(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 504 T2** 2004.12.23

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 734 263 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 504.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/13299**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 902 592.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/13821**
(86) PCT-Anmeldetag: **18.11.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **26.05.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **21.01.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.12.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 35/48**
A61K 39/395, G01N 33/15, G01N 33/543, G01N 33/554, G01N 33/577, G01N 33/68, A61P 43/00

(30) Unionspriorität:
155435 **19.11.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Trustees of the University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., US

(72) Erfinder:
LESSEY, Bruce A., Hillsborough, US

(74) Vertreter:
Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel, 80538 München

(54) Bezeichnung: **ALPHAvBETA3 INTEGRIN ALS INDIKATOR FÜR ENDOMETRIOSE**

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] Während des letzten Jahrzehnts ist die Bedeutung der extrazellulären Matrix (ECM) bei der Steuerung des Wachstums, Differenzierung und Funktion des darüber liegenden Epithels von Forschern erkannt worden. Getzenberg et al., "The Tissue Matrix: Cell Dynamics and Hormone Action", Endocrine Rev. 1990, 11: 399. Die Wechselwirkung zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix (oder Substratum) wird durch verschiedene Klassen von Zelladhäsionsmolekülen vermittelt, wobei eine der wichtigsten die Integrine sind. Albelda et al., "Integrins and Other Cell Adhesion Molecules", FESEB J. 1990, 4: 2868. Buck et al., "Integrin, a Transmembrane Glycoprotein Complex Mediating Cell-Substratum Adhesion", J. Cell Sci. Suppl. 1987, 8: 231. Diese mannigfaltige Familie von Glycoproteinrezeptoren wird auf der Zellmembran als heterodimere α und β Integrinuntereinheiten exprimiert und ist sowohl an der Zell-Zell- als auch an der Zell-Substratumadhäsion beteiligt. Spezifische Erkennung und Bindung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Fibronectin (FN), Lamin (LM) und Collagen (Col) übertragen Informationen auf die cytoskelettale Struktur, eine Wechselwirkung, die wichtige Rollen beim Fördern von Hormonansprechbarkeit und genomischer Aktivierung spielen könnte. Burridge et al., "Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton", Ann. Rev. Cell. Biol. 1988, 4: 487 und Getzenberg et al. supra.

[0002] Obwohl umfassende Information über spezifische Integrinproteine vorhanden ist, zum Beispiel Hemler, M. E. "VLA Proteins in the Integrin Family: Structures, Functions and Their Role on Leukocytes", Annu. Rev. Immunol. 1990, 8: 365, ist wenig bekannt, das die Verteilung dieser Rezeptoren im weiblichen Fortpflanzungssystem betrifft. Im Uterus hält das Endometrium, das aus glandulärem Epithel und verknüpftem Mesenchym (Stroma) besteht, komplexe zeitliche und räumliche Funktionen aufrecht als Antwort auf das zyklische hormonale Milieu. Während Tabibzadeh berichtete, dass dynamische Veränderungen der Integrinexpression die anderen histologischen Änderungen, die zeitweise den Menstruationszyklus kennzeichnen, begleiten, Tabibzadeh, S., "Patterns of Expression of Integrin Molecules in Human Endometrium Throughout the Menstrual Cycle", Hum. Reprod. 1992, 7: 876, ist die Suche nach morphologischen oder biochemischen Markern für die Empfänglichkeit des Uterus bis heute erfolglos geblieben, wie von Rogers und Murphy berichtet wurde, "Uterine Receptivity for Implantation: Human Studies", in Blastocyst Implantation 1989, Yoshinaga, K. ed., Serono Symposia, p. 231. Wenn solche Marker erst einmal identifiziert worden sind, kann ihre Rolle in endometrialen Phänomenen einschließlich Embryoimplantierung, Fertilität, Verhütung und endometrialer Reifung und Empfänglichkeit wahrscheinlich auch identifiziert werden. Da einige Integrine die Kriterien für Marker der Empfänglichkeit zu erfüllen scheinen, besteht daher ein großer Bedarf an Verfahren zum Nachweisen von Integrin-Zelladhäsionsmolekülen im Endometrium.

[0003] Asynchronität zwischen Uterus- und embryonaler Entwicklung ist als eine Ursache für Schwangerschaftsabgang vorgeschlagen worden, auf der Basis einer falschen Abgleichung zwischen endometrialer und embryonaler Empfänglichkeit, siehe Pope, et al., "Uterine Asynchrony: A cause of Embryonic Loss", Biol. Reprod. 1988, 39: 999.

[0004] Die Beziehung zwischen minimaler Endometriose und Kinderlosigkeit und Unfruchtbarkeit bleibt kontrovers. Während es viele beweiskräftige Argumente gibt, um diese Verbindung zu unterstützen, glauben viele Kliniker heute immer noch nicht, dass minimale oder milde Formen der Erkrankung schädlich für die Fruchtbarkeit eines Paares sind. Mehrere Studien, die Frauen mit normalem Endometrium verglichen mit Frauen mit milder oder minimaler Endometriose haben eine Abnahme in Zyklusfruchtbarkeit gezeigt, wie Erfolgsraten in Donorprogrammen, IVF, oder GIFT unterstützt durch Tiermodelle. Ein Grund für dieses Fehlen von Akzeptanz ist das Ergebnis von vielen Studien, das abwartendes Management Schwangerschaftsraten erzielt, die ebenso hoch sind wie die der meisten gegenwärtig verwendeten Therapien.

[0005] Von den vielen Mechanismen, die vorgeschlagen wurden um den Rückgang in Zyklusfruchtbarkeit zu erklären, hat ein Fehler in der Uterusempfänglichkeit wahrscheinlich die geringste Aufmerksamkeit erhalten. Fedele meldete spezifische Änderungen im nativen Endometrium bei Frauen mit schwerer Endometriose, Fedele, L., et al., "Structural and Ultrastructural Defects in Preovulatory Endometrium of Normo-Ovulating Infertile Women with Minimal or Mild Endometriosis", Fertil. Steril. 1990, 53: 989. Yovich schlug basierend auf IVT-ET Erfahrung vor, dass schwere Endometriose mit einem Fehler in der Implantation verbunden war, siehe Yovich et al., "Hormonal Profiles and Embryo Quality in Women with Severe Endometriosis Treated by In Vitro Fertilization and Embryo Transfer", Fertil. Steril. 1988, 50: 308. Es gibt Daten aus Studien im Kaninchen, die nahelegen, dass Implantation durch chirurgisch induzierte Endometriose schädlich beeinflusst wird, und dass die Wirkung durch die Peritonealflüsssigkeit vermittelt wird, siehe Hahn et al., "Experimental Evidence for Failure

to Implant as a Mechanism of Infertility Associated with Endometriosis", Am. J. Obstet. Gynecol. 1986, 155: 1109.

[0006] Endometriose ist eine Erkrankung, die geschätzte 2–5% der allgemeinen, fruchtbaren weiblichen Bevölkerung betrifft, deren Prävalenz sich jedoch bei unfruchtbaren Frauen 30–50% nähert, Peterson et al., "Laparoscopy of the infertile Patient", Obstet. Gynecol. 1970, 36: 667. Während viele betroffene Frauen keine Symptome aufweisen können, leiden andere an Dysmenorrhoe (schmerzhafte, schwierige Menstruation), Dispareunie (Schmerz während des Geschlechtsverkehrs), Menstruationsstörungen und Unfruchtbarkeit. Dass milde oder minimale Endometriose mit Unfruchtbarkeit verbunden ist, wurde durch zahlreiche Studien vorgeschlagen, Hasson H. M., "Incidence of Endometriosis in Diagnostic Laparoscopy", J. Reprod. Med. 1976, 16: 135 und wurde kürzlich in einem Übersichtsartikel zusammengefasst, Bancroft, et al., "Minimal/Mild Endometriosis and Infertility. A Review", Br. J. Obstet. Gynaecol. 1989, 96: 454. Der Mechanismus durch den minimale Endometriose Infertilität verursacht bleibt unbestimmt. Schädliche Wirkungen auf Follikelbildung, Ovulation, Eitransport, Befruchtung, Spermaqualität, Embryonen, Funktion der lutealen Phase und ein Anstieg der Raten von spontanen Fehlgeburten sind alle postuliert worden. Diese Wirkungen können vermittelt werden durch die Weiterentwicklung von peritonealen Faktoren wie Prostaglandinen, Cytokinen, und Wachstumsfaktoren; Aktivierung von peritonealen Makrophagen oder Veränderungen in der Immunfunktion, wie verringerter Aktivität von natürlichen Killerzellen. Kurzrock et al., "LIF: Not Just a Leukemia Inhibitory Factor", Endo. Rev. 1990, 12: 208. Einige wenige Autoren haben vorgeschlagen, dass in erster Linie die Empfänglichkeit des Uterus für den Embryo durch die Anwesenheit von Endometriose betroffen sein könnte, Muscato, et al., "Sperm Phagocytosis by Human Peritoneal Macrophages: A Possible Cause of Infertility in Endometriosis", Am. J. Obstet. Gynecol. 1982, 144: 503 und Yovich et al., supra; und begrenzte Daten aus chirurgisch induzierter Endometriose in Tiermodellen unterstützen diese Hypothese, Hahn, et al., supra. Des Weiteren, wurden strukturelle Anomalien im Endometrium von Frauen mit Endometriose beschrieben im Vergleich zu normalen, fruchtbaren Kontrollen, Fedele, et al., supra.

[0007] Zahlreiche Ansätze wurden untersucht, um Frauen mit Endometriose, unter Verwendung von nicht-chirurgischen Mitteln zu identifizieren. Serummarker wie OC-125, (Barbieri, et al. "Evaluation of a Serological Test for the Diagnosis of Endometriosis using a Monoclonal Antibody OC-125", SGI Annual Meeting 1985; March: 331P (abstract)) sind erhöht in Frauen mit Endometriose, obwohl die Überlappung mit normalen oder anderen Erkrankungszuständen seine Verwendbarkeit als ein diagnostischer Test erheblich einschränkt, Hornstein, et al., "Menstrual Cyclicity of CA-125 in Patients with Endometriosis", Fertil. Steril. 1992, 58: 279. Des Weiteren weist OC-125 in Anbetracht seines allmählichen Anstiegs mit der Schwere der Erkrankung wenig Anwendbarkeit in Fällen von minimaler oder milder Endometriose auf. Andere Ausführungsarten wie MRI oder Ultraschall weisen ihre höchste Sensitivität ebenfalls beim Vorliegen von fortgeschrittener Endometriose auf. Bis heute konnte von keinem anderen Verfahren als Laparoskopie gezeigt werden, dass es eine nachgewiesene Effektivität für die Diagnose von minimalen oder milden Stadien von Endometriose sichert.

[0008] Während die Empfänglichkeit des Uterus ein wenig verstandenes Phänomen bleibt, wird die anfängliche Anheftung des Embryos an die innere Auskleidung des mütterlichen Uterus als kritischer Schritt im Implantationsprozess betrachtet. Ein Implantationsfenster wurde durch beschreibende Studien aus den 50er Jahren des 20 Jahrhunderts sowie durch neuere Studien unter Verwendung von fortgeschrittenen Reproduktionstechnologien definiert, Hertig et al., 1956 und Navot et al., 1992. Die Anwesenheit eines Integrin-Zelladhäsionsmoleküls, das zuverlässigerweise auf den Epithelzellen des Endometriums nach Tag 19 des normalen Menstruationszyklus erscheint, entspricht dieser mutmaßlichen Zeit der Implantation, Lessey, et al., "Integrin Adhesion Molecules in the Human Endometrium", J. Clin. Invest. 1992, 90: 188. Die Expression dieses Integrins, des $\alpha_v\beta_3$ Vitronectinrezeptors, ist außerdem bei Frauen mit verzögerter Reifung des Endometriums verlangsamt, (wobei die Histologie des Endometriums durch unzureichende Hormonkonzentrationen oder verringerte Antwort auf existierende Konzentrationen von Hormonen verzögert oder verlangsamt ist). Da von Einigen vorgeschlagen wurde, dass Unfruchtbarkeit auf Grund von Endometriose einen Fehler in der Empfänglichkeit des Uterus widerspiegeln könnte, ist es von Interesse die Expression dieses Proteins in den Endommetrien von Frauen mit Unfruchtbarkeit zu untersuchen. Die Verwendung von Integrinen als diagnostische Mittel um die Empfänglichkeit des Uterus zu untersuchen, erweist sich als ausgesprochen wertvoll bei der Identifizierung von betroffenen Individuen und fördert das Verstehen der Etiologie von Unfruchtbarkeit, die mit milden Formen von Endometriose einhergeht.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die vorliegende Erfindung ist gerichtet auf ein Verfahren zur Messung von β_3 Integrin in einer Endometrium-Probe umfassend:

a. In Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, wobei die Probe ein nullipares Endometrium ist, das aus dem Menstruationszyklus-Tag 20 bis 24 ausgewählt wurde; und
b. Nachweisen von β_3 Integrin in Probe.

[0010] Das Verfahren ist nützlich bei der Vorhersage von Endometriose.

[0011] Die Verfahren zur Vorhersage von Endometriose umfassen, Erlangen einer Endometrium-Probe die aus Menstruationszyklus-Tag 20 bis 24 ausgewählt wurde, Identifizieren der Endometrium-Probe als nullipara, in Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, Messen von β_3 Integrin in der Probe, und Korrelieren der Abwesenheit von β_3 Integrin mit Endometriose, wobei das Endometrium als milde/minimale Endometriose identifiziert wurde. Die vorliegende Erfindung ist außerdem nützlich zum Vorhersagen von Endometriose in der allgemeinen, unfruchtbaren weiblichen Bevölkerung.

[0012] Die Verfahren der Verwendung von monoklonalen Antikörpern für β_3 Integrin um Endometriose vorherzusagen umfassen, Erlangen einer Endometrium-Probe die aus Menstruationszyklus-Tag 20 bis 24 ausgewählt wurde, in Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, Messen von β_3 in der Probe, und Korrelieren der Abwesenheit von β_3 mit Endometriose, wobei das Endometrium als nullipara oder milde/minimale Endometriose aufweisend identifiziert wurde.

[0013] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist außerdem nützlich beim Nachweisen der Empfänglichkeit des Endometriums für Embryoimplantation durch Nachweisen der β_3 Untereinheit des α_v/β_3 Integrins im Endometrium mit einem monoklonalen Antikörper.

[0014] Das Verfahren der Erfindung ist außerdem nützlich beim Diagnostizieren von Fruchtbarkeit und Überwachen der Reifung des Endometriums in einem Säugetier durch Überwachen des Auftauchens der β_3 Untereinheit von Integrin im Endometrium von einer Mehrzahl von Stadien des Endometriumzyklus. Dies erfolgt vorzugsweise mit einem monoklonalen Antikörper.

[0015] Das Verfahren der Erfindung ist außerdem nützlich beim Nachweisen des optimalen Fensters für die Embryoimplantation in das Endometrium durch Nachweisen der β_3 Untereinheit von Integrins in einer Endometrium-Probe, vorzugsweise mit einem monoklonalen Antikörper.

[0016] Diese und andere Aspekte der Erfindung werden durch die folgende detaillierte Beschreibung offensichtlicher werden, wenn sie zusammen mit den folgenden Figuren betrachtet werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0017] **Fig.** 1 zeigt eine Immunperoxidasefärbung von normalem Endometrium. Die Mikrophotographie zeigt das Verteilungsmuster für sechs verschiedene Integrine, die sich nicht während des Menstruationszyklus zu verändern scheinen. Dunkle Bereiche stellen positive Färbung dar, helle Bereiche stellen Fehlen von Farbe dar (Fehlen der spezifischen Integrinuntereinheit).

[0018] Immunhistochemische Färbung der Collagen/Lamininrezeptor-Untereinheiten: α_2 (A), α_3 (B), α_6 (C), und β_4 (D) zeigt herausragende Färbung des Epithets (←) und von Mikrogefäßen (←) ohne bedeutsame stromale Färbung (*) für α_2, α_3, und β_4. Man beachte die basolaterale Färbung für α_6 und basale Färbung für β_4. Färbung für Fibronectinrezeptor-Untereinheiten α_4 (E) ist im proliferativen Stadium nicht vorhanden, α_5 (F) zeigt herausragende Mesenchymfärbung (*) mit verringerter epithelialer Färbung (←). Die Immunreaktionen (Bereiche von dunkler Färbung) wurden durch Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex entwickelt unter Verwendung von Diaminobenzidin als ein Chromogen. Für höhere Sensitivität wurde keine Gegenfärbung angewandt. Vergrößerung: 125X.

[0019] **Fig.** 2 zeigt Mikrophotographien der immunhistochemischen Färbung für die Integrinuntereinheit α_1 in proliferativem im Vergleich zu sekretorischem Endometrium. Die Färbung war im glandulärem Epithel (←) in der proliferativen Phase (A) weitgehend nicht vorhanden, und deutlich in allen Schnitten nach Menstruationszyklustag 14 (B; Tag 20 Endometrium). Die Färbung der Mikrogefäßversorgung (←) war ebenfalls deutlich und veränderte sich während des Menstruationszyklus nicht. Die Färbung, die in sekretorischen Drüsen des Endometriums bemerkt wurde, war signifikant stärker als die des Hintergrunds (C). Vergrößerung: 125X.

[0020] **Fig.** 3 zeigt Immunfärbung von α_1 und β_3 (den zwei paarenden Untereinheiten des Vitronectinrezeptorintegrins) in proliferative Phase im Vergleich zu sekretorische Phase Endometrium. Die Intensität der Färbung

von α_v in der proliferativen Phase (A) wurde als „+" für stromale Zellen (*) bewertet und „±" für glanduläres α_v (←). Immunfärbung auf α_v in Tag 22 Endometrium (B) zeigt einen signifikanten Anstieg in glandulärer Färbung (Beispiel von „++" Färbungsintensität). Ebenso war die Färbung auf β_3 in proliferativem Epithel nicht vorhanden (C; ←) und war merklich erhöht in diesem Tag 22 sekretorischem Endometrium (D). Vergrößerung: 125X.

[0021] Fig. 4 zeigt die relative Intensität der Färbung für die epithelialen α_v und β_3 Untereinheiten in 35 Endometrium-Proben durch den ganzen Menstruationszyklus hindurch. Das Expressionsmuster für α_v , in A gezeigt, es zeigt einen allmählichen Anstieg in der Färbung während des Menstruationszyklus. Im Gegensatz dazu zeigt das Muster für β_3 einen steileren Anstieg dieser Integrinuntereinheit um Tag 20 des Menstruationszyklus herum. Proben wurden entsprechend des letzten Menstruationszyklus in Stadien eingeteilt. Schnitten wurde eine Bewertungszahl bzw. Score von 0 (–; negativ), 1 (.±.; schwach), 2 (+; mittel) oder 3 (++; stark) durch einen Blindbeobachter zugewiesen und durch einen zweiten Beobachter bestätigt.

[0022] Fig. 5 zeigt die Färbungsintensität von epithelialem β_3 in 12 Unfruchtbarkeitspatienten mit verzögerter Endometriumreifung. Endometrium wurde von Frauen gesammelt, die sich einer Untersuchung auf Unfruchtbarkeit unterzogen. Die Biopsien wurden in zwei Gruppen aufgeteilt basierend auf der Korrelation zwischen histologischen Kriterien und der Menstruationszyklusdatierung, basierend auf der Ovulationszeit und/oder der nachfolgenden Menstruationsperiode. Patienten mit Endometriumbiopsien, die 3 Tage oder mehr „phasenverschoben" waren (OOP Gruppe) wurden mit 25 Endometriumbiopsien, die „in Phase" waren (normal) verglichen und in A gezeigt. Schnitten wurde ein Score von 0 (-; negativ), 1 (±; schwach), 2 (+; mittel) oder 3 (++; stark) zugewiesen, basierend auf der Intensität der epithelialen β_3 Färbung. Beispiele für immunhistochemische Färbung einer „phasenverschobenen" Biopsie (B) und einer normalen „in Phase" Probe (C) sind enthalten, um die epitheliale β_3 Färbung in jeder Gruppe gegenüberzustellen. Vergrößerung: 400X.

[0023] Fig. 6 zeigt eine Immunblotanalyse von proliferativem und sekretorischem Endometrium, angefärbt auf die β_3 Untereinheit. (A) Der Immunblot von Thrombocytenextrakt (Bahn 1), verglichen mit Proben aus der frühen und mittleren proliferativen Phase (Bahn 2, 3) und aus der lutealen Phase (Bahn 4 und 5; Tage 23 beziehungsweise 26) zeigt eine Bande bei ungefähr 95 kDa Molekulargewicht, übereinstimmend mit β_3. Endometrium-Proben wurden partiell mit Collagenase verdaut und die glandulären Elemente (B) wurden unter Verwendung einer Modifikation der Verfahren von Satyaswaroop et al., "Isolation and Culture of Human Endometrial Glands", J. Clin. Endocr. Metab. 1979, 48: 639 erhalten. Die Drüsen erscheinen als hohle Strukturen frei von umgebendem Stroma. Immunfluoreszenz der Proben von Bahnen 3 und 4 (C beziehungsweise D) entspricht dem Fehlen oder der Anwesenheit der 95 kDa Bande in A. Vergrößerung: 400X.

[0024] Fig. 7 ist ein Streuungsdiagramm, das die immunhistochemische Färbung für die β_3 Integrinuntereinheit in Endometrium-Proben von Tag 1 bis 28 des Zyklus zeigt. Alle Proben wiesen eine bekannte Endometriumdatierung auf und keine war histologisch phasenverschoben.

[0025] Fig. 8 zeigt eine Immunfärbung für die β_3 Untereinheit des $\alpha_v\beta_3$ Vitronectinrezeptors. Epithelzellen des Endometriums (Pfeilspitzen) machten Veränderungen in β_3 Expression während des ganzen Menstruationszyklus durch. Proben wurden erhalten aus der proliferativen Phase (A), frühen sekretorischen Phase (B; Tag 18) und aus der mittleren sekretorischen Phase (C; Tag 22). Eine Endometriumbiopsie von einem Patienten mit milder Endometriose (D) wies keine epitheliale Färbung von β_3 auf, obwohl sie als „normal, in Phase Tag 22–23" nach histologischen Kriterien beurteilt worden war. Die Immunreaktionen (Bereiche von brauner Färbung) wurden durch den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex entwickelt, unter Verwendung von Diaminobenzidin als ein Chromogen. Gefäßelemente (Sterne) färbten sich positiv für die β_3 Untereinheit in allen Proben. Für einen besseren Kontrast wurden die Schnitte mit Methylgrün gegengefärbt. Grüne Färbung bedeutet das Fehlen von β_3 Expression. Die Muster der Färbung in A und B entsprechen histochemischen Bewertungszahlen bzw. HSCOREs von 0 und in „C" einem HSCORE von 2,6. Vergrößerung 200X.

[0026] Fig. 9 ist ein Vergleich von Immunfärbungsergebnissen für endometriales β_3 Integrin in normalen fruchtbaren Kontrollen (Kontrolle; n = 20), unfruchtbaren Frauen mit Endometriose und vorherigen Geburten (para; n = 28) und nullipara unfruchtbaren Frauen mit Endometriose (nullipara; n = 76). Der ungepaarte T-Test vergleicht den Mittelwert von zwei Gruppen und bestimmt die Wahrscheinlichkeit, dass der beobachteten Unterschied zufällig auftritt; der Zufall ist als p-Wert angegeben. Unter Verwendung des ungepaarten T-Tests war der Gesamt-HSCORE in der letztgenannten Gruppe signifikant niedriger im Vergleich mit jeder der anderen beiden. Der HSCORE wurde berechnet wie beschrieben.

[0027] Fig. 10 zeigt die Verteilung der α_4 und β_3 Integrinuntereinheiten während des normalen Menstruationszyklus. Man beachte, dass die Co-Expression von beiden Untereinheiten dem putativen Implantationsfenster

entspricht, Tage 6 bis 9 nach Ovulation).

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0028] Die vorliegende Erfindung ist gerichtet auf ein Verfahren zur Messung von β_3 Integrin in einer Endometrium-Probe umfassend:

a. In Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, wobei die Probe ein nullipares Endometrium ist, das aus dem Menstruationszyklus-Tag 20 bis 24 ausgewählt wurde; und
b. Nachweisen von β_3 Integrin in Probe.

[0029] Das Verfahren ist nützlich bei der Vorhersage von Endometriose. Verfahren zur Verwendung von monoklonalen Antikörpern für β_3 Integrin liegen ebenfalls im Schutzbereich der Erfindung.

[0030] Die Erfindung stellt eine Vorhersage von Endometriose bereit unter Verwendung einer Probe, die aus Endometrium von Menstruationszyklus-Tag 20 bis 24 ausgewählt wurde, Identifizieren der Endometrium-Probe als nullipara, in Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, Messen von β_3 Integrin in der Probe, und Korrelieren der Abwesenheit von β_3 Integrin mit Endometriose, wobei das Endometrium als milde/minimale Endometriose identifiziert wurde. Die Endometrium-Probe wird vorzugsweise aus den Menstruationszyklus-Tagen 20 bis 24, weiter bevorzugt aus den Menstruationszyklus-Tagen 20 bis 23 und noch weiter bevorzugt aus Menstruationszyklus-Tag 22 ausgewählt. Zyklustage 20–24 entsprechen den Tagen 6–10 nach Ovulation. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist außerdem nützlich bei der Vorhersage von Endometriose in der allgemeinen, unfruchtbaren weiblichen Bevölkerung.

[0031] Das Verfahren der Erfindung, das monoklonalen Antikörpern für β_3 Integrin verwendet, um Endometriose vorherzusagen, umfasst Erlangen einer Endometrium-Probe, in Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, Messen von β_3 in der Probe, und Korrelieren der Abwesenheit von β_3 mit Endometriose, wobei das Endometrium als nullipara oder milde/minimale Endometriose aufweisend identifiziert wurde.

[0032] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung beinhaltet, wenn es zum Nachweisen der Empfänglichkeit von Säugetier-Endometrium verwendet wird, Erlangen einer Endometrium-Probe, in Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper für die β_3 Untereinheit des Integrins und Nachweisen der β_3 Untereinheit.

[0033] Für Zwecke der vorliegenden Erfindung kann die β_3 Untereinheit, β_3 allein oder in Kombination mit einer anderen Integrinuntereinheit, zum Beispiel α_v sein.

[0034] Wie hierin verwendet, ist Integrin definiert als eine mannigfaltige Klasse von Glycoproteinrezeptoren, die auf der Zellmembran exprimiert wird. Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Überfamilie. Integrine sind zusammengesetzt aus heterodimeren α und β Untereinheiten und sind an der Zell-Zell- und an der Zell-extrazelluläre Matrix-Adhäsion beteiligt. Die Integrinfamilie ist eine weit verbreitete Gruppe von Rezeptoren, die aus nicht-kovalent verbundenen α/β Heterodimerpaaren zusammengesetzt ist, die Leukocyten-Leukocyten und Leukocyten-Endothelzellen-Adhäsion vermitteln, wie auch zelluläre Wechselwirkungen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie Collagen, Laminin, Fibrinogen und Fibronectin, und Zell-Zell-Wechselwirkungen in organisierten Geweben.

[0035] Während Integrine auf praktisch allen Zelltypen gefunden werden (mit Ausnahme von Roten Blutzellen), variiert die Expression der Integrinuntereinheiten von Zelltyp zu Zelltyp. In menschlichem Endometrium des Uterus, wie hierin ermittelt, exprimieren glanduläre Epithelzellen hauptsächlich α_2, α_3 und α_6 Integrinuntereinheiten, die Collagen- Lamininrezeptoren sind. Stromale Zellen exprimieren überwiegend α_5, einen Fibronectinrezeptor. Die Anwesenheit von α_1 auf glandulären Epithelzellen ist Menstruationszyklus-spezifisch, es wird nur während der sekretorischen Phase gefunden. Die Expression von beiden Untereinheiten des Vitronectinrezeptors, α_v/β_3, macht ebenfalls Menstruationszyklus-spezifische Änderungen auf endometrialen Epithelzellen durch. Die Expression von α_v erhöht sich durch den ganzen Menstruationszyklus hindurch, währenddessen die β_3 Untereinheit plötzlich am Menstruationszyklustag 20 auf luminalen und glandulären Epithelzellen erscheint. Es wurde außerdem ermittelt, dass die α_4 Expression am Tag 23 abgeschaltet wird. Untersuchen der Expression von β_3 mit dem monoklonalen Antikörper SSA6 zeigte β_3 Expression von Tag 20 in den Zyklus hinein an. α_4 Expression beginnt am Tag 14 und wird nicht länger nach Tag 23 exprimiert, wie durch Untersuchen auf α_4 mit monoklonalem Antikörper B5G10 bestimmt wurde, bereitgestellt durch Martin Hemler, Dana Farber Cancer Center, Boston, MA. Des Weiteren wurde gemäß der vorliegenden Erfindung entdeckt, dass α_4 und β_3

Expression zwischen den Tagen 19–21 überlappen, dem Implantationsfenster.

[0036] Als Ergebnis, wie gesehen in **Fig.** 10, definieren Integrine das Implantationsfenster in der fruchtbaren Frau im fortpflanzungsfähigen Alter. Diese Zelladhäsionsmoleküle werden um die Zeit der Implantation herum dynamisch reguliert und dienen als hervorragende Markerproteine für diese Zeit des Menstruationszyklus. Wie in **Fig.** 10 gezeigt, fällt die Co-Expression von α_4 und β_3 (die zwei unterschiedliche Integrinarten repräsentieren) präzise mit dem bekannten Implantationsfenster zusammen (Tage 6–9 nach Ovulation, basierend auf der Arbeit von Hertig et al., 1956 and Navot et al., 1992). Im Gegensatz zum β_3 Integrin, das bei zahlreichen Frauen mit Unfruchtbarkeit gestört zu sein scheint, ist das α_4 nicht gestört. Während der Prozess der Implantation wahrscheinlich viele verschiedene Proteine oder Faktoren umfassen wird, wie die Co-Expression von zwei verschiedenen Integrinen wie α_4 und β_3, scheint der Verlust einer einzelnen Einheit wie β_3, ausreichend zu sein für den Verlust der Fruchtbarkeit, der in diesen Patienten mit Endometriose beobachtet wird.

[0037] Ein Endometrium, wie hierin erwähnt, ist ein Endometrium des Uterus eines Säugetiers. Die Uteruswand ist weitgehend glatte Muskulatur oder Myometrium. Das Endometrium, eine glanduläre Schicht von variabler Dicke, extrem sensitiv auf die Hormone Estrogen/Progesteron, kleidet das Myometrium aus. Das Endometrium besteht aus mehreren funktionellen Schichten. Die Schicht, die am nächsten zum Myometrium liegt, wird die Basalisschicht genannt und die Schicht, die näher an der Oberfläche liegt, ist als die Funktionalis bekannt. Dieses Gewebe ist aus Epithelzellen, stromalen (oder mesenchymalen) Zellen und endometrialen Leukocyten hergestellt. Die Epithelzellen sind entweder glandulär (Drüsen bildend unterhalb der Oberfläche des Endometriums) oder luminal (die Oberfläche des Endometriums auskleidend). Diese unterschiedlichen Arten des Epithels dienen unterschiedlichen Zwecken und die Färbungsmuster für verschiedene Markerproteine sind bei glandulärem und luminalem nicht immer gleich. Es ist die luminale Oberfläche, die dem menschlichen Embryo zuerst begegnen würde und von ihr wird angenommen, dass sie an der anfänglichen Anheftung beteiligt ist. Das Endometrium von Mädchen vor der Menopause und Frauen nach der Menopause ist wegen des Fehlens der Hormone Estrogen und Progesteron atrophisch. In der Frau im fortpflanzungsfähigen Alter macht das Endometrium zyklische Entwicklungsänderungen durch, basierend auf dem Ovarzyklus der Hormonfreigabe. Der erste Tag der Menstruation ist der erste Tag des Zyklus; die Menstruation ist im Allgemeinen am Tag 5 beendet. Das Wachstum des Endometriums wird dann unter dem Einfluss von Estrogen wieder aufgenommen und schreitet durch Tag 14 hindurch fort, proliferative Phase, und weiter bis ungefähr Tag 28. Von Tag 14 bis Tag 28 zeigt das Endometrium auch Zeichen vermehrten Drüsenwachstums und Sekretion, sekretorische Phase, weitgehend zurückzuführen auf den Einfluss von Progesteron. Während der follikulären Phase, während Follikel im Ovar wachsen und Estrogen das bestimmende Hormon ist, wird das Endometrium dicker. Mit der Ovulation (typischerweise Tag 14 eines 28 Tage Zyklus) wird die Frau Estrogen und Progesteron ausgesetzt. Dies wird die sekretorische oder luteale Phase genannt und sie ist bekannt für eine stereotype Reihe von histologischen Veränderungen, die fortschreiten während der Zyklus sich fortsetzt. Diese histologischen Veränderungen werden von Pathologen verwendet, um das Endometrium zu datieren, ein Verfahren das umstritten bleibt, trotz seiner Anwendung über die letzten 40 Jahre. Es wurden keine verlässlichen immunhistochemischen Marker gemeldet, die nachweisbaren Nutzen beim Datieren des Endometriums aufweisen.

[0038] Dysfunktion der lutealen Phase (LPD) ist ein Begriff für die Entwicklungsverzögerung des Endometriums. Sie ist eine bekannte Ursache für Unfruchtbarkeit, wegen der Asynchronität zwischen dem befruchteten Ei und dem Endometrium. Wenn ein Embryo bereit ist, sich anzuheften aber das Endometrium verzögert ist, wird eine Schwangerschaft wahrscheinlich nicht auftreten. Die Ursachen für LPD können unzureichende Hormonausschüttung durch das Ovar einschließen, und können in Zusammenhang stehen mit gestörter Signalgebung von höheren Zentren, wie unzureichende Ausschüttung von Keimdrüsen stimulierenden Hormon aus der Hypophyse oder dem Hypothalamus. LPD ist eine bekannte Ursache für Unfruchtbarkeit und spontane Fehlgeburt und kann durch Hormonzusatz korrigiert werden.

[0039] Die Embryoimplantationsstadien schließen ein: Apposition – wenn die Epithelzellen des Embryos sich an die äußeren (luminalen) Epithelzellen der mütterlichen Endometriumoberfläche anheften; Adhäsion; und Invasion des Trophoblasten in das darunter liegende Stroma, wo er sich einnistet und anfängt zu wachsen. Kontakt mit mütterlichen Blutgefäßen wird hergestellt, um Nährstoffe und mit Sauerstoff angereichertes Blut zu erhalten und sich von Abfallstoffen zu befreien während des Invasionsstadiums. Das Entwicklungsstadium, das der Embryo zur Zeit der Implantation erreicht, ist das Blastocystenstadium, das zur gleichen Zeit auftritt wie das Hatching. Es gibt Anzeichen dafür, dass Hatching erforderlich ist bevor Implantation auftritt, vielleicht weil die Epithelzellen des Embryos freigelegt sein müssen (aus der Zona Pellucida Hülle) um mit den mütterlichen Zellschichten zu wechselwirken. Wie hierin dargelegt, findet diese Wechselwirkung über Integrine statt.

[0040] Für Zwecke der Erfindung wird Endometriose definiert als ein ektopisches Auftreten von Endometri-

umgewebe, das häufig Zysten bildet, die veränderte Rote Blutzellen enthalten. Endometriosestadien sind von der Amerikanischen Gesellschaft für Fertilität, AFS, eingeführt worden. American Fertility Society: Revised American Fertility Society Classification of Endometriosis: 1985. Fertil Steril 1985; 43: 351–352. Die AFS definiert Stadium I Endometriose als mild und Stadium II Endometriose als minimal.

[0041] Wie dargelegt in der vorliegenden Erfindung, wird Unfruchtbarkeit definiert als verringerte oder fehlende Fruchtbarkeit, so dass ein weibliches Säugetier adäquate anatomische Strukturen und ungewisse Funktion aufweist, mit der Möglichkeit einer Schwangerschaft, die nicht bis zur Niederkunft fortschreiten könnte. Nullipara schließt ein, ist aber nicht beschränkt auf, Endometrium eines weiblichen Säugetiers, das keine Nachkommen geboren hat. Nullipara schließt Frauen ein, die Nachkommen empfangen haben aber nicht über die 20te Schwangerschaftswoche hinaus ausgetragen haben, anstatt erlitten sie eine spontane Fehlgeburt. Para wird gemäß der vorliegenden Erfindung definiert als Junge geboren habend, lebend oder tot, nach einer Schwangerschaft von 20 Wochen und einem Gewicht von 500 Gramm für Menschen. Entsprechende Schwangerschaftslängen und Gewichte sind auf andere Säugetiere anwendbar, so dass sie vergleichbar sein würden mit jenen, die für Menschen dargelegt wurden.

[0042] Für Zwecke der gegenwärtigen Erfindung schließen Säugetiere ein, sind aber nicht beschränkt auf die Ordnung Nagetiere, wie Mäuse; die Ordnung Hasenartige, wie Kaninchen; weiter insbesondere die Ordnung Raubtiere, einschließlich Felidae (Katzen) und Canidae (Hunde); noch weiter insbesondere die Ordnung Paarzehige Huftiere, Bovidae (Rinder) und Suidae (Schweine); und die Ordnung Unpaarzehige Huftiere, einschließlich Equidae (Pferde); am meisten insbesondere die Ordnung Herrentiere, Coboidae und Simiae (Affen) und Menschenartige (Menschen und Menschenaffen). Die Säugetiere der am meisten bevorzugten Ausführungsformen sind Menschen. Monoklonale Antikörper, die in der Ausführung der Erfindung verwendbar sind, schließen alle monoklonalen Antikörper ein, die eine Affinität zu oder Bindung an die β_3 Untereinheit von Integrin aufweisen. Ein Beispiel für einen solchen Antikörper ist SSA6. Der monoklonale Antikörper SSA6 kann hergestellt werden wie beschrieben durch Bennett et al., PNAS 1983, 80: 2417 und Brass et al., J. Biol. Chem. 1985, 260: 7876.

[0043] Monoklonale Antikörper, die β_3 kombiniert mit einer anderen Integrinuntereinheit erkennen, können ebenfalls verwendet werden. Ein solcher monoklonaler Antikörper ist 23C6, der hergestellt werden kann gemäß des Verfahrens von Davies et al., J. Cell Biol. 1989, 109: 1817. Immunfärbung mit monoklonalen Antikörpern wie 23C6 (spezifisch für das intakte α_v/β_3, d. h. dem Vitronectinrezeptor) ruft das gleiche Muster hervor wie SSA6, der nur die β_3 Untereinheit misst. Dies zeigt, dass während α_v spezifische Antikörper alle die α_v enthaltenden Integrine messen, Antikörper, die das intakte α_v/β_3 Integrin oder die β_3 Untereinheit erkennen, dazu verwendet werden können, dieses Integrin (der α_v/β_3 „Vitronectinrezeptor") zu studieren.

[0044] Andere monoklonale Antiköper können verwendet werden. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern ist dem Fachmann bekannt. Insbesondere kann das Verfahren von Köhler and Milstein, Nature 1975, 256: 495 verwendet werden, um monoklonale Antikörper zur Verwendung in der Erfindung herzustellen.

[0045] Verfahren zum Erhalten von Endometrium-Gewebeproben zur Analyse schließen jede chirurgische und nicht-chirurgische Technik ein, die im Stand der Technik bekannt ist. Chirurgische Verfahren schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Biopsie, Dilatation und Ausschabung. Nicht-chirurgische Verfahren schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Spülungen des Uterus und Abbürsten des Uterus mit immuncytochemischer Auswertung.

[0046] Verfahren zum Nachweisen von β_3 im Endometrium schließen alle Verfahren zur Identifizierung von Glycoproteinen, die im Stand der Technik bekannt sind, ein. Die Verfahren schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, immunhistochemische Techniken wie Immunblotten oder Westernblotten, Immunperoxidasefärbung, Fluoresceinmarkierung, Diaminobenzidin und Biotinylierung.

[0047] Im Allgemeinen erfordert Immunhistochemie das Färben von Gefrierschnitten von Gewebeproben. Wie hierin verwendet, können Endometrium-Proben bis zu 4–8 µm dick gefriergeschnitten werden. Endometrium wird mit einem primären Antikörper, wie SSA6, in Kontakt gebracht, gefolgt durch Kontakt mit einem sekundärem Antikörper, wie biotinyliertem Ziegen anti-Maus-Antikörper. Das Endometrium wird dann in Avidin-konjugiertem Meerrettichperoxidase-Makromolekularkomplex inkubiert, gefolgt von Inkubation mit Chromogen, wie Diaminobenzidin. Fluorescein kann dann hinzugefügt werden um die Integrinverteilung zu beobachten.

[0048] Immunblotten schließt die Analyse von Protein, hier Integrin, auf Natrimdodecylsulphat-Polyacryla-

mid-gelelektrophorese ein, SDS-PAGE. Das Gel wird unter nicht-reduzierenden Bedingungen gefahren und die Proben werden auf beispielsweise eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wird in Medium, das primären Antikörper wie SSA6 enthält, inkubiert. Der Filter wird unter Verwendung eines sekundären Antikörpers, wie alkalische Phosphatasekonjugierter Ziegen anti-Maus-Antikörper, entwickelt.

[0049] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung umfasst, wenn es zur Vorhersage von Endometriose verwendet wird, Erlangen einer Endometrium-Probe, Identifizieren der Endometrium-Probe als nullipara, in Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, Messen von β_3 Integrin in der Probe, und Korrelieren der Abwesenheit von β_3 Integrin mit Endometriose, wobei die Endometriose milde/minimale Endometriose ist.

[0050] Das Verfahren der Erfindung kann auch zur Vorhersage von Endometriose verwendet werden und umfasst, Erlangen einer Endometrium-Probe, Identifizieren der Endometrium-Probe als nullipara, in Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, Messen von β_3 Integrin in der Probe, und Korrelieren der Abwesenheit von β_3 Integrin mit Endometriose, wobei das Endometrium als milde/minimale Endometriose identifiziert worden ist.

[0051] Das Verfahren kann auch zum Nachweis des Fensters für die Embryoimplantation im Endometrium eines Säugetiers verwendet werden und sind ebenfalls innerhalb des Schutzumfangs der Erfindung. Wie hier bestimmt, erscheint die β_3 Untereinheit des Integrins am Tag 20 des Menstruationszyklus. Es wird hierin ebenfalls bestimmt, dass α_v/β_3 auf endometrischem Epithel Fibronectin, Vitronectin und Osteopontin bindet. Diese Moleküle können eine Brücke zwischen dem α_v/β_3 Integrin des Endometriums und dem Embryo bereitstellen. Des Weiteren weisen Patienten mit Dysfunktion der lutealen Phase verzögerte Endometriumreifung, Unfruchtbarkeit und negative Färbung für β_3 am Tag 20 bis 24 auf. Daher kann die optimale Zeit für Fertilität bestimmt werden durch wiederholtes Testen von Endometrium-Proben in einer Mehrzahl von Stadien im Menstruationszyklus. Als solches ist das Suchen nach α_v/β_3 für ein Verfahren zur Diagnose von Unfruchtbarkeit und zum Nachweis des Fensters für Embryoimplantation im Endometrium verwendbar. Das Implantationsfenster ist die Zeit in der das Endometrium des Uterus für Embryoimplantation zur Verfügung steht. Dieses Fenster ist vorzugsweise von Tag 19 bis Tag 23, und weiter bevorzugt Tag 20 des menschlichen Menstruationszyklus, gekennzeichnet durch die Expression von α_v/β_3 Integrin.

[0052] Ähnlich Zyklen sind für andere Säugetiere bekannt- es liegt innerhalb der normalen Sachkenntnis die vorhergehende Methodik an solche Zyklen anzupassen.

[0053] Die vorliegende Erfindung ist außerdem hilfreich bei Verfahren der in vitro Fertilisation. Sobald die β_3 Untereinheit des Integrins in einem für Schwangerschaft ausgewähltem Tier nachgewiesen wird, kann ein befruchtbares Ei (oder Eier) vom gleichen oder einem anderen Tier in den Uterus eingesetzt werden um eine Schwangerschaft zu begründen. Das Ei und passendes Sperma werden kombiniert um eine Zygote in vitro herzustellen. In vitro Fertilisation kann in einer Petrischale, in einem Teströhrchen oder dergleichen stattfinden. Zusätzlich kann in vitro Fertilisation auch das unabhängige Zufügen von Eiern und Sperma zu den Eileitern bezeichnen, so dass die Zygote darin gebildet wird. Auf jeden Fall wird die Zygote in den Uterus des Tieres, das für eine Schwangerschaft ausgewählt wurde, eingeführt und auf die Implantation in das Endometrium der Uteruswand des Tieres hin überwacht.

[0054] Pharmazeutisch akzeptable Träger schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf, Vaginalzäpfchen, Intrauterinvorichtungen (IUD), Gele wie langsam wirkende Formulierungen, zum Beispiel Depotformen von Hormonen- Mikrokristalle, die injiziert und langsam in den systemischen Kreislauf abgegeben oder in Silikon-Elastomer-Schläuchen (engl.: „silastic tubing") bereitgestellt werden. Verhütend wirkende Formulierungen würden in ungefähr 10 µg/ml verabreicht werden.

[0055] Das Verfahren der Erfindung ist anwendbar in Verfahren zum Überwachen der Endometriumreifung. Das Endometrium kann auf Embryoempfänglichkeit, Embryoimplantation, Unfruchtbarkeit, Endometriumauffüllung und Ovulation hin überwacht werden.

[0056] Diagnostische Kits können bereitgestellt werden, die monoklonale Antikörper zum schnellen Nachweisen von β_3 in Lösung enthalten; eine absorbierende Nachweisvorrichtung, die vorher absorbierten Antikörper gegen β_3 enthält und auf die Uterusspülungen aufgetragen werden können; einen Entwickler um β_3 sichtbar zu machen, wenn es vorhanden ist.

[0057] Obwohl das regulatorische Signal für die Induktion des Endometriumintegrins am Tag 19 bis 20 noch

nicht gesichert ist, ist als ein Ergebnis der vorliegenden Erfindung bekannt, das peritoneale Flüssigkeit bioaktive Agenzien enthält, die in Bezug zu stehen scheinen zur gestörten Integrinexpression in Frauen mit Unfruchtbarkeit und Endometriose. Bioaktive Bestandteile mit einem abnormalen peritonealen Milieu können zu einem Zusammenbruch in der parakrinen Kommunikation zwischen Endometriumzellen innerhalb des Uterus führen. Kandidaten umfassen den Interleukin-1β-Rezeptorantagonist, erhöht bei Frauen mit milder und minimaler Endometriose und von dem kürzlich gezeigt wurde, dass er die Implantation in einem Nagetiermodel stört, Simon, C., et al., Annual Meeting of the American Fertility Society, Montreal, S2-Abst O-3, 1993. Offene oder nicht-blockierte Eileiter können eine Voraussetzung für Endometriose-vermittelte Wirkungen von endometrialem β_3 Integrin sein.

[0058] Die vorliegende Erfindung wird in den folgenden Beispielen weiter beschrieben. Diese Beispiele sollten nicht so ausgelegt werden, dass sie den Schutzumfang der angefügten Ansprüche begrenzen.

BEISPIELE

Menschliche Proben

[0059] Endometrium wurde von 35 Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter zur Zeit einer Hysterektomie erhalten. Gewebe wurde von der frühen proliferativen Phase (Tag 5) hindurch bis zur späten sekretorischen Phase (Tag 28) erhalten und alle Hysterektomien wurden wegen gutartiger Erkrankung durchgeführt. Endometriumbiopsien wurden an Frauen als Teil ihrer Untersuchungen für Unfruchtbarkeit durchgeführt. Alle Patienten hatten einen normalen Zyklus und keine hatte Hormone erhalten für mindestens 3 Monate vor der Operation. Datierung des Endometriums wurde gemäß der Kriterien von Noyes et al., "Dating the Endometrium", Fertil. Steril. 1950, 1: 3 eingeschätzt. Endometriumbiopsien wurden im Zusammenhang der zeitlichen Steuerung der Ovulation und/oder des Einsetzens der nächsten Menstruationsperiode bewertet. Proben wurden als „phasenverschoben" beurteilt, wenn die histologische Datierung um 3 oder mehr Tage relativ zum vorhergesagten Tag des Menstruationszyklus verzögert war. Proliferatives Endometrium wurde basierend auf Histologie und auf der letzten Menstruationsperiode eingeteilt. Proben wurden auf Eis zum Labor transportiert und auf Trockeneis schockgefroren und bei –70°C gelagert.

Antikörper

[0060] Monoklonale Antikörper (Mabs) P1H5, P1B5, P1D6 spezifisch für α_2, α_3, beziehungsweise α_5 Untereinheiten wurden von Dr. Elizabeth Wayner und Dr. William Carter erhalten. Mabs TS2/7 und B-5H10, gerichtet gegen die α_1, beziehungsweise α_4 Untereinheiten, wurden von Dr. Martin Hemler erhalten. GoH3, ein spezifischer Mab, gerichtet gegen α_6, wurde von Dr. Arnoud Sonnenberg erhalten. Mab SSA6, spezifisch für die β_3 Untereinheit, wurde von Dr. Joel Bennett und Dr. James Hoxie erhalten. Mab LM142 gegen α_v, wurde von Dr. David Cheresh erhalten. Der α_4 Antikörper wurde von Dr. Steven Kennel erhalten. Der 23C6 Antikörper, der β_3 angeheftet an α_v erkennt, wurde Michael Horton bekommen.

Immunhistochemie

[0061] Immunperoxidasefärbung wurde auf Kryostatschnitten durchgeführt von Endometrium-Proben durch den ganzen Menstruationszyklus hindurch. Serielle Gefrierschnitte, 4–8 µ dick, wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern platziert, in –20°C Aceton für 10 Minuten fixiert und angefärbt unter Verwendung von Vectastain Elite® ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.). Diaminobenzidin (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) wurde als das Chromogen verwendet. Primärer Antikörper wurde auf den Gefrierschnitten nach Blockieren mit 1% Rinderserumalbumin in PBS platziert, und für 1 Stunde bei Raumtemperatur binden gelassen. Ein Spülen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pH 7,2 bis 7,4 wurde gefolgt von sekundärem Antikörper, bestehend aus biotinyliertem Ziege anti-Maus-Antikörper für 30 Minuten. Nach einem Spülen mit PBS wurde die endogene Peroxidase durch eine 30 Minuten Inkubation mit 0,3% H_2O_2 in absolutem Ethanol getilgt, gefolgt durch eine 30 Minuten Rehydrierung in PBS. Avidin : biotinylierter Meerrettichperoxidase-Makromolekularkomplex (ABC) wurde dann auf den Schnitten für 30 Minuten inkubiert, vor Zufügen von Diaminobenzidin für 3 Minuten um die Reaktion zu vervollständigen. Einige Proben wurden mit einer 1 : 200 Verdünnung von Fluorescein-markiertem anti-Maus-Antikörper für 1 Std. behandelt, für Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Proben wurden nachfolgend in PBS gewaschen und präpariert. Die sich ergebende Färbung wurde unter einem Nikon Mikroskop bei geringer (100x) und höherer (400X) Vergrößerung ermittelt, mit oder ohne Fluoreszenz. Färbung wurde als fehlend (-), schwach (±), mittel (+) oder stark (++) beurteilt. Beispiele für jede werden in **Fig.** 3 gezeigt. Mikrophotographien wurden unter Verwendung von Kodak T-Max 100 ASA Film hergestellt.

Integrinverteilung im normalen Epithel

[0062] Die Verteilung von α_2, α_3, α_6 und β_4 Untereinheiten von Integrinen, die hauptsächlich Collagen (Col) und/oder Laminin (LM) erkennen, wird in **Fig.** 1A–D gezeigt. Diese Untereinheiten waren auf glandulärem Epithel (←) durch den ganzen Menstruationszyklus hindurch vorhanden. Ihre Verteilung innerhalb des Endometriums war typisch für die, welche in den meisten Epithelien gesehen wird. Die α_2 und α_3 Untereinheiten waren um die gesamte Peripherie der Zellen herum verteilt, während die α_6 und β_4 Untereinheiten an der basolateralen Oberfläche lokalisiert zu sein schienen, benachbart zur Basalmembran (BM) der Endometriumdrüsen. Die Expression dieser Untereinheiten durch das Mesenchym (*) war weniger deutlich. Während für α_6 auf Stromazellen (**Fig.** 1C) eine mittlere Färbung beobachtet wurde, wurde für β_4 sehr wenig Färbung bemerkt. Die Expression der α_4 und α_5, Untereinheiten von Integrinen, von denen bekannt ist, dass sie Fibronectin binden, (Tabelle 1) war sehr eingeschränkt. Die α_4 Untereinheit war über der Hintergrundfärbung nicht nachweisbar (vergleiche **Fig.** 1E mit **Fig.** 2C) weder im Epithel noch im Mesenchym. Die α_5 Untereinheit (**Fig.** 1F), repräsentativ für den klassischen Fibronectinrezeptor, wurde in den epithelialen Komponenten nicht beobachtet, aber wurde stark exprimiert im Mesenchym, das reich an Fibronectin ist.

TABELLE 1
Verteilung von Integrinen nach Ligandenspezifität
Liganden

	Collagen/Laminin	**Fibronectin/Vitronectin**
	α_1 / β_1	α_4 / β_1
Integrinuntereinheit	α_2 / β_1	α_5 / β_1
	α_3 / β_1	α_v / β_1
	α_6 / β_1	α_v / β_3
	α_6 / β_4	

[0063] Es wurde festgestellt, dass sich die Intensität der Immunfärbung für drei weitere Untereinheiten von Integrinen in einer Menstruationszyklus-abhängigen Weise ändert. Die Immunfärbung für α_1 in der proliferativen Phase (**Fig.** 2A) lag nur leicht über der Hintergrundhöhe (**Fig.** 2C). Die Intensität der Färbung erhöhte sich während der sekretorischen Phase (**Fig.** 2B). Diese intensive Peripheriefärbung wurde auf glandulärem und luminalen Epithel auf allen Proben von Tag 15 bis 28 gefunden. Gleichfalls wurde α_v in der proliferativen Phase schwach exprimiert, sowohl im Epithel als auch im Mesenchym (**Fig.** 3A) und die Färbung verstärkte sich allmählich während der sekretorischen Phase bis zu der Höhe, die in **Fig.** 3B beobachtet wurde. Während der proliferativen Phase war β_3 Färbung nur auf den mesenchymalen Zellen vorhanden (**Fig.** 3C). Verstärkte β_3 Färbung war auf dem Emdometriumepithel nur nach Tag 19 des Menstruationszyklus sichtbar (**Fig.** 3D) sowohl auf dem luminalen als auch auf dem glandulären Epithel, und war ebenfalls in einer perizellularen Verteilung vorhanden. Im Gegensatz dazu, färbte sich die Basalisschicht nicht signifikant an, weder für α_v noch für β_3. Dieses sich ändernde Muster von epithelialem α_v und β_3 durch den Zyklus hindurch wurde in 35 Endometrium-Proben studiert und wird graphisch in **Fig.** 4A und 4B dargestellt.

[0064] Collagen/Lamininrezeptoren (Col/LM) gekennzeichnet durch α_2, α_3 und α_6 wurden gleichmäßig durch den Menstruationszyklus hindurch exprimiert, siehe Tabelle 2. Die perizelluläre Verteilung der α_2 und α_3 Untereinheiten war ausgeprägt unterschiedlich zu der, der α_6 Untereinheit. Charakteristisch für einen Lamininrezeptor, war α_6 auf der basolateralen Oberfläche konzentriert. Die β_4 Untereinheit, die mit α_6 paart, wurde ebenfalls auf der basolateralen Oberfläche von Epithelzellen verteilt gefunden, und ihre Verteilung erschien sogar mehr beschränkt auf den basalen Pol zu sein. Das α_5/β_1 Integrin, ein wichtiger Fibronectinrezeptor, wurde ebenfalls gleichmäßig während des ganzen Menstruationszyklus hindurch exprimiert. Anders als die Collagen- und Lamininrezeptoren war die Verteilung von α_5/β_1 auf das Mesenchym beschränkt.

[0065] Das zeitliche Muster der Verteilung von α_v war verschiedenartig. Immunfärbung wurde zuerst vor der sekretorischen Phase festgestellt mit einem Anstieg in Intensität während des ganzen Zyklus. Eine Untereinheit von der bekannt ist, dass sie mit α_v paart, ist β_3. β_3 ist charakteristischerweise nicht auf Epithelzellen vorhanden. Das plötzliche Auftauchen der β_3 Untereinheit nach Tag 19 legt nahe, dass die Expression des Vitronectinrezeptors im menschlichen Endometrium reguliert wird. Die erhöhte α_v/β_3 Färbung in normalen Zyklen stimmt mit einem Implantationsfenster innerhalb der sekretorischen Phase überein. Während die physiologische Grundlage für das Implantationsfenster vorher nicht festgestellt worden war, deutet eine vorgeschlagene Rolle von Integrinen bei der anfänglichen Wechselwirkung zwischen mütterlichen und embryonalen Zellen auf

eine endometriale Periode der Empfänglichkeit hin.

TABELLE 2
Verteilung von Integrinuntereinheiten in normalem Endometrium während des Menstruationszyklus

Zelltyp	Col/LM					FN/VN			
	α_1	α_2	α_3	α_6	β_4	α_4	α_5	α_v	β_3
epithelial									
proliferativ	○	●	●	●[b]	●[b]	○	○	○	○
früh sekretorisch	●	●	●	●	●	○	○	*	○
spät sekretorisch	●	●	●	●	●	○	○	●	●
stromal									
proliferativ	○	○	○	●	○	○	●	●	●
früh sekretorisch	○	○	○	*	○	○	*	●	●
spät sekretorisch	*	○	○	●	○	○	*	●	●

[b] = basolaterale Verteilung der Färbung

- • + oder ++ Färbung
- * ± Färbung
- o – Färbung

Integrine in gestörtem Endometrium

[0066] Die Anwesenheit der epithelilalen β_3 Untereinheit schien ein konstanter interner Marker für luteale Phasenreifung zu sein, und die zeitliche Steuerung der β_3 Expression stimmte mit der Peri-Implantationsperiode oder dem Fenster der Embryoimplantation überein. Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen in der klinischen Beurteilung von Endometriumbiopsien verwendbar ist, wurde Immunfärben an Endometrium-Proben aus der lutealen Phase durchgeführt, aus Zyklen die Zeichen von Reifungsverzögerung zeigten. Endometrium-Proben von 25 Frauen, bei denen Übereinstimmung von menstrueller und histologischer Datierung vorlag („normal" Gruppe) wurden verglichen mit 12 Biopsien, die als ≥ 3 Tage phasenverschoben (OOP) identifiziert worden waren, basierend entweder auf der Zeit der Ovulation oder der nachfolgenden Regel. Proben wurden auf α_1, α_v und β_3 Untereinheiten angefärbt. Alle Biopsien wurden an Tagen 20 bis 24 des Menstruationszyklus durchgeführt. In allen Fällen war Immunfärbung für diese drei Antigene auf Endometriumepithel der normalen Gruppe vorhanden. In Biopsien, die 3 Tage oder mehr verzögert waren, war α_1, und α_v Färbung vorhanden, aber epitheliale β_3 Färbung fehlte. Der Vergleich der β_3 Färbungsintensität in den beiden Gruppen wird in **Fig.** 5A gezeigt. Begleitende Mikrophotographien der β_3 Immunfärbung von phasenverschobenen Biopsien (OOP; B) und normalen „in Phase" Biopsien (C) sind enthalten, was die Diskrepanz zeigt, die bei der β_3 Färbung beobachtet wurde. In nachfolgenden Behandlungszyklen unterzogen sich 2 OOP Patienten einer wiederholten Biopsie während eines normalisierten Zyklus, zu dieser Zeit war Immunfärbung für epitheliales β_3 vorhanden. Dies legt nahe, dass das Fehlen von β_3 keine immanente Störung in der OOP Gruppe war. Vielmehr hatten die gestörten Biopsien, denen β_3 fehlte, den Phänotyp der mittleren lutealen Phase von normalem Tag 20 bis 24 Endometrium noch nicht hergestellt.

Zellernte und NP-40-Extrahierung

[0067] Um weiterhin zu zeigen, dass immunhistochemische Färbung Änderungen der Expression der β_3 Untereinheit genau widerspiegeln, wurden Immunblots (Westernblots) durchgeführt an Proben von angereicher-

ten endometrialen glandulären Elementen aus der proliferativen und sekretorischen Phase. Vier Endometrium-Proben wurden für die Untersuchung der β_3 Untereinheit in proliferativem (n = 2) and spät sekretorischem (n = 2) Endometriumepithel erhalten. Jede Probe wurde in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM; Sigma, St. Louis, Mo.), ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum (Flow Laboratories, McLean, Va.) Glucose (4500 mg/L), Hepespuffer (25 mM), L-Glutamin (584 mg/L), and Natriumbicarbonat (3,7 g/L) aufgenommen. Endometrium wurde in einer Plastik-Petrischale zerkleinert, vor Inkubation mit 6 mg Collagenase (Typ 1A, 550 Einheiten/mg; Sigma, St Louis, Mo.) für 2 Stunden bei 37°C, unter Anwendung von Modifikationen der Verfahren beschrieben von Satyaswaroop et al. in "Isolation and Culture of Human Endometrial Glands", J. Clin. Endocr. Metab. 1979, 48: 639. Die sich ergebende Suspension wurde nacheinander durch ein 250 µm Sieb und ein 38 µm Sieb (Newark Wire Cloth Co, Newark N. J.) passiert. Das grobe (250 µm) Sieb entfernte unverdautes Material, während das zweite die glandulären Elemente zurückhielt und die einzelnen Stroma- und Blutzellen ausschloss. Nach gründlichem Spülen wurden die glandulären Elemente durch Rückwaschen mit 10 bis 20 ml DMEM erhalten. Die isolierten glandulären Strukturen wurden dann in ein 1.5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 3 mal (82 × g) für 2 Minuten mit unterbrechenden Waschschritten mit PBS zentrifugiert. Membranextrakte wurden durch Zugeben von kleinen Volumina (100–200 µl) 10 mM Tris-Acetat, pH 8.0, 0.5% NP-40, 0.5 mM Ca^{2+} (TNC) mit 2 mM PMSF (Phenylmethyl-sulfonylfluorid) zum Endpellet hergestellt, pipettiert und auf Eis für 15 Minuten inkubiert. Das Lysat wurde für 5 Minuten bei 16 000 × g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der sich ergebende Überstand wurde NP-40-Extrakt genannt, und wurde bei –70°C bis zur Verwendung eingefroren. Ein Teil des ursprünglichen, unverdauten Gewebes wurde zur immunhistochemischen Lokalisierung von β_3 gefriergeschnitten.

Gelelektrophorese und Immunblots

[0068] Die Proteinkonzentration jedes NP-40-Extrakts und eines Thrombocytenextrakts (positive Kontrolle) wurde bestimmt unter Verwendung der Technik, die von Lowry et al., "Protein Measurement with Folin Phenol Reagent", J. Biol. Chem. 1951, 193: 265 beschrieben wurde. Proben mit gleichen Proteinmengen wurden Elektrophoseprobenpuffer (62,5 mM Tris Base, 2% SDS, 10% Glycerol, pH 6,8) hinzugefügt. Proben wurden durch SDS-PAGE unter Verwendung von 6% Polyacrylamidgelen analysiert, bei Anwendung von nicht-reduzierenden Bedingungen, beschrieben durch Laemmli, U. K., "Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature 1970, 227: 680. Das Gel wurde auf Nitrozellulose übertragen unter Verwendung eines Biorad Transferapparates (Biorad, Richmond, Calif.) und blockiert mit 4% BSA in PBS mit 0,2% Na-Azid für 1 Stunde. Nach Zugabe des primären Antikörpers (SSA6 Überstand) für 2 Stunden, wurde das Gel unter Verwendung eines alkalische Phosphatase-konjugiertem sekundärem Antikörper (Promega Corp., Madison, WI) entwickelt, gemäß den Verfahren beschrieben durch Albelda et al., "EndoCAM: A Novel Endothelial Cell-Cell Adhesion Molecule", J. Cell Biol. 1990, 110: 1227.

[0069] Wie in **Fig.** 6A gezeigt, wiesen Epithelstrukturen aus der proliferativen Phase wenig bis keine Immunfärbung bei 95 kDa auf (Bahnen 2 und 3) im Vergleich zur positiven Kontrolle (Thrombocytenextrakt; Bahn 1) oder zu Proben aus der sekretorischen Phase (Bahnen 4 und 5), die eine starke Färbung für β_3 zeigten. Die isolierten Endometriumdrüsen erschienen als tubuläre Strukturen frei von umgebenden Stroma (**Fig.** 6B). Immunfluoreszenzfärbung von β_3 in Proben, die Bahnen 3 und 4 entsprechen (mittlere proliferative Phase beziehungsweise Tag 23) werden in **Fig.** 6C und D gezeigt. Man beachte das Fehlen von glandulärer Färbung in der proliferativen Probe, während sowohl glanduläre als auch luminale Immunfärbung in der sekretorischen Phase offensichtlich ist. Diese Daten bestätigen, dass die Expression von epithelialem β_3 in menschlichem Endometrium ein zyklusspezifisches Phänomen ist.

Feststellung von Endometriose

Patientenauswahl

[0070] Biopsien über den ganzen Menstruationszyklus hindurch wurden von 500 Frauen erhalten, die sich Untersuchungen auf Unfruchtbarkeit an der Universität von Pennsylvania unterzogen. Die Biopsien wurden für die Beteiligung an der Studie basierend auf Kriterien durchsucht, die einschlossen genaues Wissen des Menstruationszyklustags oder „in Phase" Histologie und Freisein von Menstruationszyklusstörungen (fehlende Ovulation (Aussetzen oder Einstellen der Ovulation), perimenopausales Stadium (disfunktionelle Blutung des Uterus), luteale Phasenstörung (histologische Hinweise auf Reifungsverzögerung des Endometriums), die Anwesenheit oder Verwendung einer Intrauterinvorrichtung oder Endometritis (Entzündung des Endometriums auf Grund von infektiösen Agenzien oder chemischer Irritation). Patienten mit endometrialer Hyperplasie (ein Anstieg der Zellzahlen im Endometrium), Neoplasie (ein pathologischer Prozess, der in der Bildung oder Wachstum von abnormalen Gewebe oder Tumoren, gutartig oder bösartig, resultiert), und jene mit hormoneller The-

rapie (einschließlich oraler Verhütungsmittel, Estrogenersatztherapie und Progestenen) wurden ebenfalls ausgeschlossen. Zweihundertundachtundsechzig Frauen kamen für die Aufnahme in diese Studie in Frage, von Zyklustag 2 bis hindurch zu 27 reichend. Die häufigste erste Diagnose war Endometriose (41,4%), gefolgt durch ungeklärte Unfruchtbarkeit (23,5%), siehe Tabelle 3. Wegen des Teilnahmekriteriums der normalen „in Phase" Histologie, wie oben erwähnt, waren alle Fälle von lutealer Phasenstörung ausgeschlossen.

TABELLE 3

Diagnosen von Versuchspersonen mit Unfruchtbarkeit, die sich einer Diagnose durch Endometriumbiopsie unterzogen (N = 268)

Diagnose	Anzahl	(%)
Endometriose	111	(41,4)
Tubenerkrankung	38	(14,2)
Beckenanheftungen	17	(6,3)
Männlicher Faktor	18	(6,7)
Fibrome	9	(3,4)
Häufige Fehlgeburten	6	(2,2)
in utero DES Exposition	4	(1,5)
Hyperprolaktinämie	2	(0,7)
ungeklärte Unfruchtbarkeit	63	(23,5)

[0071] Es wurden Endometriumbiopsien von 241 Patienten nach Tag 19 (Tag 6 oder höher nach Ovulation) erhalten, basierend auf der Welle von luteinisierendem Hormon, LH, im Urin oder der nächsten Menstruationsperiode, einer Zeit im Menstruationszyklus, in der epitheliales β_3 exprimiert wird, Lessey et al., supra. Die verbleibenden Patienten (n = 27) wurden vor Tag 20 biopsiert und daher wurde von ihnen nicht erwartet, dass sie das β_3 Integrin erzeugen. Basierend auf der Routineaufarbeitung bei Unfruchtbarkeit, einschließlich diagnostischer Laparoskopie, welche die Untersuchung des Inhalts des Peritoneums mit einem Laparoskop, das durch die Unterleibswand geschoben wird, beinhaltet, hatten 105 (43,6% der Gruppe) dieser Frauen Endometriose. Die 105 Frauen wurden dann als die Testfälle betrachtet. Bei 20 Frauen mit Endometriose war auch vorherige Fruchtbarkeit dokumentiert, hatten vorher Nachkommen hervorgebracht, wiesen eine Kinderzahl ≥ 1 auf, wobei jede Frau ≥ 1 vorherige Geburten aufwies und sich einer beidseitigen Eileiterunterbindung unterzogen hatte oder eindeutig identifizierte männliche Faktor Unfruchtbarkeit (oder Unfruchtbarkeit des männlichen Partners) aufwies. Diese wurden ausgewählt, um als fruchtbare Kontrollen zu dienen. Die verbleibenden 116 Frauen (48,1% der Gruppe) wurden als unfruchtbare Kontrollen betrachtet.

Immunhistochemie

[0072] Immunperoxidasefärbung wurde an den 241 Proben durchgeführt, wie beschrieben durch Lessey et al., supra. Kurz gesagt, wurde Immunperoxidasefärbung auf Kryostatschnitten durchgeführt von Endometrium-Proben durch den ganzen Menstruationszyklus hindurch. Serielle Gefrierschnitte, 4–8 µ dick, wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern platziert, in –20°C Aceton für 10 Minuten fixiert und angefärbt unter Verwendung von Vectastain Elite® ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.). Diaminobenzidin (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) wurde als das Chromogen verwendet. Primärer Antikörper, bestehend aus SSA6 (spezifisch für die β_3 Untereinheit des Fibronectinrezeptors) wurde auf den Gefrierschnitten nach Blockieren mit 1% Rinderserumalbumin in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS, platziert, und für 1 Stunde bei Raumtemperatur binden gelassen. Ein Spülen mit PBS, pH 7,2 bis 7,4, wurde gefolgt von sekundärem Antikörper, bestehend aus biotinyliertem Ziege anti-Maus-Antikörper für 30 Minuten. Nach einem Spülen mit PBS wurde die endogene Peroxidase durch eine 30 Minuten Inkubation mit 0,3% H_2O_2 in absolutem Ethanol getilgt, gefolgt durch eine 30 Minuten Rehydrierung in PBS. Avidin : biotinylierter Meerrettichperoxidase-Makromolekularkomplex (ABC) wurde dann auf den Schnitten für 30 Minuten inkubiert, vor Zufügen von Diaminobenzidin für 3 Minuten um die Reaktion zu vervollständigen. Die Proben wurden nachfolgend in PBS gewaschen und präpariert.

[0073] Immunfärbung für endometriales β_3 wurde an jeder der 268 Endometriumbiopsien, die vom ganzen Menstruationszyklus hindurch erhalten worden waren, durchgeführt (siehe **Fig.** 7). Beispiele für zyklusspezifische Expression der β_3 Untereinheit unter Verwendung der immunhistochemischen Färbung werden gezeigt in **Fig.** 8A (proliferativ), **Fig.** 8B (Tag 18), **Fig.** 8C (Tag 22) und einer Probe vom Zyklustag 23 mit negativer Färbung in einem Patienten mit Endometriose, dessen „in Phase" Biopsie als „Tag 22–23" am histologischen Schnitt (D) gelesen wurde. Wie in allen Fällen gesehen wurde, bleibt die Immunfärbung des vaskulären Endothels vorhanden, auch in Proben ohne epitheliale Färbung für dieses Integrin, die daher als positive interne Kontrolle für die Immunfärbetechnik dient. Basierend auf der Verteilung von β_3, die in **Fig.** 7 gezeigt wird, und der Theorie, dass die β_3 Untereinheit normalerweise im Endometrium von Tag 20 an und später exprimiert wird, wurde alle Proben, die histologisch auf Zyklustag 20 oder höher datiert waren, zur weiteren Untersuchung einbezogen (n = 241). Fälle mit bekannter Endometriose (102/241; 43,5%) wurden mit unfruchtbaren Kontrollen ohne Endometriose (116/241; 48,1%) und 20 fruchtbaren Kontrollen (20/241; 83%) verglichen. Wie in Tabelle 4 aufgelistet, waren sowohl die Endometriosegruppe als auch die unfruchtbaren Kontrollen jünger als die fruchtbaren Kontrollen. Die sich ergebende Färbung wurde unter einem Nikon Mikroskop untersucht bei niedriger (100x) und höherer (400X) Vergrößerung. Der HSCORE, ein halbquantitativer Index, der sowohl die Intensität als auch die Verteilung der positiven Färbung für β_3 Integrin abschätzt, wurde unter Verwendung der folgenden Gleichung berechnet:

$$HSCORE = \sum Pi(i + 1)$$

wobei i = Intensität der Färbung mit einem Wert von 1, 2 oder 3, schwach, mittel beziehungsweise stark, und Pi der Prozentsatz der gefärbten Epithelzellen für jede Intensität ist, variierend von 1–100%. Geringe Abweichungen zwischen Beobachtern (r = 0,994; p = 0,00001) in Uterusgewebe sind unter Verwendung dieser Technik von Budwit-Novotny, D. A., et al., "Immunohistochemical Analyses of Estrogen Receptor in Endometrial Adenocarcinoma Using a Monoclonal Antibody", Cancer Res., 1986 46: 5419–5425 berichtet worden. Beispiele für repräsentative HSCOREs, welche die sich ändernden Höhen der Färbeintensität und Verteilung widerspiegeln, werden in **Fig.** 8 dargestellt. Mikrophotographien wurden unter Verwendung von Kodak 100 ASA Film hergestellt.

Statistische Analyse

[0074] Unfruchtbare Endometriosepatienten wurden mit unfruchtbaren Kontrollen ohne Endometriose und fruchtbaren Kontrollen verglichen. Vergleiche wurde auch zwischen nullipara Endometriosepatienten und para Endometriosepatienten gemacht, für ausgewählte Eigenschaften wie Alter und HSCORE, und wurden unter Verwendung des nicht-parametrischen Wilcoxon Tests durchgeführt. Wilcoxon, F., Individual Comparisons by Ranking Methods. Biometrics Bull 1945; 1: 80–85.

[0075] ROC-Analyse (engl.: „Receiver Operator Characteristic") wurde verwendet, um den besten Ausschlusswert für den HSCORE in Frauen zu bestimmen, die sich einer prospektiven Laparoskopie unterziehen. Metz, C. E., Basic Principles of ROC analysis. Sem Nuclear Med 1978; 8: 283–298. Ein HSCORE-Ausschlusswert wurde als der höchste Vorhersagewert für Endometriose gesucht, was bedeutete eine hohe Spezifität auf Kosten von moderater Sensitivität zu suchen. Ein hoher Vorhersagewert minimiert die Zahl der Frauen, die sich sonst einer unnötigen Operation unterziehen würden, wenn dieser Test in diagnostischer Art und Weise für Endometriose verwendet wird. Der HSCORE-Ausschlusswert betrug 0,7, was eine Sensitivität von 38%, eine Spezifität von 91% und eine positiven Vorhersagewert von 86% für den Nachweis von Endometriose ergab.

[0076] Die Beziehung zwischen HSCORE und Endometriose wurde zuerst durch einen nicht-parametrischen Test (Wilcoxon Test) bewertet und weiter durch mehrfache logistische Regression in der Stichprobe von 241 Frauen, deren Biopsien histologisch Zyklustag 20 oder später waren. Wie in Tabelle 4 zu sehen, war der mittlere HSCORE signifikant niedriger für die unfruchtbare Endometriosegruppe ($p < 0,003$) verglichen mit fruchtbaren Kontrollen ($p < 0,002$) und den unfruchtbaren Kontrollen ohne Endometriose ($p < 0,012$; Tabelle 4). Interessanterweise wiesen die unfruchtbaren Kontrollen ohne Endometriose auch eine grenzwertig niedrigeren HSCORE für β_3 Färbung als die fruchtbaren Kontrollgruppe ($p = 0,05$) auf.

TABLE 4
Demographische and HSCORE Eigenschaften von Versuchspersonen, deren Endometriumbiopsien histologisch normal und von Zyklustag 20 oder höher waren

unfruchtbar mit Endometriose	unfruchtbar ohne Endometriose Unfruchtbare Kontrollen	fruchtbare Kontrollen
n = 105	n = 116	n = 20
Eigenschaft		
Alter (J.)		
Mittelwert ± Std.Abw.	34,1 ± 4,1[+]	34,5 ± 4,7[++] 36,9 ± 4,9
Ernsthaftigkeit AFS Bewertungszahl		
I	40 (38,5%)	
II	44 (42,3%)	
III	15 (14,3%)	
IV	6 (5,8%)	
HSCORE		
Mittelwert ± Std.Abw.	1,30 (± 1,09)*	1,68 (± 0,95)** 2,15 ± 0,66)
Median	1,3	1,75 2,05
Max	3,6	3,4 3,6

[+]p < 0.003 vgl. mit fruchtbaren Kontrollen, nach Wilcoxon Test.
[++]p < 0.01 vgl. mit fruchtbaren Kontrollen, nach Wilcoxon Test.
[*] p < 0.02 vgl. mit fruchtbaren Kontrollen und p < 0.012 verglichen mit unfruchtbaren Kontrollen ohne Endometriose, nach Wilcoxon Test.
[**]p = 0.05 vgl. mit fruchtbaren Kontrollen, nach Wilcoxon Test.

[0077] Die Ernsthaftigkeit der Endometriose basierend auf der AFS Klassifizierung schien mit der Gegenwart oder dem Fehlen der β_3 Immunfärbung in Zusammenhang zu stehen. Alle 105 Patienten mit Unfruchtbarkeit und Endometriose wurden nach Ernsthaftigkeit der Erkrankung eingeteilt. Die Verteilung der Fälle nach AFS-Ernsthaftigkeitsbewertung wird in Tabelle 4 aufgelistet. Der HSCORE der beiden Gruppen basierend auf der AFS-Ernsthaftigkeitsbewertung, I und II (minimal und mild; n = 84) gegenüber III und IV (mittel und schwer; n = 21) zeigte einen signifikanten Unterschied unter Verwendung eines Wilcoxon Tests (p = 0,0151).

[0078] Daher ist die gestörte β_3 Expression spezifisch mit Endometriosestadien I und II verbunden.

[0079] Mehrfache logistische Regression unter Anwendung von EGRET wurde verwendet, um die Verbin-

dung zwischen Endometriose und HSCORE zu untersuchen, nach Angleichen der Auswirkungen von Alter und Kinderzahl, und die mögliche Wechselwirkung der Kinderzahl berücksichtigend. Mauritisen, R. EGRET. Statistics and Epidemiology Research Corporation Software. Seattle, WA, 1990.

[0080] Durch mehrfache logistische Analyse betrug das einfache relative Risiko (RR) und der 95% Vertrauensbereich (CI), basierend auf einem Modell mit nur dem HSCORE als der unabhängigen Variablen und der Anwesenheit oder dem Fehlen von Endometriose als die abhängige (Ergebnis) Variable, 0,6 (0,5–0,8), wenn berechnet für einen HSCORE von 0,7 (nach ROC Analyse). Ein relatives Risiko (RR) von 1 bedeutet, dass es keine Wirkung gibt, dass beide Gruppen hinsichtlich des Risikos für Endometriose gleich sind. Ein RR von 0,6 ist hochsignifikant, Vertrauensbereiche zeigen den Bereich für die Verlässlichkeit des Tests. Zusammen definieren RR und CI ein erhöhtes Risiko dafür Endometriose zu haben, für nullipara Frauen mit einem HSCORE von 0,7 oder darunter. Das Einbeziehen des Alters in das Modell änderte das Ergebnis nicht, aber es gab eine statistisch signifikante Wechselwirkung mit der Kinderzahl ($p = 0{,}030$). Entsprechend betrug das angepasste RR (95% CI) 0,6 (0,4–0,9) für nullipara Frauen verglichen mit 1,2 (0,8–1,8) für para Frauen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von β_3 (wie durch den HSCORE gezeigt) in nullipara Frauen eine statistisch signifikante Vorhersage von Endometriose ist. Das Beschränken der Analyse auf Frauen mit nur minimaler oder milder Erkrankung änderte das Ergebnis nicht wesentlich. Das angepasste RR (95% CI) in nullipara Frauen gegenüber 0,5 (0,4–0,8) verglichen mit 1,2 (0,7–1,8) in para Frauen.

[0081] Um diese Beziehung zwischen Fortpflanzungsgeschichte und HSCORE weiter zu untersuchen, wurde die 105 Patienten mit Endometriose nach Kinderzahl eingeteilt und mit der fruchtbaren Kontrollgruppe verglichen (Tabelle 5). Die Kontrollpopulation war älter als die para und nullipara Endometriosegruppen. Der HSCORE in der nullipara Endometriosegruppe war niedriger als der der para Endometriosegruppe und der fruchtbaren Kontrollgruppe ($p < 0{,}0001$, für jede Gruppe), aber es gab keine Unterschied zwischen der para Gruppe mit Endometriose und den fruchtbaren Kontrollen ($p = 0{,}98$). Der Vergleich zwischen diesen drei Gruppen wird in **Fig.** 9 graphisch dargestellt.

TABLE 5
Vergleich von nullipara und para Frauen mit Endometriose und normalen fruchtbaren Kontrollen

	Endometriose Patienten n = 105		
	nullipara	para	fruchtbare Kontrollen
	n = 78	n = 27	n = 20
Eigenschaft			
Alter (J.)			
Mittelwert			
± Std.Abw.	34,1 ± 4,1[+]	34,3 ± 4,0[++]	36,9 ± 4,9
Ernsthaftigkeit			
AFS Bewertungszahl			
I	30 (38,5%)	10 (37,0%)	
II	33 (42,3%)	11 (40,7%)	
III	11 (14,1%)	4 (14,8%)	
IV	4 (5,1%)		2 (7,4%)
HSCORE			
Mittelwert			
± Std.Abw.	1,03 (± 1,04)*	2,10 (± 0,79)**	2,15 ± 0,66)
Median	0,6	2,1	2,05
Max	3,6	3,6	3,6

[+]p < 0.004 vgl. mit fruchtbaren Kontrollen, nach Wilcoxon Test.
[++]p < 0.02 vgl. mit fruchtbaren Kontrollen, nach Wilcoxon Test.
[*]p < 0.0001 vgl. mit para Endometriosepatienten und p < 0.0001 verglichen mit fruchtbaren Kontrollen, nach Wilcoxon Test.
[**]p < 0.98 vgl. mit fruchtbaren Kontrollen, nach Wilcoxon Test.

[0082] Die Beobachtung, dass Unterschiede in der Integrinexpression mit der Diagnose von Endometriose korrelieren, veranlasste die Bewertung der Verwendbarkeit dieses Markers zur Vorhersage dieser Störung bei Frauen prospektiv zur diagnostischen Laparoskopie. Als eine Untergruppe der ursprünglichen 241 Proben, wurden 89 Biopsien prospektiv vor der diagnostischen Laparoskopie erhalten. Chronologische Datierung wurde festgestellt durch die Welle von luteinisierendem Hormon, LH, im Urin und/oder Beginn der nächsten Menstruationsperiode. Endometrische Datierung wurde unter Anwendung der Kriterien von Noyes et al., "Dating the Endometrium", Fertil. Steril. 1950, 1: 3 durchgeführt. Alle 89 dieser Frauen unterzogen sich einer diagnostischen Laparoskopie, um die Anwesenheit oder Abwesenheit von Endometriose festzustellen. Die Ernsthaftigkeit der Erkrankung, wenn vorhanden, wurde in Stadien eingeteilt nach den überarbeiteten Kriterien der Ame-

rikanischen Gesellschaft für Fertilität, AFS, wie ausgeführt in American Fertility Society: Revised American Fertility Society classification of endometriosis, supra. Die Chirurgen, die die diagnostische Laparoskopie durchführten, kannten das Ergebnis der immunhistochemischen Befunde nicht. Ebenso wurde die Interpretation der Biopsieergebnisse in einer blinden Art und Weise durchgeführt unter Verwendung des HSCORE, der sowohl die Intensität als auch die Verteilung der positiven Färbung für β_3 Integrin abschätzt. Der 0,7 HSCORE-Wert, der als optimaler Ausschlusswert bestimmt worden war, ergab eine Sensitivität von 38%, eine Spezifität von 91% und den höchsten Vorhersagewert von 86% für die prospektive Erkennung von Endometriose. Insgesamt wurden 50 Patienten prospektiv identifiziert, die bei Laparoskopie Endometriose in verschiedenen AFS Stadien aufwiesen. Negative Färbung, die keine $\square_3$ Expression anzeigt, wurde in 22 Proben basierend auf ROC-Analyse nachgewiesen. Von diesen 22 Patienten ohne β_3 Färbung, wurde bei 19 Endometriose festgestellt. Eine ROC-Analyse wurde durchgeführt, um den optimalen Ausschlusswert für normale Proben festzulegen. Nach bestem Wissen des Antragstellers ist die vorliegende Erfindung der erste nichtchirurgische Test, von dem gezeigt wurde, dass er die Anwesenheit von minimaler oder milder Endometriose vorhersagt.

[0083] Nicht allen Patienten, bei denen nachfolgend Endometriose festgestellt wurde, fehlte die β_3 Untereinheit. Die vorliegende Erfindung identifiziert eine Untergruppe von Unfruchtbarkeitspatienten mit einem Mangel an β_3, der Frauen mit gestörter Empfänglichkeit des Uterus kennzeichnet. Diese Verbindung zwischen Endometriose und gestörter β_3 Integrinexpression könnte die ersten zyklusspezifische Störung im putativen Implantationsfenster darstellen. Nachweisen des Verlusts von β_3 könnte Patienten mit Endometriose anzeigen, die am meisten von Unfruchtbarkeit durch einen endometrialen Faktor gefährdet sind. Während Implantation das Ergebnis einer Kaskade von einzelnen Molekülen sein kann, deckt die vorliegende Erfindung auf, dass der Verlust eines einzelnen Bestandteils ausreichend sein kann, um ein Scheitern der Implantation zu erklären.

[0084] Die vorliegende Erfindung deckt auf, dass der Verlust von β_3, das normalerweise mit Beginn des Implantationsfensters exprimiert wird, mit Frauen verbunden ist, welche die Unfruchtbarsten zu sein scheinen. Die prospektive Verwendung dieses Markerproteins hat gezeigt, dass die β_3 Integrinuntereinheit ein nützlicher Test mit hoher Spezifität und hohem positivem Vorhersagewert für die nicht-chirurgische Diagnose von minimaler oder milder Endometriose ist. Als ein potenzieller Marker für die Empfänglichkeit des Uterus, die das Fruchtbarkeitspotenzial vorhersagen könnte, ermöglicht das Studieren dieser Untergruppe von Unfruchtbarkeitspatienten eine bessere Verfeinerung beim Diagnostizieren dieser rätselhaften Erkrankung.

Feststellung von Endometriose in der unfruchtbaren Patientenpopulation

[0085] Biopsien über den ganzen Menstruationszyklus hindurch werden von Frauen erhalten werden, die wegen Unfruchtbarkeit untersucht werden. Frauen, die para und nullipara sind, werden in die Studie aufgenommen werden. Die Biopsien werden für die Beteiligung an einer Studie basierend auf Kriterien durchsucht, die einschließen genaues Wissen des Menstruationszyklustags oder „in Phase" Histologie und Freisein von Menstruationszyklusstörungen (fehlende Ovulation (Aussetzen oder Einstellen der Ovulation), perimenopausales Stadium (disfunktionelle Blutung des Uterus), luteale Phasenstörung (histologische Hinweise auf Reifungsverzögerung des Endometriums), die Anwesenheit oder Verwendung einer Intrauterinvorrichtung oder Endometritis (Entzündung des Endometriums auf Grund von infektiösen Agenzien oder chemischer Irritation). Patienten mit endometrialer Hyperplasie (ein Anstieg der Zellzahlen im Endometrium), Neoplasie (ein pathologischer Prozess, der in der Bildung oder Wachstum von abnormalen Gewebe oder Tumoren, gutartig oder bösartig, resultiert), jene mit hormonaler Therapie (einschließlich oraler Verhütungsmittel, Estrogenersatztherapie und Progestenen) und solche mit Störung der lutealen Phase werden ausgeschlossen werden.

[0086] Es werden Endometriumbiopsien nach Tag 19 (Tag 6 oder höher nach Ovulation) erhalten werden, basierend auf der Welle von luteinisierendem Hormon, LH, im Urin oder der nächsten Menstruationsperiode, einer Zeit in der epitheliales β_3 exprimiert wird, Lessey et al., supra. Fruchtbare und unfruchtbare Kontrollen werden ebenfalls ausgewählt werden.

[0087] Immunperoxidasefärbung werden an den Patientenproben durchgeführt werden, wie beschrieben durch Lessey et al., supra. Kurz gesagt, werden Immunperoxidasefärbung auf Kryostatschnitten durchgeführt werden, von Endometrium-Proben durch den ganzen Menstruationszyklus hindurch. Serielle Gefrierschnitte, 4–8 µ dick, werden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern platziert, in –20°C Aceton für 10 Minuten fixiert und angefärbt werden, unter Verwendung von Vectastain Elite® ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.). Diaminobenzidin (DAB; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) wird als das Chromogen verwendet werden. Primärer Antikörper, bestehend aus SSA6 (spezifisch für die β_3 Untereinheit des Vitronectinrezeptors), wird auf den Gefrierschnitten nach Blockieren mit 1% Rinderserumalbumin in phosphatgepufferter Salzlösung, PBS, platziert werden, und für 1 Stunde bei Raumtemperatur binden gelassen. Ein Spülen mit PBS, pH 7,2 bis

7,4, wird gefolgt werden von sekundärem Antikörper, bestehend aus biotinyliertem Ziege anti-Maus-Antikörper für 30 Minuten. Nach einem Spülen mit PBS wird die endogene Peroxidase durch eine 30 Minuten Inkubation mit 0,3% H_2O_2 in absolutem Ethanol getilgt werden, gefolgt durch eine 30 Minuten Rehydrierung in PBS. Avidin : biotinylierter Meerrettichperoxidase-Makromolekularkomplex (ABC) wird dann auf den Schnitten für 30 Minuten inkubiert werden, vor Zufügen von Diaminobenzidin für 3 Minuten um die Reaktion zu vervollständigen. Die Proben werden nachfolgend in PBS gewaschen und präpariert werden.

[0088] Von der HSCORE und statistischen Analyse, unter Verwendung von Wilcoxon Test, ROC-Analyse und p-Werten, für unfruchtbare Frauen wird erwartet, dass sie der von nullipara unfruchtbaren Frauen, wie oben ausgeführt, ähnlich ist. HSCORE-Ausschlusswert, Sensitivitäts- und Spezifitätswerte werden für den Nachweis von Endometriose bei unfruchtbaren Patienten bestimmt werden. Die Patienten werden auch nach Ernsthaftigkeit der Endometriose basierend auf der AFS-Klassifizierung getrennt werden. EGRET wird verwendet werden, um die Verbindung zwischen Endometriose und HSCORE zu bewerten, nach Angleichen der Auswirkungen von Alter und Kinderzahl, supra. Das einfache relative Risiko und Vertrauensbereiche werden für Endometriose berechnet werden. Insgesamt wird erwartet, dass die Integrinexpression, nachgewiesen durch das Fehlen von β_3, mit der Diagnose von Endometriose bei unfruchtbaren Frauen korrelieren wird.

[0089] Verschiedene Modifikationen der Erfindung, zusätzlich zu jenen, die hierin gezeigt und beschrieben werden, werden Fachleuten aus der vorhergehenden Beschreibung offensichtlich sein. Es ist beabsichtigt, dass solche Modifikationen ebenfalls unter den Schutzbereich der angehängten Ansprüche fallen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung von β_3 Integrin in einer Endometrium Probe umfassend:
a. In Kontakt bringen der Probe mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin, wobei die Probe ein nullipares Endometrium ist, das aus dem Menstruationszyklus-Tag 20 bis 24 ausgewählt wurde; und
b. Nachweisen von β_3 Integrin in der Probe.

2. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers spezifisch für β_3 Integrin in der Herstellung eines diagnostischen Reagenz.

3. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers spezifisch für β_3 Integrin in der Herstellung eines Reagenz zum Vorhersagen von Endometriose.

4. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, unter Verwendung einer Probe, die aus Endometrium erhalten wurde, das aus dem Menstruationszyklus-Tag 20 bis 24 ausgewählt wurde, umfassend:
a. Identifizieren der Endometrium-Probe als nullipara,
b. In Kontakt bringen der Probe mit dem monoklonalen Antikörper spezifisch für β_3 Integrin,
c. Messen von β_3 Integrin in der Probe, und
d. Korrelieren der Abwesenheit von β_3 Integrin Expression mit Endometriose, wobei die Endometriose eine milde/minimale Endometriose ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Endometrium vom Menschen stammt.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, wobei die Stadien des Menstruationszyklus gewählt sind aus der Gruppe bestehend aus follikulärer Phase und sekretorischer Phase.

7. Verfahren nach Anspruch 1 oder Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei der monoklonale Antikörper SSA6 ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1 oder Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 7, wobei das β_3 mit einer anderen Integrin-Untereinheit kombiniert ist.

9. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 8, wobei die andere Integrin-Untereinheit α_v ist.

10. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 9, wobei der monoklonale Antikörper 23C6 ist.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 10, wobei das β_3 durch immunohistochemische Färbung der Endometrium-Probe nachgewiesen wird, die mit dem monoklonalen An-

tikörper in Kontakt gebracht wurde, der spezifisch für β_3 ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1 oder Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 11, wobei das β_3 durch Immunoblotting von β_3 aus der Endometrium-Probe nachgewiesen wird, die mit dem monoklonalen Antikörper in Kontakt gebracht wurde, der spezifisch für β_3 ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. IA

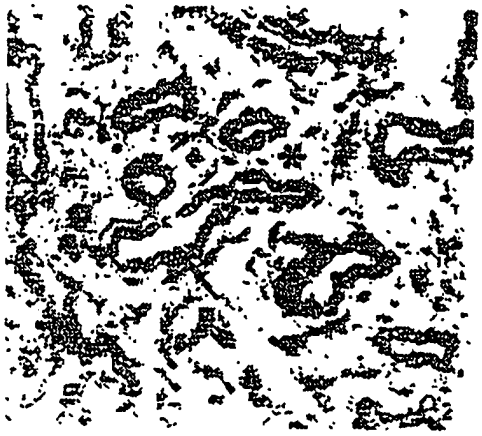


FIG. IB



FIG. IC

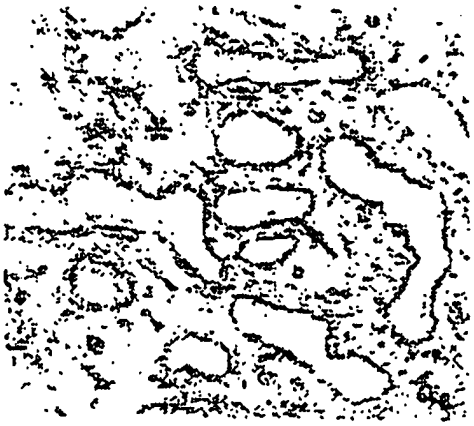


FIG. ID



FIG. IE



FIG. IF

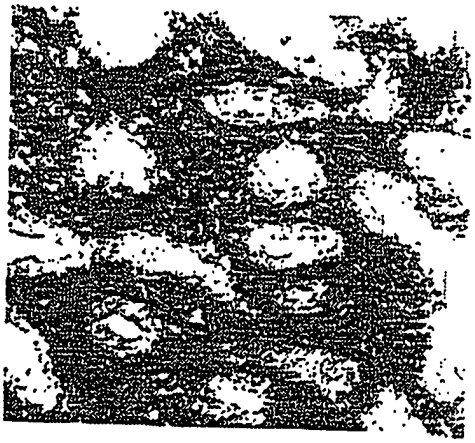


FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C





FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C

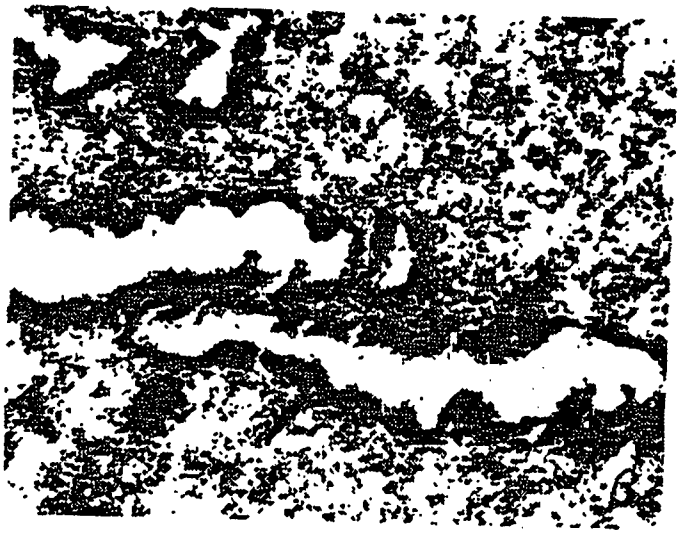
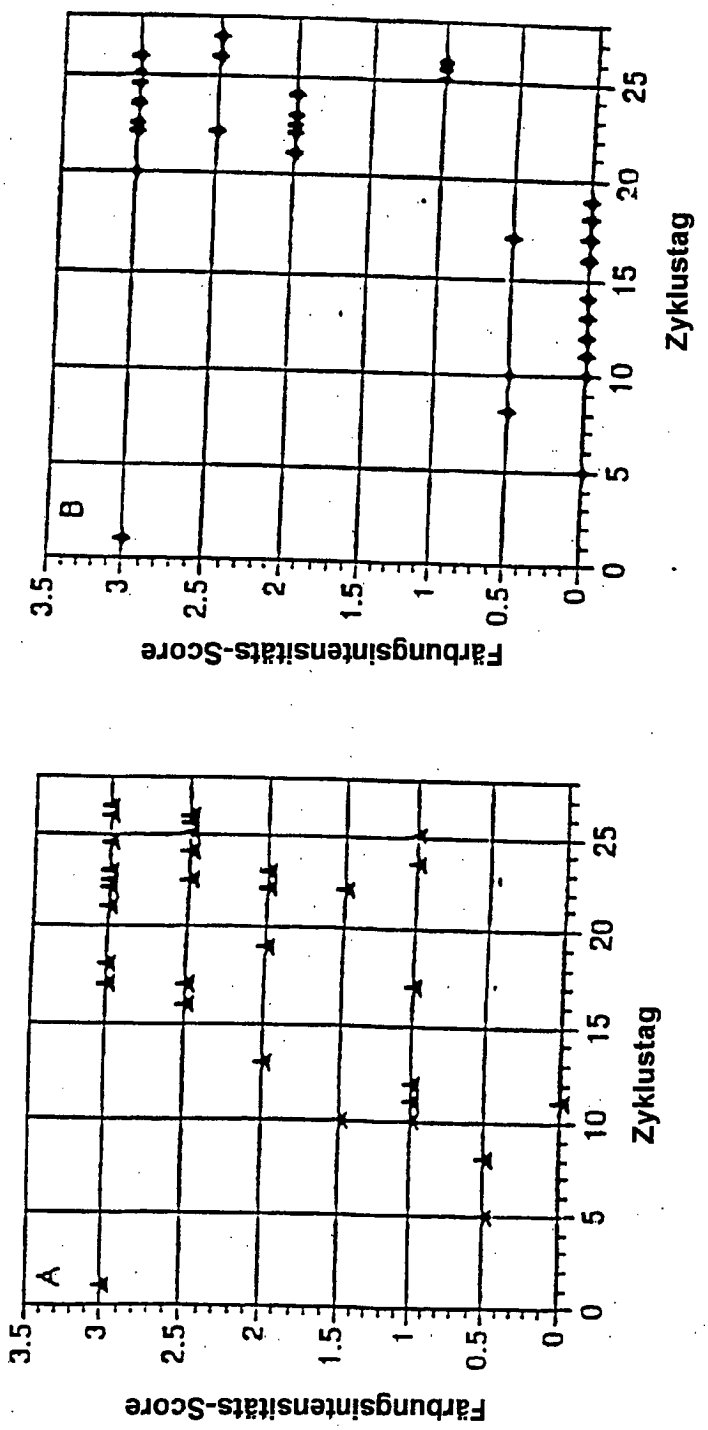


FIG. 3D


B
Färbungsintensitäts-Score
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
Zyklustag
A
Färbungsintensitäts-Score
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
5
10
15
20
25
Zyklustag

FIGUR 4

FIG. 5A

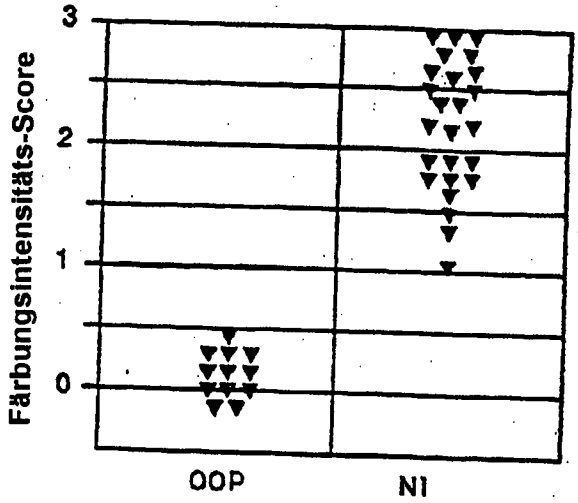


FIG. 5B



FIG. 5C



FIG. 6A

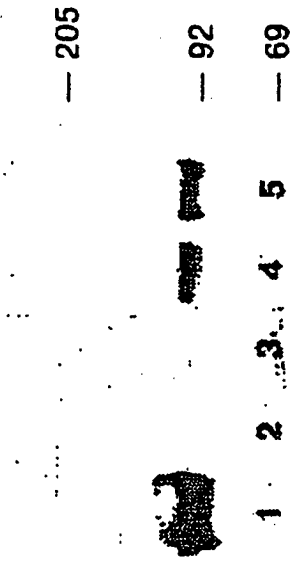


FIG. 6C

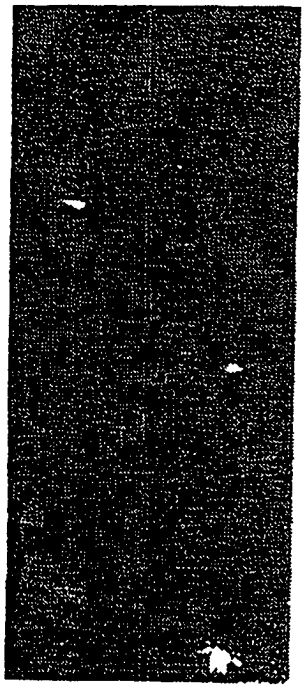
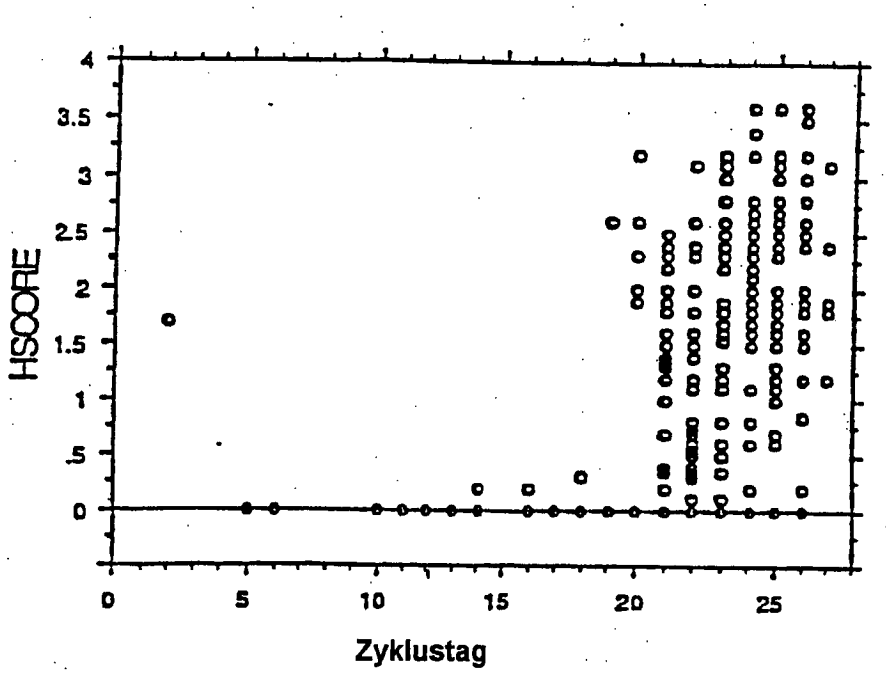


FIG. 6B



FIG. 6D





FIGUR 7



FIG. 8A



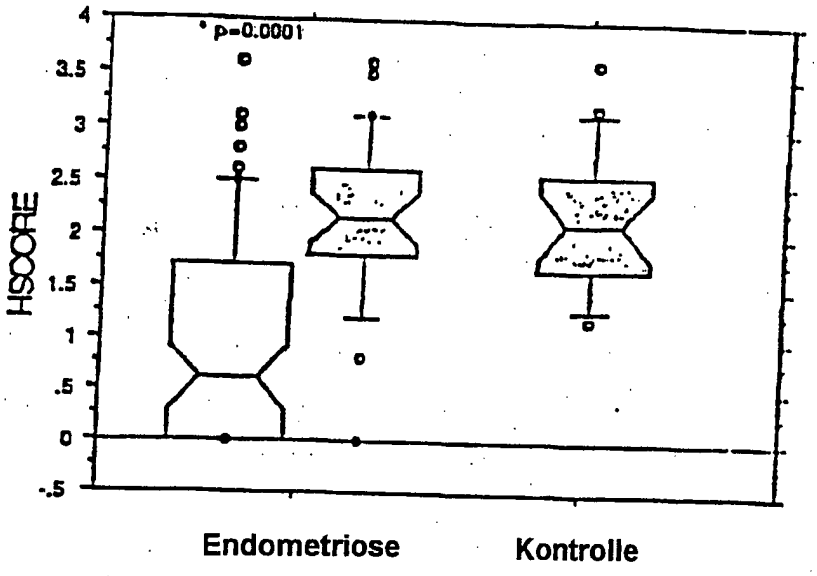
FIG. 8B



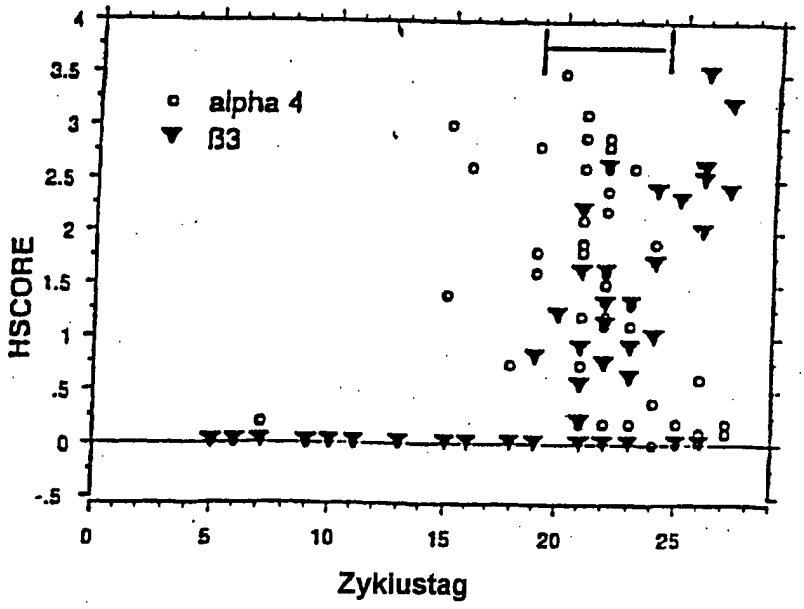
FIG. 8C



FIG. 8D



FIGUR 9



FIGUR 10