



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 10 297 T2** 2007.01.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 411 971 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 10 297.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IT02/00473**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 758 773.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/011326**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.07.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **13.02.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.03.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.01.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/17** (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

309472 P **03.08.2001** **US**

(73) Patentinhaber:

**Sigma-Tau Industrie Farmaceutiche Riunite
S.p.A., Rom/Roma, IT**

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**MANTOVANI, Istituto di Ricerche Farmacologiche,
A., 20157 Milan, IT**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON LANGEM PENTRAXIN PTX3 FÜR DIE BEHANDLUNG VON INFERTILITÄT
BEI FRAUEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung betrifft die Erfordernis von PTX3-Aktivität für die weibliche Fertilität. Eine genetische Mutation, die die PTX3-Aktivität reduziert, führt zu weiblicher Sterilität.

[0002] Pentraxine sind eine Überfamilie von Proteinen, die durch eine zyklische multimere Struktur charakterisiert wird [1]. Die klassischen kurzen Pentraxine, C-reaktives Protein (CRP) und Serum Amyloid-P-Bestandteil (SAP), sind akute Phase-Proteine bei Mensch bzw. Maus, die in der Leber in Antwort auf Entzündungsmediatoren hergestellt werden; insbesondere werden sie direkt durch Interleukin-6 induziert [2-3].

[0003] Lange Pentraxine teilen sich Ähnlichkeiten mit den klassischen kurzen Pentraxinen, aber sie unterscheiden sich durch die Gegenwart einer nicht verwandten N-terminalen Domäne, die an die C-terminale Pentraxindomäne gekoppelt ist, wie auch durch die genomische Organisation, chromosomale Lokalisierung, zelluläre Quelle, induzierende Stimuli und Liganden, die erkannt werden. Langes Pentraxin 3 (PTX3) ist das erste lange Pentraxin, das als ein Interleukin-1 (IL-1) induzierbares Gen in endothelialen Zellen [4] und als Tumornekrosefaktor- α (TNF α) induzierbares Gen in Fibroblasten [5] identifiziert wurde. PTX3 wird auch durch Makrophagen und andere Zellarten und Gewebe bei der Stimulierung mit primären Entzündungsmediatoren (LPS, IL-1, TNF α) hergestellt [6-8]. PTX3 besteht aus einer Pentraxin-ähnlichen C-terminalen 203-Aminosäurendomäne und einer nicht-verwandten N-terminalen 178-Aminosäurendomäne. Wenn sie sezerniert werden, ordnen sich glykosylierte PTX3-Protomere (45 kDa) so an, dass sie 10 bis 20 Multimere bilden [9]. PTX3 bindet nicht an klassische Pentraxinliganden, wie Phosphoethanolamin, Phosphocholin, Hochpyruvatagarose, Kollagen IV, Fibronectin oder Gelatine. Im Gegensatz dazu, bindet PTX3 spezifisch mit hoher Affinität an Clq durch die Pentraxindomäne [9]. PTX3-Plasmaspiegel sind bei normalen Bedingungen sehr niedrig (≤ 2 ng/ml), aber sie steigen bei verschiedenen pathologischen Zuständen (10 bis 100 ng/ml) einschließlich Infektionen [10] an.

[0004] Andere lange Pentraxine, die nach PTX3 geklont wurden, beinhalten Meerschweinchenapexin [11, 12], das in dem Spermaacrosom exprimiert wird, XL-PXN1 von *Xenopus laevis* [13], neuronales Ratten-Pentraxin 1 (NP1) [14], menschliches NP1 und NP2 [15, 16], Maus NP1 und NP2 [15], Narp [17] und neuronalen Pentraxinrezeptor (NRP), ein mögliches integrales Membranpentraxin [18-9]. Die in vivo Funktion von langen Pentraxinen wurde nicht eindeutig definiert.

[0005] PTX3 besteht aus zwei strukturellen Domänen; einer N-terminalen Domäne, die nicht mit irgendeinem bekannten Molekül verwandt ist, und einer C-terminalen Domäne, die den kurzen Pentraxinen, wie C-reaktivem Protein gleicht (Breviario et al., J. Biol. Chem., 267:22190-22197, 1992). Eine wesentliche Ähnlichkeit wurde zwischen menschlichem PTX3 (hPTX3) und Maus PTX3 (mPTX3) gefunden. Der Grad der Identität zwischen menschlichen und Maus-PTX3-Genen beträgt 82 % und erreicht 90 %, wenn konservative Substitutionen in Betracht gezogen werden (Introna et al., Blood, 87:1862-1872, 1996). Die Gene sind in syntenischen Chromosomorten lokalisiert. Der hohe Grad an Ähnlichkeit zwischen hPTX3- und mPTX3-Sequenzen ist ein Zeichen für den hohen Grad der Konservierung von Pentraxinen während der Evolution (Pepys & Baltz, Adv. Immunol., 34:141-212, 1983). Eine Übersicht über die Pentraxine wird durch Gewurz et al. (Curr. Opin. Immunol., 7:54-64, 1995) gegeben.

[0006] WO 99/32516 beschreibt die Verwendung von PTX3 für die therapeutische Behandlung von Krebs, Entzündung und Infektionskrankheiten.

[0007] US-Patent 5,767,252 beschreibt einen Wachstumsfaktor für neuronale Zellen, der zu der Pentraxinfamilie gehört.

[0008] WO 02/36151 beschreibt die Verwendung von PTX3 für die Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und Behandlung autoimmuner Pathologien.

[0009] Varani S., et al.; Mol. Endocrinol., 2002, June, 16(6):1154-67 berichten, dass weibliche Individuen mit einem Pentraxin-3-Knockout subfertil sind, was eine wichtige Rolle von PTX3 bei der Cumulus-Oocyt-Wechselwirkung in dem präovulatorischen Zeitraum als ein Stromabwärts-Protein in der GDF-9-Signaltransduktionskaskade zeigt.

[0010] Im Gegensatz zu dem Vorangehenden, zeigten die Untersuchung von Mäusen, die an ihrem PTX3-Genort genetisch modifiziert wurden, und die durch homologe Rekombination in embryonalen Stamm-

zellen hergestellt wurden, und die Effekte davon, die Beteiligung der PTX3-Aktivität bei weiblicher Fertilität.

[0011] Es ist eine Aufgabe der Erfindung, das rekombinante menschliche PTX3 für ein Medikament zur Steigerung der weiblichen Fertilität zu verwenden. Die Effekte der weiblichen Sterilität können gelindert werden, die reproduktive Fähigkeit kann gesteigert oder verringert werden, wie gewünscht, die weibliche Fertilität kann verstärkt werden oder Kombinationen davon. Andere Behandlungen, wie in vitro Fertilisation erfordern invasive Eingriffe und eine komplizierte Technologie. Der Bedarf an Therapien, die die weibliche Fertilität beeinflussen, wird dadurch angegangen. Andere Vorteile und Verbesserungen werden unten diskutiert oder werden aus der Offenbarung hier offensichtlich.

[0012] Pharmazeutische Zusammensetzungen, Verfahren für die Verwendung und Herstellung von ihnen und weitere Aufgaben werden unten beschrieben.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Eine Aufgabe der Erfindung ist es, ein Medikament bereitzustellen, das aus einem rekombinanten menschlichen PTX3 in einer Menge, die ausreicht, die Reproduktionsfähigkeit eines weiblichen Subjektes mit einem Defekt in der Reproduktion zu erhöhen, besteht. Die Entdeckung, dass PTX3-Aktivität erforderlich ist, kann als eine Therapie für einen weiblichen Patienten oder ein Tier mit einem Defekt in der Reproduktion oder für die Diagnose ihrer Reproduktionsfähigkeit verwendet werden.

[0014] Das Subjekt kann ein weiblicher Patient oder ein weibliches Tier sein. Die Zusammensetzung kann für die systemische Verabreichung geeignet sein oder für die lokale Verabreichung adaptiert sein (sprich, innerhalb oder um ein weibliches reproduktives Organ herum). Die Zusammensetzung kann verwendet werden, um Sterilität zu behandeln.

[0015] Eine andere Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren für die Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung an ein Subjekt, das Bedarf für eine Behandlung weiblicher Sterilität hat, in einer Menge, die ausreicht, die Reproduktionsfähigkeit des Subjektes zu steigern, bereitzustellen.

[0016] Der Nachweis von PTX3 bei einem weiblichen Subjekt und die Korrelation dieser Menge mit ihrer Reproduktionsfähigkeit ist eine weitere Aufgabe der Erfindung. Mutationen in dem menschlichen PTX3-Genort würden im Chromosom 3q24-q28 auftreten; Mutationen in den wechselwirkenden Genen würden außerhalb des PTX3-Genortes auftreten. Die Funktion einer PTX3-Variante kann durch Vergleich mit bekannten PTX3-Sequenzen oder anderen Pentraxinsequenzen; Faltung, Glycosylierung, Sezernierung oder Bildung von Multimeren; Rezeptorbindung oder Signaltransduktion; Effekt auf Reproduktionsfähigkeit, Fertilität oder Sterilität oder Kombinationen davon bestimmt werden.

[0017] Weitere Aspekte der Erfindung werden einer Person, die auf dem Fachgebiet bewandert ist, aus der folgenden Beschreibung und den Ansprüchen und den Verallgemeinerungen dazu offensichtlich sein.

KURZE BESCHREIBUNGEN DER ZEICHNUNGEN UND DES SEQUENZPROTOKOLLS

[0018] Fig. 1A – 1F veranschaulichen die abnormale Morphologie von Cumuli oophori von PTX3 $-/-$ Mäusen. Cumuli oophori wurden 14 bis 16 Stunden nach hCG-Behandlung gewonnen. Sie werden nach der Sammlung (A und B) oder 4 Stunden später (C und D) gezeigt. In PTX3 $+/+$ -Mäusen (A und C) bilden Granulosazellen einen kompakten und stabilen Cumulus um die Oocyte (Pfeil "da mettere"). Bei PTX3 $-/-$ Mäusen (B und D) stehen sie mit der Oocyte nur lose in Verbindung und der Cumulus ist nach 4 Stunden vollständig verschwunden. Histologische Untersuchung der Ovarien von PTX3 $+/+$ (E)- und PTX3 $-/-$ (F)-Mäusen zeigt normale antrale Follikel.

[0019] Fig. 2A – 2D zeigen PTX3-mRNA und Proteinexpression in ovariellen Gewebe. (A) Die Kinetik der PTX3-Expression im Ovar nach hormonell-induzierter Superovulation (PMS-Behandlung, 48 Stunden später gefolgt durch hCG-Behandlung) werden auf dem mRNA-Niveau gezeigt. Die Ovarien wurden 0, 6, 16, 24 oder 48 Stunden nach PMS-Behandlung und dann 2, 6, 16, 24 oder 48 Stunden nach hCG-Behandlung gesammelt. 10 μ g der Gesamt-RNA wurden auf jede Bahn gegeben. Ethidiumbromidfärbung des Gels wird in der unteren Tafel gezeigt. (B) In situ Hybridisierung des Ovars: Granulosazellen exprimieren PTX3-mRNA nur in reifen Follikeln. (C) PTX3-Expression durch Cumuli oophori (C.O.), Cumulus-Oophorus-Zellen (C.O.-Zellen) und Oocyten wurde durch Western-Blotting nachgewiesen. Cumuli oophori wurden aus vier PTX3 $+/+$ - und PTX3 $-/-$ -superovulierten Weibchen gewonnen; Cumulus-Oophorus-Zellen und Oocyten wurden von 7 bzw. 14 PTX3 $+/+$

superovulierten Weibchen erhalten. (D) Phasenkontrast (rechte Tafeln) und Immunofluoreszenzanalyse (linke Tafeln) von Cumuli oophori von PTX3 $-/-$ (untere Tafeln) und PTX3 $+/+$ (obere Tafeln) -Mäusen werden veranschaulicht.

[0020] Sequenzen einer menschlichen cDNA und ihr translatierter offener Leserahmen (SEQ ID NO: 1 bzw. 2), eine Maus-cDNA und ihr translatierter offener Leserahmen (SEQ ID NO: 3 bzw. 4), menschliche und Maus-Stromaufwärtsregulationsorte (SEQ ID NO: 5 bzw. 6) und PCR-Primer (SEQ ID NO: 7 bis 10) werden in dem Sequenzprotokoll gezeigt. Die Anordnung menschlicher und Maus-Aminosäuresequenzen zeigt, dass 312 von 381 Resten identisch (82 %) und 351 Reste zumindest ähnlich (92 %) sind. Beide Gene enthalten drei Exons. Das erste kodiert 43 Aminosäurereste, das zweite kodiert 135 Aminosäurereste mit keiner hohen Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzmotiven und das dritte kodiert 203 Aminosäurereste mit Ähnlichkeit zu Pentraxinen. Eine Pentraxin-ähnliche Domäne beinhaltet zwei Cys-Reste an den Positionen 162 und 254 und eine Consensus "Pentraxin-ähnliche" Sequenz His-Xaa-Cys-Xaa-Ser/Thr-Trp-Xaa-Ser (SEQ ID NO: 11).

BESCHREIBUNG DER SPEZIFISCHEN AUSFÜHRUNGSARTEN DER ERFINDUNG

[0021] Natives PTX3 wird glycosyliert (potentieller N-gekoppelter Glycosylierungsort an Position 203). Ein multimerer PTX3-Komplex eluierte bei Gelfiltration mit einem relativen Molekulargewicht von ungefähr 900 kDa. Er wanderte in der Gelelektrophorese unter nicht-denaturierenden und nichtreduzierenden Bedingungen als eine vorherrschende Bande von ungefähr 440 kDa (z.B. 9- oder 10-mer von ungefähr 45 kDa Protomeren) mit zwei geringeren Banden in dem 540 bis 600 kDa-Bereich. Circular dichroismusanalyse wies daraufhin, dass PTX3 überwiegend β -Faltblattstruktur mit etwas α -helikaler Struktur enthielt. pPTX3-Polypeptid oder ein Komplex davon kann indirekt durch ein Bindungsmolekül (z.B. Antikörper, natürlicher oder nichtnatürlicher Peptid-Nachahmer) für das PTX3-Genprodukt identifiziert, isoliert oder nachgewiesen werden.

[0022] PTX3-Polypeptid und seine Varianten (sprich Deletion, Domänenneukombination oder -duplikation, Insertion, Substitution oder Kombinationen davon) sind auch für die Bestimmung von Struktur funktionsbeziehungen nützlich (z.B. Alanin scanning, konservative oder nicht-konservative Aminosäuresubstitution). Z.B. Faltung und Processing von PTX3-Protein, Sekretion von PTX3-Protomer und Bildung von Multimeren, Ligandenbindung am Rezeptor, Signaltransduktion oder Kombinationen davon. Siehe Wells (Bio/Technology, 13:697-651, 1995) und US-Patent 5,534,617. Gerichtete Evolution durch zufällige Mutagenese oder Genneukombination unter Verwendung von PTX3 kann verwendet werden, um neue und verbesserte Funktionen in Übereinstimmung mit den Selektionskriterien zu erwerben. Mutierte, polymorphe und analoge PTX3-Polypeptide werden durch geeignete mutierte, polymorphe und analoge PTX3-Polynucleotide kodiert. Strukturaktivitätsbeziehungen von PTX3 können unter Verwendung varianter Polypeptide, die durch ein Expressionskonstrukt, das in eine Wirtszelle mit oder ohne endogenes PTX3 transfiziert wurde, hergestellt wurden, untersucht werden. So können Mutationen in diskreten Domänen des PTX3-Polypeptids mit abnehmender oder sogar zunehmender Aktivität bei der Funktion des Proteins vergesellschaftet sein.

[0023] Eine PTX3-Nucleotidsequenz kann verwendet werden, um ein Fusionspolypeptid mit mindestens einer heterologen Peptid domäne (z.B. eine Affinitäts- oder Epitopmarkierung) herzustellen. Oligopeptid ist nützlich für die Herstellung spezifischen Antikörpers und Epitopkartierung von PTX3-spezifischem Antikörper. Ein Polypeptid kann mindestens 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 oder mehr Aminosäuren lang sein (einschließlich dazwischenliegenden Bereichen davon). Oligopeptid kann mit einer Affinitätsmarkierung eines spezifischen Bindungspaares konjugiert sein (z.B. Antikörper-Digoxigenin/Hapten/Peptid, Biotin-Avidin/Streptavidin, Glutathion S-Transferase-Glutathion, Maltosebindungsprotein-Maltose, Protein A oder G/Immunoglobulin, Polyhistidin-Nickel). Es kann entweder ein PTX3-Polypeptid in voller Länge (z.B. SEQ ID NO: 2 oder 9) oder ein kürzeres Fragment (z.B. N-terminale oder C-terminale Domäne) hergestellt werden; wahlweise einschließlich einer heterologen Peptid domäne. PTX3-Polypeptid kann durch chemische Mittel synthetisiert, aus natürlichen Quellen gereinigt, in transfizierten Wirtszellen synthetisiert oder durch Kombinationen davon hergestellt werden.

[0024] Die PTX3-Nucleotidsequenz oder ein Teil davon kann verwendet werden, um die PTX3-Expression zu überwachen, die PTX3-Sequenz zu bestimmen und/oder PTX3-Varianten nachzuweisen. Die Erfindung stellt auch Hybridisierungs sonden und Amplifikationsprimer bereit (z.B. Polymerasekettenreaktion, Ligationskettenreaktion, andere isothermale Amplifikationsreaktionen). Ein Paar von solchen Primern kann für RT-PCR-Assays verwendet werden, um PTX3-Transkripthäufigkeit innerhalb der Zellen zu quantifizieren. Amplifikationsprimer können zwischen 15 und 30 Nucleotiden lang sein (vorzugsweise ungefähr 25 Nucleotiden), verbinden sich entweder mit dem Sinn- oder Gegensinn-Strang (vorzugsweise wird das Paar komplementär zu jedem Strang sein) und enden an dem 3'-Ende irgendwo innerhalb der SEQ ID NO: 1, 3 und 5 bis 6 oder ihrer Kom-

lemente. Daher wird diese Erfindung nützlich für die Entwicklung und Nutzung von PTX3-Primern und anderen Oligonucleotiden sein, um zugehörige RNA und DNA innerhalb von Zellen zu quantifizieren.

[0025] Die Bindung von Polynucleotiden oder Polypeptiden kann in einer Lösung oder in einem Substrat stattfinden. Das Assayformat kann die Trennung von Gebundenem von Nicht-Gebundenem erforderlich machen oder nicht. Nachweisbare Signale können direkt oder indirekt sein, an irgendeinen Teil eines gebundenen Komplexes gebunden sein, kompetitiv gemessen werden, amplifiziert werden oder Kombinationen davon. Ein Blockierungs- oder Waschschrift kann zwischengeschaltet sein, um Sensitivität und/oder Spezifität zu verbessern. Das Anbringen eines Polynucleotids oder Polypeptids, wechselwirkenden Proteins oder Bindungsmoleküls an einem Substrat vor, nach oder während der Bindung, führt zu einem Einfangen einer ungebundenen Art. Solche Immobilisierung wird an das Substrat unter Waschungsbedingungen stabil gebunden werden. Siehe US-Patente 5,143,854 und 5,412,087.

[0026] Änderungen in der Genexpression können sich in der Zelle durch Hervorrufen von transkriptionaler Initiierung, Transkriptstabilität, Translation des Transkripts in Proteinprodukt, Proteininstabilität, Glycoproteinreifung, Rate der Faltung oder Sezernierung oder Kombinationen davon manifestieren. Das Gen, Transkript oder Polypeptid kann auch durch Techniken wie in vitro Transkription, in vitro Translation, Northern-Hybridisierung, Nucleinsäurehybridisierung, Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), Run-On-Transkription, Southern-Hybridisierung, metabolische Proteinmarkierung, Antikörperbindung, Immunpräzipitation (IP), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Radioimmunoassay (RIA), Fluoreszenzmarkierung oder histochemische Färbung, Mikroskopie und Digitalbildanalyse und Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse oder Sortierung untersucht werden.

[0027] Ein Reporter- oder selektierbares Markergen, dessen Produkt einfach bestimmt werden kann, kann für den bequemen Nachweis verwendet werden. Reportergene beinhalten z.B. alkalische Phosphatase, β -Galaktosidase (LacZ), Chloramphenicolacetyltransferase (CAT), β -Glucuronidase (GUS), Luciferasen (LUC), grüne und rote fluoreszierende Proteine (GFP bzw. RFP), Meerrettichperoxidase (HRP), β -Lactamase und Derivate davon (z.B. blaue EBFP, Zyan-ECFP, gelb-grüne EYFP, destabilisierte GFP-Varianten, stabilisierte GFP-Varianten oder Fusionsvarianten, die als LIVING COLORS fluoreszierende Proteine durch Clontech verkauft werden). Reportergene würden zugehörige Substrate verwenden, die vorzugsweise durch ein chromogenes, fluoreszierendes oder lumineszierendes Signal bestimmt werden. Alternativ kann das Assayprodukt durch ein heterologes Epitop markiert werden (z.B. FLAG, MYC, SV40-T-Antigen, Glutathiontransferase, Polyhistidin, Maltosebindungsprotein), für das zugehörige Antikörper oder Affinitätsharze erhältlich sind. Beispiele für Medikamente, für die selektierbare Markergene, die Resistenz übertragen, existieren, sind Ampicillin, Genetidin/Kanamycin/Neomycin, Hygromycin, Puromycin und Tetracyclin. Ein metabolisches Enzym (z.B. Dihydrofolatreduktase, HSV-1-Thymidinkinase) kann als ein selektierbarer Marker bei sensitiven Wirtszellen oder Auxotrophen verwendet werden. Z.B. kann Methotrexat die Kopieanzahl eines Polynucleotids, das an einen DHFR-selektierbaren Marker gebunden ist, steigern oder Gancyclovir kann einen viralen Thymidinkinase-selektierbaren Marker negativ selektieren.

[0028] Ein Polynucleotid kann an ein Linkeroligonucleotid gebunden oder an ein Mitglied eines spezifischen Bindungspaares konjugiert sein (z.B. Antikörper-Digoxygenin/Hapten/Peptidepitop, Biotin-Avidin/Streptavidin, Glutathion S-Transferase oder GST-Glutathion, Lectin-Zucker, Maltosebindungsprotein-Maltose, Polyhistidin-Nickel, Protein-A/G-Immunglobulin). Das Polynucleotid kann durch eine Ligation einer Nucleotidsequenz, die das Bindungsmitglied kodiert, konjugiert sein. Ein Polypeptid kann mit einem Mitglied des spezifischen Bindungspaares durch Herstellung der Fusion, die durch ein solches gebundenes oder konjugiertes Polynucleotid kodiert wird, oder alternativ durch direkte chemische Bindung an einen reaktiven Rest auf dem Bindungsmitglied durch chemische Quervernetzung verbunden sein. Solche Polynucleotide und Polypeptide können als ein Affinitätsreagens verwendet werden, um Wechselwirkungen, die spezifische Bindung eines Transkriptes oder Proteinproduktes des Expressionsvektors involvieren, zu identifizieren, zu isolieren und nachzuweisen. Vor oder nach der Affinitätsbindung des Transkriptes oder Proteinproduktes kann das Mitglied, das an das Polynucleotid oder Polypeptid gebunden ist, an sein zugehöriges Bindungsmitglied gebunden werden. Dies kann einen Komplex in Lösung oder immobilisiert an einen Träger hervorrufen. Eine Proteaseerkennungsstelle (z.B. für Enterokinase, Faktor Xa, ICE, Secretasen, Thrombin) kann zwischen nebeneinanderliegenden Domänen eingeschlossen werden, um ortsspezifische Proteolyse, die diese Domänen trennt und/oder Proteinaktivität inaktiviert, zu erlauben.

[0029] Sonden und Primer können verwendet werden, um ein PTX3-Gen oder eine Variante davon zu identifizieren. Z.B. kann eine Sonde oder ein Primer, der spezifisch für ein menschliches PTX3-Gen ist, wie hier identifiziert, verwendet werden, um die Gegenwart oder Abwesenheit des Genes nachzuweisen und daraus zu

schließen, dass die Quelle des Genes anwesend bzw. abwesend ist. Genetische Polymorphismen und Mutationen in dem PTX3-Gen können spezifisch durch Positionierung einer potentiell nicht übereinstimmenden Base(Basen) in dem mittleren Teil einer Sonde oder dem 3'-Ende eines Primers, um die Bindung der Sonde oder des Primers an sein Ziel zu stabilisieren oder zu destabilisieren, abhängig davon, ob die Sequenz des Zieles an dieser Position komplementär bzw. nicht komplementär zu der Base ist, nachgewiesen werden.

[0030] Genetische Polymorphismen und Mutationen können auch durch eine Änderung in der Länge des Restriktionsfragmentes (RFLP), Nuclease-geschützten Fragmentes (z.B. S1-Nuclease, Deoxyribonuclease I, Ribonuclease A, H oder T1) oder eines amplifizierten Produktes nachgewiesen werden. Für komplizierte genetische Fingerabdrücke mag die Identifizierung von jedem Bestandteil nicht notwendig sein, da ein visueller Seit-an-Seit-Vergleich Unterschiede leicht nachweisen könnte (z.B. RAPD). Unterschiede können auch durch Änderungen in dem Molekulargewicht (MW) oder isoelektrischen Punkt (pI) des PTX3-Proteins durch Gelelektrophorese bzw. isoelektrische Fokussierung nachgewiesen werden.

[0031] Die Gegenwart von PTX3-Protein kann als ein Hinweis auf PTX3-Aktivität in menschlichen oder tierischen Flüssigkeiten oder Geweben verwendet werden. Die Flüssigkeit kann Blut, Blutprodukt (z.B. Plasma, Serum), Lavage, Sputum oder dergl. sein. Beispielhafte Gewebe sind diejenigen des Epithels (z.B. Lunge) oder Mucosa (z.B. Mund, Vagina), obwohl die Infektion systemisch sein und andere Gewebearten involvieren kann. Das Signal kann in situ für festes Gewebe, auf dispergiertem oder homogenisiertem Gewebe, in Lösung (z.B. verdünnte oder unverdünnte Körperflüssigkeit, Waschung) oder auf einem Zellausstrich oder "touch prep" nachgewiesen werden. Oocyten, die fertilisiert werden können, können durch PTX3-Expression selektiert werden.

KONSTRUKTION EINES SHUTTLE- ODER EXPRESSIONSVEKTORS

[0032] Ein Shuttle- oder Expressionsvektor ist ein rekombinantes Polynucleotid, das in chemischer Form entweder Deoxyribonucleinsäure (DNA) und/oder Ribonucleinsäure (RNA) ist. Die physikalische Form des Vektors kann einsträngig oder doppelsträngig sein; seine Topologie kann linear oder zirkulär sein. Der Vektor ist vorzugsweise eine doppelsträngige Deoxyribonucleinsäure (dsDNA) oder wird in eine dsDNA nach Einführung in eine Zelle (z.B. Insertion eines Retrovirus in ein Wirtsgenom als ein Provirus) konvertiert. Der Vektor kann ein oder mehrere Bereiche von einem Säugetier-, Insekt-, Pflanzen- oder Pilzen oder einem Virus (z.B. Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus, Cytomegalovirus, Geflügelpockenvirus, Herpes simplexvirus, Lentivirus, Moloney-Leukämievirus, Mausbrustkrebsvirus, Rous-Sarcomvirus, SV40-Virus, Vacciniavirus), wie auch Bereiche, die für genetische Manipulation geeignet sind (z.B. selektierbaren Marker, Linker mit multiplen Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen, Promotor für in vitro Transkription, Primerannealingsstellen für in vitro Replikation) mit einschließen. Der Vektor kann mit Proteinen und anderen Nucleinsäuren in einem Träger (z.B. in einem Viruspartikel verpackt) assoziiert oder mit einer Chemikalie (z.B. kationischem Polymer) kondensiert sein, um auf den Eintritt in eine Zelle oder ein Gewebe zu zielen. Die Wahl der Vektorpolynucleotide und Verfahren für die Einführung von ihnen in das weibliche Reproduktionssystem (z.B. Endometrium, Ovar) liegt innerhalb des Bereiches des Fachwissens.

[0033] Ein Expressionsvektor kann weiter aus einem Regulationsbereich für die Genexpression (z.B. Promotor, Verstärker, Silencer, Splice-Donor- oder Akzeptorstelle, Polyadenylierungssignal, zelluläre Lokalisierungssequenz) bestehen.

[0034] Für PTX3 spezifischer Antikörper kann für Inhibition oder Nachweis verwendet werden. Polyklonale oder monoklonale Antikörper können durch Immunisierung von Tieren (z.B. Huhn, Hamster, Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege, Pferd) mit Antigen hergestellt werden und wahlweise gegen das gleiche oder ein verwandtes Antigen affinitätsgereinigt werden. Das Antigen kann natives Protein, Fragment, das durch Proteolyse oder Gentechnik hergestellt wurde, Fusionsprotein oder in vitro translatiertes oder synthetisiertes Protein, das mindestens ein oder mehr Epitope, die an den Antikörper gebunden sind, beinhaltet, sein. Antikörperfragmente können durch proteolytische Spaltung oder Gentechnik hergestellt werden; humanisierter Antikörper und Einzelketten-Antikörper kann durch Transplantation von Sequenzen von Antigen-Bindungsdomänen eines Antikörpers auf Gerüstmoleküle hergestellt werden. Andere Bindungsmoleküle (z.B. Agonisten oder Antagonisten von Ligand-Rezeptorbindung) können durch Screening einer kombinatorischen Bibliothek auf ein Mitglied, das Antigen spezifisch bindet (z.B. Phagen-Display-Bibliothek), hergestellt werden. Das Antigen kann ein Protein in vollständiger Länge, das durch das Gen oder Fragment/Fragmente davon kodiert wird, sein. Der Antikörper kann für PTX3 spezifisch sein oder er kann mit anderen Pentraxinen kreuzreagieren, abhängig davon, wie gut das durch den Antikörper erkannte Epitop unter verschiedenen Arten konserviert ist. Siehe z.B. US-Patente 5,903,484; 5,723,286; 5,733,743; 5,747,334 und 5,871,974.

[0035] PTX3-spezifische Bindungswirkstoffe (z.B. Polynucleotide, Polypeptide) können diagnostisch verwendet werden, um PTX3-Nucleinsäure oder Protein nachzuweisen oder für die Behandlung, um PTX3-Aktivität zu inhibieren (z.B. Transkription, Translation, Processing, Sekretion, Rezeptorbindung). Insbesondere sind Wirkstoffe, die die PTX3-Transkription und PTX3-Bindung an einen Rezeptor beeinflussen, erwünscht.

[0036] Verbindungen der Erfindung oder Derivate davon können als ein Medikament verwendet werden oder verwendet werden, um eine pharmazeutische Zusammensetzung mit einer oder mehreren Nutzungen, die hier offenbart werden, zu formulieren.

[0037] Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, das rekombinante menschliche PTX3 für die Herstellung eines Medikamentes zur Steigerung der Reproduktionsfähigkeit bei einem weiblichen Subjekt mit einem Defekt in der Reproduktion herzustellen.

[0038] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren für die Bestimmung der Reproduktionsfähigkeit bei einer Frau, umfassend den Nachweis der Gegenwart von PTX3-Protein als diagnostischen Marker.

[0039] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in vitro an Zellen in Kultur, in vivo an Zellen im Körper oder ex vivo an Zellen außerhalb eines Subjektes, die dann dem Körper desselben Subjektes oder eines anderen wieder zugeführt werden, verabreicht werden. Das Subjekt ist eine Frau im reproduktionsfähigen Alter; sie will schwanger werden.

[0040] Verbindungen oder Derivate davon können verwendet werden, um ein Medikament oder andere pharmazeutische Zusammensetzungen herzustellen. Die Verwendung von Zusammensetzungen, die weiter einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfassen, und von Zusammensetzungen, die weiter Bestandteile umfassen, die für die Abgabe der Zusammensetzung an ein Subjekt nützlich sind, sind auf dem Fachgebiet bekannt. Die Zugabe von solchen Trägern und anderen Bestandteilen zu der Zusammensetzung der Erfindung liegt völlig innerhalb des Niveaus des Fachwissens auf diesem Gebiet.

[0041] Eine pharmazeutischen Zusammensetzung kann als eine Formulierung verabreicht werden, die für die direkte Anwendung an dem weiblichen Reproduktionssystem (z.B. Endometrium, Ovar) adaptiert oder für die Passage durch den Darm oder die Blutzirkulation geeignet ist. Alternativ können pharmazeutische Zusammensetzungen zu dem Kulturmedium zugegeben werden. Zusätzlich zu der aktiven Verbindung können solche Zusammensetzungen pharmazeutisch akzeptable Träger und andere Inhaltsstoffe enthalten, von denen bekannt ist, dass sie die Verabreichung erleichtern und/oder die Aufnahme steigern. Die Zusammensetzung kann in einer einzelnen Dosis oder in vielfachen Dosen, die zu verschiedenen Zeiten verabreicht werden, verabreicht werden.

[0042] Pharmazeutische Zusammensetzungen können auf jedem bekannten Wege verabreicht werden. Beispielfhaft kann die Zusammensetzung auf einem mukösem, pulmonalem, topischen oder anderen lokalisiertem oder systemischem Weg (z.B. enteral und parenteral) verabreicht werden. Insbesondere kann das Erreichen einer effektiven Menge von PTX3-Aktivität in oder um das reproduktive System erwünscht sein. Dies kann die Verwendung von lokaler Applikation, Implantation nahe eines Reproduktionsorganes oder vaginale Zäpfchen involvieren. Der Begriffe "parenteral" beinhaltet subkutane, intradermale, intramuskuläre, intravenöse, intraarterielle, intrathekale und andere Injektions- oder Infusionstechniken ohne Beschränkung.

[0043] Geeignete Auswahl der Mengen und des Timings der Dosierungen, der Formulierung und der Verabreichungswege kann mit den Zielen der Erreichung eines günstiges Ansprechens des Subjektes (z.B. Effizienz) und Vermeidung unnötiger Toxizität oder anderem Schaden (Sicherheit) getroffen werden. Daher bezieht sich "effektiv" auf solche Wahlen, die Routinemanipulation von Zuständen involvieren, um einen erwünschten Effekt zu erreichen: z.B. Beeinflussung der Reproduktionsfähigkeit, Steigerung der Fertilität oder Verringerung der Fertilität.

[0044] Ein Bolus der Formulierung, verabreicht an ein weibliches Subjekt einmal am Tag, ist ein bequemer Dosierungsplan. Alternativ kann eine effektive Dosis jeden zweiten Tag, einmal pro Woche oder einmal pro Monat verabreicht werden. Die Dosierungsspiegel von aktiven Inhaltsstoffen in einer pharmazeutischen Zusammensetzung können auch variiert werden, um eine transiente oder anhaltende Konzentration der Verbindung oder des Derivates davon in einem Subjekt zu erreichen und in dem erwünschten therapeutischen Ansprechen zu resultieren. Aber es liegt auch innerhalb des Fachwissens mit Dosierungen auf niedrigerem Niveau zu beginnen, als erforderlich ist, um den erwünschten therapeutischen Effekt zu erreichen, und die Dosierung all-

mählich zu steigern, bis der erwünschte Effekt erreicht ist.

[0045] Die Dosierung kann zeitlich dem Reproduktionszyklus (z.B. Menses) des weiblichen Subjekts angepasst werden. Auf eine praktische Art können Körpertemperatur oder Hormonspiegel als Ersatz für Ereignisse wie Ovulation und Menstruation bei der Reproduktion verwendet werden.

[0046] Die Menge der verabreichten Verbindung ist abhängig von solchen Faktoren, wie z.B. Bioaktivität und Bioverfügbarkeit der Verbindung (z.B. Halbwertszeit im Körper, Stabilität und Metabolismus); chemische Eigenschaften der Verbindung (z.B. Molekulargewicht, Hydrophobie und Löslichkeit); Wege und Zeitplanung der Verabreichung und dergl.. Es wird auch verstanden werden, dass spezifische Dosierungsspiegel, die für jedes spezielle Subjekt erreicht werden sollen, von einer Vielzahl von Faktoren abhängen, einschließlich Alter, Gesundheit, Anamnese, Gewicht, Kombination mit einem oder mehreren anderen Medikamenten und Schwere der Erkrankung.

[0047] Der Begriff "Behandlung" bezieht sich u.a. auf die Verringerung oder Linderung von einem oder mehreren Symptomen der Sterilität bei einem betroffenen Subjekt. Für ein gegebenes Subjekt kann die Verbesserung eines Symptoms, seine Verschlechterung, Regression oder Progression durch ein objektives oder subjektives Maß bestimmt werden. Die Behandlung kann auch die Kombination mit anderen existierenden Behandlungsmethoden und Wirkstoffen (z.B. Superovulation) involvieren. So kann Kombinationsbehandlung durchgeführt werden.

BEISPIELE

[0048] Heterozygote weibliche und männliche Mäuse, die genetisch für das PTX3-Gen modifiziert wurden, sind normal und fruchtbar. Die Züchtung untereinander ergab die vorhergesagte Anzahl von homozygoten Nullmäusen mit einer Mendel'schen Frequenz. Die Züchtung zwischen homozygoten Weibchen und Männchen (PTX3 $-/-$) ist jedoch vollständig infertil. Die Züchtungsergebnisse zeigten an, dass homozygote Männchen normalerweise fertil sind, wenn sie mit Wildtyp (PTX3 $+/+$) oder heterozygoten (PTX3 $+/-$) Weibchen gepaart werden, während PTX3 $-/-$ -Weibchen immer infertil sind, unabhängig von dem männlichen Genotyp. Paarungsexperimente zeigten an, dass es keine Unterschiede zwischen PTX3 $-/-$ und PTX3 $+/-$ -Weibchen in der Frequenz der Kopulationspfropfen ("plugs") nach spontaner Paarung während eines Zeitraumes von vier Tagen oder nach Superovulation gab (Tabelle 1). Die Anzahl der spontan ovulierten Eier (Tabelle 1) (durchschnittlich 7 pro Maus, $n = 4$, bei PTX3 $+/-$ und 7,8 pro Maus, $n = 8$, bei PTX3 $-/-$ -Mäusen) oder hormonell induzierten ovulierten Eiern (durchschnittlichen 35 pro Maus, $n = 9$, bei PTX3 $+/-$ und 27 pro Maus, $n = 18$, bei PTX3 $-/-$ -Mäusen) war bei $+/+$ - und $-/-$ -Mäusen vergleichbar. Die Daten stammten von einem repräsentativen Experiment von vier durchgeführten. Die Oocyten- und Zona pellucida-Morphologie war normal und die ersten Polkörperchen wurden bei ungefähr 50 % der Oocyten, die man 16 Stunden nach Human-Chorion-Gonadotropin (hCG)-Behandlung sowohl von PTX3 $+/-$ wie auch PTX3 $-/-$ -Mäusen erhielt, beobachtet (Tabelle 1). Diese Daten weisen darauf hin, dass Ovulation und Oocytenreifung normal und nicht die Ursache der Infertilität sind. Im Gegensatz dazu wurden morphologische Abnormitäten der Cumuli oophori, die von dem Ovidukt von PTX3 $-/-$ -Mäusen gesammelt wurden (**Fig. 1B** und **1D**), einheitlich beobachtet, da die Granulosazellen lose mit den Oocyten assoziiert waren und nicht die Corona radiata bildeten. Von PTX3 $-/-$ stammende Cumuli waren *in vitro* instabil und Granulosazellen lösten sich innerhalb kurzer Zeit (15 bis 60 Minuten bei PTX3 $-/-$ gegenüber mehreren Stunden bei PTX3 $+/+$ Cumuli) nach der Sammlung (14 bis 16 Stunden nach hCG oder an Tag 0,5 nach natürlicher Paarung) ab, was schnell zu Oocytendenudation führte.

TABELLE 1

NORMALE PAARUNGSFREQUENZ UND OVULATION BEI PTX3 -/-MÄUSEN

	PTX3 +/+	PTX3 -/-	P-Wert
Paarungsfrequenz			
Spontan (a)			
1. Tag	4/9	2/10	NS
2. Tag	2/5	2/8	NS
3. Tag	2/3	2/5	NS
Nach Superovulation	4/4	8/8	NS
Ovulation spontan (b):			
ovulierende Mäuse	4/4	5/5	NS
Eier pro Maus	7	7,8	-#
Nach Superovulation:			
ovulierende Mäuse	5/5	6/6	NS
Eier pro Maus	37,8	33,3	-
Gegenwart von Polkörperchen in den	53/98	54/109	NS
ovulierten Eiern (c)	(54 %)	(49 %)	-

(a) Weibchen wurden mit Männchen für einen Zeitraum von 4 Tagen untergebracht und täglich auf die Gegenwart von Pfropfen untersucht.

(b) Ovulation wurde bei Weibchen mit Pfropfen analysiert.

(c) Die Gegenwart der ersten Polkörper wurde in Oocyten, die 15 Stunden nach hCG-Behandlung gewonnen wurden, bestimmt.

NS nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) von Kontrolle PTX3 +/-Mäusen durch Fischer's Exact Test

Die Zahlen beziehen sich auf gepoolte Proben von PTX3 +/- oder PTX3 -/-Mäusen. Ein ähnlicher Mangel an Unterschieden wurde bei vier Experimenten mit 5 bis 7 Mäusen beobachtet.

[0049] Um zu verstehen, ob und wann die Schwangerschaft unterbrochen wurde, wurden Zygoten und Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Paarung nach spontaner oder hormonell induzierter Ovulation gesammelt. Es wurden weder Oocyten, die sich zu dem Zwei-Zell-Stadium in vivo (Tag 1,5) (Tabelle 2) entwickelten, noch Oocyten mit zwei Vorkernen (Tag 0,5) jemals beobachtet, sogar wenn lebensfähiges Spermia in dem Ovidukt von Mangelmäusen gefunden wurde. Um dem Grund/die Gründe der Infertilität weiter zu identifizieren, wurden PTX3 +/-Blastocyten auf pseudoschwangere PTX3 -/-Weibchen übertragen, aber es wurde normale Schwangerschaft und Geburt beobachtet. Dies schließt Defekte bei der Implantation und den darauffolgenden Vorgängen aus.

TABELLE 2

BEFRUCHTUNG BEI PTX3 -/-MÄUSEN

Befruchtung	PTX3 +/+	PTX3 -/-	P-Wert
In vivo			
Befruchtete Eier über Gesamt (a)			
Spontane Ovulation:	17/28 (60 %)	0/39 (0 %)	<0,0001#
Nach Superovulation:	81/162 (50 %)	0/192 (0 %)	<0,0001
In vitro			
Nach Zona pellucida-Entfernung			
(b)	21/27 (77 %)	21/31 (68 %)	NS ⁺
Unter Verwendung von intakten Cu-			
muli oophori (c)	79/189 (41,8 %)	68/169 (40 %)	NS

(a) Die Embryonen wurden 1,5 Tage postcoitum im Zwei-Zellen-Stadium gesammelt.

(b) Die Fusion wurde durch die Farbtransfertechnik 4 Stunden nach Insemination beurteilt.

(c) Zwei-Zell-Embryonen wurden an dem Tag nach Insemination gezählt.

Fischer's-Exact-Test

NS nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) von Kontroll-PTX3 +/-Mäusen.

[0050] Um zu bestimmen, ob PTX3 -/-Oocyten befruchtet werden könnten, wurde in vitro Fertilisation (IVF) unter Verwendung von Wildtyp-Sperma von erwachsenen Männchen durchgeführt, um PTX3 +/- - oder PTX3 -/-Oocyten zu inseminieren (Tabelle 2). IVF wurde zuerst mit Oocyten durchgeführt, die von der Zona pellucida befreit und mit dem DNA-spezifischen Fluorochrom Hoechst 33258 gefärbt worden waren, um die Fusion zu beobachten. Unter diesen Bedingungen wurde normale Spermabindung an PTX3 -/-Oocytenplasmamembran und vergleichbare Fusionsfähigkeit von PTX3 +/- (77 %) und PTX3 -/- (68 %) Oocyten mit Sperma (Tabelle 2) beobachtet. Diese Resultate legen nahe, dass die Sperma-Ei-Bindung und Fusion in der Abwesenheit von PTX3 auftreten kann. Intakte Kumuli, die 13 bis 15 Stunden nach hCG-Behandlung gesammelt wurden, wurden inseminiert und die Befruchtung von PTX3 -/-Oocyten und die Progression zum Zwei-Zell-Stadium wurde mit einer Frequenz beobachtet, die mit PTX3 +/-Oocyten vergleichbar war (Tabelle 2). Diese Daten bestätigen, dass die Oocytenqualität bei PTX3-Mangelmäusen normal ist. Da der Cumulus oophorus eine kritische Rolle für die in vivo, aber nicht für die in vitro Fertilisation spielt, legen diese Ergebnisse nahe, dass die Abnormalitäten in dem Cumulus der Infertilität von PTX3 -/-Mäusen zugrunde liegen.

[0051] Die Expression von PTX3-mRNA in ovariellen Geweben wurde durch Northern-Blotting und in situ Hybridisierung untersucht. Nach hormonell induzierter Superovulation beginnt die PTX3-mRNA-Expression (beurteilt durch Northern-Blotting in ganzem Gewebe) 2 Stunden nach hCG-Behandlung und dauert 12 bis 14 Stunden (siehe Fig. 2A), korrespondierend zu präovulatorischer Expansion bis ein paar Stunden nach Ovulation [20]. Granulosazellen, die man durch Hyaluronidasebehandlung von Cumuli oophori und Trennung von Oocyten erhielt, exprimierten PTX3-Transkripte.

[0052] Die Expression unter normaler Bedingung in der Abwesenheit von Superovulation wurde durch in situ Hybridisierung untersucht. In situ Hybridisierung von Organen von unbehandelten Weibchen (Fig. 2B) bestätigte die Expression von PTX3-mRNA in dem Ovar, beschränkt auf Granulosazellen von reifen Follikeln, ohne Anzeichen von Transkription in Oocyten.

[0053] Es wurde dann die PTX3-Proteinexpression in ovariellen Geweben analysiert. Western-Blotting deutete darauf hin, dass PTX3 mit PTX3 +/-Cumuli (insbesondere mit extrazellulärer Matrix) assoziiert war, da Hyaluronidasebehandlung, die Cumuluszellen von Oocyten trennt, die Immunreaktivität aufhob (Fig. 2C). Immunfluoreszenzanalyse von PTX3 +/- und -/-Cumuli oophori, die nach hormonell induzierter Superovulation gesammelt wurden (13 bis 15 Stunden nach hCG), bestätigte die Assoziation von PTX3 mit interzellulärer Cumulusmatrix (Fig. 2D).

[0054] Diese Daten legen nahe, dass Sterilität, die durch PTX3-Mangel hervorgerufen wird, durch einen Man-

gel an Oocytenbefruchtung entsteht, da PTX3-Mangel andere Schritte der Reproduktion, von der Paarung zur Ovulation, Implantation und Schwangerschaft, nicht beeinflusst. PTX3-Transkripte werden in dem normalen Ovar ausschließlich durch die Granulosazellen reifer Follikel exprimiert, wie auch durch abgetrennte Granulosazellen, aber nicht durch Oocyten. PTX3-mRNA-Expression wird in gesamten ovariellen Geweben nach hormonell induzierter Superovulation induziert. Schließlich wurde PTX3-Protein in der extrazellulären Matrix von isolierten Cumuli identifiziert, vermutlich produziert durch Granulosazellen. Die Analyse von PTX3 $-/-$ -Mäusen identifizierte einen anormalen Cumulus oophorus als einen Determinanten der Infertilität. Cumuli oophori von PTX3 $-/-$ -Weibchen zeigten morphologische Abnormitäten. Es fehlte ihnen an gut definierten Corona radiata und bei in vitro Kultur lösten sie sich schnell von Oocyten ab. Die "Fragilität" von PTX3-Mangel-Cumuli kann eine strukturelle Rolle von PTX3 in dieser besonderen Matrix oder eine Änderung bei den Regulationsmechanismen der Matrixauflösung reflektieren. Diese Ergebnisse identifizieren PTX3 als einen neuen Bestandteil der extrazellulären Matrix des Cumulus oophorus, der eine Schlüsselrolle bei der Fertilität spielt. Der Cumulus oophorus, obwohl er in vitro nicht essentiell ist, spielt eine Schlüsselrolle bei in vivo Befruchtung. Daher sind die Abnormitäten des Cumulus oophorus wahrscheinlich bei der Infertilität von weiblichen PTX3 $-/-$ -Mäusen involviert.

MATERIALIEN UND METHODEN

ERZEUGUNG VON PTX3 $-/-$ -MÄUSEN

[0055] Ein genomisches DNA-Fragment von 8,5 kb, umfassend Exons 1 bis 2 des Maus-PTX3-Gens, wurde verwendet, um die IRES-LacZ-Kassette, gefolgt von dem PGK-Neomycin-Resistenzgen von dem pWH9-Plasmid in Exon 1 an einer Lokalisation 71 bp stromabwärts des ersten kodierenden ATG, zu integrieren. Verfahren für die Kultur, Selektion und Identifikation von ES-Zellen wurden wie beschrieben durchgeführt [20]. Fünf unabhängig voneinander gerichtete R1-ES-Zellklone wurden durch Southern-Blot-Hybridisierung unter Verwendung von Sonde A (EcoRI/EcoRV 750 bp-Fragment im zweiten Intron) identifiziert. Mit der Sonde B (von dem Neomycin-Resistenzgen) wurde kein Anzeichen für zufällige Integration nachgewiesen. Zwei ES-Zellklone wurden in C57Bl/6-Blastocysten injiziert. Für die Genotypisierung von Mäusen wurde DNA, die von Schwanzbiopsien stammte, durch Polymerasekettenreaktion mit zwei Primersets (Primerset 1: 5'-AGCAATGCACCTC-CCTGCGAT-3', SEQ ID NO: 7; 5'-TCCTCGGTGGGATGAAGTCCA-3', SEQ ID NO: 8; Primer Set 2: 5'-CTG-CTCTTTACTGAAGGCTC-3', SEQ ID NO: 9; 5'-TCCTCGGTGGGATGAAGTCCA-3', SEQ ID NO: 10), die den Wildtyp bzw. das Zielallel nachwies, amplifiziert. Die phänotypische Analyse wurde auf den zwei Linien, die von unabhängigen Klonen stammten, durchgeführt und die Ergebnisse wurden in einem 129Sv-C57Bl/6 gemischten und einem 129Sv Inzucht-genetischen Hintergrund bestätigt. PTX3 $+/+$ -Mäuse waren 129Sv-C57Bl/6 PTX3 $-/-$ -Wurfgeschwister oder 129Sv- oder C57Bl/6-Mäuse, die von Charles River, Calco, Italien erhalten wurden.

[0056] Die Verfahren, die Tiere und die Sorge für sie involvieren, stimmten mit institutionellen Richtlinien gemäß nationalem (4D.L. N.116, G.U., suppl. 40, 18-2-1992) und internationalem Gesetz und Grundsätzen (EEC Council Directive 86/609, OJ L. 358, 1, 12-12-1987; NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, US National Research Council, 1996) überein. Es wurden alle Anstrengungen unternommen, die Anzahl von verwendeten Tieren und ihr Leiden zu minimieren.

PTX3-mRNA UND PROTEIN

[0057] RNA wurde aus Zellen extrahiert und unter Verwendung von TRIZOL-Reagens (GIRCO BRL) gereinigt. Bedingungen für Northern-Blotting, Sondenmarkierung und Hybridisierung (Bindung und Waschen) wurden wie beschrieben durchgeführt [21].

[0058] In situ Hybridisierung: Cryostatschnitte (13 μ m), die vom Wildtyp und PTX3 $-/-$ -Ovarien gewonnen, mit Paraformaldehyd 4 % fixiert und in flüssigem Stickstoff gefroren wurden, wurden verwendet, um in situ Hybridisierung, wie beschrieben, durchzuführen [22]. Kurz gefasst, wurden Präparate, die mit Proteinase K und 0,2 N HCl durchlässig gemacht wurden, bei 65°C über Nacht mit einer radioaktiv-markierten Ribosonde, die aus einem PTX3-cDNA enthaltenem Vektor (pBluescript) unter Verwendung eines Stratagene RNA-Transkriptionskits hergestellt wurde, inkubiert. Darauf folgend wurden die Proben mit Formamid-enthaltendem Puffer gewaschen, luftgetrocknet, in fotografische Emulsion getaucht und bei 4°C in einer dunklen Box für mindestens 10 Tage inkubiert. Nach der Entwicklung wurden die Präparate mit einer Lösung von 2 μ g/ml Hoechst 33258-Färbung gegengefärbt. Für die Western-Blot-Analyse wurden Gesamtzellextrakte, die man von intakten Cumuli oophori, Cumuluszellen oder Oocyten, gesammelt von superovulierten Weibchen, erhielt, durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Page) getrennt, auf Nitrocellulosefilter wurde Elektroblothing durchgeführt (Hybond

ECL, Amersham) und sie wurden mit einem gereinigten biotinylierten Anti-Maus-PTX3-polyklonalen Hämterserum (1 µg/ml), gefolgt durch Streptavidin-HRP (BIOSPA, Italien), markiert. Markierte Proteine wurden durch verstärkte Chemilumineszenz (ECL, Amersham) bestimmt.

OOCYTEN- UND EMBRYOSAMMLUNG, IN VITRO FERTILISATION UND EMBRYOTRANSFER

[0059] Cumuli oophori, Zygoten und Embryonen wurden aus dem Oviduct oder dem Uterus von unbehandelten Weibchen nach natürlicher Paarung gewonnen [20]. Superovulation wurde durch Behandlung mit 5 Einheiten trüchtige Stutenserum (PMS, Folligon, Intervet) und mit 5 Einheiten humanem Choriongonadotropin (hCG, Corulon, Intervet) 48 Stunden später induziert. Cumuli oophori wurden zu verschiedenen Zeiten nach Paarung oder 13 bis 15 Stunden nach hCG-Behandlung gesammelt. Cumuluszellen und Oocyten wurden durch Hyaluronidasebehandlung getrennt [20].

[0060] In vitro Fertilisation (IVF) von Eiern, die von superovulierten Weibchen erhalten wurden, wurde mit intakten Cumuli oophori, wie beschrieben [20], oder mit Zona pellucida freien Eiern [20], gefärbt mit 1 µg/ml Hoechst-Färbung im M16-Medium (Sigma) [23], und mit Sperma vom BDF-Männchen durchgeführt. Befruchtung und Sperma-Ei-Fusion wurde durch Zählung von Zwei-Zell-Stadium-Embryonen am Tag nach der Insemination von intakten Cumuli oophori und durch Zählung von Eiern mit fluoreszierendem fertilisierendem Sperma 4 Stunden nach Insemination von Zona pellucida-freien Eiern bestimmt.

[0061] Der Embryotransfer wurde, wie beschrieben [20], unter Verwendung von 3,5 Tage PTX3 +/-Blastocysten, die in den Uterus von 2,5 Tagen pseudoschwangeren PTX3 -/-Weibchen implantiert wurden, durchgeführt.

LITERATURVERZEICHNIS

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 pentraxin family of calcium-dependent binding proteins. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269:32607-32614.
12. Reid & Blobel, Apexin, an acrosomal pentraxin. *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 (NPTX2): 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 spermocyte fusion. J. Reprod. Fertil., 1988, 82:681-690.

[0062] Alle Modifikationen und Substitutionen, die in den Sinn der Ansprüche und den Bereich ihrer legalen Äquivalente fallen, sollen innerhalb ihres Umfangs eingeschlossen werden. Ein Anspruch, der den Übergang "umfassend" verwendet, erlaubt den Einschluss von anderen Elementen in den Umfang des Anspruches; die Erfindung wird auch durch solche Ansprüche beschrieben, die die Übergangsredewendung "im wesentlichen bestehend aus" (spricht den Einschluss von anderen Elementen in den Umfang des Anspruches erlaubend, wenn sie die Ausübung der Erfindung nicht wesentlich beeinflussen) und den Übergang "bestehend" (spricht, nur die Elemente die in dem Anspruch aufgeführt sind, erlaubend, anders als die Unreinheiten oder belanglosen Aktivitäten, die normalerweise mit der Erfindung vergesellschaftet sind) anstelle des "umfassend" Begriffes benutzen. Jeder dieser drei Übergänge kann verwendet werden, um die Erfindung zu beanspruchen.

[0063] Es sollte verstanden werden, dass ein Element, das in dieser Beschreibung beschrieben wird, nicht als eine Begrenzung der beanspruchten Erfindung ausgelegt werden sollte, außer es wird darauf ausdrücklich in den Ansprüchen hingewiesen. So sind die Ansprüche die Basis für die Bestimmung des Umfangs des legalen Schutzes, der gewährt wird, anstatt eine Begrenzung durch die Beschreibung, die in die Ansprüche hineingelesen wird.

[0064] In Unterscheidung dazu ist der vorherige Stand der Wissenschaft ausdrücklich von der Erfindung bis zu dem Ausmaß spezifischer Ausführungsarten ausgeschlossen, die die beanspruchte Erfindung antizipieren oder die Neuartigkeit zerstören würden. Bei bestimmten Ausführungsarten kann die Gattung von Polynucleotiden oder Polypeptiden in den Ansprüchen unter dem Vorbehalt aufgezählt werden, dass native Nucleinsäuren oder Proteine ausgeschlossen sind (z.B. mit einer Nucleotid- oder Aminosäuresequenz, die in dem Sequenzprotokoll nicht angegeben ist). Z.B. kann die Degeneration des genetischen Codes verwendet werden, um ein Polynucleotid mit einer Nucleotidsequenz bereitzustellen, die SEQ ID NO: 2 kodiert, die aber nicht SEQ ID NO: 1 ist. Ähnlich kann ein PTX3-Polypeptid bereitgestellt werden, das funktionell äquivalent aber nicht identisch mit dem Maus- und/oder menschlichen Protein (z.B. mindestens 90 % identisch) durch Änderung von einem oder mehreren der Aminosäurereste von SEQ ID NO: 2 ist.

[0065] Für einen Fachmann auf diesem Gebiet wird es offensichtlich sein, dass die Erfindung in anderen spezifischen Formen ausgeführt werden kann, ohne dass sie von ihrem Geist oder ihren wesentlichen Charakteristika abweicht. Die beschriebenen Ausführungsarten sollten nur als veranschaulichend, nicht als beschränkend angesehen werden, da der Umfang des legalen Schutzes, der für die Erfindung bereitgestellt wird, eher durch die anhängenden Ansprüche als durch diese Beschreibung zum Ausdruck gebracht wird.

SEQUENZPROTOKOLL

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

<120> Langes Pentaxin PTX3 und weibliche Sterilität

<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> Homo sapiens

<300>

<301> Breviario et al.

<302> Interleukin-1 Inducible Genes in Endothelial Cells

<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 gctcacttga gagtctctct cgcgcagctg tggaaagaac tttgcgtctc 60
tccagcaatg catctccttg cgattctgtt ttgtgctctc tggctctgcag tgttggccga 120
gaactcggat gattatgate tcatgtatgt gaatttggac aacgaaatag acaatggact 180
ccatcccact gaggacccca cgcggtgcga ctgcggtcag gagcactcgg aatgggacaa 240
gctcttcac cagctggaga actcgcagat gagagagcgc atgctgctgc aagccacgga 300
cgacgtcctg cggggcgagc tgcagaggct gggggaggag ctgggcccgc tcgcgaaag 360
cctggcgagg ccgtgcgcgc cgggggctcc cgcagaggcc aggctgacca gtgctctgga 420
cgagctgctg caggcgacce gcgacgcggg ccgcaggtct gcgctatgg agggcgcgga 480
ggcgcagcgc ccagaggagg cggggcgcgc cctggccgcg gtgctagagg agctgcggca 540
gacgcgagcc gaectgcacg cgggtgcagg ttgggtgccc cggagctggc tgccggcagg 600
ttgtgaaaca gctattttat tcccattgcg ttccaagaag atttttggaa gcgtgcatcc 660
agtgagacca atgaggett ggtcttttag tgcctgcatt tgggtcaaag ccacagatgt 720
attaacaaa accatcctgt tttcctatgg cacaaagagg aatccatctg aaatccagct 780
gtatctcagc taccaatcca tagtgtttgt ggtgggtgga gaggagaaca aactggttgc 840
tgaagccatg gtttccctgg gaaggtggac ccacctgtgc ggcacctgga attcagagga 900
agggctcaca tccttgtggg taaatggtga actggcggct accactggtg agatggccac 960
aggtcacatt gttcctgagg gaggaatcct gcagattggc caagaaaaga atggctgctg 1020
tgtgggtggt gcttttgatg aaacattagc cttctctggg agactcacag gcttcaatat 1080
ctgggatagt gttcttagca atgaagagat aagagagacc ggaggagcag agtcttgtca 1140
catccggggg aatattggtt ggtggggagt cacagagatc cagccacatg gaggagctca 1200
gtatgtttca taaatgttgt gaaactccac ttgaagccaa agaaagaac tcacacttaa 1260
aacacatgcc agttgggaag gtctgaaaae tcagtgcata ataggaacac ttgagactaa 1320
tgaagagag agttgagacc aatctttatt tgtactggcc aaatactgaa taaacagttg 1380
aaggaaaagc attggaaaaa gcttttgagg ataatgttac tagactttat gccatggtgc 1440
tttcagttta atgctgtgtc tctgtcagat aaactctcaa ataattaaaa aggactgtat 1500

tgttgaacag agggacaatt gttttacttt tctttggtta attttgttt ggccagagat 1560
gaattttaca ttggagaat aacasaataa gatttgttgt ccattgttca ttgttattgg 1620
tatgtacctt attacaaaaa aatgatgaa aacatattta tactacaagg tgacttaaca 1680
actataaatg tagtttatgt gttataatcg aatgtcacgt ttttgagaag ategtcatat 1740
aagttatatt gcaaaagga tttgtattaa ttttaagacta ttttgtaaa gctctactgt 1800
aaataaaata ttttataaaa ctaaaaaaa aaaaaaa 1837

```

<210> 2

<211> 381

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Signalpeptid

<222> (1)..(17)

<223>

<220>

<221> MAT_Peptid

<222> (18)..(381)

<300>

<301> Breviario et al.

<302> Interleukin-1 Inducible Genes in Endothelial Cells

<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> Mus musculus

- <300>
- <301> Introna et al.
- <302> Cloning of Mouse PTX3
- <303> Blood
- <304> 87
- <305> 5
- <306> 1862-1872
- <307> 1996-03-01
- <308> X83601
- <309> 1996-01-10

<400> 3

```

actcctgcct cacactatct ctcccgggct caaactcgga tcaactgtaga gtctcgcttc 60
ttcccctgcg gctgcgaacg aaatttcgcc tctccagcaa tgcacctccc tgcgatcctg 120
ctttgtgctc tctggtctgc agtagtggtc gagacctcgg atgactacga gctcatgtat 180
gtgaatttgg acaacgaaat agacaatgga cttcatccca ccgaggaccc cacgccatgc 240
gactgccgac aggagcactc ggagtgggac aagctgttca tcatgctgga gaactcgcag 300
atgcgggagg gcatgctgtt gcaggccacc gacgacgtcc tccgtggaga gctgcagcgg 360
ctgcgggcau agctggggcg gctggggggc ggratggcga gcccgttcgc agccggtggc 420
cccgcagacg ccaggctggg gcggggcgctg gagccgctgc tgcaggagag ccgtgacggc 480
agcctcaggc tggcgcgcct ggaggacggc gaggcggcgg gacccgaggc gacagtgcct 540
ggcctaggcg ctgtgctgga ggaactgcgg cggacgcggc ccgacctgag cgcctgacag 600
agctgggtcg ccgcccactg gctgcccgca ggttgtgaaa cagcaatttt cttcccaatg 660
cgttcgaaag agatttttgg aaqctgcat cctgtgagac caatgaagct tgaatctttt 720
agtacttgca tttgggtcaa agccacagat gtattaaaca aaaccatcct gttttcttat 780
ggcacaagaat ggaaccctca tgagattcag ctgtacctca gttcccagtc cctagtgttg 840
gtggtgggtg gaaaggagaa caagctggct gcagacactg tgggttccct ggggaggtgg 900
tcccacctgt gtggcactg gagttcagag caggggagca tgtccctgtg ggcaaacggg 960
gagctgggtg ctaccactgt agagatggcc aaaagtcact ctgttccctga ggggtggactc 1020
ctacagattg gccaaagaaaa gaatggttgc tgtgtaggtg ggggctttga cgaatcatta 1080
gcattttctg gaagaatcac aggccttcaat atctgggatc gggttctcag cgaggaggag 1140
atacgggccg gtggaggagt cgaatcctgt cacatccggg gaaatgtcgt cgggtgggga 1200
gtcacagaga ttcaggcgca cggaggagcc cagtatgttt ctttaagtgtt gtgaaaatct 1260
acttgaagcc aaaggagact cacattttaa atatgccagt tggaaaagtc tgaaaacttc 1320
    
```

```

ggcgcgtaat agacgaatga aggagagact tgagattgtc tttgtttatc ttggcaaaat 1380
actgaataca cagttgaagg gaaggcttga gagagggctc cgggatgttg ttactaagcc 1440
ttatactgtg gtgctttcag attaatgtct gcctctgtca gataaacctt cagataacta 1500
aacatgactg gactctgaac agagggacga ttgtgtgact tttttttttt tttattttgg 1560
ttaattttat tttggccaga gacattttta tattggaaga ataacaaaac aagctctgtt 1620
gcccatgttt cattctttct ggtgtgtatt ttgtgacaaa agagatgatg agaaaaccat 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> Mus musculus

<220>
 <221> Signalpeptid
 <222> (1)..(17)
 <223>

<220>
 <221> MAT_Peptid
 <222> (18)..(381)
 <223>

<300>
 <301> Introna et al.
 <302> Cloning of Mouse PTX3
 <303> Blood
 <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> Homo sapiens

 <220>
 <221> Promotor
 <222> (1)..(1317)
 <223>

 <220>
 <221> Proteinbindung
 <222> (1222)..(1231)
 <223> NF-kB

 <300>
 <301> Basile et al.
 <302> Characterization of the Promoter for the Human Long Pentaxin PTX3
 <303> Journal of Biological Chemistry
 <304> 272
 <305> 13
 <306> 8172-8178
 <307> 1997-03-28
 <308> X97748
 <309> 1997-11-15

 <400> 5
 gaattccccc gatctccctt ctaactctcc acctttggcc taagctttgc ttccacatgg 60
 tcatcaacat ttgggtggta tagaactaat aaccctatc tcacttcact cctatgccag 120
 agggggcccta gcatcagctc atgggattgt tgtttttgct ttccctctcta tctttggetc 180
 cgggattttc cccttacttt aatgggagct catctgtacc ttttaagttt ttattaatat 240
 catgtgaaca cagacctgta tatattgta gaagcagaaa tctctaagtt tactttttaa 300
 acatgatcct tgcctcgaaa ccttgtagaa taatataatg tcccacataat accaagttat 360
 gaaaagaaac atacctaact aactaataa gtatatcct tttttccccc agcttttttt 420
 cccattteta ggttaccag ttgtactgtg ttgtttgtca taggcgggt gaggtggetc 480
 aegtctgtaa tcctagcaat ttgggaggcg aaggcgggtg gatcgctga ggtcaggagt 540
 tcgagaccag cctggctaac atggtgaaac cctgtctcta ctaaaaatac aaaaattaac 600
 tgggtgtggg ggcgggtgcc tgaattcca gctactggg aagctgaggt aggagaatcg 660
 cttgaaccca ggatgaggag gttgcagtga gccgagatca caccattgca ctccagcctg 720
 ggcaacaaga gcgaaattca gtctcaaaa aaaaaattat ctataaaagt ataggtgcaa 780
 ctccctcaagt attaaagaca agatagctcg gattggactt gaacttcaga gccataacta 840
 ttcttaatat gttggtttat cttggaatca gaccatttcc agtttcaacc tgtaaaacag 900
 tgtacaaagg aaacatggaa agttttctat atataaaggg ttgtgaaata ataacagctc 960
 acagaaaatg ctgaaatgat gatttgcttc agtaccctct gaaatttctc ccctaccacc 1020

```

cctccttcac ccccatgtct atcaattcaa attacaacag ctaattctca ggagaacagt 1080
agaagcccag tttctctcct ctttcccctc tgaccctcct ccaattaatc tgactgcagc 1140
gtaaaccctt gcggtttaat attgtgcaac ttccacattt cectcgetct eccaccagc 1200
cccctcccc accaaattca ggggaactcc cgttaccgca gtgccaccag cattactcat 1260
tcacccccat tcaggcttte ctcagcattt attaaggact ctctgctcca gcctctcact 1320
ctcactctcc tccgctcaaa ctcagctcac ttgagagtct cctcccgcc a gctgtggaaa 1380
gaactttgcg tctctccagc aatgcacctc cttgctgattc tgttttgtgc tctctggtct 1440
gcagtgttg ccgagaaactc ggatcattat catctcatgt atgtgaattt ggacaacgaa 1500
atagacaatg gactccatcc cactgaggac c 1531

```

- <210> 6
- <211> 2708
- <212> DNA
- <213> Mus musculus

- <220>
- <221> Promotor
- <222> (1)..(1373)
- <223>

- <300>
- <301> Altmeyer et al.
- <302> Promoter Structure and Transcriptional Activation ...
- <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 accacateag gtttcttaat 60
gtggacteta gaaactgaac tcgagcccac agccttagga gaaaagcacc ttacaaagct 120
gtggtccac actgcccttt aaacaatata gtattgtctc atattgccat cgctttctga 180
tggtttaac ggtttcaaac ataccctgtc tttagccgtg atctcaata agtgaagctc 240
ttgagcaggg gcctgatgcc ttttgacttt gtgttgattc atgcttatga tgccctgttc 300
cctccgtgtc tagctatggt taactgtgga ttcaattttt attggtgggt ggatgggtac 360
atgcatgtgc attccagatg cgtgagggca ctcaggccag gaaagccact catgagtctc 420
tgtcaggagc agaggaattt acctatggaa atccaagagc agccttctga gaggcctggc 480
ctgagggtag taccctccc atcatgatca ggatgtgact ggtaaccctc cccctccatc 540
tcctttgtat attggagact tgtatcagct caggggtatc ctctgggagt ggttccctct 600
agatctgtgt agttttttag atcttgcttt atttgagtt tattctcatg ttttaatttt 660
ttatcactat tattatgact tatcaacacc tatctaggta cttttcactg ggggaggggg 720
caggttttac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acagtcacta 780
atgtaaaatt taaaacaggg accttgatag gatatgtcca agaataccca agcaaccctaa 840
agccactata ttcccgccct cactttcctg ttttactggg ttttgacca gccatactgt 900
gttttttagt tgctccacca gaggagtcaa gactagttag tcaagattga cttctagagt 960
cataaaaatt cttaatgggt ttttttgag tcacggaatc attttctata gcttgggtctt 1020
gagaaagtat ccaaaggaaa agtgaaaaaa aaaagttttc cataacttca ggggttgtgg 1080

```

```

agtaatgaaa gctcacacca aatgccaaaa tgataattcg cctgtacct ctgtgctcct 1140
caccocccca agcgttagca cttcaggta cagcaactaa tcctcagggg caccagaaaa 1200
gtccagcttc cctccccttc tcccctgac tggcctctaa ttaatctgcc tgcagtgtgg 1260
acctcgttgg ttaacattg tgcaacctct tcagctcct tgcctccca cccaaccccc 1320
tcccccaaat ccaggggaac tccctcgcgc tgtgccaccg acattagtca ttcatccgct 1380
catgctttgg agcgtttatt aagggcttca ctccctgctc acactatctc tcccgggctc 1440
aaactcggat cactgttagag tctcgttctc tcccctgctc gtgccaagca aatttcggct 1500
ctccagcaat gcacctccct gcgatcctgc tttgtgctct ctggctctgca gtctgtgctg 1560
agacctcggg tgactacgag ctcatgtatg tgaatttggg caacgaaata gacaatggac 1620
ttcatccca cagggaccgt aagttcattt ttaactctct cagcgtatca aaactacata 1680
actcacttct gggggggcgc gattaacata attaacatag atagccaatg aagcaagctc 1740
aaattatact ttatttctga aagcaaggac tgggggaaaa aaggaaagca aggaaatctc 1800
tgagaaaagc cagaggtttt aaattatttt tgtaacattt atgatgagtt aagtataacg 1860
aaatctttta ctgttttttag ctatattaat ggcattttct cagttagttt aacatgtcta 1920
taaagaatag tctgtgtcat ctttgagttt acacgcacgc tgttttcaga gctatcctta 1980
gaaggagagc gttgctgggg acaggtgaa acctggagtc accaagagtg caaccocatg 2040
ccaccagga caagctgata acacttgtgt gtgtcctgct ttctagccac gccatgagac 2100
tggcccagga agcactcggg gtgggacaag ctgttcatca tgctggagaa ctgcagatg 2160
cgggagggca tgctgttgcg gcccaccgac gacgtcctcc tgggagagct gcagcggctg 2220
cggtcagagc tgggcccgtc ggcggcggc atggcgagge cgtgcgcagc cggtgcccc 2280
gcagaagcca ggtcgttgcg ggcgctggag ccgctgctgc aggagagccg tgacgcgagc 2340
ctcaggctgg cgcgctgga ggcgcggag gcgcggcgac ccgagggcgc agtgccctggc 2400
ctaggcgtcg tgcctggagga actgcggcgg acgcgctcgc acctgagcgc cgtgcagagc 2460
tgggtcggcc accactggct gcccgaggt aagcccacgg tggctctgt ccttagagge 2520
aagcttttgt gggaccctca cactcagagc ccagtaactt ttcataggca cactcacaga 2580
gctcacacca cggcaggcag ctcattgctt tttaaaagta tttccaagcc cgaggaaccc 2640
aaaagaaaa aacgaggatt taaccatca gtctggaagt tgacgtcaga ggttccctgat 2700
accggatc 2708

```

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer

<400> 7

agcaatgcac ctcccctgoga t

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Oligonucleotidprimer

<400> 8

tcctcgttgg gatgaagtcc a

21

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Oligonucleotidprimer

 <400> 9
 ctgctcttta ctgaaggctc 20

 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Oligonucleotidprimer

 <400> 10
 tcctcgggtgg gatgaagtcc a 21

 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Consensus "Pentraxin-ähnliche" Sequenz

 <220>
 <221> Weitere Merkmale
 <222> (2)..(2)
 <223> Jede Aminosäure

 <220>
 <221> Weitere Merkmale
 <222> (4)..(4)
 <223> Jede Aminosäure

<220>

<221> Weitere Merkmale

<222> (5)..(5)

<223> Ser oder Thr

<220>

<221> Weitere Merkmale

<222> (7)..(7)

<223> Jede Aminosäure

<400> 11

His Xaa Cys Xaa Xaa Trp Xaa Ser

1 5

Patentansprüche

1. Verwendung des rekombinanten menschlichen PTX3 zur Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Reproduktionsfähigkeit eines weibliches Subjekts mit einem Defekt in der Reproduktion.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Subjekt ein weiblicher Patient oder ein Tier ist.
3. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, worin das Medikament systemisch zu verabreichen ist.
4. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1 bis 2, worin das Medikament lokal zu verabreichen ist.
5. Verfahren zur Bestimmung der Reproduktionsfähigkeit einer menschlichen Frau, umfassend den Nachweis der Gegenwart des PTX3-Protein als diagnostischen Marker in Fluids oder Geweben, die der Frau entnommen wurden.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

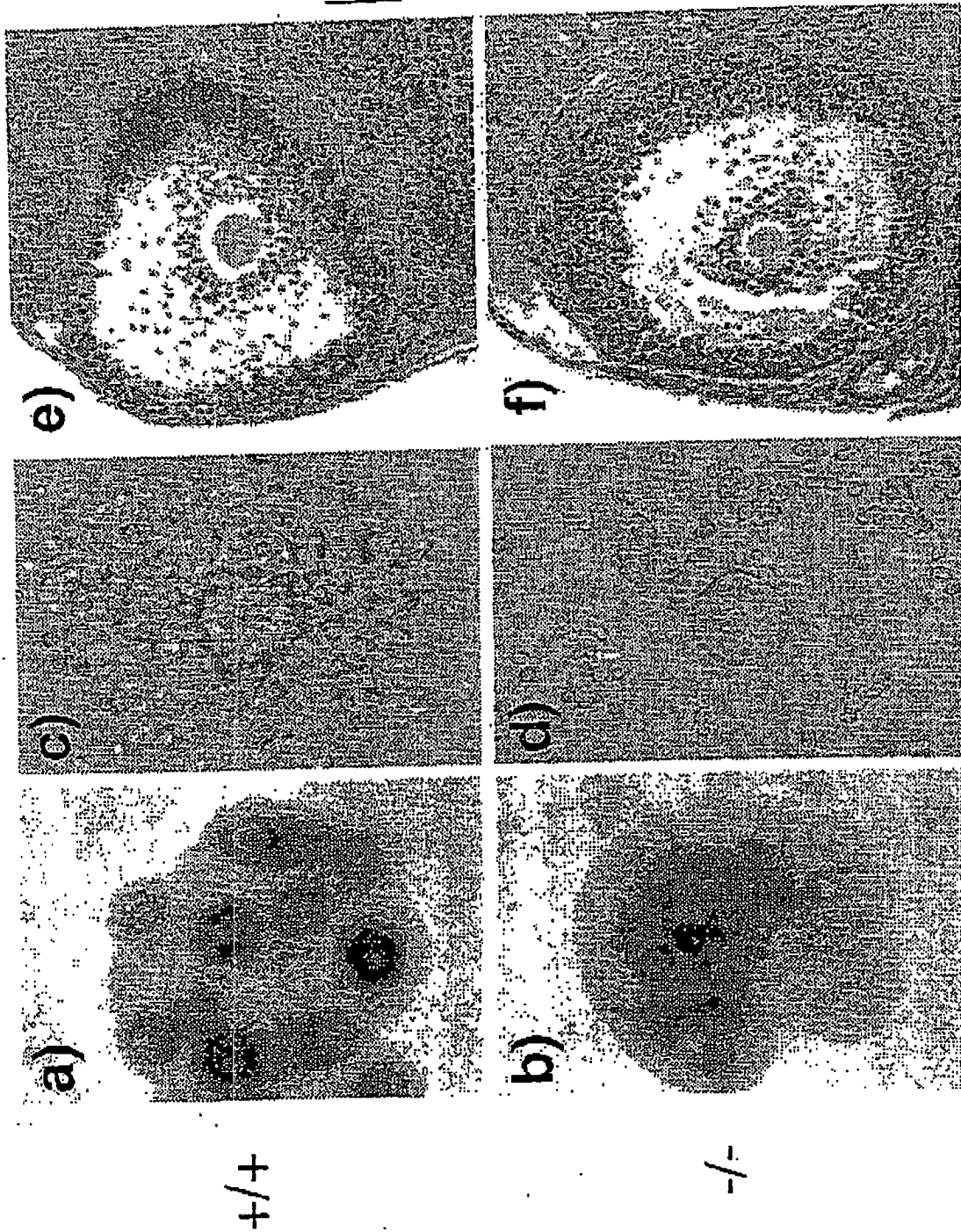


Figure 2

