-C 缺失型小鼠会发展成严重的进行性肺病, 并伴有肺气肿、弥散性肺泡纤维化、单核细胞浸润和导气道及周围性气道中的上皮细胞发育异常。proSP-C 在小鼠中的定位缺失会造成类似于人的间质性肺炎的综合症。

一方面, 本发明提供了转基因的非人生物体和细胞系, 其可用于体内筛选和评价用于治疗肺病的药物或其它治疗方案。在一个实施方案中, 本发明是具有肺表面活性剂基因的定位破坏的转基因动物。更具体地, 该基因是 SP-C 基因。动物针对该被破坏的基因可以是嵌合的、杂合的或纯合的。纯合的敲除 SP-C 哺乳动物具有发展成肺病的较强倾向, 所述肺病例如有肺气肿、单核细胞浸润、纤维化、上皮细胞发育异常和胞内脂类在 II 型上皮细胞和肺泡巨噬细胞中的非典型性积累。定位破坏可以在该基因内的任意位置, 只要能抑制功能性 SP-C 蛋白的生成即可。

小鼠表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的 DNA 序列 (GenBank 登记号 M38314) 如 SEQ ID NO: 1 所示。小鼠 SP-C 基因的外显子 DNA 序列 (GenBank 登记号 M38314) 如 SEQ ID NO: 2 所示。小鼠表面活性剂蛋白 C (SP-C) 的多肽序列 (GenBank 登记号 AAA40010) 如 SEQ ID NO: 3 所示。人表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的 DNA 序列 (GenBank 登记号 J03890) 如 SEQ ID NO: 4 所示。人表面活性剂蛋白 C (SP-C) 的多肽序列 (GenBank 登记号 AAC32022) 如 SEQ ID NO: 5 所示。人表面活性剂蛋白 C1 (SP-C1) 的 DNA 序列 (GenBank 登记号 AAC32023) 如 SEQ ID NO: 6 所示。

在优选的实施方案中,所述破坏发生于野生型基因的外显子 2 内。在更优选的实施方案中,所述破坏至少包括位于野生型基因外显子 2 中的 ApaL1 位点处的核苷酸 1667 处的破坏。转基因动物可以是任意种属(人除外),但是优选地为哺乳动物。在优选的实施方案中,该非人动物包含表面活性剂蛋白 C 基因的定位破坏,其中所述的定位破坏会抑制野生型表面活性剂蛋白 C 的生成,从而针对该定位破坏而言为纯合的非人哺乳动物的表型特征在于肺病状况。

在另一方面,本发明涉及细胞或细胞系,其含有表面活性剂蛋白 C 基因的定位破坏。在优选的实施方案中,细胞或细胞系是未分化的细胞,例如干细胞、胚胎干细胞、卵母细胞或胚性细胞。

另一方面,本发明涉及生产在表面活性剂蛋白基因内具有定位破坏的非人哺乳动物的方法。例如,使用内部一部分被替换为标记的所述 SP-C 基因部分可以建立 SP-C 敲除构建体。然后将敲除构建体转染进胚胎干(ES)细胞群中。然后可以根据标记的表达来选择转染的细胞。然后将转染的 ES 细胞导入所述哺乳动物的祖胚胎中。可以使胚胎发育成熟,最终生成在其生殖系中具有敲除构建体的嵌合哺乳动物。繁殖所述的嵌合哺乳动物会生成具有 SP-C 基因定位破坏的杂合哺乳动物。通过杂交杂合体,可以生成纯合体。

在另一方面,本发明涉及 SP-C 敲除构建体,其可以用于生成上述的动物。在一个实施方案中,SP-C 构建体可以包含表面活性剂蛋白 C (SP-C) 基因的一部分,其中所述基因的内部部分被替换为选择标记。优选地,标记是新霉素抗性基因,且该 SP-C 基因的部分至少 2.5 kb 长,或 7.0 或 9.5 kb 长(包括被替换部分和任意的 SP-C 侧翼序列)。所述内部部分优选地包括至少一部分外显子,最优选地,它至少是野生型基因外显子 2 内的 ApaL1 位点处的核苷酸 1667。

另一方面,本发明涉及用于测试试剂在治疗和/或预防肺病方面的有效性的方法。在一个实施方案中,该方法可以采用如上所述的转基因动物或细胞系。例如,可以把测试试剂施用给转基因动物,并根据对所述肺病的有效性对试剂改善肺病的能力进行评分。使用这些哺乳动物可以

测试具有表面活性剂组分的任何肺病，但是更具体地研究了特征在于缺少 SP-C 蛋白的疾病。这些方法还可以用于测试在替换 SP-C 肺蛋白和它们的下游组分方面有效的试剂。

除非另有定义，在本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。在实施或测试本发明时可以使用与本文所述的那些类似的或等同的方法和材料，下面只是描述了合适的方法和材料。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都特别地整体引作参考。在出现冲突时，以本说明书（包括定义）为准。另外，这些材料、方法和实施例都仅仅是解释性的，而不是限制性的。

从下面的详细说明和权利要求中，能明白本发明的其它特征和优点。

具体实施方式

在下面的说明中广泛使用了重组 DNA 技术中使用的许多术语。为了能清楚地和一致地理解说明书和权利要求，包括这样的术语所限定的范围，提供了下面的定义。

如本文所使用的，术语"激动剂"意指能模拟或上调（例如加强或补充）SP-C 生物活性的试剂。SP-C 激动剂可以是野生型 SP-C 蛋白或其衍生物，其具有野生型 SP-C 的至少一种生物活性。SP-C 治疗剂还可以是这样的化合物，其能上调 SP-C 基因的表达，或增加 SP-C 蛋白的至少一种生物活性。激动剂可以是任意种类的分子，优选小分子，包括核酸、蛋白质、碳水化合物、脂质或其组合。

如本文所使用的，"拮抗剂"意指能下调（例如消除或抑制）至少一种 SP-C 生物活性的试剂。拮抗剂可以是这样的化合物，其能下调 SP-C 基因座基因的表达，或减少存在的 SP-C 蛋白的量。SP-C 拮抗剂还可以是 SP-C 反义核酸或核酶，其能与 SP-C RNA 特异性地相互作用。另一些 SP-C 拮抗剂是能结合 SP-C 多肽并抑制其作用的分子。这样的分子包括肽。另一些 SP-C 拮抗剂包括抗体，其能与 SP-C 分子的表位特异性地相互作用，使得该结合干扰 SP-C 基因座多肽的生物学功能。

术语"等位基因"在本文中与"等位变体"可互换地使用,是指可替换形式的基因或其部分。等位基因占据同源染色体上的相同的基因座或位置。当个体具有一个基因的2个相同的等位基因时,称该个体针对该基因或等位基因而言是纯合的。当个体具有一个基因的2个不同的等位基因时,称该受试者针对该基因或等位基因而言是杂合的。特定基因的等位基因可以彼此相差一个核苷酸或几个核苷酸,且可以包含核苷酸的取代、缺失和插入。常见的序列变化包括转换性突变(即嘌呤至嘌呤的取代和嘧啶至嘧啶的取代,例如A至G或C至T)、颠换性突变(即嘌呤至嘧啶和嘧啶至嘌呤的取代,例如A至T或C至G)和重复性DNA序列的变化(例如三核苷酸重复序列和其它串联重复序列的扩展和收缩)。基因的等位基因还可以是含有突变的基因形式。术语"SP-C 基因多态区的等位变体"是指 SP-C 基因座基因的一个区域,其它个体中所述基因的该区域内具有一个或几个核苷酸序列差异。

如本文所使用的,"肺病"是指通常被本领域的技术人员认为是与肺病群体有关的疾病和障碍群,其特征不在于肺气肿、单核细胞浸润、纤维化、上皮细胞发育异常、和胞内脂类在 II 型上皮细胞和肺泡巨噬细胞中的非典型积累,而不论起因或病因学如何。这包括但不限于肺气肿和间质性肺炎。

"生物学活性"或"生物活性"或"活性"或"生物学功能"可互换地使用,在本文中的目的是指 SP-C 多肽(无论以其天然的或变性的构象)或其任意亚序列直接或间接实现的功能。通过直接影响 SP-C 多肽,可以调控 SP-C 生物活性。或者,通过调控 SP-C 多肽的水平,例如通过调控 SP-C 基因的表达,可以调控 SP-C 生物活性。

如本文所使用的,术语"SP-C 多肽的生物活性片段"是指全长 SP-C 多肽的片段,其中该片段能特异性地模拟或拮抗野生型 SP-C 多肽的活性。

如应用于多肽(例如 SP-C)的活性的,术语"异常活性"是指这样的活性,其与野生型或天然多肽的活性不同,或者其与健康受试者中的多肽的活性不同。多肽的活性可以是因为比其天然对应物的活性更强而称

作异常的。或者，活性可以是因为比其天然对应物的活性更弱或者不存在而称作异常的。异常活性还可以是活性的变化。细胞可以因编码 SP-C 基因座多肽的 SP-C 基因座基因的过表达或低表达而具有异常的 SP-C 活性。

"细胞"、"宿主细胞"或"重组宿主细胞"是在本文中可互换地使用的术语。应当理解，这样的术语不仅指特定的受试者细胞，而且指这样的细胞的后代或潜在的后代。因为突变或环境的影响而可能发生在后代中发生某些修饰，这样的后代实际上可以与亲本细胞不同，但是它们仍然包括在如本文所使用的术语的范围内。

"嵌合多肽"或"融合多肽"是能编码目标 SP-C 基因座多肽之一的第一个氨基酸序列与确定一个结构域（例如多肽部分）的第二氨基酸序列的融合体，所述结构域针对 SP-C 多肽的任何结构域而言是外源的、且基本上不同源。嵌合多肽可以存在见于（虽然在不同的多肽中）也能表达第一多肽的生物体中的外源结构域，或者它可以是"种属间的"、"基因间的"等由不同种类生物体表达的多肽结构的融合体。通常，融合多肽可以表示成通式 X-SP-C-Y，其中 SP-C 代表多肽中源自 SP-C 多肽的一部分，X 和 Y 独立地不存在或代表与生物体（包括天然产生的突变体）中的 SP-C 序列无关的氨基酸序列。

短语"与 SEQ ID NO. x 所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列"是指具有 SEQ ID NO. x 的核酸链的互补链的核苷酸序列。术语"互补链"在本文中与术语"互补体"可互换地使用。核酸链的互补体可以是编码链的互补体或非编码链的互补体。当提及双链核酸时，具有 SEQ ID NO. x 的核酸的互补体是指具有 SEQ ID NO. x 的链的互补链，或具有 SEQ ID NO. x 的互补链的核苷酸序列的任意核酸。当提及具有 SEQ ID NO. x 的单链核酸时，该核酸的互补体是具有与 SEQ ID NO. x 互补的核苷酸序列的核酸。核苷酸序列和其互补序列总是按照 5' 向 3' 的方向给出。

如众所周知的，基因可以以单拷贝或多拷贝存在于个体的基因组中。这样的重复基因可以是相同的，或者可以具有某些修饰，包括核苷酸取代、添加或缺失，而仍然编码具有基本上相同活性的多肽。术语"能编码

SP-C 多肽的 DNA 序列"因而可以指特定个体内的一个或多个基因。而且,核苷酸序列中的某些差异可以存在于生物个体之间,它们称作等位基因。这样的等位基因差异可以导致或不导致所编码多肽的氨基酸序列的差异,而仍然编码具有相同生物活性的多肽。

短语"基因的破坏"和"定位破坏"或任何类似的短语是指天然 DNA 序列的位点特异性打断,从而与基因的野生型拷贝相比阻止该基因在细胞中的表达。打断可以由对该基因的缺失、插入或修饰或其任意组合造成。

术语"单倍型"是指一组等位基因,它们作为一组遗传地在一起(处于连锁不平衡)。如本文所使用的,单倍型定义为包括以统计学上显著水平发生的那些单倍型($p < 0.05$)。如本文所使用的,短语"SP-C 单倍型"是指 SP-C 基因座中的单倍型。

"同源性"或"同一性"或"相似性"是指 2 种肽或 2 种核酸分子之间的序列相似性。通过对比每个序列(为了对比目的,可以对齐它们)中的位点,可以确定同源性。当对比的序列中的位点被相同的碱基或氨基酸占据时,那么该分子在该位点是相同的。核酸序列之间的同源性或相似性或同一性的程度是这些核酸序列共有的位点处相同的或匹配的核苷酸的数目的函数。氨基酸序列的同一性程度是这些氨基酸序列共有的位点处相同的氨基酸的数目的函数。氨基酸序列的同源性或相似性的程度是这些氨基酸序列共有的位点处结构上相关的氨基酸的数目的函数。"无关的"或"非同源的"序列与本发明的一个 SP-C 基因座序列具有低于 40%的同一性,优选低于 25%的同一性。

如本文所使用的,术语"相互作用"意在包括分子之间的可检测的关系或关联(例如生化相互作用),例如蛋白-蛋白、蛋白-核酸、核酸-核酸和蛋白-小分子或核酸-小分子之间的相互作用。

如本文所使用的,术语"SP-C 有关的"意在包括与人染色体 8 上的人 SP-C 基因座基因有关的所有小鼠和人基因。

当提及基因产物或多肽时,使用的术语"SP-C"意指由人染色体 8 上的表面活性剂蛋白 C 基因座编码的全部基因产物和它们的对应小鼠同系物。

术语"SP-C 治疗剂"是指各种形式的 SP-C 多肽以及肽模拟物、核酸或小分子,其可以通过模拟或加强(激动)或抑制(拮抗)天然产生的 SP-C 多肽的作用来调控 SP-C 多肽的至少一种活性。能模拟或加强野生型 SP-C 多肽活性的 SP-C 治疗剂是"SP-C 激动剂"。相反地,能抑制野生型 SP-C 多肽活性的 SP-C 治疗剂是"SP-C 拮抗剂"。

如本文关于核酸(例如 DNA 或 RNA)所使用的,术语"分离的"是指与存在于该大分子的天然来源中的其它 DNA 或 RNA 分开的分子。例如,编码主题 SP-C 多肽之一的分离的核酸优选地包含不超过 5 千碱基(kb)的、天然地紧邻基因组 DNA 中 SP-C 基因的核酸序列,更优选地不超过 10 kb 的这样的天然侧翼序列,最优选地低于 5 kb 的这样的天然侧翼序列。如本文所使用的,术语"分离的"也是指核酸或肽,当通过重组 DNA 技术生产时,其基本上不含细胞物质、病毒物质或培养基,当化学合成时,其基本上不含化学前体或其它化合物。而且,"分离的核酸"意在包括天然不以片段存在并且不以天然状态存在的核酸片段。术语"分离的"在本文中也用于指从其它细胞蛋白中分离出来的多肽,且意在包含纯化的和重组的多肽。

术语"敲除的"是指部分地或彻底地抑制内源基因的表达。这通常是通过删除该基因的一部分或通过用另一种序列替换其中一部分来完成,但是也可以通过对该基因的其它修饰来造成,例如终止密码子的导入、关键氨基酸的突变、内含子连接的去除等。

术语"敲除构建体"是指核酸序列,其可以用于降低或抑制由细胞中的内源 DNA 序列编码的蛋白的表达。在一个简单的实施例中,敲除构建体包含基因,例如 SP-C 基因,其在基因的关键部分具有缺失,从而不能从其表达有活性的蛋白。或者,可以将许多终止密码子添加到天然基因中,以造成蛋白的较早终止,或者可以灭活内含子连接。在典型的敲除构建体中,将该基因的一部分替换为选择标记(例如 neo 基因),从而该基因可以表示如下: SP-C5'/neo/SP-C3', 其中 SP-C5' 和 SP-C3' 是指基因组或 cDNA 序列,其分别位于 SP-C 基因一部分的上游和下游,其中 neo 是指新霉素抗性基因。在另一个敲除构建体中,在侧翼位置添加第二选

择标记,从而该基因可以表达为: SP-C/neo/SP-C/TK, 其中 TK 是胸腺嘧啶激酶基因, 该基因可以添加到前述构建体的 SP-C5' 或 SP-C3' 序列旁侧, 可以针对合适的培养基来进行选择(即是负的选择标记)。该双标记构建体可以用于从典型地保留 TK 序列的非同源重组事件中选择出去除侧翼 TK 标记的同源重组事件。基因缺失和/或替换可以来自外显子、内含子、特别是内含子连接处和/或调节区(例如启动子)。

术语"敲除的哺乳动物"等是指转基因哺乳动物, 其中已经通过敲除构建体的重组而抑制了特定的基因。应当强调的是, 该术语意在包括所有的后代。因而, 包括了原始的动物和所有的 F1、F2、F3 等和其后代。

术语"嵌合体"、"嵌合的哺乳动物"等是指这样的转基因哺乳动物, 其在一些含有其基因组的细胞中具有敲除构建体。

术语"杂合体"、"杂合的哺乳动物"等是指这样的转基因哺乳动物, 其在含有其基因组的全部细胞的染色体对之一上具有敲除构建体。

术语"纯合体"、"纯合的哺乳动物"等是指这样的转基因哺乳动物, 其在含有其基因组的全部细胞的染色体对中两个成员上都具有敲除构建体。

"连锁不平衡"是指 2 个等位基因的共遗传频率比从特定对照群体中每个等位基因的单独发生频率所预期的更大。独立地遗传的 2 个等位基因的预期发生频率是第一等位基因的频率乘以第二等位基因的频率。以预期的频率共同存在的等位基因称作是"连锁平衡"的。

术语"标记"或"标记序列"或类似的短语是指能生成可选择基因型或优选地可选择表型的任意基因。其包括这样的实例, 例如 neo 基因、绿色荧光蛋白(GFP)基因、TK 基因、 β -半乳糖苷酶基因等。标记序列可以是本领域的技术人员已知的可以用于该目的任意序列, 尽管典型地标记序列是编码可以赋予可选择性状的蛋白的序列, 例如抗生素抗性基因, 或可以检测的且典型地不存在于细胞中的酶。标记序列还可以包括调节区, 例如能调节该蛋白表达的启动子或增强子。但是, 还可以使用内源调节序列来转录所述标记。在本发明的一个实施方案中, 标记有利于通过荧光激活细胞分选术从未转染的细胞中分离转染的细胞, 例如通过使

用荧光标记的抗体或荧光蛋白（例如 GFP）的表达。还可以将有利于标记基因表达的其它 DNA 序列掺入本发明的 DNA 构建体中。这些序列包括但不限于转录起始和终止信号、翻译信号、翻译后的修饰信号、内含子拼接连接、核糖体结合位点和多腺苷酸化信号，等等。标记序列还可以用于将序列附加到靶基因上。例如，它可以用于添加终止密码子以截断 SP-C 翻译。

选择标记的应用是本领域熟知的，无需在本文中详述。如本文所使用的，术语"调控"是指上调（即活化或刺激（例如，通过激动或加强））和下调（即抑制或消除（例如，通过拮抗、减少或抑制））。

术语"突变的基因"是指基因的等位形式，与不具有该突变基因的受试者相比，其能改变具有该突变基因的受试者的表型。如果受试者针对该突变必需是纯合的才具有改变的表型，则称该突变是隐性的。如果突变基因的一个拷贝就足以改变受试者的基因型，则称突变是显性的。如果受试者具有突变基因的一个拷贝，且具有介于纯合受试者和杂合受试者（针对该基因而言）之间的表型，则称该突变是共显性的。

本发明的"非人动物"包括哺乳动物，例如啮齿类动物、非人灵长类动物、绵羊、狗、母牛、小鸡、两栖类动物、爬行类动物等。优选的非人动物选自啮齿类动物家族，包括大鼠和小鼠，最优选小鼠，尽管转基因的两栖类动物（例如 *Xenopus* 属的成员）和转基因的小鸡也能提供用于理解和鉴别可以影响例如胚胎发生和组织形成的试剂的重要工具。

术语"嵌合动物"在本文中用于指这样的动物，其中在该动物的一些细胞、但不是全部细胞中存在或表达重组基因。术语"组织特异性的嵌合动物"是指重组 SP-C 基因之一在一些组织、但不在其它组织中存在和/或表达或破坏。术语"非人的哺乳动物"是指除人之外的哺乳动物类的任何成员。

如本文所使用的，术语"核酸"是指多核苷酸或寡核苷酸，例如脱氧核糖核酸 (DNA)，和在合适时的核糖核酸 (RNA)。该术语也应当理解为包括作为等同物的从核苷酸类似物制备出的 RNA 或 DNA 的类似物，在适于所述的实施方案时，还包括单链的（有义的或反义的）和双链的多核苷

酸。

术语"多态性"是指超过一种形式的基因或其片段(例如等位变体)的共存。其中基因的一部分存在至少2种不同的形式,即2种不同的核苷酸序列,被称作"基因的多态性区域"。多态性区域可以是单核苷酸,其身份在不同的等位基因中存在差异。多态性区域还可以是几个核苷酸长。

"多态性基因"是指具有至少一个多态性区域的基因。

如本文所使用的,术语"启动子"是指DNA序列,其可以调节所选择的可操作地连接到该启动子上的DNA序列的表达,且能实现所选择的DNA序列在细胞中的表达。该术语包括"组织特异性的"启动子,即仅仅在特定细胞(例如特定组织的细胞)中实现所选择的DNA序列表达的启动子。该术语也包括所谓的"泄漏型"启动子,其主要调节所选择的DNA在一种组织中的表达,但是也会造成其它组织中的表达。该术语也包括非组织特异性的启动子,和组成性表达或可诱导(即表达水平是可以控制的)的启动子。

当提及基因产物时,术语"蛋白质"、"多肽"和"肽"在本文中可互换地使用。

术语"重组蛋白"是指通过重组DNA技术生成的本发明的多肽,其中一般地,将编码SP-C多肽的DNA插入合适的表达载体中,后者继而用于转化宿主细胞,以生成异源蛋白。而且,当提及重组SP-C基因时,短语"源自"意指包括在"重组蛋白"的含义内,这些蛋白具有天然SP-C多肽的氨基酸序列、或者通过该多肽的天然形式的突变(包括取代和缺失(包括截断))而生成的与其类似的氨基酸序列。

如本文所使用的,"小分子"意指具有小于约5 kD、最优选小于约4 kD分子量的组分。小分子可以是核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、脂类或其它有机(含碳的)或无机分子。许多制药公司具有广泛种类的化学和/或生物学混合物(常常是真菌、细菌或藻类提取物)文库,可以用本发明实验中的任一个来筛选它们,以鉴别能调控SP-C生物活性的化合物。

如本文所使用的,术语"特异性地杂交"或"特异性地检测"是指本发

明的核酸分子与脊椎动物、优选 SP-C 基因的至少约 6、12、20、30、50、100、150、200、300、350、400 或 425 个连续核苷酸杂交的能力。

"转录调节序列"是一般性术语，在整篇说明书中用于指 DNA 序列，例如起始信号、增强子和启动子，其能诱导或控制与其可操作地连接的蛋白质编码序列的转录。在优选的实施方案中，SP-C 基因之一的转录是在启动子序列(或其它转录调节序列)的控制下，控制重组基因在期望在其中实现表达的细胞类型中的表达。还应当指出，重组基因可以处于与控制天然形式的 SP-C 多肽转录的那些序列相同或不同的转录调节序列的控制之下。

如本文所使用的，术语"转染"是指通过核酸介导的基因转移将核酸导入(例如，通过表达载体)受体细胞。本领域已知的转化方法包括任何电的、磁的、物理的、生物的或化学的方法。如本文所使用的，"转染"包括如下的具体技术：电穿孔、磁穿孔、 Ca^{2+} 处理、注射、轰击、逆转录病毒感染和脂转染等等。如本文所使用的，"转化"是指其中因细胞摄入外源 DNA 或 RNA 而改变了细胞的基因型的方法，例如，转化的细胞表达 SP-C 多肽的重组形式，或者在反义表达转移基因的情况下，会破坏天然形式的 SP-C 多肽的表达。

如本文所使用的，术语"转基因"是指已经导入细胞中的核酸序列(其编码例如一种 SP-C 多肽或其反义转录物)。转基因可以对于其所导入的转基因动物或细胞而言是部分地或完全地异源的，即外来的，或者对于其所导入的转基因动物或细胞的内源基因而言是同源的，但是它被设计成要插入或被插入动物的基因组中，其插入方式能改变插入其中的细胞的基因组(例如，它是插入在与天然基因不同的位置，或者其插入会导致敲除)。转基因还可以以游离体的形式存在于细胞中。转基因可以包括一个或多个转录调节序列和任意的其它核酸，例如内含子，其对于所选择的核酸的最佳表达可以是必需的。

"转基因动物"是指任意的动物，优选非人的哺乳动物、鸟或两栖动物，其中该动物的一个或多个细胞含有通过人工干预、例如通过本领域熟知的转基因技术导入的异源核酸。通过审慎的遗传操纵，例如通过显

微注射或重组病毒感染，直接地或间接地导入细胞的前体，可以将核酸导入细胞中。术语遗传操纵不包括传统的杂交育种或体外受精，而是指重组 DNA 分子的导入。该分子可以整合到染色体中，或者它可以是在染色体外复制的 DNA。在本文所述的典型的转基因动物中，转基因会使细胞表达重组形式的一种 SP-C 多肽，例如激动剂形式或拮抗剂形式。但是，也包括重组 SP-C 基因在其中沉默的转基因动物，例如，下面所述的 FLP 或 CRE 重组酶依赖性构建体。而且，“转基因动物”还包括这样的重组动物，其中一个或多个 SP-C 基因的基因破坏是通过人工干预造成的，包括重组和反义技术。

如本文所使用的，术语“治疗”意在包括治愈和改善障碍或疾病的至少一种症状。

术语“载体”是指核酸分子，其能对已经连接其上的另一核酸进行转运。一种优选的载体是游离体，即能在染色体外复制的核酸。优选的载体是能自主复制和/或表达它们所连接的核酸的那些。能指导与它们可操作连接的基因表达的载体在本文中称作“表达载体”。通常，在重组 DNA 技术中使用的表达载体经常是“质粒”的形式，其一般指环状双链 DNA 环，处于它们的载体形式时不会结合到染色体上。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换地使用，因为质粒是最常用的载体形式。但是，本发明意在包括起等同功能、今后将为本领域所知的其它形式的表达载体。

术语“野生型等位基因”是指基因的等位基因，当在受试者中以 2 个拷贝存在时会导致野生型表型。特定基因可以存在几种不同的野生型等位基因，因为基因中的某些核苷酸变化可能不会影响具有 2 个拷贝的基因（具有核苷酸变化）的受试者的表型。

本发明提供了治疗受试者中的肺病的方法，其包括给需要该治疗的受试者施用治疗有效量的含有 SP-C 治疗剂的制剂。优选地，SP-C 治疗剂是选自下述的试剂：分离的 SP-C 蛋白，分离的编码 SP-C 蛋白的核酸分子，能刺激受体活性的 SP-C 受体特异性抗体，或其药学上可接受的组合物。

本发明提供了 SP-C 治疗剂的应用，其中该治疗剂是能刺激受体活性

的抗体 SP-C 受体特异性,或者其中该试剂是分离的 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白。

在一个实施方案中,SP-C 治疗剂是分离的编码 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白的核酸分子,其中该核酸分子可操作地连接了转录控制序列上。优选地,该核酸分子在受试者的气道 (airway) 细胞中表达。更优选地,该核酸编码 SP-C 多肽、片段、同系物或基本上同源的变体,从而提供 SP-C 功能。

在一个实施方案中,核酸分子整合进染色体 DNA 中,构成受试者的气道细胞的基因组。在另一个实施方案中,核酸分子由受试者的气道细胞从染色体外的位置表达。通常,核酸分子包含至少 50 个核苷酸。优选地,核酸分子包含至少 200 个核苷酸。气道细胞通常是平滑肌和上皮细胞。

在一个实施方案中,分离的核酸分子以与脂质体投递载体复合的形式施用给哺乳动物。或者,分离的核酸分子以病毒载体投递载体的形式施用给哺乳动物。优选地,该病毒载体投递载体来自腺病毒。

在一个实施方案中,分离的核酸分子当施用到哺乳动物的肺时,将在哺乳动物的细胞中表达。优选地,疾病是与嗜曙红细胞的炎症有关的气道慢性阻塞性肺病。

在另一个实施方案中,所述疾病选自:气道阻塞、变态反应、哮喘、急性炎性肺病、慢性炎性肺病、慢性阻塞性肺发育异常、肺气肿、肺部肺气肿、慢性阻塞性肺气肿、成人呼吸窘迫综合征、支气管炎、慢性支气管炎、慢性哮喘支气管炎、慢性阻塞性支气管炎和间质性肺病。

优选地,所述 SP-C 治疗剂能减轻哺乳动物的肺炎症。SP-C 治疗剂以约 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至约 100 mg/kg 哺乳动物体重的量施用。优选地,以约 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至约 10 mg/kg 哺乳动物体重的量施用。在一个实施方案中,SP-C 治疗剂是在药学上可接受的赋形剂中施用。

SP-C 治疗剂可以通过至少一种选自下述的途径施用:经鼻途径和吸入途径。

在另一个实施方案中,所述肺病选自:哮喘、过敏性支气管肺曲霉病、过敏性肺炎、嗜酸细胞性肺炎、过敏性支气管炎、支气管扩张、过

敏性肺炎、职业性哮喘、反应性气道病综合症、嗜酸细胞过多综合征、鼻炎、鼻窦炎、和肺寄生虫病。

本发明还提供了处方治疗与哺乳动物中涉及炎症反应的呼吸道疾病有关的气道过度反应性和/或气流限制的方法，其包括：a. 给哺乳动物的肺施用选自下述的 SP-C 治疗剂：能刺激受体活性的 SP-C 受体特异性抗体、分离的 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白；和分离的编码 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白的核酸分子，其中所述核酸分子可操纵地连接了转录控制序列；b. 检测哺乳动物中响应于刺激剂而产生的肺功能的变化，以确定 SP-C 治疗剂是否能调控气道过度反应性；和 c. 基于肺功能的变化，开出药理学上的治疗处方，其包括给哺乳动物施用能有效地减少炎症的 SP-C 治疗剂。

本发明还提供了保护哺乳动物免于发生下述疾病的制剂：气道过度反应性，与涉及炎症的呼吸道疾病有关的气流限制和/或气道纤维化，其中包含能有效地减少嗜曙红细胞炎症的抗炎剂和选自下述的 SP-C 治疗剂：SP-C 受体特异性的能刺激该受体活性的抗体；分离的 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白；和分离的编码 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白的核酸分子，其中核酸分子可操纵地连接了转录控制序列。通常，该制剂包含药学上可接受的赋形剂。

优选地，制剂包含选自下述的控释载体：生物相容性聚合物、其它的聚合基质、胶囊、微胶囊、微粒、大药丸制剂、浸润泵、扩散装置、脂质体、脂球、病毒载体和透皮递送系统。

在一个实施方案中，SP-C 治疗剂是分离的 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白。在另一个实施方案中，SP-C 治疗剂是分离的编码 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白的核酸分子，其中所述核酸分子可操纵地连接了转录控制序列。在一个实施方案中，分离的核酸分子与脂质体递送载体相复合。在另一个实施方案中，分离的核酸分子提供在病毒载体递送载体中。优选地，病毒载体递送载体来自腺病毒。

在另一个实施方案中，SP-C 治疗剂是 SP-C 受体特异性的能刺激该受体活性的抗体。在另一个实施方案中，所述 SP-C 治疗剂选自：分离的

SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白和分离的编码 SP-C 蛋白或 proSP-C 蛋白的核酸分子, 其中所述核酸分子可操纵地连接了转录控制序列。

在另一个实施方案中, 制剂可以含有选自下述的抗炎剂: 抗-IgE、免疫调节药、白三烯合成抑制剂、白三烯受体拮抗剂、糖皮质激素、类固醇化学衍生物、抗环加氧酶剂、 β -肾上腺素能激动剂、甲基黄嘌呤、cromone、抗-CD4 剂、抗-IL-5 剂、表面活性剂、cytoxin 和肝素。优选地, 抗炎剂选自: 白三烯合成抑制剂、白三烯受体拮抗剂、糖皮质激素、 β -肾上腺素能激动剂、甲基黄嘌呤和 cromone。

通常, 本发明提供了转基因动物, 其中已经通过转基因克隆方法修饰了一个或多个与 SP-C 相关的基因。这些 SP-C 转基因动物可以用作涉及 SP-C 介导的肺部过程的各种疾病的动物模型。尽管大多数上述肺病和障碍似乎具有复杂的和多种诱因的病理学, 它们最终都似乎涉及 SP-C 介导的肺部过程。本发明还提供了用于发现能干扰这些 SP-C 介导的肺部过程、由此阻止这些原本不同的不同疾病进展的药物化合物的试剂和方法。

在优选的实施方案中, 本发明涉及转基因的"敲除"小鼠系, 其中破坏或删除了携带在位点 8p, 8 处的小鼠染色体 14 上的小鼠 SP-C (表面活性剂蛋白 C) 基因, 以降低或消除 SP-C 基因的表达。

SP-C 敲除小鼠系的特征在于增强了由于缺少内源 SP-C 蛋白分子导致的 SP-C-介导的肺病过程。在另一个实施方案中, 本发明提供了"双"敲除的小鼠系, 其特征在于降低了 SP-C 基因以及 SP-A、SP-B 或 SP-D 中至少一个基因的表达。

转基因的"敲除"小鼠系可以用于生成杂合的和纯合的 SP-C 基因敲除小鼠, 它们可以用于研究 SP-C 介导的肺病和障碍。例如, 表面活性剂蛋白 C 蛋白的缺失会导致 SP-C 介导的肺病增加, 且会助长许多疾病和障碍的病理学, 包括: 肺气肿、单核细胞浸润、纤维化、上皮细胞发育异常、和胞内脂类在 II 型上皮细胞和肺泡巨噬细胞中的非典型积累。

慢性和急性形式的这样的肺病和障碍可以在合适的 SP-C 敲除动物或动物系中再现。例如, 针对 SP-C 敲除构建体而言为杂合的动物具有减少了的生成表面活性剂蛋白 C 的能力, 因此表现出 SP-C 介导的相应肺部过

程的加重。因此，杂合的小鼠系可以再现慢性肺病和障碍的环境。而且，这些杂合的动物或细胞系非常适用于发现能加强它减少了的内源表面活性剂蛋白 C 群的表达或活性的治疗剂。这样的受体拮抗剂"激动剂"可以例如增加 SP-C 基因的剩余拷贝的表达。相反地，纯合的 SP-C"敲除"动物和系不具有生产 SP-C 基因产物的能力，因此表现出相应的更强的 SP-C 介导的过程。因此，纯合的动物和细胞系可以再现在急性肺病中发生的异常肺功能。而且，这些纯合的动物和系特别适用于发现可以作为例如表面活性剂蛋白 C 的分子模拟物起作用的治疗剂。

本发明还提供了可用于建立 SP-C"敲除"和 SP-C"敲入"转基因小鼠细胞系和转基因小鼠的多种核酸构建体。

例如，可以建立 SP-C 破坏构建体，以将报告或标记基因（例如 β -半乳糖苷酶或绿色荧光蛋白）整合进该基因的染色体拷贝中，由此使得到的嵌合报告基因依赖于内源 SP-C 基因启动子实现其表达。包含这样的"敲入"构建体的转基因细胞系和动物特别适用于针对通过增加表面活性剂蛋白 C 基因的转录来抑制 SP-C 依赖性肺过程的能力来筛选化合物。在另一个实施例中，可以将异源的可调节启动子"敲入"到 SP-C 基因座中，使该可调节的启动子现在控制表面活性剂蛋白 C 的表达。可调节的启动子可以是可诱导的启动子、可抑制的启动子或可发育调节的启动子。在该情况下，启动子的选择可以依目前的具体研究而定。例如，可抑制的启动子系统可用于生成这样的小鼠品系，其中 SP-C 基因得到表达，直到正常生长和发育后的特定时间点。然后通过施用能导致 SP-C 基因的转录性关闭的合适配体（例如四环素），可以突然中断 SP-C 基因的功能。该可诱导的表面活性剂蛋白 C 缺失由此在原本正常发育的动物中触发 SP-C 介导的肺病。因而可以针对能阻止表面活性剂蛋白 C 缺失诱导的肺反应的化合物设计药物筛选。

因而，本发明的 SP-C 转基因动物和细胞系可以用于开发能用于治疗或预防这样的 SP-C 介导的疾病和障碍的药物。

要敲除的基因可以是参与 SP-C 途径的任何基因，条件是至少有部分关于待破坏 DNA 的序列或图谱信息可以用于制备敲除构建体和筛选探

针。在本发明的一个优选实施方案中，定位破坏在位点 8p, 8 处的染色体 14 上的小鼠 SP-C 基因。鼠 SP-C 基因的基因组 DNA 序列如 SEQ ID NO: 1 所示。这些靶基因构建体包括 SP-C 靶基因敲除和敲入构建体，它们特别适用于本发明的各个实施方案。

本发明的重要方面涉及表达一种或多种 SP-C 多肽的基因的破坏，所述基团通常具有小鼠 (GenBank 登记号 M38314; SEQ ID NO: 1) 或人 (GenBank 登记号 J03890 ; SEQ ID NO: 4) SP-C 基因的序列，或其功能等同物。"基因"是指这样的 DNA 片段，其包含任意的 SP-C 基因编码序列，且在某些方面中包含基本上与其它天然产生的基因或蛋白编码序列分离的调节序列。在这方面，术语"基因"是功能蛋白、多肽或肽编码单位的简称。如本领域的技术人员所知的，该功能术语包括基因组序列、cDNA 序列和更小的工程化基因片段，其能表达或适用于表达蛋白、多肽、结构域、肽或融合蛋白。

在特定方面，本发明涉及编码 SP-C 多肽的 DNA 序列，所述多肽在其氨基酸序列中分别包含小鼠 (GenBank 登记号 AAA40010; SEQ ID NO: 3) 或人 (GenBank 登记号 AAC32022; SEQ ID NO: 5 和 AAC32023; SEQ ID NO: 6) SP-C 和 SP-C1 多肽的连续氨基酸序列或其功能等同物。

自然地，当 DNA 片段编码 SP-C 多肽、或旨在用于表达 SP-C 多肽时，最优选的序列是：基本上如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 的连续序列中所示的那些，和编码保留了 SP-C 生物活性的蛋白的那些。SP-C 多肽的序列基本上与 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 中所示的连续部分相对应，且与 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸不同的、或不是其生物学功能等同物的氨基酸相对较少。术语"生物学功能等同物"是本领域熟知的，且在本文中进一步定义。

因此，与 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所示氨基酸具有约 70%至约 80%、或更优选约 81%至约 90%、或更优选约 91%至约 99%相同或功能上等同的氨基酸序列是“基本上如 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所述”的序列。

在某些其它的实施方案中，本发明涉及分离的 DNA 片段和重组载体，

在它们的序列中包括来自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示序列的连续核酸序列。该定义的含义与上述的相同，是指该核酸序列基本上对应于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 中所示的连续部分，且其中具有的与 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 的密码子不同的、或功能上不等同的密码子相对较少。术语"功能上等同的密码子"在本文中用于指编码相同氨基酸的密码子，也指编码生物学等同的氨基酸的密码子。

除了内含子区或侧翼区外，并考虑遗传密码的简并性，与 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 的序列中所示的核苷酸具有约 70%至约 79%、或更优选约 80%至约 89%、或更优选约 90%至约 99%相同的核苷酸的序列是"基本上如 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示"的序列。基本上与 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示序列相同的序列也可以在功能上定义为能在相对严格条件下与含有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 的互补体的核酸片段杂交的序列。合适的相对严格杂交条件是本领域的技术人员熟知的。

自然地，本发明也包括与 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 所示序列互补的、或基本上互补的 DNA 片段。"互补"的核酸序列是根据标准 Watson-Crick 互补法则能进行碱基配对的序列。如本文所使用的，术语"互补序列"是指基本上互补的核酸序列，例如可通过上述的相同核苷酸对比进行判断，或定义为能在相对严格条件下与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 3 的核酸片段杂交。

还应当理解，本发明不限于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所示的具体核酸和氨基酸序列。因此，DNA 片段可以不同地包含 SP-C 编码区自身、携带基本编码区中的选定变化或修饰的编码区，或者它们可以编码更大的多肽，其仍然包含 SP-C 编码区，或者可以编码生物学功能等同的、具有不同氨基酸序列的蛋白质或肽。

本发明的 DNA 片段包括生物学功能等同的 SP-C 蛋白和肽。这样的序列可以由密码子冗余以及已知在核酸序列及所编码的蛋白质中天然存在

的功能等同性所造成的。或者，通过应用重组 DNA 技术，在考虑要改变的氨基酸的性质基础上建立蛋白质结构上的变化，可以创建功能等同的蛋白质或肽。可以使用定点诱变技术导入变化，例如改善蛋白质的抗原性或测试 SP-C 突变体，以在分子水平检测腺苷脱氨酶活性。

由于可以在本发明的 SP-C 基因和蛋白中进行修饰和变化，且仍然得到具有相似的或理想特征的分子，这样的生物学功能等同物也包含在本发明内。

例如，某些氨基酸可以取代蛋白质结构中的其它氨基酸，而不显著损失结构的相互作用结合能力，例如抗体的抗原结合区、底物分子或受体上的结合位点、DNA 结合位点等。由于是蛋白质的相互作用能力和性质决定了蛋白质的生物学功能活性，因此可以在蛋白质序列(或者，当然其根本的 DNA 编码序列)中进行某些氨基酸序列取代，仍然得到具有类似(激动剂)性质的蛋白。因而，发明人预期，可以在 SP-C 蛋白或多肽或根本的 DNA 序列中进行各种变化，而不显著损失它们的生物学用途或活性。

关于功能等同物，技术人员熟知，"生物学功能等同的蛋白或肽或基因"的定义是指可以在分子的特定部分进行有限数目的变化，且仍然产生具有可接受水平的等同生物活性的分子。因而，生物学功能等同的肽在本文中定义为这样的肽，其中可以取代某些、而不是大部分或全部氨基酸。

更具体地，当涉及更短长度的肽时，预期在特定肽中只能进行更少的氨基酸取代。更长的结构域可以具有中等数目的变化。全长蛋白最能容忍更大数目的变化。当然，根据本发明，可以容易地制备和使用具有不同取代的多种独特的蛋白质/肽。

氨基酸取代通常是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，例如它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。对氨基酸侧链取代基的大小、形状和类型的分析表明，精氨酸、赖氨酸和组氨酸都是带正电荷的残基；丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸都是近似大小；而苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸通常都具有近似的形状。因此，基于这些考虑，精氨酸、赖氨酸和组氨酸；丙氨酸、甘氨酸和丝氨酸；和苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸在本文中定义

为生物学功能等同物。

在一个实施方案中，用限制酶消化用于生产敲除构建体的克隆，所选择的限制酶能够在将插入标记基因的该基因内位点实现切割。在替代实施方案中，通过用随机核酸酶部分地消化基因中的单一限制酶切口，可以去除 DNA 序列。

标记基因插入的合适位置是能阻止天然基因表达的位置。该位置取决于多种因素，包括待定向（即，抑制启动子功能或抑制天然外显子合成所必需的插入精确位置）的序列（外显子，内含子或启动子）和序列中方便的限制位点的可用性。在一些情况下，当要将标记基因插入敲除构建体中时，需要去除该基因的大部分，以保持敲除构建体的长度与原始基因组序列相当。

标记基因可以是本领域的技术人员熟知的、且可检测的和/或可测试的任意核酸序列。典型地，使用抗生素抗性基因，或任何其它的可以容易地检测出其在基因组中的表达或存在情况的基因。标记基因一般可操作地连接到任意来源的启动子上，该启动子在其插入的细胞有活性或可以容易地活化。但是，标记基因无需具有其自己的启动子，因为它可以使用靶基因的启动子进行转录。另外，标记基因一般具有连接到该基因 3' 端的 polyA 序列，以实现所述基因的转录终止。优选的标记基因是氨基糖苷磷酸转移酶基因 (aph)、潮霉素 B 磷酸转移酶基因或已知可以在敲除技术中用作标记的任意抗生素抗性基因。

可以将线性的敲除构建体直接转染进胚胎干细胞中（下面讨论），或者可以先将它置于合适的载体中，在插入前扩增。合适的载体是本领域的技术人员已知的。

本发明还提供了转基因动物，其可以用于多种目的，例如鉴别可用于 SP-C 介导的肺病的治疗剂。该转基因动物可以用于例如鉴别能调控 SP-C 的生成、例如通过调控 SP-C 基因的表达而实现调控的药物。可以分离 SP-C 基因启动子，例如通过用 SP-C cDNA 片段筛选基因组文库，并根据本领域已知的方法表征。在本发明的优选实施方案中，可以用含有所述的 SP-C 报告基因的转基因动物筛选一类生物活性分子（称作类固醇

激素)调控 SP-C 表达的能力。在本发明的更优选实施方案中,生成了非人动物,其中已经突变了或“敲除了”内源 SP-C 基因的表达。“敲除”动物是携带特定基因的纯合或杂合缺失的动物。这些动物可以用于确定 SP-C 的缺失是否会导致特定表型,特别是这些小鼠是否会或可能发展成特定疾病,例如对肺气肿的高敏感性。而且,这些动物可以用于筛选能减轻或减弱如下所述的 SP-C 基因突变造成的疾病的药物。在本发明的该方面的优选实施方案中,使用在其两个染色体上携带着突变 SP-C 基因座的转基因 SP-C 敲除小鼠作为由缺失 SP-C 表达所造成的疾病的转基因治疗或药物治疗的模型系统。

得到转基因和敲除非人动物的方法是本领域熟知的。在一般方面,通过将特定的转基因以能允许转基因表达的方式整合进基因组中,或者通过破坏野生型基因、导致野生型基因的敲除,可以生产转基因动物。在这里整体引作参考的美国专利号 5,616,491 中一般地描述了制备敲除小鼠所涉及的技术。

生产转基因动物的方法一般地记载在美国专利号 4,736,866; 4,873,191; 5,175,383; 5,824,837; 6,437,216; 6,437,215; 6,374,130 中,其在这里整体引作参考。美国专利号 5,639,457; 5,175,384; 5,175,385; 5,530,179; 5,625,125; 5,612,486 和 5,565,186 也都在这里引作参考,以类似地补充本发明的关于转基因猪、兔、小鼠和大鼠生产的教导。

通过将“敲除”构建体同源地整合进小鼠胚胎干细胞染色体(其编码要敲除的基因),可以生产敲除小鼠。在一个实施方案中,可以使用基因打靶(它是一种使用同源重组来修饰动物基因组的方法)而将改变导入培养的胚胎干细胞中。通过将感兴趣的 SP-C 基因定向到 ES 细胞中,可以将这些变化导入动物的生殖系中,以生成嵌合体。通过将包含与目标 SP-C 基因座同源的片段以及待导入 SP-C 基因组序列的序列修饰(例如,插入、缺失、点突变)的 DNA 打靶构建体导入组织培养细胞中,可以完成基因打靶操作。然后筛选处理的细胞的精确打靶,以鉴别和分离已经适当地打靶的那些细胞。

胚胎干细胞中的基因打靶实际上是本发明预期通过使用打靶转基因

构建体破坏 SP-C 基因功能的方案,该打靶转基因构建体被设计成与一个或多个 SP-C 基因组序列发生同源重组。可以将打靶构建体设计成在与 SP-C 基因的元件重组后,正选择标记将插入(或替换)该基因的编码序列。插入的序列会在功能上破坏 SP-C 基因,同时还提供正选择性状。在下面更详细地介绍了示例性的 SP-C 打靶构建体。

通常,用于生产敲除动物的胚胎干细胞(ES 细胞)与要生产的敲除动物属于相同物种。因而,例如,小鼠胚胎干细胞通常用于生产敲除小鼠。

使用技术人员熟知的方法生产和维持胚胎干细胞,例如 Doetschman 等(1985) *J. Embryol. Exp. Mol. Biol.* 87: 27-45 所述的方法。可以使用任意的 ES 细胞系,但是,通常筛选选定系的细胞整合进发育着的胚胎中、并变成生殖系一部分的能力,以建立敲除构建体的生殖系传递。因此,据信具有该能力的任意 ES 细胞系都适用于本文的用途。优选地用于生产 ES 细胞的一个小鼠株是 129/Sv 株。使用技术人员熟知的方法培养和制备细胞,以用于插入敲除构建体。

典型的敲除构建体含有不小于约 0.5 kb 且不大于约 10.0 kb 的核酸片段,其来自编码要突变的基因的基因组基因座的 5' 和 3' 端。这 2 个片段被编码正选择标记、例如新霉素抗性基因(neoR)的核酸间插片段分隔开。由该基因组位点 5' 最远端的核酸、与之相连接的编码正选择标记的核酸、以及继而连接的感兴趣基因组位点 3' 最远端组成的所得核酸片段中,缺少了要敲除的 SP-C 或其它目标基因的大部分编码序列。当得到的构建体与该基因座中的染色体同源地重组时,导致了从基因组基因座中丢失了缺少的编码序列(也称作结构基因)。可以借助于编码正选择标记的基因在基因组中的稳定整合、及随后在适当药物(在本实例中为新霉素)的存在下选择表达该标记基因的细胞,选择出其中发生了这种罕见同源重组事件的干细胞。

还存在该基本技术的变体,且是本领域熟知的。例如,"敲入"构建体是指编码 5' 基因组基因座片段的核酸连接编码正选择标记的核酸、后者又连接编码 3' 基因组基因座片段的核酸的相同的基本排列,但是其不同之处在于没有去掉编码序列,因而在通过导入能编码正选择标记基因

的核酸破坏之前,使用的5'和3'基因组片段是紧邻的。因而,当要突变的基因仅仅有有限区域的基因组基因座(例如单个外显子)可以用于克隆和遗传操作时,该"敲入"类型的构建体对于突变的转基因动物的构建是非常有用的。或者,"敲入"构建体可以用于特异性地消除靶基因的单个功能域,得到表达缺乏了一种功能、同时保留了其它结构域的功能的靶基因多肽的转基因动物。在敲入技术的一种变化形式中,将标记基因整合在目标基因组基因座处,使得标记基因的表达处于靶基因的转录调节元件的控制下。标记基因是编码可以检测其活性的酶(例如, β -半乳糖苷酶)的基因,可以在合适的条件下将酶底物添加给细胞,并分析酶活性。本领域的技术人员熟知其它的有用标记和检测它们在特定细胞中的存在的方法。例如,一种这样的替代标记是绿色荧光蛋白(GFP)。GFP标记特别适用于检测各活细胞中的基因表达。因而,GFP和有关的标记特别适用于原位分析"敲入"基因的表达水平。所有的这样的标记都包含在本发明的教导范围内。

通过修饰上述的敲除和敲入构建体,使得它们在任一端侧翼连接负选择标记,可以筛选掉非同源重组事件(特别是通过使用胸腺嘧啶激酶基因的2个等位基因变体,可以在本领域熟知的合适的组织培养基(即其含有药物,例如5-溴脱氧尿苷)中表达细胞系中而筛选掉该基因的多肽产物)因而,本发明的这种敲除或敲入构建体的优选实施方案包括编码负选择标记的核酸,其连接编码基因组基因座的5'端的核酸,后者又连接正选择标记的核酸,继而又连接编码相同基因组基因座的3'端的核酸,再连接编码负选择标记的第二核酸。所得到的敲除构建体和基因组之间的非同源重组通常会导致这些负选择标记基因中的1个或2个的稳定整合,因此通过在合适的选择培养基(例如含有药物、例如5-溴脱氧尿苷的培养基)中生长可以筛选掉进行了非同源重组的细胞。同时进行利于正选择标记和不利于负选择标记的筛选,会导致克隆的巨大富集,其中敲除构建体已经同源地重组在要突变的目标基因的基因座处。通过本领域的技术人员熟知的DNA印迹分析技术,可以确定得到的敲除干细胞系中靶基因基因座处的预计染色体改变的存在。或者,可以使用PCR。

要插入细胞中的每个敲除构建体首先必须是线性形式。因此，如果敲除构建体已经插入了载体(如下述)中，则通过用合适的限制性核酸内切酶消化该 DNA 来实现线性化，所选择的该酶仅仅在载体序列内切割，而不在敲除构建体序列中切割。

为了插入，如技术人员已知的，在适于所选择的插入方法的合适条件下，将敲除构建体添加到 ES 细胞中。例如，如果要对 ES 细胞电穿孔，则按照生产商的使用说明书，使用电穿孔机，将 ES 细胞和敲除构建体 DNA 暴露于电脉冲中。电穿孔后，通常在合适的孵育条件下使 ES 细胞恢复。然后如上筛选细胞是否存在敲除构建体。当要将多个构建体导入 ES 细胞时，可以将各敲除构建体同时地或逐个地导入。

通过上述的筛选技术已经鉴别出了在合适的位置含有敲除构建体的合适 ES 细胞后，可以将该细胞插入胚胎中。可以通过技术人员已知的多种方法实现插入，但是优选的方法是通过显微注射。为了显微注射，将约 10-30 个细胞收集进微量移液管中，并注射进处于合适的发育阶段的胚胎中，使含有敲除构建体的外来 ES 细胞整合进发育的胚胎中。例如，可以将转化的 ES 细胞显微注射进胚细胞中。

尽管可以使用处于合适发育阶段的任何胚胎，优选胚胎是雄性的。在小鼠中，优选胚胎还含有编码与 ES 细胞基因编码的皮毛颜色不同的皮毛颜色的基因。以此方式，通过观察嵌合体的皮毛颜色(指示着 ES 细胞掺入进了发育的胚胎中)，可以容易地筛选后代是否存在敲除构建体。例如，如果 ES 细胞系携带白色毛皮的基因，则选择的胚胎可携带黑色或棕色毛皮的基因。

将 ES 细胞导入胚胎后，可以将胚胎植入假孕母的子宫中进行妊娠。尽管可以使用任意的养母，通常选择繁殖和生育能力良好并能照料幼儿的养母。典型地通过与同种的切除了输精管的雄性进行交配，生产出这样的养母。假孕母的阶段对于成功的植入是重要的，且是种属依赖性的。对于小鼠，该阶段是约 2-3 天假孕状态。

当已经采用了皮毛颜色筛选策略(如上面和下面的实施例所述)时，可以初步筛选养母生育的后代的嵌合体皮毛颜色。例外，或者作为替代

方案,可使用上述的 DNA 印迹和/或 PCR,筛选来自后代尾巴组织的 DNA 是否存在敲除构建体。然后,如果认为显示嵌合的后代在其种系中携带着敲除构建体,则可以使之彼此交配,以生成纯合的敲除动物。通过对交配产生的小鼠、和已知为杂合体的小鼠以及野生型小鼠的等量基因组 DNA 进行 DNA 印迹,可以鉴别出纯合体。

可以有鉴别和表征敲除后代的其它方法可供利用。例如,可以使用 RNA 印迹来检测 mRNA,确定是否存在编码敲除基因、标记基因或二者的转录物。另外,当该基因得到表达时,通过用针对特定 SP-C 蛋白的抗体、或者针对标记基因产物的抗体探测蛋白印迹,可以经蛋白印迹来评价后代的不同组织中敲除的 SP-C 基因的表达水平。最后,可以使用合适的抗体对来自后代的各种细胞进行原位分析(例如固定细胞并用抗体标记)和/或 FACS(荧光激活细胞分选术)分析,以确定是否存在敲除构建体基因产物。

还可以生产依赖于重组酶的敲除体,例如通过同源重组以插入靶序列,使得重组酶序列可以控制 SP-C 基因失活的组织特异性的和/或时间性的控制。

以许多方法中的任一种制备含有多个敲除构建体和/或多个转基因表达构建体的动物。优选的制备方法是生成一系列的哺乳动物,每只含有需要的转基因表型中的一种。通过一系列的杂交、回交和筛选,将这些动物一起杂交,最终生成单一的含有全部需要的敲除构建体和/或表达构建体的动物,其中所述动物是与野生型同基因的(遗传上相同的),只是存在敲除构建体和/或转基因。

本发明的转基因动物都在它们的许多细胞中含有本发明的转基因,该转基因能改变"宿主细胞"在调节细胞生长、死亡和/或分化方面的表型。由于可以使用一种或多种本文所述的转基因构建体生产本发明的转基因生物体,将一般性地参考外源遗传物质对转基因生物体的生产进行一般说明。本领域的技术人员可以调整该一般说明,以使用下述的方法和材料将特定的转基因序列整合进生物体中。

在一个解释性的实施方案中,可以利用噬菌体 P 1 的 cre/loxP 重组

酶系统或酿酒酵母的 FLP 重组酶系统体内地生产位点特异性的遗传重组系统，这在本领域是已知的。Cre 重组酶能催化位于 loxP 序列之间的间插靶序列的位点特异性重组。loxP 序列是 34 个碱基对的核苷酸重复序列，Cre 重组酶可以与其结合，并且它们是 Cre 重组酶介导的遗传重组所需要的。loxP 序列的方向决定着在存在 Cre 重组酶时间插靶序列是切割掉还是倒转；当 loxP 序列是正向重复时，将催化靶序列的切割，当 loxP 序列是反向重复时，将催化靶序列的倒转。

因此，靶序列的遗传重组依赖于 Cre 重组酶的表达。重组酶的表达可以由启动子元件调节，后者受到调节控制，例如组织特异性的、发育阶段特异性的、通过外源地加入试剂可诱导的或可抑制的。该调节控制会仅仅在其中重组酶的表达受到该启动子元件介导的细胞中导致靶序列的遗传重组。因此，可以通过控制重组酶的表达来调节重组 SP-C 蛋白的活化表达。

使用 cre/loxP 重组酶系统来调节重组 SP-C 蛋白的表达时，需要构建含有编码 Cre 重组酶和主题蛋白二者的转基因的转基因动物。通过构建"双"转基因动物，可以提供含有 Cre 重组酶和重组 SP-C 基因二者的动物。提供这样的动物的一种方便方法是使 2 只转基因动物交配，它们每只都含有转基因，例如 SP-C 基因和重组酶基因。

在一个示例性的实施方案中，将转基因导入非人动物的生殖系中，产生本发明的"转基因非人动物"。处于不同发育阶段的胚胎靶细胞可以用于导入转基因。根据胚胎靶细胞的发育阶段，可使用不同的方法。选择的用于实现本发明的任何动物的具体品系需具有总体良好的健康、良好的胚胎产率、良好的胚胎原核可视性、良好的繁殖适合性。另外，单倍型是重要因素。例如，当要生产转基因小鼠时，经常使用 C57BL/6 或 FVB 系等株(Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me.)。优选的株是具有 H-2b、H-2d 或 H-2q 单倍型的那些，例如 C57BL/6 或 DBA/1。用于实现本发明的品系自身可以是转基因的和/或敲除的(即，从具有一个或多个部分地或完全地受到抑制的基因的动物得到)。

在一个实施方案中，将转基因构建体导入单一阶段的胚胎中。合子

是最好的显微注射目标。在小鼠中，雄原核达到约 20 微米大小的直径，这允许可重复地注射 1-2p1 DNA 溶液。使用合子作为基因转移的目标具有显著的优点，即在大多数情况下，注射的 DNA 会在首次分裂之前整合进宿主基因中 (Brinster 等 (1985) PNAS 82 : 4438-4442)。这样，转基因动物的所有细胞都会携带整合的转基因。这也会一般地反映在转基因向亲本的后代的有效传递中，因为 50% 的生殖细胞会带有转基因。

通常，在合适的培养基中孵育受精的胚胎，直到出现原核。约在此时，如下所述将含有转基因的核苷酸序列导入雌性或雄性原核中。在有些种属、例如小鼠中，雄性原核是优选的。最优选的是，在其被卵子核或合子雌性原核加工之前，将外源遗传物质添加到合子的雄性 DNA 互补体中。认为卵子核或雌性原核会释放出能影响雄性 DNA 互补体的分子，这可能是通过用组蛋白替换雄性 DNA 的精蛋白，由此促进雌性和雄性 DNA 互补体的结合，形成二倍体合子而实现的。

因而，优选地，在其受到雌性原核的影响之前，将外源遗传物质添加到 DNA 的雄性互补体或 DNA 的任何其它互补体中。例如，在形成雄性原核之后尽可能快地，也就是当雄性和雌性原核较好地分离、且都位于临近细胞膜时，将外源遗传物质添加到早期雄性原核中。或者，在诱导解聚后，可以将外源遗传物质添加到精子的核中。然后将含有外源遗传物质的精子添加到卵子中，或者可以将解聚的精子尽可能快地添加到具有转基因构建体的卵子中。

可通过本领域已知的任意方法，将转基因核苷酸序列导入胚胎中，例如显微注射、电穿孔或脂转染。将转基因核苷酸序列导入胚胎中以后，可以体外孵育胚胎不同的时间，或者重新植入代宿主中，或者二者兼之。体外孵育至成熟也在本发明的范围内。一种常用的方法是，根据种属的不同，体外孵育胚胎约 1-7 天，然后将它们重新植入代宿主中。

为了本发明的目的，合子基本上是能发育成完整生物体的二倍体细胞的形式。通常，该合子会含有卵子，后者含有通过自然地或人工地融合来自一个或多个配子的 2 个单倍体核形成的核。因而，配子核必须是可天然相容的，即其会产生能进行分化和发育成有功能生物体的活合子。

通常，整倍体合子是优选的。如果得到了整倍体合子，那么染色体的数目相对于任一配子来源生物体的整倍体数目的变化不会超过1个。

除了类似的生物学因素外，物理因素也会影响可以添加到合子核或形成合子核一部分的外源遗传物质的量(例如，体积)。如果没有去除遗传物质，那么可以添加的外源遗传物质的量会受到没有物理破坏时可以吸附的量的限制。通常，插入的外源遗传物质的量不超过约10皮升。添加的物理作用不应当大到能物理地破坏合子的生存力。DNA序列的数目和种类的生物学限制会随特定合子和外源遗传物质的功能而变化，且是本领域的技术人员能容易地明白的，因为得到的合子的遗传物质(包括外源遗传物质)必须能在生物学上启动和维持合子分化和发育成有功能生物体。

添加到合子中的转基因构建体的拷贝数取决于添加的外源遗传物质的总量，且是能发生遗传转化的量。理论上仅仅需要1个拷贝，但是通常使用多个拷贝，例如1,000-20,000个拷贝的转基因构建体，以确保有1个拷贝是有功能的。关于本发明，常常有利的是每种插入的外源DNA序列有多个有功能拷贝，以增强外源DNA序列的表型表达。

可以使用能将外源遗传物质添加到核遗传物质中的任何技术，只要它不会破坏细胞、核膜或其它的已有细胞结构或遗传结构即可。优选地，通过显微注射将外源遗传物质插入核遗传物质中。细胞和细胞结构的显微注射是本领域已知的并已得到使用。

使用标准方法完成重新植入。通常，麻醉代宿主，将胚胎插入输卵管中。植入特定宿主中的胚胎的数目会因种属而异，但是通常与该种属天然地生成的后代的数目相当。

通过任意的合适方法，可以筛选代宿主的转基因后代是否存在和/或表达转基因。筛选经常是通过DNA印迹或RNA印迹分析完成，其中使用与转基因的至少一部分互补的探针。可以使用针对由转基因编码的蛋白的抗体进行蛋白印迹分析，作为筛选转基因产物存在情况的替代或附加方法。通常，从尾组织制备DNA，并通过DNA印迹分析或PCR分析转基因。或者，通过DNA印迹分析或PCR测试被认为以最高水平表达转基因

的组织或细胞是否存在和表达转基因，当然任意的组织或细胞类型都可以用于该分析。

验证转基因的存在情况的替代或附加方法包括但不限于合适的生化实验，例如酶和/或免疫学实验、对特定标记或酶活性的组织学染色、流式细胞仪分析等。也可以使用血液分析来检测转基因产物在血液中的存在情况，以及评价转基因对不同类型的血细胞和其它血液组分的水平的影响。

通过使转基因动物与合适的伴侣交配，或者通过从转基因动物得到的卵子和/或精子的体外受精，可以得到转基因动物的后代。当要进行与伴侣的交配时，伴侣可以是或不是转基因的和/或敲除的；当它是转基因的时，它可以含有相同的或不同的转基因、或二者。或者，伴侣可以是亲本品种。当使用体外受精时，可以将受精的胚胎植入代宿主中，或体外孵育，或进行二者。使用任一种方法，经上述的方法或其它的合适方法可以验证后代是否存在转基因。

根据本发明制备的转基因动物会包含外源遗传物质。如上所述，外源遗传物质在某些实施方案中是 DNA 序列，其会导致 SP-C 蛋白(激动性或拮抗性)和反义转录物或 SP-C 突变体的生成。而且，在这样的实施方案中，所述序列将连接转录控制元件，例如启动子，其优选地能够允许在特定类型的细胞中表达转基因产物。

还可以使用逆转录病毒感染来将转基因导入非人的动物中。可以将发育着的非人胚胎体外培养至囊胚泡阶段。在该过程中，分裂球可以作为逆转录病毒感染的目标(Jaenich, R. (1976) PNAS 73: 1260-1264)。通过酶促处理去除透明带，可以有效地感染分裂球 (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan 编 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1986)。用于导入转基因的病毒载体系统典型地是携带转基因的复制缺陷型逆转录病毒(Jahner 等(1985) PNAS 82: 6927-6931; Van der Putten 等(1985) PNAS 82: 6148-6152)。通过在能产生病毒的细胞单层上培养分裂球，可以容易地和有效地进行转染 (Van der Putten, supra; Stewart 等(1987) EMBO J. 6: 383-388)。或者，可以在较晚的

阶段进行转染。可以将病毒或能产生病毒的细胞注射进囊胚腔中(Jahner 等(1982) Nature 298: 623-628)。大多数亲本会是转基因的嵌合体, 因为整合仅仅存在于形成转基因非人动物的细胞的一部分中。而且, 亲本可以在基因组的不同位点含有转基因的各种逆转录病毒插入, 所述基因组通常在后代中分裂。另外, 通过妊娠中的胚胎的子宫内逆转录病毒感染, 也可以将转基因导入种系中(Jahner 等(1982) supra)。

第3种用于导入转基因的靶细胞是胚胎干细胞(ES)。ES细胞是从体外培养的植入前胚胎得到的, 并可与胚胎融合。通过DNA转染或通过逆转录病毒-介导的转导, 可以将转基因有效地导入ES细胞中。此后, 这样转化的ES细胞可以与来自非人动物的囊胚泡结合。这样, ES细胞会在胚胎中定居, 并参与所得嵌合动物的遗传系。

药物筛选

本发明提供了多种转基因细胞系和生物体, 其中可以进行药物筛选, 以鉴别能实现SP-C介导的肺部过程的化合物。如上所述, 转基因细胞系和生物体被加工成内源SP-C基因活性缺陷的。所导致的内源SP-C活性的损失通常会导致"急性阶段反应"。急性阶段反应进一步引发肺部过程, 包括上述的各种肺病和障碍的那些特征。

上面鉴别出的可以用于预防SP-C介导的肺部过程的化合物可以是例如核酸(例如DNA、RNA或PNA)、蛋白、肽、肽模拟物、小分子或其衍生物。优选的化合物能结合并调节SP-C基因或蛋白的转录、翻译、加工或活性。其实例包括反义、核酶或三链核酸、小分子配体、抗体或抗体样结合片段。

通过在细胞培养物或实验动物中进行标准的药理学方法, 例如测定LD₅₀ (对50%群体致死的剂量)和ED₅₀ (在50%群体中治疗上有效的剂量), 可以检测这样的化合物的毒性和治疗功效。毒性和治疗作用的剂量比是治疗指数, 可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。表现出较大治疗效应的化合物是优选的。尽管可以使用表现出毒副作用的化合物, 但应该小心地设计用于将这样的化合物定位到受影响组织位点的递送系统, 以使对未感染细胞

的潜在损害最小化，并由此减小副作用。

从细胞培养实验和动物研究得到的数据可以用于配制一定范围的用于人类的剂量。这样的化合物的剂量优选地在循环浓度的范围内，其中包含具有较小的毒性或无毒性的 ED_{50} 。剂量可以在该范围内，随采用的剂型和使用的给药途径而变化。对于在本发明的方法中使用的任何化合物，可以从细胞培养实验中初步估计治疗上有效的剂量。可以在动物模型中确定剂量，以达到包括如在细胞培养中确定的 IC_{50} (即，达到实现半数最大抑制症状的实验化合物的浓度) 的循环血浆浓度范围。这样的信息可以用于更准确地确定在人类中有用的剂量。可以测量血浆中的水平，例如通过高效液相色谱。

使用一种或多种生理上可接受的载体或赋形剂，可以以常规方式配制根据本发明使用的药物组合物。因而，可以将化合物和它们的生理学可接受的盐和溶剂化物配制成用于给药的制剂，例如通过注射、吸入或吹入（通过嘴或鼻子）或经口的、经颊的、非肠胃或直肠给药。

对于这样的治疗，本发明的化合物可以配制成用于多种给药装载的制剂，包括全身的和局部的或区域的给药。对于全身给药，注射是优选的，包括肌肉内的、静脉内的、腹腔内的和皮下的。对于注射，本发明的化合物可以配制在液体溶液中，优选地在生理上相容的缓冲液中，例如 Hank 氏溶液或 Ringer 氏溶液。另外，化合物可以配制成固体形式，且在即将使用前重新溶解或悬浮。冻干形式也包括在内。

对于经口给药，药物组合物可以采用与药学上可接受的赋形剂通过常规方法制成的形式，例如片剂或胶囊，所述的赋形剂例如结合剂（例如，预明胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素）；填充剂（例如，乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙）；润滑剂（例如，硬脂酸镁、滑石或硅石）；崩解剂（例如，马铃薯淀粉或淀粉乙醇酸钠）；或润湿剂（例如，月桂基硫酸钠）。可以通过本领域熟知的方法对片剂进行包衣。用于经口给药的液体制剂可以采用例如溶液、浆或悬浮液等形式，或者它们可以制成用于在使用前与水或其它合适的载体进行配制的干产物。通过常规方法，可以与药学上可接受的添加剂一起制备这样的液体制剂，例如悬

浮剂(例如,山梨醇浆、纤维素衍生物或氢化的可食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水性介质(例如,atond 油、油基酯、乙醇或分级分离的植物油);和防腐剂(例如,甲基或丙基-对羟基苯甲酸酯或山梨酸)。制剂在合适时还可以含有缓冲盐、芳香剂、着色剂和甜味剂。

可以将经口给药的制剂合适地配制成能控释活性化合物的剂型。对于经颊给药,可以采用常规方法将组合物制成片剂或锭剂。对于吸入给药,根据本发明使用的组合物可简便地借助于合适的推进剂以气溶胶形式(从增压的包装或喷雾器中呈递)递送,所述的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它的合适气体。在增压的气溶胶的情况下,可以通过阀门递送计量的量,可以确定剂量单位。可以将例如用在吸入器或吹入器中的例如明胶胶囊和药筒配制成含有化合物和合适的粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物的制剂。

可以将化合物配制成用于非肠胃的注射给药制剂,例如通过推注或连续灌输给药。注射制剂可以与添加的防腐剂一起制成单位剂型,例如在安瓿中或在多剂容器中。组合物可以采取例如在油性或水性介质中的悬浮液、溶液或乳状液的形式,且可以含有辅剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是粉末形式,用于在使用前与合适的介质(例如无菌的无热源的水)进行配制。

还可以将化合物配制在直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠剂中,其中例如含有常规的栓剂基质,例如可可油或其它甘油酯。

除了前述制剂外,还可以将化合物配制成长效制剂(depot preparation)。这样的长期作用制剂可以通过植入(例如皮下地或肌肉内地)或通过肌肉内的注射来给药。因而,例如,可以将化合物与合适的聚合物或疏水性材料(例如作为在可接受的油中的乳状液)或者离子交换树脂一起配制,或作为微溶的衍生物,例如作为微溶的盐。其它的合适递送系统包括微球,其提供长时间地非侵入地局部递送药物的可能性。该技术使用前毛细管大小的微球,可以通过冠状动脉导管注射进例如心脏或其它器官的任何选定的部分,而不会造成炎症或缺血。所施用的治疗剂缓慢地从这些微球中释放出来,并被周围的组织细胞(例如内皮细胞)

摄入。

还可以通过透粘膜的或透皮的方法进行全身给药。对于透粘膜或透皮给药，在制剂中要使用适于待穿过的屏障的渗透剂。这样的浸润剂通常是本领域已知的，包括例如用于透粘膜给药的胆汁盐和梭链孢酸衍生物。另外，可以使用去污剂促进渗透。透粘膜的给药可以通过经鼻喷射或使用栓剂。对于局部给药，可以将本发明的寡聚物配制在软膏、药膏、凝胶或乳剂中，如本领域通常已知的。可以使用洗液局部地处理伤口或炎症，以加速愈合。

在治疗剂是基因的情况下，可以通过许多方法中的任一种将基因递送系统导入患者中，这些方法都是本领域熟知的。例如，可以将基因递送系统的药物制剂全身地导入，例如通过静脉内注射，蛋白质在靶细胞中的特异性转导主要源自基因递送介质提供的转染特异性、由于控制受体基因表达的转录调节序列造成的细胞类型或组织类型表达、或其组合。在其它的实施方案中，重组基因的起始递送更加受到限制，向动物中的导入非常局部化。例如，基因递送介质可以通过导管或通过趋实体注射导入。使用本领域已知的技术，通过电穿孔，可以将治疗基因（例如编码反义 RNA 或核酶的基因）在基因治疗构建体中进行递送。

基因治疗制剂可以基本上由在可接受的稀释剂中的基因递送系统组成，或者可以包含缓释基质，其中嵌入了基因递送载体或化合物。或者，当可以从重组细胞中完整地生产出完整基因递送系统（例如逆转录病毒载体）时，药物制剂可以含有一个或多个能生成基因递送系统的细胞。

如果需要，组合物可以制备在包装或分配器中，其中可以含有一个或多个含有活性成分的单位剂型。该包可以例如含有金属或塑料薄片，例如泡罩包装。包装或分配器可以伴有关于施用的说明书。

下面的实施例进一步解释了本发明，它们不应当理解成以任何方式进行限制。在本申请中引用的所有文献（包括参考文献书目、授权专利、公开的专利申请）的内容都在这里特别地引作参考。除非另有说明，本发明的实施将采用常规的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的技术，这都在本领域的技术范

围内。在文献中清楚地解释了这样的技术。参见, 例如, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版, Fritsch 和 Maniatis 编 (Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989); DNA Cloning, 卷 I 和 II (D. N. Glover ed. , 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. , 1984) ; Mullis 等, 美国专利号 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins 编 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins 编 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller 和 M. P. Calos 编, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Methods In Enzymology, 卷 154 和 155 (Wu 等编), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer 和 Walker 编, Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, 卷 I-IV (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, 编, 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. , 1986)。

材料和方法

动物

如前所述 [11], 通过定位基因失活生成了 SP-C (-/-) 小鼠。一般地, 筛选 129/J 小鼠基因组文库, 以鉴别与 129 衍生的 ES 细胞同源的 SP-C 基因基因组克隆。含有 SP-C 基因的外显子 2-6 的 2.1-kb BamHI 片段用于基因的修饰。通过用 1.6-kb pGKneo 基因盒进行插入诱变, 打断编码 SP-C 肽的疏水性多缬氨酸结构域的序列。通过在新霉素类似物 G418 中生长, 该插入为打靶细胞提供了正筛选。用 ApaLI 消化了 2.1-kb SP-C 质粒, 该酶剪切位于 SP-C 多缬氨酸结构域中的独特的 ApaLI 位点。将 ApaLI 连接物 pGKneoBPA 盒连接进 SP-C ApaLI 位点中。将跨越外显子 1

和 5' 侧翼 DNA 的 1.3-kb PstI 至 BamHI 片段连接到 2.1-kb Bam-pGKneoBPA 片段的 5' BamHI 位点处。通过将单纯疱疹病毒胸苷激酶基因克隆进 5' SphI 位点, 进一步修饰了打靶构建体, 提供了针对构建体非同源整合的丙氧鸟苷筛选。

用纯化的 SP-C 打靶构建体 DNA 电穿孔 ES 细胞的 D3R 株, 如(15)所述进行筛选。用 Bsu36I 消化 ES 细胞 DNA, 用打靶构建体序列之外的探针进行分析。探针是临近打靶构建体的 5' 末端的 457-bp SphI-PstI 片段。通过多限制酶切的基因组 DNA 印迹, 确认了阳性克隆。

将携带被打靶的 SP-C 等位基因的 ES 细胞克隆显微注射进 C57/B16 囊胚泡中, 并植入宿主小鼠。通过嵌合野灰色皮毛颜色鉴别嵌合的后代, 并与 NIH 瑞士黑 (Tac: N: NIH3T3/Br, 来自 Taconic 农场) 雌性杂交。通过对 BglIII-和 SphI-消化的尾 DNA 进行基因组 DNA 印迹分析, 筛选野灰色后代中被打靶 SP-C 等位基因的种系传递。457 bp 5' Sph-Pst 片段用作探针。繁殖 SP-C 突变杂合的 F1 后代 (+/-), 建立 SP-C (+/+), SP-C (+/-) 和 SP-C (-/-) 小鼠群。所有的小鼠都维持在无病原体的隔离区, 并供给过滤过的空气、水和高压灭菌的食物。

将嵌合的建立者小鼠与 129/Sv 小鼠 Taconic (Germantown, NY) 杂交。通过基因组 DNA 印迹分析, 分析后代的被打靶 SP-C 等位基因的传递。繁殖被打靶等位基因阳性的动物, 建立针对该被打靶 SP-C 等位基因而言纯合的 129/Sv 小鼠。将小鼠维持在隔离区。在无菌条件下处理所有的动物, 关在灭菌的室中, 并供给供给过滤过的空气、水和高压灭菌的食物。来自该室的标记小鼠对常见病毒、细菌或寄生性病原体是阴性的。在 12 月龄, 在无菌条件下从 SP-C (-/-) 和野生型同窝幼仔制备的肺匀浆不含有细菌或真菌。23 只小鼠病毒病原体的血清学是阴性的。

形态学分析

通过腹腔内注射氯胺酮、甲苯噻嗪和乙酰丙嗪的混合物, 处死小鼠。通过气管内滴注 25 cm 水压的 4% 低聚甲醛, 使肺膨胀。过夜固定后, 通过常规的石蜡包埋处理组织。用苏木精-曙红、Mason 氏三色染料或地衣

红染料对 6 微米的组织切片进行染色。使用前述的方法[13]，利用生物素化的一抗或二抗和抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶(Vector Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)或链霉抗生物素蛋白(Zymed Laboratories, Burlingame, CA)，对 MAC-3、MUC5A/C、CCSP、SP-B、TTF-1 和 α -SMA 进行免疫组织化学染色。对从 9 月龄 SP-C (-/-) 和年龄匹配的对照得到的、在如前述[14]用戊二醛固定后的肺组织进行电子显微镜检查。

磷脂和表面活性剂蛋白

用戊巴比妥钠(100 mg/kg 腹腔内)麻醉 15 月龄的小鼠(n=5/组)，并放血处死。插入导管，将 5 份 1 ml 的 0.9%NaCl 等分试样灌进肺中，对于每份试样，通过注射剂抽取 3 次。取出灌洗过的肺组织，在 2 ml 0.9%NaCl 中匀浆。使用四氧化锇，分离在气管肺泡灌洗液(BALF) 和肺组织的脂提取物中的饱和磷脂酰胆碱(饱和 PC)[15]，随后进行磷检测[16]，如前所述[11]。对于磷脂组分分析，将 BAL 后的肺组织的提取脂质用于二维薄层色谱[17]。使用碘蒸汽使斑点可视化，刮掉，并检测磷含量。在 SDS-PAGE 后，通过蛋白印迹分析 BALF 中的表面活性剂蛋白[11, 18]。

细胞因子测量

在 BALF 和灌洗后的全肺匀浆物中检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-13 和 IL-6 的浓度。检测了每种基因型的 5 只动物。根据生产商的说明书使用 ELISA 试剂盒(R&D Systems, Minneapolis, MN)。

MMP 活性

如前所述[19]，在从 12 月龄的 SP-C (-/-) 或 SP-C (+/+) 129/Sv 小鼠收集的巨噬细胞条件培养基中检测基质金属蛋白酶(MMP-2 和 MMP-9)活性。通过用 1 ml PBS 连续灌洗肺，分离出巨噬细胞。合并灌洗液，并以 5×10^5 细胞/孔的密度在 24 孔组织培养皿中培养 24 小时，使用的是无

血清的 RPMI 培养基,其中添加了 1% Nutriodoma (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)和 1% 抗生素。通过将 100 μ l 培养基与 15 μ l 明胶-Sepharose 4-B 珠子 (Amersham Pharmacia, Arlington Heights, IL) 在 4° C 孵育 3 小时,浓缩来自条件培养基的蛋白酶。通过温和离心沉淀珠子,用 PBS 洗涤,并将珠子在不含 BME 的 Laemmli 样品缓冲液中在 37° C 孵育 1 小时而洗脱蛋白酶。在非还原条件下,通过在 10%Zymogram 明胶凝胶 (NOVEX, San Diego, CA) 中进行电泳,直接分析样品。用 2.5% Triton X-100 洗涤凝胶 2 次(每次 15 分钟),并在显影缓冲液(50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl_2)中孵育 16 小时。然后在 50%甲醇、10%醋酸中的 0.5%(重量/体积)考马斯蓝中对凝胶进行染色,随后部分脱染,显示出蛋白酶活性的清楚条带。

肺力学

在 15 月龄的野生型和 SP-C(-/-)小鼠(n=5/组)的气道和/或肺薄壁组织中检测阻力和弹力。用 0.1 ml/10 g 体重的混合物(含有 40 mg/ml 氯胺酮和 2 mg/ml 甲苯噻嗪)麻醉小鼠(腹腔内)。切开小鼠的气管,使用电脑化 flexiVent (SCIREQ, Montreal, Canada)递送的强制振动技术(0.25-20 Hz)检测呼吸阻抗[20]。通过将模型对每个阻抗谱拟合,得到了在 2 cm H_2O PEEP 时小鼠的估计的总肺顺应性、气道阻力、气道弹回性、组织衰减和组织弹回性。将滞后性计算为组织衰减和组织弹回性的比率。使用该系统,校准程序去除了装置和气管的阻抗。

在 10-12 月龄的野生型和 SP-C(-/-)小鼠(n=5/组)中,研究了压力-容积关系。用戊巴比妥钠(100 mg/kg 腹腔内)麻醉小鼠,并置于含有 100% O_2 的盒子中,以确保 O_2 吸收能完全崩塌肺泡。放血处死小鼠后,将插管插入气管中,连接到压力传感器(小鼠肺测试系统, TSS, Cincinnati, OH),并在充气和放气过程中以 5 cm H_2O 的间隔测定每 kg 体重的肺容积[21]。

结果

SP-C(-/-) 129/Sv 同类系小鼠

将从 129/Sv 胚胎干细胞生成的 SP-C(+/-) 嵌合建立者与 129/Sv 小鼠杂交。由于仅仅 ES 细胞衍生的精子会传递来自嵌合雄性建立者的 SP-C 突变，故 SP-C(-/-) 后代全部是从 129/Sv 精子细胞生成的。因而，SP-C(-/-) 后代代表了纯系株。在 2 月龄的 SP-C(-/-) 小鼠中观察到了较差的健康状况和降低的生殖力。超过 6 月龄的动物生产的幼仔较少。在超过 6 月龄的所有 SP-C(-/-) 129/Sv 动物中都观察到理毛行为较差和结膜炎。在大多数 2 月龄后 SP-C(-/-) 小鼠中观察到了皮毛状况的恶化。与对照组相比，12-13 月龄的 SP-C(-/-) 小鼠的平均体重减小了 24% ($25.7\text{g} \pm 3.2$, $n=7$ 和 $33.5\text{g} \pm 3.0$, $n=7$)。在这些更老的 SP-C(-/-) 小鼠中，由心脏/体重比测得相对心脏重量有所增加。比率增加了 30%，右心室比左心室增加更多，为 0.00565 ± 0.00026 , $m \pm \text{SD}$, $n=10$ (SP-C(-/-) vs 0.00431 ± 0.00033 , $m \pm \text{SD}$, $n=7$ (SP-C+/+), $p<0.007$ 。

SP-C(-/-) 小鼠的肺中的形态学变化

尽管 SP-C(-/-) 小鼠的肺结构在出生时是正常的(未显示数据)，在 2 月龄时观察到了肺泡的增大，此后，与肺气肿的发展相一致，图 1。肺泡隔膜是不规则的，在整个肺薄壁组织中观察到了没有或缩短了肺泡隔膜片。检测到了通常由肺泡巨噬细胞和其它单核细胞组成的多病灶细胞浸润，图 1B。在来自 6 月龄小鼠的肺中，普遍观察到增强的薄壁组织浸润。在肺薄壁组织中观察到了广泛区域的 II 型细胞增生和间质增厚。薄壁组织异常和细胞浸润的范围和严重性随着年龄增加，经常在 12 月龄时产生具有完全闭塞的一些肺泡室的区域。在肺泡和气道中观察到了具有上皮细胞增生、间质增厚和纤维化的区域。在大多数严重感染的动物中检测到了广泛的血管周围和细支气管周围单核细胞浸润，图 1F。

肺泡重造

三色染色证实了肺薄壁组织、胸膜表面和血管周围与细支气管周围位点处的纤维化区域，图 2。在一些区域，胶原沉积以延伸的网状结构

分布在整個肺薄壁組織中。在 SP-C (-/-) 小鼠的肺泡中，觀察到了廣泛的 α -SMA 染色，指示成肌纖維細胞轉化。 α -SMA 染色的強度和範圍通常隨着年齡增加，但是在肺切片內部和同窩幼仔之間會有變化，圖 2。在 SP-C (-/-) 小鼠的肺泡破壞區觀察到了用地衣紅染色檢測的肺泡彈性蛋白纖維網絡的喪失，圖 2。地衣紅染色減少的區域局限在三色染色增加的位點支持了下述觀點，即肺泡重造的嚴重性與 SP-C 缺陷型小鼠中的肺纖維化相關聯。

電子顯微鏡觀察的發現

在電子顯微鏡水平，SP-C (-/-) 小鼠的肺泡經常是增厚的，並襯有增生性的 II 型上皮細胞，圖 3A。在襯層肺泡表面中觀察到了增加數目的立方細胞，且 II 型細胞含有過量數目的片層體。毛細管壁增厚，或被周圍的間質組織和膠原所閉塞。支氣管和細支氣管襯有高度非典型的柱狀上皮細胞。導氣道襯有無纖毛的柱狀上皮細胞，後者含有許多非典型的電子致密細胞器，這與 Clara 細胞的非典型性線粒體特征一致 [22]。II 型細胞是肥大的，含有增加數目的片層體和脂包含物。在肺泡中，基底膜是增厚的，含有許多膠原纖維。許多毛細管內腔是閉塞的，且纖維化區域能被容易地辨別出來。較大管的基底膜和內皮表面受到破壞。異常的肺泡巨噬細胞含有大量積累的具有管狀髓磷脂和片層體結構特征的表面活性劑樣物質，圖 3。

巨噬細胞形態學和異常的脂類積累

在 SP-C (-/-) 小鼠的肺泡室中的單核細胞亞群被 MAC3 抗体（肺泡巨噬細胞的細胞標記）強烈染色，圖 4B。在肺泡巨噬細胞中觀察到了異常的胞內脂質內含物，圖 4D。同樣地，在襯有殘余肺泡的增生性 II 型上皮細胞中也觀察到了類脂積累，圖 4D。在超結構水平上，非典型的肺泡巨噬細胞含有豐富的表面活性劑組分，包含片層體和管狀髓磷脂（胞外形式的肺表面活性劑），圖 3。其它的巨噬細胞含有許多胞質晶體，與 Ym1（哺乳動物凝集素）形成的相一致 [23]。質譜分析確認了在 BALF 中存在

增加的 Yml (未显示数据)。在来自维持在该隔离区的对照 129/Sv 的肺泡巨噬细胞中没有检测到胞内晶体和脂类的积累。在来自 6 月龄 SP-C(-/-)小鼠的 BALF 中,肺泡巨噬细胞的数目增加了 4.4 倍,在 SP-C(-/-)和 SP-C(+/-)中分别是 9021 ± 1017 和 2039 ± 497 , ($n=5$)。淋巴细胞的百分比没有改变。没有观察到多形核细胞和嗜曙红细胞的变化。

上皮细胞发育异常

在 SP-C(-/-)小鼠中观察到了引导气道上皮细胞形态学的显著变化,图 5。在 6 至 12 月龄,上皮细胞发育异常是显而易见的,导气道衬有增生性的假复层柱状上皮细胞,图 1F, 5B。尽管在野生型小鼠中难以见到 MUC5A/C 染色的细胞,但 MUC5A/C 阳性细胞衬在 SP-C(-/-)小鼠的大多数导气道处,图 5D。导气道的 MUC5A/C 染色通常是广泛的,但是染色图案会不均一。检测到了 Clar 细胞分泌蛋白 (CCSP) 和 proSP-B 的免疫染色,但是在严重感染的 SP-C(-/-)小鼠导气道中,染色的范围和强度有所降低,这也与上皮细胞发育异常相一致(未显示数据)。在肺泡中,在广泛的上皮细胞增生区域观察到了隔膜增厚和致密的单核细胞浸润。但是,在一些具有严重气隙重造的区域内,有些肺泡缺少 II 型细胞。在这些病变中,鳞片状细胞的网状链形成了缺少毛细管的肺泡。

肺力学

在更高压力下的压力-容积曲线的放气部分, SP-C(-/-)中的肺容积比野生型小鼠显著增加(图 6),这与在组织学上观察到的肺气肿相一致,图 1。在更低的压力下,肺容积是正常的,且剩余的肺容积维持在 0 压力,这与正常的表面活性剂功能相一致。类似地,在 7 ml/kg 的换气容积下 SP-C(-/-)和对照小鼠的动态肺顺应性之间没有显著差异,表 II。尽管气道和组织的弹回性没有变化,但 SP-C(-/-)小鼠中的气道阻力和组织衰减显著增加 ($p<0.05$)。SP-C(-/-)小鼠中的滞后性显著增加 ($p<0.01$)。这些发现与观察到的肺气肿相一致,并且与表面活性剂功能的维持相一致。在 SP-C(-/-)小鼠中,表面活性剂组分组织和总表面活

性剂磷脂库大小增加了约 2 倍, 图 7。BAL 后肺组织中的脂类组成没有变化, 表 I。通过 BALF 的蛋白印迹分析, 估计了 SP-A、SP-B 和 SP-D。尽管表面活性剂蛋白 B 的水平没有变化, 但 SP-C (-/-) 小鼠中的 SP-A 和 SP-D 显著增加。

表 I. 肺组织中的磷脂成分

	SP-C (+/+) $\mu\text{mol/kg}$	SP-C (-/-) $\mu\text{mol/kg}$
SM	6.8 ± 0.6	5.9 ± 1.0
Lyso PC 1	8.4 ± 1.0	21.5 ± 3.3
PC	70.0 ± 3.1	82.5 ± 12.4
PI	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.4
PS	5.3 ± 1.2	6.1 ± 0.6
PE	22.9 ± 1.5	25.8 ± 4.0
PG	3.3 ± 0.8	4.2 ± 0.5

值为平均值 $\pm$ SE, $n=5$ /组。

SM: 鞘磷脂; PS: 磷脂酰丝氨酸; PC: 磷脂酰胆碱; PE: 磷脂酰乙醇胺; PI: 磷脂酰肌醇; PG: 磷脂酰甘油

表 II. 使用强制振动技术得到的肺力学参数

	SP-C (+/+)	SP-C (-/-)
顺应性 ($\text{ml}/\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{kg}$)	1.45 ± 0.11	0.69 ± 0.01
气道阻力 ($\text{cmH}_2\text{O} \cdot \text{s}/\text{ml}$)	20.2 ± 0.5	2.38 ± 0.03
气道弹回性 ($\text{cmH}_2\text{O}/\text{ml}$)	19.3 ± 0.7	
0.123 $\pm$ 0.006		
组织衰减 ($\text{cmH}_2\text{O}/\text{ml}$)	1.54 ± 0.10	$0.80 \pm 0.04^*$
组织弹回性 ($\text{cmH}_2\text{O}/\text{ml}$)	20.1 ± 0.8	$3.34 \pm 0.21^*$
滞后性	20.0 ± 1.0	
0.167 $\pm$ 0.008*		

值为平均值 $\pm$ SE。通过 2 条尾巴的 Student t-检验评定为 $*p < 0.05$, $n=5$ /组。

细胞因子和金属蛋白酶表达

确定了来自 6 月龄小鼠的 BALF 和肺匀浆物中促炎细胞因子的浓度。SP-C(-/-) 小鼠中的 TNF- α 、IL-6、MIP-2 和 IL-13 没有变化。通过 SDS/PAGE 酶谱, 测试了来自 1 年龄的 SP-C(-/-) 和 (+/+) 小鼠的培养肺泡巨噬细胞的上清液的 MMP 活性。在来自 SP-C(-/-) 巨噬细胞的条件培养基中可以容易地检测到明胶酶活性, 但是在来自对照巨噬细胞 (SP-C+/+) 的培养基中检测不到。蛋白酶条带在约 72 kDa 和 92 kDa 迁移, 分别与 MMP-2 和 MMP-9 相一致(未显示数据)。另外, 与野生型小鼠相比, 在来自 SP-C(-/-) 的肺 RNA 中 MMP-12 mRNA 增加了 3.58 倍。提高的 MMP 活性的表达可能促进了在 SP-C(-/-) 小鼠中观察到的肺泡重造。

讨论

在 SP-C(-/-)/129/Sv 小鼠同类系中 SP-C 基因的打靶缺失造成了特征在于肺气肿、上皮细胞发育异常、单核细胞浸润、肺纤维化和异常脂积累的严重肺病。异质性肺病变包括 1) 增厚的、纤维化的肺泡壁, 其染上了 α -平滑肌肌动蛋白; 2) 广泛的单核细胞浸润和增加的金属蛋白酶的表达, 3) 具有隔膜变薄和肺毛细血管退化的严重的肺气肿区域, 4) 导气道中的上皮细胞发育异常和 MUC5A/C 表达, 和 5) 不同细胞类型中的胞内脂类的积累。在 SP-C(-/-) 小鼠中的病理学发现与在来自患有称作特发性间质性肺炎(IIP) 的各种疾病的患者的肺中观察到的现象相一致, 但是并不相同。因而, 可以将 SP-C 或 proSP-C 的缺乏直接与小鼠中间质性肺炎的发病机理相联系。

近来, 已将 SP-C 基因中的突变与家族性间质性肺炎联系起来了, 后者作为常染色体的显性影响而遗传[8, 9]。在具有突变 c460+1G $\rightarrow$ A (导致 proSP-C 肽的外显子 4 缺失) 的同胞群中, 错误加工的 proSP-C 在 II 型上皮细胞内积累; 组织和肺灌洗物质缺少有活性的 SP-C 肽[8]。类似地, 单碱基对取代(L188Q) 改变了一个扩展的具有 IIP 的家族中 proSP-C 的亚细胞定位[9]。因此, 尚不清楚这些患者中的严重肺病是否由 SP-C 的缺失、或者错误折叠的突变 SP-C 或 proSP-C 蛋白的异常积累造成。本

研究证实了, SP-C 的缺失本身可以重现许多与各种形式的成人和儿童间质性肺炎相一致的病理学发现。

尽管缺少 proSP-C 和/或 SP-C 会在小鼠中造成严重肺病, 该疾病的分子发病机理仍不清楚。在光学显微镜水平, SP-C(-/-)小鼠的肺结构在 E19.5 和出生后第 1 天是正常的(未显示数据)。随着年龄的增长, 肺结构中观察到的异常增加, 表明肺气肿和重造不是由肺形态形成中的异常造成, 而是源自进行中的损伤和修复过程。以前已经发现与肺气肿和炎症相关联的各种促炎细胞因子的表达在 SP-C(-/-)小鼠中没有改变。在 SP-C(-/-)小鼠中, 嗜中性粒细胞的数目没有变化, 也没有病毒或细菌感染的证据。这些发现表明, 重造和炎症是由肺固有的细胞异常造成的, 且依赖于 SP-C 的功能, 或者可能是巨噬细胞加工的 MMP 对细胞外基质的选择性降解的结果, 而不是对病原菌的敏感性所造成的。肺泡巨噬细胞对 MMP-9 和 MMP-2 的生产和 MMP-12 mRNA 的水平都有增加, 因此可能在 SP-C(-/-)小鼠的肺病发病机理中起作用。以前已将增加的 MMP-2、MMP-9 和 MMP-12 的表达与 SP-D 基因打靶小鼠中的肺气肿相联系起来了[24]。

尽管促炎细胞因子在 SP-C(-/-)小鼠的肺中没有增加, 但肺中浸润了含有许多脂内含物和 Ym1 晶体的非典型性肺泡巨噬细胞[23]。异常巨噬细胞的数目比对照组增加了 4-5 倍。细胞浸润与肺泡增厚和纤维化有关。在超结构水平观察到的成肌纤维细胞转化和胶原沉积与在 SP-C(-/-)小鼠的整个肺泡壁中观察到的增加的 α -SMA 染色相一致。不合理的是, 在 SP-C(-/-)小鼠的导气道中观察到了显著的上皮细胞发育异常, 尽管事实上 proSP-C 在野生型小鼠的这些细胞中不表达。而且, 在导气道中 SP-C mRNA 和蛋白通常不表达的位点处观察到了高水平的 MUC5A/C 的表达。MUC5A/C 在小鼠的导气道中通常以低水平表达, 但是能容易地被炎症或炎症细胞因子诱导, 被 IL-4、IL-13 和过敏原所提高[综述参见 25]。这些较后的发现暗示, SP-C 的缺失可以影响肺泡外的基因表达, 表明 SP-C 在导气道中直接地或间接地起作用。但是, 不清楚 SP-C(-/-)小鼠的导气道中的细胞异常是否由 SP-C 依赖性信号传导事件直接介导, 还是可能与 SP-C 依赖性的表面力的调控或在缺少 SP-C 时粘膜纤毛清除的变

化有关。

严重肺病可以由显性遗传的突变 proSP-C 蛋白的表达或 SP-C 基因的缺失造成,这一发现暗示了 SP-C 可能造成 IIP 的发病机理的几种潜在机理。在 Nogee 等和 Thomas 等[8,9]所述的 IIP 患者中,突变的 proSP-C 蛋白在 II 型细胞中积累,潜在地造成了与该前体蛋白的错误折叠或错误加工有关的细胞损伤。为了支持该观点,Conkright 等近来证实了 SP-C 突变蛋白的表达会在体内造成致死的肺功能障碍[26]。但是,在 SP-C (-/-) 小鼠和在患有由该显性遗传的 SP-C 突变造成的 IPF 的患者中,缺少有活性的 SP-C 肽[8]。因而,SP-C 的缺失本身可能参与 IIP 的发病机理。Amin 等近来描述了一组同胞群,其中 3 个个体受到 IIP 的严重影响,它们中的每个都在肺泡灌洗液中缺少可检测的 proSP-C 或 SP-C 的表达,而在 SP-C 的编码区也没有发现突变[27]。尚不清楚 proSP-C 或 SP-C 的选择性缺失是否直接造成了这些患者中的疾病。

表面活性剂功能的异常是否会导致 IIP?

本发现证实了 SP-C 的缺失本身会在小鼠中造成具有间质性肺炎特征的综合症。由于 SP-C 能增强气隙中磷脂的表面性质,因而有可能 SP-C 的缺失随时间改变了表面活性剂功能,导致了间质性肺炎。但是,肺磷脂含量在瑞士黑株的 SP-C (-/-) 小鼠中没有改变[11],在 129/Sv 背景的 SP-C (-/-) 小鼠中增加 2 倍。表面活性剂磷脂组成、片层体的结构和管状髓磷脂在这两株 SP-C (-/-) 小鼠中都普遍得到保留。

在先前的 8 周龄瑞士黑 SP-C (-/-) 小鼠研究中表现出的肺力学和肺组织学变化与本研究不同。在 SP-C (-/-) 瑞士黑小鼠中,没有炎症或肺气肿的证据。滞后性有所降低,而组织弹回性和阻力未变化,该发现与表面活性剂的体外表面活性的适度异常性相一致。相反地,本发明中的 SP-C (-/-) 小鼠表现出气道阻力、组织衰减的严重异常,且滞后性显著增加,与广泛的肺气肿相一致[28]。而且,SP-B 和表面活性剂磷脂库大小是正常的或增加的,与观察到的表面活性剂功能的保留相一致。SP-C (-/-) 129/Sv 小鼠中 SP-A 和 SP-D 的适度增加的水平可能反映了与慢性肺炎症

有关的变化。因而，现在没有证据表明表面活性剂缺失是 SP-C(-/-) 129/Sv 小鼠中的慢性肺病的原因，但是仍然可能的是，在本研究中不可辨别的剪切力的微妙差异可能有助于破坏 SP-C(-/-) 小鼠的肺结构和功能。体外研究证实，各种生长因子、细胞因子和剪切应力可以造成肺成纤维细胞的成肌纤维细胞转化。与本研究中小鼠中观察到的 α -SMA 染色增加相一致的是，广泛的纤维化和成肌纤维细胞转化经常在具有 IIP 的人中观察到[10]。还能容易地在肺泡壁中观察到胶原沉积和增多的成纤维细胞，与在具有 IIP 的患者中观察到的类似。如果 SP-C 的缺失会助长肺病的发病机理，那么可以考虑给患有 IIP 的患者施用外源 SP-C 的疗法。另一方面，如果疾病是由 SP-C 的错误指导和异常积累或突变 SP-C 造成的，则正常 SP-C 的添加或增强表达可能实际上会促进该疾病。

SP-C 缺失会造成脂肪储存病？

表面活性剂脂类、片层体和管状髓磷脂在非典型性巨噬细胞中积累，并在 SP-C(-/-) 小鼠肺中的大量成纤维细胞（II 型细胞的基础）中观察到了明显的脂微滴。这些病理学发现暗示着一种可能性，即 SP-C 的缺失会改变表面活性剂或其它细胞组分的分解代谢，造成储存病。体外研究已经证实，SP-C 能增加 II 型上皮细胞的表面活性剂脂类摄入，其作用方式与 SP-A 和 SP-B 的不同，后者用于维持与上皮细胞表面有关的大表面活性剂聚集体[29]。因而，SP-C 可能在表面活性剂稳态中起细胞内的和细胞外的作用。

株系影响 SP-C(-/-) 小鼠中的病理学发现

在 129/Sv 株的 SP-C(-/-) 小鼠中观察到的严重肺病与维持在远交瑞士黑背景中的 SP-C(-/-) 小鼠中观察到的更轻微的异常明显大不相同。尽管 SP-C(-/-)/瑞士黑小鼠不具有明显的肺结构异常，但当置于氧过多和表面活性剂蛋白 B 减少的情况下时，这些小鼠易受肺功能障碍的影响[12]。对 SP-C(-/-) 表型的强烈株系依赖性的影响和在严重性、时间和位置方面有所不同的肺病变的异质性，与在患有 SP-C 基因突变造成的家

族性特发性纤维化的患者中的发现相一致[30]。这些综合症在临床上和病理学上与肺气肿不同，后者与 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶缺失有关。在 IIP 中，这些同胞群中的临床和病理学发现显著不同，在相同家族中已经作出了多种组织病理学诊断。尽管 SP-C 突变的性质会影响该疾病，但严重性的显著异质性、发作年龄，肺病的发展时间也是该疾病的特征，表明环境因素或其它的基因强烈地影响其发病机理。所观察到的 SP-C(-/-)小鼠中 SP-C 缺失造成的肺病严重性方面的株系差异表明与 SP-C 缺失或 SP-C 突变有关的表型可能受到遗传因素的强烈影响。尽管尚无证据表明感染会使本研究的阐释更为复杂，但感染确实会使患有 IIP 的患者中的肺功能障碍发生恶化。

诊断和治疗的暗示

本研究 and 近期的人类研究[8, 30]可能首次提供了基因突变和特发性间质肺病之间的关联。由于 SP-C 的缺失会在 SP-C(-/-)小鼠中造成严重的肺病，SP-C 的缺失（无论是遗传还是继发性损伤）有可能会促进急性的和慢性的肺病。SP-C 的突变与人类的 IIP 之间的关联使得该疾病风险的遗传检测变得可行。同样地，通过免疫组织化学，可以对 SP-C 基因的突变造成的各种病理学进行组织学诊断。检测突变的 SP-C 基因或者 BALF 中 SP-C 的存在与否，可以为 SP-C 在患有复杂肺病的患者中的作用提供诊断性见解。最后，尚不清楚人 IIP 是否是由下述因素造成的：1) SP-C 和 proSP-C 的缺失，2) SP-C 前蛋白或活性 SP-C 肽的错误折叠和错误指导，或 3) 其稳态依赖于 proSP-C 和/或 SP-C 的其它细胞组分的改变的路线安排、加工或降解。如果 II 型或其它肺细胞中的蛋白错误折叠会促进肺病的发病机理，则在间质性肺病的发病机理中可以考虑除 SP-C 以外的蛋白质的错误折叠。阐明造成与 SP-C 的异常有关的间质性肺病的细胞和分子机制将可以为开发新的 IIP 疗法提供理论基础。

参考文献

1. Weaver, T. E. , and Conkright, J. J. 2001. Functions of

surfactant proteins B and C. *Ahn. Rev. Physiol.* 63: 555-578.

2. Johansson, J. 1998. Structure and properties of surfactant protein C. *Biochim Biophys Acta* 1408: 161-172.

3. Morrow, M. R., Taneva, S. , Simatos, G. A. , Allwood, L. A. , and Keough, K. M. 1993. ^2H NMR studies of the effect of pulmonary surfactant SP-C on the 1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine headgroup: a model for transbilayer peptides in surfactant and biological membranes. *Biochemistry* 32: 11338-11344.

4. Horowitz, A. D. , Elledge, B. , Whitsett, J. A. , and Baatz, J. E. 1992. Effects of lung surfactant proteolipid SP-C on the organization of model membrane lipids: a fluorescence study. *Biochim. Biophys. Acta* 1107: 44-54.

5. Johansson, J., Szyperski, T. , and Wuthrich, K. 1995. Pulmonary surfactant-associated polypeptide SP-C in lipid micelles: CD studies of intact SP-C and NMR secondary structure determination of depalmitoyl-SP-C (1-17). *FEBS Lett.* 362: 261-265.

6. Whitsett, J. A. , Ohning, B. L. , Ross, G. , Meuth, J. , Weaver, T. , Holm, B. A. , Shapiro, D. L., and Notter, R. H. 1986. Hydrophobic surfactant-associated protein in whole lung surfactant and its importance for biophysical activity in lung surfactant extracts used for replacement therapy. *Pediatr. Res.* 20: 460-467.

7. Hawgood, S. , Ogawa, A. , Yukitake, K. , Schlueter, M. , Brown, C., White, T. , Buckley, D. , Lesikar, D. , and Benson, B. 1996. Lung function in premature rabbits treated with recombinant human surfactant protein-C. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 484- 490.

8. Noguee, L. M. , Dunbar, A. E. , Wert, S. E. , Askin, F. , Hamvas, A. , and Whitsett, J. A. 2001. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N. Engl. J. Med.* 344: 573-579.

9. Thomas, A. Q. , Lane, K. , Phillips, J. III, Prince, M. , Markin, C. , Speer, M. , Schwartz, D. A. , Gaddipati, R. , Marney, A. , Johnson, J. , et al. 2002. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am. J Respir. Crit. Care Med.* 165: 1322-1328.

10. Katzenstein, A. L. , and Myers, J. L. 1998. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 1301-1315.

11. Glasser, S. W. , Burhans, M. S. , Korfhagen, T. R. , Na, C-L. , Sly, P. D. , Ross, G. F. , Ikegami, M. , and Whitsett, J. A. 2001. Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 6366-6371.

12. Ikegami, M. , Weaver, T. E. , Conkright, J. J. , Sly, P. D. , Ross, G. F. , Whitsett, J. A. , and Glasser, S. W. 2002. Deficiency of SP-B reveals protective role of SP-C during oxygen injury. *J. Appl. Physiol.* 92: 519-526.

13. Wert, S. E. , Dey, C. R. , Blair, P. A. , Kimura, S. , and Whitsett, J. A. 2002. Increased expression of thyroid transcription factor-1 (TTF-1) in respiratory epithelial cells inhibits alveolarization and causes pulmonary inflammation. *Dev. Biol.* 242: 75-87.

14. Clark, J. C. , Tichelaar, J. W. , Wert, S. E. , Itoh, N. , Perl, A. K. , Stahlman, M. T. , and Whitsett, J. A. 2001. FGF-10 disrupts lung morphogenesis and causes pulmonary adenomas in vivo.

Am. J. Physio. 280: L705-L715.

15. Mason, R. J. , Nellenbogen, J. , and Clements, J. A. 1976. Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide. J. Lipid Res. 17: 281-284.

16. Bartlett, G. R. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234: 466-468.

17. Jobe, A. H. , Kirkpatrick, E. , and Gluck, L. 1978. Labeling of phospholipids in the surfactant and subcellular fractions of rabbit lung. J. Biol. Chem. 253: 3810-3816.

18. Ikegami, M. , Whitsett, J. A. , Jobe, A. , Ross, G. , Fisher, J. , and Korfhagen, T. 2000. Surfactant metabolism in SP-D gene-targeted mice. Am. J. Physiol. 279: L468-L476.

19. Yoshida, M. , Korfhagen, T. R. , and Whitsett, J. A. 2001. Surfactant protein D regulates NF- κ B and matrix metalloproteinase production in alveolar macrophages via oxidant-sensitive pathways. J. Immunol. 166: 7514-7519.

20. Schuessler, T. F. , and Bates, J. H. 1995. A computer controlled research ventilator for small animals: design and evaluation. IEEE Trans Biomed Eng 42: 860-866.

21. Ikegami, M. , Jobe, A. H. , Whitsett, J. , and Korfhagen, T. 2000. Tolerance of SP-A deficient mice to hyperoxia or exercise. J. Appl. Physiol. 89: 644-648.

22. Cross, P. C. , and Mercer, K. L. 1993. Respiratory System. In Cell and tissue ultrastructure.-a functional perspective. W. H. Freeman/New York, 314-315.

23. Chang, N. C. , Hung, S. I. , Hwa, K. Y. , Kato, I. , Chen, J. E. , Liu, C. H. , and Chang, A. C. 2001. A macrophage protein, Yml, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. J. Biol. Chem. 276: 17497-17506.

24. Wert, S. E. , Yoshida, M. , Levine, A. M. , Ikegami, M. , Jones, T. , Ross, G. F. , Fisher, J. H. , Korfhagen, T. R. , and Whitsett, J. A. 2000. Increased metalloproteinase activity, oxidant production, and emphysema in surfactant protein D gene-inactivated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5972-5977.

25. Rose, M. C. , Nickola, T. J. , and Voynow, J. A. 2001. Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25: 533-537.

26. Conkright, J. J. , Na, C. -L. , and Weaver, T. E. 2002. Overexpression of SP-C mature SP-C peptide causes neonatal lethality in transgenic mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26: 85- 90.

27. Amin, R. S. , Wert, S. E. , Baughman, R. P. , Tomashefski, J. F. , Noguee, L. M. , Brody, A. S. , Hull, W. M. , and Whitsett, J. A. 2001. Surfactant protein deficiency in familial interstitial lung disease. *J. Pediatr.* 139: 85-92.

28. Pillow, J. J. , Korfhagen, T. R. , Ikegami, M. , and Sly, P. D. 2001. Overexpression of TGF α increases lung tissue hysteresivity in transgenic mice. *J. Appl. Physiol.* 91: 2730- 2734.

29. Horowitz, A. D. , Moussavian, B. , and Whitsett, J. A. 1996. Roles of SP-A, SP-B and SP-C in modulation of lipid uptake by pulmonary epithelial cells in vitro. *Am J. Physiol. (Lung Cell. Mol. Physiol.)* 270: L69-L79.

30. Noguee, L. M. , Dunbar, A. E. , Wert, S. , Askin, F. , Hamvas, A. , and Whitsett, J. A. 2002. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest* 121: 20S-21S.

其它实施方案

尽管已经结合其详细描述说明了本发明，但前面的描述只是用于解释而不是限制所附权利要求书定义的本发明的范围。其它方面、优点和改进都在下述权利要求书的范围内。

序列表

<110> Whitsett, Jeffrey A.
Glasser, Stephan W.

<120> 诊断和治疗间质性肺病的方法

<130> 0010872/0507287

<150> US 60/431,949

<151> 2002-12-09

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 3633

<212> DNA

<213> Mus musculus

<300>

<308> M38314

<309> 1999-07-28

<313> (1)..(3633)

<220>

<221> 基因

<222> (321)..(3443)

<220>

<221> mRNA

<222> (321)..(3443)

<223> join (321..389, 1619..1777, 2112..2234, 2472..2582,
2911..3066,
3268..3443)

<220>

<221> 外显子

<222> (321)..(389)

<220>

<221> 内含子

<222> (390)..(1618)

<220>

<221> 外显子

<222> (1619)..(1777)

<220>

<221> 内含子

<222> (1778)..(2111)

<220>

<221> 外显子

<222> (2112)..(2234)

<220>

<221> 内含子

<222> (2235)..(2471)

<220>

```

<221> 外显子
<222> (2472) .. (2582)

<220>
<221> 内含子
<222> (2583) .. (2910)

<220>
<221> 外显子
<222> (2911) .. (3066)

<220>
<221> 内含子
<222> (3067) .. (3267)

<220>
<221> 外显子
<222> (3268) .. (3443)

<400> 1
ctgcaggggc aggtgccagc aagagaggca gacatgcaga aagacaccca cggagagagg
60
agcaggtggc ccgaggggtga gtttgcttga cctcaccag gtttgctctt gttggggcca
120
agaggattca tgtgcctagg ccaagggcct tgggggctct tgcagctgcc ttatcggggc
180
ctgggctctg aaaagccagg aacaaacaag ctacaaagcc aaggacttgg ctggcagaca
240
ggaggcccag tccttcaccc ctgtcctctc tgtctctgat gatatatata agacactggg
300
cacaccagag agatgaggag agg aga gag aga gag aaa cct tac aaa atg gac
353
                Arg Arg Glu Arg Glu Lys Pro Tyr Lys Met Asp
                1             5             10

atg agt agc aaa gag gtc ctg atg gag agt cca ccg gtgagtgatga
399
Met Ser Ser Lys Glu Val Leu Met Glu Ser Pro Pro
15             20

ttgtgtgtgt gtgtgtgtgt gctgcgcgcg catacatagt atactgactt gactgtccat
459

cctccagtag gctttttttc tttttctaga cccatatact caattagctt aggattgggc
519

ttttaggata gagataccgt gatcattaag agtccttggt agaggcaggc acgacgacca
579

cgaattcctg tataaaggga ttgagagcca cagaggggtc aatagaaagt cctgtgaaga
639

acaactgatag caccacocatg tagttgggag gctacaggaa gtaccacaga gcaaatacaca
699

gtgaggctgg gatgtagatc agtagctaga gcactttgca aaacgtggag accctggggg
759

```

ttcagtcccc cagatccaca taatccaggc atagaggtgc acactgtttg gaaatataag
819

caagataatc attcaggggc atccttagat atataaggag ttgaaaggca gcctgggtca
879

tagatatggt ttttttcttt aaaaaaaaaa aaaggatggc tcagtaggta gtgggtgcttg
939

caccaaagt ggcggtcga gtttaatctc tggaattcac atgatgaaag gagatgaaaa
999

gttgtccttg acttacacac acacatgtac atacacactc acacatacta cacacatgta
1059

cacaaacatt cacactcaca ccacatacac acactctcac acacaccaca cacatgtgca
1119

cacacacaca cacacatgta ccttcacaca catcacacac atgcacactc aaacatacca
1179

cacaatgtat acacgctcac aactaaatc cgtgtaaaaa accatgaagc tggcacatgg
1239

actggattga gaaggaacaa aggagacccg tgtaaaggta tagagacagg gctacctgga
1299

tcctttgagg gagcaaaaac tcaggatatg tctgggggtgt taggcgtcgt gggaaaacag
1359

aagaagagat cggtagctgg ctctcttgga ttatttcaaa cctagacttt gcttctaact
1419

ttctaagtag ctatggtttt gttaggggtcc aaccaccttc cccaaagcct tccttcccaa
1479

aagcctctga tctccccagc tottccttca cactcgtagc ctaaagaggt acgggatgtg
1539

tgtgtcccc ttgcacaggg agagtaggag ccaccctctc cactaccacac ttgtctctct
1599

gcttcccttg ctctctcag gat tac tcg gca ggt ccc agg agc cag ttc cgc
1651

Asp Tyr Ser Ala Gly Pro Arg Ser Gln Phe Arg
25 30

atc ccc tgc tgt ccc gtg cac ctc aaa cgc ctt ctc atc gtg gtt gtg
1699

Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val
35 40 45 50

gtg gtg gtc ctc gtt gtc gtg gtg att gta ggg gct ctg ctc atg ggc
1747

Val Val Val Leu Val Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly
55 60 65

ctc cac atg agt caa aaa cat act gag atg gtgagtgggc ctgggttggg
1797

Leu His Met Ser Gln Lys His Thr Glu Met
70 75

caaagaggca cagcagacag ggggttgggg gagattatgg gggatgggca gctgttcgga
1857

ggaagagaag ggagtggaca ggtatgagca catcttgggt gacacaaaca gagacgaggt
1917

agccatcctg cctagatcct ctccccagc cccggcctag tgtgataacc atcgattgct
1977

ctgacacctc ttacgttttag ccttcctgag atctcaggaa agcgtttgaa tagaggattc
2037

tgagtagata tgggtaccga aagctgaggg aagaaagaga aataccaggc agcattccaa
2097

cacccttccc ctag gtc ctt gag atg agc atc gga gca ccg gaa act cag
2147

Val Leu Glu Met Ser Ile Gly Ala Pro Glu Thr Gln
80 85

aaa cgc cta gcc ccg agt gag cga gca gac acc atc gct acc ttt tcc
2195

Lys Arg Leu Ala Pro Ser Glu Arg Ala Asp Thr Ile Ala Thr Phe Ser
90 95 100

atc ggc tcc act ggc atc gtt gtg tat gac tac cag cgg gtgaggatgc
2244

Ile Gly Ser Thr Gly Ile Val Val Tyr Asp Tyr Gln Arg
105 110 115

cggaggacca ccgggacttt attggaacta gccagttgta gcatttctag aggtctctcc
2304

ccattctgtg cctggctacc tcacctcaga tgctogaacc actgaacgaa gtgcgccct
2364

ccaccctctg aagacaatct aaaggaagtt gggttgctga gaactagggt tggggaggaa
2424

gcaaggcaag gggaccttgt gaatgacctc cagggtttta tacctag ctc ctg acg
2480

Leu Leu Thr
120

gcc tat aag cca gct cca gga acc tac tgc tac atc atg aag atg gct
2528

Ala Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Cys Tyr Ile Met Lys Met Ala
125 130 135

cca gag agc atc cct agt ctt gag gct ttc gct aga aaa ctc cag aac
2576

Pro Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Phe Ala Arg Lys Leu Gln Asn
140 145 150

ttc agg tgggtatgtt tagggaggga gggagcagtc tcctctgagg tttgagtaga
2632

Phe Arg

aggacatgt gaaagatgac tagcgtaccc tgtgtagtat tgatgtttct gatcagacat
2692

gttctcctct ctccatgacc tgtgtcctgc catccctacc agctctcagg tggccctgct
2752

aagttgttgg ccttggctga gcttagacat gacctatggg cttctacatc caaccagtc
2812

cctctctgaa tttgtgagga aactgatcct cgagaattac caacttagtg tcccacacta
2872

aataaagcag gtgacattga aagtaggtgt tctttcca gcc aag ccc tcc aca ccc
2928

Ala Lys Pro Ser Thr Pro
155 160

acc tct aag ctg ggc cag gag gaa ggg cat gat act ggt tcc gag tcc
2976

Thr Ser Lys Leu Gly Gln Glu Glu Gly His Asp Thr Gly Ser Glu Ser
165 170 175

gat tct tcc ggg aga gac ctg gct ttc cta ggc ctt gct gtg agc acc
3024

Asp Ser Ser Gly Arg Asp Leu Ala Phe Leu Gly Leu Ala Val Ser Thr
180 185 190

ctg tgt gga gag cta cca ctc tac tat atc tag cat cca cag
3066

Leu Cys Gly Glu Leu Pro Leu Tyr Tyr Ile His Pro Gln
195 200 205

gtgagcaaca gtacctttca ggggtgcctgg gcaacactgg cagggttgg gctgcctgct
3126

ttgtcagggg acctactagg tatctcttaa agtcagtggc ctcgggagct cggaggatgg
3186

agggttccca gacacatccc aactggacc caagcgggtg gcttcttcag tcccataag
3246

cattagttct ttgcttcaca g ggt cgg tag aaa ccg cag cgg gac agg aaa
3297

Gly Arg Lys Pro Gln Arg Asp Arg Lys
210

gac cct ccg caa agg gtc ttt gtc aga caa gca gga agc tgc tcc tgc
3345

Asp Pro Pro Gln Arg Val Phe Val Arg Gln Ala Gly Ser Cys Ser Cys
215 220 225 230

cca gaa acc ggt gga agt ctg taa agg aaa ggt gtc tct cct acg ggc
3393

Pro Glu Thr Gly Gly Ser Leu Arg Lys Gly Val Ser Pro Thr Gly
235 240 245

cag ggg gat cct atc aca aaa gaa taa agc agc ctg att gga aaa caa
3441

Gln Gly Asp Pro Ile Thr Lys Glu Ser Ser Leu Ile Gly Lys Gln
250 255 260

ag agtggcgctt cttttctttc acattttctc agctcggctt ctagcagaag
3493

ctcctaggaa ggagaggggt tggagagttg ggcgctttgc acgtcctttc taagagtgat
3553

ggaggttttg tctaccccag gtaatgggaa cagagcaaaa ggcagggaca gaggacggga
3613

cctgggtgcc atacacgggg
3633

<210> 2
<211> 995
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2
aggagagaga gagagaaacc ttacaaaatg gacatgagta gcaaagaggt cctgatggag
60
agtccaccgg attactcggc aggtcccagg agccagttcc gcatcccctg ctgtcccgtg
120
cacctcaaac gccttctcat cgtggttggtg gtggtgggtcc tcgttgctgt ggtgattgta
180
ggggctctgc tcatgggcct ccacatgagt caaaaacata ctgagatggt ccttgagatg
240
agcatcggag caccggaaac tcagaaacgc ctagccccga gtgagcgagc agacaccatc
300
gctacctttt ccatcggctc cactggcatc gttgtgtatg actaccagcg gtccttgacg
360
gcctataagc cagctccagg aacctactgc tacatcatga agatgggtcc agagagcatc
420
cctagtcttg aggttttgc tagaaaactc cagaacttca gggccaagcc ctccacacc
480
acctctaagc tgggccagga ggaagggcat gatactgggt ccgagtcga ttcttcggg
540
agagacctgg ctttcctagg ccttgctgtg agcacctgt gtggagagct accactctac
600
tatatctagc atccacaggt gagcaacagt acctttcagg gtgcctgggc aacctggca
660
gggcttgggc tgctgcttt gtcaggggac ctactaggta tctottaaag tcagtgggtc
720
cgggagctcg gaggatggag ggtcccaga cacatcccac actggaccca agcgggtggc
780
ttcttcagtc ccataagca ttagttcttt gttcacagg gtcggtagaa accgcagcgg
840
gacaggaaag acctccgca aagggtcttt gtcagacaag caggaagctg ctctgcca
900
gaaaccggtg gaagtctgta aaggaaagg gtctctcta cgggccaggg ggatcctatc
960
acaaaagaat aaagcagcct gattggaaaa caaag
995

<210> 3
<211> 193

<212> PRT
<213> Mus musculus

<300>
<308> AAA40010
<309> 1999-07-28
<313> (1)..(193)

<400> 3

Met Asp Met Ser Ser Lys Glu Val Leu Met Glu Ser Pro Pro Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Ala Gly Pro Arg Ser Gln Phe Arg Ile Pro Cys Cys Pro Val His
20 25 30

Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val Val Val Val Leu Val Val Val
35 40 45

Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu His Met Ser Gln Lys His
50 55 60

Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly Ala Pro Glu Thr Gln Lys
65 70 75 80

Arg Leu Ala Pro Ser Glu Arg Ala Asp Thr Ile Ala Thr Phe Ser Ile
85 90 95

Gly Ser Thr Gly Ile Val Val Tyr Asp Tyr Gln Arg Leu Leu Thr Ala
100 105 110

Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Cys Tyr Ile Met Lys Met Ala Pro
115 120 125

Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Phe Ala Arg Lys Leu Gln Asn Phe
130 135 140

Arg Ala Lys Pro Ser Thr Pro Thr Ser Lys Leu Gly Gln Glu Glu Gly
145 150 155 160

His Asp Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Ser Gly Arg Asp Leu Ala Phe
165 170 175

Leu Gly Leu Ala Val Ser Thr Leu Cys Gly Glu Leu Pro Leu Tyr Tyr
180 185 190

Ile

<210> 4
<211> 3409

```

<212> DNA
<213> 人

<300>
<308> J03890
<309> 1998-08-17
<313> (1) .. (3409)

<220>
<221> 基因
<222> (591) .. (3237)

<220>
<221> mRNA
<222> (591) .. (3237)
<223> join(616..657,1356..1514,1860..1982,2206..2316,2651..2809);
gene="SP-C1"; product="pulmonary surfactant protein SP-C"

<220>
<221> mRNA
<222> (591) .. (3237)
<223> join(616..657,1356..1514,1860..1982,2206..2316,2669..2809);
gene="SP-C1"; product="pulmonary surfactant protein SP-C1"

<220>
<221> 外显子
<222> (591) .. (657)

<220>
<221> 内含子
<222> (658) .. (1355)

<220>
<221> 外显子
<222> (1356) .. (1514)

<220>
<221> 内含子
<222> (1515) .. (1859)

<220>
<221> 外显子
<222> (1860) .. (1982)

<220>
<221> 内含子
<222> (1983) .. (2205)

<220>
<221> 外显子
<222> (2206) .. (2316)

<220>
<221> 内含子
<222> (2317) .. (2650)

<220>
<221> 外显子
<222> (2651) .. (3237)

<400> 4
ggtaccagat atgtgggagg aggcaaggta agggaaagag tacttgaagt tggaactggt
60

```

ccttgaggg aaatgcacat ttatgaaacc ccgaaaactg atgtcaaagc acctcctgcc
120

ttgggcagtc ctctcagagt ctacaggtgc tgcctccaga accctcttcc tggagcgcat
180

ccctatgtat ctagaaattc tgctgggaaa tatgatggtc agacccttgg ccacctgaaa
240

gttcagggtg gtagaagaaa aaggaaagcc acagggcagc aggggcaggt gcagcaagga
300

aggcaggcac gccaggaaga caccatggg tagaagtga gatggcccga gggcacagtt
360

tgctcaactc acccaggttt gctcttgctg gggccaagag gactcatgtg ccaggggccaa
420

gggctctggg ggctctcaca gggggcttat ctgggcttcg gttctggagg gccaggaaca
480

aacaggcttc aaagcaaggg cttggctggc acacaggggc ttggtccttc acctctgtcc
540

ctctcctacg gacacatata agaccctggc cacacctggg agaggaggag agg aga
596

Arg Arg
1

gca tag cac ctg cag caa gat gga tgt ggg cag caa aga ggt cct gat
644

Ala	His	Leu	Gln	Gln	Asp	Gly	Cys	Gly	Gln	Gln	Arg	Gly	Pro	Asp
		5					10					15		

gga gag ccc gcc g gtgagtgtg ttgcgtgtgt gtatgtatgt gcgcgcgcac
697

Gly Glu Pro Ala
20

atgtgtgtga tggccctgcc tcctctatcc tcctggcct gtttccttat ccagatccat
757

tcactcaact aacctaggac tgtgataagt caggatgggg acaccaagac cactaagcca
817

gggacccttg gggagctgtt tgtggccaag agccactata ggggtccgta gaactggagt
877

gcgcgtagac agccctgagt cagaagccat gagaaacttc agaagtcagg ggacacttct
937

cagagaaaaa ccacatacga gctggagcca gaataaggag gagctcgccc ggtggagaag
997

gaggaaggca ttccaggaag gagggagact ctgtatcacc gcatggaggt gatcacttgg
1057

ggagagagag gggctgacca tggctggggg aagcagcagg gagagacagg tgaagcaggc
1117

tctcttgggt ccctcaaaac tagaccctgc ttotaagctt ctatgtatct atgggtttgt
1177

tagaatccag gccacctcct ccaagaagcc ttctctgata tcttcagccc ttccctgtcc
1237

atccatcgca tcggctgtcc agcctaggag ccgtgggagg gtgttcagct tgtataggga
1297

gaagagggga cagcctcatg acctcatgcc tgtctccttg cctgccccac cgtgtcag
1355

ga cta ctc cgc agc tcc ccg ggg ccg att tgg cat tcc ctg ctg ccc
1402

Gly Leu Leu Arg Ser Ser Pro Gly Pro Ile Trp His Ser Leu Leu Pro
25 30 35

agt gca cct gaa acg cct tct tat cgt ggt ggt ggt ggt ggt cct cat
1450

Ser Ala Pro Glu Thr Pro Ser Tyr Arg Gly Gly Gly Gly Gly Pro His
40 45 50

cgt cgt ggt gat tgt ggg agc cct gct cat ggg tct cca cat gag cca
1498

Arg Arg Gly Asp Cys Gly Ser Pro Ala His Gly Ser Pro His Glu Pro
55 60 65

gaa aca cac gga gat g gtgagaggtg tgggatgcac agcagtgggc acaggacatg
1554

Glu Thr His Gly Asp
70

ccagacagag gggctaggtg ggatgggcga taggaaactg tccaagggga gtggagggga
1614

ggaggcaagg ggcacagcta gaaggaaaga ggcacgaacc aggcagcaac ccagctcagg
1674

cttttccaca aggcccttgc ccgcgacagg acagccagct ccctccagca cctgggtcca
1734

ctcagcctcc ctgaactctt gggaaagagg gaagcgcatt tgagtacaga ggctgagta
1794

tggggatggg taccactggc tgagtaggaa aggggaagac caggtggctc catgcctttc
1854

cccag gt tct gga gat gag cat tgg ggc gcc gga agc cca gca acg cct
1903

Gly Ser Gly Asp Glu His Trp Gly Ala Gly Ser Pro Ala Thr Pro
80 85

ggc cct gag tga gca cct ggt tac cac tgc cac ctt ctc cat cgg ctc
1951

Gly Pro Glu Ala Pro Gly Tyr His Cys His Leu Leu His Arg Leu
90 95 100

cac tgg cct cgt ggt gta tga cta cca gca g gtgggtatgc cagacctcct
2002

His Trp Pro Arg Gly Val Leu Pro Ala
105 110

gacctggacc aatgacaact gggctctgct agagcgcca gctggccact ttcattccac
2062

atccatctct cctctctcag actttttgct gagcccagat tctagtagtc tcccggtccc
2122

aacctagagg gaggtggcta aggacctggg tcagggagag agcagggcag gaccccgaat
2182

gatctccagc attctgtgcc tag ct gct gat cgc cta caa gcc agc ccc tgg
2234

Ala Ala Asp Arg Leu Gln Ala Ser Pro Trp
115 120

cac ctg ctg cta cat cat gaa gat agc tcc aga gag cat ccc cag tct
2282

His Leu Leu Leu His His Glu Asp Ser Ser Arg Glu His Pro Gln Ser
125 130 135

tga ggc tct cac tag aaa agt cca caa ctt cca g gtgtgtgtgt
2326

Gly Ser His Lys Ser Pro Gln Leu Pro
140 145

gtgggtgaaa agagtgggct gtctccctcc caggctgctg gaggagtgtc cgaatgggtg
2386

ctatttgtca cctgtaaagc actgttcttc attggctgcc agctgactgc ccctctccta
2446

ttccctgca cgactccttt ccttcccacc ccactgccaa gctgctgggc tcagctgagt
2506

ccactcacta cctgggtggct tctgactcta gcacagcccc tctttactga tgagaaaact
2566

gaggctcaga gagattgcct gatatacctg aagtcccaca ataagggctg cacatgggat
2626

agaaactcac ttctacatt ccag at gga atg ctc tct gca ggc caa gcc
2676

Asp Gly Met Leu Ser Ala Gly Gln Ala
150 155

cgc agt gcc tac gtc taa gct ggg cca ggc aga ggg gcg aga tgc agg
2724

Arg Ser Ala Tyr Val Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Cys Arg
160 165 170

ctc agc acc ctc cgg agg gga ccc ggc ctt cct ggg cat ggc cgt gaa
2772

Leu Ser Thr Leu Arg Arg Gly Pro Gly Leu Pro Gly His Gly Arg Glu
175 180 185

cac cct gtg tgg cga ggt gcc gct cta cta cat cta gga cgc ctc cgg
2820

His Pro Val Trp Arg Gly Ala Ala Leu Leu His Leu Gly Arg Leu Arg
190 195 200

tga gca ggt gtg atc cca ggg ccc ctg atc agc agc gga gga gcg ctg
2868

Ala Gly Val Ile Pro Gly Pro Leu Ile Ser Ser Gly Gly Ala Leu
205 210 215

gcc acc tgc ccg gct gtg gag gag gct cgc tga cca ggc tgg ggc gtc
2916

Ala Thr Cys Pro Ala Val Glu Glu Ala Arg Pro Gly Trp Gly Val
220 225 230

cac tga agc ggg gtc atc cag gca act cgg ggg agg gga agc tca cag
 2964
 His Ser Gly Val Ile Gln Ala Thr Arg Gly Arg Gly Ser Ser Gln
 235 240 245
 acc ggt act tcc cac tcc cct gaa ttc tct ctg tcc atc ctc aac att
 3012
 Thr Gly Thr Ser His Ser Pro Glu Phe Ser Leu Ser Ile Leu Asn Ile
 250 255 260 265
 cct ttg ctt cat agg gtc agt gga agc ccc aac gga aag gaa acg ccc
 3060
 Pro Leu Leu His Arg Val Ser Gly Ser Pro Asn Gly Lys Glu Thr Pro
 270 275 280
 cgg gca aag ggt ctt ttg cag ctt ttg cag acg ggc aag aag ctg ctt
 3108
 Arg Ala Lys Gly Leu Leu Gln Leu Leu Gln Thr Gly Lys Lys Leu Leu
 285 290 295
 ctg ccc aca ccg cag gga caa acc ctg gag aaa tgg gag ctt ggg gag
 3156
 Leu Pro Thr Pro Gln Gly Gln Thr Leu Glu Lys Trp Glu Leu Gly Glu
 300 305 310
 agg atg gga gtg ggc aga ggt ggc acc cag ggg ccc ggg aac tcc tgc
 3204
 Arg Met Gly Val Gly Arg Gly Gly Thr Gln Gly Pro Gly Asn Ser Cys
 315 320 325
 cac aac aga ata aag cag cct gat ttg aaa agc aaaggggtctg cttctgtctt
 3257
 His Asn Arg Ile Lys Gln Pro Asp Leu Lys Ser
 330 335 340
 cctgcagggc gcagtcctcg ctggcggggc cggccaagaa gggaagggcc ttgggagagc
 3317
 aaagtgggggt ttccattcgc cctctgtccc agggcgctgg cactgtccac ctcggcgggg
 3377
 agaggggctc gcagggagca tccacgggct tt
 3409

<210> 5
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> 人

<300>
 <308> AAC32022
 <309> 1998-08-17
 <313> (1)..(197)

<400> 5

Met Asp Val Gly Ser Lys Glu Val Leu Met Glu Ser Pro Pro Asp Tyr
 1 5 10 15

Ser Ala Ala Pro Arg Gly Arg Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His
 20 25 30

Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val
35 40 45

Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu His Met Ser Gln Lys His
50 55 60

Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly Ala Pro Glu Ala Gln Gln
65 70 75 80

Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Leu Val Thr Thr Ala Thr Phe Ser Ile
85 90 95

Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr Gln Gln Leu Leu Ile Ala
100 105 110

Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys Ile Ala Pro
115 120 125

Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr Arg Lys Val His Asn Phe
130 135 140

Gln Met Glu Cys Ser Leu Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys
145 150 155 160

Leu Gly Gln Ala Glu Gly Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Gly Gly
165 170 175

Asp Pro Ala Phe Leu Gly Met Ala Val Asn Thr Leu Cys Gly Glu Val
180 185 190

Pro Leu Tyr Tyr Ile
195

<210> 6
<211> 191
<212> PRT
<213> 人

<300>
<308> AAC320023
<309> 1998-08-17
<313> (1)..(191)

<400> 6

Met Asp Val Gly Ser Lys Glu Val Leu Met Glu Ser Pro Pro Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Ala Ala Pro Arg Gly Arg Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His
20 25 30

Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val
 35 40 45

Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu His Met Ser Gln Lys His
 50 55 60

Thr Glu Met Val Leu Glu Met Ser Ile Gly Ala Pro Glu Ala Gln Gln
 65 70 75 80

Arg Leu Ala Leu Ser Glu His Leu Val Thr Thr Ala Thr Phe Ser Ile
 85 90 95

Gly Ser Thr Gly Leu Val Val Tyr Asp Tyr Gln Gln Leu Leu Ile Ala
 100 105 110

Tyr Lys Pro Ala Pro Gly Thr Cys Cys Tyr Ile Met Lys Ile Ala Pro
 115 120 125

Glu Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ala Leu Thr Arg Lys Val His Asn Phe
 130 135 140

Gln Ala Lys Pro Ala Val Pro Thr Ser Lys Leu Gly Gln Ala Glu Gly
 145 150 155 160

Arg Asp Ala Gly Ser Ala Pro Ser Gly Gly Asp Pro Ala Phe Leu Gly
 165 170 175

Met Ala Val Asn Thr Leu Cys Gly Glu Val Pro Leu Tyr Tyr Ile
 180 185 190

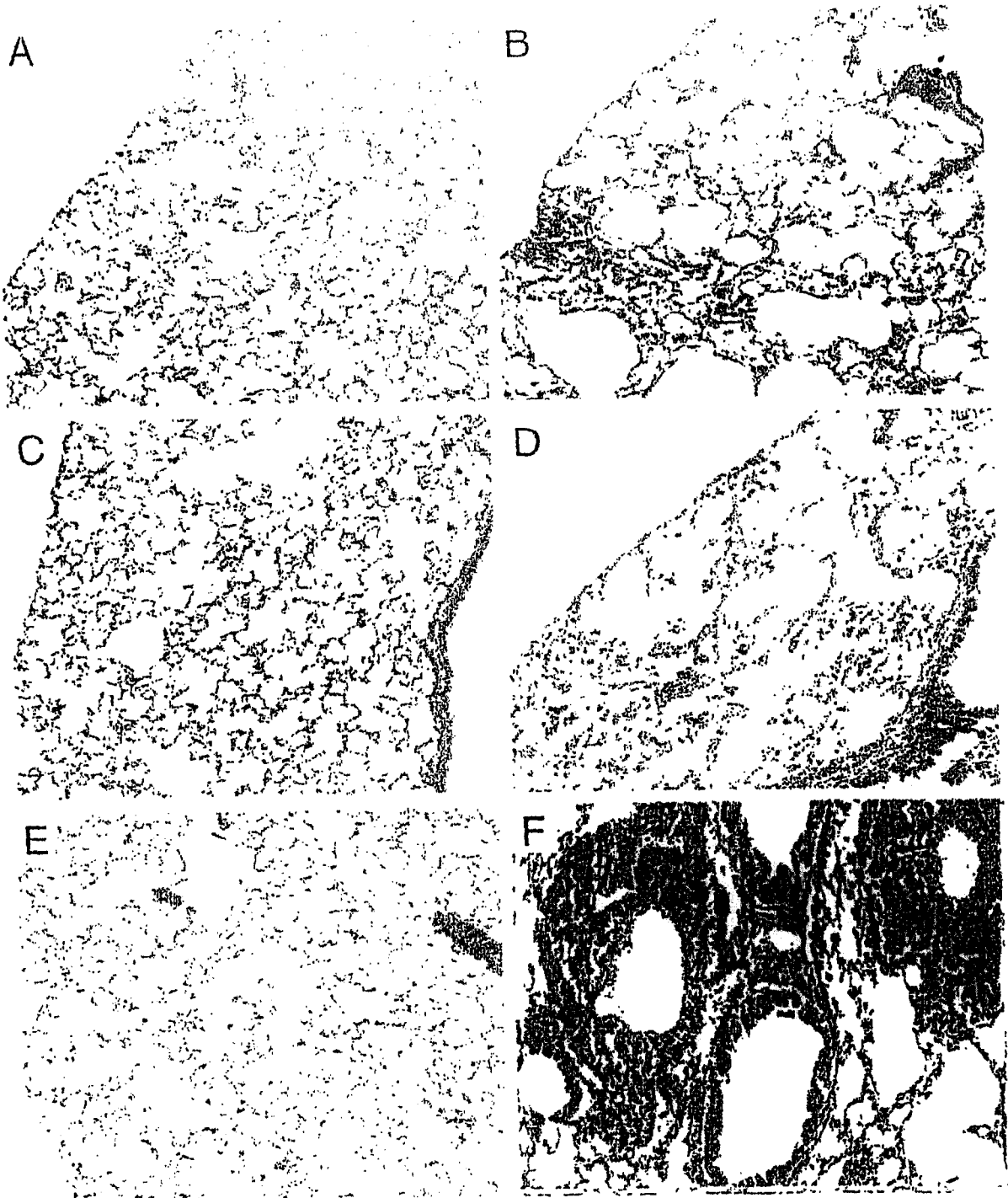


图1

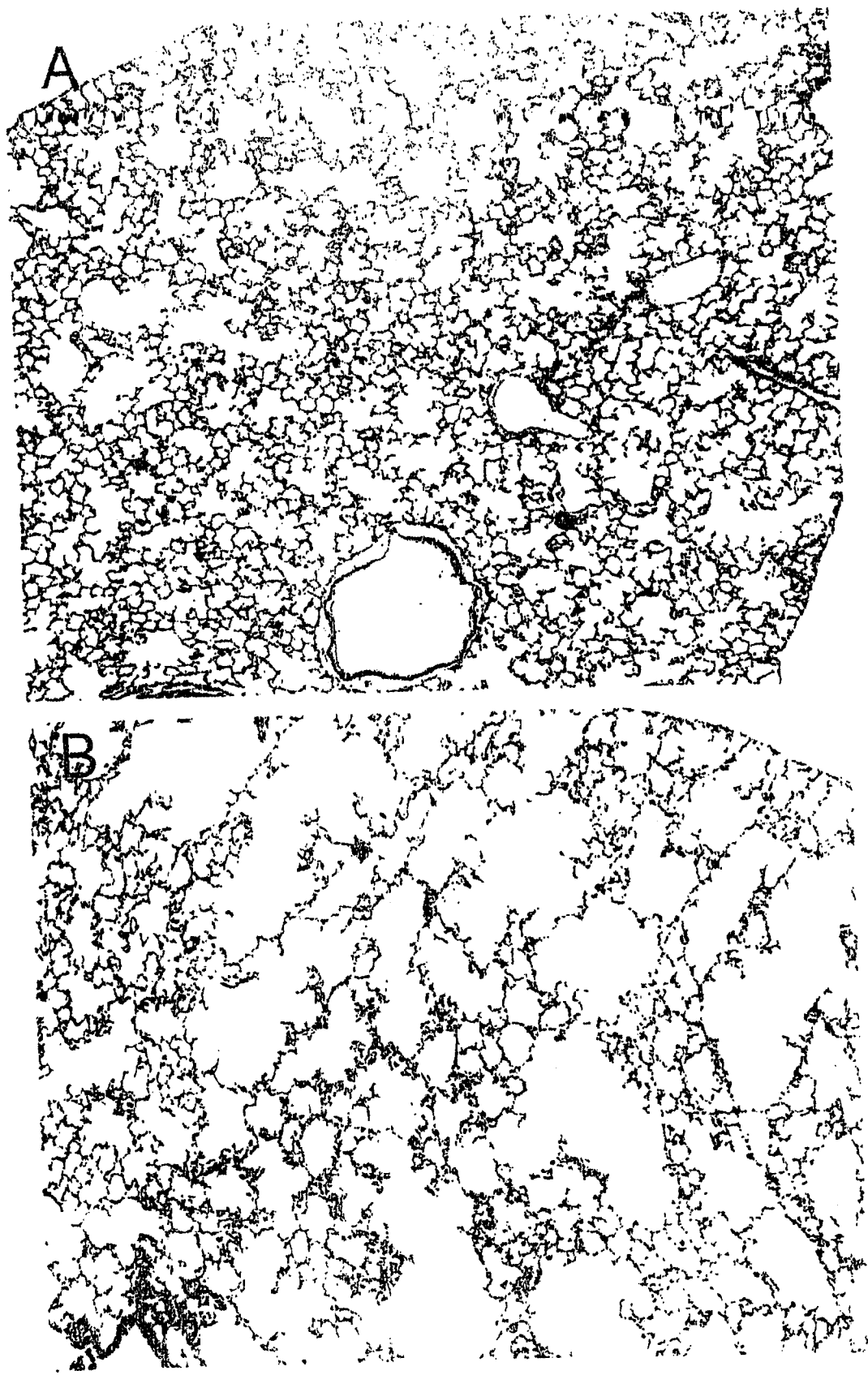


图 2

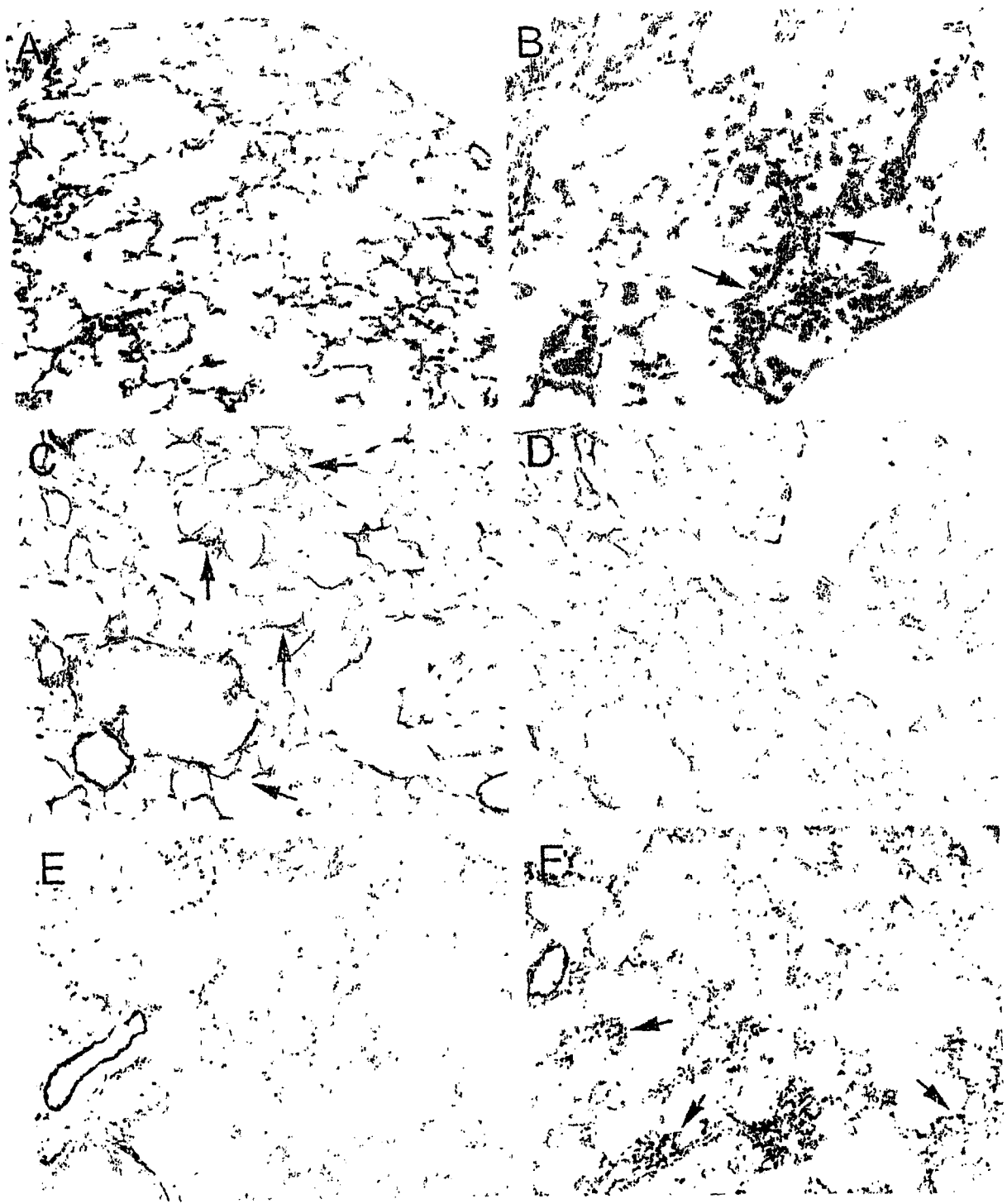


图3

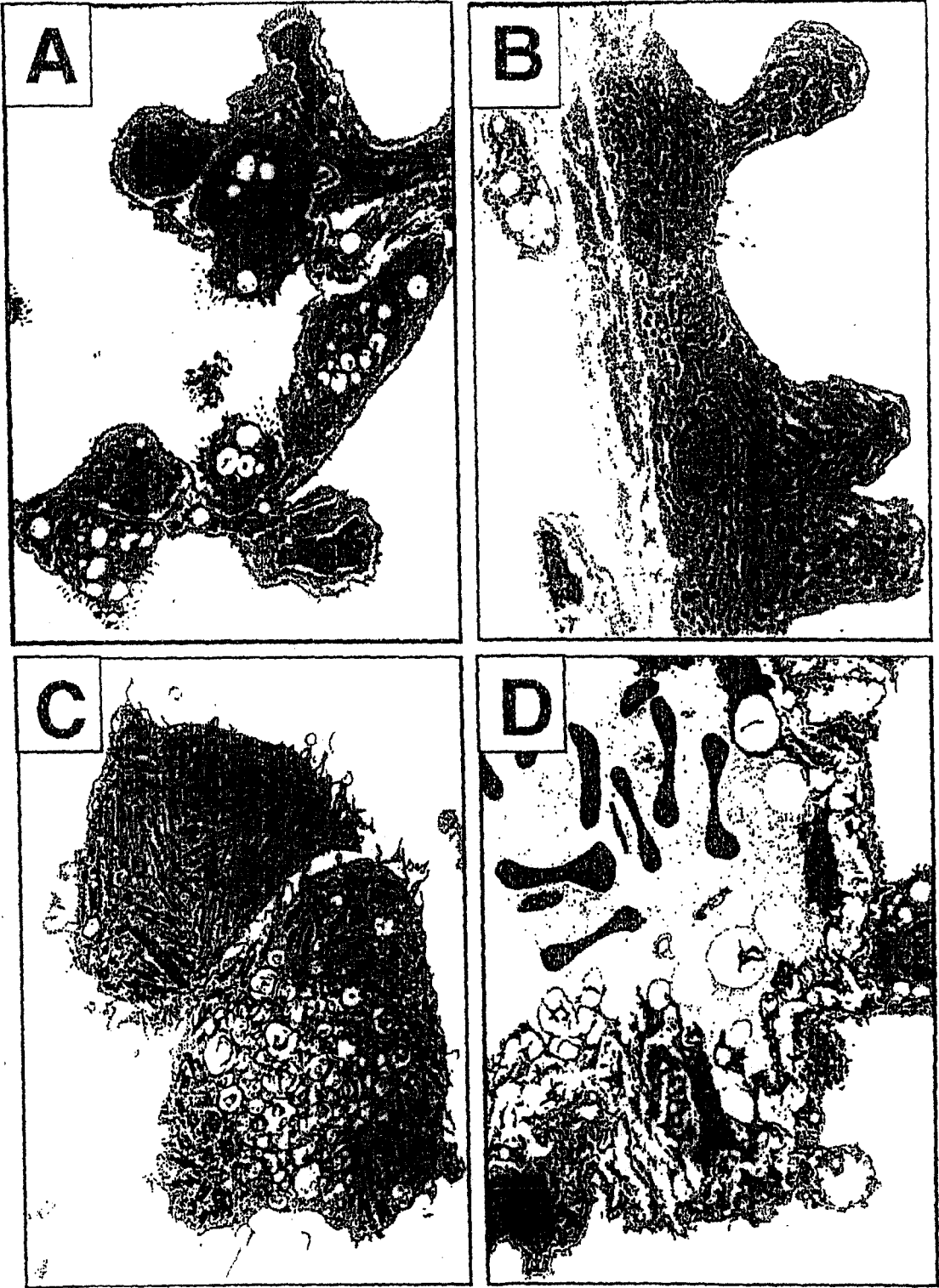


图 4

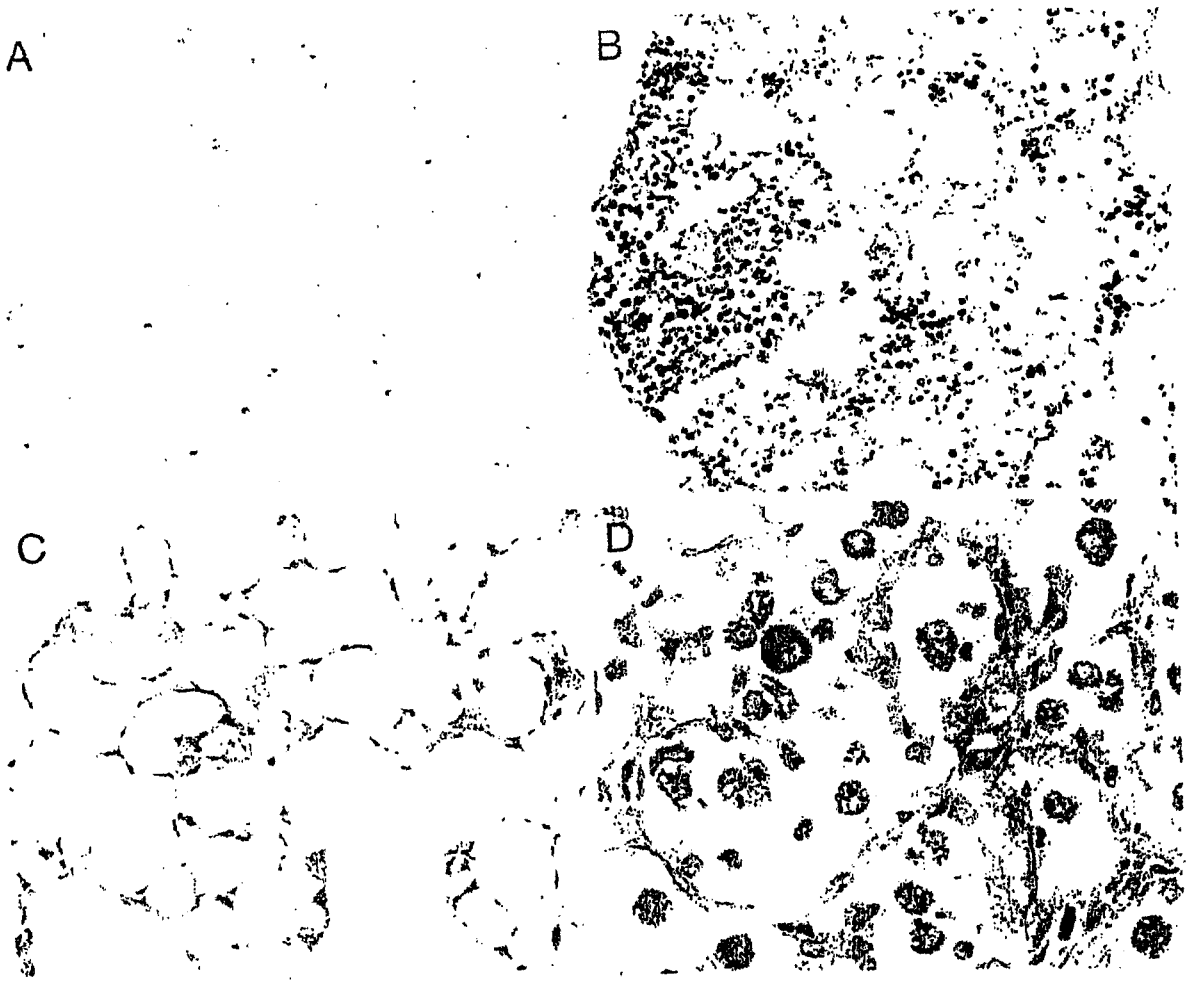


图 5



图6

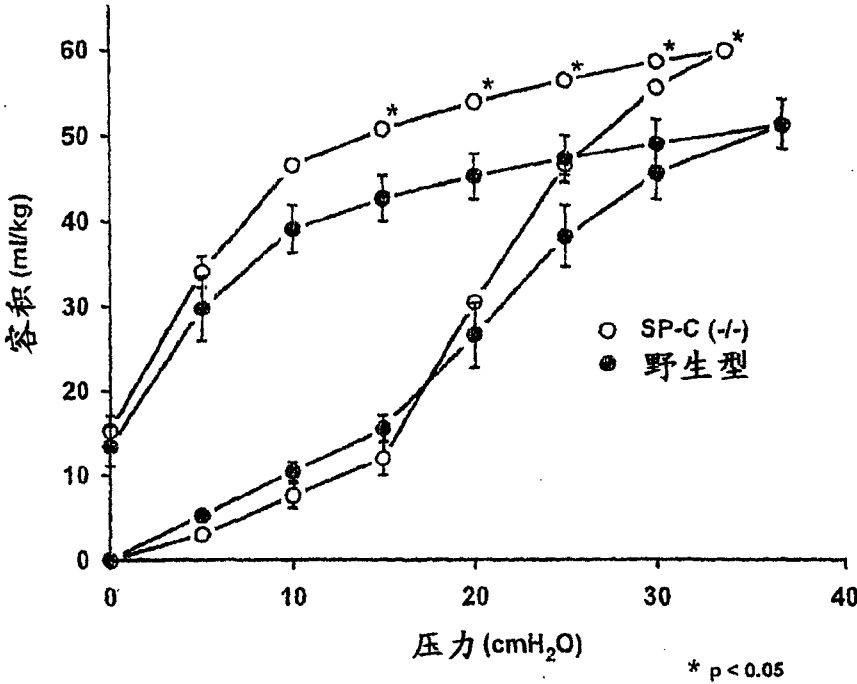


图 7

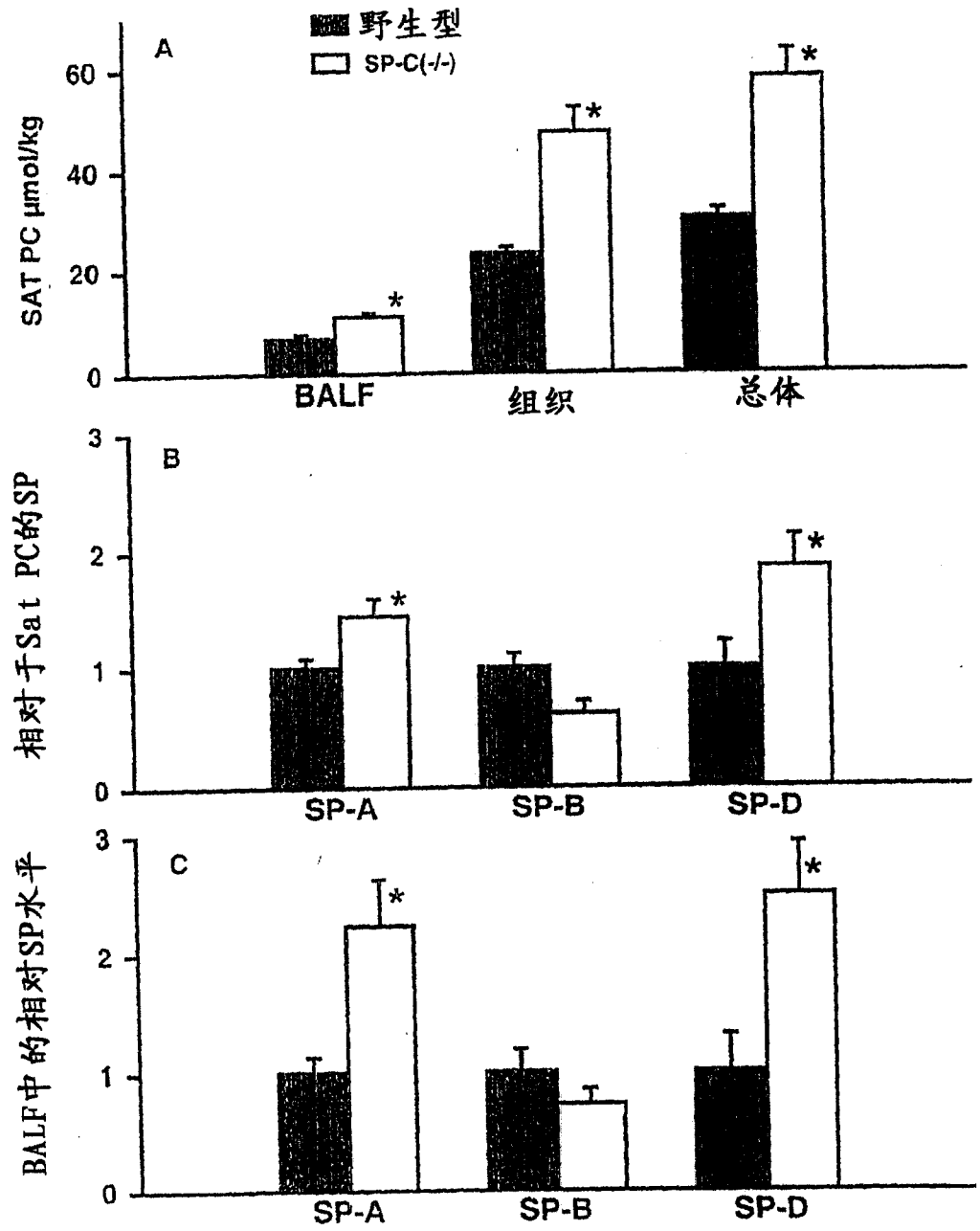


图 8

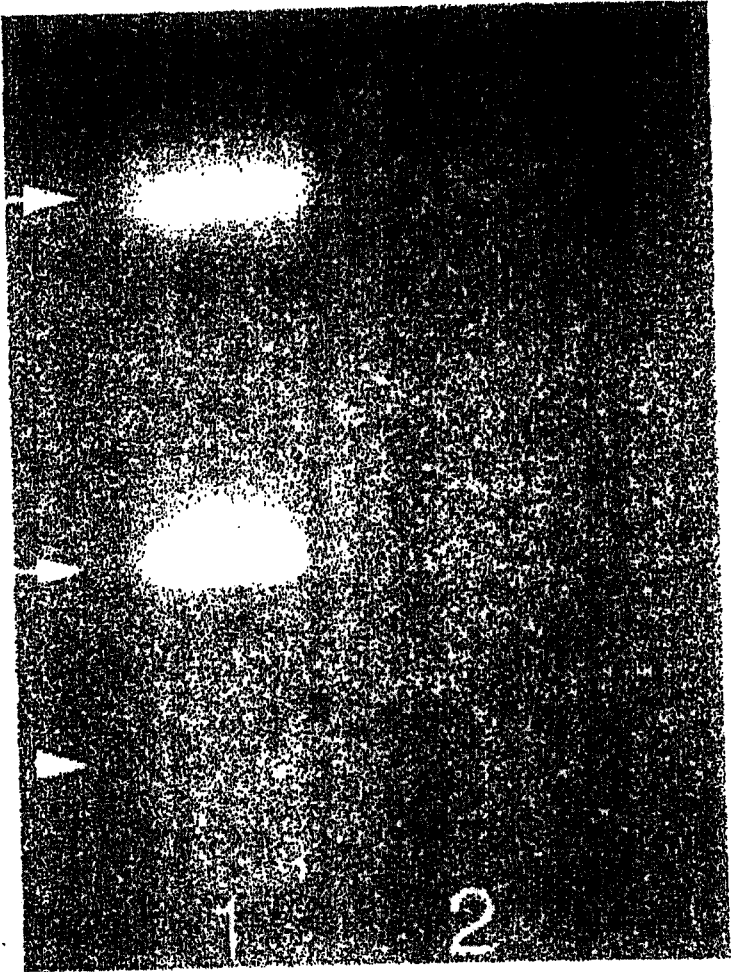


图9