



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 32 951 T2** 2004.05.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 688 365 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 32 951.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/02527**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 911 509.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/020637**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.03.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **15.09.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.1995**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.07.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.05.2004**

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/02**

**C12Q 1/00, C12Q 1/68, G01N 33/53,
G01N 33/566, A61K 39/00, A01N 37/18,
A61K 38/00, C07K 1/00, C07K 14/00,
G01N 33/68**

(30) Unionspriorität:

29027 10.03.1993 US

(73) Patentinhaber:

**Trustees of the University of Pennsylvania,
Philadelphia, Pa., US; Yale University, New Haven,
Conn., US**

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**FEINBERG, F., Ronald, Cherry Hill, US; KLIMAN,
Jon, Harvey, Woodbridge, US**

(54) Bezeichnung: **REGULIERUNG DER FRUCHTBARKEIT MIT TRANSFORMIERENDEM WACHSTUMFAKTOR BETA**

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] Auf dem Gebiet der Reproduktion von Säugetieren sind viele Diagnoseverfahren vorhanden, um den Reproduktionsmedizinern beim Erstellen einer Diagnose und der Auswahl eines geeigneten Behandlungsweges zu helfen.

[0002] Derzeit wird bei Menschen Unfruchtbarkeit als ein Jahr ohne Empfängnis bei ungeschütztem Koitus definiert. Ungefähr 10–15% aller Paare sind von Unfruchtbarkeit betroffen. Das Risiko für Unfruchtbarkeit bei Frauen im Alter zwischen 35 und 44 ist doppelt so hoch im Vergleich zu Frauen im Alter zwischen 30 und 34. Näherungsweise 600000 Paare suchten während des Jahres 1968 professionelle Hilfe. In den frühen 80'er Jahren erhöhte sich diese Zahl auf über 2 Millionen Arztbesuche aufgrund Unfruchtbarkeit pro Jahr. Die Veränderungen in den Fruchtbarkeitsmustern wird eine signifikante Auswirkung auf die Zusammensetzung von Bevölkerungen haben. Es wurde berechnet, dass bis um die Mitte des nächsten Jahrhunderts die Bevölkerung in den Vereinigten Staaten ohne Einwanderung zurückgehen wird. Weiterhin wird der Prozentsatz der Bevölkerung mit einem Alter von über 65 auf über mehr als 23% in den nächsten 100 Jahren zunehmen, was zu einem gealterten und geringeren Arbeitskräftepotential führt.

[0003] In den Vereinigten Staaten wird der Hauptanteil der Unfruchtbarkeit durch Probleme bei Frauen erklärt. Den Grund für Unfruchtbarkeit in einer Frau zu finden kann komplex sein. Die Untersuchung der Eileiter ist ein wichtiger früher Schritt bei der Fruchtbarkeitsbewertung von Säugetieren aufgrund der zunehmenden Anzeichen für eine Beckenentzündungskrankheit. Derzeit ist ein Hysterosalpinogramm (HSG) das Verfahren der Wahl zur Untersuchung der Durchlässigkeit der Eileiter. Zusätzlich zum HSG ist die Hysteroskopie, die die direkte Untersuchung der Gebärmutter durch eine faseroptische Vorrichtung ist, wichtig zur Bestimmung des Vorhandenseins von Korpuspolypen, submukösen Leiomyomen und anderen Abnormalitäten innerhalb der eigentlichen Gebärmutter.

[0004] Eine andere Kategorie diagnostischer Verfahren umfaßt die Untersuchung der Eierstockfunktion, einschließlich des Eisprungs und der Progesteronabsonderung während der lutealen Phase des Menstruationszyklus. Die Eierstockfunktion kann grob durch Messung der Grundkörpertemperaturen während des Menstruationszyklus und durch Testen des Gebärmutterhalsschleims um die Zeit des Eisprungs bewertet werden. Ein genauerer Test kann durchgeführt werden, indem das luteinisierende Hormon, ein Hormon der Hirnanhangdrüse, gemessen wird, das einen Eisprung nach einem Anstieg in der Mitte des Zyklus hervorruft. Schließlich können die Progesteronkonzentrationen im Serum gemessen werden, um die nor-

male luteale Phase des Menstruationszyklus zu bewerten.

[0005] Die Gebärmutter Schleimhaut selbst kann direkt durch Durchführung einer Gebärmutter Schleimhautbiopsie drei Tage vor dem vermuteten Beginn Menstruation bewertet werden. Zur Bewertung der Gebärmutter Schleimhaut eines Säugers hängen derzeit Gynäkologen und Ärzte zur Behandlung der Unfruchtbarkeit vom Fachpersonal in der Pathologie ab, das die Gebärmutter Schleimhautbiopsien durch Hämatoxylin- und Esosinfärben von in Paraffin eingebetteten Proben untersucht. Für unfruchtbare Patienten liefert das Auslesen dieser Biopsien Informationen über den Tag des Zyklus nach dem Eisprung, die Angemessenheit der lutealen Phase und andere möglichen Daten, wie zum Beispiel das Vorliegen einer Infektion, einer Entzündung oder einer Neoplasie der Gebärmutter Schleimhaut. In den meisten Fällen jedoch gibt es keine Ausweitung der funktionellen und biochemischen Qualität der Gebärmutter Schleimhaut und oftmals kein histologisches Auslesen, um das Unfruchtbarkeitsproblem der Patientin zu erklären.

[0006] Schließlich kann sich die unfruchtbare Patientin einer endoskopischen Untersuchung durch einen Schnitt in den Unterleib zur direkten Sichtbarmachung der äußeren Oberflächen des Eierstocks, der Eileiter und der Gebärmutter unterziehen, um einen schweren pathologischen Befund sichtbar zu machen, der durch vorhergehende Untersuchungen nicht entdeckt wurde.

[0007] Ein hoher Prozentsatz der Frauen, die nicht in der Lage sind, eine Schwangerschaft vollständig auszutragen, erleben im allgemeinen innerhalb der ersten sechs Wochen einen spontanen Schwangerschaftsabbruch. Es wurde gezeigt, dass ein Verlust der Schwangerschaft in den ersten sechs Wochen bei einem Wert in der Größenordnung von zwischen 15 bis 20 % liegt. Weiterhin liegt die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Lebendgeburt nach aufeinanderfolgenden Fehlgeburten ohne eine Lebendgeburt nur bei 40 bis 50%.

[0008] Die in vitro Befruchtung (IVF) erfordert die Entfernung von Eiern aus einem Eierstock eines Säugers und das Aussetzen dieser Eier gegenüber dem Sperma außerhalb des Körpers. Die Befruchtung von jedem Ei erfordert, dass mindestens ein lebendes Spermium die Eihülle (äußere Hülle) des Eis durchdringt und mit dem Pronukleus verschmilzt. Sobald dies stattgefunden hat und die Eier befruchtet sind, können sie in eine Gebärmutter übertragen werden, in der sie sich an der Gebärmutterwand einnisten können. Falls die Einnistung stattfindet, kann die Schwangerschaft weiter verlaufen, als ob sich die Befruchtung innerhalb des Körpers ereignet hätte. Die in vitro Befruchtung hat eine weitreichende professionelle und öffentliche Akzeptanz erreicht. Trotz der immer zunehmenden Anwendungshäufigkeit und Verfeinerung dieses Verfahrens führen jedoch die Befruchtungsversuche meistens nicht zu einer Schwan-

gerschaft. Die in vitro Schwangerschaftsquoten liegen derzeit nur bei ungefähr 15 bis 20 Prozent. Aus vielfältigen Gründen führt die Aussetzung der Eier gegenüber Spermia nicht notwendigerweise zu einer Befruchtung. Weiterhin resultiert normalerweise nicht einmal bei einer Befruchtung der Eier das Einsetzen der Eier in die Gebärmutter zu einer normalen Einnistung. Die niedrige Erfolgsquote der IVF führt oftmals zu einer übermäßigen finanziellen und psychologischen Belastung für das unfruchtbare Paar.

[0009] Andere unterstützte Reproduktionstechnologien umfassen zwei Modifikationen des NF-Verfahrens. Die erste ist der Gamettransfer in den Eileiter (GIFT), die zweite ist der Zygotentransfer in den Eileiter (ZIFT). In dem GIFT-Verfahren wird die gewonnene Eizelle und Spermia zusammengemischt und in den Eileiter zurückgebracht, in dem die Befruchtung stattfindet. Die befruchtete Zygote wandert dann durch den Eileiter hindurch hinunter in die Gebärmutterhöhle, in der die Einnistung stattfinden kann oder auch nicht. Das ZIFT-Verfahren gestattet wie das Standard-NF-Verfahren eine Befruchtung in vitro und dann wird die befruchtete Zygote in den Eileiter zurück eingesetzt, von wo aus sie dann hinunter in die Gebärmutter zur Einnistung wandert. Schließlich ist erkannt worden, dass die Hyperstimulationsprotokolle, die zum Gewinnen vieler Eizellen von der Spenderfrau notwendig sind, auf die Gebärmutter Schleimhaut selbst schädliche Wirkungen haben können und die Einnistungsquoten verringern. Zwei grundlegende Verfahren wurden verwendet, um bei der Überwindung dieses Problems zu helfen. Das erste wird als nicht-stimulierte Eizellengewinnung betrachtet. Ein einzelnes Ei wird gewonnen, man gestattet seine Befruchtung und setzt es zurück in den Eileiter oder die Gebärmutter zur Einnistung. Die andere Technik betrifft den Hyperstimulationsanteil des NF-Verfahrens zur Gewinnung der Eier und gestattet die in vitro Befruchtung. Die Zygoten werden dann eingefroren, um in die Patientin nach mehreren normalen Zyklen zurück eingesetzt zu werden, in der Hoffnung, dass die Gebärmutter Schleimhaut für eine Einnistung empfänglicher sein wird. All diese Verfahren versuchen die Qualität der Eier, der nach der Befruchtung erzeugten Zygoten und die Empfänglichkeit der Gebärmutter Schleimhaut zu maximieren. Jedes Verfahren, das die Einnistungsquote über den Standardwert von 15 bis 20 % vergrößern würde, würde auf jede dieser Technologien eine deutlich positive Wirkung ausüben.

[0010] Daher ist es offensichtlich, dass Verfahren zur Verbesserung der Erfolgsquote der unterstützten Reproduktionstechniken bei Säugetieren hoch erwünscht sind. Mittel zur Bestimmung der Fähigkeit spezieller befruchteter Eier, Empfängnisprodukten für eine Gebärmuttereinpflanzung sind besonders erwünscht, da solche Mittel zu einer unmittelbaren Verbesserung der Erfolgsquote der unterstützten Reproduktion führen. Verfahren zur Verbesserung der Fähigkeit von Empfängnisprodukten für eine Einnistung

sind ebenso hoch erwünscht. Zusätzlich sind ebenfalls Verfahren zur Bestimmung der Unfruchtbarkeit von Frauen erwünscht.

[0011] Schwangerschaftsverhütung oder post-koitale Empfängnisverhütung wird derzeit über zwei grundlegenden Verfahren praktiziert: chirurgisch und medizinisch. In den 70'er Jahren, war der „Morgen nach der Pille“ (Diethylstilbestrol) als eine post-koitale Empfängnisverhütungsmethode populär. In letzter Zeit hat die Verwendung des Anti-Progesterons R-486 eine weitreichende Akzeptanz in Europa zur Beendigung der Schwangerschaft kurz nach der Befruchtung und Einnistung erreicht. Während des ersten Trimesters ist die häufigste Technik zur Beendigung einer Schwangerschaft der operative Schwangerschaftsabbruch. Operative Schwangerschaftsabbrüche betreffen im allgemeinen die Gebärmutterhalsdilatation und Ausschabung oder die Absaugung unter Vakuum. Schließlich können nach dem ersten Trimester weheneinleitende Medikamente, wie zum Beispiel Oxytocin und Prostaglandine zur Einleitung einer vorzeitigen Entbindung und somit zur Beendigung der Schwangerschaft verwendet werden. Von den vorstehend beschriebenen medizinischen Techniken ist bekannt, dass sie eine Anzahl nachteiliger Wirkungen und möglicher Komplikationen aufweisen. Die operative Technik kann zu Gebärmutterruptur, Blutung und Infektion führen.

[0012] In den Vereinigten Staaten umfassen die am häufigsten angewandten Empfängnisverhütungstechniken die oralen steroidal Empängnisverhütungsmittel, injizierte oder eingepflanzte steroidale Empfängnisverhütungsmittel, Vorrichtungen innerhalb der Gebärmutter, physikalische, chemische oder physikochemische Barrieretechniken, coitus interruptus, sexuelle Enthaltsamkeit um die Zeit des Eisprungs, Stillen und dauerhafte Sterilisation. Zusätzlich zu den hohen Versagensquoten von einigen dieser Verfahren, weisen eine Anzahl dieser Verfahren ernsthafte mögliche Komplikationen für die Anwender auf. Zum Beispiel gibt es zusätzlich zu Stoffwechseleränderungen, die durch orale Empfängnisverhütungsmittel verursacht werden, möglicherweise ein erhöhtes Risiko für Neoplasie, Ernährungsstörungen, Herz und Gefäße betreffende Auswirkungen, Thromboembolie und sogar Tod.

[0013] Verfahren zur Bewirkung einer Empfängnisverhütung und Schwangerschaftsverhütung sind hoch erwünscht, besonders Verfahren, die wenig oder keine Nebenwirkungen bei der Patientin zeigen. Verfahren, die die Schwangerschaftsverhütung in einem frühen Stadium in der Kette reproduktiver Ereignisse hemmen, sind besonders erwünscht und wurden seit langem von Fachleuten auf dem Gebiet der Reproduktionswissenschaft gesucht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Die vorliegende Erfindung stellt ein in vitro Verfahren zur Bestimmung der Fähigkeit eines Emp-

fängnisproduktes für eine Gebärmutterimplantation zur Verfügung, wobei das Verfahren umfaßt: das Inkontaktbringen von Trophoblastenzellen, die aus dem Empfängnisprodukt isoliert wurden, mit transformierendem Wachstumsfaktor- β ; und das Auswerten des Erzeugungsspiegels von Fibronectin durch die Trophoblastenzellen, wobei die Fibronectinerzeugung ein Indikator für die Fähigkeit des Empfängnisproduktes ist.

[0015] Die Anmelder haben erkannt, dass die Ansprechempfindlichkeit des Embryos auf TGF β mit dessen gesamter Implantationswahrscheinlichkeit zusammenhängt, wodurch dies bei der Auswahl des optimalen Embryos für die Einpflanzung hilft. Roberts et al., (J. Biol. Chem. 1988, 263(10): 4586–4592) untersuchte menschliche Lungen-Fibroblasten und bemerkte, dass TGF β die Fibronectinrezeptorsynthese stimuliert. Diese Folgerungen haben jedoch für die vorliegende Erfindung keine Bedeutung.

[0016] Die Erfindung stellt ebenfalls Verfahren zur Bestimmung weiblicher Unfruchtbarkeit in einer Patientin zur Verfügung, von der vermutet wird, dass sie unfruchtbar ist, welches das Untersuchen des Gewebes oder der Körperflüssigkeit der Patientin auf das Vorhandensein von transformierendem Wachstumsfaktor- β umfaßt. Somit stellen die Verfahren dieser Erfindung ein Werkzeug zur Diagnose von Säugern mit Unfruchtbarkeit aufgrund ungenügendem TGF β Gehalt zur Verfügung.

[0017] Die Anmelder haben entdeckt, dass während der normalen Schwangerschaft bei Säugern, das Trophoblasten-Fibronectin, das sich in der Plazenta-Gebärmutter-Verbindungsstelle befindet, für die Implantation wichtig ist. Somit verbessert TGF β , von dem festgestellt wurde, dass es (1) zusammen mit der Stimulation der Erzeugung von Trophoblasten-Fibronectin (2) die Haftungsfähigkeit von Trophoblast an die extrazelluläre Matrix fördert und wirkungsvoll die Implantation des Eis oder des Empfängnisproduktes verbessert.

[0018] Die Anmelder haben die Bedeutung von Trophoblasten-Fibronectin in der Fortpflanzung von Säugern erkannt und sie haben entdeckt, dass die Erhöhung der Trophoblasten-Fibronectinerzeugung ein wichtiges Verfahren in der Fruchtbarkeitstherapie ist. Es wurde festgestellt, dass eine solche Erhöhung durch den transformierenden Wachstumsfaktor- β bewirkt wird.

[0019] TGF β -Antagonisten verringern die Menge an verfügbarem TGF β , zum Beispiel zur Stimulation der TUN-Synthese Dies macht folglich den Erhalt einer Schwangerschaft unmöglich und bewirkt, dass eine Empfängnis unwahrscheinlich wird.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0020] Kürzlich haben die Anmelder festgestellt, dass Trophoblasten-Fibronectine, hauptsächlich das Tropho-Uteronectin (TUN) durch Trophoblasten über die Schwangerschaft hinweg an Anlagerungsstellen

sowohl in vivo als auch in vitro synthetisiert werden. Es wurde festgestellt, dass Tropho-Uteronectin an der Plazenta-Gebärmutterverbindungsstelle vorkommt. Es wird angenommen, dass Trophoblasten-Fibronectine und besonders Tropho-Uteronectin eine entscheidende Funktion bei der Modulierung der Trophoblastenhaftung an die extrazelluläre Gebärmuttermatrix ausübt. Feinberg, et al., 1991, American Journal of Pathology, 138 (3): 537–543. Zusätzlich wurde über viele Jahre hindurch festgestellt, dass Trophoblastenzellen des Empfängnisproduktes einen Kontakt mit der Gebärmutter als einen entscheidenden Teil des Implantationsprozesses herstellen. Hertig, A. T. und Rock, J., 1956, American Journal of Anatomy, 98, 435–494.

[0021] Die Anmelder haben nun festgestellt, dass der transformierende Wachstumsfaktor- β , (TGF β), die Produktion von Trophoblasten-Fibronectin, einschließlich Tropho-Uteronectin, stimuliert. Der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF β), wie er hier verwendet wird, ist ein Protein, das von α -Granulae oder Blutplättchen abgegeben wird. TGF β wurde kürzlich an der menschlichen Plazenta-Gebärmutter-Grenzfläche von Einpflanzungsorten lokalisiert, die von schwangeren Menschen operativ entfernt worden waren. Graham, et al., 1992, Biol. Reprod., 46: 561–572. TGF β ist zum Beispiel von Sigma, St. Louis, MO, R & D Systems, Minneapolis, MN und Collaborative Research, New Bedford, MA. kommerziell erhältlich. TGF β bezieht sich auf alle Isoformen von TGF β . Somit können TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 und TGF β 4 von einigen oder allen Aspekten der Erfindung umfaßt werden.

[0022] Trophoblasten-Fibronectin umfaßt alle Fibronectinproteine, die durch Trophoblasten produziert werden. Es wurde festgestellt, dass ein Trophoblasten-Fibronectin, Tropho-Uteronectin (TUN) für die Ausübung der vorliegenden Erfindung besonders wichtig ist, jedoch wird ebenfalls von anderen Trophoblasten-Fibronectinen angenommen, dass sie wichtig sind.

[0023] Ein erfindungsgemäßes in vitro Verfahren zur Bestimmung der Fähigkeit eines Empfängnisproduktes für eine Gebärmutterimplantation wird zur Verfügung gestellt, wobei das Verfahren umfaßt: das Inkontaktbringen von Trophoblastenzellen, die aus dem Empfängnisprodukt isoliert wurden, mit transformierendem Wachstumsfaktor- β ; und das Auswerten des Erzeugungsspiegels von Fibronectin durch die Trophoblastenzellen, wobei die Fibronectinerzeugung ein Indikator für die Fähigkeit des Empfängnisproduktes ist.

[0024] Mit dem Ausdruck Fähigkeit für eine Gebärmutterimplantation sind die für eine Implantation wichtigen Merkmale gemeint. Zum Beispiel ist die Erzeugung von Fibronectin durch Trophoblasten für die Implantation wichtig. Es wird daher angenommen, dass die Fähigkeit, eine solche Reaktion in vitro hervorzurufen, ein Anzeichen dafür ist, dass das Empfängnisprodukt wirksam Fibronectin und andere Fak-

toren, die für die in vivo Entwicklung des Fötus nach dessen Einführung in die Gebärmutter wichtig sind, erzeugen wird.

[0025] Der Ausdruck „Empfängnisprodukt“, wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf die Summe der Derivate eines befruchteten Eis in jedem beliebigen Entwicklungsstadium von der Befruchtung bis zum Tod, einschließlich außerembryonalen Membranen, Plazenta und Trophoblasten, so wie auch den Embryo oder den Fötus. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung sind allgemein auf Säugetiere anwendbar. Zum Beispiel können die Verfahren der vorliegenden Erfindung unter anderem auf Rinder, Pferde, Schweine, Hunde-, katzenartige und menschliche Säugetiere angewandt werden.

[0026] Der Gehalt des Trophoblasten-Fibronectins, das durch das Empfängnisprodukt erzeugt wird, kann durch jedes Verfahren ausgewertet werden, das das Protein nachweist, jedoch aber das Empfängnisprodukt unversehrt läßt. Diese Auswertung kann somit durch Inkontaktbringen des Empfängnisproduktes oder des das Empfängnisprodukt umgebenden Kulturmediums mit einem nachweisbar markierten Antikörper ausgeführt werden, der für Trophoblasten-Fibronectin spezifisch ist. Die Anmelder haben früher die Fähigkeit kultivierter Trophoblasten zur Absonderung von Fibronectin und insbesondere TUN in die Kulturmedien gezeigt. Feinberg, et al., 1991, American J. Pathology, 138 (3): 537–543. Zum Beispiel ist FDC-6 ein geeigneter Antikörper, der Trophoblasten-Fibronectine, wie zum Beispiel Tropho-Uteronectin, erkennt, wie es in dem US Patent Nr. 4,894,326 offenbart ist. Dem Fachmann ist klar, dass ebenfalls andere Antikörper verwendet werden können, die spezifisch eines oder mehrere Trophoblasten-Fibronectine erkennen.

[0027] Die nachweisbare Markierung wird praktischerweise aus der Gruppe ausgewählt, die aus Enzymen, Chromophoren, Fluorophoren, Coenzymen, Chemolumineszenzmaterialien, Enzymhemmstoffen und paramagnetischen Metallen und Radionukleotiden besteht.

[0028] Ein Assay, von dem angenommen wird, dass er zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet ist, ist ein in situ Hybridisierungsassay, der die Schritte des Inkontaktbringens des Empfängnisproduktes mit einem nachweisbar markierten Oligonucleotid oder einer cDNA-Sonde, die mit der für Trophoblasten-Fibronectin kodierenden mRNA hybridisierbar ist, und des Nachweisens des markierten Oligonucleotids umfaßt. Allgemeine Verfahren für die in situ Hybridisierung sind zum Beispiel in Stroop, et al., 1984, Lab. Invest. 51: 27–38 beschrieben.

[0029] Die Verfahren dieser Erfindung können ebenfalls zur Bestimmung weiblicher Unfruchtbarkeit in einem weiblichen Säugetier nützlich sein, von dem angenommen wird, dass es unfruchtbar ist. Dementsprechend kann Gewebe oder Körperflüssigkeit, die von einer Patientin isoliert wurde, auf das Vorhandensein von aktivem und/oder immunologischem

transformierenden Wachstumsfaktor- β mit einem Gehalt, der gleich derjenigen einer fruchtbaren Kontrolle ist, untersucht werden. Das Vorhandensein des Wachstumsfaktor- β weist auf eine Fruchtbarkeit hin. Das Fehlen des Wachstumsfaktor- β weist auf ein Fehlen der Empfänglichkeit für die Implantation und folglich auf eine Unfruchtbarkeit hin. Körperflüssigkeiten, von denen angenommen wird, dass sie nützlich sind, umfassen zum Beispiel Plasma, Serum und cervicouterine Aspirate. Beispiele von Zellarten, von denen angenommen wird, dass sie in solchen Assays verwendbar sind, umfassen eine endometriale Biopsie. Im allgemeinen wird angenommen, daß jede reproduktive Körperflüssigkeit oder Zellart verwendbar ist, die mit der Implantation und der Fähigkeit zur Stimulierung einer Trophoblasten-Fibronectinsynthese in einer fruchtbaren Kontrolle zusammenhängt. Praktischerweise sind Assays für die immunologisch reaktive Menge und Aktivität des funktionellen TGF β handelsüblich und sind vom Fachmann einfach zu verwenden.

[0030] TGF β kann vor der Einführung des Eis, Spermias oder Empfängnisproduktes in den reproduktiven Bereich eines weiblichen Säugers entweder natürlich oder durch unterstützte reproduktive Techniken verabreicht werden. Zum Beispiel kann eine interuterinäre Infusion, ein Gel oder eine physiologische Lösung, die TGF β enthält, zur Einführung von TGF β in die Vagina, den Gebärmutterhalskanal, die Gebärmutter und in die Eileiter verwendet werden. Weiterhin kann in Fällen von unterstützten reproduktiven Techniken TGF β mit dem Ei oder dem Empfängnisprodukt vor Einführung in den reproduktiven Bereich in vitro in Kontakt gebracht werden.

[0031] TGF β kann ebenfalls gleichzeitig mit der Einführung des Eis, des Spermias oder des Empfängnisproduktes in den reproduktiven Bereich eines weiblichen Säugers verabreicht werden. Zum Beispiel kann ein TGF β -enthaltendes Gel hergestellt werden, in dem ein Empfängnisprodukt während der in vitro Befruchtung suspendiert ist, in dem Ei und Sperma während des Gamettransfers im Eileiter suspendiert sind oder in dem die Zygote während des Transfers im Eileiter suspendiert ist. Es können ebenfalls TGF β -enthaltende physiologische Lösungen gleichzeitig mit unterstützten reproduktiven Verfahren, die solche wie diese sind, verabreicht werden.

[0032] TGF β kann nach der Einführung des Eis, Spermias oder des Empfängnisproduktes in den Reproduktionsbereich eines weiblichen Säugers verabreicht werden. Zum Beispiel kann eine intravenöse Injektion einer physiologischen TGF β -Lösung nach der Einführung eines Eis, Spermias oder Empfängnisproduktes in die Gebärmutter als ein vorbeugendes Verfahren verabreicht werden, um die Chancen für eine Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zu stärken. Dem Fachmann ist natürlich klar, dass die Dosierung und die Verfahren für die Verabreichung mit der Größe, dem Gewicht und dem Zustand des zu behandelnden Patienten variieren werden, wobei das

Ziel die Erhöhung der Trophoblasten-Fibronectinsynthese auf die Niveaus einer normalen fruchtbaren Kontrolle ist.

[0033] In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird die Verwendung eines transformierenden Wachstumsfaktor- β -Antagonisten oder eines transformierenden Wachstumsfaktor- β -Rezeptorantagonisten bei der Herstellung eines Medikaments zur Empfängnisverhütung zur Verfügung gestellt. Zum Beispiel können Antisense-Oligonucleotide zur Hemmung der TGF β -Synthese durch Säuger-Trophoblasten oder durch die Gebärmutter Schleimhaut verwendet werden. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Zugabe von Oligonucleotid-Antisense-DNA-Sonden zu Zellen bewirkt, dass sie spezifisch mit der Erzeugung des entsprechenden Proteins aufhören. Siehe, zum Beispiel Tortora, et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 705–708. Ein Antisense-Oligonucleotid kann leicht hergestellt werden und auf einer Anzahl von Wegen verabreicht werden, die dem Fachmann bekannt sind. Siehe zum Beispiel das U.S. Patent Nr. 5,098,890 erteilt am 24. März 1992.

[0034] Die Hemmung der TGF β -Synthese in einem Säugetier weist eine Vielzahl von Verwendungsmöglichkeiten auf. Zum Beispiel kann ein Säugetier, bei dem ein TGF β -Gehalt festgestellt wurde, der dem Gehalt einer normalen fruchtbaren Kontrolle entspricht oder darüber liegt, ein Kandidat für die TGF β -Hemmung sein, wobei die Hemmung so ausgelegt ist, daß die die TGF β -Gehalte in den Bereich einer normalen fruchtbaren Kontrolle bringt. Die TGF β -Hemmung kann ebenfalls als ein Verfahren zur Empfängnisverhütung dazu angewandt werden, einen im Vergleich zu einer normalen fruchtbaren Kontrolle unzureichenden Betrag der TGF β -Konzentration beizubehalten. Zusätzlich kann eine TGF- β -Hemmung auf einen Gehalt, der geringer ist als derjenige in einem normalen fruchtbaren Frau, zur Beendigung einer Schwangerschaft verwendet werden und stellt somit ein Verfahren zur Schwangerschaftsverhütung zur Verfügung.

[0035] Zum Beispiel können Antikörper gegen TGF β oder TGF β -Rezeptoren verabreicht werden. Solche Antikörper können durch Standardverfahren hergestellt werden, die dem Fachmann bekannt sind. Alternativ sind solche Antikörper zum Beispiel von R & D Systems, Minneapolis, MN kommerziell erhältlich und sie können durch gut bekannte Verfahren verabreicht werden.

[0036] Die immunologische Unterbrechung einer Schwangerschaft kann erreicht werden. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass bei einer Injektion von 5 bis 25 mg von gereinigtem Anti-hCG in drei Patientinnen mit ektopischen Schwangerschaften, sich die Eileiterschwangerschaft bei einer der Patientinnen vollständig auflöste, während die zwei anderen deutlich verringerte Progesteron- und Östrogengehalte aufwiesen, was auf eine deutliche Abnahme der Lebensfähigkeit der Schwangerschaft hinweist. Frydman et al., „Phase I Clinical Trial of Monoclonal anti-human

Chorionic Gonadotropin Antibody in Women with an ectopic Pregnancy“, Fertil Steril 152: 734–8 (1989). Diese Autoren verwendeten monoklonale Maus-Antikörper. In einem neueren Artikel, bei dem menschliche monoklonale Antikörper verwendet wurden, wurde gezeigt, dass humanisierte Antikörper in der CMV-Behandlung nach einer Nierentransplantation verwendet werden konnten. Skarp et al., „Use of a human monoclonal anti-cytomegalovirus antibody for the treatment of severe cytomegalovirus after renal transplantation“, Transplant Proc 22: 234 (1990).

[0037] Zusätzlich zu einer systemischen Verabreichung können diese speziellen monoklonalen Antikörper ebenfalls direkt innerhalb der Gebärmutterhöhle und möglicherweise innerhalb des Eileiters, wie vorstehend beschrieben ist, angewandt werden.

[0038] Die Verabreichung von TGF β und Hemmstoffen und deren Antagonisten kann wie vorstehend beschrieben, zum Beispiel parenteral, durch intravenöse Injektion, durch interuterine Infusionen, Gele oder Schwämme oder auf anderen Wegen, die für den Fachmann offensichtlich sind, ausgeführt werden. Literatur, die die Verwendung dieser Verfahren zur Behandlung einer Vielfalt von Krankheitszuständen beschreibt ist bekannt. Es wurde gezeigt, dass die endokrine Funktion eines Eierstocks durch eine intrauterine Infusion deutlich verändert werden kann. Helmer, et al., 1989, J. Reprod. Fertil., 87: 89–101. Es wurde gezeigt, dass Ratten-Gebärmütter, die eine intrauterine Injektion des Hormons bekamen, das das Luteinisierung- Hormon freisetzt, eine signifikant erhöhte Implantationsquote im Vergleich zu Gebärmüttern ohne Injektion aufwiesen. Jones, R. C. „Blastocyst attachment in the ovariectomized rat treated with an intrauterine injection of luteinizing hormone-releasing hormone (LRH)“, Acta Endocrinol (Copenh) 103: 266–8 (1983). Zusätzlich zur Verwendung von Lösungen ist die Verwendung von Gelen bekannt, die intracervikal zur Erleichterung der Wehen und der Entbindung eingeträufelt werden. Siehe zum Beispiel Ekman et al., „Intracervical instillation of PGE₂-gel in patients with missed abortion or intrauterine fetal death“, Arch Gynecol 233: 241–5 (1983). Zusätzlich kann ein intrauterines Vehikel, das entweder zu den derzeit auf dem Markt vorhandenen ähnlich ist oder modifiziert ist, zur Erleichterung einer langsameren Abgabe eines pharmakologischen Wirkstoffes verwendet werden, der entweder die TGF β - oder TUN-Synthese erhöht oder vermindert. Ein Beispiel für ein solches intrauterines Vehikel zur langsamen Abgabe kann in Zhu et al. „The effect of intrauterine devices, the stainless steel ring, the copper T220, and releasing levonorgestrel, on the bleeding profile and the morphological structure of the human endometrium- -a comparative study of three IUDs. A morphometric study of 96 cases“ Contraception 40: 425-38 (1989) gefunden werden.

[0039] Erfindungsgemäße Kits zur Bestimmung der Fibronectinerzeugung, die den transformierenden Wachstumsfaktor- β in einer physiologisch verträgli-

chen Lösung und einen Assay zum (1) selektiven Trophoblasten-Fibronectinnachweis umfassen, werden ebenfalls zur Verfügung gestellt. Herkömmliche Kitkomponenten, wie zum Beispiel Puffermittel, antibakterielle Mittel, Stabilisatoren und Arzneimittelträger werden ebenfalls von den Kits der vorliegenden Erfindung umfaßt. Solche Komponenten sind aus dem Stand der Technik gut bekannt und werden zum Beispiel in The United States Pharmacopeia – The National Formulare, 22te überarbeitete Ausgabe, 1. Januar 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, A. R., Herausgeber, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985) erörtert, auf deren Offenbarungsgehalt hier vollumfänglich Bezug genommen wird.

[0040] Die folgenden Beispiele sollen die vorliegende Erfindung nur erläutern und sollen in keiner Weise derart ausgelegt werden, dass sie den Umfang der Erfindung auf eine beliebige Art beschränken. Dieses Beispiel und deren Äquivalente werden dem Fachmann im Lichte der vorliegenden Offenbarung und der beigefügten Ansprüche klarer werden.

BEISPIEL 1

Zellkultur

[0041] Zytotrophoblasten wurden von einem Plazenta im normalen Zustand durch das Verfahren von Kliman et al., 1986, Endocrinology, 118: 1567–1582 hergestellt. Isolierte Trophoblasten wurden wie in Kliman, vorstehend beschrieben ist, gezählt. Vor der Zellenbeschichtung wurden die Trophoblasten in Dulbeccos minimalen essentiellen Medien (DMEM) mit hinzugefügten Glutamin und Gentamicin mit oder ohne Serum suspendiert. Vor der Beschichtung betrug die Konzentration dieser Zellsuspension $2 \times 10^6/\text{ml}$.

BEISPIEL 2

Identifikation eines von einem Blutplättchen abstammenden TUN-Stimulierungsfaktor im Serum

[0042] Trophoblastenzellkulturen wurden auf Glas- oder Kunststoffsubstraten, wie in Beispiel 1 beschrieben ist, hergestellt. Die Erzeugung von TUN durch Trophoblasten in einem Serumenthaltenden Medium wurde durch die Kultivierung von Trophoblasten in verschiedenen Serumkonzentrationen beobachtet. Es wurde festgestellt, dass die TUN-Erzeugung Dosisabhängig ist, wobei die Konzentrationen des nachweisbaren TUN in den Medien schrittweise von 1 bis 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zunahm als die Serummenge in den Medien schrittweise von 1 bis 10% erhöht wurde. Ein Prozent bis 10% der Serum-enthaltenden Medien erzeugten Zellen, die morphologisch identisch erschienen, mit einem deutlichen Anzeichen für eine Ausbreitung und Bildung von Aggregaten und Synzytia. Bei einer Kultivierung von Trophoblasten in Serum-freien Me-

dien und in Abwesenheit von TGF β wurde keine TUN-Erzeugung beobachtet.

[0043] Die Verwendung einer Nabelschnurserumprobe von einem Baby mit schwerer alloimmuner Thrombozytopenie (schwerer Blutplättchenmangel) führte zu einer sehr geringen TUN-Stimulation, was vermuten läßt, dass ein entscheidender TUN-Stimulierungsfaktor von Blutplättchen abstammt. Zum Nachweis, dass der TUN-Stimulierungsfaktor tatsächlich von Blutplättchen abstammt, wurde Blut aus einem gesunden Donor gezogen und in zwei Zentrifugenröhrchen eingeteilt, denen ein Anti-Koagulans zugegeben worden war. Ein Röhrchen wurde bei einer hohen Geschwindigkeit geschleudert (2000 rpm \times 10 min). das andere Röhrchen wurde bei einer niedrigen Geschwindigkeit geschleudert (500 rpm \times 10 min). Das Röhrchen bei der hohen Geschwindigkeit wies keine Blutplättchen in der überstehenden Flüssigkeit auf und bei dem Röhrchen bei der geringen Geschwindigkeit waren so gut wie alle Blutplättchen in der überstehenden Flüssigkeit geblieben. Bei beiden Plasmen wurde eine Gerinnung herbeigeführt und das resultierende Serum wurde als Blutplättchen-reich (niedrige Umdrehungsgeschwindigkeit) und als Blutplättchen-arm (hohe Umdrehungsgeschwindigkeit) markiert. Nur das Blutplättchen-reiche Serum veranlasste die Trophoblasten zunehmende Menge an TUN herzustellen.

BEISPIEL 3

TUN-Stimulierung durch Zugabe von TGF β

[0044] Trophoblasten, die nach der Beschreibung in Beispiel 1 hergestellt worden waren, wurden in 2% Blutplättchen-armem Serum oder in Serum, das von dem Neugeborenen mit alloimmuner Thrombozytopenie abstammt, in Gegenwart von exogen zugegebenem TGF β 1 kultiviert. 50 bis 200 pM TGF β riefen nach 48 Stunden eine Reaktion der 3 bis 4-fachen Induktion an TUN hervor, wobei die TUN-Gehalte in den Medien von näherungsweise 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zunahmen.

BEISPIEL 4

TGF β -Antagonist hemmt die TUN-Erzeugung

[0045] Blutplättchen-reiches Serum wurde getrennt während 6 Stunden mit zwei verschiedenen handelsüblichen TGF β neutralisierenden Antikörpern (R & D Systems, Minneapolis, MN) mit Konzentrationen von 50 bis 100 μl vorinkubiert. Trophoblasten, die nach der Beschreibung in Beispiel 1 unter Verwendung des mit TGF β neutralisierenden Antikörpern vorinkubierten Serums hergestellt worden waren, zeigten nicht nachweisbare Mengen der TUN-Synthese durch Western Immunoblots. (Die Zugabe von 1 ng/ml während 48 Stunden von entweder nur dem von Blutplättchen abstammenden Wachstumsfaktor

zu den Trophoblastenkulturen oder in Kombination mit 1 ng/ml TGF β , wies auf die TUN-Produktion keine zusätzliche Wirkung auf). Diese Feststellung bestätigt weiterhin, dass TGF β in der TUN-Stimulation eine signifikante Rolle einnimmt.

BEISPIEL 5

Herstellung von Platten

[0046] Kunststoffplatten mit sechs Vertiefungen wurde mit einer Lösung aus Plasma-Fibronectin (Boehringer) vorbeschichtet, die mit einer Konzentration von 10 μ g/ml in einer Phosphatgepufferten Salzlösung hergestellt worden war. Ein ml dieser Lösung wurde auf jede der Platten mit den sechs Vertiefungen aufgetragen. Die Platten wurden bei Raumtemperatur während 8 bis 10 Stunden inkubiert.

BEISPIEL 6

Wirkung des zugegebenen TGF β auf die Trophoblastenanlagerung

[0047] Es wurde die Wirkung von TGF β auf die Trophoblastenanlagerung an Plasma-Fibronectinoberflächen untersucht. Zu jeder Platte, der nach der Beschreibung in Beispiel 5 hergestellten Platten mit sechs Vertiefungen, wurde ein ml einer Zellsuspension in Serumfreien Medien zugegeben, die nach der Beschreibung in Beispiel 1 hergestellt worden sind. Nach dem Aufbringen der Zellen wurde eine Stammösung (1 ng/ μ l) des transformierenden Wachstumsfaktor- β (R & D Systems, Minneapolis, MN) zu der Zellkultur gegeben, woraus sich eine Endkonzentration von 1 ng/ml in den Trophoblastenkulturen ergab, die TGF β erhielten.

[0048] Die Zellen wurden während 48 Stunden kultiviert. Danach wurde das Medium entfernt, die Kulturen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 10% neutral gepuffertem Formalin während 10 Minuten fixiert. Eine genaue Untersuchung der Zellen durch Lichtmikroskopie zeigte einen deutlichen quantitativen Unterschied zwischen den Zellen, die mit TGF β behandelt worden waren und denjenigen, die nicht mit TGF β behandelt worden waren. In Abwesenheit von vorbeschichtetem Plasma-Fibronectin waren ungefähr 97% der Zellen rund. Mit zugegebenem Plasma-Fibronectin, das mit 10 μ g/ml aufgetragen worden war, waren ungefähr 70% der Zellen rund während die restlichen als flach und dazwischenliegend eingeteilt wurden. Mit der Zugabe von 1 ng/ml Säure-aktiviertem TGF β waren weniger als 25% der Zellen rund, beinahe 40% lagen dazwischen und ungefähr 35% der Zellen waren flach. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Kombination von sowohl vorbeschichtetem Plasma-Fibronectin als auch zugegebenem TGF β , das die Trophoblastenabsonderung von TUN stimuliert, in der Lage ist, die Trophoblastenanlagerung an Kulturoberflächen unter Se-

rum-freien Bedingungen zu erhöhen.

[0049] Es wurde weiterhin festgestellt, dass das vorbeschichtete Fibronectin leicht durch die Trophoblasten abgebaut wird, wobei mehrere proteolytische Fragmente in die Medien freigesetzt werden. Umgekehrt dazu waren vorbeschichtete amniotische Flüssigkeiten und Trophoblasten-Fibronectin sehr beständig gegenüber Verdauung durch die Trophoblasten und es wurden geringe proteolytische Fragmentgehalte gefunden. Dies könnte erklären, wie Trophoblasten gleichzeitig eindringen und die mütterliche uterine extrazelluläre Matrix verdauen können, und noch neue TUN-enhaltende, Protease-beständige extrazelluläre Matrixkomponenten während der Implantation synthetisieren und abscheiden können.

Patentansprüche

1. In vitro Verfahren zur Bestimmung der Fähigkeit eines Empfängnisproduktes für eine Uterusimplantation, wobei das Verfahren umfaßt das Inkontaktbringen von Trophoblastenzellen, welche aus dem Empfängnisprodukt isoliert wurden, mit transformierendem Wachstumsfaktor- β und das Auswerten des Erzeugungsspiegels von Fibronectin durch die Trophoblastenzellen, wobei die Fibronectinerzeugung ein Indikator für die Fähigkeit des Empfängnisproduktes ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Trophoblasten-Fibronectin Trophouteronectin ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Erzeugungsspiegel von Fibronectin durch die Trophoblastenzellen durch das Inkontaktbringen der Trophoblastenzellen oder des die Trophoblastenzellen umgebenden Kulturmediums mit einem nachweisbar markierten Antikörper, welcher spezifisch für Trophoblasten-Fibronectin ist, und das Nachweisen des markierten Antikörpers ausgewertet wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei der Antikörper der anti-Trophouteronectin-Antikörper FDC-6, erhältlich vom Hybridom HB 9018 mit der ATCC Nr. HB 9018, ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Bestimmungsschritt das Inkontaktbringen der Trophoblastenzellen mit einem markierten Oligonucleotid oder einer cDNA-Sonde, hybridisierbar mit mRNA, welche für Trophoblasten-Fibronectin kodiert, und das Nachweisen des markierten Oligonucleotide umfaßt.

6. Verfahren zur Bestimmung weiblicher Unfruchtbarkeit in einer Patientin, von der vermutet wird, daß sie unfruchtbar ist, welches das Untersuchen von Gewebe oder reproduktiver Körperflüssigkeit, das bzw. die von der Patientin isoliert wurde, auf das Vorhandensein von transformierendem Wachstums-

faktor- β umfaßt.

7. Verwendung von transformierendem Wachstumsfaktor- β bei der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Erfolgsrate von unterstützter Reproduktion.

8. Verwendung eines transformierenden Wachstumsfaktor- β -Antagonisten oder eines transformierenden Wachstumsfaktor- β -Rezeptorantagonisten bei der Herstellung eines Medikaments zur Empfängnisverhütung.

9. Verwendung eines transformierenden Wachstumsfaktor- β -Antagonisten oder eines transformierenden Wachstumsfaktor- β -Rezeptorantagonisten bei der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit, daß Empfängnisverhütung bewirkt wird.

10. Verwendung nach Anspruch 8 oder Anspruch 9, wobei der transformierende Wachstumsfaktor- β -Antagonist ein Antikörper ist, der für den transformierenden Wachstumsfaktor- β spezifisch ist.

11. Verwendung nach Anspruch 8 oder Anspruch 9, wobei der transformierende Wachstumsfaktor- β -Rezeptorantagonist ein Antikörper gegen einen transformierenden Wachstumsfaktor- β -Rezeptor ist.

12. Kit, eingerichtet zur Bestimmung der Fähigkeit eines Empfängnisproduktes vor dessen Implantation in den Körper, umfassend transformierenden Wachstumsfaktor- β in einer physiologisch verträglichen Lösung und Mittel für einen Test zum selektiven Nachweis von Trophoblasten-Fibronectin.

13. Kit nach Anspruch 12, wobei die Mittel für einen Test zum selektiven Nachweis von Trophoblasten-Fibronectin einen anti-Trophouteronectin-Antikörper umfassen.

14. Kit nach Anspruch 13, wobei die Mittel für einen Test zum selektiven Nachweis von Trophoblasten-Fibronectin den anti-Trophouteronectin-Antikörper FDC-6, erhältlich aus Hybridoma HB 9018 mit der ATCC Nr. HB 9018, umfassen.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen