

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-511810
(P2004-511810A)

(43) 公表日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 3
C 1 2 Q 1/37	GO 1 N 33/574 E	2 G O 4 5
GO 1 N 21/64	C 1 2 Q 1/37	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78	GO 1 N 21/64 B	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53	GO 1 N 21/64 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 122 頁) 最終頁に続く

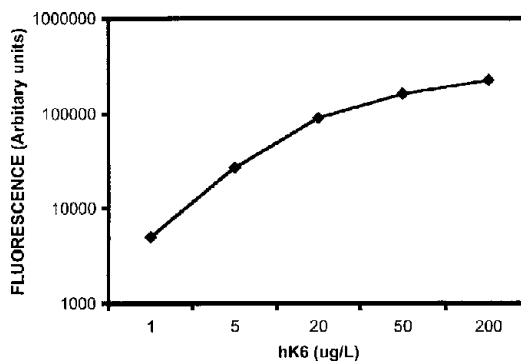
(21) 出願番号 特願2002-538164 (P2002-538164)	(71) 出願人 503162092 マウント・サイナイ・ホスピタル MOUNT SINAI HOSPITAL カナダ、エム5ジー・1エックス5、オンタリオ、トロント、スウィート970、ユニバーシティ・アベニュー600番
(86) (22) 出願日 平成13年10月26日(2001.10.26)	
(85) 翻訳文提出日 平成15年4月28日(2003.4.28)	
(86) 国際出願番号 PCT/CA2001/001505	
(87) 国際公開番号 W02002/035232	
(87) 国際公開日 平成14年5月2日(2002.5.2)	
(31) 優先権主張番号 60/243,789	(74) 代理人 100062144 弁理士 青山 稔
(32) 優先日 平成12年10月27日(2000.10.27)	(74) 代理人 100067035 弁理士 岩崎 光隆
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100064610 弁理士 中嶋 正二
	(74) 代理人 100072730 弁理士 小島 一晃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 卵巣癌の検出方法

(57) 【要約】

対象由来のサンプル、好ましくは血清サンプルまたは腫瘍組織抽出物中の h K 6 を検出することによる、対象における卵巣癌の診断、予後、およびモニタリングの方法。h K 6 は、h K 6 を検出または結合する試薬、好ましくは h K 6 またはその一部に特異的に反応性である抗体、を使用して測定し得る。腫瘍イメージング用の標識を有する h K 6 に結合する試薬を使用する、h K 6 を伴う腫瘍のイメージング方法も記載される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象中の卵巣癌に伴う h K 6 を検出する方法であって、

- (a) 対象由来のサンプルを採取すること；
 - (b) サンプル中の h K 6 を検出または同定すること；および
 - (c) 検出される量を基準で検出される量と比較すること、
- を含む方法。

【請求項 2】

段階 (b) に、ヒト角質層キモトリプシン酵素 (H S C C E)、カリクレイン 4、カリクレイン 5、カリクレイン 8、カリクレイン 9、カリクレイン 10、C A 1 2 5、C A 1 5 - 3、C A 1 9 - 9、O V X 1、リソホスファチジン酸 (L P A) または癌胚抗原 (C E A) の 1 種またはそれ以上を検出することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

段階 (b) に、C A 1 2 5、カリクレイン 9 およびカリクレイン 10 の 1 種またはそれ以上を検出することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

対象由来のサンプル中の h K 6 を定量することにより対象中の卵巣癌を診断またはモニタリングする方法であって、

- (a) 対象由来の生体サンプルを、検出可能な物質で直接または間接的に標識された h K 6 特異的抗体と接触させること； 20
 - (b) 検出可能な物質を検出してサンプル中の h K 6 を定量すること；
 - (c) 定量された h K 6 を基準のレベルと比較すること、
- を含む方法。

【請求項 5】

卵巣癌を診断またはモニタリングする方法であって、

- (a) 生体サンプルを、検出可能な物質で直接または間接的に標識された第一の h K 6 特異的抗体、および固定された第二の h K 6 特異的抗体とインキュベートすること；
 - (b) 第一抗体を第二抗体から分離させ、第一抗体相と第二抗体相を生じさせること；
 - (c) 第一または第二抗体相中の検出可能な物質を検出することにより、生体サンプル中の h K 6 を定量すること；および 30
 - (d) 定量された h K 6 を基準のレベルと比較すること、
- を含む方法。

【請求項 6】

生体サンプルが血清または腫瘍組織抽出物である、請求項 1 ないし請求項 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

生体サンプルが血清である、請求項 1 ないし請求項 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

基準が非卵巣癌の対象または良性疾病の対象で検出される h K 6 レベルである、請求項 1 ないし請求項 7 のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 9】

基準のものより大きい h K 6 量の検出が、後期の疾病または疾病進行および死亡のリスクの増大を示すものである、請求項 1 ないし請求項 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

段階 (a) で、第一および第二抗体を同時または連続的に生体サンプルと接触させる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、免疫学的に活性な抗体断片、ヒト化抗体、抗体重鎖、抗体軽鎖、遺伝子的に加工した一本鎖 F_v 分子、またはキメラ抗体である、請求項 4 ないし請求項 10 のいずれかに記載の方法。 50

【請求項 12】

検出可能な物質がアルカリフォスファターゼである、請求項 4 ないし請求項 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

アルカリフォスファターゼが蛍光基質を使用して検出される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

h K 6 が時間分解蛍光を使用して測定される、請求項 1 ないし請求項 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

h K 6 に伴う腫瘍をイメージングする方法であって、

(a) 腫瘍を、h K 6 に結合する試薬と、腫瘍に伴う h K 6 に試薬を結合させるのに十分な時間インキュベートすること、但し、試薬は腫瘍イメージング用の標識を帯びている；

(b) 腫瘍に局在化した標識の存在を検出すること、

を含む方法。

10

【請求項 16】

段階 (a) に、ヒト角質層キモトリプシン酵素 (H S C C E)、カリクレイン 4、カリクレイン 5、カリクレイン 8、カリクレイン 9、カリクレイン 10、C A 1 2 5、C A 1 5 - 3、C A 1 9 - 9、O V X 1、リソホスファチジン酸 (L P A) または癌胚抗原 (C E A)、好ましくは C A 1 2 5 に結合する試薬の 1 種またはそれ以上とインキュベートすることをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

20

【請求項 17】

各試薬が段階 (b) で区別できるように標識されている、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

卵巣癌をイメージングするためのインビボの方法であって、

(a) h K 6 に結合する試薬を患者に注射すること、但し、試薬は卵巣癌イメージング用の標識を帯びている；

(b) 試薬をインビボでインキュベートし、卵巣癌に伴う h K 6 に結合させること；および

(c) 卵巣癌に局在化した標識の存在を検出すること、

を含む方法。

30

【請求項 19】

試薬が h K 6 を認識する抗体である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

標識が放射性標識、蛍光標識、核磁気共鳴活性標識、陽電子放出断層撮影 (「 P E T 」) スキャナーで検出可能な陽電子放出同位元素、化学発光物質または酵素マーカーである、請求項 18 または請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 ないし請求項 20 のいずれかに記載の方法を実行するためのキット。

【請求項 22】

酵素で標識された h K 6 特異的抗体；および酵素の基質を含む、請求項 1 ないし請求項 20 のいずれかに記載の方法を実行するためのキット。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、卵巣癌腫の診断および予後方法に関するものである。

【0002】

発明の背景

最近まで、ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーは 3 遺伝子のみからなると考えられていた：膵臓 / 腎臓カリクレイン (K L K 1、h K 1 タンパク質をコードする)、ヒト腺カリクレイン 2 (K L L 2、h K 2 タンパク質をコードする) およびヒトカリクレイン 3 (K L

50

K 3、h K 3タンパク質、あるいは前立腺特異的抗原、P S Aをコードする)。後の2種のカリクレイン、即ちP S Aおよびh K 2は、比較的前立腺特異的であり、これらには既に前立腺癌の診断およびモニタリング用バイオマーカーとしての重要な適用法が見出されている(1-6)。

【0003】

ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーの新構成員が最近発見された(1)。今やこの遺伝子ファミリーは少なくとも14種の遺伝子を含み、これらは全てセリンプロテアーゼをコードし、DNAとアミノ酸のレベルの両方で有意な相同性を示す。そしてこれらは、他の非カリクレイン遺伝子に挿入されることなく全て染色体座19q13.3-q13.4に縦列に位置する。この分野の研究は、最近概説された(1)。

10

【0004】

K L K 6 遺伝子(ヒトカリクレイン6、h K 6をコードする)は、3研究グループにより独立にクローニングされ、以前にザイム(zyme)(7)、プロテアーゼM(8)、およびニューロシン(neurosin)(9)の名称を付けられていた。最近、全ての新規発見および伝統的カリクレイン遺伝子についての均一な命名法が確立された(10)。K L K 6 遺伝子は、244アミノ酸長のトリプシン様セリンプロテアーゼをコードし、その16アミノ酸はシグナルペプチドを構成し、5アミノ酸は活性化ペプチドを構成する。成熟型酵素は223アミノ酸からなる。h K 6は分泌タンパク質であることが以前に予想された(7-9、11)。このことは、h K 6タンパク質が脳脊髄液、乳頭吸引液、乳房嚢胞液、男性および女性の血清、精漿、羊水および乳癌細胞質を含む様々な体液中で見つかったことにより、最近立証された(12)。Littleら(7)は、この酵素が脳内でアミロイド生成(amyloidogenic)能力を有し、アルツハイマー病の発生と進行に関与し得ると論証した。他は、ディファレンシャル・ディスプレイ法により同じ遺伝子をクローニングし、それが乳癌の攻撃的な形態では下方調節されていることを見出した(8)。同じ遺伝子はYamashiroらによって、ヒト結腸腺癌細胞系のC O L O 2 0 1からクローニングされた(9)。

20

【0005】

古典的ヒトカリクレインの中で、P S Aは最も価値ある前立腺癌のバイオマーカーであると証明され、現在この疾病の診断およびモニタリングに使用されている(2-4)。別の見込みある前立腺バイオマーカーのh K 2もまた、最近導入された(5、6)。新たに発見されたカリクレイン(1)の中では、いずれもいかなる悪性腫瘍の血清マーカーとしても調べられていない。なぜなら、現在のところ、高い敏感度と特異度を有する分泌タンパク質を測定する方法が存在しないからである。

30

【0006】

卵巣癌は、女性の生殖器系の他のいかなる癌よりも死を引き起こしやすい、深刻な疾病である(13)。この疾病は、早期に診断されれば生存率が劇的に改善されるので、早期検出を助け、悪性度(grade)および/または病期(stage)分けを容易にするバイオマーカーの同定に大きな関心がある(15)。不幸なことに、C A 1 2 5(16-19)、インヒピン(20-23)、O V X 1(24)並びに他のマーカー(25に概説)を含む現在の卵巣癌腫血清マーカーは、幾許かの見込みを示したが、広範な臨床的好評を博してはいない。もう1つの見込みある卵巣癌マーカーである、リソホスファチジン酸(lysophosphatidic acid)も、この目的のためには同じ価値を有するようである(26)。

40

【0007】

卵巣癌腫の新しいバイオマーカーの発見と確認に、至急の要望がある。特に、血清分析による卵巣癌の早期診断は、効果的な処置の適用を介して臨床成果を改善し得る。

【0008】

発明の概要

種々の体液中のh K 6を測定するための高感度h K 6免疫アッセイが開発された(実施例1)。この鋭敏なアッセイを使用して、卵巣癌患者の大部分で血清中のh K 6濃度が有意

50

に増大していることが見出された。特に、正常非癌患者および良性疾病の患者と比較すると、h K 6 は卵巣癌患者で有意に増大しているが見出された。従って、h K 6 は、卵巣癌の診断およびモニタリング用の新しいバイオマーカーを構成する。h K 6 は、後期卵巣癌の診断およびモニタリングに使用し得、そして手術前または再発後のバイオマーカーとしても使用し得る。

【0009】

本発明はまた、卵巣腫瘍抽出物中のh K 6量を定量し、h K 6の量と、手術による切除の時に記録した臨床病理的変量とを、そして無進行生存率および全生存率とを関連付けた。h K 6レベルの増大は、長期にわたりより攻撃的な腫瘍行動を予測するものであると分かった。h K 6陽性は、疾病の進行と死の両方のリスクにおいて、約2倍の増大に伴うことが分かった。

10

【0010】

h K 6およびh K 6に結合する試薬は、卵巣癌を検出するのに使用し得る。特に、それらは卵巣癌の診断的評価および卵巣癌の素因のある患者の同定に使用できる。

【0011】

本発明は、対象由来のサンプル中のh K 6を測定することを含む、対象の卵巣癌を診断およびモニタリングする方法に関連する。h K 6は、h K 6を検出または結合する試薬、好ましくはh K 6またはその一部に特異的に反応性である抗体を使用して測定し得る。

【0012】

本発明のある態様では、

20

- (a) 患者由来のサンプルを採取すること；
 - (b) サンプル中のh K 6を検出または同定すること；および
 - (c) 検出される量を基準で検出される量と比較すること、
- を含む、患者の卵巣癌に伴うh K 6を検出するための方法が提供される。

【0013】

本発明はまた、(a) 対象から生体サンプルを入手すること；(b) 該サンプル中のh K 6量を検出すること；および(c) 検出された該h K 6量を、予め決定された基準と比較すること、但し、基準のものよりも高いレベルのh K 6の検出は、卵巣癌、特に後期の卵巣癌の存在を示すものである、を含む、卵巣癌について対象を調べる方法にも関連する。

【0014】

30

「検出」または「検出する」の用語は、標的であるh K 6、そのサブユニット、または試薬に結合した標的の組合せなどの有無を、アッセイすること、定量すること、イメージングすることまたはその他の方法で確立すること、並びに卵巣癌、転移、病期、または類似する状態の1つまたはそれ以上の事実に基づく特徴について、アッセイすること、イメージングすること、確認すること、確立すること、またはその他の方法で判定することを含む。この用語は、h K 6についての診断、予後、モニタリングの適用を包含する。

【0015】

ある実施態様では、本発明は、(a) 生体サンプルを、検出可能な物質で直接または間接的に標識されたh K 6特異的抗体と反応させること；および(b) 検出可能な物質を検出すること、を含む、対象由来の生体サンプル中のh K 6を定量することにより対象中の卵巣癌を検出する方法に関連する。

40

【0016】

本発明はさらに、(a) 対象由来の生体サンプルを、検出可能な物質で直接または間接的に標識されたh K 6特異的抗体と反応させること；および(b) 検出可能な物質を検出すること、を含む、対象由来のサンプル中のh K 6を定量することにより対象中の卵巣癌腫を診断およびモニタリングする方法に関連する。

【0017】

本発明の方法の実施態様は、(a) 対象由来の生体サンプルを、酵素で直接または間接的に標識されたh K 6特異的抗体と反応させること；(b) 酵素の基質を添加すること、但し、基質は、基質または酵素と基質の反応生成物が蛍光錯体を形成するように選択する；

50

(c) 蛍光錯体の蛍光を測定することにより、サンプル中のhK6を定量すること；および(d) 定量したレベルを基準のものと比較すること、を含む。基準は、対象患者由来の他のサンプルまたは対照対象について得られるレベルに相応し得る。ある実施態様では、定量したレベルを卵巢癌腫のない対象について定量されたレベルと比較する。その際、対照対象と比較して増大したhK6レベルは、卵巢癌腫、特に後期の卵巢癌腫を示すものである。

【0018】

本発明の好ましい実施態様は、以下の段階を含む。

- (a) 生体サンプルを、検出可能な物質で直接または間接的に標識された第一のhK6特異的抗体、および固定された第二のhK6特異的抗体と反応させること；
- (b) 第一抗体を第二抗体から分離させ、第一抗体相と第二抗体相を生じさせること；
- (c) 第一または第二抗体相中の検出可能な物質を検出することにより、生体サンプル中のhK6を定量すること；および
- (d) 定量されたhK6を基準のレベルと比較すること。

10

【0019】

基準は、健康な対照対象由来、良性疾病の対象由来、早期疾病の対象由来、または対象のその他のサンプル由来のサンプルについて定量されるレベルに相応し得る。基準と比較して増大したhK6レベルは、卵巢癌、特に後期の卵巢癌を示すものである。

【0020】

本発明は、複数の卵巢癌マーカーを使用する本明細書に記載の方法も企図している。従って、本発明は、hK6および卵巢癌特異的インジケーターである他のマーカーの存在について、生体サンプルを分析する方法を企図している。他のマーカーには、ヒト角質層キモトリプシン酵素(HSCCE)、カリクレイン4、カリクレイン5、カリクレイン8、カリクレイン9、カリクレイン10、カリクレイン11などのカリクレイン；CA125、CA15-3、CA19-9、OVX1、リソホスファチジン酸(LPA)および癌胚抗原(CEA)に対するマーカーが含まれる。好ましくは、他のマーカーはカリクレインマーカーである。好ましい実施態様では、マーカーは、hK6、hK10、およびCA125の2種またはそれ以上である。本明細書に記載の方法は、さらなるマーカーまたはマーカーの核酸を検出するための試薬を含めることにより改変してもよい。

20

【0021】

本発明はまた、

- (a) 腫瘍を、hK6に結合する試薬と、腫瘍に伴うhK6に試薬を結合させるのに十分な時間インキュベートすること、但し、試薬は腫瘍イメージング用の標識を帯びている；
 - (b) 腫瘍に局在化した標識の存在を検出すること、
- を含む、hK6を伴う腫瘍のイメージング方法にも関連する。

30

【0022】

発明のある態様に従って、1種またはそれ以上のカリクレインを標的とするように構築された試薬を対象に投与することを含む、インビボの方法が提供される。

【0023】

従って、本発明は、イメージング用の標識を帯び、かつカリクレイン、好ましくはhK6に結合する1種またはそれ以上の試薬を哺乳動物に投与し、次いで哺乳動物をイメージングすることを含む、インビボの方法を企図している。

40

【0024】

発明の好ましい態様によると、

- (a) カリクレイン6に結合する試薬を患者に注射すること、但し、試薬は卵巢癌イメージング用の標識を帯びている；
 - (b) 試薬をインビボでインキュベートさせ、卵巢癌に伴うカリクレイン6に結合させること；および
 - (c) 卵巢癌に局在化した標識の存在を検出すること、
- を含む、卵巢癌をイメージングするためのインビボ方法が提供される。

50

【0025】

発明のある実施態様では、試薬はカリクレインを認識する抗体である。発明の別の実施態様では、試薬はカリクレインを認識する化学物質である。

【0026】

試薬は、カリクレインをイメージングするための標識を帯びている。イメージングに有用な標識の例は、放射性標識、蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、核磁気共鳴活性標識、陽電子放出断層撮影（「PET」）スキャナーで検出可能な陽電子放出同位元素、ルシフェリンなどの化学発光物質、およびペルオキシダーゼやフォスファターゼのような酵素マーカーである。短距離検出器プローブで検出可能な短距離放射線放射物質も採用できる。

10

【0027】

本発明はまた、複数の卵巣癌マーカーを使用する、本明細書に記載の局在化またはイメージングの方法も企図している。例えば、卵巣癌イメージング用の方法は、ヒト角質層キモトリプシン酵素（HSCCE）、カリクレイン4、カリクレイン5、カリクレイン8、カリクレイン9、カリクレイン10、カリクレイン11、CA125、CA15-3、CA19-9、OVX1、リソホスファチジン酸（LPA）または癌胚抗原（CEA）、好ましくはCA125、に結合する1種またはそれ以上の試薬を患者に注射することをさらに含み得る。

【0028】

本発明はまた、発明の方法を実行するためのキットにも関連する。

20

【0029】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明白になる。しかしながら、本発明の精神と範囲の内での様々な変更や改変は、この詳細な説明から当業者に明らかになるので、詳細な説明と特定の実施例は、発明の好ましい実施態様を示す一方で、例示説明のみに供されると理解すべきである。

【0030】

図面の説明

ここで、図面に関して発明を説明する。

図1は、hK6タンパク質アッセイの較正曲線である。ゼロ基準の蛍光（ $\sim 18,000$ 任意蛍光単位）を、他の全測定値から差引いた。

30

図2は、3種の体液の高速液体クロマトグラフィーによる分離と、開発されたhK6免疫アッセイによる全画分の分析の結果を示す。3種全部の液中で、 ~ 30 kDaの分子量に相当する画分38-42の辺りで単一の免疫反応性ピークが検出された。カラムを分子量基準で較正した（上部に矢印で示す；量はkDa表記である）。乳汁のサンプルは、HPLCカラムに注入する前に10倍に希釈した。

【0031】

図3は、様々なヒト組織細胞質抽出物の、hK6タンパク質についての分析結果を示すグラフである。

図4は、80人の卵巣癌腫患者の血清におけるhK6濃度の度数分布を示すグラフである。表1でカットオフとして使用した $15 \mu\text{g/L}$ のレベルを矢印で示す。約66%の卵巣癌患者は、このカットオフ値よりも高い血清hK6濃度を有する。他の298個の非卵巣癌の血清サンプルからは、ほんの2個の血清が $15 \mu\text{g/L}$ よりわずかに高い値を有した（表1参照）。

40

【0032】

図5は、卵巣癌患者由来の96個の血清サンプルにおけるhK6濃度とCA125濃度との間の相関を示すグラフである。

図6は、卵巣癌患者からの連続的血清サンプルにおけるhK6とCA125の分析を示すグラフである。これらのデータは、hK6が患者のモニタリングに価値があることを示唆する。

【0033】

50

図 7 A は、正常、良性、癌患者での h K 6 分布を示すグラフである。

図 7 B は、正常、良性、癌患者での C A 1 2 5 分布を示すグラフである。

図 8 は、手術前と手術後の卵巢癌患者の血清サンプルにおける h K 6 濃度を示すグラフである。

図 9 は、血清 h K 6 濃度と C A 1 2 5 濃度との間の相関を示すグラフである。

図 1 0 は、血清 h K 6 濃度の敏感度と特異度を示すグラフである。

図 1 1 A は、h K 6 濃度対卵巢癌の病期を示すグラフである。

図 1 1 B は、h K 6 濃度対卵巢癌の悪性度を示すグラフである。

図 1 2 A は、生存可能性対無進行生存 (P F S) を示すグラフである。

図 1 2 B は、生存可能性対全生存 (O S) を示すグラフである。

10

【 0 0 3 4 】

図 1 3 (A) は、卵巢腫瘍抽出物における h K 6 比活性の度数分布を示すグラフである。35 ng / mg 総タンパク質の値は、カイ二乗解析によると、研究集団の全生存率を最も良好に予測する境界に相当する (カイ二乗プロットは、図 1 3 (B) 参照)。35 ng / mg 総タンパク質を超える h K 6 の腫瘍は h K 6 陽性と分類し、そして 35 ng / mg 総タンパク質より少ないか、または等しい値のものは h K 6 陰性と分類した。この基準により、腫瘍の 30% が陽性と分類された。(B) 最も良好に全生存率を予測する h K 6 陽性腫瘍と h K 6 陰性腫瘍との間の境界を判定するための、h K 6 腫瘍比活性対カイ二乗統計値のプロット。最大の潜在的予測能力は、28 ないし 40 ng h K 6 総抽出タンパク質で生じ、ピークは 35 ng h K 6 / mg 総抽出タンパク質であった。

20

【 0 0 3 5 】

図 1 4 は、正常卵巢組織 (「正常」) および卵巢癌 (「癌」) からの抽出物中の h K 6 濃度の比較を示すグラフである。N は、各グループの試料数を示す。水平の棒は、各グループにおける h K 6 比活性の中央値 (ng h K 6 / mg 総抽出タンパク質) を表す。クラスカル・ワリス検定により、抽出された h K 6 の比活性は、卵巢腫瘍標本で有意に上昇したことが示された (P < 0 . 0 0 1) 。

【 0 0 3 6 】

図 1 5 は、I / I I 期および I I I / I V 期の卵巢癌患者由来の腫瘍抽出物中の、h K 6 比活性 (ng h K 6 / mg 総抽出タンパク質) の分布を示すグラフである。N は、各グループに含まれる腫瘍数を示す。水平の棒は、h K 6 腫瘍比活性の中央値を表す。マン・ホイットニー検定により、h K 6 比活性は、I I I / I V 期の卵巢癌患者からの腫瘍において有意に上昇したことが論証された (P = 0 . 0 0 2) 。

30

【 0 0 3 7 】

図 1 6 は、研究下にある全患者集団のカプラン・マイヤーの生存率曲線 : h K 6 状態の影響を示す。上 : 無進行生存率 (P F S)。下 : 全生存率 (O S)。各グループの患者数 (n) は、h K 6 陽性と h K 6 陰性との間の生存率の差異について統計的に有意である (P 値) と示されている。進行と全生存の両方の時間に対する h K 6 陽性の悪影響は、有意である。

【 0 0 3 8 】

図 1 7 は、程度 I および I I の卵巢腫瘍患者における、無進行生存率 (P F S) と全生存率 (O S) に対する h K 6 状態 (陽性または陰性) の影響を示すグラフである。各グループの患者数 (n) は、h K 6 陽性の個体と h K 6 陰性の個体との間の生存率の差異について統計的に有意である (P 値) と示されている。進行と全生存の両方の時間に対する h K 6 陽性の悪影響は、有意である (P < 0 . 0 0 2) 。

40

【 0 0 3 9 】

図 1 8 は、様々な悪性状態、細胞タイプおよび起源 (上皮性対間葉性) の卵巢新生物における、h K 6 の免疫組織学的局在を示すプロットである。(A) 卵巢の一般的な悪性上皮性腫瘍である、侵襲性乳頭漿液腺癌 (i n v a s i v e p a p i l l a r y s e r o u s a d e n o c a r c i n o m a)。多数の腫瘍細胞の強い細胞質染色と、ストロマや脈管に全く染色がないことに注目されたい。(B) 上皮性と繊維性の良性混合新生物であ

50

る、漿液性嚢胞線維腫。繊維状成分に免疫染色は見られないが、嚢胞を囲む上皮の細胞質では強い陽性である。(C) 良性平滑筋腫瘍である、卵巢平滑筋腫。染色がないことに注目されたい。(D) 悪性状態が低い、中間的悪性度の上皮腫瘍である、ムチン上皮腫瘍。新生物上皮の弱い、拡散した細胞質染色と、支持ストロマに染色がないことに注目されたい(左端)。

【0040】

発明の詳細な説明

前述のように、本発明は対象由来の生体サンプル中のhK6を検出することにより、対象の卵巢癌腫をモニタリング、診断または予後する方法を提供する。ある実施態様では、本方法は、hK6に結合する試薬、好ましくは検出可能な物質で直接または間接的に標識されたhK6特異的抗体、とサンプルを反応させること、および検出可能な物質を検出することを含む。

10

【0041】

本発明の方法は、非疾患状態と比べて過剰量または不足量のhK6、または疾患状態(例えば、卵巢癌)もしくは疾患状態への進行に相応する、修飾されたhK6(例えば、全長に満たない)の存在の検出に使用してもよい。本明細書に記載した方法は、例えば宿主から新たに取出した細胞グループ中の、悪性または前悪性細胞の存在可能性を評価するのに使用してもよい。かかる方法は、腫瘍の検出、その成育の定量、および疾病の診断および予後の補助に使用できる。本方法は、癌転移の存在の検出、並びに手術、癌化学療法、および/または放射線療法後の、全腫瘍の非存在または除去の確認に使用できる。それらはさらに、癌化学療法および腫瘍の再出現のモニタリングに使用できる。

20

【0042】

本発明の方法は、後期卵巢癌腫の診断、および卵巢癌腫の疾病進行と致死性の予後に特に有用である。本明細書に例示説明するように、基準と比較して増大したレベルのhK6が血清中に検出されることは、後期疾病を示すものであり、そして基準と比較して増大したレベルのhK6が腫瘍組織またはその抽出物中に検出されることは、疾病進行および致死性のリスクの増大を示すものである。

【0043】

「サンプル」「生体サンプル」などの用語は、hK6を発現または含有すると分かっているか、または疑われる材料を意味する。試験サンプルは、供給源から得たまま直接か、あるいはサンプルの特性を改変する予処理に続いて、使用できる。サンプルは、細胞(例えば腫瘍細胞)を含む組織または抽出物、および例えば血液全体、血漿、血清、唾液、眼のレンズ液、脳脊髄液、汗、尿、乳汁、腹水、滑液、腹水などの、生理的液体などのいかなる生体供給源にも由来することができる。サンプルは、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトから入手できる。サンプルは、血液から血漿を調製する、粘性の液を希釈するなど、使用前に処理できる。処理方法は、濾過、蒸留、抽出、濃縮、妨害物質の不活性化、試薬の添加などを含むことができる。タンパク質をサンプルから単離し、本発明の方法に利用してもよい。好ましい実施態様では、生体サンプルは、血清または腫瘍組織抽出物であり、最も好ましくは血清である。

30

【0044】

本発明の実施態様では、本明細書に記載の方法を、対象由来の生体サンプル中のhK6を検出することによる、卵巢癌腫の診断およびモニタリングに、そして予想に適合させる。これらの適用は、試験される対象に由来するサンプル中に検出されるhK6の量を、他のサンプルまたは対象由来の以前のサンプルに検出されるレベル、または対照サンプルに検出されるレベルと比較することを要する。健康な対象または良性疾病の対象に由来する対照サンプルのレベルは、予期的および/または遡及的な統計的研究により確立し得る。臨床的に明らかな疾病または異常を持たない健康な対象を、統計的研究のために選択し得る。診断は、対照サンプルまたは同一対象で検出された過去のレベルと比較して、統計的に異なるhK6レベルを見出すことによってなされ得る。

40

【0045】

50

「hK6」の用語は、ヒトカリクレイン6（ザイム、プロテアーゼMおよびニューロシンとしても知られる）を表し、それは244アミノ酸長のトリプシン様セリンプロテアーゼであり、その16アミノ酸はシグナルペプチドを構成し、5アミノ酸は活性化ペプチドを構成する（7、8および9）。この用語は、GenBank受託番号AF013988、AF149289、HSU62801、D78203およびNM002774のヒトカリクレイン6の全ての相同体、天然産生対立遺伝子変異体、アイソフォームおよび前駆体を包含する。一般的に、例えば、ヒトカリクレイン6の天然産生対立遺伝子変異体は、GenBank受託番号AF013988、AF149289、HSU62801、D78203およびNM002774に示される配列と有意な相同性（70 - 90%）を共有する。対立遺伝子変異体は、KLK6配列からの保存的アミノ酸置換を含有し得、あるいは、例えばマウスカリクレイン6相同体などのhK6相同体中の対応する位置からのアミノ酸置換を含有するであろう。

10

【0046】

「対象」の用語は、卵巣癌に冒されているか、または冒されている疑いのある、哺乳動物などの温血動物を表す。好ましくは、「対象」はヒトを表す。

【0047】

本発明の方法で使用するhK6特異的抗体は、科学的または商業的供給源から入手し得る。あるいは、単離した天然のhK6または組換えhK6を、抗体、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、および免疫学的に活性な断片（例えば、Fabまたは(Fab)₂断片）、抗体重鎖、抗体軽鎖、ヒト化抗体、遺伝子的に加工した一本鎖F_v分子(Ladner et al, 米国特許第4,946,778号)、または、例えばマウス抗体の結合特異性を有するが、残りの部分はヒト由来である、キメラ抗体の調製に使用してもよい。モノクローナルおよびポリクローナル抗体、断片およびキメラを含む抗体は、当業者に既知の方法を使用して調製し得る。好ましくは、本発明の方法で使用する抗体は、10⁻⁷Mより大きいか、または等しいK_dで結合する場合、hK6に対して反応性である。本発明のサンドイッチ免疫アッセイでは、マウスポリクローナル抗体とウサギポリクローナル抗体を利用する。

20

【0048】

hK6と特異的に反応する抗体、または酵素結合もしくは標識誘導体などの誘導体は、様々な生体サンプル中のhK6の検出に使用し得る。それらは例えば、タンパク質の抗原決定因子と抗体との結合相互作用に依存するいかなる既知の免疫アッセイにも使用し得る。かかるアッセイの例は、放射性免疫アッセイ、酵素免疫アッセイ（例えば、ELISA）、免疫蛍光、免疫沈降、ラテックス凝集反応、血球凝集反応および組織学的試験である。

30

【0049】

hK6特異的抗体は、検出可能な物質で標識され、検出可能な物質の存在に基づいて生体サンプル中で局在化または同定されてもよい。検出可能な物質の例には、以下のもの：放射性同位元素（例えば、³H、¹⁴C、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、ルミノールなどの発光標識；酵素標識（例えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリフォスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ）、ビオチン基（これは、例えば蛍光マーカーまたは光学的方法や熱量測定方法で検出できる酵素活性を含むストレプトアビジンなどの、マークしたアビジンで検出できる）、二次レポーターに認識される、予め決定したポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）が含まれるがこれらに限定されるわけではない。hK6に反応する抗体に対する特異性を有する二次抗体の導入により一次抗原抗体反応が増幅される、間接的方法も採用し得る。例えば、hK6に特異性を有する抗体がウサギIgG抗体ならば、二次抗体は、本明細書に記載の検出可能な物質で標識されたヤギ抗ウサギガンマグロブリンであり得る。

40

【0050】

上記の抗体を結合または標識する方法は、当業者に容易に達成される（例えば、Inma

50

n, Methods In Enzymology, Vol. 34, Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B, Jakoby and Wichek (eds.), Academic Press, New York, p. 30, 1974; および Wilchek and Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications," Anal. Biochem. 171:1-32, 1988 re methods for conjugating or labelling the antibodies with enzyme or ligand binding partner 参照)。

【0051】

時間分解蛍光分析を、シグナルの検出に使用し得る。例えば、Christopoulos TK and Diamandis EP Anal Chem 1992:64:342-346 に記載の方法を、従来の時間分解蛍光光度計を用いて使用してもよい。

【0052】

従って、本発明の実施態様に従うと、hK6抗体を酵素で標識し、酵素の基質を添加する方法が提供される。但し、基質は基質または酵素と基質の反応生成物がランタニド金属と蛍光錯体を形成するように選択する。ランタニド金属を添加し、蛍光錯体の蛍光を測定することにより、サンプル中のhK6を定量する。hK6特異的抗体は、直接または間接的に酵素で標識し得る。酵素は、酵素の基質または酵素と基質の反応生成物がユーロピウムやテルビウムなどのランタニド金属と錯体形成する能力に基づいて選択される。適する酵素の例には、アルカリフォスファターゼおよび - ガラクトシダーゼが含まれる。好ましくは、酵素はアルカリフォスファターゼである。hK6抗体は、間接的に酵素で標識してもよい。例えば、抗体をリガンド結合対の1パートナーと結合させ、酵素をリガンド結合対のもう一方のパートナーと共役させてもよい。代表例には、アビジン-ビオチンおよびリボフラビン-リボフラビン結合タンパク質が含まれる。好ましくは、抗体をビオチン化し、酵素をストレプトアビジンと共役させる。

【0053】

本方法では、サンプル中のhK6に結合した抗体を、酵素の基質を添加することにより検出する。基質は、ランタニド金属(例えば、ユーロピウム、テルビウム、サマリウムおよびジスプロシウム、好ましくはユーロピウムおよびテルビウム)の存在下で、基質または酵素と基質の反応生成物がランタニド金属と蛍光錯体を形成するように選択する。かかる蛍光錯体をもたらす酵素と酵素の基質の例は、Diamandisの米国特許第5,3112,922号に記載されている。一例として、抗体が直接または間接的にアルカリフォスファターゼで標識されているとき、本方法で採用する基質は、リン酸4-メチルウンベリフェリルまたはリン酸5-フルオロサリチルである。錯体の蛍光強度は、典型的には、例えばCyberFluor 615 Imunoanalyzer (Nordion International, Kanata, Ontario)などの時間分解蛍光強度計を使用して測定する。

【0054】

サンプル、hK6特異的抗体またはhK6は、固定化してもよい。適する担体の例は、アガロース、セルロース、デキストラン、セファデックス(Sephadex)、セファロース(Sepharose)、リポソーム、カルボキシメチルセルロースポリスチレン、濾紙、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ガラスビーズ、ポリアミン-メチルビニルエーテル-マレイン酸コポリマー、アミノ酸コポリマー、エチレン-マレイン酸コポリマー、ナイロン、絹などである。担体は、例えば、チューブ、試験プレート、ウェル、ビーズ、ディスク、球体などの形状であってもよい。固定化抗体は、例えば臭化シアン共役などの既知の化学または物理学的方法を使用して、材料を適する不溶担体と反応させることにより調製し得る。

【0055】

ある実施態様によると、免疫アッセイでhK6を測定することにより、本発明は血液サン

10

20

30

40

50

ブルまたは腫瘍組織抽出物、好ましくは血清サンプル中のhK6を測定する手段を提供する。hK6の測定に様々な免疫アッセイ法を使用できることは、当業者に明らかである。一般に、hK6免疫アッセイ法は、競合または非競合的であり得る。典型的に、競合的方法には、固定化または固定可能なhK6の抗体(抗hK6)と、標識化形態のhK6を採用する。サンプルのhK6と標識化hK6が抗hK6への結合を競合する。生じる抗hK6に結合した標識化hK6(結合画分)を、非結合のままのもの(非結合画分)から分離した後、結合または非結合画分のいずれかの標識の量を測定し、例えば標準曲線との比較によるなど、任意の従来の方法で試験サンプル中のhK6量と関連させ得る。

【0056】

好ましくは、hK6の測定に非競合的方法を使用する。最も一般的な方法は、「サンドイッチ」方法である。このアッセイでは、2種の抗hK6抗体を採用する。抗hK6抗体の一方は、直接または間接的に標識化し(「検出抗体」と呼ばれることもある)、他方を固定化または固定可能にする(「捕獲抗体」と呼ばれることもある)。捕獲および検出抗体を同時または連続的に試験サンプルと接触させることができる。連続的方法は、捕獲抗体をサンプルとインキュベートし、予め決定した時間の後、検出抗体を添加すること(「順行」方法と呼ばれることもある)により達成される;または、最初に検出抗体をサンプルとインキュベートし、次いで捕獲抗体を添加することもできる(「逆行」方法と呼ばれることもある)。必要なインキュベーションが起こった後、アッセイを完了するために、捕獲抗体を液状試験混合物から分離し、分離した捕獲抗体相または液状試験混合物の残りの少なくとも一部で標識を測定する。一般に、捕獲と検出抗体とに結合された(間に「サンドイッチ」された)hK6を含むので、それは捕獲抗体相で測定する。

【0057】

典型的な2部位のhK6免疫測定アッセイでは、捕獲および検出抗体の一方または両方は、ポリクローナル抗体である。検出抗体で使用する標識は、当分野で従来既知のいずれのものからも選択できる。標識は、酵素または化学発光部分であり得るが、放射性同位元素、発蛍光団、検出可能なリガンド(例えば、標識化されたリガンドの結合パートナーによる二次的結合により検出可能)などであってもよい。好ましくは、抗体は酵素で標識し、酵素と基質の反応生成物が蛍光錯体を形成するように選択された基質を添加することによって検出される。捕獲抗体は、試験混合物の残部から分離される手段を提供するように選択される。従って、捕獲抗体は、既に固定された形態または不溶形態でアッセイに導入でき、あるいは固定可能形態、つまりアッセイに捕獲抗体を導入した後で固定化を達成させられる形態であり得る。固定化捕獲抗体は、磁気粒子、ラテックス粒子、マイクロタイタープレートのウェル、ビーズ、キュベットまたは他の反応容器などの固相に、共有結合または非共有結合的に結合した抗体を含み得る。固定可能捕獲抗体の例は、例えばハプテン、ピオチンなどのリガンド部分で化学的に修飾され、固定化形態のリガンドの結合パートナー、例えば抗体、アビジンなど、との接触により後で固定化できる抗体である。ある実施態様では、固相に結合した捕獲抗体の種特異的抗体を使用して、捕獲抗体を固定化し得る。

【0058】

本発明の特定のサンドイッチ免疫アッセイ方法は、hK6に対して反応性である2種の抗体、hK6に対して反応性である抗体に対する特異性を有する、酵素標識で標識化された二次抗体、および酵素の蛍光基質を採用する。ある実施態様では、酵素はアルカリフォスファターゼ(ALP)であり、基質はリン酸5-フルオロサリチルである。ALPは蛍光基質のリン酸5-フルオロサリチルからリン酸を切り取り、5-フルオロサリチル酸(FSA)を産生する。次いで、5-フルオロサリチル酸は、強い蛍光を発する三重複合体FSA-Tb(3+)-EDTAを形成でき、これはTb3+蛍光を時間分解様式で測定することにより定量できる。蛍光強度は、本明細書に記載のように時間分解蛍光光度計を使用して測定する。

【0059】

上記の免疫アッセイ方法と構成は、例示を意図しており、限定的意味ではなく、一般的に

、本発明ではいかなる免疫アッセイ方法または構成も使用できることが理解される。

【0060】

本発明の方法は、サンプル中の h K 6 を定量するための診断キットを使用して実行できる。一例として、キットは、h K 6 特異的抗体、酵素で標識されたその抗体に対する抗体；および酵素の基質を含み得る。キットはまた、マイクロタイタープレートのウェル、基準、アッセイ希釈剤、洗浄緩衝液、粘着性プレートカバー、および/またはキットを使用して本発明の方法を実行するための指示書も含み得る。

【0061】

h K 6 特異的抗体はまた、卵巣癌の管理におけるイメージング方法論で使用し得る。本発明は、h K 6、および場合により1種またはそれ以上の他のカリクレイン、好ましくは h K 4、h K 5、h K 8、h K 9、h K 10 および h K 11 を含むがこれらに限定されるわけではない、卵巣癌に伴うカリクレイン、を伴う腫瘍をイメージングするための方法を提供する。

10

【0062】

本発明はまた、複数の卵巣癌マーカーを使用する、本明細書に記載のイメージング方法も企図している。例えば、卵巣癌をイメージングする方法は、h K 6 に結合する試薬と、ヒト角質層キモトリプシン酵素 (H S C C E)、カリクレイン4、カリクレイン5、カリクレイン8、カリクレイン9、カリクレイン10、カリクレイン11、C A 1 2 5、C A 1 5 - 3、C A 1 9 - 9、O V X 1、リソホスファチジン酸 (L P A) または癌胚抗原 (C E A)、好ましくは C A 1 2 5 に結合する、1種またはそれ以上の試薬を利用し得る。好ましくは、イメージング中に区別できるように、各試薬を標識化する。

20

【0063】

ある実施態様では、本方法はインビボの方法であり、対象または患者は、イメージング標識を帯び、かつカリクレイン、好ましくは h K 6 を標的化または結合する能力のある1種またはそれ以上の試薬を投与される。試薬をインビボでインキュベートし、腫瘍、好ましくは卵巣腫瘍に伴うカリクレイン(類)に結合させる。標識の存在は卵巣癌に局在化し、そして当業者に既知のイメージング装置を使用して局在化した標識を検出する。

【0064】

試薬は、カリクレイン(類)を認識する抗体または化学物質であり得る。発明のある態様では、試薬は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、またはそれらの断片、または一本鎖抗体、二価抗体、分子認識ユニット、およびペプチドまたはペプチドを模倣する成分を含むがこれらに限定されるわけではない、それらの構成要素である。本発明の方法で使用するカリクレイン特異的抗体は、科学的または商業的供給源から入手し得、あるいは単離した天然カリクレインまたは組換えカリクレインを、本明細書に記載のように抗体などを調製するのに利用してもよい。

30

【0065】

試薬は、カリクレイン特異的抗体のエピトープを模倣し、かつカリクレインに結合するペプチドであってもよい。ペプチドは、従来の固相化学を使用して、合成業者で産生され得る。一例として、N₂S₂キレートが錯体形成するチロシン、リジンまたはフェニルアラニンのいずれかを含むペプチドを調製し得る(米国特許第4,897,255参照)。抗カリクレインペプチド結合体 (c o n j u g a t e) を、次いで放射性標識(例えば、^{99m}Tc 過テクネチウム酸ナトリウムまたは¹⁸⁸Re 過レニウム酸ナトリウム)と組合せ、それをカリクレイン産生腫瘍の位置を知るのに使用し得る。

40

【0066】

試薬は、カリクレインをイメージングするための標識を帯びる。試薬は、放射性核種イメージングで使用するために標識化し得る。特に、試薬は直接または間接的に放射性同位元素で標識化し得る。本発明で使用し得る放射性同位元素の例は、以下のものである：²⁷Ac、²¹¹At、¹²⁸Ba、¹³¹Ba、⁷Be、²⁰⁴Bi、²⁰⁵Bi、²⁰⁶Bi、⁷⁶Br、⁷⁷Br、⁸²Br、¹⁰⁹Cd、⁴⁷Ca、¹¹C、¹⁴C、³⁶Cl、⁴⁸Cr、⁵¹Cr、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、¹⁶⁵Dy、¹⁵⁵Eu、

50

¹⁸F、¹⁵³Gd、⁶⁶Ga、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷²Ga、¹⁹⁸Au、³H、¹⁶⁶Ho、¹¹¹In、^{113m}In、^{115m}In、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁸⁹Ir、^{191m}Ir、¹⁹²Ir、¹⁹⁴Ir、⁵²Fe、⁵⁵Fe、⁵⁹Fe、¹⁷⁷Lu、¹⁵O、^{191m}Os、¹⁹¹Os、¹⁰⁹Pd、³²P、³³P、⁴²K、²⁶Ra、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、^{82m}Rb、¹⁵³Sm、⁴⁶Sc、⁴⁷Sc、⁷²Se、⁷⁵Se、¹⁰⁵Ag、²²Na、²⁴Na、⁸⁹Sr、³⁵S、³⁸S、¹⁷⁷Ta、⁹⁶Tc、^{99m}Tc、²⁰¹Tl、²⁰²Tl、¹¹³Sn、^{117m}Sn、¹²¹Sn、¹⁶⁶Yb、¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb、⁸⁸Y、⁹⁰Y、⁶²Znおよび⁶⁵Zn。好ましくは、放射性同位元素は¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹¹¹I、^{99m}Tc、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、³²P、¹⁵³Sm、⁶⁷Ga、²⁰¹Tl、⁷⁷Br、または¹⁸Fであり、光学スキャン装置でイメージングされる。

10

【0067】

生体試薬を放射性同位元素で標識化する手法は、当分野で一般的に知られている。米国特許第4,302,438号は、トリチウム標識化の手法を記載している。特にマウスのモノクローナル抗体に適合させた、ヨウ化物化、トリチウム標識化、および³⁵S標識化の手法は、Goding, J. W. (前出, pp 124 - 126) およびそこで引用されている文献に記載されている。抗体、その結合部分、プローブ、またはリガンドなどの生体試薬をヨウ化物化する他の手法は、科学文献に記載されている (Hunter and Greenwood, Nature 144:945 (1962), David et al., Biochemistry 13:1014 - 1021 (1974) および米国特許第3,867,517号および第4,376,110号参照)。試薬のヨウ化物化手法は、Greenwood, F. et al., Biochem. J. 89:114 - 123 (1963); Marchalonis, J., Biochem. J. 113:299 - 305 (1969); および Morrison, M. et al., Immunochimistry, 289 - 297 (1971) に記載されている。^{99m}Tc - 標識化手法は、Rhodes, B. et al. in Burc hiel, S. et al. (eds.), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111 - 123 (1982) およびこれらで引用されている文献に記載されている。抗体または断片のテクネチウム - ^{99m}による標識化はまた、例えば米国特許第5,317,091号、米国特許第4,478,815号、米国特許第4,478,818号、米国特許第4,472,371号、米国特許第Re32,417号および米国特許第4,311,688号に記載されている。¹¹¹In - 標識化生体試薬に適する手法は、Hnatowich, D. J. et al., J. Immunol. Methods, 65:147 - 157 (1983), Hnatowich, D. et al., J. Applied Radiation, 35:554 - 557 (1984), および Buckley, R. G. et al., F.E.B.S. 166:202 - 204 (1984) に記載されている。

20

30

【0068】

本発明のインピボ方法のために、試薬はまた、常磁性同位元素で標識化してもよい。磁気共鳴イメージングで有用な要素の例には、ガドリニウム、テルビウム、スズ、鉄、またはこれらの同位元素が含まれる (インピボ核磁気共鳴イメージングについての考察には、例えば Schaefer et al., (1989) JACC 14, 472 - 480; Shreve et al., (1986) Magn. Reson. Med. 3, 336 - 340; Wolf, G. L., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 93 - 95; Wesbey et al., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 145 - 155; Runge et al., (1984) Invest. Radiol. 19, 408 - 415 を参照)。

40

【0069】

50

放射性標識化試薬の場合、試薬を患者に投与してもよく、それはその試薬が結合するカリクレインを有する腫瘍に局在化し、例えばガンマカメラやエミッション・トモグラフィを使用する放射性核種スキャニングなどのインビボの既知技法を使用して、検出または「イメージング」される(例えば A. R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", Monoclonal Antibody for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin et al., (eds.), pp. 65 - 85 (Academic Press 1985) 参照)。Brookhaven National Laboratory にある Pet VI と呼ばれるスキャナーのような、陽電子放出軸横断トモグラフィスキャナー(positron emission transaxial tomography scanner)も、放射性標識が陽電子を放出する場合(例えば、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 、および ^{13}N)に使用できる。 10

【0070】

放射性同位元素標識化試薬を使用する全身イメージング技法を、一次腫瘍と転移した腫瘍の両方の位置を知るために使用できる。カリクレイン特異的抗体、または同じエピトープ特異性を有するその断片を、適する放射性核種またはその組合せに結合させ、非経口的に投与する。卵巣癌には、投与は、好ましくは静脈注射である。標識の生体分布をシンチグラフィでモニタリングし、標識の蓄積を卵巣癌細胞の存在と関連付ける。全身イメージング技法は、米国特許第4,036,945号および第4,311,688号に記載されている。診断および治療的使用に有用な、抗体および抗体断片と対になれる試薬の他の例には、金属結合性タンパク質および断片(例えば、米国特許第4,732,864号)が含まれる。これらの試薬は、癌、特に卵巣癌の病期診断(diagnosis staging)および可視化に有用であり、手術および/または放射線処置計画をより効果的に使用できるようにする。 20

【0071】

本発明は、本発明の方法を実行するためのキットも企図している。キットは、抗体またはカリクレインのエピトープに特異的に結合する抗体断片、および腫瘍細胞に伴うエピトープへの抗体の結合を検出する手段を、使用前にさらに希釈され得る濃縮物(凍結乾燥組成物を含む)として、あるいは使用時の濃度で含み、バイアルは1またはそれ以上の用量を含み得る。キットがインビボでの使用を企図されている場合、所望の量と濃度の試薬を有する単用量を滅菌容器内に提供してもよい。直接的使用のための製剤を提供する容器は、通常他の試薬を必要としない。例えば、キットがインビボイメージング用の放射性標識抗体の調製物を含有する場合である。 30

【0072】

以下の非限定的実施例は、本発明の例示説明である。

実施例 1

ヒトカリクレイン 6 (ザイム / プロテアーゼ M / ニューロシン) の免疫蛍光測定アッセイ材料と方法

ジフルーニサルリン酸塩 (DFP) は、実験室で合成した (ジフルーニサルは、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO から入手した)。DFP 原液は、0.1 モル / L NaOH 中、0.01 モル / L であった。DFP 原液は、4 で少なくとも 6 ヶ月間安定である。アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (GAR Ig - ALP) とヒツジ抗マウス免疫グロブリン G (Fc フラグメント特異的) は、Jackson Immunoresearch, West Grove, PA から入手した。GAR Ig - ALP の作業溶液は、アッセイ緩衝液 (後述) 中で原液を 3,000 倍に希釈して調製した。白色、不透明の 12 - ウェルポリスチレンマイクロタイター小片は、Dynatech Labs., Alexandria, VA から入手した。基質緩衝液は、1 リットル当り 0.1 モルの NaCl と 1 m モルの MgCl_2 を含有するトリス緩衝液 (0.1 モル / L、pH 9.1) であった。基質作業溶液 (DFP、基質緩衝液中 1 m モル / L) は、DFP 原液を基質緩衝液中で 10 倍に希釈して使用直前に調製した 40 50

。洗浄溶液は、1 Lの10 mモル/Lトリス緩衝液、pH 7.40中に、9 gのNaClと0.5 gのポリオキシエチレンソルビタンモノラウリン酸塩(Tween 20)を溶解させて調製した。現像溶液は、1リットル当り、1モルのトリスベース、0.4モルのNaOH、2 mモルのTbCl₃および3 mモルのEDTAを含有した(pH調整なし)。アッセイ緩衝液Aは、1リットル当り60 gのBSA、0.5 gのアジ化ナトリウム、100 mLの正常ヤギ血清、25 mLの正常マウス血清、5 gのウシIgGおよび0.5 gのTween 20を含有する、50 mモル/Lトリス緩衝液、pH 7.40であった。アッセイ緩衝液Bは、マウス血清を省く以外は、アッセイ緩衝液Aと同じであった。

【0073】

臨床サンプル

いくつかの臨床サンプルを使用して、hK6の存在を調べた。これらには、男性および女性の個体(健康血液ドナー)からの血清および尿のサンプル、針吸引で得られた乳房嚢胞液、以前に記載のように調製した乳癌細胞質抽出物(11)、羊水、授乳女性の乳汁、精漿、乳頭吸引液(NAF)および脳脊髄液(CSF)が含まれた。さらに、以前に記載のように調製したヒト組織細胞質抽出物のパネルを試験した(Hassapoglidou, S. et al Oncogene 1993, 8:1501-1509)。最適測定条件を確立するために、全サンプルを様々な希釈率で試験した。手法は、1983年に改訂された、1975年のヘルシンキ宣言の倫理基準に従った。全組織および液のサンプルは、使用するまで-80で貯蔵した。

10

【0074】

器具

時間分解蛍光光度計、CyberFluor 615 Immunoanalyzer (MDS Nordion, Kanata, ON, Canada)を使用して、白色マイクロタイターウェル中のTb³⁺蛍光を測定した。この手法は、別に詳細に記載されている(Christopoulos, TK, et al Anal Chem 1992, 64:342-346; Ferguson RA et al, Clin Chem 1996 42:675-684)。

20

【0075】

手法

組換えhK6タンパク質の産生と精製 1.4-kbのhK6 cDNAを含有するプラスミドをトランスフェクションしたヒト293細胞を、3週間G418(400 mg/L)中で生育させて選択し、その後時間安定形質転換体を単離した。1つのクローンが、培養培地中に同定可能な量のhK6タンパク質を生成した。この細胞系を培養し、組織培養上清を回収し、Centricon 限外濾過装置(Millipore, Waltham, MA 02454)を使用して濃縮した。濃縮細胞培養上清からのhK6の精製は、0.1%トリフルオロ酢酸/アセトニトリルの線状勾配を使用する逆相高圧液体クロマトグラフィー(C-8, Aquapore RP-300, 0.45 x 25 cm, Applied Biosystems, Foster City, CA)により達成した。一般に、勾配は1分につきアセトニトリル1%の割合で増大した。hK6を含有する画分の位置をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確かめ、回収し、凍結乾燥し、-20で貯蔵した(Little SP et al, J. Biol Chem 1997:272:251135-25142)。

30

40

【0076】

hK6に対するポリクローナル抗体の生成 精製した組換えhK6タンパク質を使用して、標準的な手法を用いてウサギとマウスを免疫した(Campbell Am, Production and purification of antibodies. In: Immunoassay. Diamandis EP Christopoulos TK (eds) 00.95-115, Academic Press, San Diego, 1996)。さらに精製せず、ウサギとマウスの抗血清を免疫蛍光測定アッセイの開発に使用した。

50

【0077】

ヒツジ抗マウス免疫グロブリンによるマイクロタイタープレートの被覆 50 mモル/L トリス緩衝液、pH 7.80に希釈した被覆抗体を1ウェルにつき500 ng / 100 μ Lで一晩インキュベートすることにより、白色ポリスチレンマイクロタイターウェルを被覆した。次いでウェルを洗浄溶液で6回洗浄し、200 μ L / ウェルのブロック溶液(50 mモル/Lのトリス、pH 7.80中の10 g / L BSA)で1時間ブロックした。さらに6回洗浄した後、ウェルの使用準備が整った。

【0078】

hK6較正 1リットルにつき60 gのBSAと0.5 gのアジ化ナトリウムを含有する50 mモル/Lトリス緩衝液、pH 7.80中で組換え精製hK6タンパク質を希釈することにより、0、1、5、20、50および200 μ g / LのhK6較正剤(calibrator)を調製した。 10

【0079】

hK6アッセイ 較正剤またはサンプル(100 μ L)を、マイクロタイターウェルにピペットで移し、そしてアッセイ緩衝液Bで5,000倍に希釈したポリクローナルマウス抗hK6抗血清50 μ Lを添加した。次いでウェルを室温で2時間、震盪しながらインキュベートし、6回洗浄した。各ウェルにアッセイ緩衝液Aで1,000倍に希釈したウサギ抗hK6抗体100 μ Lを添加し、上記のように30分間インキュベートし、次いで6回洗浄した。アッセイ緩衝液Aで3,000倍に希釈した、アルカリフォスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ免疫グロブリン100 μ Lを各ウェルに添加し、上記のように30分間インキュベートした。次いでウェルを6回洗浄した；1 mモル/LのDFP作業基質溶液100 μ Lを添加し、上記のようにウェルを10分間インキュベートした。100 μ Lの現像溶液を各ウェルに添加し、ウェルを機械震盪により1分間混合し、時間分解蛍光度計で蛍光を測定した。較正とデータの換算は、CyberFluor 615 Immunoanalyzerで自動的に実施した。 20

【0080】

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：別に記載された手法(Yu H, Diamandis EP, Clin Chem 1993: 39: 2108 - 2114; Diamandis, EP at al Clin Chem 1997: 43: 1365 - 1371)を使用して、様々な体液をゲル濾過カラムで分別した。HPLC画分を回収し、開発した免疫蛍光測定アッセイでhK6について分析した。 30

【0081】

結果

アッセイの最適化

組換えhK6タンパク質に対する2種のポリクローナル抗体を使用した。一方はマウスで生成させ、他方はウサギで生成させた。選択したアッセイの構成(ヒツジ抗マウス抗体によるウェルの間接的被覆およびアルカリフォスファターゼに結合したヤギ抗ウサギ免疫グロブリンによる免疫複合体の検出)は、一次抗体の精製や結合を必要とせずに、良好な感度を示した(後述)。使用する抗体の量、様々なアッセイ段階の希釈剤およびインキュベーション時間を最適化した。最低の達成可能検出限界および最良のアッセイ線形性およびダイナミック・レンジに基づいて、最適条件を選択した。最終的な条件は前記した。 40

【0082】

較正曲線、検出限界、精度

提唱するhK6アッセイの典型的な較正曲線を図1に示す。ゼロ較正プラス2つの標準偏差の蛍光に相応するhK6濃度として定義される検出限界は、 $\leq 0.5 \mu$ / Lである。作動(run)中および作動間の精度を、様々な臨床サンプルを用いて2 - 50 μ g / Lの間の様々なhK6濃度で評価した。全件で、変動係数(CV)は2ないし9%であり、典型的なマイクロタイタープレートベースの免疫アッセイの精度と一致した。

【0083】

特異性

h K 6 タンパク質は、様々な体液で検出された。免疫蛍光測定アッセイが h K 6 を高い感度と特異性で測定することを確認するために、3種の体液（即ち、1つは授乳女性由来のヒト乳汁、1つは脳脊髄液、そして1つは血清中に高レベルのこのバイオマーカーを有することが分かっている卵巢癌患者由来の血清サンプル）をゲル濾過カラムで分離し、ゲル濾過カラム上で測定した。結果を図2に示す。試験した3種全部の体液中に、分子量 ~ 30 k D a の単一の免疫反応種が検出され、これは h K 6 タンパク質の分子量と一致した。これより高い分子量の複合体は検出されず、これらの体液中で h K 6 が遊離形態で存在することを示唆した。他の血清プロテアーゼ（例えば、P S A）は、大部分がプロテアーゼ阻害剤と結合して血清および他の液の中に存在している（S t e n m a n U - H , e t a l , C a n c e r R e s . 1 9 9 1 : 5 1 : 2 2 2 - 2 2 6）; C h r i s t e n s s o n A e t a l C u r J B i o c h e m 1 9 9 0 ; 1 9 4 ; 7 5 5 - 7 6 3）。

10

【0084】

体液および組織抽出物中の h K 6

体液中の h K 6 の存在について予備的情報を得るために、表1に示すように様々な臨床サンプルを分析した。最高濃度の h K 6 は授乳女性の乳汁に見出され、続いて脳脊髄液、乳頭吸引液および乳房嚢胞液であった。h K 6 はまた、男性と女性の血清サンプル、精漿の大部分、そして比較的低い割合で羊水および乳房腫瘍細胞質抽出物にも検出された。h K 6 タンパク質は、尿中に検出されなかった。

【0085】

数々のヒト組織細胞質抽出物を試験した。最高濃度の h K 6 は唾液腺で検出され、続いて肺、結腸、輸卵管、胎盤、乳房、下垂体および腎臓であった。試験した次の組織は陰性であった：皮膚、脾臓、骨、甲状腺、心臓、輸尿管、肝臓、筋肉、子宮内膜、精巣、膵臓、精囊、卵巢、副腎および前立腺（図3）。

20

【0086】

考察

本発明者らは、体液および組織抽出物中の h K 6 タンパク質を定量するのに適するポリクローナル抗体と免疫蛍光測定手法を開発した。h K 6 タンパク質の豊富な天然供給源は未知であったので、ポリクローナルウサギおよびマウス抗体を生成させるのに組換え h K 6 タンパク質を使用した。この組換えタンパク質は、いかなる混入タンパク質もない高純度を保証する。選択されたアッセイ構成は、使用する一次抗体のさらなる精製や結合を必要とせず、従って鋭敏な免疫蛍光測定手法の開発に便利な方法である。同じ原理は、以前に、体液中の p 5 3 腫瘍抑制因子の測定に採用された（H a s s a p o g l i d o u S e t a l , O n c o g e n e 1 9 9 3 : 8 : 1 5 0 1 - 1 5 0 9）。

30

【0087】

開発された h K 6 タンパク質の免疫アッセイは、良好な感度、ダイナミック・レンジおよび線形性を示した（図1）。このアッセイは、調べる体液中に単一の免疫反応性バンドを検出することが、さらに立証された。血清では、このプロテアーゼは、h K 2 測定での観察と同様に、遊離形態で存在する（B l a c k , M H e t a l C l i n C h e m 1 9 9 9 ; 4 5 : 7 9 0 - 7 9 9）。しかしながら、これは、大部分が γ - アンチキモトリプシンに結合して血清中に存在することが知られている、P S A の状況と対照的である（S t e n m a n U - H , e t a l , C a n c e r R e s . 1 9 9 1 : 5 1 : 2 2 2 - 2 2 6）; C h r i s t e n s s o n A e t a l C u r J B i o c h e m 1 9 9 0 ; 1 9 4 ; 7 5 5 - 7 6 3）。

40

【0088】

比較的多数の体液の探索により、h K 6 タンパク質は授乳女性の乳汁および乳頭吸引液や乳房嚢胞液を含む他の乳房分泌物中に比較的高濃度で存在することが示された（表1）。以前に、P S A と h K 2 を含む他のカリクレインの存在が、これらの体液で論証されてきた（Y u , H D i a m a n d i s ; C l i n C h e m 1 9 9 5 : 4 1 : 5 4 - 5 8 ; S a u t e r E R e t a l C a n c e r E p i d e m i o l B i o m a r k e

50

rs Prevent 1996 967 - 970 ; Diamandis Ep et al Breast Cancer Res Treat 1996 38 : 259 - 264 ; Balck MH et al Br J Cancer 2000 ; 82 : 361 - 367 ; Blcak MH et al Clin Chem 1999 ; 45 : 790 - 799 ; yu H . and Diamandis EP Clin Chem 1995 : 41 : 204 - 210 ; Black MH Diamandis EP , Breast Cancer Res Treat 2000 59 : 1 - 14) 。 大量のhK6タンパク質が脳脊髄液に検出され、このことはhK6が脳組織において高レベルで発現しているという観察と一致する (Little , 前出) 。 hK6は、男性と女性の血清および精漿、そして低い割合で羊水および乳房腫瘍細胞質にも見出された。以前に、PSAとhK2は、同様にこれらの体液中で立証されている (Yu , H Diamandis ; Clin Chem 1995 : 41 : 54 - 58 ; Sauter ER et al Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent 1996 967 - 970 ; Diamandis Ep et al Breast Cancer Res Treat 1996 38 : 259 - 264 ; Balck MH et al Br J Cancer 2000 ; 82 : 361 - 367 ; Blcak MH et al Clin Chem 1999 ; 45 : 790 - 799 ; yu H . and Diamandis EP Clin Chem 1995 : 41 : 204 - 210 ; Black MH Diamandis EP , Breast Cancer Res Treat 2000 59 : 1 - 14) 。 精漿は極めて高いレベルのPSAとhK2を含有するが (Diamandis EP Trends Endocrinol Metab 1999 : 25 : 14 - 26 ; Rittenhouse He et al Crit Rev Clin Lab Sci 1998 : 35 : 275 - 368) 、本明細書に記載のアッセイでは、非常に少量のhK6がこの体液で検出された (表1) ことに注目するのは興味深い。このことはさらに、相同タンパク質であるPSAとhK2が、開発されたhK6アッセイといかなる重大な交差反応性も有さないことを立証する。

【0089】

本発明で開発されたアッセイは、体液中のhK6タンパク質を検出するための最初の方法を示している。結果はさらに、その推定アミノ酸配列から予想されたように、hK6が分泌タンパク質であることを立証する (Yousek GM et al Genomics 1999 ; 62 : 251 - 259) 。

【0090】

実施例 2

材料と方法

hK6の免疫蛍光測定アッセイ

この免疫蛍光測定アッセイの詳細は、既に説明した (実施例 1 および参考文献 12 を参照) 。 アッセイは、一方はマウスで生成させ、他方はウサギで生成させた2種のhK6特異的ポリクローナル抗体を利用した。これは、時間分解蛍光測定の原理を検出に組込んだ、非競合的免疫蛍光測定手法である。アッセイは、 < 10% の精度で 0.5 - 200 μg / L の範囲のhK6を測定した。血清サンプルは、サンプルの予処理なしで分析した。

【0091】

この調査では、様々な悪性腫瘍を有する患者から得た血清サンプルの残りを使用した (表 2) 。 血清中で起こり得るhK6上昇を検出する機会を増やすために、比較的高い腫瘍負荷を有する患者 (正常の上限より少なくとも10倍高い腫瘍マーカーレベルで示される) を含めた。全血清サンプルは、 - 20 で分析まで最長1年間貯蔵した。手法は、1983年に改訂された、1975年のヘルシンキ宣言の倫理基準に従った。

【0092】

腫瘍マーカーの分析

腫瘍マーカーCA125、PSA、CEAおよびAFPを、Elec Sys 免疫アッセイ分析機 (Roche Diagnostics , Indianapolis , IN)

で分析した。CA15.3、CA19.9およびhCGは、Immuno 1 免疫アッセイ分析機 (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) で分析し、カルシトニン は、Diasorin, Italy の放射性免疫アッセイキットで測定した。腫瘍マーカーの正常値の上限は、35 KU/L (CA125)、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ (PSA)、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ (AFP)、5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (CEA)、35 KU/L (CA15.3)、37 KU/L (CA19.9)、10 IU/L (hCG) および 100 ng/L (カルシトニン) であった。

【0093】

結果

全部で378個の血清サンプルを、以前に記載されたhK6の免疫蛍光測定アッセイで分析した(12)。これらのサンプルは、正常個体(男性および女性)由来、または様々な悪性腫瘍の患者由来のいずれかであった。得られたデータを表2に示す。hK6濃度は15 $\mu\text{g}/\text{L}$ (任意のカットオフ)を、正常対照の全てが超えず、そして卵巣以外の悪性腫瘍の患者に由来するサンプルでは2個のみが超えたが、卵巣癌腫患者の大部分(~66%)では、血清のhK6濃度がかなり上昇していた(>15 $\mu\text{g}/\text{L}$)。卵巣癌患者の血清のhK6値分布を、図4に示す。図5に示すように、hK6濃度とCA125レベルとの相関は乏しく、統計的に有意ではない。

【0094】

図6では、4人の卵巣癌患者における連続的な血清hK6とCA125濃度の経時変化についてのデータを提示する。モニタリング期間中にhK6濃度は変化し、CA125と同様に、この新バイオマーカーは、患者の管理に有用性を有し得ることを示唆している。

【0095】

考察

表2のデータは、調査結果をまとめたものであり、試験したあらゆる癌のタイプ(正常男性および女性対、乳癌、甲状腺癌、精巣癌、胃腸の癌、前立腺癌、肺癌および卵巣癌)の中で、卵巣癌患者のみが、循環器系におけるこのバイオマーカーレベルの有意な上昇を示すことを立証する。約66%の患者が、試験した他のあらゆる癌の特異度を98-100%まかなえるカットオフである、15 $\mu\text{g}/\text{L}$ より高いレベルを有した。これらのデータは非常に有望であるが、卵巣癌腫の循環器系バイオマーカーとしてのhK6の価値に関して、全卵巣癌患者が比較的高レベルのCA125(≥ 372 KU/L、これは参照範囲上限より約10倍高い)を有することを考慮するべきである。図6のデータは、hK6の血清レベルが卵巣癌モニタリング中に経時変化することを示し、このバイオマーカーが初期処置後の患者のモニタリングに有用であり得ることを示唆している。

【0096】

図5から明らかなように、hK6濃度とCA125との間には有意な相関はなく、これら2つのバイオマーカーが卵巣癌腫の診断と管理のために相補的であり得ることを示唆している。

【0097】

結論として、約66%の卵巣癌患者において、血清hK6濃度が有意に増大している最初の証拠が提供される。他の様々な悪性腫瘍で増大が見られなかったため、本試験は卵巣癌特異的と考えられる。従って、hK6は、卵巣癌の新しい血清バイオマーカーになり、それは疾病の診断およびモニタリングに有用であり得る。

【0098】

実施例3

材料と方法

患者集団

本研究には、97人の明らかに健康な女性(26から72歳; 平均値 = 52歳、中央値 = 49歳)、141人の良性疾病の女性(21から76歳; 平均値 = 46歳、中央値 = 45歳)および146人の組織学的に証明された一次卵巣腫瘍の患者(28から78歳; 平均値 = 56歳、中央値 = 57歳)が含まれた。良性病変のうち、50人は子宮内膜性に、2

2人はムチン性 (mucinosum) に、10人は卵巣奇形腫性に、26人は類皮性 (dermoidea) に、15人は黄体性に、そして18人は漿膜性に分類された。腫瘍は、国際産科婦人科連合 (FIGO) の基準に従って病期に分類した。組織学的分類は、世界保健機関およびFIGOの勧告に基づいた。病期、悪性度、組織タイプ、手術後の残存腫瘍、減容積 (debulking) の成功および化学療法への反応に関する卵巣癌患者の特徴を、表7に示す。全患者の血清サンプルを手術前、治療開始前に回収し、分析まで - 80 で貯蔵した。105人の卵巣癌患者について、血清は手術後にも入手可能であった。このサンプルは手術の約2 - 3週間後に得られた。

【0099】

血清は、次の4施設から得た：トリノ大学婦人科腫瘍学部門、イタリア (正常の97人、良性の14人、癌の21人)；オランダ (癌の40人)；ベルギー (良性の13人、癌の85人)；フィンランド、ヘルシンキ大学中央病院、臨床化学部 (良性の114人)。

10

【0100】

中央値25ヶ月 (1 - 106ヶ月の範囲) の期間、生存率と疾病の進行について患者をモニタリングした。131人の卵巣癌患者について、追跡情報が入手可能であった。これらのうち、追跡期間中に64人 (49%) が再発し、28人 (21%) が死亡した。

【0101】

hK6とCA125の分析

CA125は、市販の自動免疫アッセイ法 (Immulite 2000, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) で測定した。この方法では、正常の上限は23 KU/Lである。hK6の濃度は、ここで記載した手法 (12) を幾分か改良したものをを用いて測定した。このアッセイでは、マイクロタイターウェルに直接被覆したモノクローナル抗hK6マウス抗体 (捕獲抗体)、ポリクローナルウサギ検出抗体およびアルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ抗体を採用した。シグナルを時間分解蛍光測定法により定量した。アッセイは、0.1 μg/Lの検出限界と、50 μg/Lまでのダイナミック・レンジを有した。精度は測定範囲内で < 10%であった。各作動につき3つの品質管理用サンプルを含め、血清サンプルを2部で分析した。

20

【0102】

統計解析

データを解析するために、臨床および病理学的パラメーターに従って、患者を異なるグループに分けた。手術前後のhK6血清濃度間の差異の解析を、ノンパラメトリックのマクニマーの検定で実施した。二項分布を使用して、マクニマー検定の有意レベルを計算した。

30

【0103】

敏感度対 (1 - 特異度) をプロットしてhK6およびCA125血清濃度について受信者動作特性 (ROC) 曲線を構築し、ROC曲線より下の面積 (AUC) を算出した。非癌グループには、正常個体および良性疾病の患者が含まれた。異なる変量間の相関を、スピアマン相関係数により評価した。ノンパラメトリックのマンホイットニーU検定を使用して2グループ間の差異を判定し、2以上のグループ間の差異の解析にノンパラメトリックのクラスカル・ワリス検定を使用した。これらの試験では、血清中のhK6濃度を連続変量として扱った。hK6血清濃度は、hK6陽性 (> 4.4 μg/L) またはhK6陰性 (< 4.4 μg/L) としても分類された。この二分法的変量と他の臨床病理学的変量の関係は、適するようにカイ二乗 (χ^2) 検定またはフィッシャーの直接法で確立した。

40

【0104】

hK6陽性とhK6陰性の患者との間の生存率の差異を立証するために、カプラン・マイヤーの無進行生存率および全生存率の曲線を構築した。ログランク検定を使用して生存曲線間の差異の有意さを調べた。患者の全生存率 (OS) と疾病の進行 (無進行生存率; PFS) に対する血清hK6濃度の影響を、一変量と多変量の両方のコックス比例ハザード回帰モデルにより計算したハザード比で評価した。多変量解析では、疾病の病期、腫瘍の

50

悪性度、残存腫瘍および組織学的タイプを含む、生存に影響し得る臨床および病理学的変量を補正した。

【0105】

結果

癌および非癌患者の血清hK6濃度：非癌（正常； $n = 97$ ）、良性疾病（ $n = 141$ ）、手術前（ $n = 146$ ）および手術後（ $n = 105$ ）の卵巢癌患者の血清hK6濃度の平均値、中央値、範囲および選択した百分位の値を、表3に示す。非癌（正常）と良性疾病の患者との間の平均値と中央値は、統計的に有意ではなかった。手術前の卵巢癌患者の平均および中央hK6値は、非癌と良性のグループより有意に高かった（ $p < 0.001$ ）。患者の3グループ（正常、良性、手術前の卵巢癌）のhK6濃度の分布を、対応するCA125値と共に図7にさらに表示する。明らかに、手術前の血清hK6濃度は、正常と良性疾病の患者との間で異ならないが、卵巢癌患者の割合では有意に上昇している（図7A）。逆に、CA125値は正常から良性へ、癌患者へ、漸進的に増大している（図7B）。

【0106】

hK6陽性とhK6陰性としてこの患者集団を二分的に分類するには、 $4.2 \mu\text{g/L}$ （診断特異度90%）と $4.4 \mu\text{g/L}$ （診断特異度95%）のhK6カットオフを選択した。

【0107】

手術後の血清hK6濃度の変化：105人の卵巢癌患者について、手術前と手術後の血清サンプルを選択した。図8に示すように、71人の患者（68%）が、手術後にhK6濃度の低下を示し、21人（20%）は値が変化せず、そして13人は術後により高いhK6血清レベルを有した。マクニマー検定により、手術後の濃度低下は統計的に極めて有意であった（ $p < 0.001$ ）。

【0108】

血清hK6とCA125濃度との間の相関：図9の対数プロットは、血清hK6濃度とCA125濃度との間に弱い相関があることを示す（スピアマン相関 $r_s = 0.44$ ）。相関は有意であるが、なお多くの完全に可変の値を有するサンプルがある。例えば、約500KU/LのCA125レベルでは、hK6濃度は2 - 40 $\mu\text{g/L}$ の範囲であるが、一方約6 $\mu\text{g/L}$ のhK6レベルのサンプルは、5から>5,000KU/Lの範囲のCA125値を有し得る。

【0109】

血清hK6濃度の診断感度と特異度：この計算には、表4に示すように、患者の様々なサブグループを考慮した。非癌グループには、正常か、または良性疾病を有するかの全患者が含まれた。全患者グループを解析すると、診断感度は90%の特異度で約54%、そして95%の特異度で50%であった。図10の受信者動作特性（ROC）曲線は、hK6と比較して、CA125がわずかに診断的に有利であることを示す。しかしながら、hK6濃度は比較的低いCA125の患者のサブセットで上昇し得るので、2つのマーカーは組合せて作用できる。CA125 > 60KU/Lの患者のサブグループでは、hK6の診断感度は、90および95%の特異度で各々71および65%であった。低CA125 (< 23KU/L)の患者のサブグループでは、約13 - 17%の患者は、hK6カットオフ4.4（特異度95%）または4.3 $\mu\text{g/L}$ （特異度90%）で、各々なお上昇したhK6を有した。CA125がわずかに上昇した（23 - 60KU/L）患者のサブグループでは、hK6の診断感度は、95 - 90%の特異度で各々15 - 26%であった（表4）。

【0110】

表5では、CA125単独またはCA125プラスhK6のいずれかを使用して、卵巢癌患者の同定におけるhK6のさらなる貢献を計算した。病期の分かる全患者（ $N = 124$ ）の中で、hK6分析は、CA125の感度を、両マーカーの特異度カットオフ90%または95%で、12%または13%まで増大させる。卵巢癌病期I/II（43人の患

者)で、貢献はなお有意であった。h K 6 の追加は、C A 1 2 5 単独の敏感度を、両マーカーの特異度カットオフ90%または95%で、30%から42%まで、または26%から37%まで各々上昇させた。

【0111】

表6は、血清h K 6濃度に基づいて、卵巣癌を有する相対的リスク(RR)をまとめる。相対的リスクは、h K 6濃度の増大に伴い指数関数的に上昇し、h K 6が $\geq 4.3 \mu\text{g/L}$ のとき20の値に達した。RRは、多変量解析でC A 1 2 5レベルを補正した後、なお実質的であった(RR = 5.3)。

【0112】

血清h K 6の予後的価値：高い卵巣癌病期と悪性度は、高い血清h K 6濃度と強く関連する(図1および表7)。さらに、漿液性腺癌腫は、より頻繁に高い血清h K 6濃度と関連し(確率68%)、子宮内膜性腫瘍(確率33%)が続く；ムチン性腫瘍はまれにしか高い血清h K 6に関連しない(9%)。さらに、高い血清h K 6濃度は、残存腫瘍の存在、最適下限の減容積および乏しい化学療法への反応に関連する。これらの全関連は、極めて有意であった($p < 0.001$)。 10

【0113】

一変量コックス解析では、血清h K 6濃度は、短い無進行生存と全生存に関連した(表8)。これらの関連は、多変量解析で統計的に有意のままであった。C A 1 2 5の予後的価値は、多変量解析ではもはや統計的に有意ではなかった。手術前の血清h K 6を除いて、疾病の病期は、多変量解析において無進行生存率と全生存率の両方に関連する参考パラメーターにすぎなかった(表6)。 20

【0114】

同様のデータが、カプラン・マイヤーの生存分析(図12)で得られた。手術前の血清h K 6が高い患者は、術前のh K 6レベルが低い患者より、もっと短い無進行生存と全生存を有した。高い血清h K 6の実質的に全ての患者が6年までに再発した一方で、低い術前血清h K 6の患者の50%以上は、鎮静したままであった。

【0115】

考察

早期診断、予後、治療反応のモニタリングおよび予測のための新たな卵巣癌バイオマーカーの発見は、臨床成果の改善に貢献するであろう。十分に受入れられている唯一の卵巣癌バイオマーカーであるC A 1 2 5は、20年前に発見された。数々の可能性のある他の卵巣癌バイオマーカーが同定されたが、それらの臨床的価値は確立されていない(27)。新規卵巣癌バイオマーカーである、拡張されたヒトカリクレイン遺伝子ファミリーの構成員のヒトカリクレイン6(h K 6)が、本明細書に記載されている。 30

【0116】

伝統的な卵巣癌バイオマーカーであるC A 1 2 5は、早期の卵巣癌を診断できるには及ばない。早期疾病に対する低敏感度に加えて、C A 1 2 5はまた、低い特異度、即ちレベルの上昇が多く、腹部の良性疾病にも見られるという欠点も持つ。現在、単一の癌バイオマーカーが最適な癌診断および管理に必要な全情報をもたらすわけではないことが、広く受入れられている。現在の趨勢は、組合せて使用できる複数のバイオマーカーの同定に焦点を当てることである。かかるアプローチは、卵巣癌で臨床的な将来性を有すると既に示されている(28、29)。 40

【0117】

血清h K 6は、卵巣癌腫の新規バイオマーカーに当る。このバイオマーカーは、C A 1 2 5よりも卵巣癌に特異的である。なぜなら、C A 1 2 5と対照的に、良性疾病で上昇が見られないからである(図7)。h K 6の診断敏感度は、同じ特異度カットオフでC A 1 2 5の診断敏感度よりわずかに低い(表5および図10)。しかしながら、h K 6は、病期I/IIの疾病を含む疾病の全病期で、C A 1 2 5の診断敏感度を増大させる(表5)。h K 6とC A 1 2 5との間の弱い相関にも関わらず(図9)、上昇したh K 6レベルを有する正常なC A 1 2 5の患者が依然として存在する(表4)。従って、C A 1 2 5とh K 50

6 は、バイオマーカー各々単独の診断感度を増大させるために組合せて使用できる。

【0118】

CA125 の状況と同様に、hK6 濃度は、子宮内膜性およびムチン性癌腫においてよりも、漿液性卵巣癌腫においてより頻繁に上昇する(表7)。血清 hK6 濃度はまた、後期および高悪性度の疾病においても、より頻繁に上昇する。血清 hK6 濃度は、患者の行く末の強力な予測因子である。術前 hK6 濃度が $4.4 \mu\text{g/L}$ 以上の患者は、術前に hK6 が低い患者よりも有意に悪い予後である(表8および図12)。血清 hK6 濃度は、血清 CA125 よりも強力な予後インジケータである。CA125 の予後的価値は、多変量解析で消滅するが、表8の多変量解析に示すように、血清 hK6 は独立した予後インジケータである。血清 hK6 は、術後にレベルが有意に低下するので、腫瘍細胞に由来するようである(図8)。卵巣腫瘍抽出物における hK6 分析の予後的価値を調べる実施例4の研究では、腫瘍細胞における hK6 の過剰発現が免疫組織化学的に確認され、腫瘍内 hK6 濃度も強い予後予測因子である証拠がさらに与えられた。興味深いことに、hK4、hK5、hK7、hK8、hK9 および hK10 の酵素を含む、ヒトカリクレイン遺伝子ファミリーの他の構成員の多くは、卵巣癌で予後的重要性を有することが既に示されている(34-41)。トリプシン、ヘプシンおよびテストシン(testisin)を含む、カリクレインファミリーに属さないセリンプロテアーゼも、卵巣癌で予後的重要性を有することが示されている(42-44)。しかし、長年に渡り、多くの他のタンパク質分解酵素が、多くの癌で予後的価値を有することが知られてきた(概説には、45および46を参照)。癌の予後におけるタンパク質分解酵素の関与についての生物学的メカニズムは、細胞外マトリックスを分解し、従って侵襲と転移を助長する能力を含む(47-49)。カリクレインファミリー遺伝子の複数の構成員が、卵巣癌で無制御であるように思われる。従って、このプロテアーゼファミリーの他の構成員が、潜在的卵巣癌バイオマーカーとして出現する可能性がある。これらのプロテアーゼが癌の進行に関わるならば、それらは治療標的として適する候補であり得る。

【0119】

表7は、手術前の血清 hK6 濃度が、卵巣癌患者の化学療法に対する反応の予測因子であり得ることを予備的に示す。非反応者の中で、81%が上昇した手術前 hK6 濃度を有し、一方これらの患者の19%が低い hK6 濃度を有した。化学療法に対して完全または部分的反応のいずれかを有した患者の中で、57%は低い術前 hK6 濃度を有した($p < 0.001$)。

【0120】

結論として、血清 hK6 濃度は、診断、予後および予測ツールとしての潜在的有用性を有する、卵巣癌腫の新規バイオマーカーに当る。hK6 と CA125 の組合せは、早期の疾病を含む、全病期の卵巣癌の診断感度を改善する。

【0121】

実施例4

KLK6 卵巣組織

患者と方法

卵巣癌患者 180人の一次卵巣癌患者がこの研究に含まれた。これらの患者は、イタリアのトリノ大学婦人科で卵巣癌の手術を受けた。患者の年齢は25ないし82歳の範囲であり、中央値は59歳であった。癌の臨床的病期、腫瘍の悪性度と組織構造、および残存腫瘍の量を含む、臨床および病理学的情報を手術時に記録した。閉経状態を記録し、化学療法への反応をモニターした。腫瘍を国際産科婦人科連合(FIGO)の基準に従って病期に分類した。組織学的分類は、世界保健機関およびFIGOの勧告に基づいた。この研究に含まれた腫瘍のうち、80は漿液乳頭性、32は未分化性、27は子宮内膜性、13はムチン性、14は透明細胞、10はミューラー管性、4はその他と分類された。残存腫瘍の大きさは0ないし9cmの範囲であり、中央値は1.1cmであった。

【0122】

生存と疾病の進行(明確な進行なし、または進行)について、期間の中央値62ヶ月(1

10

20

30

40

50

ないし99ヶ月の範囲)にわたり患者をモニターした。165人の患者について、追跡情報が入手可能であった。これらのうち、追跡期間中に97人(54%)が再発し、61人(34%)が死亡した。

【0123】

調査は、1983年に改訂された、1975年のヘルシンキ宣言の倫理基準に従って実行し、イタリア、トリノの Institute of Obstetrics and Gynecology に承認された。

【0124】

腫瘍細胞抽出物の調製 手術直後に液体窒素中で腫瘍組織を凍結し、抽出するまで-80で貯蔵した。20ないし100mgの凍結組織をドライアイス上で微細粉末に粉碎し、10倍量の抽出緩衝液(50mMトリス、pH8.0、150mM NaCl、5mM EDTA、10g/LのNP-40界面活性剤、1mMフェニルメチルスルホニルフッ化物、1g/Lのアプロチニン、1g/Lのロイペプチン)に添加した。生じた懸濁液を、氷上で30分間インキュベートし、その間10分ごとにボルテックスをかけた。混合物を14,000rpm、4で30分間遠心分離し、上清(細胞抽出物)を回収し、分析するまで-80で貯蔵した。抽出物のタンパク質濃度を、アルブミン(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を基準としてビスシニコニン酸(bicinchoninic acid)法で測定した。

10

【0125】

卵巣細胞抽出物中のhK6の測定 腫瘍細胞抽出物中のhK6濃度を、以前に記載され、詳細に評価された(12)、高い感受度と特異度の非競合hK6免疫アッセイで定量した。アッセイは、時間分解蛍光検出による連続的2部位免疫測定フォーマットに、一方はマウスで生成させ、他方はウサギで生成させた2種のhK6特異的ポリクローナル抗体を組み込んだ。基準、腫瘍細胞抽出物および対照プールの分析を、96ウェルポリスチレンマイクロタイプレート中で2部で実行し、免疫アッセイには200μLの試料を加えた。組換えhK6を使用する標準曲線は、0.5μg/Lないし200μg/Lの範囲であった。アッセイの精度は10%より良好であった。シグナル検出およびデータの換算は、CyberFluor 615 Immun analyzerにより自動的に実施した。

20

【0126】

免疫組織化学による卵巣腫瘍試料中のhK6の局在 酵母細胞中で産生したhK6全長組換えタンパク質に対して、ウサギポリクローナル抗体を生成させた。標準的な免疫ペルオキシダーゼ法に従って、hK6の免疫組織化学染色を実施した。概略を述べると、パラフィン包埋組織切片(4μm)を固定し、パラフィンを取り除いた。内在性ペルオキシダーゼ活性を3%水性過酸化水素で15分間ブロックした。切片を0.4%ペプシンで、pH2.0で5分間、42で処理し、20%タンパク質ブロッカー(Signet Labs)で10分間ブロックした。次いで、一次抗体を1:400の希釈で、1時間室温で添加した。洗浄後、抗体希釈緩衝液(DAKO)で4倍に希釈したビオチン化抗ウサギ抗体(Signet)を添加した。インキュベーションと洗浄に続いて、ストレプトアビジンタグ付のホースラディッシュペルオキシダーゼを30分間室温で添加した。洗浄後、5-10分間のアミノエチルカルバゾール(AEC)で検出を達成した。スライドをヘマトキシリンで対比染色し、次いでカバースリップでマウントした。

30

40

【0127】

統計解析 統計解析は、SPSSソフトウェアで実施した(SPSS Inc., Richmond, CA)。データを解析するために、臨床および病理学的パラメーターに従って、患者を異なるグループに分けた。卵巣腫瘍抽出物中の総タンパク質1mg当りのhK6量(即ち、比活性)の分布がガウス分布ではなかったため、ノンパラメトリックのマン・ホイットニーU検定を使用して2グループ間の差異を判定し、2グループ以上の間の差異の解析にクラスカル・ワリス検定を使用した。これらの検定では、腫瘍抽出物中のhK6比活性(ng hK6/mg総タンパク質)を連続変量として扱った。hK6腫瘍抽出物比活性は、hK6陽性(>35ng/mg総タンパク質;説明には図7Bを参照)また

50

は h K 6 陰性 ($\leq 35 \text{ ng/mg}$ 総タンパク質) のいずれかとしても分類した。他の臨床病理的相関に対するこの二分法的変量の関係は、適するようにカイ二乗 (χ^2) 検定またはフィッシャーの直接法で確立した。患者の生存と疾病の進行 (無進行生存) に対する腫瘍抽出物の h K 6 比活性の影響を、一変量と多変量の両方のコックス比例ハザード回帰モデル (30) により計算したハザード比で評価した。多変量解析では、疾病の病期、腫瘍の悪性度、残存腫瘍、組織学的タイプおよび年齢を含む、生存に影響し得る臨床および病理学的変量を補正した。h K 6 陽性と h K 6 陰性の患者との間の生存率の差異を立証するために、カプラン・マイヤーの無進行生存率および全生存率の曲線 (31) を構築した。ログラंक検定 (32) を使用して生存曲線間の差異の有意さを調べた。全患者のデータセットを全体として解析した後、疾病の病期により、腫瘍の悪性度により、そして手術後の残存腫瘍の量 (減容積の成功) により個別に層化したサブグループに対してプロセスを繰り返した。生存および疾病の進行に対する腫瘍 h K 6 レベル (陽性または陰性) の影響を、各サブグループについて一変量および多変量モデルにより判定した。

【0128】

結果

卵巣腫瘍抽出物における h K 6 比活性の分布 180 人の患者からの卵巣腫瘍抽出物中の h K 6 比活性の分布 (図 13A) は、 0.04 ng/mg 総タンパク質ないし 497 ng/mg 総タンパク質の範囲にあり、平均値は 33 ng/mg 総タンパク質、中央値は 13.2 ng/mg 総タンパク質であった。 35 ng/mg 総タンパク質の値は、カイ二乗解析 ($\chi^2 = 7.3$; $P = 0.007$) により、全生存率を予測する観点で陰性腫瘍から陽性腫瘍を区別するのに最適なカットポイントとして同定された (図 13B)。30 パーセントの腫瘍がこの基準で h K 6 陽性であった。腫瘍抽出物の h K 6 比活性は、続く解析において連続変量および二分法的変量 ($\leq 35 \text{ ng/mg}$ 総タンパク質、 $> 35 \text{ ng/mg}$ 総タンパク質) の両方として扱った。

【0129】

h K 6 比活性 (ng h K 6/mg 総タンパク質) は、正常卵巣組織 (平均 3.5 、標準誤差 2.5 、範囲 0.05 ないし 20.8) または良性疾患の卵巣組織 (平均 3.2 、標準誤差 2.6 、範囲 0.03 ないし 21.5) から調製された抽出物と比較して、卵巣腫瘍抽出物 (平均 32.7 、標準誤差 3.8 、範囲 0.04 ないし 497) で有意に上昇した (クラスカル・ワリス検定で $P < 0.001$) (図 14)。さらなる解析により、組織タイプにより層化すると (即ち、漿液性対、未分化性対、子宮内膜性、など)、卵巣腫瘍間に h K 6 比活性の有意な差異はないことが示された (データ非掲載)。

【0130】

h K 6 状態と他の臨床病理学的変量との関係 h K 6 陽性と h K 6 陰性の患者の間で、様々な臨床病理学的変量の分散を表 9 にまとめた。h K 6 状態とこれらの変量との関係を、適するようにカイ二乗 (χ^2) 検定またはフィッシャーの直接法のいずれかで調べた。h K 6 状態と、腫瘍の悪性度、閉経状態および化学療法に対する反応との間に関係は観察されなかった。しかしながら、h K 6 陽性患者は、進行した疾病 (病期 I I - I V)、漿液性腫瘍組織構造およびより大きい残存腫瘍 ($> 1 \text{ cm}$) を有する可能性が高かった (全て $P < 0.05$)。連続変量として扱ったときの腫瘍抽出物の h K 6 比活性は、疾病の病期に比例した。図 15 は、病期によって層化した h K 6 比活性の分布を示す。h K 6 比活性は、病期 I I I / I V の卵巣癌抽出物において、病期 I / I I のそれにおいてよりも有意に高かった (マン・ホイットニー U 検定で $P = 0.002$)。

【0131】

一変量および多変量生存解析 疾病の進行および全生存に対する h K 6 比活性、他の臨床病理学的変量および年齢の影響を表 10 に提示する。一変量解析では、h K 6 陽性患者は、有意に上昇した疾病進行 (ハザード比 = 1.71) および死亡 (ハザード比 = 1.88) のリスクを有した ($P < 0.05$)。h K 6 の比活性を連続変量として扱うと、ハザード比は h K 6 陰性腫瘍のもの (任意に 1.00 と設定する) と非常に近かったが、疾病進行のリスク (ハザード比 = 1.005) における僅かな上昇は、 $P = 0.001$ でかなり

有意であった。カプラン・マイヤーの生存曲線は、h K 6 陽性とh K 6 陰性の患者の間の生存率の差異を論証した。図 1 6 に示すように、無進行および全生存の可能性は、それぞれh K 6 陰性患者よりもh K 6 陽性患者で低かった。

【 0 1 3 2 】

無進行生存および全生存に対するh K 6 陽性の悪影響は、多変量解析では失われた。表 1 0 に示すように、生存結果を他の臨床病理学的変量について補正すると、h K 6 陽性とh K 6 陰性の患者は、統計的に近い疾病進行率および全生存率を有した。腫瘍悪性度も、多変量解析では、一変量解析におけるその予後的有意さを失った。疾病の病期および手術後の残存腫瘍のみが、多変量解析で生存結果に対する独立的効果を維持した。

【 0 1 3 3 】

患者のサブグループにおける一変量および多変量解析 病期、腫瘍悪性度、および減容積の成功（残存腫瘍）に基づいて、患者を異なるサブグループに分けた。各サブグループにおいて、疾病の進行と全生存に対するh K 6 陽性と陰性の影響を、一変量と多変量のコックス比例ハザード回帰モデルにより判定した。結果を表 1 1 に示す。h K 6 比活性（陽性、陰性）は、腫瘍悪性度 I または I I の患者サブグループで有意に影響を与えた。一変量解析により、h K 6 陽性患者は、h K 6 陰性患者の約 9 倍疾病の進行をこうむりやすく、5 倍死亡しやすいことが解明された。これらの生存率の差異は、データを多変量解析に処した後でさえ有意なままであった。h K 6 陽性から生じる両結果の相対的リスクは、目下約 4 倍であった（ $P < 0.03$ ）。h K 6 状態は、悪性度 I I I の腫瘍の患者ではかかる効果を有さず、初期の疾病の患者および手術後に 1 c m 以上の残存腫瘍を有する患者でも、いかなる識別可能な効果も論証されなかった。一変量解析により、h K 6 陽性である進行した疾病（病期 I I I および I V）の患者のサブグループにおける、疾病進行および死亡のリスクにおける 2 倍の増大が解明されたが、その効果は多変量解析では失われた。逆のことが手術時に最適の腫瘍減容積（残存腫瘍が直径 1 c m 以下）で特徴付けられる患者のサブセットで起こった。h K 6 陽性は、一変量解析で疾病進行または生存に対して論証可能な悪影響を有さなかったが、データを多変量解析に処すと統計的に有意になり、有害リスクにおいて各々 3.5 および 5.5 倍の増大をもたらした。補正した変量が結果に全く影響しないとき、一変量モデルで何も生じないのに多変量モデルにおいて効果が現れる。本研究の場合、このことは、この特定の患者サブセットにおいて、疾病の病期、腫瘍悪性度、腫瘍組織構造および患者の年齢は、疾病の進行と全生存に対して予後的潜在能力を有さないことを意味する。悪性度 I または I I の卵巣腫瘍患者サブセットのカプラン・マイヤーの生存曲線を図 1 7 に示す。先に述べた一変量解析から期待されたように、h K 6 陽性とh K 6 陰性の患者の間に、疾病の進行および生存に有意な差異があった。

【 0 1 3 4 】

卵巣腫瘍のh K 6 免疫組織化学染色 パラフィン包埋腫瘍切片のh K 6 免疫組織化学染色は、腫瘍抽出物のh K 6 比活性におおよそ比例した（データ非掲載）。良性、境界または悪性腫瘍を含む 4 つの卵巣組織におけるh K 6 タンパク質の免疫組織化学的局在を、図 1 8 に描写する。h K 6 染色は、上皮細胞に限定され、繊維状支持ストロマを含む間葉性要素には存在しなかった。h K 6 は上皮細胞の細胞質内で染色されたが、染色強度は腫瘍調製物の間、そして内で変動した。

【 0 1 3 5 】

考察

増大したh K 6 合成が、長期にわたってより攻撃的な腫瘍行動を予測するものであることが判明した。他の臨床病理学的変量および年齢を別にして考えると、研究下にある全患者集団にわたって、h K 6 陽性は、疾病の進行と死亡の両リスクにおける約 2 倍の増大と関連した。この効果は、全患者集団の多変量解析で結果を他の臨床病理学的変量および年齢に補正すると失われたが、多変量解析を腫瘍悪性度の低い患者および手術後の残存腫瘍が少ない（直径で < 1 c m）患者に限定すると失われなかった。前者の患者サブグループでは、h K 6 陽性は疾病の進行と死亡のリスクにおける約 4 倍の増大を予測し（ $P < 0.03$ ）、一方後者のサブグループにおける相応するハザード比は、各々 3.75 および 5.

10

20

30

40

50

5であった ($P < 0.02$)。データは、これらの2サブグループにおいてhK6陽性が独立した予測的潜在能力を有し、従来測定されてきた臨床パラメーターと病理学的相関からは探り出せなかった腫瘍行動に、長期にわたって洞察を与えることを示す。それ故に、hK6試験は、かかる患者の個別化された効果的な処置に貢献し得る。

【0136】

hK6は、非悪性卵巣組織と比較して、卵巣腫瘍で頻繁に過剰発現されることが見出された。この過剰発現は、早期の疾病由来よりも後期の疾病由来の腫瘍において高い傾向がある。組織化学的研究により、hK6は卵巣の上皮細胞により合成され、細胞質区画内に拡散して分布することが示唆された。

【0137】

上皮性卵巣癌は、婦人科系悪性腫瘍の中でも最も予後が悪いものの1つである。主な理由は、診断の4分の3以上が、疾病が既に局所的または遠位の転移を確立したときになされるからである(33)。問題を複雑にすることに、腫瘍の進行と攻撃性は、従来の臨床および病理学的マーカーと変わりやすく相関する。従って、この疾病に関し、さらなる診断および予後マーカーに対する重要な要望があり、数々の潜在能力のあるマーカーが同定された。

【0138】

好ましい実施例であると現在考えられるものを参照して本発明を説明したが、本発明は開示した実施例に限定されないことを理解すべきである。反対に、本発明は、添付の請求の範囲の精神と範囲内にある様々な修正および均等物の取合せを包含することを意図している。

【0139】

全刊行物、特許および特許出願は、各個別の刊行物、特許または特許出願を特別かつ個別に出典明示により全体を本明細書の一部とすると指示するのと同程度に、出典明示により全体を本明細書の一部とする。

以下の詳細な引用は、明細書中で参照した参考文献を示す。

【0140】

表1 - 様々な液中のhK6タンパク質の分析

【表1】

10

20

表 1 : 様々な液中の h K 6 タンパク質の分布

サンプル	hK6, $\mu\text{g/L}$			N ²	陽性率 (%)
	範囲	平均値 (SD)	中央値		
乳汁 ¹	398 - 7,638	2,588 (1,607)	2,531	20	100
脳脊髄液 (CSF)	41 - 2,053	605 (485)	525	21	100
NAF (正常) ³	-	914	-	1 (7°-ル)	100
NAF (癌) ⁴	-	737	-	1 (7°-ル)	100
乳房嚢胞液	34 - 97	74 (25)	84	5 (7°-ル)	100
男性の血清	2.0 - 12.6	6.9 (2.6)	6.7	18	100
女性の血清	0 - 8.1	4.1 (2.0)	4.4	18	100
精漿	0 - 17.7	6.8 (5.5)	5.0	16	81
羊水	0 - 9.5	1.1 (2.2)	0	21	33
乳房腫瘍細胞質	0 - 33	2.1 (7.0)	0	36	17
尿	0	0	0	10	0

10

20

- 1 . 授乳女性より
- 2 . 試験したサンプルの数
- 3 . 乳頭吸引液
- 4 . 乳癌患者から得られた N A F

【 0 1 4 1 】

表 2 - 正常個体および様々な悪性腫瘍患者の血清のヒトカリクレイン 6 (h K 6) 濃度

30

【 表 2 】

表 2 : 正常個体および様々な悪性腫瘍患者の血清のヒトカリクレイン 6 (hK6) 濃度

患者グループ	サンプル数	分	hK6, $\mu\text{g/L}$			hK6 > 15 $\mu\text{g/L}$ の患者数 (%)
			最大	中央値	95 番目の百分位	
正常男性	41	3.2	11.4	7.5	11.1	0 (0)
正常女性	40	3.5	13.7	7.0	10.8	0 (0)
乳癌 ¹	24	1.1	11.9	4.3	9.7	0 (0)
髄様甲状腺癌腫 ²	29	0	13.9	5.0	11.8	0 (0)
精巣癌 ³	78	2.0	32.2	9.3	14.3	1 (2)*
胃腸の癌 ⁴	28	2.6	10.6	5.7	9.6	0 (0)
前立腺癌 ⁵	40	1.0	16.1	4.1	9.5	1 (2)**
肺癌	18	2.6	7.4	5.2	6.7	0 (0)
卵巣癌 ⁶	80	1.0	206	23.0	148	53 (66)

10

20

1 . 血清 CA 15 . 3 レベル \geq 4 1 4 K U / L (上限レファレンス・レンジ 3 5 K U / L)

2 . カルシトニンレベル \geq 1 . 1 3 5 n g / L (上限レファレンス・レンジ 1 0 0 n g / L)

3 . h C G レベル \geq 6 9 I U / L (上限レファレンス・レンジ 1 0 I U / L) または A F P レベル \geq 1 1 0 $\mu\text{g} / \text{L}$ (上限レファレンス・レンジ 1 0 $\mu\text{g} / \text{L}$)

4 . CA 19 . 9 レベル \geq 6 2 9 K U / L (上限レファレンス・レンジ 3 7 K U / L) および C E A レベル \geq 1 . 0 0 0 $\mu\text{g} / \text{L}$ (上限レファレンス・レンジ 5 $\mu\text{g} / \text{L}$)

5 . P S A \geq 3 2 4 $\mu\text{g} / \text{L}$ (上限レファレンス・レンジ 4 $\mu\text{g} / \text{L}$)

6 . CA 1 2 5 \geq 3 7 2 K U / L (上限レファレンス・レンジ 3 5 K U / L)

【 0 1 4 2 】

表 3 : 非癌 (健康) 、 良性疾病および卵巣癌患者における血清 h K 6 の記述的統計

【 表 3 】

30

百分位

変量	平均値 ± SE ^a	範囲	5	25	50	75	95
非癌 (N=97) hK6 (μg/L)	2.94 ± 0.099	0.89 - 6.58	1.49	2.28	2.90	3.54	4.44
良性疾病 (N = 141) hK6 (μg/L)	3.12 ± 0.074	1.30 - 6.16	1.99	2.50	3.00	3.60	4.88
手術前の卵巣癌 (N=146) hK6 (μg/L)	6.81 ± 0.57	1.30 - 38.00	2.19	3.12	4.40	7.15	25.06
手術後の卵巣癌 (N=105) hK6 (μg/L)	3.87 ± 0.25	0.80 - 21.82	1.82	2.66	3.20	4.20	7.72

10

^a 標準誤差

【 0 1 4 3 】

表 4 : 選択されたカットオフポイントでの血清 h K 6 濃度の敏感度と特異度の比較

20

【 表 4 】

パラメーター	カットオフ	特異度 (%)	敏感度 (%)
総集団 (N = 384) hK6 (μg/L)	2.20	95	19
	2.50	90	29
	4.20	54	90
	4.40	50	95
CA125 < 23 KU/L (N = 182) hK6 (μg/L)	2.27	95	24
	2.40	90	28
	4.30	17	90
	4.40	13	95
CA125 23-60 KU/L (N = 65) hK6 (μg/L)	2.20	95	10
	2.40	90	19
	4.00	26	90
	4.20	15	95
CA 125 > 60 KU/L (N = 110) hK6 (μg/L)	2.20	95	16
	2.70	90	43
	4.50	71	90
	5.56	65	95

30

40

【 0 1 4 4 】

表 5 : C A 1 2 5 単独、h K 6 単独および C A 1 2 5 + h K 6 分析の卵巣癌診断敏感度 (両マーカーの特異度カットオフ 90 および 95 %)

【 表 5 】

	特異度90% での敏感度	特異度95% での敏感度
病期に分かる全患者 (N=124)		
CA125	60	56
hK6	58	53
CA125+hK6	72	69
病期 I / I I の患者 (N=43)		
CA125	30	26
hK6	26	21
CA125+hK6	42	37

10

【 0 1 4 5 】

表 6 : 血清 h K 6 の四分位による卵巣癌の相対的リスク^a (R R)

【 表 6 】

パラメーター	四分位 (µg/L)			
	1 (0.89-2.60) n = 96	2 (2.61-3.29) n = 96	3 (3.30-4.27) n = 96	4 (4.28-38.00) n = 96
<u>hK6 未補正^a</u>				
RR	1.00	1.41	3.12	20.00
95% 信頼区間		0.71-2.79	1.43-6.85	7.70-48.46
P 値		0.32	0.003	< 0.001
<u>hK6 補正^b</u>				
RR	1.00	1.21	2.31	5.33
95% 信頼区間		0.56-2.62	1.05-5.02	2.32-12.24
p 値		0.62	0.036	< 0.001

20

^a 無条件ロジスティック回帰モデルから評価^b 多変量モデルは C A 1 2 5 四分位で補正した

30

【 0 1 4 6 】

表 7 : 卵巣癌患者における h K 6 状態と他の変量との関係^{*}

【 表 7 】

変量	患者	患者数 (%)		p値	
		hK6 陰性	hK6 陽性		
病期					
I	32	27 (84.4)	5 (15.6)	< 0.001 ^a	
II	11	8 (72.7)	3 (27.3)		
III	73	18 (24.7)	55 (75.3)		
IV	8	3 (37.5)	5 (62.5)		
x	22				
悪性度					
G1	39	31 (79.5)	8 (20.5)	< 0.001 ^a	10
G2	24	7 (29.2)	17 (70.8)		
G3	62	19 (30.6)	43 (69.4)		
x	21				
組織タイプ					
漿液性	74	24 (32.4)	50 (67.6)	< 0.001 ^a	
子宮内膜性	15	10 (66.7)	5 (33.3)		
ムチン性	22	20 (90.9)	2 (9.1)		
その他	27	17 (63.0)	10 (37.0)		
x	8				
残存腫瘍 (cm)					
0	76	52 (68.4)	24 (31.6)	< 0.001 ^a	
1-2	17	3 (17.6)	14 (82.4)		
> 2	35	6 (17.1)	29 (82.9)		
x	18				
減容積の成功 ^c					
SO	49	9 (18.4)	40 (81.6)	< 0.001 ^b	20
OD	81	53 (65.4)	28 (34.6)		
x	16				
CTXへの反応 ^d					
NC/PD	21	4 (19.0)	17 (81.0)	< 0.001 ^b	
CR/PR	107	61 (57.0)	46 (43.0)		
NE	18				

* h K 6 カットオフ = 4 . 4 μ g / L (中央値)

a ² 検定

b フィッシャーの直接法

c O D、最適の減容積 (0 - 1 c m) ; 最適下限の減容積 (> 1 c m)

d C T X、化学療法 ; N C 変化なし ; P D、進行性疾病 ; C R、完全な反応 ; P R、部分的な反応 ; N E、評価せず

X 状態は未詳

【 0 1 4 7 】

表 8 : 無進行および全生存率に関する血清 h K 6 の一変量および多変量解析

【 表 8 】

変量	無進行生存			全生存			
	HR ^a	95% CI ^b	p 値	HR ^a	95% CI ^b	p 値	
一変量解析							
hK6	陰性	1.00		1.00			
	陽性	4.10	2.28-7.36	< 0.001	3.15	1.36-7.29	0.007
	連続変量として	1.068	1.041-1.095	< 0.001	1.075	1.038-1.11	< 0.001
CA125	陰性 ^d	1.00		1.00			
	陽性 ^d	2.52	1.45-4.38	0.001	2.36	1.03-5.42	0.041
	連続変量として	1.001	1.000-1.002	< 0.001	1.001	1.000-1.003	0.018
悪性度	(普通)	2.50	1.71-3.64	< 0.001	2.34	1.53-3.58	< 0.001
残存腫瘍	(普通)	1.23	1.13-1.34	< 0.001	1.31	1.21-1.41	< 0.001
組織タイプ ^c		2.49	1.37-4.54	0.003	4.25	1.44-12.53	< 0.008
多変量解析							
hK6	陰性	1.00		1.00			
	陽性	4.86	1.10-21.47	0.036	5.08	1.07-23.69	0.038
	連続変量として	1.047	1.007-1.089	0.019	1.063	1.007-1.12	0.025
CA125	陰性 ^d	1.00		1.00			
	陽性 ^d	2.86	0.69-11.74	0.14	2.17	0.38-63.17	0.38
疾病の病期	(普通)	2.54	1.37-4.69	0.003	6.34	2.27-17.7	< 0.001
悪性度	(普通)	1.63	0.94-2.82	0.078	1.56	0.66-3.68	0.31
残存腫瘍	(普通)	1.09	0.42-2.26	0.15	1.01	0.80-1.24	0.98
組織タイプ ^c		1.08	0.75-1.56	0.65	1.18	0.94-1.31	0.18

10

20

^a ハザード比 (HR) はコックス比例ハザード回帰モデルにより評価した

^b 評価した HR の信頼区間

^c 漿液性対その他

^d カットオフ = 98 KU/L (95%の特異度; 53%の敏感度; 48番目の百分位)

【0148】

表9.180人の卵巣癌患者におけるhK6状態と他の変量との関係

【表9】

変量	患者	患者数 (%)		p 値	
		hK6 陰性	hK6 陽性		
病期					
I	44	38 (86.4)	6 (13.6)	0.034 ^a	
II	13	8 (61.5)	5 (38.5)		
III	110	72 (65.4)	38 (34.5)		
IV	13	7 (53.8)	6 (46.2)		
悪性度					
G1	25	21 (84.0)	4 (16.0)	0.33 ^a	10
G2	27	21 (77.8)	6 (22.2)		
G3	119	84 (70.6)	35 (29.4)		
x	9				
組織タイプ					
漿液性	80	52 (65.0)	28 (35.0)	0.31 ^b	
未分化性	27	17 (63.0)	10 (37.0)		
子宮内膜性	32	27 (46.7)	5 (53.3)		
ムチン性	13	10 (76.9)	3 (13.1)		
透明細胞	14	11 (78.6)	3 (21.4)		
ミューラー管性	10	8 (80.0)	2 (20.0)		
その他	4	3 (75.0)	1 (25.0)		
残存腫瘍 (cm)					
0	80	67 (83.2)	13 (16.3)	0.002 ^a	20
1-2	29	16 (55.2)	13 (44.8)		
>2	64	40 (62.5)	24 (37.5)		
x	7				
閉経					
前 / 周辺	50	32 (64.0)	18 (36.0)	0.075 ^b	
後	130	99 (76.2)	31 (23.8)		
CTXへの反応 ^c					
NC/PD	15	11 (73.3)	4 (26.7)	0.99 ^b	
CR/PR	148	104 (70.3)	44 (29.7)		
NE	17				

30

^a χ^2 検定

^b フィッシャーの直接法

^c CTX ; 化学療法、NC ; 変化なし、PD ; 進行性疾病、CR ; 完全な反応、PR ; 部分的な反応、NE ; 評価せず

X . 状態は未詳

【 0 1 4 9 】

表 1 0 . h K 6 の予後的価値の一変量および多変量解析

【 表 1 0 】

変量	無進行生存 (PTS)			全生存 (OS)		
	HR ^a	95% CI ^b	P 値	HR ^a	95% CI ^b	P 値
一変量解析						
hK6						
陰性	1.00			1.00		
陽性	1.71	1.11-2.64	0.015	1.88	1.09-3.21	0.022
連続変量として	1.005	1.002-1.007	0.001	1.004	0.999-1.008	0.074
疾病の病期 (普通)	2.79	2.07-3.79	<0.001	3.07	2.05-4.61	<0.001
悪性度 (普通)	1.95	1.38-2.75	<0.001	2.07	1.31-3.29	0.002
残存腫瘍 (普通)	1.27	1.20-1.34	<0.001	1.31	1.22-1.41	<0.001
組織タイプ ^c	0.83	0.68-1.00	0.055	0.88	0.69-1.13	0.34
年齢	1.012	0.99-1.03	0.14	1.015	0.99-1.03	0.15
多変量解析						
hK6						
陰性	1.00			1.00		
陽性	1.40	0.84-2.32	0.19	1.08	0.79-1.49	0.62
連続変量として	1.002	0.99-1.006	0.22	1.001	0.99-1.004	0.69
疾病の病期 (普通)	1.57	1.09-2.27	0.014	1.72	1.053-2.82	0.03
悪性度 (普通)	1.31	0.84-2.32	0.18	1.31	0.75-2.25	0.33
残存腫瘍 (普通)	1.14	1.05-1.24	0.001	1.21	1.09-1.34	<0.001
組織タイプ ^c	0.95	0.82-1.11	0.57	1.04	0.86-1.26	0.68
年齢	1.02	0.99-1.039	0.12	1.02	0.99-1.04	0.21

^a ハザード比 (HR) はコックス比例ハザード回帰モデルにより評価した

^b 評価した HR の信頼区間

^c 漿液性対その他

【 0 1 5 0 】

表 11 . 患者サブグループのコックス比例ハザード回帰分析

【 表 1 1 】

10

20

30

40

変量	無進行生存		全生存	
	HR ^a	95% CI ^b	HR ^a	95% CI ^b
<u>腫瘍悪性度 I-II</u>				
hK6 一変量 ^c	9.25	3.33-25.67	5.05	1.63-15.71
hK6 多変量 ^c	4.29	1.17-15.65	4.05	1.23-16.6
<u>腫瘍悪性度 III</u>				
hK6 一変量 ^c	1.45	0.87-2.39	1.69	0.91-3.14
hK6 多変量 ^c	1.03	0.58-1.83	1.02	0.48-2.13
<u>病期 I-II</u>				
hK6 一変量 ^d	0.90	0.18-4.35	1.49	0.13-16.53
hK6 多変量 ^d	1.83	0.17-19.41	2.23	0.20-25.04
<u>病期 III-IV</u>				
hK6 一変量 ^d	2.04	1.26-3.29	1.98	1.12-3.47
hK6 多変量 ^d	1.57	0.93-2.68	1.33	0.71-2.53
<u>最適な減容積^e</u>				
hK6 一変量 ^f	1.81	0.72-4.55	2.61	0.70-9.73
hK6 多変量 ^f	3.75	1.39-10.09	5.57	1.47-21.04
<u>最適下限の減容積^e</u>				
hK6 一変量 ^f	1.39	0.83-2.32	1.16	0.64-2.09
hK6 多変量 ^f	1.27	0.72-2.23	1.19	0.62-2.27

10

20

30

^a ハザード比 (HR) はコックス比例ハザード回帰モデルにより評価した

^b 評価したHRの信頼区間

^c 多変量モデルは疾病の病期、残存腫瘍、組織学的タイプおよび年齢に補正した

^d 多変量モデルは腫瘍の悪性度、残存腫瘍、組織学的タイプおよび年齢に補正した

^e 最適の減容積 (0 - 1 cmの残存腫瘍) ; 最適下限の減容積 (> 1 cm残存腫瘍)

^f 多変量モデルは疾病の病期、腫瘍の悪性度、組織学的タイプおよび年齢に補正した

【0151】

明細書中で参照した参照文献の詳細な引用

1. Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magklara A, Obiezu CV. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. Trends Endocrinol Metab 2000; 11: 54 - 60.

2. Diamandis EP. Prostate specific antigen

40

50

its usefulness in clinical medicine. Trends Endocrinol Metab 1999;25:14-16.

3. McCormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, Sokoloff RL, Wang TJ, Wolfert RL, Lilja H, Oesterling JE. Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. Urology 1995;45:729-744.

4. Chu TM. Prostate-specific antigen and early detection of prostate cancer. Tumor Biol 1997;18:123-134. 10

5. Stenman U-H. New ultrasensitive assays facilitate studies on the role of human glandular kallikrein (hK2) as a marker for prostatic disease. Clin Chem 1999;45:753-754.

【0152】

6. Rittenhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW. Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): Two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. Crit Rev Clin Lab Sci 1998;35:275-368. 20

7. Little SP, Dixon EP, Norris F, Buckley W, Becker GW, Johnson M, Dobbins JR, et al. Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. J Biol Chem 1997;272:25135-25142.

8. Anisowicz A, Sotiropoulou G, Stenman G, Mok SC, Sager R. A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. Mol Med 1996;2:624-636. 30

9. Yamashiro K, Tsuruoiko N, Kodama S, Tsujimoto M, Yamamura T, Tanaka T, Nakazato H, Yamaguchi N. Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. Biochim Biophys Acta 1997;1350:11-14.

10. Diamandis EP, Yousef GM, Clements J, Ashworth LK, Yoshida S, Egelrud T, Nelson PS, Shiosaka S, Little S, Lilja H, Stenman U-H, Rittenhouse HG, Wain H. New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. Clin Chem (in press). 40

【0153】

11. Yousef GM, Luo L-Y, Scherer SW, Sotiropoulou G, Diamandis EP. Molecular characterization of zyme/protease M/neurosin (PRSS9), a hormonally regulated kallikrein-like 50

- serine protease. *Genomics* 1999; 62: 251 - 259.
12. Diamandis EP, Yousef GM, Soosaipillai AR, Grass L, Porter A, Little S, Sotiropoulou G. Immunofluorometric assay of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) and preliminary clinical applications. *Clin Biochem*. 2000, 33: 369 - 375.
13. Riman T, Persson I, Staffan N. Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. *Clin Endocrinol* 1998; 49: 695 - 707. 10
14. National Cancer Institute of Canada: Canadian Cancer Statistics 1999, Toronto, Canada, 1999.
15. Menon U, Jacobs IJ. Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12: 39 - 42.
- 【0154】**
16. Davellar EM, van Kamp GJ, Verstraeten RA, Kenemans P. Comparison of serum immunoassays for the quantification of CA 125 antigen in serum. *Clin Chem* 1998; 44: 1417 - 1422. 20
17. Rosenthal AN, Jacobs IJ. The role of CA 125 in screening for ovarian cancer. *Int J Biol Markers* 1998; 13: 216 - 220.
18. Maggino T, Gadducci A. Serum markers as prognostic factors in epithelial ovarian cancer: an overview. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 21: 64 - 69. 30
19. Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers* 1998; 13: 179 - 187.
20. Robertson DM, Kahir N, Burger HG, Mamer P, McCloud PI, Pettersson K, McGuckin M. Combined inhibin and CA 125 assays in the detection of ovarian cancer. *Clin Chem* 1999; 45: 651 - 658.
- 【0155】**
21. Lambert-Messerlian GM. Is inhibin a serum marker for ovarian cancer? *Eur J Endocrinol* 2000; 42: 331 - 333. 40
22. Ala-Fossi SL, Maenpaa J, Blauer M, Tuohimaa P, Punnonen R. Inhibin A, B and pro-alphaC in serum and peritoneal fluid in postmenopausal patients with ovarian tumors. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 334 - 339.
23. Burger HG, Baillie A, Drummond AE, Healy DL, Jobling T, Mamer P, Robertson DM, et al. Inhibin and ovarian cancer. *J Reprod I* 50

mmunol 1998;39:77-87.

24. Xu FJ, Yu YH, Daly L, DeSombre K, Anselmino L, Hass GM, Berchuck A, et al. OVX1 radioimmunoassay complements CA-125 for predicting presence of residual ovarian carcinoma at second-look surgical surveillance procedures. *J Clin Oncol* 1993;11:1506-1510.

【0156】

25. Berek JS, Bast RC Jr. Ovarian cancer screening. The use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection. *Cancer* 1995;76:2092-2096. 10

26. Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, Elson P, Kennedy AW, et al. Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic markers. *J Am Med Assoc* 1998;280:7190-723.

27. Myer, t, Rustin GJS. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1535-1538. 20

28. Woolas RP, Xu FJ, Jacobs IJ, Yu Y, Daly L, Berchuck A, et al. Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J. Natl Cancer Inst* 1993;85:1748-1751.

29. Woolas RP, Conaway MR, Xu F, Jacobs IJ, Yu Y, Daly, L et al. Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1995;59:111-116. 30

30. Cox, DR. Regression tables and life tables. *J. R. Stat. Cos. B*, 34:187-202, 1972.

【0157】

31. Kaplan, E.L, and Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53:457-481, 1958.

32. Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.* 50:163-170, 1966. 40

33. Gatta, G. Lasota, M.B. and Verdecchia, A. Survival of European women with gynecological tumours during the period 1978-1989. *Eur. J. Cancer*, 34: 2218-2225, 1998.

34. Obiezu, CV et al, *Clin Cancer Res.* 2001;7:2380-2386.

35. Kim, H, et al, *Br. J. Cancer* 2001;8:643-650. 50

【0158】

36. Magklara, A., et al., Clin. Cancer Res 2001; 7: 806 - 811.
37. Luo, LY et al, Clin Cancer Res 2001; 7: 2372 - 2379.
38. Luo, LY et al, Clin Chim Acta 2001; 306: 111 - 118.
39. Dong Y, et al, Clin Cancer Res 2001; 7: 2363 - 2371.
40. Tanimoto H. et al, Cancer 1999; 86: 2074 - 2082. 10

【0159】

41. Underwood LJ et al Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma
42. Shigemasa K et al J Soc Gynecol Investig 200; 7: 357 - 362.
43. Tanimoto, H., et al, Cancer Res 1997; 57: 2884 - 2887.
44. Hirahara F., et al Gynecol Oncol 1998; 68: 162 - 165. 20
45. Duffy, MJ, Clin Exp Metasis 1992; 10: 145 - 155.

【0160】

46. Matrisian, LM, Curr Biol 1999; 9: R776 - R778.
47. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG, Cancer Chemother Pharmacol 1999; 43: S42 - S51.
48. Woodhouse EC et al, Cancer 1997; 80: 1529 - 2537. 30
49. Aznavoorian, S et al Cancer 1993; 71: 1368 - 1383.

【図面の簡単な説明】

【図1】hK6タンパク質アッセイの較正曲線である。

【図2】3種の体液の高速液体クロマトグラフィーによる分離と、開発されたhK6免疫アッセイによる全画分の分析の結果を示す。

【図3】様々なヒト組織細胞質抽出物の、hK6タンパク質についての分析結果を示すグラフである。

【図4】80人の卵巢癌腫患者の血清におけるhK6濃度の度数分布を示すグラフである。 40

【図5】卵巢癌患者由来の96個の血清サンプルにおけるhK6濃度とCA125濃度との間の相関を示すグラフである。

【図6】卵巢癌患者からの連続的血清サンプルにおけるhK6とCA125の分析を示すグラフである。

【図7A】正常、良性、癌患者でのhK6分布を示すグラフである。

【図7B】正常、良性、癌患者でのCA125分布を示すグラフである。

【図8】手術前と手術後の卵巢癌患者の血清サンプルにおけるhK6濃度を示すグラフである。

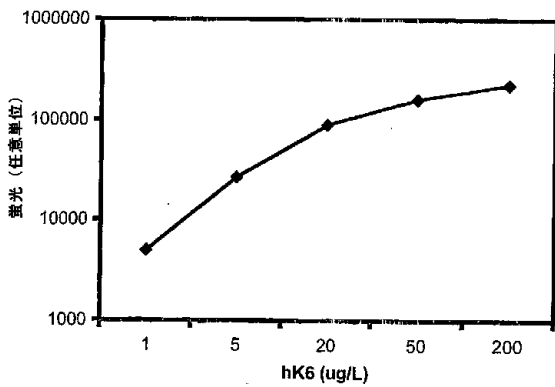
【図9】血清hK6濃度とCA125濃度との間の相関を示すグラフである。 50

- 【図10】血清hK6濃度の敏感度と特異度を示すグラフである。
- 【図11A】hK6濃度対卵巢癌の病期を示すグラフである。
- 【図11B】hK6濃度対卵巢癌の悪性度を示すグラフである。
- 【図12A】生存可能性対無進行生存(PFS)を示すグラフである。
- 【図12B】生存可能性対全生存(OS)を示すグラフである。
- 【図13A】卵巢腫瘍抽出物におけるhK6比活性の度数分布を示すグラフである。
- 【図13B】hK6腫瘍比活性対カイ二乗統計値のプロットである。
- 【図14】正常卵巢組織および卵巢癌からの抽出物中のhK6濃度の比較を示すグラフである。
- 【図15】I/I I期およびI I I/I V期の卵巢癌患者由来の腫瘍抽出物中の、hK6比活性の分布を示すグラフである。
- 【図16】研究下にある全患者集団のカプラン・マイヤーの生存率曲線：hK6状態の影響を示す。
- 【図17】程度IおよびI Iの卵巢腫瘍患者における、無進行生存率と全生存率に対するhK6状態の影響を示すグラフである。
- 【図18】様々な悪性状態、細胞タイプおよび起源の卵巢新生物における、hK6の免疫組織学的局在を示すプロットである。

10

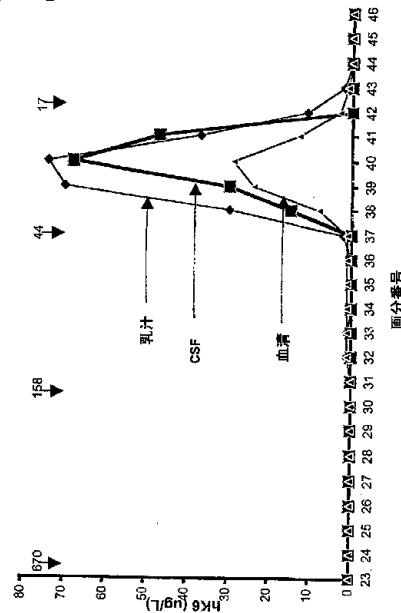
【図1】

FIGURE 1



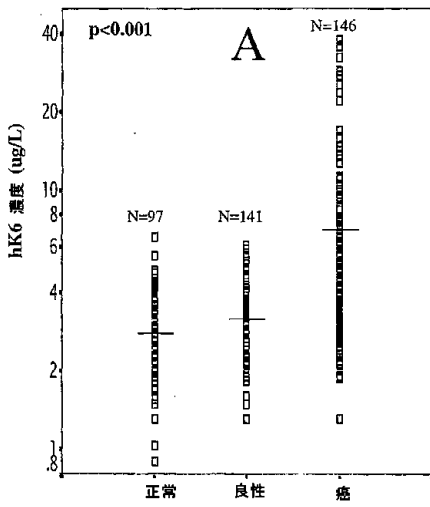
【図2】

FIGURE 2



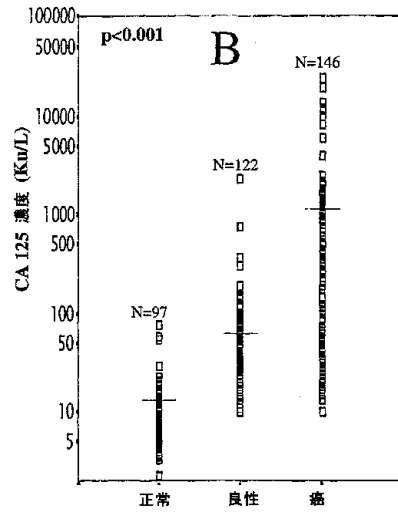
【 図 7 A 】

Figure 7A



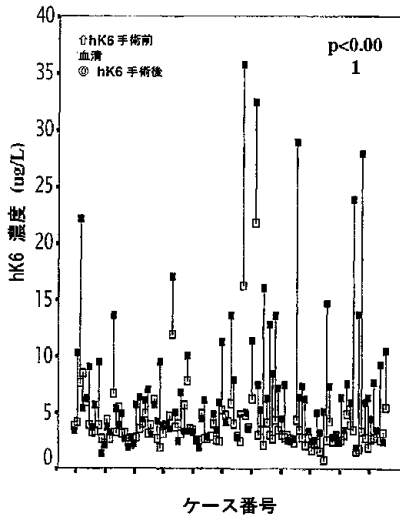
【 図 7 B 】

Figure 7B



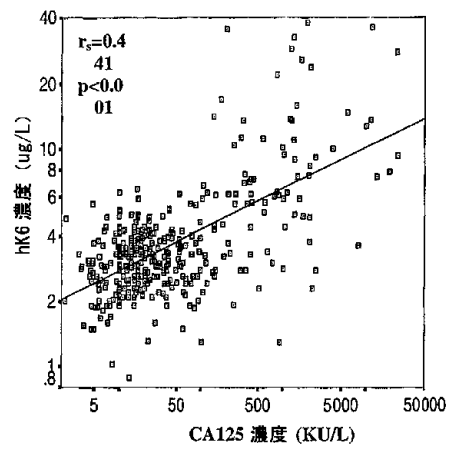
【 図 8 】

Figure 8



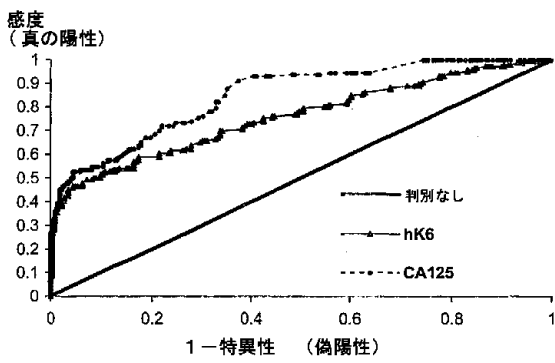
【 図 9 】

FIGURE 9



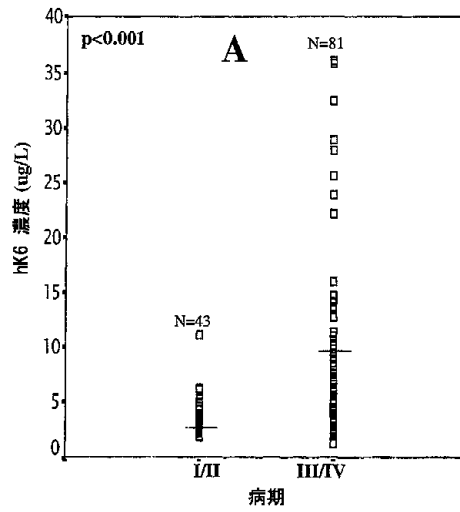
【 図 1 0 】

FIGURE 10



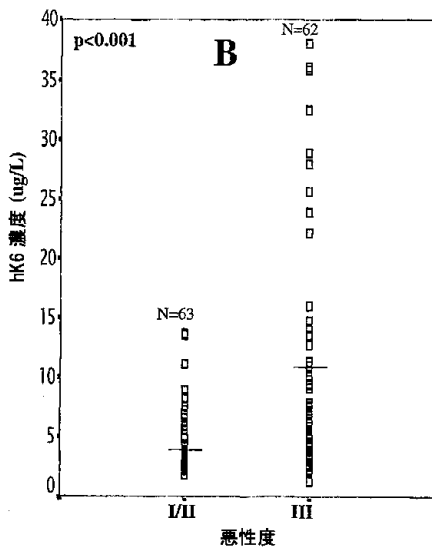
【 図 1 1 A 】

Figure 11A



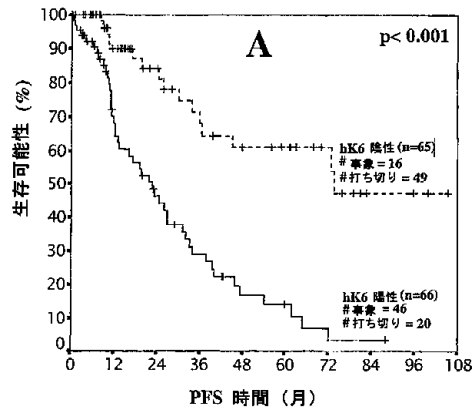
【 図 1 1 B 】

Figure 11B



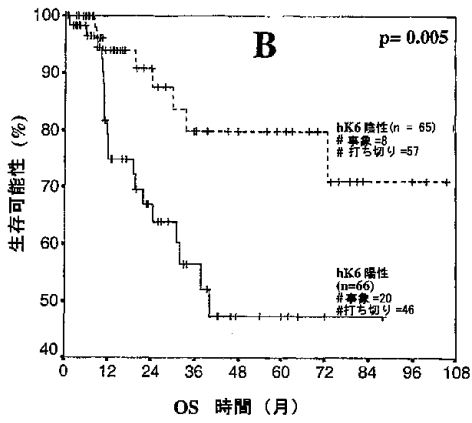
【 図 1 2 A 】

Figure 12A



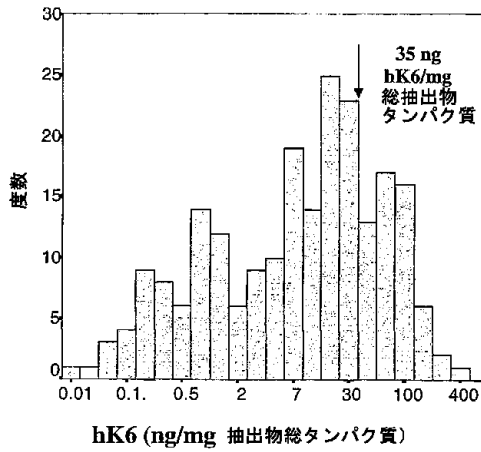
【 図 1 2 B 】

Figure 12B



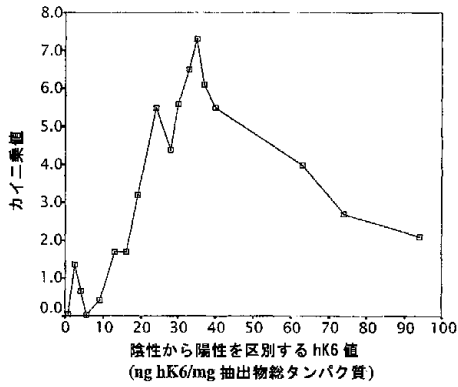
【 図 1 3 A 】

Figure 13A



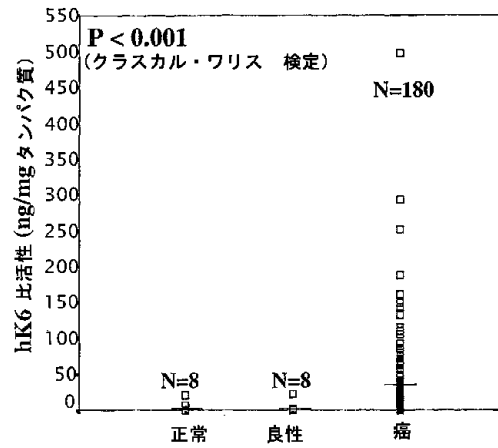
【 図 1 3 B 】

Figure 13B



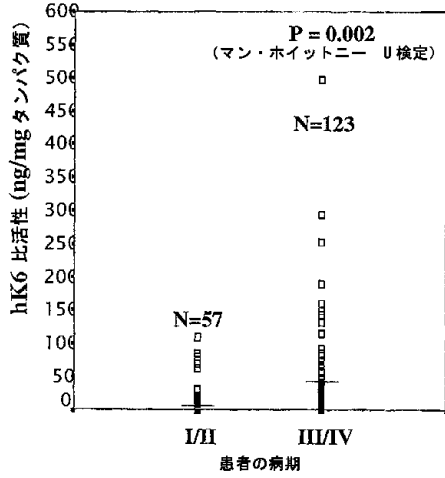
【 図 1 4 】

Figure 14



【 図 1 5 】

Figure 15



【 図 1 6 】

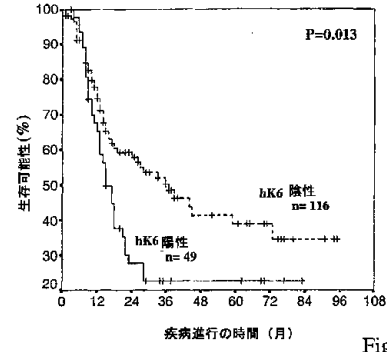
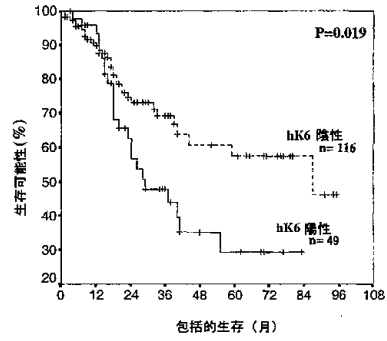
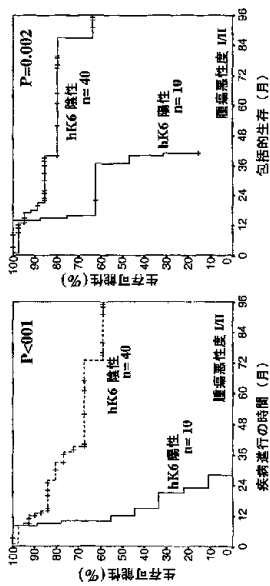


Figure 16



【 図 1 7 】

Figure 17



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 May 2002 (02.05.2002)

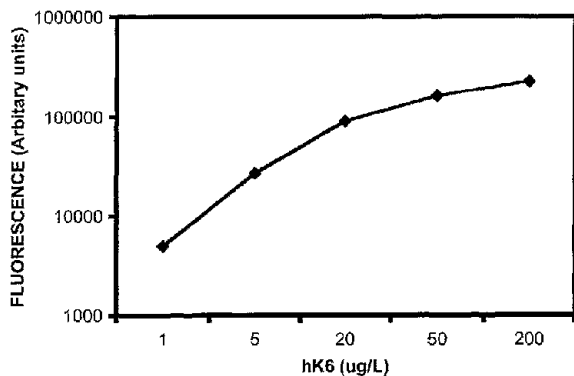
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/35232 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/574
- (21) International Application Number: PCT/CA01/01505
- (22) International Filing Date: 26 October 2001 (26.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/243,789 27 October 2000 (27.10.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MOUNT SINAI HOSPITAL [CA/CA]; 600 University Avenue, Toronto, Ontario M5G 1X5 (CA).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): DIAMANDIS, Fiechteris, P. [CA/CA]; 1504 Gerrard Street West, Suite 44, Toronto, Ontario M5G 2X2 (CA).
- (74) Agent: BERESKIN & PARR; 40 King Street West, Box 401, 40th Floor, Toronto, Ontario M5H 3Y2 (CA).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NG, NZ, PA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KE, LS, MW, NI, SD, SL, SZ, UZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING OVARIAN CANCER



(57) Abstract: A method for the diagnosis, prognosis, and monitoring of ovarian cancer in a subject by detecting hK6 in a sample from the subject, preferably a serum sample or tumor tissue extract. hK6 may be measured using a reagent that detects or binds to hK6 preferably antibodies specifically reactive with hK6 or a part thereof. Imaging methods for tumors associated with hK6 are also described using an agent that binds to hK6 which has a label for imaging the tumor.

WO 02/35232 A2

WO 02/35232 A2



Published:
*without international search report and to be republished
upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

TITLE: Methods for Detecting Ovarian Cancer**FIELD OF THE INVENTION**

The invention relates to diagnostic and prognostic methods for ovarian carcinoma.

5 BACKGROUND OF THE INVENTION

Until recently, the human kallikrein gene family was thought to consist of only 3 genes: pancreatic/renal kallikrein (KLK1, encoding for hK1 protein), human glandular kallikrein 2 (KLK2, encoding for hK2 protein) and human kallikrein 3 (KLK3, encoding for hK3 protein or prostate-specific antigen, PSA). The latter two kallikreins, PSA and hK2, are relatively prostatic-specific and they have already found
10 important applications as biomarkers for the diagnosis and monitoring of prostate cancer (1-6).

New members of the human kallikrein gene family have recently been discovered (1). This gene family now contains at least 14 genes which are all encoding for serine proteases, show significant homology at both the DNA and amino acid level and they are all localized at the chromosomal locus 19q13.3-q13.4, in tandem, without any intervention from other non-kallikrein genes. This area of investigation has recently
15 been reviewed (1).

The KLK6 gene (encoding for human kallikrein 6, hK6) has been cloned independently by three groups of investigators and was previously given the names zyme (7), protease M (8) and neurosin (9). Recently, uniform nomenclature for all newly discovered and the traditional kallikrein genes has been established (10). The KLK6 gene encodes for a trypsin-like serine protease of 244 amino acids in length,
20 of which 16 amino acids constitute the signal peptide and 5 amino acids, the activation peptide. The mature enzyme consists of 223 amino acids. It has been previously predicted that hK6 is a secreted protein (7-9,11). This was recently verified by finding hK6 protein in various biological fluids, including cerebrospinal fluid, nipple aspirate fluid, breast cyst fluid, male and female serum, seminal plasma, amniotic fluid and breast cancer cytosols (12). Little et al. (7) have demonstrated that this enzyme has amyloidogenic potential in the
25 brain and may play a role in the development and progression of Alzheimer's disease. Others have cloned the same gene by the method of differential display, and found that it is down-regulated in aggressive forms of breast cancer (8). The same gene was cloned by Yamashiro et al. from the human colon adenocarcinoma cell line COLO 201 (9).

Among the classical human kallikreins, PSA has proven to be the most valuable biomarker for
30 prostate cancer and is currently used for diagnosis and monitoring of this disease (2-4). Another potential prostatic biomarker, hK2, has also been recently introduced (5, 6). Among the newly discovered kallikreins (1), none of them has been examined as a serological marker for any malignancy since no methods currently exist to measure the secreted proteins with high sensitivity and specificity.

Ovarian cancer is a serious disease which causes more deaths than any other cancer of the female reproductive system (13). Since survival could be dramatically improved if the disease is diagnosed early
35 (14), there is great interest in the identification of biomarkers that could aid in the early detection and facilitate grading and/or staging (15). Unfortunately, the current serological markers for ovarian carcinoma,

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

2

including CA125 (16-19), inhibin (20-23), OVX1 (24) as well as many other markers (reviewed in 25) have shown some promise but have not gained wide clinical acceptance. Another potential ovarian cancer marker, lysophosphatidic acid appears to also have some value for this purpose (26).

There is an urgent need for discovery and validation of new biomarkers for ovarian carcinoma.

- 5 Early diagnosis of ovarian cancer, particularly with serological analysis, may improve clinical outcomes through administration of effective treatment.

SUMMARY OF THE INVENTION

10 A highly sensitive hK6 immunoassay for the measurement of hK6 in various biological fluids was developed (Example 1). Using this sensitive assay the hK6 concentration in serum was found to be significantly increased in a large proportion of patients with ovarian cancer. In particular, hK6 was found to be significantly increased in ovarian cancer patients when compared to normal non-cancer patients and patients with benign disease. Thus, hK6 constitutes a new biomarker for diagnosis and monitoring of ovarian cancer. hK6 may be used to diagnose and monitor late stage ovarian cancer, and it may be used as a biomarker before surgery or after relapse.

15 The present inventors also quantitated the amount of hK6 in extracts of ovarian tumors and determined that the amount of hK6 correlated with clinicopathological variables documented at the time of surgical excision and with progression free survival and overall survival. Increased hK6 levels were found to be predictive of more aggressive tumor behavior over time. hK6 positivity was found to be associated with about a 2-fold increase in the risk of both disease progression and of death.

20 hK6, and agents that bind to hK6 may be used to detect ovarian cancer and in particular they can be used in the diagnostic evaluation of ovarian cancer, and the identification of subjects with a predisposition to ovarian cancer.

The present invention relates to a method for diagnosing and monitoring ovarian cancer in a subject comprising measuring hK6 in a sample from the subject. hK6 may be measured using a reagent that detects or binds to hK6 preferably antibodies specifically reactive with hK6 or a part thereof.

25 In an aspect of the invention, a method is provided for detecting hK6 associated with ovarian cancer in a patient comprising:

- (a) taking a sample derived from a patient;
- (b) detecting or identifying in the sample hK6; and
- (c) comparing the detected amount with an amount detected for a standard.

30 The invention also relates to a method of screening a subject for ovarian cancer comprising: (a) obtaining a biological sample from a subject; (b) detecting the amount of hK6 in said sample; and (c) comparing said amount of hK6 detected to a predetermined standard, where detection of a level of hK6 greater than that of a standard indicates the presence of ovarian cancer, in particular late stage ovarian cancer.

35 The terms "detecting" or "detect" include assaying, quantitating, imaging or otherwise establishing the presence or absence of the target hK6, subunits thereof, or combinations of reagent bound targets, and the like, or assaying for, imaging, ascertaining, establishing, or otherwise determining one or more factual

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

3

characteristics of ovarian cancer, metastasis, stage, or similar conditions. The term encompasses diagnostic, prognostic, and monitoring applications for hK6.

In an embodiment, the invention relates to a method for detecting ovarian cancer in a subject by quantitating hK6 in a biological sample from the subject comprising (a) reacting the biological sample with an antibody specific for hK6 which is directly or indirectly labelled with a detectable substance; and (b) detecting the detectable substance.

The invention further relates to a method for diagnosing and monitoring ovarian carcinoma in a subject by quantitating hK6 in a sample from a subject comprising (a) reacting a biological sample from the subject with an antibody specific for hK6 which is directly or indirectly labelled with a detectable substance; (b) and detecting the detectable substance.

Embodiments of the methods of the invention involve (a) reacting a biological sample from a subject with an antibody specific for hK6 which is directly or indirectly labelled with an enzyme; (b) adding a substrate for the enzyme wherein the substrate is selected so that the substrate, or a reaction product of the enzyme and substrate forms fluorescent complexes; (c) quantitating hK6 in the sample by measuring fluorescence of the fluorescent complexes; and (d) comparing the quantitated levels to that of a standard. The standard may correspond to levels obtained for other samples from the subject patient, or control subjects. In an embodiment the quantitated levels are compared to levels quantitated for subjects without ovarian carcinoma wherein an increase in hK6 levels compared with the control subjects is indicative of ovarian carcinoma, in particular late stage ovarian carcinoma.

A preferred embodiment of the invention comprises the following steps

- (a) incubating a biological sample with a first antibody specific for hK6 which is directly or indirectly labeled with a detectable substance, and a second antibody specific for hK6 which is immobilized;
- (b) separating the first antibody from the second antibody to provide a first antibody phase and a second antibody phase;
- (c) detecting the detectable substance in the first or second antibody phase thereby quantitating hK6 in the biological sample; and
- (d) comparing the quantitated hK6 with levels for a standard.

The standard may correspond to levels quantitated for samples from healthy control subjects, from subjects with benign disease, subjects with early stage disease, or from other samples of the subject. Increased levels of hK6 as compared to the standard may be indicative of ovarian cancer, in particular late stage ovarian cancer.

The invention also contemplates the methods described herein using multiple markers for ovarian cancer. Therefore, the invention contemplates a method for analyzing a biological sample for the presence of hK6 and other markers that are specific indicators of ovarian cancer. Other markers include markers to kallikreins such as human stratum corneum chymotryptic enzyme (HSCCE), kallikrein 4, kallikrein 5, kallikrein 8, kallikrein 9, kallikrein 10, kallikrein 11; CA125, CA15-3, CA19-9, OVX1, lysophosphatidic acid

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

4

(LPA) and carcinoembryonic antigen (CEA). Preferably the other markers are markers to kallikreins. In a preferred embodiment, the markers are two or more of hK6, hK10, and CA 125. The methods described herein may be modified by including reagents to detect the additional markers, or nucleic acids for the markers.

5 The invention also relates to a method for imaging a tumor associated with hK6 comprising

(a) incubating the tumor with an agent that binds to hK6 for a sufficient period of time to permit the agent to bind to hK6 associated with the tumor, where the agent carries a label for imaging the tumor;

(b) detecting the presence of the label localized to the tumor.

10 In accordance with an aspect of the invention an in vivo method is provided comprising administering to a subject an agent that has been constructed to target one or more kallikreins.

The invention therefore contemplates an in vivo method comprising administering to a mammal one or more agent that carries a label for imaging and binds to a kallikrein, preferably hK6, and then imaging the mammal.

15 According to a preferred aspect of the invention, an in vivo method for imaging ovarian cancer is provided comprising:

(a) injecting a patient with an agent that binds to kallikrein 6, the agent carrying a label for imaging the ovarian cancer;

(b) allowing the agent to incubate in vivo and bind to kallikrein 6 associated with the ovarian cancer; and

20 (c) detecting the presence of the label localized to the ovarian cancer.

In an embodiment of the invention the agent is an antibody which recognizes the kallikrein. In another embodiment of the invention the agent is a chemical entity which recognizes the kallikrein.

25 The agent carries a label to image the kallikreins. Examples of labels useful for imaging are radiolabels, fluorescent labels (e.g. fluorescein and rhodamine), nuclear magnetic resonance active labels, positron emitting isotopes detectable by a positron emission tomography ("PET") scanner, chemiluminescers such as luciferin, and enzymatic markers such as peroxidase or phosphatase. Short-range radiation emitters, such as isotopes detectable by short-range detector probes can also be employed.

30 The invention also contemplates the localization or imaging methods described herein using multiple markers for ovarian cancer. For example, a method for imaging ovarian cancer may further comprise injecting the patient with one or more of an agent that binds to human stratum corneum chymotryptic enzyme (HSCCE), kallikrein 4, kallikrein 5, kallikrein 8, kallikrein 9, kallikrein 10, kallikrein 11, CA125, CA15-3, CA19-9, OVX1, lysophosphatidic acid (LPA) or carcinoembryonic antigen (CEA), preferably CA 125.

The invention also relates to kits for carrying out the methods of the invention.

35 Other objects, features and advantages of the present invention will become apparent from the following detailed description. It should be understood, however, that the detailed description and the specific examples while indicating preferred embodiments of the invention are given by way of illustration only, since

various changes and modifications within the spirit and scope of the invention will become apparent to those skilled in the art from this detailed description.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The invention will now be described in relation to the drawings in which:

- 5 Figure 1 is a calibration curve for a hK6 protein assay. The fluorescence of the zero standard (~18,000 arbitrary fluorescence units) was subtracted from all other measurements.
- Figure 2 shows the results of high performance liquid chromatography separation of three biological fluids and analysis of all fractions with the developed hK6 immunoassay. In all three fluids, a single immunoreactive peak around fractions 38 - 42 was detected, corresponding to a molecular mass of ~30 kDa.
- 10 The column was calibrated with molecular weight standards (shown on top with arrows; masses are in kDa). The milk sample was diluted 10 times before injection into the HPLC column.
- Figure 3 is a graph showing the results of the analysis of various human tissue cytosolic extracts for hK6 protein.
- Figure 4 is a graph showing the frequency distribution of hK6 concentrations in the serum of 80 patients with ovarian carcinoma. The level of 15 µg/L which was used as a cutoff in Table 1 is indicated by an arrow. About 66% of ovarian cancer patients have serum hK6 concentration higher than this cutoff value. From another 298 serum samples with non-ovarian cancer, only 2 sera had values slightly higher than 15 µg/L (see Table 1).
- 15 Figure 5 is a graph showing the correlation between hK6 and CA125 concentration in 96 serum samples from ovarian cancer patients.
- Figure 6 are graphs showing the analysis of hK6 and CA125 in serial serum samples from patients with ovarian cancer. These data suggest that hK6 may have value for patient monitoring.
- Figure 7A is a graph showing the distribution of hK6 in normal, to benign, to cancer patients.
- Figure 7B is a graph showing the distribution of CA 125 in normal, to benign, to cancer patients.
- 25 Figure 8 is a graph showing the concentration of hK6 in pre-surgical and post-surgical serum samples of ovarian cancer patients.
- Figure 9 is a graph showing the correlation between serum hK6 and CA125 concentrations.
- Figure 10 is a graph showing the sensitivity and specificity of serum hK6 concentrations.
- Figure 11A is a graph showing hK6 concentration versus stage of ovarian cancer.
- 30 Figure 11B is a graph showing hK6 concentration versus grade of ovarian cancer.
- Figure 12A is a graph showing the survival probability versus progression-free survival (PFS).
- Figure 12B is a graph showing the survival probability versus overall survival (OS).
- Figure 13(A) is a graph showing the frequency distribution of hK6 specific activity in ovarian tumor extracts. The value of 35ng/mg of total protein corresponds to the limit that, according to Chi square analysis, gives the best prediction of overall survival of the study population. (See Figure 13(B) for Chi square plot.) Tumors with hK6 in excess of 35 ng/mg total protein were classified as hK6 positive and those with values less than or equal to 35 ng/mg total protein were classified as hK6 negative. 30% of the tumors

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

6

were classified as positive by this criterion. (B) Plot of hK6 tumor specific activity versus Chi-square statistic to determine the limit between hK6 positive and hK6 negative tumors that is most predictive of overall survival. Maximum predictive potential occurred between 28 to 40 ng hK6 total extract protein with a peak at 35 ng hK6/mg total extract protein.

5 Figure 14 is a graph showing a comparison of hK6 concentration in extracts from normal ovarian tissues ("normal"), and ovarian cancer ("cancer"). N indicates the number of specimens in each group. Horizontal bars represent the median hK6 specific activity (ng hK6/mg total extract protein) in each group. The Kruskal-Wallis test showed that extracted hK6 specific activity was significantly elevated in the ovarian tumor preparations ($P < 0.001$).

10 Figure 15 is a graph showing the distribution of hK6 specific activity (ng hK6/mg total protein) in tumor extracts from stage I/II and stage III/IV ovarian cancer patients. N indicates the number of tumors comprising each group. Horizontal bars represent the median value of hK6 tumor specific activity. The Mann-Whitney test demonstrated that hK6 specific activity was significantly elevated in tumors from patients with stage III/IV ovarian cancer ($P = 0.002$).

15 Figure 16 shows Kaplan-Meier survival curves of the entire patient population under study: effect of hK6 status. Top: progression-free survival (PFS). Bottom: overall survival (OS). The patient number in each group (n) is indicated as is the statistical significance (P value) of the survival difference between hK6 positive and hK6 negative groups. The adverse effect of hK6 positivity on both time to progression and overall survival was significant.

20 Figure 17 are graphs showing the effect of hK6 status (positive or negative) on progression-free survival (PFS) and on overall survival (OS) among patients with Grade I and II ovarian tumor. The patient number in each group (n) is indicated as is the statistical significance (P value) of the survival difference between hK6 positive and hK6 negative individuals. The adverse effect of hK6 positivity both on time to progression and on overall survival was significant ($P \leq 0.002$).

25 Figure 18 is a blot showing immunohistochemical localization of hK6 in ovarian neoplasms of varying malignant potential, cell type, and origin (epithelial versus mesenchymal). (A) Invasive papillary serous adenocarcinoma, the common malignant epithelial tumor of the ovary. Note strong cytoplasmic staining of many tumor cells, and absence of any staining of stroma or vessels. (B) Serous cystadenofibroma, a benign, mixed epithelial and fibrous neoplasm. Immunostaining is absent in the fibrous component, but strongly positive in the cytoplasm of the epithelium lining the cysts. (C) Ovarian leiomyoma, a benign smooth muscle tumor. Note the absence of staining. (D) Mucinous epithelial tumor of low malignant potential, an epithelial tumor of intermediate grade. Note weak, diffuse cytoplasmic staining of neoplastic epithelium and absent staining in supportive stroma (far left).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

35 As hereinbefore mentioned, the present invention provides a method for monitoring, diagnosing, or for the prognosis of ovarian carcinoma in a subject by detecting hK6 in a biological sample from the subject. In an embodiment, the method comprises reacting the sample with an agent that binds to hK6,

preferably an antibody specific for hK6 which is directly or indirectly labelled with a detectable substance, and detecting the detectable substance.

The methods of the invention may be used for the detection of either an over- or an under-abundance of hK6 relative to a non-disorder state or the presence of a modified (e.g., less than full length) hK6 which correlates with a disorder state (e.g. ovarian cancer), or a progression toward a disorder state. The methods described herein may be used to evaluate the probability of the presence of malignant or pre-malignant cells, for example, in a group of cells freshly removed from a host. Such methods can be used to detect tumors, quantitate their growth, and help in the diagnosis and prognosis of disease. The methods can be used to detect the presence of cancer metastasis, as well as confirm the absence or removal of all tumor tissue following surgery, cancer chemotherapy, and/or radiation therapy. They can further be used to monitor cancer chemotherapy and tumor reappearance.

The methods of the invention are particularly useful in the diagnosis of late stage ovarian carcinoma and for the prognosis of ovarian carcinoma disease progression and mortality. As illustrated herein increased levels of hK6 detected in serum compared to a standard are indicative of late stage disease, and increased levels of hK6 in tumor tissues or extracts thereof compared to a standard are indicative of increased risk of disease progression and mortality.

The terms "sample", "biological sample", and the like mean a material known to or suspected of expressing or containing hK6. The test sample can be used directly as obtained from the source or following a pretreatment to modify the character of the sample. The sample can be derived from any biological source, such as tissues or extracts, including cells (e.g. tumor cells) and physiological fluids, such as, for example, whole blood, plasma, serum, saliva, ocular lens fluid, cerebral spinal fluid, sweat, urine, milk, ascites fluid, synovial fluid, peritoneal fluid and the like. The sample can be obtained from animals, preferably mammals, most preferably humans. The sample can be treated prior to use, such as preparing plasma from blood, diluting viscous fluids, and the like. Methods of treatment can involve filtration, distillation, extraction, concentration, inactivation of interfering components, the addition of reagents, and the like. Proteins may be isolated from the samples and utilized in the methods of the invention. In a preferred embodiment, the biological sample is serum or tumor tissue extracts, most preferably serum.

In embodiments of the invention, the method described herein is adapted for diagnosing and monitoring, and for the prognosis of ovarian carcinoma by detecting hK6 in biological samples from a subject. These applications require that the amount of hK6 detected in a sample from a subject being tested be compared to levels detected for another sample or an earlier sample from the subject, or levels detected for a control sample. Levels for control samples from healthy subjects or subjects with benign disease may be established by prospective and/or retrospective statistical studies. Healthy subjects who have no clinically evident disease or abnormalities may be selected for statistical studies. Diagnosis may be made by a finding of statistically different levels of hK6 compared to a control sample or previous levels detected for the same subject.

The term "hK6" refers to human kallikrein 6, (also known as zyme, protease M, and neurosin) a

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

8

trypsin-like serine protease of 244 amino acids in length, of which 16 amino acids constitute the signal peptide and 5 amino acids, the activation peptide (7, 8, and 9). The term includes all homologs, naturally occurring allelic variants, isoforms and precursors of human kallikrein 6 of GenBank Accession Nos. AF013988, AF149289, HSU62801, D78203, and NM002774. In general for example, naturally occurring allelic variants of human kallikrein 6 will share significant homology (70-90%) to the sequences shown in GenBank Accession Nos. AF013988, AF149289, HSU62801, D78203, and NM002774. Allelic variants may contain conservative amino acid substitutions from the KLK6 sequence or will contain a substitution of an amino acid from a corresponding position in a hK6 homologue such as, for example, the murine kallikrein 6 homologue.

10 The term "subject" refers to a warm-blooded animal such as a mammal which is afflicted with or suspected to be afflicted with ovarian cancer. Preferably, "subject" refers to a human.

The antibodies specific for hK6 used in the methods of the invention may be obtained from scientific or commercial sources. Alternatively, isolated native hK6 or recombinant hK6 may be utilized to prepare antibodies, monoclonal or polyclonal antibodies, and immunologically active fragments (e.g. a Fab or (Fab)₂ fragment), an antibody heavy chain, an antibody light chain, humanized antibodies, a genetically engineered single chain F₁ molecule (Ladner et al, U.S. Pat. No. 4,946,778), or a chimeric antibody, for example, an antibody which contains the binding specificity of a murine antibody, but in which the remaining portions are of human origin. Antibodies including monoclonal and polyclonal antibodies, fragments and chimeras, may be prepared using methods known to those skilled in the art. Preferably, antibodies used in the methods of the invention are reactive against hK6 if they bind with a K_d of greater than or equal to 10⁻⁷ M. In a sandwich immunoassay of the invention mouse polyclonal antibodies and rabbit polyclonal antibodies are utilized.

25 Antibodies specifically reactive with hK6, or derivatives, such as enzyme conjugates or labeled derivatives, may be used to detect hK6 in various biological samples, for example they may be used in any known immunoassays which rely on the binding interaction between an antigenic determinant of a protein and the antibodies. Examples of such assays are radioimmunoassays, enzyme immunoassays (e.g. ELISA), immunofluorescence, immunoprecipitation, latex agglutination, hemagglutination, and histochemical tests.

An antibody specific for hK6 may be labelled with a detectable substance and localised or identified in biological samples based upon the presence of the detectable substance. Examples of detectable substances include, but are not limited to, the following: radioisotopes (e.g., ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), fluorescent labels (e.g., FITC, rhodamine, lanthanide phosphors), luminescent labels such as luminol; enzymatic labels (e.g., horseradish peroxidase, beta-galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase, acetylcholinesterase), biotinyl groups (which can be detected by marked avidin e.g., streptavidin containing a fluorescent marker or enzymatic activity that can be detected by optical or calorimetric methods), predetermined polypeptide epitopes recognized by a secondary reporter (e.g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags). Indirect methods may also be employed in which the primary antigen-antibody reaction is amplified by the introduction of a second antibody, having specificity

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

9

for the antibody reactive against hK6. By way of example, if the antibody having specificity against hK6 is a rabbit IgG antibody, the second antibody may be goat anti-rabbit gamma-globulin labelled with a detectable substance as described herein.

5 Methods for conjugating or labelling the antibodies discussed above may be readily accomplished by one of ordinary skill in the art. (See for example Juman, *Methods In Enzymology*, Vol. 34, Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B, Jakoby and Wilchek (eds.), Academic Press, New York, p. 30, 1974; and Wilchek and Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications," *Anal. Biochem.* 171:1-32, 1988 re methods for conjugating or labelling the antibodies with enzyme or ligand binding partner).

10 Time-resolved fluorometry may be used to detect a signal. For example, the method described in Christopoulos TK and Diamandis EP Anal Chem 1992:64:342-346 may be used with a conventional time-resolved fluorometer.

Therefore, in accordance with an embodiment of the invention, a method is provided wherein a hK6 antibody is labelled with an enzyme, a substrate for the enzyme is added wherein the substrate is selected so that the substrate, or a reaction product of the enzyme and substrate, forms fluorescent complexes with a lanthanide metal. A lanthanide metal is added and hK6 is quantitated in the sample by measuring fluorescence of the fluorescent complexes. The antibodies specific for hK6 may be directly or indirectly labelled with an enzyme. Enzymes are selected based on the ability of a substrate of the enzyme, or a reaction product of the enzyme and substrate, to complex with lanthanide metals such as europium and terbium. Examples of suitable enzymes include alkaline phosphatase and β -galactosidase. Preferably, the enzyme is alkaline phosphatase. 15 The hK6 antibodies may also be indirectly labelled with an enzyme. For example, the antibodies may be conjugated to one partner of a ligand binding pair, and the enzyme may be coupled to the other partner of the ligand binding pair. Representative examples include avidin-biotin, and riboflavin-riboflavin binding protein. Preferably the antibodies are biotinylated, and the enzyme is coupled to streptavidin.

In the method, antibody bound to hK6 in a sample is detected by adding a substrate for the enzyme. 25 The substrate is selected so that in the presence of a lanthanide metal (e.g. europium, terbium, samarium, and dysprosium, preferably europium and terbium), the substrate, or a reaction product of the enzyme and substrate, forms a fluorescent complex with the lanthanide metal. Examples of enzymes and substrates for enzymes that provide such fluorescent complexes are described in U.S. Patent No. 5,312,923 to Diamandis. By way of example, when the antibody is directly or indirectly labelled with alkaline phosphatase the substrate employed in the method may be 4-methylumbelliferyl phosphate, or 5-fluorosalicyl phosphate. The fluorescence intensity of the complexes is typically measured using a time-resolved fluorometer e.g. a 30 CyberFluor 615 Immuoanalyzer (Nordion International, Kanata, Ontario).

The sample, an antibody specific for hK6, or hK6 may be immobilized. Examples of suitable carriers are agarose, cellulose, dextran, Sephadex, Sepharose, liposomes, carboxymethyl cellulose polystyrene, filter paper, ion-exchange resin, plastic film, plastic tube, glass beads, polyamine-methyl vinyl- 35 ether-maleic acid copolymer, amino acid copolymer, ethylene-maleic acid copolymer, nylon, silk, etc. The carrier may be in the shape of, for example, a tube, test plate, well, beads, disc, sphere etc. The immobilized

antibody may be prepared by reacting the material with a suitable insoluble carrier using known chemical or physical methods, for example, cyanogen bromide coupling.

In accordance with an embodiment, the present invention provides means for determining hK6 in a blood sample or tumor tissue extract, preferably a serum sample, by measuring hK6 by immunoassay. It will be evident to a skilled artisan that a variety of immunoassay methods can be used to measure hK6. In general, an hK6 immunoassay method may be competitive or noncompetitive. Competitive methods typically employ an immobilized or immobilizable antibody to hK6 (anti-hK6) and a labeled form of hK6. Sample hK6 and labeled hK6 compete for binding to anti-hK6. After separation of the resulting labeled hK6 that has become bound to anti-hK6 (bound fraction) from that which has remained unbound (unbound fraction), the amount of the label in either bound or unbound fraction is measured and may be correlated with the amount of hK6 in the test sample in any conventional manner, e.g., by comparison to a standard curve.

Preferably a non-competitive method is used for the determination of hK6, with the most common method being the "sandwich" method. In this assay, two anti-hK6 antibodies are employed. One of the anti-hK6 antibodies is directly or indirectly labeled (sometimes referred to as the "detection antibody") and the other is immobilized or immobilizable (sometimes referred to as the "capture antibody"). The capture and detection antibodies can be contacted simultaneously or sequentially with the test sample. Sequential methods can be accomplished by incubating the capture antibody with the sample, and adding the detection antibody at a predetermined time thereafter (sometimes referred to as the "forward" method); or the detection antibody can be incubated with the sample first and then the capture antibody added (sometimes referred to as the "reverse" method). After the necessary incubation(s) have occurred, to complete the assay, the capture antibody is separated from the liquid test mixture, and the label is measured in at least a portion of the separated capture antibody phase or the remainder of the liquid test mixture. Generally it is measured in the capture antibody phase since it comprises hK6 bound by ("sandwiched" between) the capture and detection antibodies.

In a typical two-site immunometric assay for hK6, one or both of the capture and detection antibodies are polyclonal antibodies. The label used in the detection antibody can be selected from any of those known conventionally in the art. The label may be an enzyme or a chemiluminescent moiety, but it can also be a radioactive isotope, a fluorophore, a detectable ligand (e.g., detectable by a secondary binding by a labeled binding partner for the ligand), and the like. Preferably the antibody is labelled with an enzyme which is detected by adding a substrate that is selected so that a reaction product of the enzyme and substrate forms fluorescent complexes. The capture antibody is selected so that it provides a means for being separated from the remainder of the test mixture. Accordingly, the capture antibody can be introduced to the assay in an already immobilized or insoluble form, or can be in a immobilizable form, that is, a form which enables immobilization to be accomplished subsequent to introduction of the capture antibody to the assay. An immobilized capture antibody may comprise an antibody covalently or noncovalently attached to a solid phase such as a magnetic particle, a latex particle, a microtiter plate well, a bead, a cuvette, or other reaction vessel. An example of an immobilizable capture antibody is antibody which has been chemically modified

with a ligand moiety, e.g., a hapten, biotin, or the like, and which can be subsequently immobilized by contact with an immobilized form of a binding partner for the ligand, e.g., an antibody, avidin, or the like. In an embodiment, the capture antibody may be immobilized using a species specific antibody for the capture antibody that is bound to the solid phase.

5 A particular sandwich immunoassay method of the invention employs two antibodies reactive against hK6, a second antibody having specificity against an antibody reactive against hK6 labelled with an enzymatic label, and a fluorogenic substrate for the enzyme. In an embodiment, the enzyme is alkaline phosphatase (ALP) and the substrate is 5-fluorosallyl phosphate. ALP cleaves phosphate out of the fluorogenic substrate, 5-fluorosallyl phosphate, to produce 5-fluorosallylic acid (FSA). 5-Fluorosallylic acid can then form a highly fluorescent ternary complex of the form FSA-Tb(3+)-EDTA, which can be
10 quantified by measuring the Tb3+ fluorescence in a time-resolved mode. Fluorescence intensity is measured using a time-resolved fluorometer as described herein.

The above-described immunoassay methods and formats are intended to be exemplary and are not limiting since, in general, it will be understood that any immunoassay method or format can be used in the
15 present invention.

The methods of the invention can be carried out using a diagnostic kit for quantitating hK6 in a sample. By way of example, the kit may contain antibodies specific for hK6, antibodies against the antibodies labelled with an enzyme, and a substrate for the enzyme. The kit may also contain microtiter plate wells, standards, assay diluent, wash buffer, adhesive plate covers, and/or instructions for carrying out a method of
20 the invention using the kit.

Antibodies specific for hK6 may also be used in imaging methodologies in the management of ovarian cancer. The invention provides a method for imaging tumors associated with hK6 and optionally one or more other kallikreins, preferably kallikreins associated with ovarian cancer, including but not limited to hK4, hK5, hK8, hK9, hK10 and hK11.

25 The invention also contemplates imaging methods described herein using multiple markers for ovarian cancer. For example, a method for imaging ovarian cancer may utilize an agent that binds to hK6 and one or more of an agent that binds to human stratum corneum chymotryptic enzyme (HSCCE), kallikrein 4, kallikrein 5, kallikrein 8, kallikrein 9, kallikrein 10, kallikrein 11, CA125, CA15-3, CA19-9, OVX1, lysophosphatidic acid (LPA) or carcinoembryonic antigen (CEA), preferably Ca 125. Preferably each agent
30 is labeled so that it can be distinguished during the imaging.

In an embodiment the method is an in vivo method and a subject or patient is administered one or more agents that carry an imaging label and that are capable of targeting or binding to a kallikrein, preferably hK6. The agent is allowed to incubate in vivo and bind to the kallikrein(s) associated with a tumor, preferably ovarian tumors. The presence of the label is localized to the ovarian cancer, and the localized label is detected using imaging devices known to those skilled in the art.
35

The agent may be an antibody or chemical entity which recognizes the kallikrein(s). In an aspect of the invention the agent is a polyclonal antibody or monoclonal antibody, or fragments thereof, or

constructs thereof including but not limited to, single chain antibodies, bifunctional antibodies, molecular recognition units, and peptides or entities that mimic peptides. The antibodies specific for the kallikreins used in the methods of the invention may be obtained from scientific or commercial sources, or isolated native kallikrein or recombinant kallikrein may be utilized to prepare antibodies etc as described herein.

- 5 An agent may be a peptide that mimics the epitope for an antibody specific for a kallikrein and binds to the kallikrein. The peptide may be produced on a commercial synthesizer using conventional solid phase chemistry. By way of example, a peptide may be prepared that includes either tyrosine lysine, or phenylalanine to which N_2S_2 chelate is complexed (See U.S. Patent No. 4,897,255). The anti-kallikrein peptide conjugate is then combined with a radiolabel (e.g. sodium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pertechnetate or sodium ^{188}Re perrhenate) and it may be used to locate a kallikrein producing tumor.

- 10 The agent carries a label to image the kallikreins. The agent may be labelled for use in radionuclide imaging. In particular, the agent may be directly or indirectly labelled with a radioisotope. Examples of radioisotopes that may be used in the present invention are the following: ^{227}Ac , ^{211}At , ^{130}Ba , ^{131}Ba , ^7Be , ^{204}Bi , ^{205}Bi , ^{210}Bi , ^{76}Br , ^{82}Br , ^{100}Cd , ^{47}Ca , ^{44}Ca , ^{46}Ca , ^{35}Cl , ^{48}Cr , ^{51}Cr , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{165}Dy , ^{153}Eu , ^{152}Gd , ^{154}Gd , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}Ga , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{166}Ho , ^{111}In , ^{113}In , $^{115\text{m}}\text{In}$, ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{189}Ir , $^{191\text{m}}\text{Ir}$, ^{192}Ir , ^{194}Ir , ^{52}Fe , ^{55}Fe , ^{59}Fe , ^{177}Lu , ^{150}Os , $^{194\text{m}}\text{Os}$, ^{109}Pd , ^{32}P , ^{33}P , ^{42}K , ^{223}Ra , ^{187}Re , ^{188}Re , $^{87\text{m}}\text{Rb}$, ^{153}Sm , ^{45}Sc , ^{47}Sc , ^{72}Se , ^{75}Se , ^{102}Ag , ^{23}Na , ^{24}Na , ^{89}Sr , ^{85}Sr , ^{35}S , ^{177}Ta , ^{96}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{201}Tl , ^{202}Tl , ^{113}Sn , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{121}Sn , ^{166}Yb , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{67}Zn and ^{65}Zn . Preferably the radioisotope is ^{125}I , ^{123}I , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{90}Y , ^{188}Re , ^{188}Re , ^{32}P , ^{153}Sm , ^{67}Ga , ^{201}Tl ^{76}Br , or ^{18}F , and is imaged with a photoscanning device.

- 20 Procedures for labeling biological agents with the radioactive isotopes are generally known in the art. U.S. Pat. No. 4,302,438 describes tritium labeling procedures. Procedures for iodinating, tritium labeling, and ^{35}S labeling especially adapted for murine monoclonal antibodies are described by Goding, J. W. (supra, pp 124-126) and the references cited therein. Other procedures for iodinating biological agents, such as antibodies, binding portions thereof, probes, or ligands, are described in the scientific literature (see Hunter and Greenwood, Nature 144:945 (1962), David et al., Biochemistry 13:1014-1021 (1974), and U.S. Pat. Nos. 3,867,517 and 4,376,110). Iodinating procedures for agents are described by Greenwood, F. et al., Biochem. J. 89:114-123 (1962); Marchalonis, J., Biochem. J. 113:299-305 (1969); and Morrison, M. et al., Immunochimistry, 289-297 (1971). $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeling procedures are described by Rhoads, B. et al. in Burchiel, S. et al. (eds.), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111-123 (1982) and the references cited therein. Labelling of antibodies or fragments with technetium-99m are also described for example in U.S. Pat. No. 5,317,091, U.S. Pat. No. 4,478,815, U.S. Pat. No. 4,478,818, U.S. Pat. No. 4,472,371, U.S. Pat. No. Re 32,417, and U.S. Pat. No. 4,311,688. Procedures suitable for ^{111}In -labeling biological agents are described by Hnatowich, D. J. et al., J. Immunol. Methods, 65:147-157 (1983), Hnatowich, D. et al., J. Applied Radiation, 35:554-557 (1984), and Buckley, R. G. et al., F.E.B.S. 166:202-204 (1984).

35 An agent may also be labeled with a paramagnetic isotope for purposes of an *in vivo* method of the invention. Examples of elements that are useful in magnetic resonance imaging include gadolinium, terbium,

tin, iron, or isotopes thereof. (See, for example, Schaefer et al., (1989) JACC 14, 472-480; Shreve et al., (1986) Magn. Reson. Med. 3, 336-340; Wolf, G L., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 93-95; Wesbey et al., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 145-155; Runge et al., (1984) Invest. Radiol. 19, 408-415 for discussions on *in vivo* nuclear magnetic resonance imaging.)

5 In the case of a radiolabeled agent, the agent may be administered to the patient, it is localized to the tumor having a kallikrein with which the agent binds, and is detected or "imaged" *in vivo* using known techniques such as radionuclear scanning using e.g., a gamma camera or emission tomography. [See for example A. R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwin et al., (eds.), pp. 65-85 (Academic Press 1985)]. A positron emission
10 transaxial tomography scanner, such as the scanner designated Pet VI located at Brookhaven National Laboratory, can also be used where the radiolabel emits positrons (e.g., ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N).

Whole body imaging techniques using radioisotope labeled agents can be used for locating both primary tumors and tumors which have metastasized. Antibodies specific for kallikreins, or fragments thereof having the same epitope specificity, are bound to a suitable radioisotope, or a combination thereof, and
15 administered parenterally. For ovarian cancer, administration preferably is intravenous. The bio-distribution of the label can be monitored by scintigraphy, and accumulations of the label are related to the presence of ovarian cancer cells. Whole body imaging techniques are described in U.S. Pat. Nos. 4,036,945 and 4,311,688. Other examples of agents useful for diagnosis and therapeutic use which can be coupled to antibodies and antibody fragments include metallothionein and fragments (see, U.S. Pat. No. 4,732,864).
20 These agents are useful in diagnosis staging and visualization of cancer, in particular ovarian cancer, so that surgical and/or radiation treatment protocols can be used more efficiently.

The invention also contemplates kits for carrying out the methods of the invention. The kits include an antibody or an antibody fragment which binds specifically to an epitope of a kallikrein, and means for
25 detecting binding of the antibody to its epitope associated with tumor cells, either as concentrates (including lyophilized compositions), which may be further diluted prior to use or at the concentration of use, where the vials may include one or more dosages. Where the kits are intended for *in vivo* use, single dosages may be provided in sterilized containers, having the desired amount and concentration of agents. Containers that provide a formulation for direct use, usually do not require other reagents, as for example, where the kit contains a radiolabelled antibody preparation for *in vivo* imaging.

30 The following non-limiting examples are illustrative of the present invention:

Example 1

Immunofluorometric Assay of Human Kallikrein 6 (Zymogen/Protease M/Neurosin) Materials and Methods

Difluorosal phosphate (DFP) was synthesized in the laboratory (difluorosal, obtained from Sigma
35 Chemical Co., St. Louis, MO). The stock solution of DFP was 0.01 mol/L in 0.1 mol/L NaOH. DFP stock solutions are stable at 4°C for at least 6 months. Alkaline phosphatase-labeled goat anti-rabbit IgG (GARlg-ALP) and sheep anti-mouse immunoglobulin G (Fc fragment-specific) were obtained from Jackson

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

14

Immunoresearch, West Grove, PA. Working solutions of GAR1g-A1P were prepared by diluting the stock solution 3,000-fold in the assay buffer (described below). White, opaque 12-well polystyrene microtiter strips were obtained from Dynatech Labs., Alexandria, VA. The substrate buffer was a Tris buffer (0.1 mol/L, pH 9.1) containing 0.1 mol of NaCl and 1 mmol of MgCl₂ per liter. The substrate working solution (DFP, 1 mmol/L in substrate buffer) was prepared just before use by diluting the DFP stock solution 10-fold in the substrate buffer. The wash solution was prepared by dissolving 9 g of NaCl and 0.5 g of polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20) in 1 L of a 10 mmol/L Tris buffer, pH 7.40. The developing solution contained 1 mol of Tris base, 0.4 mol of NaOH, 2 mmol of TbCl₃ and 5 mmol of EDTA per liter (no pH adjustment). The assay buffer A was a 50 mmol/L Tris buffer, pH 7.40, containing 60 g of BSA, 0.5 g of sodium azide, 100 mL of normal goat serum, 25 mL of normal mouse serum, 5 g of bovine IgG and 0.5 g of Tween 20 per liter. The assay buffer B was the same as assay buffer A except that mouse serum was omitted.

CLINICAL SAMPLES

Several clinical samples were used to examine the presence of hK6. These included serum and urine samples from male and female individuals (healthy blood donors), breast cyst fluids obtained by needle aspiration, breast tumor cytosolic extracts, prepared as described previously (11), amniotic fluids, milks from lactating women, seminal plasmas, nipple aspirate fluids (NAFs) and cerebrospinal fluids (CSFs). In addition, a panel of human tissue cytosolic extracts, prepared as previously described were tested (Hassapoglou, S. et al *Oncogene* 1993, 8:1501-1509). To establish optimal measuring conditions, all samples were tested at various dilutions. The procedures are in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

All tissues and fluid samples were stored at -80°C until use.

INSTRUMENTATION

A time-resolved fluorometer, the CyberFluor 615 Immunoanalyzer (MDS Nordion, Kanata, ON, Canada) was used to measure Tb³⁺ fluorescence in white microtiter wells. This procedure has been described in detail elsewhere (Christopoulos, TK, et al *Anal Chem* 1992, 64:342-346; Ferguson RA et al, *Clin Chem* 1996 42: 675-694).

PROCEDURES

Production and purification of recombinant hK6 protein. Human 293 cells transfected with a plasmid containing the 1.4-kb hK6 cDNA were subjected to selection by growth in G418 (400 mg/L) for three weeks, after which time stable transformants were isolated. One clone generated identifiable amounts of hK6 protein in the culture medium. This cell line was cultured and the tissue culture supernatant was collected and concentrated by using Centricon ultrafiltration devices (Millipore, Waltham, MA 02454). Purification of hK6 from the concentrated cell culture supernatants was achieved by reversed-phase high pressure liquid chromatography (C-8, Aquapore RP-300, 0.45 x 25 cm, Applied Biosystems, Foster City, CA) using a linear gradient of 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile. Generally, the gradient increased at a rate of 1% acetonitrile per min. Fractions containing hK6 were located by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis,

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

15

collected, lyophilized and stored at -20°C (Little SP et al, J. Biol Chem 1997;272:251135-25142).

Development of polyclonal antibodies against hK6. Purified recombinant hK6 protein was used to immunize rabbits and mice using standard procedures (Campbell Am, *Production and purification of antibodies*. In: *Immunossay*. Diamandis EP, Christopoulos TK (eds) 00. 95-115, Academic Press, San Diego, 1996). The rabbit and mice antisera were used for the development of the immunofluorometric assay without further purification.

5 **Coating of microtiter plates with sheep anti-mouse immunoglobulin.** White polystyrene microtiter wells were coated by incubating overnight 500 ng / 100 µL per well of the coating antibody diluted in a 50 mmol/L Tris buffer, pH 7.80. The wells were then washed six times with the wash solution and blocked for 1 hour with 200 µL/well of the blocking solution (10 g/L BSA in 50 mmol/L Tris, pH 7.80). After another six washes, the wells were ready to use.

hK6 calibration. hK6 calibrators of 0, 1, 5, 20, 50 and 200 µg/L were prepared by diluting recombinant purified hK6 protein in a 50 mmol/L Tris buffer, pH 7.80, containing 60 g of BSA and 0.5 g of sodium azide per liter.

15 **hK6 assay.** Calibrators or samples (100 µL) were pipetted into the microtiter wells and 50 µL of the polyclonal mouse anti-hK6 antiserum, diluted 5,000-fold in assay buffer B, were added. The wells were then incubated with shaking at room temperature for 2 hours and washed six times. To each well, was added 100 µL of rabbit anti-hK6 antibody, diluted 1,000-fold in assay buffer A, incubated for 30 min as described above, and then washed six times. To each well, was added 100 µL of a goat anti-rabbit immunoglobulin, conjugated to alkaline phosphatase, diluted 3,000-fold in assay buffer A and incubated for 30 min, as described above. The wells were then washed six times; 100 µL of 1 mmol/L DFP working substrate solution was added, and the wells were incubated for 10 min, as described above. 100 µL of developing solution was added to each well, the wells were mixed by mechanical shaking for 1 min and the fluorescence was measured with the time-resolved fluorometer. The calibration and data reduction were performed automatically by the CyberFluor 615 Immun analyzer.

20 **High performance liquid chromatography (HPLC):** Various biological fluids have been fractionated on a gel filtration column, using the procedures described elsewhere (Yu H, Diamandis EP, *Clin Chem* 1993; 39:2108-2114; Diamandis, EP et al *Clin Chem* 1997;43:1365-1371). HPLC fractions were collected and analyzed for hK6 with the developed immunofluorometric assay.

30 Results

ASSAY OPTIMIZATION

Two polyclonal antibodies against recombinant hK6 protein were used, one developed in mice and one developed in rabbits. The chosen assay configuration (indirect coating of the wells with a sheep anti-mouse antibody and detection of the immunocomplex with a goat anti-rabbit immunoglobulin, conjugated to alkaline phosphatase) demonstrated good sensitivity (see below) without the need for any purification or conjugation of the primary antibodies. The amounts of antibodies used, the diluents and incubation times of the various assay steps were optimized. Optimal conditions were selected based on the lowest achievable

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

16

detection limit and best assay linearity and dynamic range. The final conditions are described above.

CALIBRATION CURVE, DETECTION LIMIT, PRECISION

5 A typical calibration curve of the proposed hK6 assay is shown in Figure 1. The detection limit, defined as the concentration of hK6 corresponding to the fluorescence of the zero calibrator plus two standard deviations, is $\leq 0.5 \mu\text{g/L}$. Within-run and between-run precision was assessed at various hK6 concentrations between 2-50 $\mu\text{g/L}$ and with various clinical samples. In all cases, the coefficients of variation (CVs) were between 2 and 9%, consistent with the precision of typical microtiter plate-based immunoassays.

SPECIFICITY

10 hK6 protein was detected in various biological fluids. In order to ensure that the immunofluorometric assay measures hK6 with high sensitivity and specificity, separated in a gel filtration column three biological fluids with relatively high hK6 concentration, (namely one human milk from a lactating woman, one cerebrospinal fluid and one serum sample from an ovarian cancer patient who was found to have high levels of this biomarker in serum) were separated in and measured on a gel filtration column. The results are shown in Figure 2. In all three biological fluids tested, a single immunoreactive species of a molecular mass of $\sim 30 \text{ kDa}$ was detected, which is consistent with the molecular mass of hK6 protein. Higher molecular weight complexes were not detected suggesting that hK6 is present in these biological fluids in its free form. Other serum proteinases (e.g. PSA) are present in serum and other fluids mostly bound to proteinase inhibitors (Stenman U-H, et al. *Cancer Res.* 1991; 51:222-226); Christenson A et al *Can J Biochem* 1990; 194: 755-762).

20 hK6 IN BIOLOGICAL FLUIDS AND TISSUE EXTRACTS

To obtain preliminary information on the presence of hK6 in biological fluids, various clinical samples were analyzed, as shown in Table 1. The highest concentration of hK6 was found in milk of lactating women, followed by cerebrospinal fluid, nipple aspirate fluid and breast cyst fluid. hK6 was also detected in male and female serum samples, in the majority of seminal plasmas and in a relatively small percentage of amniotic fluids and breast tumor cytosolic extracts. hK6 protein was not detected in urine.

25 A number of human tissue cytosolic extracts were also tested. The highest concentration of hK6 was detected in the salivary glands, followed by lung, colon, fallopian tube, placenta, breast, pituitary and kidney. The following tissues tested negative: skin, spleen, bone, thyroid, heart, uterus, liver, muscle, endometrium, testis, pancreas, seminal vesicle, ovary, adrenals and prostate (Figure 3).

30 Discussion

The present inventors have developed polyclonal antibodies and an immunofluorometric procedure suitable for quantifying hK6 protein in biological fluids and tissue extracts. Since a rich natural source of hK6 protein is not known, recombinant hK6 protein was used for the development of polyclonal rabbit and mice antibodies. This recombinant protein ensures high purity without any contaminating proteins. The chosen assay configuration does not need any further purification or conjugation of the primary antibodies used, and it is thus a convenient method for developing sensitive immunofluorometric procedures. The same principle has been adopted previously for measuring the p53 tumor suppressor in biological fluids

(Hassapoglidou S et al, *Oncogene* 1993; 8: 1501-1509).

The developed immunoassay for hK6 protein demonstrates good sensitivity, dynamic ranges and linearity (Figure 1). It has been further verified that this assay detects a single immunoreactive band in the biological fluids examined. In serum, this proteinase is present in its free form, similarly to observations with hK2 measurements (Black, MH et al *Clin Chem* 1999; 45:790-799). However, this is in contrast to the situation with PSA, which is known to be present in serum mainly bound to α_1 -antichymotrypsin (Stenman U-H, et al, *Cancer Res.* 1991; 51:222-226); Christensson A et al *Cur J Biochem* 1990; 194; 755-763).

The survey of a relatively large number of biological fluids has indicated that hK6 protein is present at relatively high concentrations in milk of lactating women and other breast secretions, including nipple aspirate fluid and breast cyst fluid (Table 1). Previously, the presence of other kallikreins, including PSA and hK2, has been demonstrated in these biological fluids (Yu, H *Diamandis; Clin Chem* 1995: 41:54-58; Sauter ER et al *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 1996 967-970; *Diamandis Ep et al Breast Cancer Res Treat* 199638:259-264; *Black MH et al Br J Cancer* 2000; 82:361-367; *Black MH et al Clin Chem* 1999;45: 790-799; Yu H. and *Diamandis EP Clin Chem* 1995:41:204-210; *Black MH Diamandis EP, Breast Cancer Res Treat* 2000 59:1-14). Large amounts of hK6 protein were detected in cerebrospinal fluid, which are consistent with the observation that hK6 is expressed at high levels in brain tissue (Little, supra). hK6 was also found in male and female sera and seminal plasmas and in a small percentage of amniotic fluids and breast tumor cytosols. Previously, PSA and hK2 was demonstrated in these biological fluids as well (Yu, H *Diamandis; Clin Chem* 1995: 41:54-58; Sauter ER et al *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 1996 967-970; *Diamandis Ep et al Breast Cancer Res Treat* 199638:259-264; *Black MH et al Br J Cancer* 2000; 82:361-367; *Black MH et al Clin Chem* 1999;45: 790-799; Yu H. and *Diamandis EP Clin Chem* 1995:41:204-210; *Black MH Diamandis EP, Breast Cancer Res Treat* 2000 59:1-14). It is interesting to note that although seminal plasma contains extremely high levels of PSA and hK2 (Diamandis EP *Trends Endocrinol Metab* 1999; 25:14-26; RittenhouseHe et al *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998; 35:275-368), the assay described herein detected very small amounts of hK6 in this biological fluid (Table 1). This further demonstrates that the homologous proteins PSA and hK2 do not have any major cross-reactivity with the developed hK6 assay.

The assay developed here represents the first method for detecting hK6 protein in biological fluids.

The results further demonstrate that hK6 is a secreted protein, as predicted by its deduced amino acid sequence (Yousek GM et al *Genomics* 1999;62:251-259).

Example 2

Materials and Methods

Immunofluorometric assay for hK6

The details of this immunofluorometric assay have been described (See Example 1 and ref. 12). The assay utilizes two hK6-specific polyclonal antibodies, one raised in mouse and the other raised in rabbit. This is a non-competitive immunofluorometric procedure which incorporates the principles of time-resolved fluorometry for detection. The assay measures hK6 in the range of 0.5-200 $\mu\text{g/L}$ with precision < 10%.

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

18

Serum samples were analyzed without sample pretreatment.

Clinical samples

For this investigation, leftover serum samples obtained from patients with various malignancies were used (Table 2). Patients were included with relatively high tumor burden (as indicated by tumor marker levels of at least 10-fold higher than the upper limit of normal) in order to increase the chance of detecting possible hK6 elevations in serum. All serum samples were stored at -20°C until analysis for a maximum time of one year. The procedures are in accordance with the Ethical Standards of the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

Analysis of tumor markers

The tumor markers CA125, PSA, CEA and AFP were analyzed on the Elecsys immunoassay analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). CA15.3, CA19.9 and hCG were analyzed on the Immuno I immunoassay analyzer (Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) and calcitonin was measured with a radioimmunoassay kit from Diasorin, Italy. The upper limit of normal values for the tumor markers were 35 KU/L (CA125), 4 µg/L (PSA), 10 µg/L (AFP), 5 µg/L (CEA), 35 KU/L (CA15.3), 37 KU/L (CA19.9), 10 IU/L (hCG) and 100 ng/L (calcitonin).

Results

A total of 378 serum samples were analyzed with the previously described immunofluorometric assay for hK6 (12). These samples were from either normal individuals (male and female) or from patients with various malignancies. The obtained data are shown in Table 2. While in none of the normal controls and in only two samples from patients with non-ovarian malignancies the hK6 concentration was above 15 µg/L (at arbitrary cutoff), the majority of patients with ovarian carcinoma (~66%) had highly elevated hK6 concentrations in their serum (>15 µg/L). The distribution of hK6 values in serum of ovarian cancer patients is shown in Figure 4. As shown in Figure 5, the correlation between hK6 concentrations and CA125 levels is poor and not statistically significant.

In Figure 6, data is presented on temporal changes of serial serum hK6 and CA125 concentration in four patients with ovarian cancer. The hK6 concentration changes during the monitoring period, similarly to CA125, suggesting that this new biomarker may have value for patient management.

Discussion

The data of Table 2 summarize the findings and demonstrate that among all cancer types tested (normal males and females versus breast, thyroid, testicular, gastrointestinal, prostate, lung and ovarian cancer), only ovarian cancer patients show significantly elevated levels of this biomarker in the circulation. Approximately 66% of patients had levels higher than 15 µg/L, a cutoff that affords 93-100% specificity for all other cancers tested. Although these data are highly promising, regarding value of hK6 as a circulating biomarker for ovarian carcinoma, it should be taken into consideration that all patients with ovarian cancer had relatively high levels of CA125 (≥ 372 KU/L, which is approximately 10 times higher than the upper reference range). The data of Figure 6 indicate that serum levels of hK6 change with time during ovarian cancer monitoring, suggesting that this biomarker may be useful for monitoring patients after primary

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

19

treatment.

As is evident from Figure 5, there is no significant correlation between hK6 concentration and CA125, suggesting that these two biomarkers may be complementary for the diagnosis and management of ovarian carcinoma.

- 5 In conclusion, the first evidence that serum hK6 concentration is significantly increased in about 66% of ovarian cancer patient is provided. The test seems to be specific for ovarian cancer since no such increases were seen in various other malignancies. Therefore, hK6 represents a novel serum biomarker for ovarian cancer which may be useful for disease diagnosis and monitoring.

Example 3

10 **Materials and Methods**

Patient population

- Included in this study were 97 apparently healthy women (ages 26 to 72 years; mean = 52, median = 49 years), 141 women with benign disease (ages 21 to 76 years; mean = 46, median = 45 years) and 146 patients with histologically proven primary ovarian carcinoma (ages 28 to 78 years; mean = 56, median = 57 years). Of the benign lesions, 50 were classified as endometriosis, 22 as mucinosis, 10 as ovarian teratomas, 26 as dermoidea, 15 as corpus luteum and 18 as serosum. Tumors were staged according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria. Histologic classification was based on the World Health Organization and FIGO recommendations. The characteristics of the ovarian cancer patients in terms of stage, grade, histotype, residual tumor post-surgery, debulking success and response to chemotherapy are shown in Table 7. Serum samples from all patients were collected pre-surgically, before initiation of therapy, and stored at -80°C until analysis. For 105 ovarian cancer patients, serum was also available post-surgery. This sample was obtained approximately 2-3 weeks post-surgery.

- Sera were obtained from four centres as follows: The Gynecologic Oncology Unit, University of Turin, Italy (97 normals, 14 benign, 21 cancers); Holland (40 cancers); Belgium (13 benign, 85 cancers); Department of Clinical Chemistry, Helsinki University Central Hospital, Finland (114 benign).

- 25 Patients were monitored for survival and disease progression for a median duration of 25 months (range 1-106 months). Follow-up information was available for 131 of the ovarian cancer patients. Sixty-four (49%) of these relapsed and 28 (21%) died during the course of the follow-up period.

Analysis of hK6 and CA125

- 30 CA125 was measured with a commercially available automated immunoassay method (Immulite 2000, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). The upper limit of normal for this method is 23 KU/L. The concentration of hK6 was measured with a procedure described herein (12) with some modifications. This assay employs a monoclonal anti-hK6 mouse antibody, coated directly on microtiter wells (capture antibody), a polyclonal rabbit detection antibody and an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit antibody. Signal was quantified by time-resolved fluorometry. The assay has a detection limit of 0.1 µg/L and a dynamic range up to 50 µg/L. Precision was <10% within the measurement range. The serum samples were analyzed in duplicate with inclusion of three quality control samples in every run.

Statistical analysis

To analyze data, patients were divided into different groups according to clinical and pathological parameters. The analyses of differences between hK6 serum concentration before and after surgery were performed with the non-parametric McNemar test. The binomial distribution was used to compute the significance level of the McNemar test.

Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed for hK6 and CA125 serum concentration by plotting sensitivity versus (1-specificity) and the areas under the ROC curves (AUC) were calculated. The non-cancer group included the normal individuals and the patients with benign disease. Correlations between different variables were assessed by the Spearman correlation coefficient. The non-parametric Mann-Whitney U test was used to determine differences between two groups and the non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the analysis of differences among more than two groups. These tests treated hK6 concentration in serum as a continuous variable. hK6 serum concentration was also classified as either hK6-positive ($> 4.4 \mu\text{g/L}$) or hK6-negative ($\leq 4.4 \mu\text{g/L}$). The relationship of this dichotomous variable with other clinicopathological correlates was established with the Chi Square (χ^2) test or the Fisher's Exact test, as appropriate.

Kaplan-Meier progression-free survival and overall survival curves were constructed to demonstrate the survival differences between the hK6-positive and hK6-negative patients. The log rank test was used to examine the significance of the differences among the survival curves. The impact of serum hK6 concentration on patient overall survival (OS) and on progression of the disease (progression-free survival; PFS) was assessed with the hazards ratio, calculated by both univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models. In the multivariate analysis, the clinical and pathological variables that may affect survival, including stage of disease, tumor grade, residual tumor and histologic type were adjusted.

Results

Serum hK6 concentration in cancer and non-cancer patients: The mean, median, range and selected percentiles of serum hK6 concentration among non-cancer (normal; $n = 97$), benign disease ($n = 141$), pre-surgical ($n = 146$) and post-surgical ($n = 105$) ovarian cancer patients is shown in Table 3. The mean and median values between non-cancer (normal) and benign disease patients were not statistically significant. The mean and median hK6 values in pre-surgical ovarian cancer patients were significantly higher than the non-cancer and benign groups ($p < 0.001$). The distribution of hK6 concentration in the three groups of patients (normal, benign, pre-surgical ovarian cancer) is further presented in Figure 7 along with the corresponding CA125 values. Clearly, pre-surgical serum hK6 concentration is not different between normal and benign disease patients but is significantly elevated in a proportion of ovarian cancer patients (Figure 7A). Conversely, CA125 values are progressively increased from normal, to benign, to cancer patients (Figure 7B).

For dichotomous classification of this patient population as hK6-positive and hK6-negative, the hK6 cutoffs of $4.2 \mu\text{g/L}$ (90% diagnostic specificity) and $4.4 \mu\text{g/L}$ (95% diagnostic specificity) were selected.

Changes of serum hK6 concentration post-surgery: For 105 patients with ovarian cancer, pre-surgical and

post-surgical serum samples were selected. As shown in Figure 8, 71 patients (68%) demonstrated a drop in hK6 concentration post-surgery, 21 (20%) had unchanged values and 13 (12%) had higher hK6 serum levels after the operation. By the McNemar test, the concentration drop post-surgery was statistically highly significant ($p < 0.001$).

- 5 Correlation between serum hK6 and CA125 concentration: The logarithmic plot of Figure 9 shows that there is a weak correlation between serum hK6 and CA125 concentration (Spearman correlation $r_s = 0.44$). While the correlation is significant, there are still many samples with quite variable values. For example, at CA125 levels around 500 KU/L, hK6 concentration ranges from 2-40 $\mu\text{g/L}$ while samples with hK6 levels around 6 $\mu\text{g/L}$ may have CA125 values ranging from 5 to $> 5,000$ KU/L.
- 10 Diagnostic sensitivity and specificity of serum hK6 concentration: For this calculation, the various subgroups of patients were considered, as shown in Table 4. In the non-cancer group, all patients who are either normal or have benign disease were included. When the whole patient group was analyzed, diagnostic sensitivity is around 54% at 90% specificity and 50% at 95% specificity. The receiver operating characteristic (ROC) curve of Figure 10 indicates a slight diagnostic advantage of CA125, in comparison to hK6. However, the
- 15 two markers can work in combination, since hK6 concentration could be elevated in a subset of patients with relatively low CA125. In the subgroup of patients with CA125 > 60 KU/L, the diagnostic sensitivity of hK6 is 71 and 65% at specificities of 90 and 95%, respectively. In the subgroup of patients with low CA125 (< 23 KU/L), about 13-17% of patients will still have elevated hK6, at hK6 cut-offs of 4.4 (95% specificity) or 4.3 $\mu\text{g/L}$ (90% specificity), respectively. In the subgroup of patients with slightly elevated CA125 (23-60
- 20 KU/L), the diagnostic sensitivity of hK6 is 15-26% at specificities of 95-90%, respectively (Table 4).

In Table 5, the additional contribution of hK6 in identifying ovarian cancer patients was calculated by using either CA125 alone or CA125 plus hK6. Among all patients with known stage ($N = 124$), hK6 analysis increases the sensitivity of CA125 by 12% or 13%, at 90% or 95% specificity cut-offs for both markers. The contribution is still significant at ovarian cancer stages I/II (43 patients). The addition of hK6

25 increases the sensitivity of CA125 alone from 30% to 42%, or from 26% to 37%, at 90% or 95% specificity cut-offs for both markers, respectively.

Table 6 summarizes the relative risk (RR) of having ovarian cancer, based on serum hK6 concentration. The relative risk increases exponentially with increasing hK6 concentration, reaching a value of 20 when hK6 is ≥ 4.3 $\mu\text{g/L}$. The RR is still substantial (RR = 5.3) in multivariate analysis, after adjusting

30 for CA125 levels.

Prognostic value of serum hK6: Higher ovarian cancer stage and grade are strongly associated with higher serum hK6 concentration (Figure 11 and Table 7). Furthermore, serous adenocarcinomas are more frequently associated with high serum hK6 concentration (positivity 68%) followed by endometrioid tumors (positivity 33%); mucinous tumors are rarely associated with high serum hK6 (9%). Furthermore, high serum hK6

35 concentration is associated with presence of residual tumor, suboptimal debulking and poor response to chemotherapy. All these associations were highly significant ($p < 0.001$).

In univariate Cox analysis, serum hK6 concentration is associated with shorter progression-free and

overall survival (Table 8). These associations remained statistically significant in the multivariate analysis. The prognostic value of CA125 was no longer statistically significant in the multivariate analysis. Besides pre-surgical serum hK6, stage of disease was the only other parameter that was associated with both progression-free and overall survival in multivariate analysis (Table 6).

- 5 Similar data were obtained with Kaplan-Meier survival analysis (Figure 12). Patients with high pre-surgical serum hK6 have much shorter progression-free and overall survival than patients with low pre-operative hK6 levels. While virtually all patients with high serum hK6 relapsed by 6 years, more than 50% of patients with low pre-operative serum hK6 were still in remission.

Discussion

- 10 The discovery of new ovarian cancer biomarkers for early diagnosis, prognosis, monitoring and prediction of therapeutic response will likely contribute to improved clinical outcomes. The only well accepted ovarian cancer biomarker, CA125, was discovered 20 years ago. A number of other potential ovarian cancer biomarkers have been identified but their clinical value is not established (27). A novel ovarian cancer biomarker, human kallikrein 6 (hK6), a member of the expanded human kallikrein gene family, is described herein.

- The traditional ovarian cancer biomarker, CA125, falls short of being able to diagnose early ovarian cancer. In addition to its low sensitivity for early disease, CA125 also suffers from low specificity i.e. elevated levels are seen in many benign abdominal diseases. Currently, it is widely accepted that no single cancer biomarker will provide all the necessary information for optimal cancer diagnosis and management. 20 The current trend is to focus on the identification of multiple biomarkers which can be used in combination. Such approaches have already shown to have clinical potential in ovarian cancer (28,29).

- Serum hK6 represents a novel biomarker for ovarian carcinoma. This biomarker is more specific for ovarian cancer than CA125 since, in contrast to CA125, elevations were not seen in benign diseases (Figure 7). The diagnostic sensitivity of hK6 is slightly less than the diagnostic sensitivity of CA125 at the same specificity cut-offs (Table 5 and Figure 10). However, hK6 can increase the diagnostic sensitivity of CA125 at all stages of the disease, including stage I/II disease (Table 5). Despite the weak correlation between hK6 and CA125 (Figure 9), there are still patients with normal CA125 who have elevated hK6 levels (Table 4). Thus, CA125 and hK6 could be used in combination to increase the diagnostic sensitivity of each of the biomarkers alone.

- 30 Similarly to the situation with CA125, hK6 concentration is more frequently elevated in serous ovarian carcinoma than in endometrioid and mucinous carcinomas (Table 7). Serum hK6 concentration is also more frequently elevated in late stage and higher grade disease. Serum hK6 concentration is a powerful predictor of patient outcomes. Patients with pre-operative hK6 concentration above 4.4 µg/L have significantly worse prognosis than patients with low pre-operative hK6 (Table 8 and Figure 12). Serum hK6 concentration is a more powerful prognostic indicator than serum CA125. The prognostic value of CA125 disappears in multivariate analysis while serum hK6 is an independent prognostic indicator, as shown in the multivariate analysis of Table 8. Serum hK6 likely originates from tumor cells, since post-operatively, the

5 levels are significantly decreased (Figure 8). In the study in Example 4 examining the prognostic value of hK6 analysis in ovarian tumor extracts, the overexpression of hK6 in tumor cells was verified by immunohistochemistry and further provided evidence that intratumor hK6 concentration is also a strong predictor of prognosis. Interestingly, many other members of the human kallikrein gene family, including the enzymes hK4, hK5, hK7, hK8, hK9 and hK10 have already shown to have prognostic significance in ovarian cancer (34-41). Serine proteases not belonging to the kallikrein family have also been shown to have prognostic significance in ovarian cancer, including trypsin, hepsin and testisin (42-44). Yet, it has been known for years that many other proteolytic enzymes have prognostic value in many cancers (for reviews, see 45 and 46). The biological mechanisms of proteolytic enzyme involvement in cancer prognosis includes their ability to degrade extracellular matrix, thus facilitating invasion and metastasis (47-49). It seems likely that multiple members of the human kallikrein gene family are dysregulated in ovarian cancer. It is thus possible that other members of this protease family may emerge as potential ovarian cancer biomarkers. If these proteases are involved in cancer progression, they may be suitable candidates as therapeutic targets.

10 Table 7 shows preliminarily that pre-surgical serum hK6 concentration may be a predictor of response to chemotherapy in ovarian cancer patients. Among the non-responders, 81% had elevated pre-surgical hK6 concentration while 19% of these patients had low hK6 concentration. Among the patients who had either complete or partial response to chemotherapy, 57% had low pre-operative hK6 concentration ($p < 0.001$).

15 In conclusion, serum hK6 concentration represents a novel biomarker for ovarian carcinoma, which has potential utility as a diagnostic, prognostic and predictive tool. The combination of hK6 and CA125 improves the diagnostic sensitivity of ovarian cancer at all stages, including early stage disease.

Example 4

KLK6 Ovarian Tissue

PATIENTS AND METHODS

25 **Ovarian Cancer Patients.** One hundred eighty patients with primary ovarian cancer were included in this study. These patients underwent surgery for ovarian cancer at the Department of Gynecology, University of Turin, Italy. Patient age ranged from 25 to 82 years with a median of 59 years. Clinical and pathological information documented at the time of surgery included clinical stage of the cancer, grade and histology of the tumor, and amount of remaining tumor. Menopausal status was documented and response to chemotherapy monitored. Tumors were staged according to the International Federation of Gynaecology and Obstetrics (FIGO) criteria. Histologic classification was based on the World Health Organization and FIGO recommendations. Of the tumors included in this study, 80 were classified as serous papillary, 32 as undifferentiated, 27 as endometrioid, 13 as mucinous, 14 as clear cell, 10 as mullerian and 4 as other. The size of the residual tumors ranged from 0 to 9 cm, with a median of 1.1 cm.

35 Patients were monitored for survival and disease progression (no apparent progression or progression) for a median duration of 62 months (range 1-99 months). Follow-up information was available

for 165 of the patients. 97 (54%) of these relapsed and 61 (34%) died during the course of the follow-up period.

Investigations were carried out in accordance with the ethical standards of the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983, and were approved by the Institute of Obstetrics and Gynecology, Turin, Italy.

5 **Preparation of Tumor Cell Extracts.** Tumor tissue was frozen in liquid nitrogen immediately after surgery and stored at -80°C until extraction. 20 to 100 mg of frozen tissue was pulverized on dry ice to a fine powder and added to 10 volumes of extraction buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM HDTA, 10g/L of NP-40 surfactant, 1 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride, 1g/L of aprotinin, 1g/L of leupeptin). The resulting suspension was incubated on ice for 30 minutes during which time it was vortexed every ten minutes. The mixture was then centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 30 minutes and the supernatant (cell

10 extract) was collected and stored at -80°C until analysis. Protein concentration of the extract was determined with the bicinchoninic acid method, with albumin as standard (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

Measurement of hK6 in Ovarian Cell Extracts. The concentration of hK6 in tumor cell extract was quantified with a highly sensitive and specific non-competitive immunoassay for hK6 that has been

15 previously described and evaluated in detail (12). The assay incorporated two hK6-specific polyclonal antibodies, one raised in mouse and the other in rabbit, in a sequential two site immunometric format with time resolved fluorescence detection. Analysis of standards, tumor cell extracts and control pools was carried out in duplicate in 96-well polystyrene microtiter plates with 200 μL of specimen added to the immunoassay. The standard curve using recombinant hK6 protein ranged from 0.5 $\mu\text{g/L}$ to 200 $\mu\text{g/L}$. Assay precision was

20 better than 10%. Signal detection and data reduction were performed automatically by the CyberFluor 615 Immunoanalyzer.

Localization of hK6 in Ovarian Tumor Specimens by Immunohistochemistry. A rabbit polyclonal antibody was raised against hK6 full-size recombinant protein, produced in yeast cells. Immunohistochemical staining for hK6 was performed according to a standard immunoperoxidase method.

25 Briefly, paraffin-embedded tissue sections (4 μm) were fixed and dewaxed. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% aqueous hydrogen peroxide for 15 minutes. Sections were then treated with 0.4% pepsin at pH 2.0 for 5 minutes at 42°C and blocked with 20% protein blocker (Signet Labs) for 10 minutes. The primary antibody was then added at 1:400 dilution for 1 hour at room temperature. After washing, biotinylated anti-rabbit antibody (Signet) was added, diluted 4-fold in antibody dilution buffer (DAKO).

30 Following incubation and washing, streptavidin tagged horseradish peroxidase was added for 30 minutes at room temperature. After washing, detection was achieved with amino ethyl carbazole (AEC) for 5-10 minutes. The slides were counterstained with hematoxylin and then mounted with cover slips.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed with SPSS software (SPSS Inc. Richmond, CA). To analyze data, patients were divided into different groups according to clinical and pathological parameters.

35 Because the distribution of hK6 mass per mg total protein (i.e. specific activity) in the ovarian tumor extracts was not Gaussian, the non-parametric Mann-Whitney U test was used to determine differences between two groups and the non-parametric Kruskal-Wallis test was used for the analysis of differences among more than

two groups. These tests treated hK6 specific activity in the tumor extract (ng hK6/mg total protein) as a continuous variable. hK6 tumor extract specific activity was also classified as either hK6-positive (> 35 ng/mg total protein; see Figure 7B for explanation) or hK6-negative (≤ 35 ng/mg total protein). The relationship of this dichotomous variable to other clinicopathological correlates was established with the Chi Square (χ^2) test or the Fisher's Exact Test, as appropriate. The impact of tumor extract hK6 specific activity on patient survival and on progression of the disease (progression-free survival) was assessed with the hazards ratio calculated by both univariate and multivariate Cox proportional hazards regression models (30). In the multivariate analysis, the clinical and pathological variables that may affect survival, including stage of disease, tumor grade, residual tumor, histologic type and age were adjusted. Kaplan-Meier progression-free survival and overall survival curves (31) were constructed to demonstrate the survival differences between the hK6-positive and hK6-negative patients. The log rank test (32) was used to examine the significance of the differences among the survival curves. Following analysis of the entire patient data set as a whole, the process was repeated on subgroups stratified separately by disease stage, by tumor grade and by amount of tumor remaining following surgery (debulking success). The impact of tumor hK6 level (positive or negative) on survival and on disease progression was determined by univariate and multivariate models for each of the subgroups.

RESULTS

Distribution of hK6 Specific Activity in Ovarian Tumor Extracts. The distribution of hK6 specific activity in ovarian tumor extracts from the 180 patients (Figure 13A) ranged from 0.04 ng/mg total protein to 497 ng/mg of total protein with a mean of 33 ng/mg total protein and a median of 13.2 ng/mg total protein. A value of 35 ng/mg total protein was identified by Chi square analysis ($\chi^2 = 7.3$; $P = 0.007$) as the optimal cutpoint to distinguish positive from negative tumors in terms of predicting overall survival (Figure 13B). Thirty percent of the tumors were hK6 positive by this criterion. hK6 specific activity in tumor extracts was treated both as a continuous variable and as a dichotomous variable (≤ 35 ng/mg total protein, > 35 ng/mg total protein) in the analyses that follow.

hK6 specific activity (ng hK6/mg total protein) was significantly elevated ($P < 0.001$ by the Kruskal Wallis test) in extracts of ovarian tumor (mean 32.7, standard error 3.8, range 0.04 to 497) compared to extracts prepared from normal ovarian tissues (mean 3.5, standard error 2.5, range 0.05 to 20.8) or from ovarian tissue with benign disease (mean 3.2, standard error 2.6, range 0.03 to 21.5) (Figure 14). Further analysis showed there was no significant difference in hK6 specific activity among the ovarian tumors when they were stratified by histotype (i.e. serous vs undifferentiated vs endometrioid, etc) (data not shown).

Relationships between hK6 Status and Other Clinicopathological Variables. The distributions of various clinicopathological variables between hK6-positive and hK6-negative patients are summarized in Table 9. The relationships between hK6 status and these variables were examined with either the χ^2 Test or Fisher's Exact Test, as appropriate. No relationship was observed between hK6 status and tumor grade, menopausal status and response to chemotherapy. However, hK6-positive patients were more likely to have advanced disease (stage II-IV), serous tumor histology and greater residual tumor (>1 cm) (all $P < 0.05$). hK6 tumor

extract specific activity when treated as a continuous variable also associated proportionally with stage of the disease. Figure 15 shows the distribution of hK6 specific activity stratified by disease stage. hK6 specific activity was significantly higher in extracts from stage III/IV ovarian cancer than in those from stage I/II ($P = 0.002$ by the Mann Whitney U Test).

5 **Univariate and Multivariate Survival Analysis.** The impact of hK6 specific activity, other clinicopathological variables and age on disease progression and on overall survival is presented in Table 10. In univariate analysis, hK6-positive patients had a significantly increased risk of disease progression (hazard ratio =1.71) and death (hazard ratio =1.88) ($P < 0.05$). When hK6 specific activity was treated as a continuous variable, hazard ratios were closely similar to those of hK6 negative tumors (arbitrarily set at 1.00), although the slight increase in risk of disease progression (hazard ratio = 1.005) was highly significant at $P = 0.001$. Kaplan-Meier survival curves demonstrated survival differences between hK6-positive and hK6-negative patients. As Figure 16 shows, the probability of progression-free and overall survival, respectively, are lower in hK6-positive patients than in hK6-negative patients.

10 The adverse effects of hK6 positivity on progression free survival and on overall survival were lost in multivariate analysis. As shown in Table 10, when survival outcomes were adjusted for other clinicopathological variables, hK6-positive and hK6-negative patients had statistically similar rates of disease progression and overall survival. Tumor grade also lost its univariate prognostic significance in multivariate analysis. Only stage of disease and residual tumor remaining after surgery maintained their independent effects on survival outcome in the multivariate analysis.

15 **Univariate and Multivariate Survival Analysis in Subgroups of Patients.** The patients were divided into different subgroups based on disease stage, tumor grade, and debulking success (residual tumor). In each subgroup, the impact of hK6 positivity and negativity on disease progression and on overall survival was determined by univariate and by multivariate Cox proportional hazard regression models. The results are shown in Table 11. hK6 specific activity (positive, negative) significantly impacted survival in the subgroup of patients with tumor grade I or II. Univariate analysis revealed that hK6-positive patients were about 9-times more likely to suffer disease progression and 5-times more likely to die than hK6-negative patients. These survival differences remained significant even after the data were subjected to multivariate analysis. The relative risk of both outcomes arising from hK6 positivity was now about 4-fold ($P < 0.03$). hK6 status had no such effect among patients with Grade III tumor, nor could any discernible effect be demonstrated among patients with early stage disease and among those with greater than 1 cm of tumor remaining following surgery. Univariate analysis revealed a 2-fold increase in risk of disease progression and of death in the subgroup of patients with advanced disease (stage III and IV) who were hK6 positive, but the effect was lost in the multivariate analysis. The opposite occurred in the subset of patients characterized by optimal debulking of the tumor at the time of surgery (remaining tumor less than 1 cm in diameter). hK6 positivity had no demonstrable adverse effect on disease progression or on survival by univariate analysis, but did become statistically significant, giving a 3.5 and 5.5-fold increase in adverse risk, respectively, when the data were subjected to multivariate analysis. The emergence of effects in the multivariate model when none are

generated by the univariate model happens when the adjusted variables have no impact at all on the outcome. In the case here, this means that stage of disease, tumor grade, tumor histology and patient age had no prognostic potential on disease progression and overall survival in this particular subset of patients. Kaplan-Meier survival curves of the subset of patients with grade I or II ovarian tumor are shown in Figure 17. As expected from the univariate analysis mentioned earlier, there was a significant difference in disease progression and survival between hK6 positive and hK6 negative patients.

Immunohistochemical Staining of hK6 in Ovarian Tumors. Immunohistochemical staining of hK6 in paraffin embedded tumor sections was roughly proportional to hK6 specific activity in tumor extracts (data not shown). The immunohistochemical localization of hK6 protein in four ovarian tissues that contained benign, borderline or malignant tumor is depicted in Figure 18. hK6 staining was restricted to epithelial cells, being absent in mesenchymal elements including fibrous supporting stroma. hK6 stained within the cytoplasm of epithelial cells, but staining intensity was variable among and within tumor preparations.

DISCUSSION

Increased hK6 synthesis was found to be predictive of more aggressive tumor behavior over time. Considered apart from other clinicopathological variables and age, hK6 positivity across the entire patient population under study was associated with about a 2-fold increase in the risk of both disease progression and of death. This effect was lost when outcomes were adjusted for the other clinicopathological variables and age in multivariate analysis of the entire patient population, but not when the multivariate analysis was restricted to those patients with lower grade tumor and with less residual tumor remaining after surgery (<1 cm in diameter). Among the former subgroup of patients, hK6 positivity predicted about a 4-fold increase in the risk of disease progression and of death ($P < 0.03$) while corresponding hazard ratios in the latter subgroup were 3.75 and 5.5, respectively ($P < 0.02$). The data show that hK6 positivity has independent predictive potential in these two subgroups and gives insight into tumor behavior over time that cannot be gleaned from the clinical parameters and pathological correlates conventionally measured. Hence hK6 testing could contribute to more individualized effective treatment of such patients.

hK6 was found to be frequently overexpressed in ovarian tumors compared to nonmalignant ovarian tissue. This overexpression tended to be higher in tumors from late stage disease than from early stage disease. The histochemical studies suggest that hK6 is synthesized by the epithelial cells of the ovary and is distributed diffusely within the cytoplasmic compartment.

Epithelial ovarian cancer has one of the worst prognoses among gynecologic malignancies, largely because over three-quarters of the diagnoses are made at a time when the disease has already established regional or distant metastases (33). Compounding the problem, tumor progression and aggressiveness correlate variably with conventional clinical and pathological markers. Thus there is an important need for additional diagnostic and prognostic markers for this disease and a number of potential markers have been identified.

While the present invention has been described with reference to what are presently considered to be the preferred examples, it is to be understood that the invention is not limited to the disclosed examples.

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

28

To the contrary, the invention is intended to cover various modifications and equivalent arrangements included within the spirit and scope of the appended claims.

All publications, patents and patent applications are herein incorporated by reference in their entirety to the same extent as if each individual publication, patent or patent application was specifically and
5 individually indicated to be incorporated by reference in its entirety.

Below full citations are set out for the references referred to in the specification.

Table 1 - Analysis of hK6 protein in various fluids.

Table 1: Analysis of hK6 protein in various fluids

Sample	hK6, µg/L			N ²	Positivity rate (%)
	Range	Mean (SD)	Median		
Milk ¹	398 - 7,638	2,588 (1,607)	2,531	20	100
Cerebrospinal fluid (CSF)	41 - 2,053	605 (485)	525	21	100
NAF (normal) ³	-	914	-	1 (pool)	100
NAF (cancer) ⁴	-	737	-	1 (pool)	100
Breast cyst fluid	34 - 97	74 (25)	84	5 (pools)	100
Male serum	2.0 - 12.6	6.9 (2.6)	6.7	18	100
Female serum	0 - 8.1	4.1 (2.0)	4.4	18	100
Seminal plasma	0 - 17.7	6.8 (5.5)	5.0	16	81
Amniotic fluid	0 - 9.5	1.1 (2.2)	0	21	33
Breast tumor cytocols	0 - 33	2.1 (7.0)	0	36	17
Urine	0	0	0	10	0

1. From lactating women

2. Number of samples tested

3. Nipple aspirate fluid

4. NAF obtained from patients with breast cancer

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

30

Table 2 Concentration of human kallikrein 6 (hk6) in serum of normal individuals and patients with various malignancies.

Table 2 Concentration of human kallikrein 6 (hk6) in serum of normal individuals and patients with various malignancies.

hk6, $\mu\text{g/L}$						
Patient Group	Number of Samples	Min	Max	Median	95 th Percentile	Number of Patients with hk6 $\geq 15\mu\text{g/L}$ (%)
Normal males	41	3.2	11.4	7.5	11.1	0 (0)
Normal females	40	3.5	13.7	7.0	10.8	0 (0)
Breast cancer ¹	24	1.1	11.9	4.3	9.7	0 (0)
Medullary thyroid carcinoma ²	29	0	13.9	5.0	11.8	0 (0)
Testicular cancer ³	78	2.0	32.2	9.3	14.3	1 (2)*
Gastrointestinal cancer ⁴	28	2.6	10.6	5.7	9.6	0 (0)
Prostate cancer ⁵	40	1.0	16.1	4.1	9.5	1 (2)**
Lung cancer	18	2.6	7.4	5.2	6.7	0 (0)
Ovarian cancer ⁶	80	1.0	206	23.0	148	53 (66)

1. With serum CA 15.3 levels ≥ 414 KU/L (upper ref. range 35 KU/L).
2. With calcitonin levels ≥ 1.135 ng/L (upper ref. range 100 ng/L).
3. With hCG levels ≥ 69 IU/L (upper ref. range 10 IU/L) or AFP levels ≥ 110 $\mu\text{g/L}$ (upper ref. range 10 $\mu\text{g/L}$).
4. With CA 19.9 levels ≥ 629 KU/L (upper ref. range 37 KU/L) and CEA levels ≥ 1.000 $\mu\text{g/L}$ (upper ref. range 5 $\mu\text{g/L}$).
5. With PSA ≥ 324 $\mu\text{g/L}$ (upper ref. range 4 $\mu\text{g/L}$).
6. With CA 125 ≥ 372 KU/L (upper ref. range 35 KU/L).

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

31

Table 3: Descriptive statistics of serum hK6 in non-cancer (healthy), benign disease and ovarian cancer patients.

Variable	Mean ± SE ^a	Range	Percentiles				
			5	25	50	75	95
Non-Cancer (N=97) hK6 (µg/L)	2.94 ± 0.098	0.89 – 8.58	1.49	2.28	2.90	3.54	4.44
Benign Disease (N = 141) hK6 (µg/L)	3.12 ± 0.074	1.30 – 6.18	1.99	2.50	3.00	3.60	4.68
Pre-Surgical Ovarian Cancer (N=146) hK6 (µg/L)	6.81 ± 0.57	1.30 – 38.00	2.19	3.12	4.40	7.15	25.06
Post-Surgical Ovarian Cancer (N=108) hK6 (µg/L)	3.67 ± 0.25	0.80 – 21.62	1.62	2.96	3.20	4.20	7.72

^a Standard error

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

32

Table 4: Comparison of sensitivity and specificity of serum hK6 concentration at selected cut-off points

Parameter	Cut-Off	Sensitivity (%)	Specificity (%)
Total population (N = 384) hK6 ($\mu\text{g/L}$)	2.20	95	19
	2.50	90	29
CA125 < 23 KU/L (N = 182) hK6 ($\mu\text{g/L}$)	4.20	54	80
	4.40	50	55
	2.27	95	24
	2.40	90	28
CA125 23-50 KU/L (N = 65) hK6 ($\mu\text{g/L}$)	4.30	17	80
	4.40	13	65
	2.20	95	10
	2.40	90	19
CA 125 > 50 KU/L (N = 65) hK6 ($\mu\text{g/L}$)	4.00	26	90
	4.20	15	95
	2.20	95	16
	2.70	90	48
CA 125 > 80 KU/L (N = 110) hK6 ($\mu\text{g/L}$)	4.50	71	80
	5.55	65	65

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

33

Table 5: Diagnostic sensitivities for ovarian cancer with CA125 alone, hK6 alone and CA125 + hK6 analysis at 90 and 95% specificity cut-offs for both markers

	Sensitivity at 90% specificity	Sensitivity at 95% specificity
<i>All patients with known stage (N=124)</i>		
CA125	60	58
hK6	58	53
CA125+hK6	72	69
<i>Stage I/II patients (N=43)</i>		
CA125	30	26
hK6	26	21
CA125+hK6	42	37

Table 6: Relative risk^a (RR) of ovarian cancer according to quartiles of serum hK6

Parameter	Quartiles ($\mu\text{g/L}$)			
	1 (0.89-2.60) n = 96	2 (2.61-3.29) n = 96	3 (3.30-4.27) n = 96	4 (4.28-39.00) n = 96
hK6 unadjusted^b				
RR	1.00	1.41	3.12	20.00
95 % confidence intervals		0.71-2.79	1.43-6.65	7.70-49.46
p value		0.32	0.003	< 0.001
hK6 adjusted^b				
RR	1.00	1.21	2.31	5.33
95% confidence intervals		0.56-2.62	1.05-5.02	2.32-12.24
p value		0.62	0.036	< 0.001

^a Estimated from unconditional logistic regression models.

^b Multivariate models were adjusted with the CA125 quartiles.

Table 7: Relationship between hK6 status and other variables in ovarian cancer patients *

Variable	Patients	No. of patients (%)		p Value
		hK6 Negative	hK6 Positive	
Stage				
I	32	27 (84.4)	5 (15.6)	
II	11	8 (72.7)	3 (27.3)	< 0.001 ^a
III	73	19 (24.7)	55 (75.3)	
IV	6	3 (57.5)	3 (52.5)	
x	22			
Grade				
G1	39	31 (79.5)	8 (20.5)	
G2	24	7 (29.2)	17 (70.8)	< 0.001 ^a
G3	62	19 (30.6)	43 (69.4)	
x	21			
Histotype				
Serous	74	24 (32.4)	50 (67.6)	
Endometrioid	15	10 (66.7)	5 (33.3)	< 0.001 ^a
Mucinous	22	20 (90.9)	2 (9.1)	
Others	27	17 (63.0)	10 (37.0)	
x	8			
Residual tumor (cm)				
0	76	52 (68.4)	24 (31.6)	
1-2	17	3 (17.6)	14 (82.4)	< 0.001 ^a
> 2	35	6 (17.1)	29 (82.9)	
x	19			
Debulking success^e				
SO	49	9 (18.4)	40 (81.6)	< 0.001 ^b
OD	81	53 (65.4)	28 (34.6)	
x	15			
Response to CTX^d				
NC/PD	21	4 (19.0)	17 (81.0)	< 0.001 ^b
CR/PR	107	61 (57.0)	46 (43.0)	
NE	18			

* hK6 cut-off = 4.4 µg/L (median)

^a χ^2 test^b Fisher's Exact Test^c OD, Optimal debulking (0-1 cm); SO, Suboptimal debulking (>1 cm)^d CTX, chemotherapy; NC, no change; PD, progressive disease; CR, complete response; PR, partial response; NE, not evaluated

x Status unknown.

Table 8: Univariate and multivariate analysis of serum hK6 in relation to progression-free and overall survival

Variable	Progression-free survival			Overall survival		
	HR ^a	95% CI ^b	p Value	HR ^a	95% CI ^b	p Value
Univariate analysis						
hK6	negative	1.00		1.00		
	positive	4.10	2.28-7.36	< 0.001	3.15	1.36-7.29
as a continuous variable	1.098	1.041-1.095	< 0.001	1.075	1.033-1.11	< 0.001
CA125	negative ^d	1.00		1.00		
	positive ^d	2.52	1.45-4.38	0.001	2.36	1.03-5.42
as a continuous variable	1.001	1.000-1.002	< 0.001	1.001	1.000-1.003	0.018
Grading (ordinal)	2.50	1.71-3.64	< 0.001	2.34	1.53-3.58	< 0.001
Residual tumor (ordinal)	1.23	1.18-1.24	< 0.001	1.51	1.21-1.41	< 0.001
Histologic type ^e	2.49	1.37-4.54	0.003	4.25	1.44-12.53	< 0.008
Multivariate analysis						
hK6	negative	1.00		1.00		
	positive	4.96	1.10-21.47	0.035	5.03	1.07-23.69
as a continuous variable	1.047	1.007-1.089	0.019	1.053	1.007-1.12	0.025
CA125	negative ^d	1.00		1.00		
	positive ^d	2.96	0.63-11.74	0.14	2.17	0.38-63.17
Stage of disease (ordinal)	2.54	1.37-4.69	0.003	6.34	2.27-17.7	< 0.001
Grading (ordinal)	1.63	0.94-2.82	0.079	1.56	0.66-3.68	0.31
Residual tumor (ordinal)	1.06	0.42-2.26	0.15	1.01	0.60-1.24	0.98
Histologic type ^e	1.08	0.75-1.56	0.65	1.16	0.94-1.31	0.18

^a Hazard ratio (HR) estimated from Cox proportional hazard regression model

^b Confidence interval of the estimated HR

^c Serum vs others

^d Cut-off = 98 KU/L (95% specificity, 53% sensitivity, 48th percentile).

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

37

Table 9. Relationship between hK6 status and other variables in 180 ovarian cancer patients.

Variable	Patients	No. of patients (%)		P value
		hK6 negative	hK6 positive	
Stage				
I	44	38 (86.4)	6 (13.6)	0.034 ^a
II	13	8 (61.5)	5 (38.5)	
III	110	72 (65.4)	38 (34.5)	
IV	13	7 (53.8)	6 (46.2)	
Grade				
G1	25	21 (84.0)	4 (16.0)	0.33 ^a
G2	27	21 (77.8)	6 (22.2)	
G3	119	84 (70.6)	35 (29.4)	
x	9			
Histotype				
Serous	80	52 (65.0)	28 (35.0)	0.31 ^b
Undifferentiated	27	17 (63.0)	10 (37.0)	
Endometrioid	32	27 (46.7)	5 (53.3)	
Mucinous	13	10 (76.9)	3 (13.1)	
Clear cell	14	11 (78.6)	3 (21.4)	
Mullerian	10	8 (80.0)	2 (20.0)	
Others	4	3 (75.0)	1 (25.0)	
Residual tumor (cm)				
0	80	67 (83.2)	13 (16.3)	0.002 ^a
1-2	29	16 (55.2)	13 (44.8)	
>2	64	40 (62.5)	24 (37.5)	
x	7			
Menopause				
Pre/peri	50	32 (64.0)	18 (36.0)	0.075 ^b
Post	130	99 (76.2)	31 (23.8)	
Response to CTX^c				
NC/PD	15	11 (73.3)	4 (26.7)	0.99 ^b
CR/PR	148	104 (70.3)	44 (29.7)	
NE	17			

^a χ^2 test.^b Fisher's Exact Test^c CTX; chemotherapy, NC; no change, PD; progressive disease, CR: complete response, PR; partial response, NE; not evaluated.

x. Status unknown.

Table 10. Univariate and Multivariate Analysis of Prognostic Value of hK6

Variable	Progression-free survival (PFS)		Overall survival (OS)	
	HR ^a	95% CI ^b	HR ^a	95% CI ^b
<i>Univariate Analysis</i>				
hK6				
Negative	1.00		1.00	
Positive	1.71	1.11-2.64	1.88	1.09-3.21
as a continuous variable	1.005	1.002-1.007	1.004	0.999-1.008
Stage of disease (ordinal)	2.79	2.07-3.79	3.07	2.05-4.61
Grading (ordinal)	1.95	1.38-2.75	2.07	1.31-3.29
Residual tumor (ordinal)	1.27	1.20-1.34	1.31	1.22-1.41
Histologic type ^c	0.83	0.68-1.00	0.88	0.69-1.13
Age	1.012	0.99-1.03	1.015	0.99-1.03
<i>Multivariate Analysis</i>				
hK6				
Negative	1.00		1.00	
Positive	1.40	0.84-2.32	1.08	0.79-1.49
as a continuous variable	1.002	0.99-1.006	1.001	0.99-1.004
Stage of disease (ordinal)	1.57	1.09-2.27	0.014	1.72
Grading (ordinal)	1.31	0.84-2.32	0.18	1.31
Residual tumor (ordinal)	1.14	1.05-1.24	0.001	1.21
Histologic type ^c	0.95	0.82-1.11	0.57	1.04
Age	1.02	0.99-1.039	0.12	1.02

^a Hazard ratio (HR) estimated from Cox proportional hazard regression model^b Confidence interval of the estimated HR^c Serous vs. others

Table II. Cox proportional hazard regression analysis for subgroups of patients

Variable	Progression-free survival		Overall survival	
	HR ^a	95% CI ^b	HR ^a	95% CI ^b
Tumor grade I-II				
hK6 univariate	9.25	3.33-25.67	<0.001	5.05 1.63-15.71
hK6 multivariate ^c	4.29	1.17-15.65	0.027	4.05 1.23-16.6
Tumor grade III				
hK6 univariate	1.45	0.87-2.39	0.14	1.69 0.91-3.14
hK6 multivariate ^c	1.03	0.58-1.83	0.91	1.02 0.48-2.13
Stage I-II				
hK6 univariate	0.90	0.18-4.35	0.89	1.49 0.13-16.53
hK6 multivariate ^c	1.83	0.17-19.41	0.61	2.23 0.30-25.04
Stage III-IV				
hK6 univariate	2.04	1.26-3.29	0.004	1.98 1.12-3.47
hK6 multivariate ^c	1.57	0.93-2.68	0.092	1.33 0.71-2.53
Optimal debulking success^d				
hK6 univariate	1.81	0.72-4.55	0.20	2.61 0.70-9.73
hK6 multivariate ^c	3.75	1.39-10.09	0.019	5.57 1.47-21.04
Suboptimal debulking success^e				
hK6 univariate	1.29	0.83-2.32	0.20	1.16 0.64-2.09
hK6 multivariate ^c	1.27	0.72-2.23	0.40	1.19 0.62-2.27

^a Hazard ratio (HR) estimated from Cox proportional hazard regression model

^b Confidence interval of the estimated HR.

^c Multivariate models were adjusted for stage of disease, residual tumor, histologic type and age.

^d Multivariate models were adjusted for tumor grade, residual tumor, histologic type and age.

^e Optimal debulking (0-1 cm residual tumor); suboptimal debulking (> 1 cm residual tumor)

^f Multivariate models were adjusted for stage of disease, tumor grade, histologic type and age.

FULL CITATIONS FOR REFERENCES REFERRED TO IN THE SPECIFICATION

1. Diamandis EP, Yousef GM, Luo LY, Magkara A, Obiazu CV. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:54-60.
- 5 2. Diamandis EP. Prostate specific antigen - its usefulness in clinical medicine. *Trends Endocrinol Metab* 1999;25:14-16.
3. McCormack RT, Rittenhouse HG, Finlay JA, Sokoloff RL, Wang TJ, Wolfert RL, Lijja E, Oesterling JE. Molecular forms of prostate-specific antigen and the human kallikrein gene family: a new era. *Urology* 1995;45:729-744.
- 10 4. Chu TM. Prostate-specific antigen and early detection of prostate cancer. *Tumor Biol* 1997;18:123-134.
5. Stenman U-H. New ultrasensitive assays facilitate studies on the role of human glandular kallikrein (hK2) as a marker for prostatic disease. *Clin Chem* 1999;45:753-754.
6. Rittenhouse JG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW. Human kallikrein 2 (hK2) and prostate-specific antigen (PSA): Two closely related, but distinct, kallikreins in the prostate. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1998;35:275-368.
- 15 7. Little SP, Dixon EP, Norris F, Buckley W, Becker GW, Johnson M, Dobbins JR, et al. Zymex, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 1997;272:25135-25142.
- 20 8. Anisowicz A, Sotiropoulou G, Stenman G, Mok SC, Sager R. A novel protease homolog differentially expressed in breast and ovarian cancer. *Mol Med* 1996;2:624-636.
9. Yamashiro K, Tsuruoiiko N, Kodama S, Tsujimoto M, Yamamura T, Tanaka T, Nakazato E, Yamaguchi N. Molecular cloning of a novel trypsin-like serine protease (neurosin) preferentially expressed in brain. *Biochim Biophys Acta* 1997;1350:11-14.
- 25 10. Diamandis EP, Yousef GM, Clements J, Ashworth LK, Yoshida S, Egelrud T, Nelson PS, Shiozuka S, Little S, Lijja H, Stenman U-H, Rittenhouse HG, Wain H. New nomenclature for the human tissue kallikrein gene family. *Clin Chem* (in press).
11. Yousef GM, Luo L-Y, Scherer SW, Sotiropoulou G, Diamandis EP. Molecular characterization of zymex/proteaseM/neurosin (PRSS9), a hormonally regulated kallikrein-like serine protease. *Genomics* 1999; 62: 251-259.
- 30 12. Diamandis EP, Yousef GM, Soosaipillai AR, Grass L, Porter A, Little S, Sotiropoulou G. Immunofluorometric assay of human kallikrein 6 (zymex/protease M/neurosin) and preliminary clinical applications. *Clin Biochem* 2000; 33: 369-375.
13. Ritvan T, Persson I, Staffan N. Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. *Clin Endocrinol* 1998;49:695-707.
- 35 14. National Cancer Institute of Canada: Canadian Cancer Statistics 1999, Toronto, Canada, 1999.
15. Menon U, Jacobs II. Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*

- 2000;12:39-42.
16. Davallar EM, van Kamp GH, Verstraeten RA, Kenemans P. Comparison of serum immunoassays for the quantification of CA 125 antigen in serum. *Clin Chem* 1998;44:1417-1422.
 17. Rosenthal AN, Jacobs JJ. The role of CA 125 in screening for ovarian cancer. *Int J Biol Markers* 1998;13:216-220.
 - 5 18. Maggino T, Gadducci A. Serum markers as prognostic factors in epithelial ovarian cancer: an overview. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000;21:64-69.
 19. Bast RC Jr, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. CA 125: the past and the future. *Int J Biol Markers* 1998;13:179-187.
 - 10 20. Robertson DM, Kahir N, Burger HG, Marners P, McCloud PI, Petersson K, McCuckin M. Combined inhibin and CA 125 assays in the detection of ovarian cancer. *Clin Chem* 1999;45:651-658.
 21. Lambert-Messertian GM. Is inhibin a serum marker for ovarian cancer? *Eur J Endocrinol* 2000;42:331-333.
 - 15 22. Ala-Fossi SL, Macropaa J, Blauer M, Tuohimaa P, Punnonen R. Inhibin A, B and pro-alphaC in serum and peritoneal fluid in postmenopausal patients with ovarian tumors. *Eur J Endocrinol* 2000;142:334-339.
 23. Burger HG, Baillie A, Drummond AE, Healy DL, Jobling T, Marners P, Robertson DM, et al. Inhibin and ovarian cancer. *J Reprod Immunol* 1998;39:77-87.
 - 20 24. Xu FJ, Yu YH, Daly L, DeSombre K, Anselmino L, Hass GM, Betchuck A, et al. OVX1 radioimmunoassay complements CA-125 for predicting presence of residual ovarian carcinoma at second-look surgical surveillance procedures. *J Clin Oncol* 1993;11:1506-1510.
 25. Berek JS, Bast RC Jr. Ovarian cancer screening. The use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection. *Cancer* 1995;76:2092-2096.
 - 25 26. Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, Elson P, Kennedy AW, et al. Lyso-phosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic markers. *J Am Med Assoc* 1998;280:7190723.
 27. Myer, c, Rustin GJS. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1535-1538.
 - 30 28. Woolas RP, Xu FJ, Jacobs JJ, Yu Y, Daly L, Betchuck A, et al. Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1748-1751.
 29. Woolas RP, Conaway MR, Xu F, Jacobs JJ, Yu Y, Daly, L et al. Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1995;59:111-116.
 - 35 30. Cox, DR. Regression tables and life tables. *J. R. Stat.Cos.B*, 34:187-202,1972.
 31. Kaplan, E.L, and Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 53:457-481, 1958.

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

42

32. Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother.Rep.* 50:163-170, 1966.
33. Gatta, G, Lasota, M.B. and Verdecchia, A. Survival of European women with gynecological tumours during the period 1978-1989. *Br. J. Cancer*, 34: 2218-2225, 1998.
- 5 34. Obiezu, CV et al, *Clin Cancer Res.* 2001;7:2380-2386.
35. Kim, H, et al, *Br. J. Cancer* 2001;8:643-650.
36. Magklara, A., et al, *Clin Cancer Res* 2001;7:806-811.
37. Luo, LY et al, *Clin Cancer Res* 2001;7:2372-2379.
38. Luo, LY et al, *Clin Chim Acta* 2001;306:111-118.
- 10 39. Dong Y, et al, *Clin Cancer Res* 2001;7:2363-2371.
40. Tanimoto H et al, *Cancer* 1999;86:2074-2082.
41. Underwood LJ et al Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma
42. Shigemasa K et al *J Soc Gynecol Investig* 200;7:357-362.
- 15 43. Tanimoto, H., et al, *Cancer Res* 1997;57:2884-2887.
44. Hirahara F., et al *Gynecol Oncol* 1998;68:162-165.
45. Duffy, MJ, *Clin Exp Metasis* 1992;10:145-155.
46. Matrisian, LM, *Curr Biol* 1999;9:R776-R778.
47. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG, *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43:S42-S51.
- 20 48. Woodhouse EC et al, *Cancer* 1997;80:1529-2537.
49. Aznavoorian, S et al *Cancer* 1993;71:1368-1383.

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

43

I Claim:

1. A method for detecting hK6 associated with ovarian cancer in a subject comprising:
 - (a) taking a sample derived from a subject;
 - (b) detecting or identifying in the sample hK6; and
 - (c) comparing the detected amount with an amount detected for a standard.
- 5 2. A method as claimed in claim 1 which further comprises in step (b) detecting one or more of human stratum corneum chymotryptic enzyme (HSCCE), kallikrein 4, kallikrein 5, kallikrein 8, kallikrein 9, kallikrein 10, CA125, CA15-3, CA19-9, OVX1, lysophosphatidic acid (LPA) or carcinoembryonic antigen (CEA).
- 10 3. A method as claimed in claim 1 which further comprises in step (b) detecting one or more of CA 125, kallikrein 9, and kallikrein 10.
4. A method for diagnosing and monitoring ovarian cancer in a subject by quantitating hK6 in a sample from the subject comprising:
 - (a) contacting a biological sample from the subject with an antibody specific for hK6 which is directly or indirectly labelled with a detectable substance;
 - (b) detecting the detectable substance to quantitate hK6 in the sample;
 - (c) comparing the quantitated hK6 to levels for a standard.
- 15 5. A method for the diagnosis and monitoring of ovarian cancer comprising:
 - (a) incubating a biological sample with a first antibody specific for hK6 which is directly or indirectly labeled with a detectable substance, and a second antibody specific for hK6 which is immobilized;
 - (b) separating the first antibody from the second antibody to provide a first antibody phase and a second antibody phase;
 - (c) detecting the detectable substance in the first or second antibody phase thereby quantitating hK6 in the biological sample; and
 - (d) comparing the quantitated hK6 with levels for a standard.
- 20 6. A method as claimed in any of the preceding claims wherein the biological sample is serum or tumor tissue extracts.
7. A method as claimed in any of the preceding claims wherein the biological sample is serum.
8. A method as claimed in any of the preceding claims wherein the standard is hK6 levels detected for non-ovarian cancer subjects or subjects with benign disease.
9. A method as claimed in any of the preceding claims wherein detection of an amount of hK6 greater than that of a standard indicates late stage disease, or an increased risk of disease progression and mortality.
- 25 10. A method as claimed in claim 5 wherein in step (a) the first and second antibodies are contacted simultaneously or sequentially with the biological sample.
11. A method as claimed in any one of claims 4 to 10 wherein the antibody is a monoclonal antibody, a polyclonal antibody, immunologically active antibody fragments, humanized antibody, an antibody

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

44

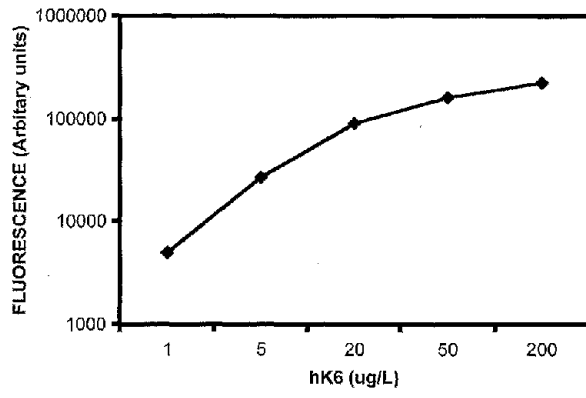
- heavy chain, an antibody light chain, a genetically engineered single chain F_v molecule, or a chimeric antibody.
12. A method as claimed in any one of claims 4 to 10 wherein the detectable substance is alkaline phosphatase.
- 5 13. A method as claimed in claim 12 wherein the alkaline phosphatase is detected using a fluorogenic substrate.
14. A method as claimed in any of the preceding claims wherein hK6 is measured using time-resolved fluorescence.
15. A method for imaging a tumor associated with hK6 comprising
- 10 (a) incubating the tumor with an agent that binds to hK6 for a sufficient period of time to permit the agent to bind to hK6 associated with the tumor, where the agent carries a label for imaging the tumor;
- (b) detecting the presence of the label localized to the tumor.
16. A method as claimed in claim 15 which further comprises in step (a) incubating with one or more of an
- 15 agent that binds to human stratum corneum chymotryptic enzyme (HSCCE), kallikrein 4, kallikrein 5, kallikrein 8, kallikrein 9, kallikrein 10, CA125, CA15-3, CA19-9, OVX1, lysophosphatidic acid (LPA) or carcinoembryonic antigen (CEA), preferably Ca 125.
17. A method as claimed in claim 16 wherein each agent is labeled so that it can be distinguished in step (b).
18. An in vivo method for imaging ovarian cancer comprising:
- 20 (a) injecting a patient with an agent that binds to hK6, the agent carrying a label for imaging the ovarian cancer;
- (b) allowing the agent to incubate in vivo and bind to hK6 associated with the ovarian cancer; and
- (c) detecting the presence of the label localized to the ovarian cancer.
19. A method as claimed in claim 18 wherein the agent is an antibody which recognizes hK6.
- 25 20. A method as claimed in claim 18 or 19 wherein the label is a radiolabel, fluorescent label, nuclear magnetic resonance active label, positron emitting isotope detectable by a positron emission tomography ("PET") scanner, chemiluminescer, or enzymatic marker.
21. A kit for carrying out a method as claimed in any of the previous claims.
22. A kit for carrying out a method as claimed in any of the previous claims comprising an antibody specific
- 30 for hK6 labeled with an enzyme; and a substrate for the enzyme.

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

1/22

FIGURE 1



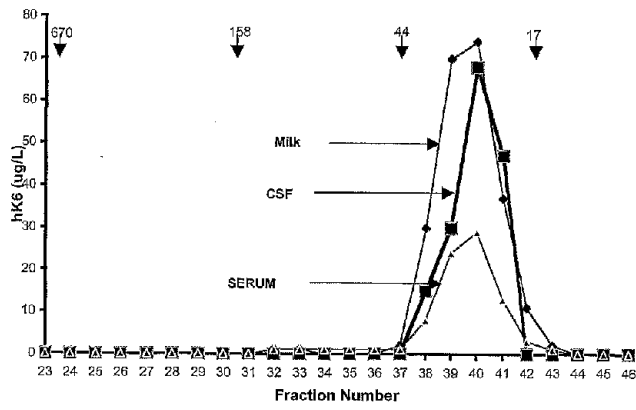
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

2/22

FIGURE 2



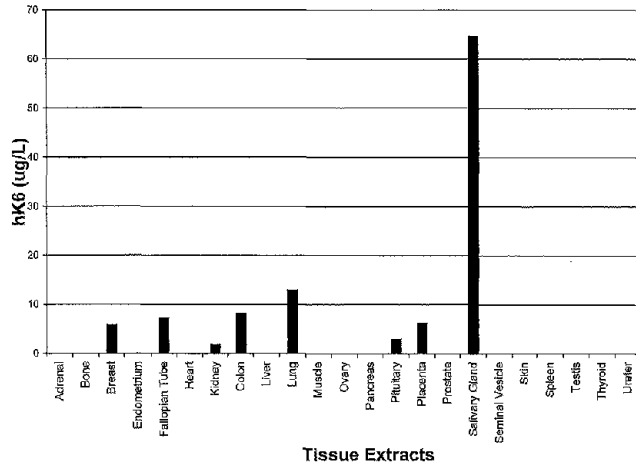
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

3/22

FIGURE 3



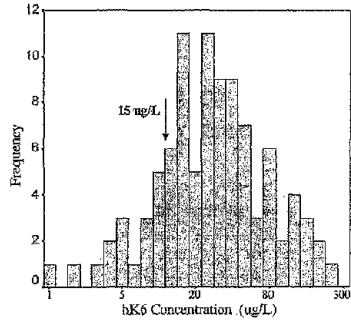
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

4/22

FIGURE 4

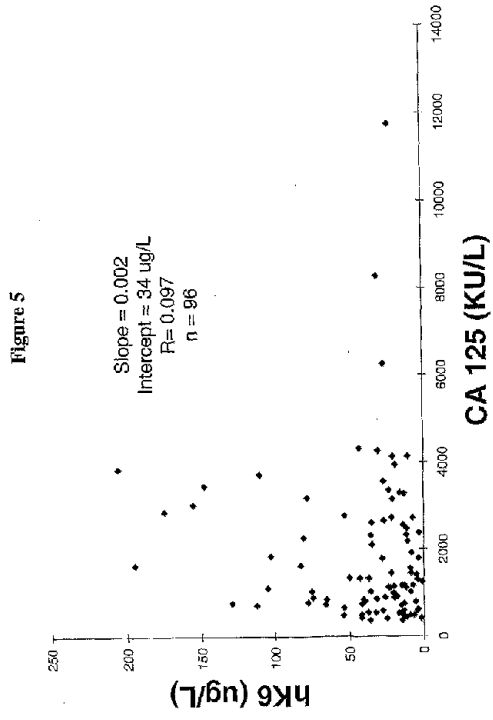


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

5/22



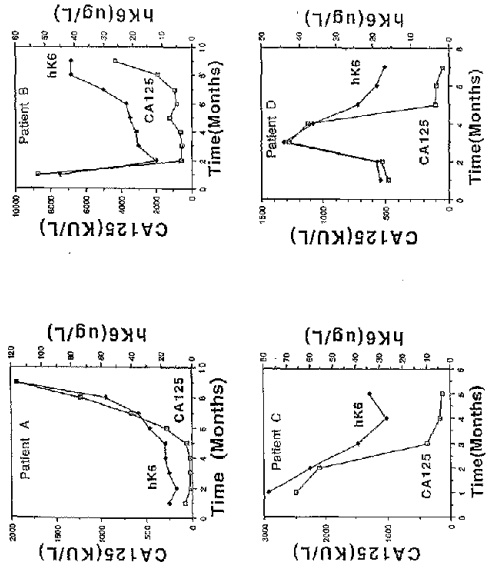
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

6/22

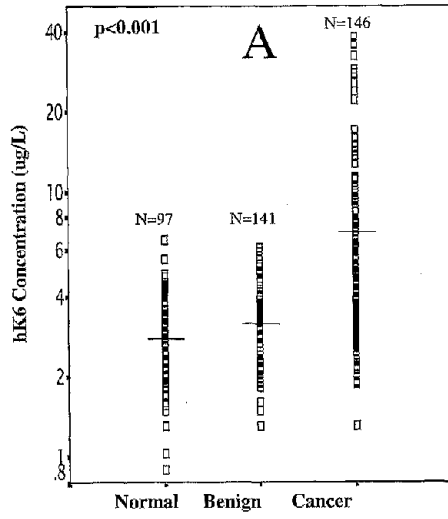
FIGURE 6



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

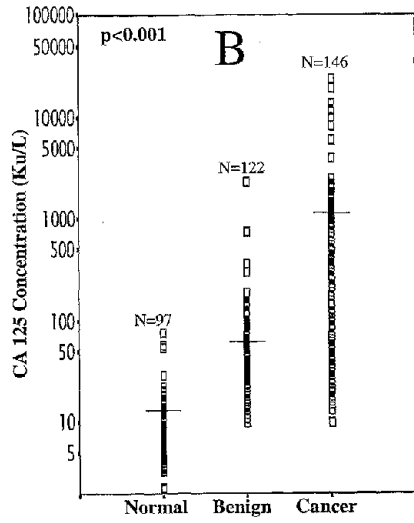
7/22

Figure 7A



8/22

Figure 7B

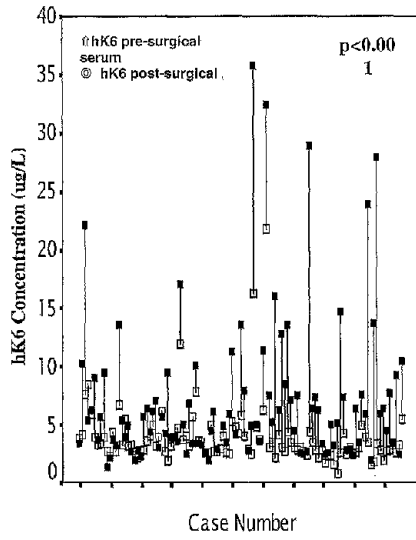


WO 02/35232

PCT/CA01/01505

9/22

Figure 8



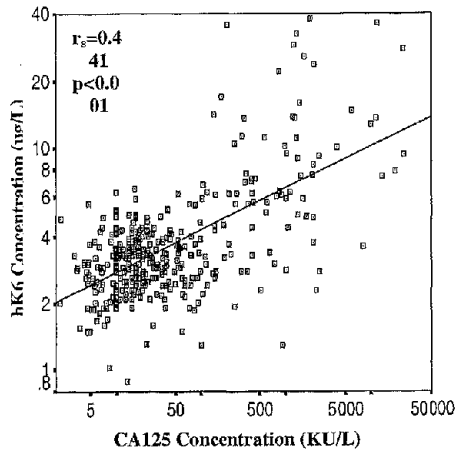
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/35232

PCT/CA01/01505

10/22

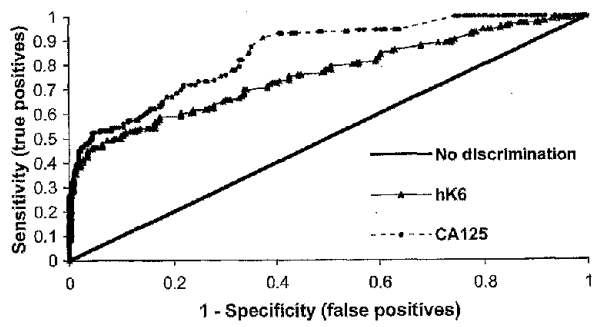
FIGURE 9



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

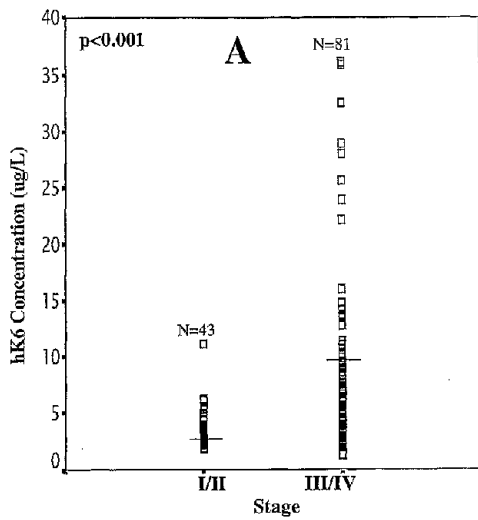
11/22

FIGURE 10



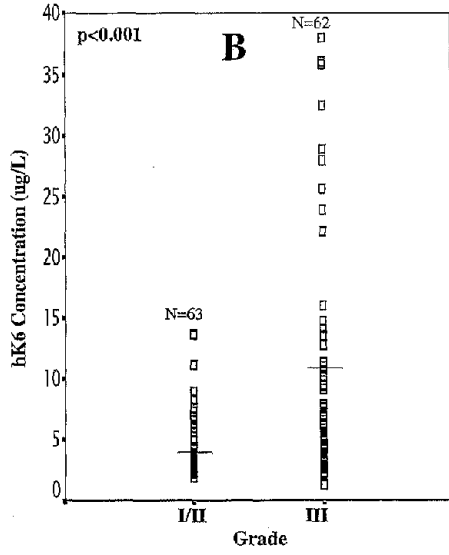
12/22

Figure 11A



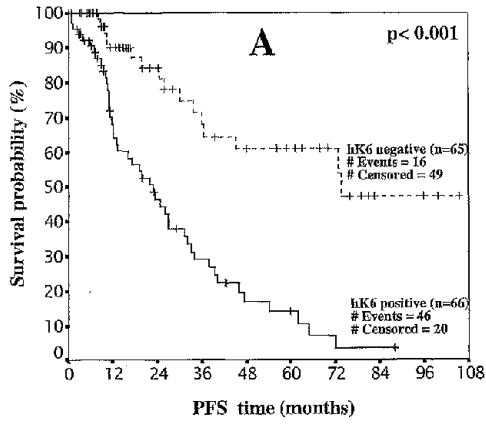
13/22

Figure 11B



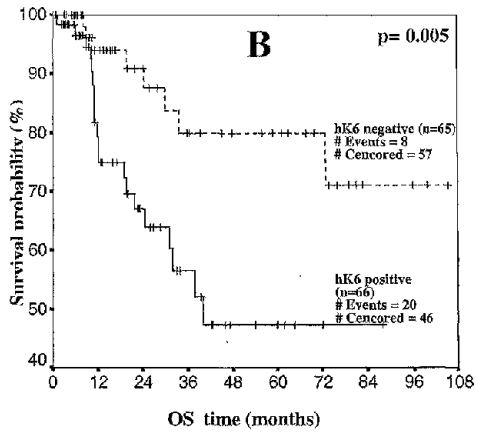
14/22

Figure 12A



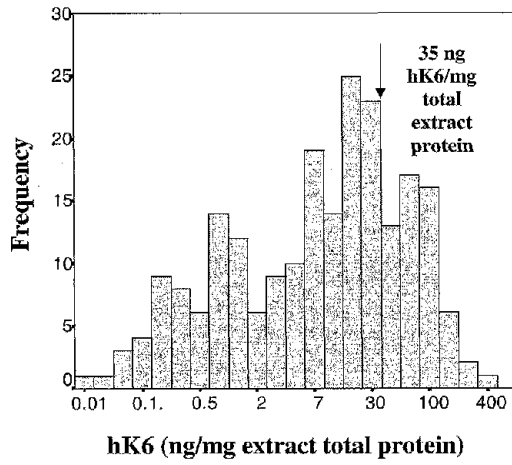
15/22

Figure 12B



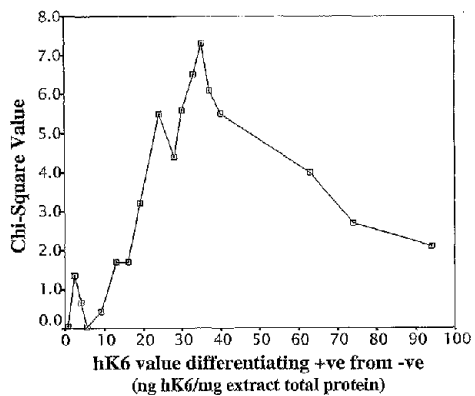
16/22

Figure 13A



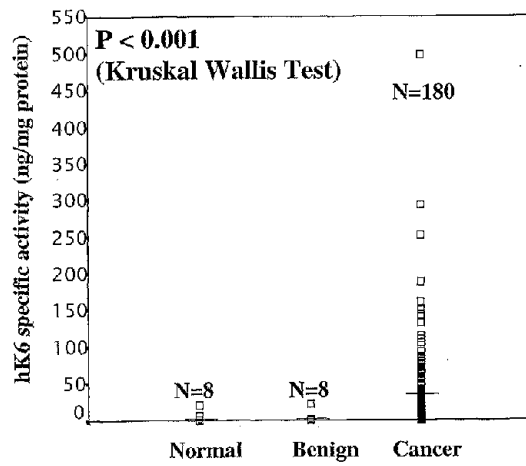
17/22

Figure 13B



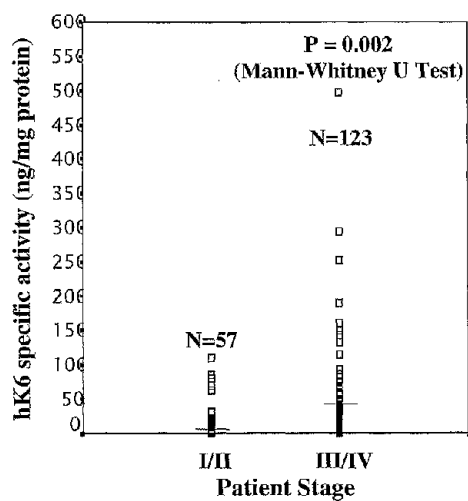
18/22

Figure 14



19/22

Figure 15



20/22

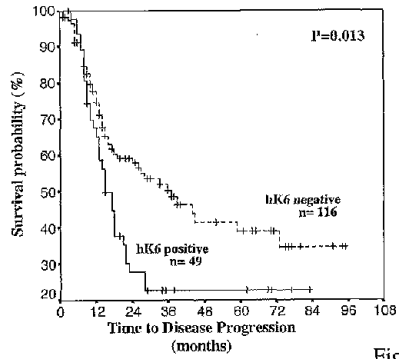
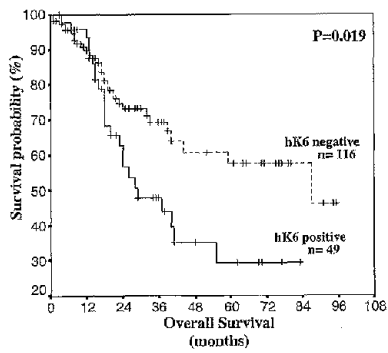


Figure 16



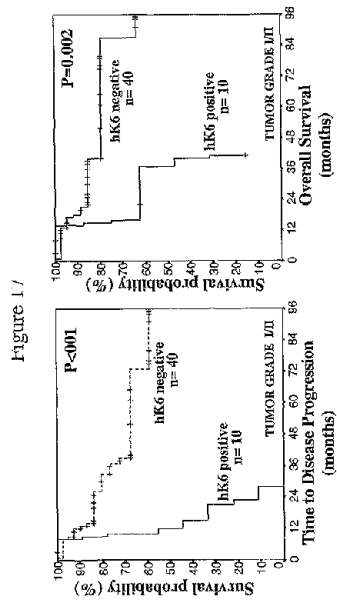
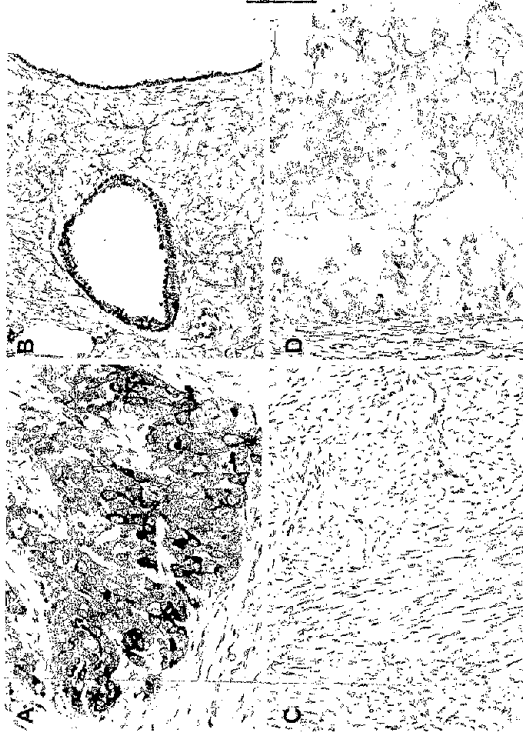


Figure 18



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 May 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/035232 A3

(51) International Patent Classification: G01N 33/574. (74) Agent: BERESKIN & PARR; 40 King Street West, Box 401, 40th Floor, Toronto, Ontario M5H 3Y2 (CA).

(21) International Application Number: PCT/CA01/01505

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(32) International Filing Date: 26 October 2001 (26.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/245,789 27 October 2000 (27.10.2000) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

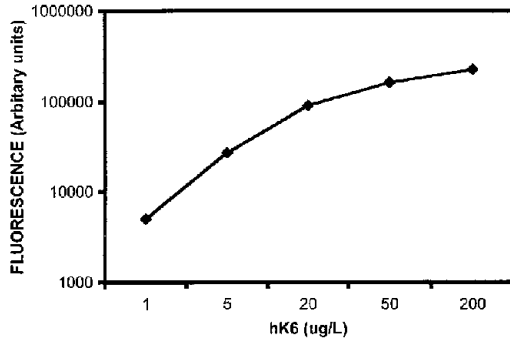
(71) Applicant (for all designated States except US): MOUNT SINAI HOSPITAL (CA/CA); 600 University Avenue, Toronto, Ontario M5G 1X5 (CA).

(72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): DIAMANDIS, Eleftherios, P. (CA/CA); 1504 Gerrard Street West, Suite 44, Toronto, Ontario M5G 2X2 (CA).

Published: with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING OVARIAN CANCER BASED ON HUMAN KALLIKREIN 6 (HK6)



(57) Abstract: A method for the diagnosis, prognosis, and monitoring of ovarian cancer in a subject by detecting hK6 in a sample from the subject, preferably a serum sample or tumor tissue extract. hK6 may be measured using a reagent that detects or binds to hK6 preferably antibodies specifically reactive with hK6 or a part thereof. Imaging methods for tumors associated with hK6 are also described using an agent that binds to hK6 which has a label for imaging the tumor.

WO 02/035232 A3

WO 02/035232 A3



Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/CA 01/01505		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574 C07K14/47 C12N9/64		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K C12Q C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANISOWICZ A ET AL: "A NOVEL PROTEASE HOMOLOG DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN BREAST AND OVARIAN CANCER" MOLECULAR MEDICINE, BLACKWELL SCIENCE, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 2, no. 5, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 624-636, XP002060076 ISSN: 1076-1551 cited in the application abstract page 626, column 2 page 631, column 1	1, 4, 6, 8, 9, 11, 21
Y	---	2, 3, 5, 7, 10, 12-20, 22
	---	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
C earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
D document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*S* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
22 July 2002	14/08/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5516 Patentkan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 451 000 nK Fax. (+31-70) 340-2016	Authorized officer Hinchliffe, P	

Form PCT/ISA/210 (electronic form) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/CA 01/01505

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 11238 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 19 March 1998 (1998-03-19) page 3, line 25 - line 34 page 5, line 14 - line 25 page 6, line 1 - line 11 figure 5 claim 46	1,4-6,8, 9,11,21, 22
Y	the whole document	2,3,7, 10, 12-20,22
X	WO 98 41656 A (UNIV ARKANSAS ;OBRIEN TIMOTHY J (US)) 24 September 1998 (1998-09-24) claims 1-5	1-4,6-9, 11,21
Y	YOUSEF G M ET AL: "The KLK7 (PRSS6) gene, encoding for the stratum corneum chymotryptic enzyme is a new member of the human kallikrein gene family - genomic characterization, mapping, tissue expression and hormonal regulation" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 254, no. 1-2, 22 August 2000 (2000-08-22), pages 119-128, XP004208787 ISSN: 0378-1119 page 127, column 1, paragraph 4 -column 2, paragraph 1	2,3
Y	ELEFTHERIOS P: "immunofluorometric assay of human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin) and preliminary clinical applications." CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 33, no. 5, July 2000 (2000-07), pages 369-375, XP002207083 cited in the application page 370, column 1, paragraph 3 -page 371, column 1, paragraph 3	5,7, 12-14, 20,22
Y	US 5 660 827 A (BURROWS FRANCIS J ET AL) 26 August 1997 (1997-08-26) the whole document	15-20
P,X	WO 01 59158 A (TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF) 16 August 2001 (2001-08-16) page 18, line 7-21; claims 17,18; figure 13	1-22

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/CA 01/01505

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	DIAMANDIS EP ET AL: "the new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis" TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, vol. 11, no. 2, November 2000 (2000-11), pages 54-60, YP002207049 cited in the application the whole document -----	1-22

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of Form PCT/ISA/210) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/CA 01/01505

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9811238	A	19-03-1998	AU 4480797 A 02-04-1998
			WO 9811238 A2 19-03-1998
WO 9841656	A	24-09-1998	US 6303318 B1 16-10-2001
			AU 6468998 A 12-10-1998
			WO 9841656 A1 24-09-1998
			US 6316213 B1 13-11-2001
			US 6294344 B1 25-09-2001
			US 6268165 B1 31-07-2001
US 5660827	A	26-08-1997	US 5965132 A 12-10-1999
			US 5855866 A 05-01-1999
			US 6004554 A 21-12-1999
			US 6261535 B1 17-07-2001
			US 5776427 A 07-07-1998
			US 5863538 A 26-01-1999
			US 6051230 A 18-04-2000
			US 2002037289 A1 28-03-2002
			US 6036955 A 14-03-2000
			US 5877289 A 02-03-1999
			US 6093399 A 25-07-2000
			US 6004555 A 21-12-1999
			AU 3737893 A 05-10-1993
			CA 2131528 A1 16-09-1993
			EP 0627940 A1 14-12-1994
WO 9317715 A1 16-09-1993			
WO 0159158	A	16-08-2001	US 6294344 B1 25-09-2001
			AU 3491001 A 20-08-2001
			WO 0159158 A1 16-08-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/577	G 0 1 N 33/543	5 4 5 S
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 33/577	A
	G 0 1 N 33/58	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 エレフテリオス・ピー・ディアマンディス
カナダ、エム5ジー・2エックス2、オンタリオ、トロント、スウィート44、ジェラード・スト
リート・ウエスト1504番

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 DA02 EA01 FA03 NA05
2G045 AA13 AA16 AA26 BB14 BB51 CA26 CB02 CB03 DA36 FA11
FB01 FB03 FB07 FB12 GC15
2G054 AA06 AA07 AA08 AB04 AB05 BB08 CA23 CD04 CE02 EA03
JA00 JA01
4B063 QA01 QA19 QA20 QQ02 QQ08 QQ36 QQ79 QQ91 QR56 QS39
QX01

专利名称(译)	检测卵巢癌的方法		
公开(公告)号	JP2004511810A	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002538164	申请日	2001-10-26
申请(专利权)人(译)	安装·サイナイ·医院		
[标]发明人	エレフテリオスピーディアマンディス		
发明人	エレフテリオス·ピー·ディアマンディス		
IPC分类号	G01N21/64 C12Q1/37 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/574 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/57449 G01N33/57488 G01N2333/96455		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/574.E C12Q1/37 G01N21/64.B G01N21/64.F G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/543.545.S G01N33/566 G01N33/577.A G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA03 2G043/NA05 2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA26 2G045/BB14 2G045/BB51 2G045/CA26 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA06 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/AB05 2G054/BB08 2G054/CA23 2G054/CD04 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/JA00 2G054/JA01 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ36 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR56 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	小岛 一晃		
优先权	60/243789 2000-10-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过检测样品中的hK6，优选来自受试者的血清样品或肿瘤组织提取物，对受试者中的卵巢癌进行诊断，预后和监测的方法。可以使用检测或结合hK6的试剂测量hK6，优选与hK6或其部分特异性反应的抗体。还描述了使用将hK6与用于肿瘤成像的标记物结合的试剂用hK6成像肿瘤的方法。

