

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02815294.8

A61K 38/17

A61K 48/00

A61K 49/00

A61P 15/08

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1231257C

[22] 申请日 2002.7.18 [21] 申请号 02815294.8

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 3 [33] US [31] 60/309,472

[86] 国际申请 PCT/IT2002/000473 2002.7.18

[87] 国际公布 WO2003/011326 英 2003.2.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.3

[71] 专利权人 希格马托制药工业公司

地址 意大利罗马

[72] 发明人 A·曼托弗尼

审查员 孙俊荣

[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 李华英

权利要求书 1 页 说明书 41 页 附图 2 页

[54] 发明名称 长 PENTRAXIN PTX3 用于制备增加
雌性动物生殖能力的药物中的用途

[57] 摘要

PTX3 基因或等同的 PTX3 活性对于雌性生物生育是需要。操纵 PTX3 活性将调节雌性生物生育力。雌性生物不育的影响可以得到改善；根据需要，生殖能力可得到增加或降低；雌性生物生育力可得到增强；或其组合。对影响雌性生物生育力的疗法的需求由此得到解决。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 重组人 PTX3 用于制备在需要增加生殖能力的雌性生物治疗对象中增加生殖能力的药物的用途。

2. 包含人 PTX3 cDNA 的病毒或质粒载体用于制备治疗需要增加生殖能力的雌性生物治疗对象的药物的用途。

3. 权利要求 1 或 2 的用途，其中所述药物全身施用。

4. 权利要求 1 或 2 的用途，其中所述药物局部施用。

5. PTX3 作为标志在用于测定人类女性的生殖能力的体外测定中的用途，这种测定包括测定存在于人类女性的生物液体或组织样品中的 PTX3 的量。

6. PTX3 作为靶用于筛选影响雌性生物生殖能力的药物化合物的用途。

7. 改变长 pentraxin PTX3 活性的物质在制备用于在需要这种治疗的雌性生物治疗对象中增加或降低生殖能力的药物中的用途。

8. 增加或降低长 pentraxin PTX3 活性的物质在制备分别用于治疗不育或作为避孕药的药物中的用途。

长 PENTRAXIN PTX3 用于制备增加雌性 动物生殖能力的药物中的用途

发明背景

本发明涉及对于雌性生物生育需要 PTX3 活性。降低 PTX3 活性的遗传突变导致雌性生物不育。

Pentraxin 是一个蛋白质超家族，其特征为环状多聚体结构[1]。经典的短 pentraxin C-反应蛋白 (CRP) 和血清淀粉样 P 成分 (SAP) 分别是人和小鼠中的急性期蛋白，其对炎症介质起反应在肝脏中产生；特别地，它们受白介素 - 6 直接诱导[2-3]。

长 pentraxin 与经典的短 pentranxin 具有相似性，但区别在于存在与 C 末端 pentraxin 结构域偶联的非相关长 N 末端结构域，以及基因组构成、染色体定位、细胞来源、诱导刺激和识别的配体。长 pentraxin 3 (PTX3) 是第一个被鉴定为在内皮细胞中可由白介素 -1(IL-1)诱导的基因[4]和在成纤维细胞中可由肿瘤坏死因子- α (TNF α)诱导的基因[5]的长 pentraxin。PTX3 还由巨噬细胞和其它细胞类型和组织在受到主要炎症介质(LPS, IL-1, TNF α)刺激时产生[6-8]。PTX3 由 C 末端 203 个氨基酸的 pentraxin 样结构域和 N 末端 178 个氨基酸的非相关结构域组成。当分泌时，糖基化的 PTX3 原体(45 kDa)装配形成 10 - 20 多聚体[9]。PTX3 不结合经典的 pentraxin 配体如磷酸乙醇胺、磷酸胆碱、高丙酮酸琼脂糖、胶原 IV、纤连蛋白或明胶。相反，PTX3 通过 pentraxin 结构域高亲和性地与 C1q 特异性结合[9]。PTX3 血浆水平在正常条件下非常低 (≤ 2 ng/ml) 但在数种病理情况下增加 (10-100 ng/ml) 包括感染[10]。

在 PTX3 之后克隆的其它长 pentraxin 包括豚鼠 apexin [11, 12]，其在精子顶体中表达；来自 *Xenopus laevis* 的 XL-PXN1 [13]；大鼠神经元 pentraxin 1 (NP1) [14]；人 NP1 和 NP2 [15, 16]；小鼠 NP1 和 NP2 [15]，Narp [17]，和神经元 pentraxin 受体(NRP)，这是一种推定

的整合膜 pentraxin [18-9]。长 pentraxin 的体内功能尚未明确。

PTX3 由两个结构域组成：一个与任何已知的分子不相关的 N 末端结构域和一个与短 pentraxin 如 C 反应蛋白类似的 C 末端结构域 (Breviario et al., J. Biol. Chem., 267:22190-22197, 1992)。在人 PTX3(hPTX3)和小鼠 PTX3 (mPTX3)之间发现了实质上的相似性。人和鼠 PTX3 基因之间的同一性程度为 82%，如果考虑保守置换则达到 90% (Introna et al., Blood, 87:1862-1872, 1996)。所述基因位于同线染色体位置上。hPTX3 和 mPTX3 序列之间的高度相似性是 pentraxin 在进化期间高度保守的征象 (Pepys & Baltz, Adv. Immunol., 34:141-212, 1983)。Gewurz 等对 pentraxin 进行了综述 (Curr. Opin. Immunol., 7:54-64, 1995)。

WO 99/32516 描述了 PTX3 用于治疗性治疗癌症、炎症和感染性疾病的用途。

US 专利 5,767,252 描述了属于 pentraxin 家族的对于神经元细胞的生长因子。

WO 02/36151 描述了 PTX3 用于制备预防和治疗自身免疫病理情况的药物的用途。

与前述相比，对在其 PTX3 遗传基因座进行了遗传学修饰的小鼠（其通过在胚胎干细胞中进行同源重组而产生）及其效应的研究揭示了 PTX3 活性涉及雌性生物生育。

本发明的目的是操纵 PTX3 活性并由此调节雌性生物生育力。雌性生物不育的影响可以被改善，生殖能力可以根据需要得到增强或降低，雌性生物生育力可以得到增强，或者其组合。其它治疗如体外受精需要侵入性操作和复杂的技术。由此解决了对影响雌性生物生育力的疗法的需要。其它优点和改进在下文讨论，或由本文公开内容显而易见。

药物组合物、其使用和制备方法以及其它目的在下文描述。

发明概述

本发明的一个目的是提供一种药物组合物，其包含足以影响雌性生物生殖能力的量的改变 PTX3 活性的活性剂。需要 PTX3 活性这一发现可用作对具有生殖缺陷的女性患者或雌性动物的治疗或用于诊断其生殖能力。

这种活性剂的实例包括相应于 PTX3 基因的多核苷酸、相应于由其编码的 PTX3 蛋白的多肽和其它增加或减少 PTX3 基因表达的物质。这包括本文所列的核苷酸和氨基酸序列、其类似物、含有突变或多态性的那些以及其它变异体（例如部分长度的寡核苷酸和寡肽）。至少一个 PTX3 部分与异源部分（多核苷酸或多肽）之间的杂合体分别被认为是嵌合基因或融合蛋白变异体。遗传载体可用于将至少一个 PTX3 部分穿梭运输到宿主中或通过宿主中转录和/或翻译或使用至少部分纯化的组分来表达至少一个 PTX3 部分。活化剂（例如白介素-6、NF- κ B、受体激动剂）或抑制剂（例如抗体、I κ B、受体拮抗剂）也可用作调节 PTX3 活性的活性剂。所述活性剂可来源于人类或非人类动物（例如哺乳动物）。

治疗对象可以是女性患者或雌性动物。组合物可适于全身施用或适于局部施用（即在雌性生物生殖器官之内或周围）。组合物可用于治疗不育症或作为避孕药。

本发明的另一个目的是提供向需要治疗雌性生物不育症或需要雌性生物避孕的治疗对象施用药物组合物的方法，其量足以分别增加或降低治疗对象的生殖能力。

在雌性生物治疗对象中检测 PTX3 并将该量与其生殖能力相关联是本发明的另一个目的。人 PTX3 遗传基因座中的突变可以作图到染色体 3q24-q28；相互作用的基因中的突变可作图在 PTX3 基因座之外。PTX3 变异体的功能可通过与已知的 PTX3 序列或其它 pentraxin 序列比较而确定；折叠、糖基化、分泌或形成多聚体；受体结合或信号转导；对生殖能力、生育力或不育的影响；或其组合。

本发明的另一个目的是筛选至少一种改变 PTX3 活性并由此影响雌性生物生殖能力的活性剂，以及通过这种方法获得活性剂。公开了

这种活性剂的数个实例。

本发明的另一个目的是提供经遗传突变以降低 PTX3 活性的哺乳动物细胞和非人类哺乳动物。它们提供对生殖能力缺陷（例如不育）的体外和体内模型。它们可用于筛选潜在的治疗剂或对其进行试验。

本发明的其它方面由以下描述和权利要求及其概括对于本领域技术人员而言将显而易见。

附图和序列表的简要描述

图 1A-1F 说明来自 PTX3 $-/-$ 小鼠的卵丘的异常形态学。卵丘在 hCG 处理后 14-16 小时回收。所显示的是在收集后（A 和 B）或 4 小时之后（C 和 D）。在 PTX3 $+/+$ 小鼠（A 和 C）中，颗粒细胞在卵母细胞周围形成致密和稳定的卵丘（箭头所示（arrow da mettere））。在 PTX3 $-/-$ 小鼠（B and D）中，它们松散地结合到卵母细胞并且卵丘在 4 小时内完全消失。对 PTX3 $+/+$ （E）和 PTX3 $-/-$ （F）小鼠的卵巢的组织学检查显示正常的窦卵泡（antral follicle）。

图 2A-2D 显示卵巢组织中的 PTX3 mRNA 和蛋白表达。（A）在激素诱导的超排卵（PMS 处理，48 小时后接着 hCG 处理）后卵巢中 PTX3 表达的动力学在 mRNA 水平显示。在 PMS 处理后 0, 6, 16, 24 或 48 小时以及然后在 hCG 处理后 2, 6, 16, 24 或 48 小时，收集卵巢。每泳道中上样 10 μ g 的总 RNA。对凝胶进行溴乙锭染色，显示在下方。（B）卵巢的原位杂交：颗粒细胞只在成熟卵泡中表达 PTX3 mRNA。（C）卵丘（C.O.）、卵丘细胞（C.O.细胞）和卵母细胞的 PTX3 表达通过蛋白质印迹检测。卵丘从 4 只 PTX3 $+/+$ 和 PTX3 $-/-$ 超排卵雌性生物中回收；卵丘细胞和卵母细胞分别从 7 和 14 只 PTX3 $+/+$ 超排卵雌性生物中获得。（D）显示了对来自 PTX3 $-/-$ （下图）和 PTX3 $+/+$ （上图）小鼠的卵丘的相差（右图）和免疫荧光分析（左图）。

在序列表中显示了人 cDNA 及其翻译的可读框（分别为 SEQ ID NOS:1-2）、小鼠 cDNA 及其翻译的可读框（分别为 SEQ ID NOS:3-4）、人和小鼠上游调控区（分别为 SEQ ID NOS:5-6）和 PCR 引物（SEQ ID

NOS:7-10)的序列。人和小鼠氨基酸序列的比对显示 381 个残基中有 312 个相同 (82%), 351 个残基至少相似 (92%)。两个基因均含有 3 个外显子: 第一个编码 43 个氨基酸残基; 第二个编码 135 个氨基酸残基, 与已知的序列基序无高相似性; 而第三个编码 203 个氨基酸残基, 与 pentraxin 具有相似性。一个 pentraxin 样结构域包括在 162 和 254 位的 2 个 Cys 残基和共有的 "pentraxin 样" 序列 His-Xaa-Cys-Xaa-Ser/Thr-Trp-Xaa-Ser (SEQ ID NO:11)。

本发明具体实施方案的描述

相应于全部或部分 PTX3 核酸 (例如转录物或基因) 的多核苷酸, 包括其突变体和其它变异体, 可用于增加 PTX3 活性 (例如在体内或在体外表达 PTX3 多肽), 补充或纠正遗传缺陷 (例如转染、感染), 降低 PTX3 活性 (例如反义、核酶、siRNA), 或检测互补多核苷酸。类似地, 相应于 PTX3 蛋白的多肽, 包括其突变体和其它变异体, 可直接用于提供 PTX3 活性 (如果有功能); 产生抑制性抗体、激动剂和拮抗剂; 和通过结合试验来鉴定、分离或检测相互作用的蛋白 (例如抗体、受体激动剂或拮抗剂)。

天然的 PTX3 是糖基化的 (在 203 位潜在的 N-连接糖基化位点)。在凝胶过滤中洗脱的多聚 PTX3 复合体具有约 900 kDa 的相对分子量。其在非变性和非还原条件下的凝胶电泳中迁移为约 440 kDa 的显著条带 (例如约 45 kDa 原体的 9-或 10-聚体), 在 540-600 kDa 范围内具有 2 个次要条带。圆二色性分析表明 PTX3 主要包含 β -折叠结构, 并具有一些 α -螺旋结构。PTX3 多肽或其复合体可通过对于 PTX3 基因产物的结合分子 (例如抗体、天然或非天然肽模拟物) 而间接地得到鉴定、分离或检测。

用于影响生殖能力的候选化合物可与代表性 PTX3 多核苷酸或多肽相互作用, 并筛选其提供诊断或治疗方法的能力。这些产品可用于测定 (例如诊断) 中或用于治疗; 便利地, 将它们包装为测定试剂盒或药物形式。与 C1q 结合是特异性和可饱和的 (一个 PTX3 原体结合

一个 C1q 受体), K_d 为 7.4×10^{-8} M. 动力学分析计算得到 K_{on} 为 $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 和 K_{off} 为 $4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. C1q 结合的配体是 PTX3 的 pentraxin 样结构域, 多聚化对于结合是需要的 (可能通过分子内半胱氨酸键). PTX3 的其它受体可进行表征.

本发明的另一方面是杂合 PTX3 多核苷酸或多肽: 例如转录嵌合体或翻译融合体. 在转录嵌合体中, 异源基因的至少转录调控区连接到 PTX3 多核苷酸, 或者 PTX3 基因的转录调控区连接到至少一个异源多核苷酸. 对于翻译融合体, PTX3 多肽的读框和至少一个异源氨基酸结构域被有序连接对齐. 如果将一个报道或可选择标志用作异源区域或结构域, 则突变 PTX3 核苷酸或氨基酸序列对 PTX3 功能的影响可容易地进行检测. 特别地, 转录嵌合体可用于定位 PTX3 基因的调控启动子, 而翻译融合体可用于定位 PTX3 蛋白在细胞中. 例如, 来自 PTX3 的转录调控区、配体结合结构域或多聚化结构域可包括在杂合分子中.

“PTX3”指人和小鼠基因和蛋白, 在自然界中发现的突变体和多态性, 及其变异体形式 (例如不在自然界中发现的突变体和类似物) 以及其类似物. PTX3 的化学结构可以是天然或非天然核苷酸的多聚体, 其通过天然或非天然共价键连接 (即多核苷酸), 或者是天然或非天然氨基酸的多聚体, 其通过天然或非天然共价键连接 (即多肽). 关于天然和非天然核苷酸和氨基酸的非限制性列表, 参见 WIPO Standard ST.25 (1998) 的表 1 - 4.

“突变体”是 PTX3 多核苷酸和多肽, 其具有至少一种更具活性或活性更低的功能, 一种被改变或缺失的现有功能, 一种非天然存在的新功能, 或其组合. “多态性”是 PTX3 多核苷酸和多肽, 其经遗传学改变, 但所述改变未必具有功能性后果. “类似物”是 PTX3 多核苷酸和多肽, 与天然基因或蛋白质相比, 其具有不同的化学结构但实质上等同的功能. PTX3 功能在本文详细描述. 突变体、多态性和类似物可通过基因工程或化学合成制备, 但对于非天然核苷酸、氨基酸或键, 优选后者.

“寡核苷酸”和“寡肽”是短的多核苷酸和多肽（例如少于 30、60、90 或 180 个核苷酸或氨基酸）。它们可以是本文描述的 PTX3 核苷酸或氨基酸序列的片段。通常，它们可通过化学合成制备，但也可采用对更长的多核苷酸或多肽进行切割的方法。电泳和/或反相高效液相色谱（HPLC）是合适的纯化短产物的生物化学技术。

PTX3 基因可采用严格杂交进行鉴定：例如，对于寡核苷酸，400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 50°C 或 70°C；对于 50 个碱基或更长的多核苷酸，500 mM NaHPO₄ pH 7.2, 7% 十二烷基硫酸钠(SDS), 1% 牛血清白蛋白(BSA), 1 mM EDTA, 45°C 或 65°C。PTX3 蛋白可采用抗体或其它结合蛋白作为探针使用严格结合来进行鉴定：例如，50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.05% TWEEN 20 表面活性剂, 1% BSA, 室温。冲洗条件可通过调节盐浓度和温度来改变，以使信噪比足够用于特异性杂交或结合。这种分离方法可用于鉴定未知的 PTX3 相关核酸或蛋白，分别使用检测已知的 PTX3 核酸或蛋白的探针。例如，核酸或蛋白质的混合物可通过一种或多种物理、化学和/或生物学性质来分离，然后 PTX3 核酸或蛋白的存在或缺失可通过探针的特异性结合来检测。探针还可用于检测已知的 PTX3 基因或蛋白的存在或缺失，或用于鉴定先前未知的 PTX3 基因或蛋白。封闭和冲洗条件可进行变化以获得核酸杂交或蛋白结合信号，其是靶特异性的和/或降低本底。

“分离的”产物是从其来源细胞（例如人、其它哺乳动物、细菌、酵母菌）或生产来源至少部分纯化的。例如，与来源细胞的溶胞产物相比，分离的产物是从其它化学相似的溶质（例如，对于多核苷酸为总核酸，或对于多肽为总蛋白）中至少 50%, 75%, 90%, 95% 或 98% 纯化的。对于化学合成的核苷酸或氨基酸多聚体而言，纯度通过与提前终止或阻断的产物相比较而测定，并且实际上可以被认为是分离的而不经纯化。纯化可通过生物化学技术来实现，例如细胞分级分离、离心、层析、电泳、沉淀、特异性结合或其组合。通常，当测定纯度时，忽视溶剂（例如水）和功能惰性的化学物质（例如盐和缓冲剂）。

克隆法常被用于分离所需的产物。因此，药物组合物可包括负责大部分（如果不是全部）的 PTX3 活性的活性剂。

“异源”的含义取决于上下文。例如，异源核苷酸区域连接以形成嵌合体意味着这些区域不是在自然界中发现共线的（例如来源于人的 PTX3 多核苷酸连接到人非 PTX3 转录调控区）。另一个实例是氨基酸结构域的融合，所述结构域不是在人类中发现共线的（例如来源于人的 PTX3 多肽连接到人非 PTX3 多聚化结构域）。核苷酸区域的连接或氨基酸结构域的连接，一个来源于人而另一个来源于动物，是异源的，因为它们来源于不同的物种。在另一个实例中，载体或表达构建体转染入异源宿主细胞或者异源非人生物体的基因转移(transgenesis)意味着所述载体或表达构建体不是在自然界中该细胞或生物体的基因组中发现的。“重组”产物是连接异源区域（对于重组核苷酸）或融合异源结构域（对于重组多肽）的结果。重组可以是进行基因工程，在体外用纯化的酶，或在体内在培养细胞中。

根据本发明的一个方面，与 PTX3 基因及其转录物特异性杂交的多核苷酸（例如 DNA 或 RNA，单链或双链）可用作探针或引物。这种多核苷酸可以是全长覆盖完整基因或转录的信息（例如在噬菌粒、质粒、噬菌体、粘粒、酵母人工染色体或 YAC、细菌人工染色体或 BAC 或其它载体中的重组克隆），N 末端“PTX3-独特的”或 C 末端“pentraxin 样”结构域，外显子或特定的编码区，或对于 PTX3 基因或其转录物独特但仅包含其一部分的更短长度序列。探针会稳定结合其靶以产生对 PTX3 多核苷酸或多肽特异性的杂交信号，而引物可稳定性较差地结合其靶，因为聚合或连接反应的重复循环也将产生特异性扩增信号。多核苷酸可以是至少 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1200, 2400, 5000, 10K, 20K, 40K, 100K, 250K 或 500K 个核苷酸长(包括其中间范围)。

典型地，与 SEQ ID NO: 1 或 3 的编码区相比，除外可能存在的任何缺失或插入，核苷酸序列可显示小至 85% 的序列同一性，更优选至少 90% 的序列同一性，而仍被认为是相关的。与 SEQ ID NO:2 或

4 相比, 具有小至 90% 的序列同一性的氨基酸序列被认为是相关的。但优选 95% 或更大的序列同一性, 更优选 98% 或更大的序列同一性。

如果可以不引入许多空隙而比对序列, 则不需要使用复杂的数学算法。但这种算法是本领域已知的, 并且在商业软件包中采用默认参数来实施。参见 Doolittle, *Of URFS and ORFS*, University Science Books, 1986; Gribskov and Devereux, *Sequence Analysis Primer*, Stockton Press, 1991; 和本文所引用的参考文献。一对序列之间的同一性百分比可以通过在 BESTFIT 计算机程序中执行的算法来计算 (Smith and Water-man, *J. Mol. Biol.*, 147:195-197, 1981; Pearson, *Genomics*, 11:635-650, 1991)。另一种计算序列差异的算法适合于快速的数据库搜索并在 BLAST 计算机程序中执行 (Altschul et al., *Nucl. Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997)。

当进行比较时也可考虑保守的氨基酸置换 (例如 Glu/Asp, Val/Ile, Ser/Thr, Arg/Lys 或 Gln/Asn 对), 因为这些氨基酸残基对的化学相似性预期会导致在许多情况下的功能等同。预期会保存多肽的生物学功能的氨基酸置换会保存被置换的氨基酸残基的化学属性, 如疏水性、亲水性、侧链电荷或大小。生物学功能的功能等同或保守可通过本文所述的结构确定和生物测定的方法来评价。因此, 在两个多肽间具有小至 90% 序列相似性的氨基酸序列被认为是相关的; 但是优选 95% 或更大的序列相似性, 更优选 98% 或更大的序列相似性。

在天然核苷酸序列中所用的密码子可通过采取宿主的密码子偏好而适于在异源宿主中翻译。这会适应异源宿主的翻译机制, 而实质上不改变多肽的化学结构。

PTX3 多肽及其变异体 (即缺失、结构域改组或复制、插入、置换或其组合) 对于确定结构-功能关系也是有用的 (例如丙氨酸扫描, 保守或非保守氨基酸置换)。例如, PTX3 蛋白的折叠和加工, PTX3 原体的分泌和多聚体的形成, 配体与受体结合, 信号转导, 或其组合。参见 Wells (*Bio/ Technology*, 13:647-651, 1995) 和 U.S. 专利 5,534,617。使用 PTX3 通过随机诱变或基因改组的定向演化可用于根

据选择标准获取新的和改进的功能。突变体、多态性和类似物 PTX3 多肽由合适的突变体、多态性和类似物 PTX3 多核苷酸编码。PTX3 的结构-活性关系可使用由转染到具有或不具有内源性 PTX3 的宿主细胞中的表达构建体产生的变异体多肽来进行研究(即 SAR 研究)。因此 PTX3 多肽的离散结构域中的突变可与蛋白功能的降低或甚至增加活性相关联。

PTX3 核苷酸序列可用于产生融合多肽,其具有至少一个异源肽结构域(例如亲和标记物或附加表位)。寡肽可用于产生特异性抗体和对 PTX3 特异性抗体进行表位作图。多肽可以是至少 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 或更多个氨基酸长(包括其中间范围)。寡肽可以结合到特异性结合对(例如抗体-地高辛配基/半抗原/肽,生物素-抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白,谷胱甘肽 S 转移酶-谷胱甘肽,麦芽糖结合蛋白-麦芽糖,蛋白 A 或 G/免疫球蛋白,多组氨酸-镍)的一个亲和标记物上。全长 PTX3 多肽(例如 SEQ ID NO:2 或 4)或更短的片段(例如 N 末端或 C 末端结构域)可以制备;任性地包括异源肽结构域。PTX3 多肽可以通过化学方式合成,从天然来源纯化,在转染的宿主细胞中合成,或其组合。

PTX3 核苷酸序列或其一部分可用于监测 PTX3 表达,测定 PTX3 序列,和/或检测 PTX3 变异体。本发明还提供了杂交探针和扩增引物(例如聚合酶链式反应,连接链式反应,其它等温扩增反应)。一对这种引物可用于 RT-PCR 测定以定量细胞中的 PTX3 转录物丰度。扩增引物可以是 15-30 个核苷酸长(优选约 25 个核苷酸),与有义或反义链退火(优选引物对将与每条链互补),并在 SEQ ID NOS:1, 3 和 5-6 或其互补物之内的任何位置在 3'端终止。因此,本发明将用于开发和利用 PTX3 引物和其它寡核苷酸以定量细胞中同源的 RNA 和 DNA。

多核苷酸或多肽的结合可发生在溶液中或底物上。测定形式可以需要或可以不需要将结合的与未结合的分离。可检测的信号可以是直接或间接的,连到结合的复合体的任何部分上,竞争性测定,扩增,或其组合。可以插入封闭或冲洗步骤,以提高敏感性和/或特异性。在

结合之前、之后或期间将多核苷酸或多肽、相互作用蛋白质或结合分子连到底物上导致捕获未连接的种类。这种固定在冲洗条件下将稳定地连到底物上。参见 US 专利 5,143,854 和 5,412,087。

基因表达的改变可通过影响转录起始、转录物稳定性、转录物翻译成为蛋白质产物、蛋白质稳定性、糖蛋白加工、折叠或分泌速率或其组合而在细胞中得以表现。基因、转录物或多肽还可通过诸如体外转录、体外翻译、Northern 杂交、核酸杂交、逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)、连缀转录、Southern 杂交、代谢蛋白标记、抗体结合、免疫沉淀 (IP)、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA)、荧光标记或组化染色、显微镜和数字图像分析以及荧光激活细胞分析或分选的技术来进行测定。

其产物容易测定的报道或可选择标志基因可用于便利的检测。报道基因包括例如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶 (LacZ)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、 β -葡糖苷酸酶 (GUS)、荧光素酶 (LUC)、绿色和红色荧光蛋白 (分别为 GFP 和 RFP)、辣根过氧化物酶 (HRP)、 β -内酰胺酶及其衍生物 (例如蓝色 EBFP, 蓝绿色 ECFP, 黄-绿色 EYFP, 去稳定化的 GFP 变异体, 稳定化的 GFP 变异体, 或由 Clontech 以 LIVING COLORS 荧光蛋白出售的融合变异体)。报道基因会使用关连的底物, 所述底物优选通过色原、荧光或发光信号来测定。或者, 试验产物可附加有异源表位 (例如 FLAG, MYC, SV40 T 抗原, 谷胱甘肽转移酶, 多组氨酸, 麦芽糖结合蛋白), 对于所述表位可得到关连的抗体或亲和树脂。存在赋予抗性的可选择标志基因的药物实例为氨基青霉素, 遗传霉素/卡那霉素/新霉素, 潮霉素, 嘌呤霉素和四环素。代谢酶 (例如二氢叶酸还原酶, HSV-1 胸腺嘧啶激酶) 在敏感的宿主细胞或营养缺陷体中可用作可选择标志。例如, 氨基蝶呤可增加与 DHFR 可选择标志关联的多核苷酸的拷贝数, 或者更昔洛韦可对病毒胸腺嘧啶激酶可选择标志进行负选择。

多核苷酸可连接到接头寡核苷酸或结合到特异性结合对 (例如抗体-地高辛配基/半抗原/肽表位、生物素-抗生物素蛋白/链霉抗生物

素蛋白, 谷胱甘肽 S 转移酶或 GST-谷胱甘肽, 凝集素-糖, 麦芽糖结合蛋白-麦芽糖, 多组氨酸-镍, 蛋白 A/G-免疫球蛋白) 中的一个成员。多核苷酸可以通过连接编码结合成员的核苷酸序列而结合。多肽可以通过产生由这种连接的或结合的多核苷酸编码的融合体, 或者通过化学交联直接化学键合到结合成员上的反应性部分, 而连接到特异性结合对中的一个成员。这种多核苷酸和多肽可以用作亲和试剂以鉴定、分离和检测涉及表达载体的转录物或蛋白产物的特异性结合的相互作用。在转录物或蛋白产物的亲和结合之前或之后, 连到多核苷酸或多肽的成员可结合其关连的结合成员。这可以在溶液中产生复合体或固定到支持体上。蛋白酶识别位点(例如对于肠激酶、Xa 因子、ICE、分泌酶、凝血酶) 可包含在邻接的结构域之间, 以允许发生分离那些结构域和/或灭活蛋白活性的位点特异性蛋白水解。

探针和引物可用于鉴定 PTX3 基因或其变异体。例如, 对本文所鉴定的人 PTX3 基因特异性的探针或引物可用于检测该基因的存在或缺失, 由此分别推断该基因的来源存在与否。PTX3 基因的遗传多态性和突变可通过以下方法特异性检测: 将潜在错配的碱基置于探针的中间部分或引物的 3'端以稳定或不稳定探针或引物与其靶的结合, 分别取决于在该位置的靶序列是否与该碱基互补。

遗传多态性和突变还可通过以下方法检测: 限制酶切片段 (RFLP), 核酸酶保护的片段 (例如 S1 核酸酶, 脱氧核糖核酸酶 I, 核糖核酸酶 A,H 或 T1) 或扩增产物的长度的改变。对于复杂的遗传指纹, 可以不需要对每一成分进行鉴定, 因为彼此邻接并行的观察比较可容易地检测出差异 (例如 RAPD)。差异也可以通过以下方法检测: 分别通过凝胶电泳或等电聚焦显示 PTX3 蛋白的分子量 (MW) 或等电点 (pI) 的改变。

PTX3 蛋白的存在可用作人或动物液体或组织中 PTX3 活性的指示。所述液体可以是血液、血液产品 (例如血浆、血清)、灌洗液、痰或诸如此类。示例性的组织是那些上皮组织 (例如肺) 或粘膜组织 (例如口腔、阴道), 尽管感染可以是全身的并涉及其它组织类型。对于实

体组织，信号可以在原位检测；在分散或匀浆的组织上，在溶液（例如稀释的或未稀释的体液、冲洗液），或在细胞涂片或接触制备物上检测。可以受精的卵母细胞可通过 PTX3 表达进行选择。

构建穿梭或表达载体

穿梭或表达载体是化学形式为脱氧核糖核酸（DNA）和/或核糖核酸（RNA）的重组多核苷酸。载体的物理形式可以是单链或双链的；其拓扑学可以是线性或环状的。载体优选为双链脱氧核糖核酸（dsDNA）或在引入细胞（例如逆转录病毒插入宿主基因组作为原病毒）之后被转化为 dsDNA。载体可包括一个或多个来自哺乳动物、昆虫、植物或真菌基因或病毒（例如腺病毒、腺伴随病毒、巨细胞病毒、鸡痘病毒、单纯疱疹病毒、慢病毒、Moloney 白血病毒、小鼠乳腺瘤病毒、劳氏肉瘤病毒、SV40 病毒、痘病毒）的区域，以及适于遗传操作的区域（例如可选择标志、具有限制性核酸内切酶的多个识别位点的接头、用于体外转录的启动子、用于体外复制的引物退火位点）。载体可与蛋白质和其它核酸结合在载体（carrier）中（例如包装在病毒颗粒中）或用化学物质（例如阳离子聚合物）凝聚，以靶向进入细胞或组织。载体多核苷酸的选择和将其引入雌性生物生殖系统（例如子宫内膜，卵巢）的方法在本领域技术范围之内。

表达载体可进一步包含基因表达的调控区（例如启动子、增强子、沉默子、剪接供体或受体位点、多腺苷酸化信号、细胞定位序列）。使用活性剂，及对该活性剂有反应的调控系统（例如四环素/tetR 或 FK506/FKBP），可实现不同水平的转录。载体还可在表达区域内包括一个或多个剪接供体和受体位点；在表达区域上游用于翻译起始的 Kozak 共有序列；和在表达区域下游，多个正向读框(forward reading frames)的三联(in the three)终止密码子，以确保翻译的终止，一个或多个 mRNA 降解信号，转录信号的终止，多腺苷酸化信号，和 3'切割信号。对于不含内含子的表达区域（例如来自 cDNA 的编码区），可以优选或可以不优选一对剪接供体和受体位点。但是，如果需要仅在诱

导条件下表达一个或多个下游区域,则包括 mRNA 降解信号会是有用的。

穿梭载体可进一步包含复制起点 (ARS), 其使得整合到宿主基因组中的载体进行复制或作为自主复制游离体进行复制。着丝点和端粒序列也可包括在内, 分别用于染色体分离和保护染色体末端的目的。随机或靶向整合入宿主基因组更有可能确保维持载体, 但游离体可通过选择压力得以维持, 或者对于载体仅仅短暂存在的应用是优选的。

载体可以是穿梭载体和表达载体。

表达区域可来源于任何感兴趣基因, 并且以相对于启动子的任一方向提供。以反义定向的表达区域将用于制备反义多核苷酸或 siRNA。基因可来源于宿主细胞或生物体, 来自其相同的物种, 或重新设计。与可享有与 PTX3 共同功能的基因的结构域的融合可进行测定, 以定义赋予该功能的结构域或提供多功能融合蛋白。融合还可以用附加表位 (例如 GFP, GST, HA, MYC) 来制备。一些基因产生可供选择的转录物, 编码装配为同多聚体或异多聚体的亚基, 或产生通过蛋白酶切割而活化的前肽。表达区域可编码翻译融合体; 编码多肽和至少一个异源结构域的区域的可读框可有序连接对齐。如果将报道或可选择标志用作异源结构域, 则融合蛋白的表达可容易地测定或定位。异源结构域可以是亲和标记物或附加表位。

筛选候选化合物

本发明的其它方面是化学或遗传学化合物、其衍生物和包括它们的组合物, 其在治疗不育或避孕方面有效。施用于需要治疗的对象的量、其制剂和给药时间及途径有效降低生育力、增加或降低生殖能力或增强生育力。对这种量、制剂和给药时间及途径的确定在本领域技术范围之内。

筛选方法可包括将候选化合物施用于生物体或将候选化合物与细胞一起培养, 然后测定基因表达是否得到调节。这种调节可以是活性的增加或降低, 其部分或完全补偿与生育或不育相关或可引起生育或

不育的改变。基因表达可以在转录起始或延伸的速率、转录物的稳定性、翻译起始或延伸的速率、蛋白的稳定性、蛋白加工、折叠或分泌的速率、处于活性构象的蛋白的比例、多聚体的形成、与受体的结合或其组合的水平增加或减少。参见例如 US 专利 5,071,773 和 5,262,300。高效筛选测定是可能的（例如通过使用并行处理和/或机器人工程学）。

筛选方法可包括将候选化合物与含有报道构建体的细胞一起培养，该报道构建体包含 PTX3 的转录调控区，以顺式构型与编码可测定产物的下游基因共价连接；和测定可测定产物的产生情况。具有 PTX3 基因的上游区域的嵌合体或具有起始 ATG 密码子的符合读框的翻译融合体可用于提供转录调控区。例如，可以使用 SEQ ID NO:5 或 6 的任何部分。增加可测定产物产生的候选化合物会被鉴定为活化基因表达的活性剂，而减少可测定产物产生的候选化合物会被鉴定为抑制基因表达的活性剂。参见例如 US 专利 5,849,493 和 5,863,733。

对 PTX3 转录的调节（例如转录调控区和关连的转录因子）对于小鼠和人基因已得到表征 (Altmeyer et al., J. Biol. Chem., 270:25584-25590, 1995; Basile et al., J. Biol. Chem., 272:8172-8178, 1997)。PTX3 转录对于某些细胞类似是特异性的。PTX3 转录对细胞因子刺激的反应性似乎是通过与 NF κ B 和 I κ B 转录因子以及细胞特异性因子的相互作用而介导的。

筛选方法可包括测定在候选化合物的存在或缺失情况下来自报道构建体的体外转录（报道构建体包含转录调控区），然后确定转录是否受到候选化合物存在的改变。体外转录可使用无细胞的提取物、部分纯化的细胞级分、纯化的转录因子或 RNA 聚合酶或者其组合来测定。参见例如 US 专利 5,453,362; 5,534,410; 5,563,036; 5,637,686; 5,708,158; 和 5,710,025。

测定体内转录或翻译活性的技术在本领域是已知的。例如，可采用核连缀测定法来测定报道基因的转录。报道基因的翻译可通过测定翻译产物的活性来测定。报道基因的活性可通过测定多核苷酸产物

的转录（例如 RT-PCR 或转录物），多肽产物的翻译（例如对蛋白进行免疫测定）和报道蛋白本身的生物学活性中的一种或多种来测定。

然后可对增加或减少 PTX3 基因表达或蛋白活性的化合物测定其对生殖能力、降低生育力或增强生育力的影响。

附加表位的 PTX3 蛋白或对 PTX3 蛋白特异性的抗体可用于亲和纯化多聚体或其它含 PTX3 的复合体。可筛选候选化合物降低丰度（即复合体的稳定态水平）、装配分泌速率、或复合体的生物学活性的能力。例如，增强或抑制 PTX3 蛋白与其受体间结合的化合物可得以鉴定。PTX3 蛋白可连到如上所述的底物上。将候选化合物与固定的 PTX3 蛋白在至少部分纯化形式或作为粗混合物的复合体的至少一种其它成分的存在下一起温育。此外，复合体的一种或多种成分可连到底物上，并且候选化合物可与固定的成分在 PTX3 蛋白的存在下有或无至少部分纯化形式或作为粗混合物的另外的复合体成分情况下一起温育。结合条件的实例如下所示。温育之后，可将所有非结合成分洗去，留下与底物结合的一种或多种复合体成分。包括 PTX3 蛋白的复合体形成也可在溶液中进行，然后可以固定或不固定含 PTX3 的复合体。还原是可逆的反应，其解开 PTX3 多聚体。在冲洗并将复合体与其它蛋白分离（例如多相测定）或不与其它蛋白分离（例如均相测定）后可以定量复合体的每一成分的量。例如，可以使用免疫学测定如 ELISA, RIA 或蛋白质印迹进行测定。可通过抗体与表位的结合来测定复合体形成，所述表位依赖于形成或在形成之后被掩蔽。通过将复合体的至少一种成分与底物结合，可以在形成之前或之后固定复合体。复合体与底物的结合可以不经分离而通过近似检测如 SPA 或 BiaCore 来测定。复合体的一种或多种结合的成分的量在有和无候选化合物的情况下测定。理想的化合物是增加或降低 PTX3 丰度、装配、分泌、多聚体形成、生物学活性或其组合的化合物。

用于治疗的遗传学化合物

活化可以这样实现：诱导包含编码具有 PTX3 活性的蛋白或上调

PTX3 活性（例如 PTX3 基因的全长编码区或功能部分；其超效等位基因突变体、同源物、直向同源物(ortholog)或共生同源物(paralog)；急性期诱导物；作用于 PTX3 基因的阳性转录因子)或编码解除对 PTX3 活性的抑制的蛋白（例如至少部分抑制 PTX3 基因的负性调节物的表达）的表达区域的表达载体。转录或翻译的超表达以及超表达蛋白功能，是基因活化的更为直接的途径。或者，下游表达区域可定向同源重组到基因组中的基因座内，由此用表达盒或特定的基因突变取代该基因的内源性转录调控区。

可通过转染或基因转移技术，使用例如一种或多种化学物质（例如磷酸钙、DEAE-葡聚糖、脂质、聚合物）、biolistics、电穿孔、裸 DNA 技术、微注射或病毒感染，而将表达载体引入宿主细胞或非人类动物中。引入的表达载体可整合入细胞或动物的宿主基因组中，或维持为游离体。用于制备脂质载体的许多中性和带电荷的脂质、甾醇和其它磷脂是已知的。例如中性脂质为二油酰基磷脂酰胆碱(DOPC)和二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)；阴离子脂质为二油酰基磷脂酰丝氨酸(DOPS)；阳离子脂质为二油酰基三甲基铵丙烷(DOTAP)，二-十八烷基二酰氨基-甘氨酸精胺(DOGS)，二油酰基三甲铵(DOTMA)，和 1,3-二油酰基氧-2-(6-羧基 spermyl)-丙酰胺四乙酸(DOSPER)。可掺入二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)以改善递送的效力和/或稳定性。FUGENE 6, LIPOFECTAMINE, LIPOFECTIN, DMRIE-C, TRANSFECTAM, CELLFECTIN, PFX-1, PFX-2, PFX-3, PFX-4, PFX-5, PFX-6, PFX-7, PFX-8, TRANSFAST, TFX-10, TFX-20, TFX-50 和 LIPOTAXI 脂质是专利制剂。聚合物可以是阳离子树状物、聚酰胺、聚酰胺型胺类、聚乙二醇或聚丙二醇(PEG)、聚氮丙啶(PEI)、聚赖氨酸，或其组合；或者聚合物材料可形成纳米颗粒或微粒。在裸 DNA 技术中，载体（通常作为质粒）被递送到细胞或组织，在那里它可以或不整合入宿主基因组中，而不使用化学转染剂（例如脂质、聚合物）在其引入细胞或组织之前凝聚载体。

动物、昆虫、真菌或细菌细胞可以被转染；基因转移可以用非人

类动物。来自基因的同源区域可用于定向整合到宿主基因组中的特定遗传基因座，由此调节在该基因座的基因的表达（例如在 PTX3 遗传基因座同源重组无启动子的报道或可选择标志）或可以插入 PTX3 基因的异位拷贝。多肽也可以用细胞提取物在体外产生或用经遗传操作的细胞在体内产生。

表达载体可用于取代被下调或完全缺陷的基因的功能，补充部分缺陷的基因的功能，或与基因的活性竞争。因此，宿主的关连基因活性可以是新效等位基因的、亚效等位基因的、超效等位基因的或正常的。功能的取代或补充可以通过上面讨论的方法来完成，可以对经遗传操作的细胞或生物体进行选择下游区域的高或低表达（例如评价转录或翻译的产物的量或任一产物的生物学功能）。表达的下游区域与新效等位基因的、超效等位基因的或正常的基因之间的竞争可以实现，因为多聚蛋白复合体中存在综合的相互作用。或者，表达载体的下游区域可以编码在胞内抑制功能的负调节物或单链抗体。因此，由反义、核酶或其中表达载体包含对应于未修饰的反义分子、核酶或对应于 PTX3 核苷酸序列的一部分的 siRNA 分子的下游区域的 RNA 干扰技术可实现对 PTX3 活性的至少部分抑制。

然后可以测定增加或减少 PTX3 基因表达或蛋白活性的化合物其对生殖能力、降低生育力或增强生育力的影响。

反义多核苷酸可通过与 mRNA 转录物杂交或降解这种基因转录物从而直接阻断翻译而发挥作用。反义分子可以重组制备，使用反义定向的基因的至少一个功能性部分作为表达载体中启动子下游的区域。化学修饰的碱基或键可用于稳定反义多核苷酸，通过减少降解或延长在体内的半衰期（例如甲基膦酸酯，硫代磷酸，肽核酸）。反义分子的序列可以与翻译起始位点互补（例如在靶核苷酸序列的-10 和+10 之间）。

核酶催化 RNA 转录物或基因组的特异性切割。作用机制包括与互补的细胞或病毒 RNA 发生序列特异性杂交，然后是核酸内切切割。抑制可以或不依赖于核糖核酸酶 H 活性。核酶包括一条或多条与靶

RNA 互补的序列以及负责 RNA 切割的催化序列（例如锤头、发夹、斧头基序）。例如，在对象 RNA 之中的潜在核酶切割位点最初是这样鉴定的：扫描对象 RNA 以发现核酶切割位点，其包括以下三核苷酸序列：GUA, GUU 和 GUC。一旦得到鉴定，可评价对应于含有切割位点的对象 RNA 的区域的约 15 到约 20 个核糖核苷酸的寡核苷酸的预测的结构特征，如二级结构，其可以使得候选寡核苷酸序列不适合。然后，可通过其与靶 RNA 杂交并切割靶 RNA 的能力来评价候选序列的合适性。核酶可以重组产生或化学合成。

siRNA 指至少 20 - 25 个碱基对的双链 RNA，其介导 RNA 干扰（RNAi）。对应于靶 RNA 的双螺旋 siRNA 可通过以下方法形成：分别转录各链，从具有相反极性的一对启动子的偶联转录，或具有至少部分自身互补序列的单链 RNA 的退火。或者，至少约 21 到约 23 个碱基对的双螺旋寡核糖核苷酸可以化学合成（例如具有 2 个核糖核苷酸的 3' 突出端的 21 个核糖核苷酸的双螺旋），可以容忍一些由修饰碱基的置换。但是，在 siRNA 序列中心的错配可消除干扰。RNA 干扰所针对的区域应被转录，优选作为基因的编码区。干扰似乎依赖于细胞因子（例如核糖核酸酶 III），所述细胞因子在相距 21 - 23 个碱基的位点切割靶 RNA；切割位点的位置似乎由引导 siRNA 的 5' 端而不是其 3' 端来定义。由少量的 siRNA 引发可在由 RNA 依赖性 RNA 聚合酶扩增后触发干扰。

对 PTX3 特异性的抗体可用于抑制或检测。多克隆或单克隆抗体可通过用抗原免疫动物（例如鸡、仓鼠、小鼠、大鼠、兔、山羊、马）来制备，任选针对相同或相关的抗原进行亲和纯化。抗原可以是天然蛋白质、通过蛋白水解或基因工程制备的片段、融合蛋白或在体外翻译或合成的蛋白，其包括至少一个或多个由抗体结合的表位。抗体片段可通过蛋白水解切割或基因工程制备；人源化抗体和单链抗体可通过从抗体的抗原结合区移植序列到构架分子来制备。其它结合分子（例如配体 - 受体结合的激动剂或拮抗剂）可通过筛选组合文库中特异性结合抗原的成员（例如噬菌体展示文库）来制备。抗原可以由基因

编码的全长蛋白质或其片段。抗体可以是对 PTX3 特异性的或它可以与其它 pentraxin 交叉反应，取决于在不同物种中由抗体识别的表位如何保守。参见例如 US 专利 5,403,484; 5,723,286; 5,733,743; 5,747,334;和 5,871,974。

PTX3 特异性结合剂（例如多核苷酸、多肽）可诊断性用于检测 PTX3 核酸或蛋白，或用于治疗以抑制 PTX3 活性（例如转录、翻译、加工、分泌、受体结合）。特别地，影响 PTX3 转录和 PTX3 与受体结合的活性剂是理想的。

本发明的化合物或其衍生物可用作药物或用于配制具有一种或多种本文所公开的用途的药物组合物。

因此，本发明的一个目的是重组人 PTX3 用于制备增加雌性生物治疗对象的生殖能力的药物的用途。

本发明的另一个目的是含有人 PTX3 cDNA 的病毒或质粒载体用于治疗需要增加生殖能力的雌性生物治疗对象的用途。

本发明的另一个目的是 PTX3 蛋白在人类女性中作为生殖能力的诊断标志的用途。

本发明的另一个目的是 PTX3 作为靶蛋白用于筛选药物化合物以评价其影响雌性生物治疗对象的生殖能力的能力的用途。

本发明的化合物可在体外施用于培养细胞，在体内施用于体内的细胞，或离体施用于处于治疗对象之外而后可被送回到相同治疗对象或另一个治疗对象体内的细胞。该治疗对象是生殖年龄的雌性生物；其想要怀孕或处于怀孕风险之中。

化合物或其衍生物可用于制备药物或其它药物组合物。还包含药学可接受载体的组合物和还包含用于将组合物递送到治疗对象的成分的组合物应用在本领域是已知的。向本发明的组合物加入这种载体和其它成分在本领域技术水平范围之内。

药物组合物可作为适于直接应用于雌性生物生殖系统（例如子宫内膜，卵巢）或适于通过肠道或血循环的制剂来施用。或者，可将药物组合物加入培养基中。除了活性化合物之外，这种组合物还可含有

药学可接受的载体和其它已知有助于给药和/或增强吸收的成分。组合物可以以单剂或在不同时间给予的多剂来施用。

药物组合物可通过任何已知的途径施用。作为实例，组合物可通过粘膜、肺、局部或其它定位或全身途径（例如肠和肠胃外）给予。特别地，在生殖系统之中或周围达到有效量的 PTX3 活性可能是理想的。这可以包括局部应用、在生殖器官周围植入或阴道栓的应用。术语“肠胃外”包括皮下、皮内、肌内、静脉内、动脉内、鞘内和其它注射或输注技术，没有限定。

可以作出在剂量的量和时间设定、制剂和给药途径方面的合适选择，目的在于在治疗对象中实现有利的反应（即效力），并避免不适当的毒性或其它对治疗对象的损害（即安全性）。因此，“有效”指这种选择，其涉及对条件的常规操作以达到所需的效应：例如影响生殖能力、增强生育力或降低生育力。

一天一次施用于雌性生物治疗对象的大丸剂配方是便利的给药方案。或者，有效剂量可每隔一天、一周一次或一月一次给予。药物组合物中活性成分的剂量水平也可以变化，以在治疗对象中达到短暂或持续的化合物或其衍生物的浓度，并产生所需的治疗反应。但是剂量从低于实现所需治疗效应所需的水平开始并逐渐增加剂量直至达到所需的效应，也在本领域技术范围之内。

可以相对于雌性生物治疗对象的生殖周期（例如月经）来设定给药时间。实际上，可以采用体温或激素水平作为象排卵和月经这样的生殖事件的替代物。

所施用的化合物的量取决于诸如以下的因素：例如化合物的生物活性和生物利用率（例如在体内的半衰期，稳定性和代谢）；化合物的化学性质（例如分子量，疏水性和溶解度）；给药途径和方案；及诸如此类。还将理解对于任何特定治疗对象而言，有待达到的具体剂量水平可取决于多种因素，包括年龄、健康状况、病史、体重、与一种或多种其它药物的组合以及疾病的严重程度

术语“治疗”指(*inter alia*)减轻或改善患病对象中不育症的一种或

多种症状。对于给定的治疗对象，症状的改善、其恶化、消退或进展可通过客观或主观指标来确定。治疗还可包括与其它现有治疗模式和药剂（例如超排卵）的组合。因此，可以实施联合治疗。

实施例

对 PTX3 基因进行遗传学修饰的杂合雌性和雄性小鼠是正常和能生育的。群体内繁殖以孟德尔频率产生预测数目的纯合裸鼠。但是在纯合雌性和雄性 (PTX3 -/-) 之间的繁殖完全不能生育。繁殖结果表明，纯合雄性当与野生型 (PTX3 +/+) 或杂合 (PTX3 +/-) 雌性交配时在正常情况下是能生育的，而 PTX3 -/- 雌性总是不能生育的，与雄性基因型无关。交配试验表明，在 PTX3 -/- 和 PTX3 +/+ 雌性之间，在 4 天期间或在超排卵后的自发交配后的性交栓 (copulation plug) 的频率的方面没有差异 (表 1)。自发排卵的卵子的数目 (表 1) (平均 7/小鼠, $n = 4$, 在 PTX3 +/- 中; 和 7.8/小鼠, $n = 8$, 在 PTX3 -/- 小鼠中) 或激素诱导排卵的卵子的数目 (平均 35/小鼠, $n = 9$, 在 PTX3 +/- 中; 和 27/小鼠, $n = 18$, 在 PTX3 -/- 小鼠中) 在 +/+ 和 -/- 小鼠中相当。数据来自进行的 4 次试验中的一次有代表性的试验。卵母细胞和透明带的形态学是正常的，并且在人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 处理后 16 小时从 PTX3 +/+ 和 PTX3 -/- 小鼠获得的约 50% 卵母细胞中观察到了第一极体 (表 1)。这些数据表明排卵和卵母细胞成熟是正常的并且不是不育的原因。相反，持续观察到从 PTX3 -/- 小鼠的输卵管收集的卵丘的形态学异常 (图 1B 和 1D)，因为颗粒细胞松散地结合到卵母细胞并且不形成辐射冠。来源于 PTX3 -/- 的卵丘在体外不稳定，在收集后 (hCG 后 14 - 16 小时, 或在自然交配后 0.5 天) 颗粒细胞在短时间内 (在 PTX3 -/- 中为 15 - 60 分钟, 相对于在 PTX3 +/+ 卵丘中为数小时) 自发地从卵母细胞上解离下来，迅速导致卵母细胞裸露。

表 1. PTX3 -/-小鼠中正常的交配频率和排卵

	PTX3 +/+	PTX3 -/-	P 值
交配频率			
自发的 (a)			
第一天	4/9	2/10	NS
第二天	2/5	2/8	NS
第三天	2/3	2/5	NS
超排卵之后	4/4	8/8	NS
排卵			
自发的(b):排卵的小鼠	4/4	5/5	NS
卵子/小鼠	7	7.8	- #
超排卵之后:排卵的小鼠	5/5	6/6	NS
卵子/小鼠	37.8	33.3	-
在排出的卵子中	53/98	54/109	NS
极体的存在(c)	(54%)	(49%)	-

(a) 将雌性与雄性一起圈养 4 天，并且每天检查性交栓的存在。

(b) 在有性交栓的雌性中分析排卵。

(c) 在 HCG 处理后 15 小时回收的卵母细胞中评价第一极体的存在。

NS, 通过 Fischer's exact 检验与对照 PTX3 +/+小鼠无显著差异 ($p < 0.05$).

数目指来自 PTX3 +/+或 PTX3 -/-小鼠的混合的样本。在对 5-7 只小鼠的 4 次试验中观察到类似的缺乏差异。

为了理解妊娠是否以及何时被中断，在自发或激素诱导排卵后交

配之后的不同时间点收集受精卵和胚胎。未观察到卵母细胞在体内发育为 2 细胞阶段 (1.5 天) (表 2) 或具有两个前核的卵母细胞, 即使在缺陷小鼠的输卵管中发现了活的精子。为了进一步识别不育的原因, 将 PTX3 +/+ 胚胎转移到 PTX3 -/- 假孕雌性, 但观察到正常的妊娠和分娩。这排除了植入和随后过程中的缺陷。

表 2. 在 PTX3 -/- 小鼠中的受精

受精	PTX3 +/+	PTX3 -/-	P 值
在体内			
受精的卵子相对于总数 (a)			
自发排卵:	17/28 (60 %)	0/39 (0%)	<0.0001#
超排卵之后:	81/162 (50 %)	0/192 (0%)	<0.0001
在体外			
在去除透明带之后 (b)	21/27 (77%)	21/31 (68%)	NS+
使用完整的卵丘 (c)	79/189 (41.8%)	68/169 (40%)	NS

(a) 在性交后 1.5 天收集胚胎, 处于 2 细胞阶段。

(b) 在授精后 4 小时通过染料转移技术评价融合。

(c) 在授精后之日计数 2 细胞胚胎。

Fischer's exact 检验

NS, 与对照 PTX3 +/+ 小鼠无显著差异 ($p < 0.05$)

为了评价 PTX3 -/- 卵母细胞是否能受精, 使用来自成年雄性的野生型精子进行体外授精 (IVF) 以使 PTX3 +/+ 或 PTX3 -/- 卵母细胞受精 (表 2)。首先用去除了透明带的卵母细胞进行 IVF, 并用 DNA 特异性荧光染料 Hoechst 33258 染色以观察融合。在这些条件下, 观察

到正常的精子与 PTX3 $-/-$ 卵母细胞质膜结合以及 PTX3 $+/+$ (77%) 和 PTX3 $-/-$ (68%) 卵母细胞与精子的融合能力相当 (表 2)。这些结果提示精子-卵子结合及融合可在缺乏 PTX3 的情况下发生。在 hCG 处理后 13-15 小时收集的完整卵丘被受精, 并且观察到 PTX3 $-/-$ 卵母细胞的受精和向 2 细胞阶段的进展, 其频率与 PTX3 $+/+$ 卵母细胞相当 (表 2)。这些数据证实在 PTX3 缺陷小鼠中卵母细胞质量是正常的。由于卵丘对于体内而不是体外授精起着关键作用, 这些结果提示卵丘的异常成为 PTX3 $-/-$ 雌性不育的基础。

PTX3 mRNA 在卵巢组织中的表达通过 RNA 印迹和原位杂交进行研究。在激素诱导的超排卵之后, PTX3 mRNA 表达 (通过在整个组织中进行 RNA 印迹来评价) 始于 hCG 处理后 2 小时, 并持续直至 12-14 小时 (参见图 2A), 对应于排卵前膨胀直至排卵后数小时 [20]。通过对卵丘进行透明质酸酶处理和从卵母细胞分离而得到的颗粒细胞表达 PTX3 转录物。

在正常条件下在缺乏超排卵情况下的表达通过原位杂交来研究。对来自未处理雌性的器官的原位杂交 (图 2B) 证实 PTX3 mRNA 在卵巢中的表达, 限于成熟卵泡的颗粒细胞, 无证据表明在卵母细胞中的转录。

然后分析 PTX3 蛋白在卵巢组织中的表达。蛋白质印迹表明 PTX3 与 PTX3 $+/+$ 卵丘 (特别是胞外基质) 相关联, 因为将卵丘细胞从卵母细胞分离的透明质酸酶处理消除了免疫反应性 (图 2C)。对在激素诱导的超排卵之后 (hCG 之后 13-15 小时) 收集的 PTX3 $+/+$ 和 $-/-$ 卵丘的免疫荧光分析证实 PTX3 与卵丘胞间基质相关联 (图 2D)。

这些数据提示由 PTX3 缺陷引起的不育是由于缺乏卵母细胞受精, 因为 PTX3 缺陷并不影响生殖的其它步骤 (从交配到排卵、植入和妊娠)。PTX3 转录物在正常卵巢中专门由成熟卵泡的颗粒细胞以及分离的颗粒细胞表达, 但不由卵母细胞表达。PTX3 mRNA 表达在激素诱导的超排卵之后在整个卵巢组织中被诱导。最后, PTX3 蛋白在分离的卵丘的胞外基质中得到识别, 推测由颗粒细胞产生。对 PTX3 $-/-$

小鼠的分析鉴定了异常的卵丘作为不育的决定因素。来自 PTX3 ^{-/-}雌性的卵丘显示形态学异常。它们缺乏明确的辐射冠，并且在体外培养时，迅速从卵母细胞解离。PTX3 缺陷卵丘的“脆弱”可反映 PTX3 在这种特殊基质中的结构作用或基质溶解的调控机制中的改变。这些结果鉴定 PTX3 为一种新的卵丘胞外基质的组分，在生育中起着关键作用。尽管在体外不是必需的，卵丘对于体内受精起着关键作用。因此，卵丘的异常可能涉及 PTX3 ^{-/-}雌性小鼠的不育。

材料和方法

PTX3 ^{-/-}小鼠的生成

将包含小鼠 PTX3 基因的外显子 1-2 的 8.5kb 的基因组 DNA 片段用于整合 IRES-LacZ 盒，后接来自 pWH9 质粒的 PGK-新霉素抗性基因在外显子 1 中在第一个编码 ATG 下游 71bp 处。培养、选择和鉴定 ES 细胞的方法如所述进行[20]。通过 DNA 印迹杂交，使用探针 A（在第二个内含子中的 EcoRI/EcoRV 750bp 片段），鉴定了 5 个独立靶向的 R1 ES 细胞克隆。用探针 B（来自新霉素抗性基因）没有检测到随机整合的证据。将 2 个 ES 细胞克隆注射到 C57Bl/6 胚胎中。对于小鼠的基因分型，采用 2 个引物对（引物对 1: 5'-AGCAATGCACCTCCCTGCGAT-3', SEQ ID NO:7; 5'-TCCTCGGTGGGATGAAGTCCA-3' SEQ ID NO:8; 引物对 2: 5'-CTGCTCTTTACTGAAGGCTC-3', SEQ ID NO:9; 5'-TCCTCGGTGGGATGAAGT CCA-3, SEQ ID NO:10) 通过聚合酶链式反应扩增来源于尾部活检的 DNA，所述引物分别检测野生型或靶向的等位基因。对来源于独立克隆的 2 个细胞系进行表型分析，在 129Sv-C57Bl/6 混合的和 129Sv 近交的遗传背景中证实了结果。PTX3 ^{+/+}小鼠为 129Sv-C57Bl/6 PTX3 ^{-/-} 同窝出生仔畜，或得自 Charles River, Calco, Italy 的 129Sv 或 C57Bl/6 小鼠。

涉及动物及其护理的操作遵守学院指南，符合国家 (4D.L. N.116, G.U., suppl. 40, 18-2-1992) 和国际法律及政策 (EEC Council Directive

86/609, OJ L 358, 1, 12-12-1987; NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, U.S. National Research Council, 1996). 为了使所用动物数目及其痛苦降到最低限度, 采用了一切努力。

PTX3 mRNA 和蛋白质

使用 TRIZOL 试剂(GIBCO BRL)从细胞中提取 RNA 并纯化。根据所述[21]进行 RNA 印迹、探针标记和杂交(结合和冲洗)条件。

原位杂交: 将从野生型和 PTX3 ^{-/-}卵巢回收的用 4% 低聚甲醛固定并冷冻在液氮中的恒冷箱切片(13 μm) 用于根据所述[22]进行原位杂交。简而言之, 将用蛋白酶 K 和 0.2N HCl 透化处理的载玻片与从含有 PTX3 cDNA 的载体(pBluescript)使用 Stratagene RNA 转录试剂盒制备的放射性标记的 riboprobe 于 65°C 温育过夜。随后, 将标本用含甲酰胺的缓冲液冲洗, 风干, 浸泡在照相乳胶中并在暗盒中于 4°C 温育至少 10 天。显影后, 将载玻片用 2 μg/ml Hoechst 33258 染料的溶液复染。对于蛋白质印迹分析, 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离从超排卵的雌性收集的完整卵丘、卵丘细胞或卵母细胞获得的全细胞提取物, 电印迹到硝酸纤维素滤膜(Hybond ECL, Amersham)上, 并用纯化的生物素化的抗鼠 PTX3 多克隆仓鼠血清(1 μg/ml)标记, 然后用链霉抗生物素蛋白-HRP(BIOSPA, Italy)标记。标记的蛋白质通过增强化学发光(ECL, Amersham)进行检测。

卵母细胞和胚胎收集、体外受精和胚胎转移

在自然交配后从未处理的雌性的输卵管或子宫回收卵丘、受精卵和胚胎[20]。通过用 5 单位的妊娠母马血清(PMS, Folligon, Intervet)处理和 48 小时后用 5 单位的人绒毛膜促性腺激素(hCG, Corulon, Intervet)处理来诱导超排卵。在交配之后的不同时间或 hCG 处理后 13 - 15 小时收集卵丘。通过透明质酸酶处理分离卵丘细胞和卵母细胞[20]。

根据所述用完整的卵丘[20]或用在 M16 培养基中的 1 μg/ml Hoechst 染料(Sigma) [23]染色的无透明带的卵子[20]和来自 BDF 雄性

的精子，对获自超排卵雌性的卵子进行体外授精（IVF）。受精和精子-卵子融合如下评价：通过在完整卵丘受精之后之日计数 2 细胞阶段胚胎，和通过无透明带的卵子受精后 4 小时计数具有荧光受精精子的卵子。

根据所述[20]进行胚胎转移，使用 3.5 天的 PTX3 +/+ 胚胎植入 2.5 天假孕 PTX3 -/- 雌性的子宫。

参考文献

1. Emsley et al., Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature*, 1994. 367:338-345.
2. Baumann & Gauldie, The acute phase response. *Immunol. Today*, 1994. 15:74-80.
3. Steel & Whitehead, The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today*, 1994. 15:81-88.
4. Breviario et al., Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.*, 1992. 267:22190-22197.
5. Lee et al., TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J. Immunol.*, 1993. 150:1804-1812.
6. Lee et al., Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. *J. Immunol.*, 1994. 153:3700-3707.
7. Vidal Alles et al., Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*, 1994. 84:3483-3493.
8. Introna et al., Cloning of mouse PTX3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*, 1996. 87:1862-1872.
9. Bottazzi et al., Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3 - Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.*, 1997. 272:32817-32823.
10. Muller et al., Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Crit. Care*

Med. 2001. 29:1404-1407.

11. Noland et al., The sperm acrosomal matrix contains a novel member of the pentaxin family of calcium-dependent binding proteins. J. Biol. Chem., 1994. 269:32607-32614.

12. Reid & Blobel, Apexin, an acrosomal pentaxin. J. Biol. Chem., 1994. 269:32615-32620.

13. Seery et al., Identification of a novel member of the pentraxin family in *Xenopus laevis*. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 1993. 253:263-270.

14. Schlimgen et al., Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system. Neuron, 1995. 14:519-526.

15. Omeis et al., Mouse and human neuronal pentraxin 1 (NPTX1): Conservation, genomic structure, and chromosomal localization. Genomics, 1996. 36:543-545.

16. Hsu & Perin, Human neuronal pentraxin II (NPTX2): Conservation, genomic structure, and chromosomal localization. Genomics, 1995. 28:220-227.

17. Tsui et al., Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. J. Neurosci., 1996. 15:2463-2478.

18. Dodds et al., Neuronal pentraxin receptor, a novel putative integral membrane pentraxin that interacts with neuronal pentraxin 1 and 2 and taipoxin-associated calcium-binding protein 49. J. Biol. Chem., 1997. 272:21488-21494.

19. Kirkpatrick et al., Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. J. Biol. Chem., 2000. 275:17786-17792.

20. Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual*. 2nd Ed., 1994: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

21. Introna et al., *Treatment of murine peritoneal macrophages with bacterial lipopolysaccharide alters expression of c-fos and c-myc oncogenes*. *J. Immunol.*, 1986. 137:2711-2715.

22. Biffo & Tolosano, *The use of radioactively labelled riboprobes for in situ hybridization: Background and examples of application*. *Liver*, 1992. 12:230-237.

23. Conover & Gwatkin, *Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion*. *J. Reprod. Fertil.*, 1988. 82:681-690.

在权利要求的含义以及其合法等同范围内的所有修改和替换均包含在其范围之内。使用转换“包含/包括”的权利要求可包括其它元素在权利要求的范围之内；本发明还通过这种权利要求使用转换语“基本上由...组成”(即可包括其它元素在权利要求的范围之内,如果它们不在本质上影响本发明的操作)和转换“由...组成”(即仅仅允许在权利要求中列出的元素,除了普通与本发明相关的不纯杂质或不合理活性之外)取代术语“包含”来描述。这三种转换中的任何一种均可用于要求保护本发明。

应理解在本说明书中描述的元素不应被理解为是对所要求保护的发明的限制,除非在权利要求中明确指出。因此,权利要求书是确定授权的合法保护范围的基础,而不是来自说明书的限定曲解权利要求。

对比之下,现有技术明确从本发明中排除,其程度为会预期到所要求保护的发明或破坏新颖性的具体实施方案。在某些实施方案中,多核苷酸或多肽的上位概念(genus)可在权利要求中叙述,条件是除外天然的核酸或蛋白质(例如具有未在序列表中给出的核苷酸或氨基酸序列)。例如,遗传密码的简并性可用于提供具有编码 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列但不为 SEQ ID NO:1 的多核苷酸。类似地,通过改变 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基中的一个或多个,可以提供功能等同但与

小鼠和/或人蛋白不完全相同的 PTX3 多肽（例如至少 90% 相同）。

本领域技术人员将清楚，本发明可以以其它具体形式来实施，而不偏离其实质和基本特征。所描述的实施方案应被认为仅仅是举例说明而非限定性的，因为对于本发明所提供的合法保护的范 围将由所附的权利要求书而不是本说明书来表明。

序列表

<110> Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite S.P.A.

<120> 长 Pentaxin PTX3 和雌性生物不育

<130> 012-ST-01-US

<140>

<141>

<150> US 60/309,472

<151> 2001-08-03

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1837

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<300>

<301> Breviario et al.

<302> 内皮细胞中白介素-1 诱导基因

<303> Journal of Biological Chemistry

<304> 267

<305> 31

<306> 22190-22197

<307> 1992-11-05

<308> X636613

<309> 1993-07-29

<400> 1

ctcaaaactca	gctcaacttga	gagtctcctc	ccgccagctg	tggaaagaac	tttgcgtctc	60
tccagcaatg	catctccttg	cgattctggt	ttgtgctctc	tggctcgcag	tgttggccga	120
gaactcggat	gattatgatc	tcatgtatgt	gaatttggac	aacgaaatag	acaatggact	180
ccatcccact	gaggaccca	cgccgtgcga	ctgcggtcag	gagcaactcg	aatgggacaa	240
gctcttcatc	atgctggaga	actcgcagat	gagagagcgc	atgctgctgc	aagccacgga	300
cgacgtcctg	cggggcgagc	tgcagaggct	gcgggaggag	ctgggcccgc	tcgcggaaag	360
cctggcgagg	ccgtgcgcgc	cgggggctcc	cgcagaggcc	aggctgacca	gtgctctgga	420
cgagctgctg	caggcgacc	gcgacgcggg	ccgcaggctg	gcgcgtatgg	agggcgcgga	480
ggcgcagcgc	ccagaggagg	cggggcgcgc	cctggccgcg	gtgctagagg	agctgcccga	540
gacgcgagcc	gacctgcacg	cggtgcaggg	ctgggctgcc	cggagctggc	tgccggcagg	600
ttgtgaaaca	gctattttat	tccaatgcg	ttccaagaag	atttttggaa	gcgtgcatcc	660
agtgagacca	atgaggcttg	agtcttttag	tgcctgcatt	tgggtcaaag	ccacagatgt	720
attaacaaca	accatcctgt	tttcctatgg	cacaaagagg	aatccatatg	aatccagct	780
gatatctcagc	taccaatcca	tagtgtttgt	ggtgggtgga	gaggagaaca	aactggttgc	840
tgaagccatg	gtttccttgg	gaagggtggac	ccacctgtgc	ggcacctgga	attcagagga	900
agggctcaca	tccttgtggg	taaatggtga	actggcggct	accactgttg	agatggccac	960
aggtcacatt	gttcctgagg	gaggaatcct	gcagattggc	caagaaaaga	atggctgctg	1020
tgtgggtggt	ggctttgatg	aaacattagc	cttctctggg	agactcacag	gcttcaatat	1080
ctgggatagt	gttcttagca	atgaagagat	aagagagacc	ggaggagcag	agtcttgtca	1140
catccggggg	aatattgttg	ggtggggagt	cacagagatc	cagccacatg	gaggagctca	1200
gtatgtttca	taaagtgtgt	gaaactccac	ttgaagccaa	agaaagaaac	tcacacttaa	1260
aacacatgcc	agttgggaag	gtctgaaaac	tcagtgcata	ataggaacac	ttgagactaa	1320
tgaaagagag	agttgagacc	aatctttatt	tgtactggcc	aaatactgaa	taaacagttg	1380
aaggaaagac	attgaaaaaa	gcttttgagg	ataatgttac	taqactttat	accatggtac	1440

```

tggtgaacag agggacaatt gttttacttt tctttgggta attttgtttt ggccagagat 1560
gaattttaca ttggaagaat aacaaaataa gatttggtgt ccattggtca ttgttattgg 1620
tatgtacctt attacaaaaa aaatgatgaa aacatattta tactacaagg tgacttaaca 1680
actataaatg tagtttatgt gttataatcg aatgtcacgt ttttgagaag atagtcatat 1740
aagttatatt gcaaaaggga tttgtattaa tttaagacta tttttgtaaa gctctactgt 1800
aaataaaata ttttataaaa ctaaaaaaaa aaaaaaa 1837

```

```

<210> 2
<211> 381
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<220>
<221> SIGNAL PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223>

```

```

<220>
<221> MAT PEPTIDE
<222> (18)..(381)

```

```

<300>
<301> Breviario et al.
<302> 内皮细胞中白介素-1 诱导基因
<303> Journal of Biological Chemistry
<304> 267
<305> 31
<306> 22190-22197
<307> 1992-11-05
<308> CAA45158
<309> 1993-07-29

```

```

<400> 2

```

```

Met His Leu Leu Ala Ile Leu Phe Cys Ala Leu Trp Ser Ala Val Leu
      -15                      -10                      -5

Ala Glu Asn Ser Asp Asp Tyr Asp Leu Met Tyr Val Asn Leu Asp Asn
-1  1                      5                      10                      15

Glu Ile Asp Asn Gly Leu His Pro Thr Glu Asp Pro Thr Pro Cys Asp
      20                      25                      30

Cys Gly Gln Glu His Ser Glu Trp Asp Lys Leu Phe Ile Met Leu Glu
      35                      40                      45

Asn Ser Gln Met Arg Glu Arg Met Leu Leu Gln Ala Thr Asp Asp Val
      50                      55                      60

Leu Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala
      65                      70                      75

Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu Ala Arg
80                      85                      90                      95

Leu Thr Ser Ala Leu Asp Glu Leu Leu Gln Ala Thr Arg Asp Ala Gly
      100                     105                     110

Arg Arg Leu Ala Arg Met Glu Gly Ala Glu Ala Gln Arg Pro Glu Glu
      115                     120                     125

```

Ala Gly Arg Ala Leu Ala Ala Val Leu Glu Glu Leu Arg Gln Thr Arg
130 135 140

Ala Asp Leu His Ala Val Gln Gly Trp Ala Ala Arg Ser Trp Leu Pro
145 150 155

Ala Gly Cys Glu Thr Ala Ile Leu Phe Pro Met Arg Ser Lys Lys Ile
160 165 170 175

Phe Gly Ser Val His Pro Val Arg Pro Met Arg Leu Glu Ser Phe Ser
180 185 190

Ala Cys Ile Trp Val Lys Ala Thr Asp Val Leu Asn Lys Thr Ile Leu
195 200 205

Phe Ser Tyr Gly Thr Lys Arg Asn Pro Tyr Glu Ile Gln Leu Tyr Leu
210 215 220

Ser Tyr Gln Ser Ile Val Phe Val Val Gly Gly Glu Glu Asn Lys Leu
225 230 235

Val Ala Glu Ala Met Val Ser Leu Gly Arg Trp Thr His Leu Cys Gly
240 245 250 255

Thr Trp Asn Ser Glu Glu Gly Leu Thr Ser Leu Trp Val Asn Gly Glu
260 265 270

Leu Ala Ala Thr Thr Val Glu Met Ala Thr Gly His Ile Val Pro Glu
275 280 285

Gly Gly Ile Leu Gln Ile Gly Gln Glu Lys Asn Gly Cys Cys Val Gly
290 295 300

Gly Gly Phe Asp Glu Thr Leu Ala Phe Ser Gly Arg Leu Thr Gly Phe
305 310 315

Asn Ile Trp Asp Ser Val Leu Ser Asn Glu Glu Ile Arg Glu Thr Gly
320 325 330 335

Gly Ala Glu Ser Cys His Ile Arg Gly Asn Ile Val Gly Trp Gly Val
340 345 350

Thr Glu Ile Gln Pro His Gly Gly Ala Gln Tyr Val Ser
355 360

<210> 3
<211> 1841
<212> DNA
<213> 小鼠(Mus musculus)

<300>
<301> Introna et al.
<302> 小鼠 PTX3 的克隆
<303> 血液
<304> 87
<305> 5
<306> 1862-1872
<307> 1996-03-01
<308> X83601

<309> 1996-01-10

<400> 3

```

actcctgcct cacactatct ctcccgggct caaactcggg tcaactgtaga gtctcgttc      60
ttcccctgcg gctgcgaacg aaatttcgcc tctccagcaa tgcacctccc tgcgatcctg    120
ctttgtgctc tctggtctgc agtagtggct gagacctcgg atgactacga gctcatgtat    180
gtgaatttgg acaacgaaat agacaatgga ctcatccca ccgaggacct cacgccatgc    240
gactgccgcc aggagcactc ggagtgggac aagetgttca tcatgctgga gaactcgcag    300
atgcggggagg gcatgctgtt gcaggccacc gacgacgtcc tccgtggaga gctgcagcgg    360
ctgcggggcag agctggggcg gctggcgggc ggcattggcg ggccgtgcgc agccgggtggc    420
cccgcagacg ccaggctggt gcgggcgctg gagccgctgc tgcaggagag ccgtgacgcg    480
agcctcaggc tggcgcgcct ggaggacgcg gaggcgcggc gacctgaggc gacagtgcct    540
ggcctaggcg ctgtgctgga ggaactgcgg cggacgcgcg ccgacctgag ccgctgacag    600
agctgggtcg cccgccactg gctgcccgca ggttgtagaa cagcaatttt ctteccaatg    660
cgttcgaaga agatttttgg aagcgtgcat cctgtgagac caatgaagct tgaatctttt    720
agtacttgca tttgggtcaa agccacagat gtattaaaca aaaccatcct gttttcttat    780
ggcacaagaat ggaacccta tgagattcag ctgtacctca gttcccagtc cctagtgttg    840
gtggtgggtg gaaaggagaa caagctggct gcagacactg tgggtgccct ggggaggtgg    900
tcccacctgt gtggcacctg gagttcagag caggggagca tgtccctgtg ggcaaacggg    960
gagctggtgg ctaccactgt agagatggcc aaaagtact ctgttcctga ggggtgactc   1020
ctacagattg gccaaagaaa gaatggttgc tgtgtaggtg ggggctttga cgaatcatta   1080
gcattttctg gaagaatcac aggcttcaat atctgggatc gggttctcag cgaggaggag   1140
atacgggcca gtggaggagt cgaatcctgt cacatccggg gaaatgtcgt cgggtgggga   1200
gtcacagaga ttcaggcgca cggaggagcc cagtatgttt ctaaagtgtt gtgaaaatct   1260
acttgaagcc aaaggagact cacattttaa atatgccagt tggaaaagtc tgaaaacttc   1320
ggtgogtaat agacgaatga aggagagact tgagattgtc tttgtttatc ttggcaaaaat   1380
actgaataca cagtgaagg gaaggcttga gagaggctc cgggatgttg ttactaagcc   1440
ttatactgtg gtgctttcag attaatgtct gcctctgtca gataaacctc cagataacta   1500
aacatgactg gactctgaac agagggacga ttgtgtgact tttttttttt tttattttgg   1560
ttaattttat tttggccaga gacattttta tattggaaga ataacaaaac aagctctgtt   1620
gcccattggt cattctttct ggtgtgtatt ttgtgacaaa agagatgatg agaaaacct   1680
aattatacca caaagtgact tattaacgaa cataaatgta gcttacgtgt tataatccaa   1740
tccatttggg agaaggtagt tgtgtaattt atattgtgaa atgtaattgt attaatttta   1800
tttttgtaaa agtctactgt aaataaattg ttttataaag c                    1841

```

<210> 4

<211> 381

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> SIGNAL PEPTIDE

<222> (1)..(17)

<223>

<220>

<221> MAT_PEPTIDE

<222> (18)..(381)

<223>

<300>

<301> Introna et al.

<302> 小鼠 PTX3 的克隆

<303> 血液

<304> 87

<305> 5

<306> 1862-1872

<307> 1996-03-01

<308> CAA58580

<309> 1996-01-10

<400> 4

Met His Leu Pro Ala Ile Leu Leu Cys Ala Leu Trp Ser Ala Val Val
 -15 -10 -5

Ala Glu Thr Ser Asp Asp Tyr Glu Leu Met Tyr Val Asn Leu Asp Asn
 -1 1 5 10 15

Glu Ile Asp Asn Gly Leu His Pro Thr Glu Asp Pro Thr Pro Cys Asp
 20 25 30

Cys Arg Gln Glu His Ser Glu Trp Asp Lys Leu Phe Ile Met Leu Glu
 35 40 45

Asn Ser Gln Met Arg Glu Gly Met Leu Leu Gln Ala Thr Asp Asp Val
 50 55 60

Leu Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Ala Glu Leu Gly Arg Leu Ala
 65 70 75

Gly Gly Met Ala Arg Pro Cys Ala Ala Gly Gly Pro Ala Asp Ala Arg
 80 85 90 95

Leu Val Arg Ala Leu Glu Pro Leu Leu Gln Glu Ser Arg Asp Ala Ser
 100 105 110

Leu Arg Leu Ala Arg Leu Glu Asp Ala Glu Ala Arg Arg Pro Glu Ala
 115 120 125

Thr Val Pro Gly Leu Gly Ala Val Leu Glu Glu Leu Arg Arg Thr Arg
 130 135 140

Ala Asp Leu Ser Ala Val Gln Ser Trp Val Ala Arg His Trp Leu Pro
 145 150 155

Ala Gly Cys Glu Thr Ala Ile Phe Phe Pro Met Arg Ser Lys Lys Ile
 160 165 170 175

Phe Gly Ser Val His Pro Val Arg Pro Met Lys Leu Glu Ser Phe Ser
 180 185 190

Thr Cys Ile Trp Val Lys Ala Thr Asp Val Leu Asn Lys Thr Ile Leu
 195 200 205

Phe Ser Tyr Gly Thr Lys Trp Asn Pro Tyr Glu Ile Gln Leu Tyr Leu
 210 215 220

Ser Ser Gln Ser Leu Val Leu Val Val Gly Gly Lys Glu Asn Lys Leu
 225 230 235

Ala Ala Asp Thr Val Val Ser Leu Gly Arg Trp Ser His Leu Cys Gly
 240 245 250 255

Thr Trp Ser Ser Glu Gln Gly Ser Met Ser Leu Trp Ala Asn Gly Glu
 260 265 270

Leu Val Ala Thr Thr Val Glu Met Ala Lys Ser His Ser Val Pro Glu
 275 280 285

Gly Gly Leu Leu Gln Ile Gly Gln Glu Lys Asn Gly Cys Cys Val Gly
290 295 300

Gly Gly Phe Asp Glu Ser Leu Ala Phe Ser Gly Arg Ile Thr Gly Phe
305 310 315

Asn Ile Trp Asp Arg Val Leu Ser Glu Glu Glu Ile Arg Ala Ser Gly
320 325 330 335

Gly Val Glu Ser Cys His Ile Arg Gly Asn Val Val Gly Trp Gly Val
340 345 350

Thr Glu Ile Gln Ala His Gly Gly Ala Gln Tyr Val Ser
355 360

<210> 5

<211> 1531

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> PROMOTER

<222> (1)..(1317)

<223>

<220>

<221> PROTEIN_BIND

<222> (1222)..(1231)

<223> NF-kB

<300>

<301> Basile et al.

<302> 人长 Pentaxin PTX3 的启动子的表征

<303> Journal of Biological Chemistry

<304> 272

<305> 13

<306> 8172-8178

<307> 1997-03-28

<308> X97748

<309> 1997-11-15

<400> 5

```

gaattccccg gatctccctt ctaactctcc acctttggcc taagctttgc ttccacatgg      60
tcatcaacat ttggtgggta tagaactaat aaccocctatc tcaacttcaact cctatgccag      120
aggggcccta gcatcagctc atgggattgt tgtttttgct ttccctctcta tctttggctc      180
cgggattttc cccttacttt aatgggagct catctgtacc ttttaagttt ttattaatat      240
catgtgaaca cagacctgta tatattgtta gaagcagaaa tctctaagtt tacttttaaa      300
acatgatcct tgcctcgaaa ccttgtagaa taatataatg tccacataat accaagttat      360
gaaaagaaac atacctaat aactaaataa gtatattcct tttttcccc agcttttttt      420
ccccattcta ggttaccag ttgtactgtg ttgtttgtca taggccgggt gaggtggctc      480
acgtctgtaa tcctagcaat ttgggagggc aaggcgggtg gatcgctga ggtcaggagt      540
tcgagaccag cctggctaac atggtgaaac cctgtctcta ctaaaaatac aaaaattaac      600
tgggtgtggt ggcgggtgcc tgtaattcca gctaactggg aagctgaggt aggagaatcg      660
cttgaaccca ggatgaggag gttgcagtga gccgagatca caccattgca ctccagcctg      720
ggcaacaaga gcgaaattca gtctcaaaaa aaaaaattat ctataaaagt ataggtgcaa      780
ctcctcaagt attaaagaca agatagctcg gattggactt gactttcaga gccataacta      840
ttcttaatat gttggtttat cttggaatca gaccattttc agtttcaacc tgtaaaacag      900
tgtacaaagg aaacatggaa agttttctat atataaaggg ttgtgaaata ataacagctc      960
acagaaaatg ctgaaatgat gatttgcttc agtacccctc gaaatttctc cctaccacc      1020

```

```

cctccttcat cccattgct atcaattcaa attacaacag ctaatttca ggagaacagt 1080
agaagcccag tttctctcct ctttcccctc tgaccctcct ccaattaatc tgactgcagc 1140
gtaaaccctt ggggtttaa atgtgcaac ttccacattt ccctcgetct cccaccagc 1200
cccctcccc accaaattca ggggaactcc cgttaccgca gtgccaccag cattactcat 1260
tcatccccat tcaggcttc ctcagcattt attaaggact ctctgctcca gcctctcact 1320
ctcactctcc tccgctcaaa ctcagctcac ttgagagtct cctcccgcc gctgtggaaa 1380
gaactttgcg tctctccagc aatgcatctc cttgcgattc tgttttgtgc tctctggctc 1440
gcagtgttg ccgagaactc ggatcattat catctcatgt atgtgaattt ggacaacgaa 1500
atagacaatg gactccatcc cactgaggac c 1531

```

```

<210> 6
<211> 2708
<212> DNA
<213> 小鼠:

```

```

<220>
<221> PROMOTER
<222> (1)..(1373)
<223>

```

```

<300>
<301> Altmeyer et al.
<302> 启动子结构和转录活化...
<303> Journal of Biological Chemistry
<304> 270
<305> 43
<306> 25584-15590
<307> 1995-10-27
<308> U33842
<309> 1995-10-27

```

```

<400> 6
atcccagagg ctctctgtac tggcattagg acctcacagc accacatcag gtttcttaat 60
gtggactcta gaaactgaac tcgagcccac agccttagga gaaaagcacc ttacaaagct 120
gtggetccac actgcccttt aaacaatatc gtattgtctc atattgccat cgctttctga 180
tggctttaa ggttcaaac ataccctgtc tttagccgtg atctcaaata agtgaagctc 240
ttgagcaggg gcctgatgcc ttttgacttt gtgttgattc atgcttatga tgccctgttc 300
cctccgtgtc tagctatggt taactgtgga ttcaattttt attggtgggt ggattggtac 360
atgcatgtgc attccagatg cgtgagggca ctcaggccag gaaagccact catgagtctc 420
tgtcaggagc agaggaattt acctatggaa atccaagagc agccttctga gaggcctggc 480
ctgagggtag taccctccc atcatgatca ggatgtgact ggtaaccctc cccctccatc 540
tcctttgtag attggagact tgtatcagct caggggtatc ctctgggagt ggttccctct 600
agatctgtgt agtttttag atcttgcttt atttggagtt tattctcatg ttttaatttt 660
ttatcactat tattatgact tatcaacacc tatctaggta cttttcactg ggggaggggg 720
caggttttac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acagtcacta 780
atgtaaaatt taaaacaggg accttgatag gatatgtcca agaataccca agcaccctaa 840
agccactata ttcccgcct cactttcctg ttttactggg ttttgaccca gccatactgt 900
gttttttagt tgctccacca gaggagtcaa gactagttag tcaagattga cttctagagt 960
cataaaaatt cttaatgggt tttttggag tcacggaatc attttctata gcttggctct 1020
gagaaagtat ccaaaggaaa agtgaaaaaa aaaagttttc cataacttca ggggttgtgg 1080
agtaatgaaa gctcacacca aatgccaaaa tgataattcg ccctgtacct ctgtgctcct 1140
caccocccaa agcgttagca cttcaggtta cagcaactaa tcctcagggg caccagaaaa 1200
gtccagcttc cctccccttc tcccctgac tcgcctctaa ttaatctgcc tgcagtgtgg 1260
acctcggtgg ttaacattg tgcaacctct tcagctccct tgccctcca cccaaccccc 1320
tccccaaat caaggggaac tccctcgcgc tgtgccaccg acattagtca ttcacgct 1380
catgctttgg agcgtttatt aagggttca ctectgectc aactatctc tcccgggctc 1440
aaactcggat cactgtagag tctcgttct tcccctgcgg gtgcgaagca aatttcgget 1500
ctccagcaat gcacctcct gcgatcctgc tttgtgctct ctggtctgca gtagtggctg 1560
agacctcggg tgactacgag ctcatgtatg tgaatttggg caacgaaata gacaatggac 1620
ttcatcccac cgaggaccgt aagttcattt ttaactctct cagcgtatca aaactacata 1680

```

```

actcacttct gggggggcgc gattaacata attaacatag atagccaatg aagcaagcta 1740
aaattatact ttatttgtga aagcaaggac tgggggaaaa aaggaaagca aggaaatatac 1800
tgagaaaagc cagaggtttt aaattathtt tgtaacattt atgatgagtt aagttatacag 1860
aaatctttta ctgttttttag ctatattaat ggcattttct cagttagttt aacatgtcta 1920
taaagaatag tctgtgtcat ctttgagttt acacgcacgc tgttttcaga gctatcetta 1980
gaaggagagc gttgctgggg acaggctgaa acttggagtc accaagagtg caaccatgg 2040
ccaccagga caagctgata acacttgtgt gtgtcctgcg ttctagccac gccatgagac 2100
tgcgccagg agcactcgga gtgggacaag ctgttcatca tgctggagaa ctgcagatg 2160
cgggaggca tgctgttgca ggccaaccgac gacgtcctcc gtggagagct gcagcggtg 2220
cggtcagagc tgggccggct ggcgggcggc atggcgaggc cgtgcgcagc cggtggtccc 2280
gcagacgcca ggctggtgag ggcgctggag ccgctgctgc aggagagccg tgacgcgagc 2340
ctcaggctgg cgcgcctgga ggacgcggag ggcgcggcag ccgagggcag agtgcctggc 2400
ctaggcgctg tgctggagga actgcggcgg acgcgctccg acctgagcgc cgtgcagagc 2460
tgggtcgccc accactggtt gcccgcaggt aagcccacgg tcggtctgtt ccctagaggc 2520
aagcttttgt gggaccctca cactcagagc cccagtaactt ttcataaggca cactcacaga 2580
gctcacacca cgccaggcag ctcattgcct tttaaaagta tttccaagcc cgaggaacct 2640
aaaagaaaa aacgaggatt taaaccatca gtctggaagt tgacgtcaga ggttctctgat 2700
accgatc

```

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 7
agcaatgcac ctccctgcga t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 8
tcctcggtgg gatgaagtcc a 21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 9
ctgctcttta ctgaaggctc 20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 10
tcctcgggtgg gatgaagtcc a

21

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 共有"pentraxin样"序列

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 任何氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Ser 或 Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> 任何氨基酸

<400> 11

His Xaa Cys Xaa Xaa Trp Xaa Ser
1 5

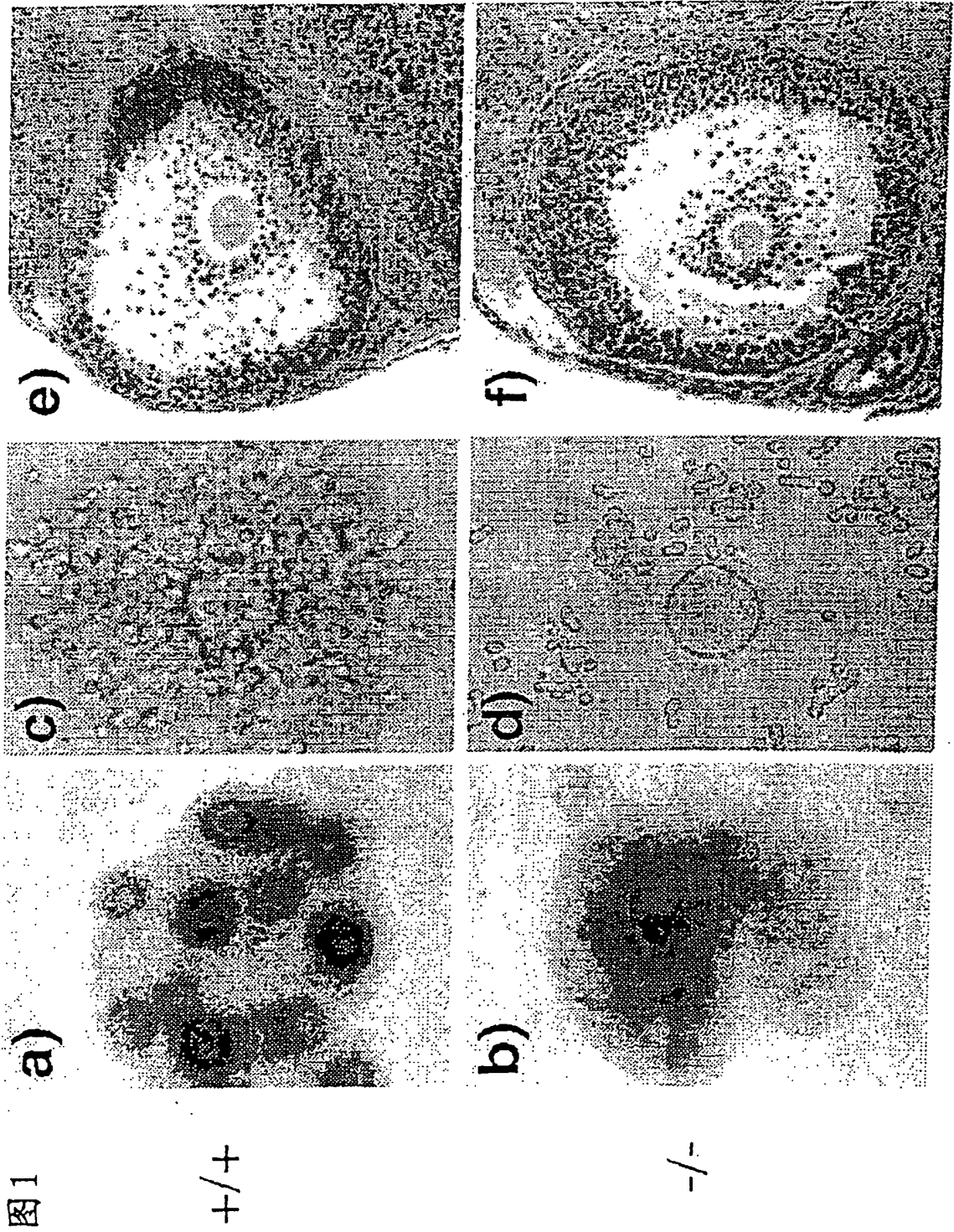


图1

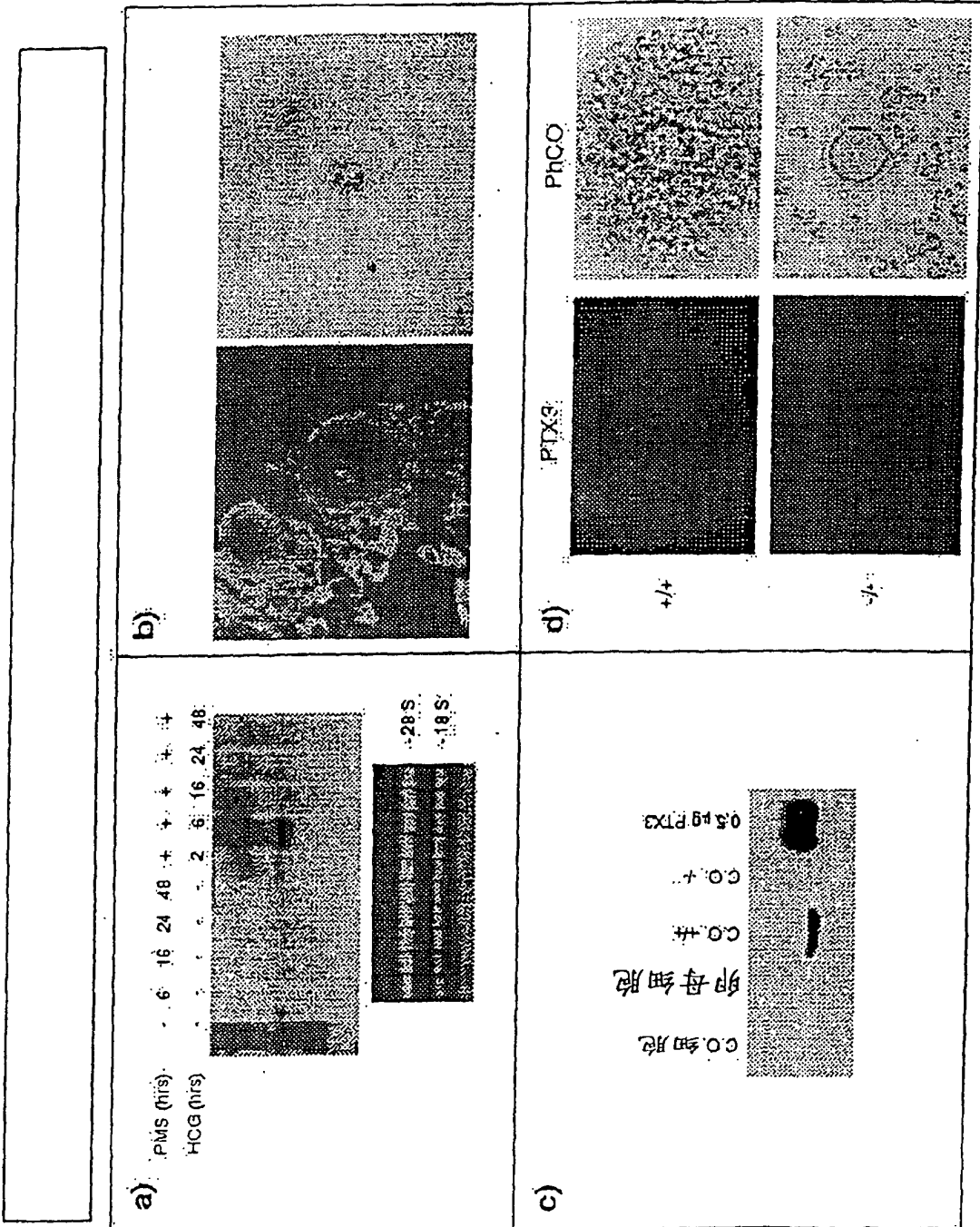


图2