



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 186**

51 Int. Cl.:

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 5/24 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98918814 .9**

96 Fecha de presentación : **28.04.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **0981629**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2000**

54

Título: **Formas del antígeno prostático específico y procedimientos para su detección.**

30

Prioridad: **30.04.1997 US 846408**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

73

Titular/es: **HYBRITECH INCORPORATED**
8958 Terman Court, P.O. Box 269006
San Diego, California 92196-9006, US

72

Inventor/es: **Saedi, Mohammad, S.;**
Mikolajczyk, Stephen, D.;
Kumar, Abhay;
Grauer, Lana, S.;
Wolfert, Robert, L. y
Rittenhouse, Harry, G.

74

Agente: **Espiell Volart, Eduardo María**

ES 2 312 186 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formas del antígeno prostático específico y procedimientos para su detección.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la detección e identificación de proteínas, así como a varias formas y subunidades de proteínas, los cuales tienen utilidad potencial como marcadores de diagnóstico. En particular, la presente invención se refiere a la detección de formas del precursor inactivo del antígeno prostático específico.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de próstata (CP) es el cáncer diagnosticado con más frecuencia en hombres americanos. Parker, S.L. y col., *CA Cancer J. Clin.*, 46:5-27, 1996. El antígeno prostático específico o PSA se ha usado ampliamente como un marcador de diagnóstico fiable en el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata. Catalona, W.J. y col., *N. Engl. J. Med.*, 324: 1156-1161, 1991; Oesterling, J.E., *J. Urol.*, 145:907-923, 1991; Labrie, F. y col., *J. Urol.*, 147:846-852, 1992. Una de las limitaciones principales del ensayo del PSA es la falta de especificidad para distinguir entre la hiperplasia prostática benigna (HPB) y el CP. McCormack, R.T. y col., *Urology*, 45: 729-744, 1995. Para mejorar la precisión del diagnóstico de PSA en suero se han introducido diferentes procedimientos, tales como la densidad de PSA, velocidad de PSA, relación entre PSA libre y total o relación entre PSA en complejo y total. Benson, M.C. y col., *J. Urol.*, 147:815-816, 1992; Carter, H.B. y col., *J. Am. Med. Assoc.*, 267:2215-2220, 1992; Oesterling, J.E. y col., *J. Am. Med. Assoc.*, 270:860-864, 1993.

El PSA (también conocido como hK3), un miembro de la familia de la calicreína humana de serina proteasas, es una glicoproteína de cadena sencilla de 30-34 kDa con un oligosacárido enlazado por N unido a la asparagina 45. Belanger, A. y col., *Prostate* 27: 187-197 1995. La clonación molecular del ADNc pone de manifiesto que el ARNm del PSA codifica una preproteína de 261 aminoácidos (aa) en la cual una secuencia señal hidrofílica de 17 aa (región prepro) y un propéptido de 7 aa preceden a la proteína madura de 237 aa. Lundwall, A. y col., *FEBS Lett.*, 214:317-322, 1987; Riegman, P.H.J. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155:181-188, 1988; Henttu, P. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 903-910, 1989. La expresión del ARNm del PSA es predominante en el epitelio prostático Qui, S. y col., *J. Urol.* 144:1550-1556, 1990, y está regulada por andrógenos, Young, C.Y.F. y col., *Cancer Res.*, 51:3748-3752, 1991. Se ha demostrado que el PSA tiene actividad tipo quimiotripsina. Watt, K.W.K. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3166-3170, 1986; Ban, Y. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 482-488, 1984. La principal función biológica del PSA propuesta es escindir las proteínas formadoras de gel principales, semenogelinas I y II y fibronectina en el fluido seminal, dando como resultado una movilidad espermática potenciada. Lilja, H., *J. Clin. Invest.*, 76: 1899-1903, 1985. Más recientemente, se ha publicado que el PSA escinde la proteína 3 de unión de IGF, dando como resultado una mayor actividad del IGF, una función que puede ser importante en la regulación del crecimiento de células epiteliales en la próstata. Kanety, H. y col., *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 77:229-233, 1992. Aunque los estudios mencionados hacen énfasis en los posibles sustratos fisiológicos del PSA, las cuestiones fundamentales en relación con su biosíntesis, activación y regulación de la actividad, siguen sin tener respuesta.

La familia de la calicreína humana consiste en tres miembros designados por hK1, hK2 y hK3 (PSA). Clements, J.A., *Endocr. Rev.*, 10:393-419, 1989; Carhini, L.A. y col., *J. Hypertens.*, 11:893-898, 1993. hK1 se produce principalmente en el riñón, páncreas y glándula salivar submandibular. Fukushima, D. y col., *Biochemistry*, 24:8037-8043, 1985. hK2, como el PSA, se produce predominantemente en el epitelio prostático (Morris, B.J., *Clin. Exp. Pharm. Phys.*, 16:345-351, 1989; Chapdelaine, P. y col., *FEBS Lett.*, 236:205-208, 1988), está regulada por andrógenos (Young, C.Y.F. y col., *Biochemistry*, 31:818-824, 1992; Grauer, L. y col., *J. Androl.*, 17:353-359, 1996) y comparte una homología de 78% de los aa con el PSA (Schedlich, L.J. y col., *DNA*, 6:429-437, 1987; Lilja, H., *World J. Urol.*, 11: 188-191, 1993). Recientemente se han revisado las propiedades de hK2 como potencial marcador de cáncer de próstata. Young, C.Y.F. y col., *The Prostate Supplement*, 7:17-24, 1996; Darson, M.F. y col., "Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostate intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A novel prostate cancer marker", *Urology* 49:857-862, 1997; Rittenhouse, H.G. y col., "Characterization and evaluation of hK2: a potential prostate cancer marker, closely related to PSA", *Proceedings of the First International Consultation on Prostate Cancer*, Monaco, 1996, 25p., 1997. El PSA es una proteasa de tipo quimiotripsina, mientras que hK2 es una proteasa de tipo tripsina, Mikołajczyk, S.D. y col., "Human glandular kallikrein (hK2) shows arginine-restricted specificity and forms complexes with plasma protease inhibitors", *Prostate* 34:44-50, 1998, lo que indica que las dos enzimas tienen distintas funciones fisiológicas. Se sabe poco de los papeles fisiológicos de hK2. Deperhes y col. han demostrado recientemente que la fibronectina presente en el eyaculado era hidrolizada más eficazmente por la hK2 que por el PSA (*J. Androl.*, 17: 659-665, 1996). Por otra parte, las semenogelinas eran hidrolizadas por hK2 en una medida similar a la del PSA. Aunque se ha demostrado que el PSA y la hK2 están presentes en el mismo entorno, no se ha estudiado la interacción entre ellos.

Para estudiar la biosíntesis, regulación de la activación del PSA y explorar la relación fisiológica entre hK2 y PSA, es necesario expresar el PSA en células de mamífero. Se han hecho varios intentos para expresar tanto el PSA como la hK2 en células de mamíferos. La expresión y purificación de hK2 en células de mamíferos ha sido descrita previamente. Kumar, A. y col., *Cancer Res.*, 56:5397-5402, 1996. Lovgren y col. expresaron el PSA en células BHK21 utilizando el sistema SFV (Lovgren, J. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231:888-895, 1995). Sin embargo,

este sistema no proporcionaba una línea celular estable necesaria para estudiar el procesamiento biosintético del PSA. A pesar de ello, Karr y col. generaron una línea celular de adenocarcinoma de colon murino estable que expresaba el PSA con el objetivo de usarla como diana para las terapias anti-PSA. No se publicaron estudios bioquímicos sobre el PSA. Karr, y col., *Cancer Res.*, 55:2455-2462, 1995.

Por lo tanto, es necesario un procedimiento para expresar el PSA de forma estable en un sistema mamífero. También es necesario detectar los productos de expresión de dicho sistema, incluyendo precursores del PSA y derivados. Además, es necesario mejorar el diagnóstico y seguimiento de las etapas del cáncer de próstata y distinguir mejor la hiperplasia prostática benigna del cáncer de próstata.

Resumen de la invención

En el presente documento se describe un vector de expresión que clona y expresa de forma estable el PSA en células de mamífero. Se demuestra por primera vez en el presente documento que el PSA es secretado en el medio agotado por células de mamíferos en forma de proPSA. El proPSA así secretado es enzimáticamente inactivo y estable en el medio. También se ha demostrado que el proPSA puede ser convertido en PSA enzimáticamente activo en el medio extracelular mediante la hK2. Esto sugiere una posible relación fisiológica entre hK2 y PSA y que hK2 podría regular la actividad de PSA *in vivo*.

Además, se describe en el presente documento un vector de expresión quimérico que comprende una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido pPSA. La molécula de ácido nucleico está preferiblemente unida de forma operativa a secuencias de control las cuales son reconocidas por una célula huésped que se transforma con el vector de expresión. La célula huésped preferiblemente es obtenida de una fuente de mamífero.

Dado que la presente invención proporciona un procedimiento para detectar proPSA en un fluido fisiológico humano, este aspecto de la invención se basa en el descubrimiento de que proPSA existe en el fluido biológico y puede servir como un marcador útil para el cáncer de próstata. Específicamente, se han identificado varias formas precursoras inactivas del PSA, y al menos una se ha detectado en el suero. La medición de estas formas precursoras inactivas del PSA puede proporcionar información importante relativa al diagnóstico y las etapas del cáncer de próstata.

Por lo tanto, los polipéptidos proPSA así como las variantes y subunidades de los mismos, producidos por los procedimientos de la presente invención, se pueden usar para producir poblaciones de anticuerpos que, a su vez, se pueden usar como base de ensayos directos o competitivos para detectar y cuantificar polipéptidos (o "proteína") proPSA en muestras derivadas de fluidos fisiológicos, sangre o suero, tejidos, tales como carcinomas de próstata, o células tales como células de la próstata.

Por lo tanto, otra realización de la presente invención proporciona un anticuerpo, y preferiblemente un anticuerpo monoclonal, el cual se une específicamente al proPSA. Dichos anticuerpos se unen específicamente a las diferentes formas precursoras inactivas del proPSA, que incluyen [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA. Mediante la presente invención también se proporcionan líneas celulares de hibridomas que producen dichos anticuerpos.

En el alcance de la presente invención también se incluyen ensayos directos y competitivos para detectar el proPSA. Se describe un procedimiento para detectar proPSA en una muestra de fluido fisiológico humano que incluye proporcionar anticuerpos purificados contra pPSA, poner en contacto los anticuerpos con la muestra para permitir la formación de complejos entre los anticuerpos y el pPSA y determinar la presencia o cantidad de pPSA que forma complejo con los anticuerpos. También se incluyen procedimientos de diagnóstico y equipos como realizaciones de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

la fig. 1 es una representación esquemática del vector de expresión de PSA, pGTD-PSA;

la fig. 2 representa la expresión de PSA por células AV12-PSA#8. Se recogió suero que contenía medio agotado de células AV12-PSA#8 cada día durante 6 días consecutivos. La concentración de PSA se midió usando el ensayo de PSA Tandem[®]-MP. Se contaron cada día las células viables utilizando azul tripán;

la fig. 3 muestra que el medio agotado de AV12-PSA#8 tratado con tripsina y hK2 formaba un complejo con ACT. El día 7 los medios agotados de las células AV12-PSA#8 y las células AV12-PGTD se concentraron de forma adecuada. El medio agotado concentrado (que contenía 1 μg de PSA medido por el ensayo de PSA Tandem[®]-MP) se mezcló con tripsina purificada (0,02 μg) o hK2 purificado (1 μg) durante 60 minutos a 37°C. Las reacciones se inactivaron por adición de 0,05 μg de aprotinina. Algunas de las muestras se incubaron con ACT (5 μg) durante 4 horas adicionales). Las reacciones se pararon con tampón de muestra + βME y ebullición. Aproximadamente 1/10 del volumen de la reacción se trató por electroforesis en un gel de gradiente de 4-20%. Las proteínas se electrotransfirieron sobre filtro de nitrocelulosa y se examinaron con mAb específico de PSA PSM 773. En el lado izquierdo se indican los marcadores de peso molecular. SF-PSA = PSA purificado de fluido seminal (SF), AV12-PSA#8 = medio agotado de células AV12-PSA#8; T = tripsina. ACT: α 1-antiquimiotripsina;

ES 2 312 186 T3

la fig. 4 representa la cromatografía por interacción hidrófoba (HIC) de hK2 incubada con proPSA purificado. Panel A: hK2 mezclada con pPSA e inyectado inmediatamente. El pico 1 es hK2 y el pico 2 es pPSA purificado. Panel B: hK2 incubada con pPSA durante 2 horas a 37°C. El pico 3 es PSA maduro confirmado por secuenciación N-terminal;

5

la fig. 5 representa el perfil cromatográfico de HIC de patrones de PSA y ACT. La fig. 5A muestra el tiempo de retención de ACT activa. La fig. 5B muestra ACT activa incubada con PSA que se purificó de fluido seminal. La fig. 5C muestra el tiempo de retención para el PSA de fluido seminal;

10

la fig. 6 representa el perfil cromatográfico de HIC de diferentes formas de PSA. La fig. 6A muestra el tiempo de retención de PSA maduro y pPSA, que incluyen [-4]pPSA, [-5]pPSA y [-7]pPSA. La fig. 6B muestra el tiempo de retención para las formas de PSA de una muestra de suero unida a una columna de afinidad de PSM773;

15

la fig. 7 representa el perfil cromatográfico para una mezcla de PSA maduro purificado y pPSA. La fig. 7B muestra el perfil cromatográfico para la mezcla de proteínas sin la adición de ACT. La fig. 7A muestra el perfil cromatográfico para la misma mezcla de proteínas después de incubación con ACT durante 2 horas a 37°C.

20

la fig. 8 representa la transferencia Western en la que se identifica una forma de PSA de 33 kDa en suero de carcinoma de próstata;

25

la fig. 9 representa el análisis de transferencia Western de PSA en suero y fluido seminal. Calle 1: sueros de carcinoma de próstata (1 μ l, 28 ng de PSA cargados por calle); calle 2: 28 ng de PSA purificado de fluido seminal; calle 3: 28 ng de PSA purificado de fluido seminal añadido a 1 μ l de suero femenino; calle 4: marcadores de peso molecular.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

30

La identificación de formas precursoras inactivas de PSA en el suero sugiere que la medición de concentraciones de proPSA en el suero puede ser útil en el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata. Con el fin de discernir las etapas implicadas en la biosíntesis del PSA y la activación de proPSA a PSA maduro, es necesaria la expresión de PSA en células de mamífero.

35

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones “PSA” y “polipéptido de PSA” se usan de forma intercambiable e incluyen polipéptidos de PSA prepro recombinante, pro y maduro. Las expresiones “proPSA”, “pPSA”, “polipéptido de proPSA” y “polipéptido de pPSA” se usan de forma intercambiable y preferiblemente abarcan todas las formas precursoras inactivas del PSA, pero en particular [-4]proPSA, [-7]proPSA, [-5]proPSA, [-1] proPSA, [-2] proPSA, [-3]proPSA y [-6]proPSA.

40

Como se usa en el presente documento, “quimérico” significa que un vector comprende un ADN de al menos dos especies diferente, o comprende ADN de la misma especie que está unido o asociado de una manera que no ocurre en la “naturaleza” o en el tipo salvaje de las especies.

45

“Secuencias de control” se define para indicar secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma operativa en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para células procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor y opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

50

“Operativamente unido” significa que los ácidos nucleicos están colocados en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o secuencia líder secretora está operativamente unido al ADN de un polipéptido si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado de modo que facilite la traducción. En general, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas, y en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores estén contiguos. La unión se logra mediante enlace en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

60

Los procedimientos generales para construir ADN recombinante la cual puede transformar las células diana son bien conocidos para los expertos en la materia, y se pueden usar las mismas composiciones y procedimientos de construcción para producir el ADN útil en el presente documento. Por ejemplo, J. Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (2d ed., 1989), proporciona procedimientos de construcción adecuados.

65

El ADN recombinante se puede introducir fácilmente en las células diana por transfección con un vector de expresión que comprende el ADNc que codifica el PSA, por ejemplo, por el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio modificado de C. Chen y col., *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2745 (1987). La transfección también se puede llevar a cabo por lipofección, usando equipos disponibles en el comercio, p. ej., proporcionados por Life Technologies, Inc. (Gibco BRL), Rockville, MD EE.UU.

Las células huésped adecuadas para la expresión de PSA derivan de organismos multicelulares. Dichas células huésped son capaces de actividades de procesamiento y glicosilación complejas. Sin embargo, las células de mamífero son las células huésped preferidas para la expresión de proteínas de mamífero puesto que estas células modifican y procesan la proteína recombinante de una manera muy próxima a la del huésped natural de la proteína. En principio, se puede usar cualquier cultivo de células eucariotas superiores en la práctica de la invención, sea de cultivo de células de vertebrado o invertebrado. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped permisivas de insecto.

La "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento o técnica en la cual se amplifican cantidades de un fragmento preseleccionado de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe en la patente US nº 4.683.195. En general, se usa información de la secuencia de los extremos de la región de interés o más allá para diseñar cebadores oligonucleótidos. Estos cebadores tendrán secuencias idénticas o similares a las cadenas opuestas del molde que se va a amplificar. La PCR se puede usar para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total y ADNc transcrito del ARN celular total, secuencias de bacteriófago o plásmido, y similares. Véase, en general Mullis y col., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51, 263 (1987); Erlich, ed., PCR Technology, (Stockton Press, NY, 1989).

Cuando el polipéptido de PSA se expresa en una célula recombinante distinta de una de origen humano, el polipéptido de PSA no tiene en absoluto proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es necesario purificar el polipéptido de PSA de proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas para el polipéptido de PSA. Por ejemplo, se puede centrifugar el medio de cultivo o lisato para eliminar restos celulares en partículas. Después se separan la membrana y las fracciones de proteínas solubles. Después, el polipéptido de PSA se puede purificar de la fracción de proteínas solubles, y si es necesario, de la fracción de membrana del lisato de cultivo. El polipéptido de PSA después se puede purificar de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes por fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio aniónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; o cromatografía de afinidad por ligando.

Una vez aislado y de acuerdo con una realización de la presente invención, se puede usar un polipéptido o péptido de proPSA correspondiente a la región de proPSA para producir anticuerpos anti-pPSA. Los polipéptidos de proPSA usados para generar anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a -7, -5 y -4proPSA. También se pueden usar péptidos correspondientes a la región proPSA para generar anticuerpos anti-pPSA y se incluyen todos los péptidos que contienen cualquier parte de la región pro del polipéptido de pPSA. Estos péptidos preferiblemente contienen aproximadamente 8 a 15 aminoácidos y comprenden un epítipo inmunógeno. Los anticuerpos monoclonales contra el pPSA purificado (proteína total) o los péptidos anteriores se pueden preparar usando técnicas conocidas de cultivo celular de hibridoma, por ejemplo, como describen E. Harlow y col., *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, este procedimiento implica preparar una línea celular fusionada que produce anticuerpos, p. ej., de células de bazo primarias fusionadas con una línea celular continua compatible de mieloma, y hacer crecer las células fusionadas en cultivo en masa o en una especie animal de la que se ha obtenido o con la que es compatible la línea celular de mieloma. Dichos anticuerpos ofrecen muchas ventajas en comparación con los producidos por inoculación de animales, puesto que son muy específicos y sensibles e inmunoquímicamente relativamente "puros". Los fragmentos de anticuerpos inmunológicamente activos también están dentro del ámbito de la presente invención, p. ej., el fragmento F(ab), puesto que son anticuerpos monoclonales parcialmente inmunizados.

Además de ser útiles como un antígeno para producir los anticuerpos anti-pPSA presentes, el polipéptido pPSA aislado producido de acuerdo con un procedimiento de la presente invención y sus variantes antigénicas activas, se pueden usar derivados y fragmentos del mismo en ensayos para el proPSA en muestras obtenidas de materiales biológicas que se sospecha que contienen proPSA o anticuerpos anti-proPSA.

Se puede usar principalmente una técnica de tipo sándwich de dos anticuerpos para determinar la concentración de antígeno en muestras desconocidas. Los ensayos de dos anticuerpos son rápidos y precisos, y si hay disponible una fuente de antígeno puro, en este caso proPSA, los ensayos se pueden usar para determinar las cantidades absolutas de antígeno en muestras desconocidas. El ensayo requiere dos anticuerpos que se unen a epítopos que no se superponen en el antígeno. Se pueden usar dos anticuerpos monoclonales que reconocen sitios discretos o un lote de anticuerpos policlonales purificados por afinidad.

En un ensayo de dos anticuerpos, un anticuerpo se purifica y se une a una fase sólida. Se puede usar cualquier fase sólida, sin embargo, para la mayoría de las aplicaciones se prefiere una placa de microvaloración de PVC. El anticuerpo unido, por ejemplo a un pocillo de una placa de microvaloración, no está marcado y se llama el "anticuerpo de captura". La cantidad del anticuerpo que va a ser utilizado dependerá del ensayo individual, pero una cantidad de aproximadamente 1 µg/pocillo en general da la unión máxima. También se pueden usar cantidades mayores o menores de anticuerpo de captura. Después, los pocillos se pueden lavar y añadir la muestra a los pocillos para dejar que el antígeno, en este caso el pPSA, en la solución de ensayo se una a la fase sólida. Las proteínas sin unir se pueden separar por lavado y se puede añadir un segundo anticuerpo marcado. Alternativamente, la muestra y el segundo anticuerpo marcado se pueden añadir simultáneamente. Después de lavar, el ensayo se puede cuantificar midiendo la cantidad del segundo anticuerpo marcado que está unido a la fase sólida. Una realización más preferida de la presente invención utiliza un anticuerpo monoclonal como el primer anticuerpo no marcado y un anticuerpo monoclonal como el segundo

ES 2 312 186 T3

anticuerpo marcado. El procedimiento de detección usado para cuantificar la cantidad de anticuerpo marcado unido depende del marcador usado. Los anticuerpos se pueden marcar de forma conveniente con yodo, enzimas o biotina. Se pueden usar procedimientos de detección calorimétrica u otros.

5 Los polipéptidos de proPSA de la presente invención se pueden inmovilizar y usar como “antígenos de captura” para unir e inmovilizar anticuerpos anti-pPSA de una muestra en la que se van a ensayar los anticuerpos anti-pPSA. Después, se detecta el complejo bivalente de polipéptidos de proPSA y anticuerpos anti-pPSA, p. ej., en el caso de material fisiológico humano, haciéndolo reaccionar con un anticuerpo de IgG antihumano el cual comprende un marcador detectable o un sitio de unión para un marcador detectable. En este último caso, se hace reaccionar el propio
10 sitio de unión con un compuesto específico para el sitio de unión, el cual comprende en sí mismo un marcador detectable. Los marcadores detectables útiles incluyen enzimas, radiomarcadores o marcadores fluorescentes. Después, el complejo ternario o cuaternario resultante se puede detectar y/o cuantificar por el marcador detectable, es decir, por una reacción de enzima-sustrato de formación de color, radioemisión, aglomeración y similares.

15 Alternativamente, el polipéptido de proPSA se puede marcar con un marcador detectable, tal como por uno o más restos de peptidilo radiomarcados, y se puede usar para competir con el proPSA endógeno por la unión a los anticuerpos anti-proPSA, es decir, como un antígeno de captura para unirse a los anticuerpos anti-proPSA en una muestra de un fluido fisiológico, mediante varios formatos de inmunoensayos competitivos. Por ejemplo, un inmunoensayo competitivo para detectar o determinar el proPSA en una muestra de fluido fisiológico humano que contiene pPSA
20 comprende:

(a) proporcionar una cantidad de anticuerpos purificados que reaccionan con pPSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA y que no presentan reactividad significativa frente a la forma madura del PSA, en el que los anticuerpos se movilizan contra el pPSA expresado
25 por una célula de mamífero;

(b) mezclar la muestra que se va a ensayar con una cantidad conocida de un polipéptido de proPSA o una subunidad inmunorreactiva del mismo que se une a un anticuerpo el cual se une a dicho pPSA el cual comprende un marcador detectable, para producir una muestra mixta;
30

(c) poner en contacto dichos anticuerpos con dicha muestra mixta durante un tiempo suficiente para permitir que se produzcan las reacciones inmunológicas entre dicho anticuerpo y dicho proPSA en dicha muestra y entre dicho anticuerpo y dicho polipéptido proPSA marcado;

(d) separar el anticuerpo de la muestra mezclada;
35

(e) detectar o determinar la presencia o cantidad de polipéptido marcado unido al anticuerpo o que queda en la muestra mixta; y

(f) determinar a partir del resultado de la etapa (e) la presencia o cantidad de dicho proPSA en dicha muestra.
40

Los inmunoensayos descritos antes en detalle se pueden usar en un procedimiento para detectar el pPSA en muestras fisiológicas humanas, tales como suero y tejido, con el propósito de diagnosticar y hacer el seguimiento del cáncer de próstata. Los ensayos de la presente invención también se pueden usar en un procedimiento para distinguir el cáncer de próstata de la hiperplasia prostática benigna, en los que el procedimiento incluye determinar la cantidad de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA en una muestra, en el que dicha determinación no usa anticuerpos que presenten unión significativa a la forma madura del PSA. La relación de la cantidad de proPSA a PSA total en una muestra también se podría determinar por los procedimientos descritos en el presente documento.
45

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas a la misma y se describe con más detalle por referencia a los siguientes ejemplos detallados.
50

Ejemplo 1

55 *Expresión de pPSA y conversión en PSA mediante hK2*

Materiales y procedimientos

60 *Vector de expresión, línea celular y transfección*

Se clonó un fragmento de ADN de 0,8 kb que codifica el ppPSA entero en el sitio BclI de pGT-d bajo el control del promotor GBMT (Berg. D.T. y col., “Ela-responsive mammalian host/vector system for the stable high-level expression of secreted proteins”, *Nucl. Acids Res.*, 20: 5485-5486, 1992) que dio como resultado el vector de expresión pGTD-PSA (Figura 1). Se confirmó la orientación y la secuencia del inserto. Se transfectaron células AV12-664 (ATCC CRL 9595), cultivadas en DMEM (alto contenido de glucosa) y clon fetal al 10% (HyClone Logan, UT, EE.UU.), con pGTD-PSA usando lipofectamina (Life Technologies, Inc (Gibco BRL), Rockville, MD, EE.UU.). Las células AV12-664 transfectadas (AV12-PSA) se seleccionaron en metotrexato 400 nM (Sigma Chemical Company St
65

ES 2 312 186 T3

Louis, MO, EE.UU.). Las células AV 12-664 transfectadas con el vector vacío (AV12-PGTD) también se seleccionaron de una manera similar para usar como control negativo. Se aislaron clones de una célula. Se ensayó la viabilidad de las células por exclusión con tinta azul tripán.

5 *Anticuerpos*

Se usaron los mAb murinos PSM 773 y HKIG 586.1. PSM 773 es uno de los componentes del equipo de PSA Tandem[®]-MP (Hybritech Incorporated, San Diego, CA, EE.UU.) y se ha demostrado que es específico para el PSA (Wang, T.J. y col., "Analysis of cross-reactivity of anti-PSA monoclonal antibodies with recombinant human glandular kallikrein", *J. Urol.*, 155:695A, 1996). HK1 G 586.1 es un anticuerpo anti-hK2. Kumar A. y col., *Cancer Research*, 56: 5397-5402, 1996.

Análisis ELISA y transferencia Western

15 Se recogió el suero que contenía medio agotado de células AV12-PSA en los días especificados. Se midió el PSA usando los ensayos de PSA y PSA libre Tandem[®]-MP (ambos de Hybritech Incorporated, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los medios agotados de las células AV12 y AV12-PGTD se usaron como controles negativos.

20 Para el análisis por transferencia Western, se hicieron crecer células AV12-PSA contenidas en matraces de cultivo celular hasta aproximadamente 60-70% de confluencia, se lavaron con PBS y se añadió medio HH4 sin suero. Los medios agotados recogidos en días específicos se concentraron usando un Centricon 10 (Amicon, Inc, Beverly, MA, EE.UU.), se incubaron con tripsina purificada o hK2 purificada seguido de ACT y se sometieron a SDS-PAGE en un gel al 4-20% (Bio-Rad, Inc, Hercules, CA, EE.UU.). Después de electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa. Se usaron anticuerpos primarios (1-10 $\mu\text{g/ml}$) y anticuerpos secundarios (IgG anti-ratón de cabra-peroxidasa de rábano picante, 1:500; Jackson Immunosearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, EE.UU.) para examinar las transferencias. Las señales inmunorreactivas se detectaron usando el sistema de quimioluminiscencia potenciada (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 *Purificación del PSA*

El mAb PSM 773 se acopló a AminoLink (Pierce Biotechnology Rockford, IL, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células AV12- PSA contenidas en matraces de cultivo tisular se hicieron crecer hasta aproximadamente 60-70% de confluencia, se lavaron con PBS y se añadió medio HH4 sin suero. Los medios agotados se recogieron los días especificados, se concentraron y se incubaron con la resina anterior durante la noche a 4°C con agitación. Después se preparó una columna con la resina, se lavó con PBS y el PSA se eluyó con glicina 100 mM, NaCl 0,5 M, pH 2,5. Las muestras se neutralizaron inmediatamente con TRIS 1 M, pH 8,0.

Ensayo para la medición de la actividad de PSA

40 La actividad enzimática del PSA se midió de acuerdo con el procedimiento publicado por Christensson, A. y col., "Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors", *Eur. J. Biochem.*, 194:755-763, 1990. Brevemente, se incubaron preparaciones de PSA (purificadas de fluido seminal o de medio agotado de células AV 12-PSA#8 el día 7) con sustratos cromogénicos peptídicos derivados de pNA 1 mM (metoxisuccinil-Arg-Pro-Tyr-pNA, S2586; Pharmacia Hepar, Inc, Franklin, OH, EE.UU.) en TRIS 200 mM, EDTA 5 mM (pH 8,0) a 37°C. La actividad enzimática del PSA se determinó por hidrólisis de los sustratos cromogénicos peptídicos, que conducía a un aumento de la absorbancia a 405 nm.

Conversión de proPSA purificado en PSA por hK2 purificada

50 Se incubó pPSA purificado (4.7 μM) con hK2 purificada (0,56 μM) a 37°C en TRIS 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8. La purificación por afinidad de la hK2 está descrita por Kumar, A. y col., "Expression of human glandular kallikrein, hK2, in mammalian cells", *Cancer Res.* 56:5397-5402, 1996 y Mikolajczyk, S.D. y col., "Human glandular kallikrein (hK2) shows arginine-restricted specificity and forms complexes with plasma protease inhibitors", *Prostate* 34: 44-50,1998. La mezcla inicial se hizo a 4°C y se resolvió inmediatamente una parte alícuota por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). La muestra se puso a 37°C y se analizaron partes alícuotas adicionales en puntos de tiempos hasta 2 horas. Las especificaciones de la columna de HIC y composiciones de los tampones fueron las siguientes: columna de polipropilaspirtamida, 4,6 X 250 mm, PoIyLC (distribuida por Western Analytical, Temecula, CA, EE.UU.), Tampón A: sulfato sódico 1,2 M, fosfato sódico 50 mM, pH 6,3; Tampón B: fosfato sódico 50 mM, 2-propanol al 5% en v/v, pH 7,3. Las muestras se prepararon en sulfato amónico 1,5 M y después se inyectaron en la columna de HIC con el siguiente gradiente: Tampón B al 0-35% de 0 a 1 minuto; Tampón B al 30-80% 1-12 minutos e isocrático con tampón B al 80% 12-14 minutos antes de reequilibrado en tampón A. Los picos recogidos de la columna se adsorbieron sobre membrana de PVDF (poli(difluoruro de vinilideno)) usando un cartucho Prosorb (Applied Biosystems, Foster City, Ca, EE.UU.) y se sometieron a secuenciación N-terminal usando un secuenciador 65 Procise AB1 modelo 492. La actividad enzimática de las muestras de los picos se determinó como se ha descrito antes.

ES 2 312 186 T3

Resultados

El ADNc del PSA se clonó en el vector pGT-d bajo el control del promotor GBMT usando un procedimiento similar al descrito para la hK2 por Kumar A. y col., *Cancer Res.* 56:5397-5402,1996. Para estudiar la expresión del PSA, se transfectaron células AV12 con el vector de expresión pGTD-PSA. Las células se seleccionaron en metotrexato 400 mM durante 2-3 semanas, y se analizó la expresión de PSA en los clones celulares usando en ensayo de PSA Tandem[®]-MP y en transferencias Western usando el mAb PSM 773. El clon AV12-PSA#8 se seleccionó basándose en sus altos niveles de expresión de una banda inmunorreactiva de PSA a ~32 kDa.

Para determinar el patrón de expresión del PSA en células de mamífero, se recogieron muestras de medio agotado de células AV12-PSA#8 durante 6 días consecutivos y se analizaron usando el ensayo de PSA Tandem[®]-MP. La figura 2 muestra que el PSA se detectó en medio agotado el día 1 y se había acumulado hasta >9 µg/ml el día 6. La expresión del PSA fue más elevada durante la fase logarítmica del crecimiento celular, indicando que las células secretan una forma estable de PSA contrariamente a ser liberada después de la muerte y lisis celular. Cuando se analizó en las mismas muestras el PSA libre, se obtuvieron valores similares (no se muestran los datos) que indicaban que las células AV12-PSA#8 expresan PSA sin formar complejo o libre.

Para determinar la identidad de la proteína que se secreta el día 1, se recogió y concentró el medio agotado de células AV12-PSA#8. El PSA del medio se purificó por cromatografía de afinidad usando PSM 773, un mAb específico de PSA. El análisis por secuenciación N-terminal de la proteína purificada puso de manifiesto la secuencia: APLILSRIVGG. Esta secuencia se corresponde con la secuencia predicha para el extremo de proPSA que empieza con el aa -7. También se identificó otra especie que empieza en el aa -5 (Ieu). No fue evidente una secuencia en competencia correspondiente a la forma madura del PSA a partir del perfil de aa liberados secuencialmente por el procedimiento de degradación de Edman. Cuando se usó el mismo protocolo de purificación para purificar la proteína del medio agotado del día 7 de las células AV12-PSA#8, se detectó sólo proPSA y no PSA maduro. Este resultado indica que el PSA es secretado como proPSA por las células AV12-PSA#8 empezando el día 1 y el proPSA es estable en el medio agotado incluso hasta después de 7 días.

Para demostrar que el proPSA expresado por AV12-PSA#8 es enzimáticamente inactivo y se puede convertir en PSA enzimáticamente activo por tratamiento suave con tripsina, se usó un ensayo espectrofotométrico usando el sustrato cromogénico disponible en el comercio, metoxisuccinil-Arg-Pro-Tyr-pNA (S-2586). Se observó un aumento de actividad de diez veces (de $2,38 \times 10^{-4}$ a $2,27 \times 10^{-3}$ unidades de actividad/minuto) cuando el medio agotado de AV12-PSA#8 (que contenía el equivalente a 14 µg de PSA medido por el ensayo de PSA Tandem[®]-MP) se trató con tripsina (al 2% en p/p) durante 60 minutos a 37°C y se inactivó con aprotinina al 4% en p/p. El medio gastado de las células AV12-PGTD (células AV12 transfectadas por el vector pGT-d vacío) que se trató de forma similar con tripsina y se inactivó con aprotinina, no mostró una actividad detectable lo que indicaba que las células AV12 no secretaban proteasas endógenas de tipo PSA. El control positivo, PSA (14 µg) purificado de plasma seminal y tratado de forma similar con tripsina en HH4 presentó una actividad de $9,49 \times 10^{-3}$ unidades de actividad/minuto.

Previamente se ha mostrado que el PSA forma complejo con la ACT en el suero. Se infirió que el proPSA enzimáticamente inactivo no formaría complejo con inhibidores de proteasa tales como el ACT. Para ensayar si el PSA convertido por tripsina podría formar complejo con ACT, se añadió ACT al medio agotado de células AV12-PSA#8 después de preincubación con tripsina. Después de 4 horas, la reacción se paró por adición de tampón de muestra + βME y ebullición. Después las muestras se trataron por electroforesis, se electrotransferieron y se examinaron con mAb PSM 773 (Figura 3). Se detectó un complejo de ~94 kDa que migraba junto con PSA-ACT (calle 1) en el medio agotado de células AV12-PSA#8 tratado con tripsina (calle 6). A diferencia de esto, no se observó complejo de PSA-ACT cuando el medio agotado de AV12-PSA#8 no tratado se incubó con ACT (calle 4). No se observó banda inmunorreactiva cuando el medio agotado de 7 días de AV12-PGTD preincubado con tripsina se incubó con ACT (calle 2). Estos resultados confirmaban que el proPSA en medio agotado de 7 días de células AV12-PSA#8 era enzimáticamente inactivo y no formaba complejo con los inhibidores de proteasa, ACT. Además, estos resultados indicaban que proPSA se convertía en PSA por tratamiento suave con tripsina y este PSA era enzimáticamente activo y podía formar complejo covalente con ACT. Parece que la región -1 a +1 de proPSA es el sitio principal para la reactividad de la tripsina ya que no se detectaron productos de degradación de PSA por transferencia Western usando el mAb PF1 D 215 (no se muestran los datos). Se ha mostrado previamente que el mAb PF1 D 215 detectaba los productos de degradación presentes en el fluido seminal. Wang, T.J. y col., "Antibody Specificities for PSA and PSA Fragments by SDS-PAGE Western Blot Analysis", *Tumor Biology* 20:75-78, 1997.

La hK2 es otro miembro de la familia de la calicreína humana. Se expresa predominantemente en el epitelio prostático, el sitio en el que PSA se expresa también de forma abundante. hK2 presenta actividad de tipo tripsina restringida por arginina. Para ensayar si el proPSA puede ser convertido en PSA por hK2, se añadió hK2 purificada al medio agotado de células AV12-PSA#8. Después de 60 minutos de incubación a 37°C, se añadió ACT a estas muestras. Después de otras 4 horas de incubación a 37°C, la reacción se paró por adición de tampón de muestra + βME y ebullición. Las muestras después se trataron por electroforesis, se electrotransferieron y se examinaron con PSM773 (Figura 3). Se detectó un complejo de ~94 kDa que migraba junto con PSA purificado-ACT (calle 1) en el medio agotado de células AV12-PSA#8 tratado con hK2 (calle 8). Aunque hK2 y PSA comparten una similitud de ~78% de aa, hK2 no se inmunodetectó con el mAb PSM 773 (calle 9) confirmando la especificidad del PSA de este mAb. Estos resultados indican que en medio agotado de AV12-PSA#8, hK2 puede convertir el proPSA enzimáticamente inactivo en la forma activa del PSA.

ES 2 312 186 T3

Para confirmar los resultados anteriores, se incubaron las preparaciones de hK2 y pPSA purificadas por afinidad y se analizó la conversión de pPSA en PSA por HIC y secuenciación de aminoácidos. La mezcla se resolvió por columna de HIC como se ha descrito antes (Figura 4). A pesar de sus similitudes, hK2, pPSA y PSA maduro tienen tiempos de retención claramente diferentes. La figura 4A muestra la mezcla de hK2 y pPSA en el tiempo 0 y la figura 4B muestra la misma mezcla después de 2 horas de incubación a 37°C. Los tiempos de retención para hK2 (pico 1) y pPSA (pico 2) eran idénticos a los de hK2 y pPSA purificados, respectivamente, cuando se inyectaban por separado (no se muestran los datos). El pico de PSA convertido por hK2 (pico 3) eluía en la misma posición que el PSA maduro purificado de fluido seminal (no se muestran los datos). La figura 4B muestra que después de una incubación de 2 horas a 37°C con hK2 purificado, el pico del pPSA se había convertido casi por completo en PSA maduro. También se analizaron puntos de tiempo adicionales a los 20 minutos y 1 hora y mostraron niveles intermedios de PSA (no se muestran los datos). La conversión del proPSA a PSA maduro se confirmó por secuenciación de aa de los picos que mostraron que el pico 2 contenía el péptido líder proPSA N-terminal (empezando en el aa -7) mientras que el pico 3 empezaba con la secuencia madura (empezando en el aa +1). Además, el PSA convertido por hK2 contenía una actividad enzimática de 58 nmoles/minuto/mg sobre el sustrato S-2586. Este valor era comparable a la actividad enzimática del PSA purificado de fluido seminal sobre el mismo sustrato. Por el contrario, la muestra de pPSA previa al tratamiento con hK2 contenía <5% de actividad enzimática de PSA. El pPSA purificado cuando se incubó sin hK2 no mostró conversión en PSA (no se muestran los datos).

Como otras serina proteasas, el PSA es traducido en forma de un precursor preproPSA inactivo. Después del paso por la ruta secretora, el péptido señal se escinde dando la forma pro de la proteína. Aunque los péptidos pro en general son escindidos dentro de la célula (p. ej., activador tisular del plasminógeno, proteína C y factor de necrosis tumoral), hay excepciones (p. ej., renina, tripsina, quimiotripsina y hK2) que son secretados como proteínas pro y escindidos extracelularmente (Kumar. A. y col., *Cancer Res.* 56: 5397-5402, 1996). La siguiente prueba demuestra de forma inequívoca que el PSA se secretado como proPSA de las células de mamífero: (a) el medio agotado de células AV12-PSA#8 no tenía actividad enzimática de tipo PSA, (b) la forma de PSA en el medio agotado de células AV12-PSA#8 no formaba complejo con ACT como se demostró por análisis de transferencia Western, (c) el tratamiento con tripsina del medio agotado de AV12-PSA#8 dio como resultado PSA natural que era enzimáticamente activo y formaba un complejo con ACT, y (d) la purificación y el análisis de secuencia de la forma de PSA presente en el medio agotado de AV12-PSA#8 confirmó su identidad como proPSA.

El PSA existe en muchas formas en el fluido seminal y en el suero. Estas formas incluyen complejos de PSA con inhibidores de proteasa tales como ACT e inhibidor de la proteína C (PCI). El PSA también existe como PSA-MG, complejo de PSA-alfa-2-macroglobulina, y PSA libre. Es posible que parte del PSA libre en el suero y el fluido seminal sea de hecho proPSA. Los datos de los autores de la invención sugieren que el proPSA existe en fluidos biológicos y puede ser un marcador útil para enfermedades prostáticas.

Hasta ahora, no se han identificado la o las proteasas responsables de la escisión del propéptido de proPSA para formar la molécula activa. La hK2, otro miembro de la familia de la calicreína humana, presenta actividad de tipo tripsina restringida por arginina, y de forma similar al PSA es expresada predominantemente en el epitelio prostático (Morris, B.J. *véase antes*; Chapdelaine, P., *véase antes*). La hK2 es secretada en forma de prohK2 por células de mamíferos. prohK2 se convierte en hK2 enzimáticamente activa. Se ha mostrado que hK2 tiene actividad autocatalítica, ya que puede cortarse a sí misma entre los restos -1-+1. Mikolajczyk, y col., "Alanine 217 is important for the catalytic function and autoactivation of prostate-specific human kallikrein 2", *Eur. J. Biochem.* 246: 440-446, 1997.

Los datos presentados en el presente documento muestran claramente que hK2 corta el propéptido de proPSA convirtiéndolo en el PSA maduro enzimáticamente activo (figura 4). El PSA maduro, pero no el proPSA, podía formar complejo con ACT (figura 3). Este resultado sugiere una posible relación reguladora fisiológica entre estos dos miembros de la familia de la calicreína humana. Se prevé que estudios posteriores determinarán si el sitio -1-+1 del PSA es el sitio de acción preferido de hK2. Normalmente, 30-40% del PSA aislado del fluido seminal está cortado entre los restos 85-86, 145-146 ó 182-183 (Christensson, A. y col., *Eur. J. Biochem.*, 194:755-763, 199a). Es sabido que el corte del PSA entre 145-146 (lisina-lisina) inactiva el PSA (Christensson, A. y col., *véase antes*). Se supone que el corte entre 85-86 y 182-183 también conduce a la inactivación. La hK2 puede estar regulando la actividad de PSA y la formación de complejo con inhibidores de proteasa cortando en algunos de los sitios mencionados. Igualmente, el PSA puede estar regulando también la actividad de hK2 al cortar la hK2 en los sitios sensibles a la quimiotripsina. Los reactivos descritos en el presente documento más la hK2 expresada en células de mamíferos facilitarán estos experimentos.

Los resultados anteriores colectivamente indican que el PSA es expresado en la forma pro en células de mamíferos y puede ser convertido en la forma madura enzimáticamente activa extracelularmente por la hK2. Estos resultados también sugieren que el proPSA puede estar presente en fluidos biológicos, y por lo tanto, podría ser un marcador útil para las enfermedades prostáticas. Las líneas celulares descritas en el presente documento constituyen una fuente valiosa de proPSA para ser usado como un inmunógeno y estudiar las funciones biológicas del proPSA y PSA con mayor detalle.

65

Ejemplo 2

Detección de pPSA en el suero humano

5 La presencia de pPSA en el suero humano indicaría lo siguiente. Primero, que el PSA se ha secretado como la forma de pPSA en el tejido humano y es convertido en PSA maduro extracelularmente. Segundo, que el pPSA es estable en el suero humano y por lo tanto puede ser útil como un marcador de diagnóstico para el cáncer de próstata (CP) o la HPB. Los autores de la invención evaluaron la presencia de pPSA en el suero humano usando primero purificación por afinidad para purificar todas las formas de PSA presentes en una mezcla de suero humano. Después
10 fraccionaron las formas de PSA eluidas en HPLC e identificaron cada forma de PSA basándose en su perfil de elución de la columna. Este análisis indicaba que el pPSA está presente en el suero humano.

Procedimientos

15 Se obtuvieron 75 ml de suero humano mezclado de pacientes con cáncer de próstata con nivel de PSA elevado. Se añadió sulfato amónico sólido al suero para llegar a una concentración final 2 M, y después la muestra se dializó frente a sulfato amónico 2 M durante 16 horas a 4°C. Después el suero se clarificó por centrifugación y la solución de líquido sobrenadante se dializó 3 veces (1 hora cada vez) contra 2 litros de fosfato sódico 20 mM, pH 7. Después, la muestra se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm y se pasó por una columna de afinidad de 0,5 ml a 1 ml/min. La
20 columna de afinidad consistía en el mAb PSM 773 unido covalentemente a resina Aminolink (Pierce Biotechnology Rockford, IL, EE.UU.) con una concentración de 5 mg de mAb por ml de resina.

La columna de afinidad se lavó con 50 ml de PBS y el PSA se eluyó con 3 volúmenes x 1 ml de glicina 100 mM, cloruro sódico 0,5 M, pH 2,5. El eluyente (3 ml) se neutralizó con 300 µl de TRIS 1 M, pH 8. Se añadió sulfato amónico al eluyente hasta una concentración final 2 M y esta muestra se aplicó a una columna de HPLC para resolverla por cromatografía de interacción hidrófoba (PolyLC, columna de polipropil-aspartamida, tamaño de poros 1000 Å, 4,6 mm X 200 mm distribuida por Western Analytical, Temecula, CA, EE.UU.). El tampón A fue fosfato sódico 20 mM, sulfato sódico 1,2 M, pH 6,3, y el tampón B fue fosfato sódico 50 mM, 2-propanol al 5%, pH 7,4. El gradiente de elución fue B al 0-35% de 0-1 minuto y B al 35-80% de 1-14 minuto, antes de reequilibrar con tampón A. El caudal
30 fue de 1 ml/minuto.

Resultados

La figura 5 muestra los tiempos de retención (RT) de patrones resueltos en las condiciones cromatográficas de HIC antes descritas. La figura 5A muestra el RT de la ACT activa. La figura 5B muestra el RT de la ACT activa incubada con PSA purificado de fluido seminal. Puesto que es sabido que el PSA del fluido seminal contiene aproximadamente 50% del PSA inactivo (conocido como PSA "libre" porque no formará complejo con ACT), la incubación de PSA con ACT da como resultado PSA-ACT así como PSA libre. El PSA también corta e inactiva la ACT y por lo tanto también se ve ACT inactiva (iACT). La figura 5C muestra el RT del PSA de fluido seminal. No hay diferencias entre
40 los tiempos de retención del PSA activo y el PSA inactivo en estas condiciones cromatográficas.

La figura 6A muestra los RT de los patrones de las diferentes formas de PSA. Todas las formas se verificaron por secuenciación de aminoácidos. El pico de [-7,-5]pPSA contiene aproximadamente niveles iguales de las formas [-7] pPSA y [-5]pPSA que no se resuelven entre sí. La figura 6B muestra el perfil de las formas de PSA del suero unidas a la columna de afinidad de PSM773 como se ha descrito antes. Las muestras se recogieron en fracciones de 0,5 ml y se ensayaron por el ensayo de PSA libre Tandem®-MP (ensayo fPSA, Hybritech Incorporated, San Diego, CA, EE.UU.). El ensayo de fPSA detecta tanto el pPSA como el PSA libre (inactivo). El pico minoritario a 7 min se debe a una pequeña reactividad cruzada del ensayo de fPSA con el PSA-ACT eluido de la columna de afinidad. El nivel real de PSA-ACT en esta muestra es aproximadamente 10 veces mayor que el nivel de PSA libre (no se muestran los datos).
50 Los picos a 10 minutos y 12 minutos corresponden al PSA maduro y [-4]pPSA, respectivamente. Estos datos indican que al menos una forma de pPSA ([-4]pPSA) está presente en el suero humano, y considerándolo en relación con las áreas relativas de los picos, compone aproximadamente el 25% del PSA libre o sin formar complejo en el suero.

Ejemplo 3

Reactividad de las formas de PSA con ACT

Para confirmar que las formas pro del PSA no son reactivas con ACT, se incubó una mezcla de PSA maduro purificado, [-4]pPSA y [-7,-5]pPSA con ACT. La figura 7B (Sin ACT) muestra el perfil cromatográfico de la mezcla de proteínas sin la adición de ACT. La figura 7A (+ACT) muestra el perfil cromatográfico de una cantidad idéntica de la misma muestra después de incubación con ACT durante 2 horas a 37°C. Sólo el PSA maduro forma un complejo con ACT. Las formas [-4], [-5] y [-7] de pPSA no forman un complejo con ACT, puesto que no muestran disminución del área del pico. Estos datos están de acuerdo con que el [-4]pPSA en el suero no forma complejo con ACT.
65

ES 2 312 186 T3

Ejemplo 4

Detección de PSA inactivo sin formar complejo en el suero humano por transferencia Western

5 *Procedimientos*

Tres muestras diferentes de suero de carcinoma de próstata (2 μ l/calle) que contenían diferentes cantidades de PSA (971 ng/ml - 5.330 ng/ml) se redujeron y desnaturalizaron, y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 4%-20%. El gel se transfirió a nitrocelulosa y se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-PSA PSM773 2 μ l/ml durante 10 1 hora. Después de lavado exhaustivo, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con HRP y se incubó con la transferencia durante 1 hora y se lavó otra vez con PBS. La reactividad del anticuerpo se detectó usando el reactivo de quimioluminiscencia potenciada (ECL) (Amersham, Arlington Heights, IL, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 *Resultados*

El anticuerpo monoclonal anti-PSA detecta una banda principal a aproximadamente 90 kDa la cual representa el PSA-ACT en las tres muestras de suero, tal como se muestra en la figura 8. También se detecta una banda minoritaria a aproximadamente 33 kDa en dos de las tres muestras de suero. Esta forma de menor peso molecular del PSA representa una forma inactiva sin formar complejo del PSA puesto que el PSA activo formaría complejo fácilmente con la ACT. La presencia de la forma de 33 kDa de PSA en las muestras de suero con niveles de PSA mayores probablemente es un reflejo de la sensibilidad del procedimiento y el anticuerpo.

Ejemplo 5

25

Las formas cortadas de PSA no son detectables en el suero humano (cáncer de próstata).

Procedimientos

30 *Transferencia Western del suero*

Las proteínas reducidas y desnaturalizadas se trataron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4-20% y se transfirieron a nitrocelulosa (Towbin, 1979). La transferencia satisfactoria se comprobó por tinción de las transferencias con tinte de proteína Ponceau S. Las transferencias se bloquearon en leche desnatada deshidratada al 5% en solución salina tamponada con TRIS (TBS) y después se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-PSA PF1D215.1 0,1 μ g/ml durante 1 hora a 4°C con agitación. Después de lavado exhaustivo con TBS, Tween al 0,05%, se incubó una dilución 1:2.000 de IgG antiratón de cabra-HRP en leche al 5% (Jackson Laboratories, Westgrove, PA, EE.UU.) con las transferencias durante 0,5 horas con agitación. Las transferencias se lavaron cinco veces con TBS y la reactividad del anticuerpo se detectó usando el reactivo de quimioluminiscencia potenciado (ECL) (Amersham, Arlington Heights, IL, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transferencia se barrió con el sistema Chemilmager Low Light Imaging System (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EE.UU.)

Aunque la presencia de formas cortadas del PSA en el fluido seminal está bien documentada, nunca se ha demostrado la presencia de estas formas cortadas en el suero humano, y sólo se ha inferido que contribuían a la proporción de PSA que existe en la forma libre, sin formar complejo. Usando un anticuerpo que detecta los productos rotos, cortados de PSA, PFI D 215, los autores de la invención examinaron en el suero de cáncer de próstata la presencia de los productos rotos, por análisis de transferencia Western. En la figura 9, se compara el suero de cáncer de próstata con el fluido seminal, en la que cada muestra contiene una cantidad equivalente de PSA. El PSA purificado de fluido seminal se examinó como añadido directamente al gel y también añadido a suero femenino normal. Se demostró que, mientras que las formas cortadas/rotas de PSA son evidentes en las muestras de fluido seminal (calle 3 - no añadido, calle 4 - añadido a suero femenino), no hay pruebas de formas cortadas en el suero de cáncer de próstata humano (calle 2). Además, las bandas predominantes vistas en los análisis de transferencia Western del suero, están de acuerdo con el complejo de PSA- α 2-macroglobulina, complejo de PSA-ACT, y una forma intacta (no cortada) pero inactiva de PSA libre de 32 kd. Esta forma se muestra en la figura 6 que es, en parte pro-PSA y, en parte, otra forma (todavía no caracterizada) de PSA inactivo. Estos datos demuestran que el PSA libre en el suero y el fluido seminal están compuestos de diferentes especies moleculares.

Documentos indicados en la descripción

60

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones. Documentos de patente indicados en la descripción

65

- US 4683195 A [0022]

ES 2 312 186 T3

Patentes no citadas en la descripción

- PARKER, S.L. *et al.* *CA Cancer J. Clin.*, 1996, vol. 46, 5-27 [0002]
- 5 • CATALONA, W. J. *et al.* *N. Engl. J. Med.*, 1991, vol. 324, 1156-1161 [0002]
- OESTERLING, J.E. *J. Urol.*, 1991, vol. 145, 907-923 [0002]
- LABRIE, F. *et al.* *J. Urol.* 1992, vol. 147, 846-852 [0002]
- 10 • MCCORMACK, R.T., *et al.* *Urology*, 1995, vol. 45, 729-744 [0002]
- BENSON, M.C. *et al.* *J. Urol.*, 1992, vol. 147, 815-816 [0002]
- 15 • CARTER, H.B. *et al.* *J. Am. Med. Assoc.*, 1992, vol. 267, 2215-2220 [0002]
- OESTERLING, J. E. *et al.* *J. Am Med. Assoc.*, 1993, vol. 270, 860-864 [00021]
- BELANGER, A. *et al.* *Prostate.* 1995, vol. 27, 187-197 [0003]
- 20 • LUNDWALL, A. *et al.* *FEBS Lett.*, 1987, vol. 214, 317-322 [0003]
- RIEGMAN, P.H.J. *et al.* *Biochem, Biophys, Res. Commun.*, 1988, vol. 155, 181-188 [0003]
- 25 • HENTTU, P. *et al.* *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 160, 903-910 [0003]
- QUI, S. *et al.* *J. Urol.*, 1990, vol. 144, 1550-1556 [0003]
- YOUNG, C.Y.F. *et al.* *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 3748-3752 [0003]
- 30 • WATT, K.W.K. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 3166-3170 [0003]
- BAN, Y. *et al.* *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 1984, vol. 123, 482-488 [0003]
- 35 • LILJA, H. *Clin. Invest.*, 1985, vol. 76, 1899-1903 [0003]
- KANETY, H. *et al.* *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 1992, vol. 77, 228-233 [0003]
- CLEMENTS, J.A. *Endocr. Rev.*, 1989, vol. 10, 393-419 [0004]
- 40 • CARBINI, L.A. *et al.* *Hypertens.*, 1993, vol. 11, 893-898 [0004]
- FUKOSHIMA, D. *et al.* *Biochemistry.* 1985, vol. 24, 8037-8043 [0004]
- 45 • MORRIS, B.J. *Clin., Exp. Pharm Phys.*, 1989, vol. 16, 345-351 [0004]
- CRAPDELAINE, P. *et al.* *FEBS Lett.*, 1988, vol 236, 205-290 [0004]
- YOUNG, C.Y.F. *et al.* *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 818-824 [0004]
- 50 • GRAUER, L. *et al.* *J. Androl.*, 1996, vol 17. 353-359 [0004]
- SCHEDLICH, L.J. *et al.* *DNA*, 1987, vol. 6.429-437 [0004]
- 55 • LILJA, H. *World J. Urol.*, 1993, vol. 11, 188-191 [0004]
- YOUNG. C.Y.F. *et al.* *The Prostate Supplement.* 1996, vol 7, 17-24 [0004]
- 60 • DARSON, M.R. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostate intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: A novel prostate cancer marker. *Urology*, 1997, vol. 49, 857-862 [0004]
- RITTENHOUSE, N.G. *et al.* Characterization and evaluation of hK2: a potential prostate cancer marker, closely related to PSA. *Proceedings of the Fast International Consultation on Prostate Cancer*, 1996, 25 [0004]
- 65 • MIKOLAJCZYK, S.D. *et al.* Human glandular kallikrein (hK2) shows arginine-restricted specificity and forms complexes with plasma protease inhibitors. *Prostate*, 1998, vol. 34, 44.50 [0004] [0039]
- *J. Androl.*, 1996, vol 17, 659-665 [0004]

ES 2 312 186 T3

- **KUMAR, A. et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 5397-5402 [0005]
- **LOVGREN, J. et al.** *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 1995, vol. 231, 888-895 [0005]
- 5 • **KARR et al.** *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 2465-2462 [0005]
- **J. SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0019]
- **C. CHEN et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 2745 [0020]
- 10 • **MULLIS et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bios.*, 1987, vol. 51, 263 [0022]
- PCR Technology. *Stockton Press*, 1989 [0022]
- 15 • **E. HARLOW et al.** *Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988 [0004]
- **BERG. D.T. et al.** Ela-responsive mammalian host/vector system for the stable high-level expression of secreted proteins. *Nucl. Acids Res.*, 1992, vol. 20, 5485-5486 [0033]
- 20 • **WANG, T.J. et al.** Analyss of cross-reactivity of anti-PSA monoclonal antibodies with recombinant human glandular kallikrein. *J. Urol.*, 1996, vol. 155, 695A [0034]
- **KUMAR A, et al.** *Cancer Research*, 1996, vol. 56, 5397-5402 [0034]
- 25 • **CHRISTENSSON, A. et al.** Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extra-cellular serine proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, 1990, vol. 194, 755-763 [0038]
- **KUMAR, A. et al.** Expression of human glandular kallikrein, hK2, in mammalian cells, *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 5397-5402 [0039]
- 30 • **KUMAR A. et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 5397-5402 [0040]
- **WANG, T.J. et al.** Antibody Specificities for PSA and PSA Fragments by SDS-PAGE Western Blot Analysis. *Tumor Biology*, 1997, vol. 20, 75-78 [0044]
- 35 • **KUMAR. A. et al.** *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 5397-5402 [0047]
- **MIKOLAJCZVK et al.** Alanine 217 is important for the catalytic function and autoactivation of prostate-specific human kallikrein 2. *Eur. J. Biochem*, 1997, vol. 246, 440-446 [0049]
- 40 • **CHRISTENSSON, A. et al.** *Eur. J. Biochem.*, vol. 194, 755-763 [0050].

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para detectar o determinar el pPSA en una muestra de fluido fisiológico humano que contiene pPSA, que comprende:
- 10 (a) proporcionar una cantidad de anticuerpos purificados que se unen específicamente al pPSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA, y que no presentan una unión significativa a la forma madura del PSA, en el que los anticuerpos se estimulan contra un pPSA recombinante expresado por una célula de mamífero;
- 15 (b) poner en contacto dichos anticuerpos con la muestra que se va a ensayar durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejos binarios entre al menos una parte de dichos anticuerpos y una parte de dicho pPSA; y
- 20 (c) detectar o determinar la presencia o cantidad de pPSA formando complejo con dichos anticuerpos.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fluido fisiológico humano es suero.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la etapa (c) el pPSA se hace reaccionar con un anticuerpo que comprende un marcador detectable o se une a un marcador detectable, para formar un complejo ternario detectable.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos anticuerpos están unidos a una fase sólida.
- 7 Un procedimiento de competición para detectar o determinar el pPSA en una muestra de fluido fisiológico humano que contiene pPSA, que comprende:
- 30 (a) proporcionar una cantidad de anticuerpos purificados que reaccionan con un pPSA seleccionado de [-1] pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA y que no presentan una reactividad significativa con la forma madura del PSA, en el que los anticuerpos se movilizan contra un pPSA recombinante expresado por una célula de mamífero;
- 35 (b) mezclar la muestra que se va a ensayar con una cantidad conocida de un pPSA o una subunidad inmunorreactiva del mismo que se une a un anticuerpo que se une a dicho pPSA el cual comprende un marcador detectable, para producir una muestra mixta;
- 40 (c) poner en contacto dichos anticuerpos con dicha muestra mixta durante un tiempo suficiente para permitir que se produzcan reacciones inmunológicas entre dicho anticuerpo y dicho pPSA en dicha muestra y entre dicho anticuerpo y dicho pPSA marcado;
- 45 (d) separar el anticuerpo de la muestra mixta;
- (e) detectar o determinar la presencia o cantidad de pPSA marcado unido al anticuerpo o que quede en la muestra mixta; y
- 50 (f) determinar a partir del resultado en la etapa (e) la presencia o cantidad de dicho pPSA en dicha muestra.
8. Un procedimiento para detectar o determinar el pPSA en una muestra de tejido de mamífero, que comprende:
- 55 (a) mezclar una cantidad de un agente que se une a un polipéptido de pPSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2] pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA y que no presenta unión significativa a la forma madura de PSA, con las células de una muestra de tejido de mamífero para formar así un complejo binario que comprende el agente y las células, en el que el agente comprende un anticuerpo movilizado contra un pPSA recombinante expresado por una célula de mamífero; y
- 60 (b) determinar o detectar la presencia o cantidad de formación de complejo en la muestra.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que las células son células de próstata.
- 65 11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la formación de complejo se detecta mediante un segundo agente que comprende un marcador detectable o que se une a un marcador detectable, para formar un complejo ternario detectable.

ES 2 312 186 T3

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el segundo agente es un anticuerpo.

13. Un anticuerpo que se une a una forma pro del PSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA y que no presenta unión significativa a la forma madura de PSA, en el que los anticuerpos se movilizan contra un pPSA recombinante expresado por una célula de mamífero.

14. El anticuerpo de la reivindicación 13, que no presenta unión significativa de la forma pro de hK2.

15. Un anticuerpo que se une específicamente a [-4]pPSA y que no presenta unión significativa a la forma madura de PSA.

16. El anticuerpo de la reivindicación 15, que no presenta unión significativa a [-5]pPSA o [-7]pPSA.

17. El anticuerpo de la reivindicación 15, que es un anticuerpo monoclonal.

18. Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente al pPSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA y que no presenta unión significativa a la forma madura de PSA, en el que anticuerpo se ha movilizado contra un pPSA recombinante expresado por una célula de mamífero.

19. Una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo que se une específicamente a [-4]pPSA y que no presenta unión significativa a la forma madura de PSA.

20. Un equipo de diagnóstico para detectar o determinar el pPSA en fluido fisiológico humano, que comprende una cantidad conocida de al menos un anticuerpo que se une específicamente a un pPSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA y que no presenta unión significativa a la forma madura de PSA, en el que el anticuerpo está marcado de forma detectable o se une a un marcador detectable y en el que los anticuerpos se movilizan contra un pPSA recombinante expresado por una célula de mamífero.

21. El kit de diagnóstico de la reivindicación 20, que además comprende una fase sólida que puede tener dicho anticuerpo unido a la misma.

22. Un procedimiento de diagnóstico que comprende:

(a) poner en contacto una cantidad de anticuerpos purificados que se unen específicamente a pPSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA y que no presentan unión significativa a la forma madura de PSA, con una muestra de fluido fisiológico obtenida de un ser humano, que contiene pPSA, durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejos binarios entre al menos una parte de dichos anticuerpos y una parte de dicho pPSA, en el que los anticuerpos se movilizan contra un pPSA expresado por una célula de mamífero; y

(b) determinar la cantidad de dichos complejos en dicha muestra y correlacionar la cantidad de dichos complejos con la presencia o ausencia de cáncer de próstata en dicho ser humano.

23. Un procedimiento para distinguir entre la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata, que comprende determinar la presencia o cantidad de pPSA seleccionado de [-1]pPSA, [-2]pPSA, [-3]pPSA, [-4]pPSA, [-5]pPSA, [-6]pPSA y [-7]pPSA en una muestra de fluido fisiológico humano, en el que dicha determinación no usa anticuerpos que presenten unión significativa a la forma madura de PSA.

Vector de expresión de PSA

pGTD-PSA

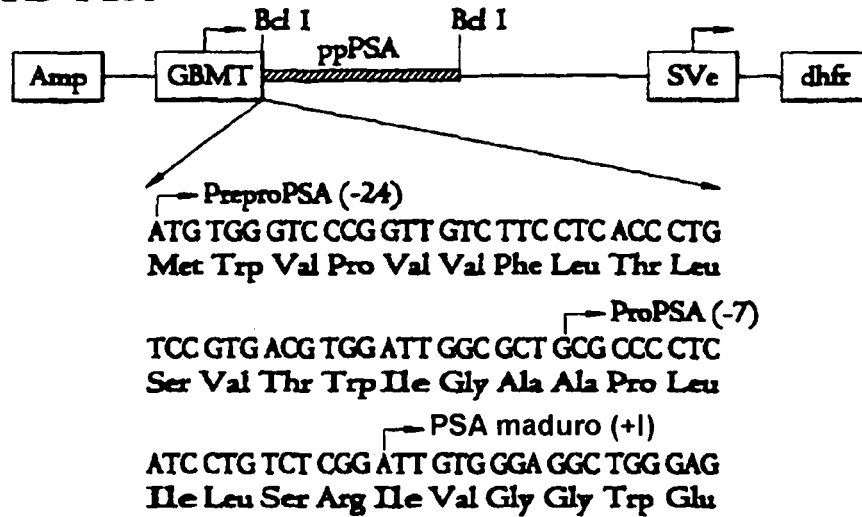


Fig. 1

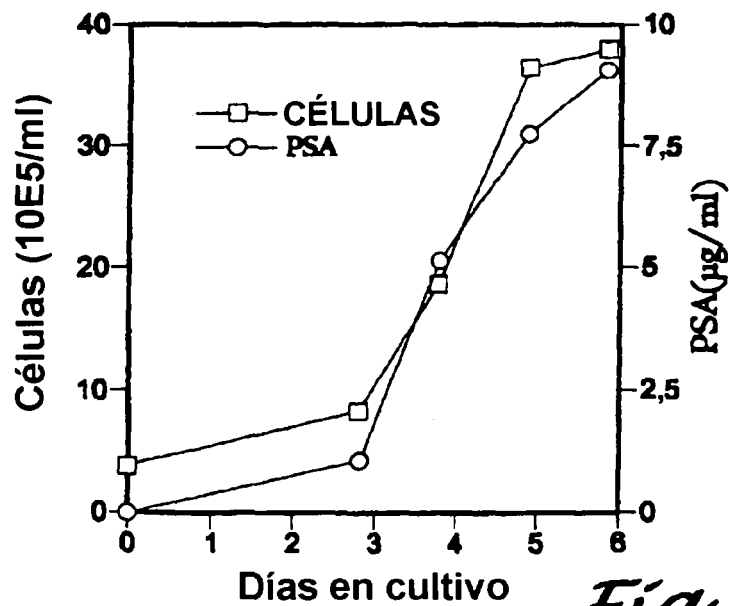


Fig. 2

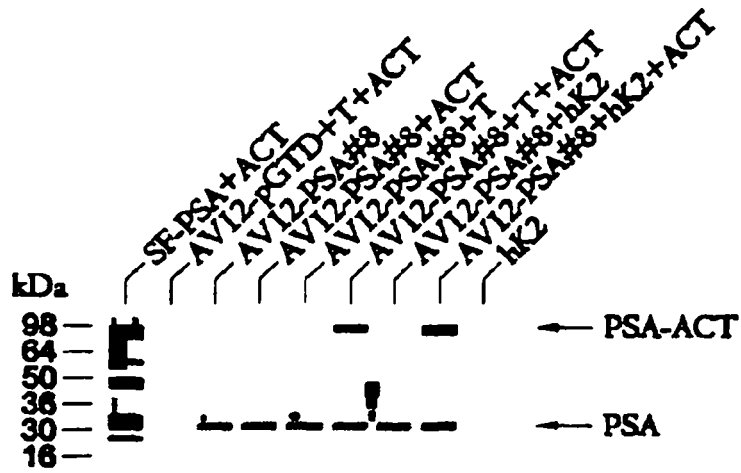


Fig. 3

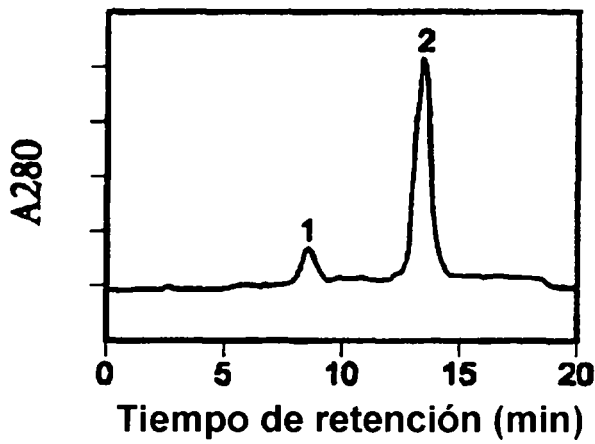


Fig. 4A

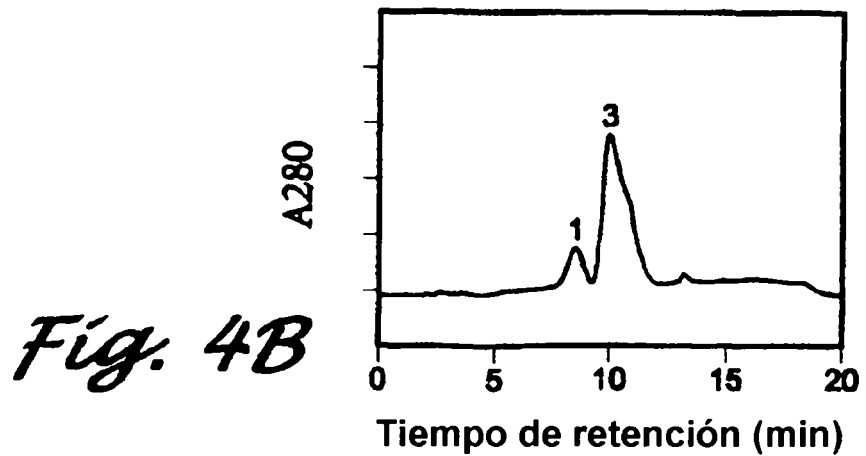


Fig. 4B

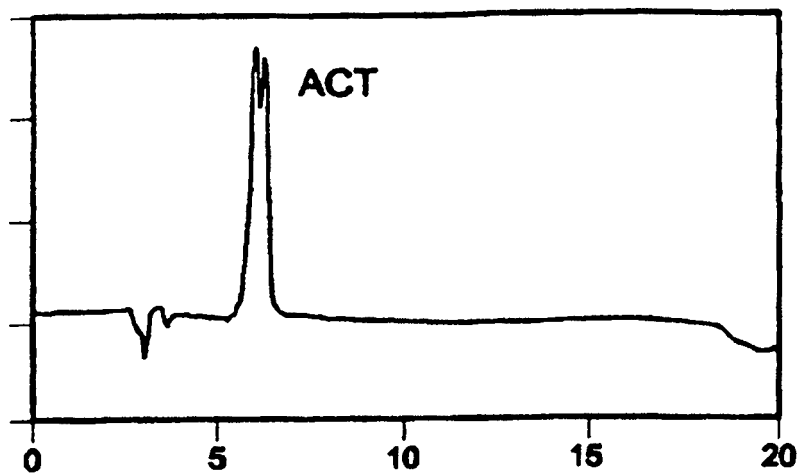


Fig. 5A Tiempo de retención (min)

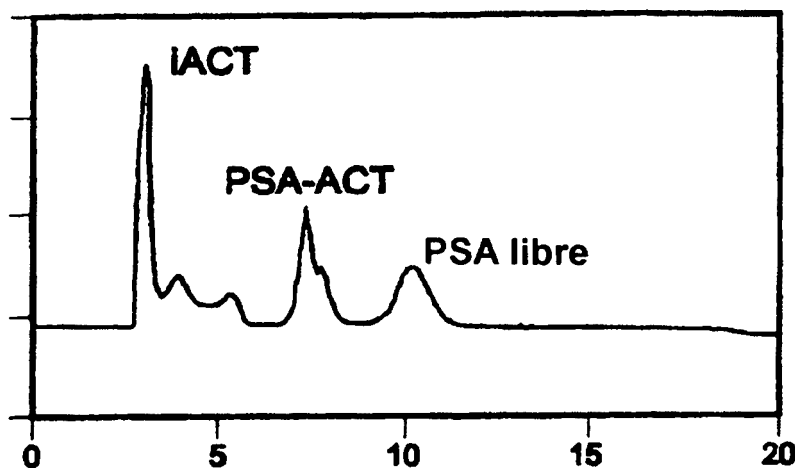


Fig. 5B Tiempo de retención (min)

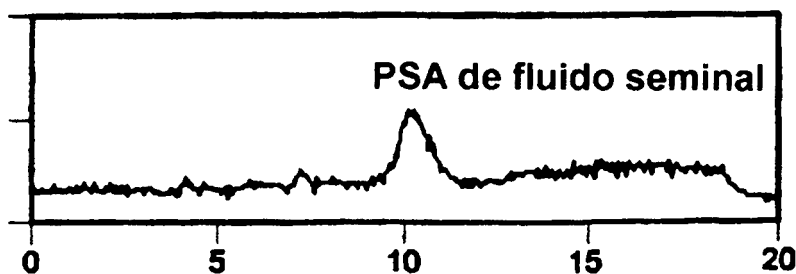


Fig. 5C Tiempo de retención (min)

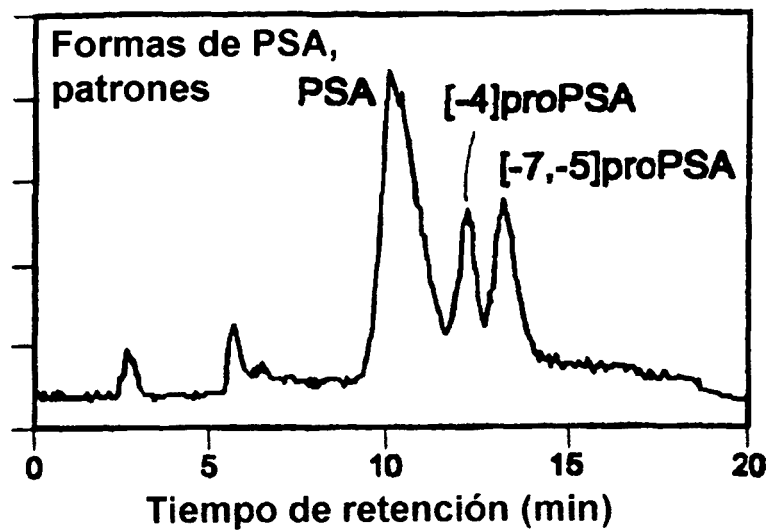


Fig. 6A

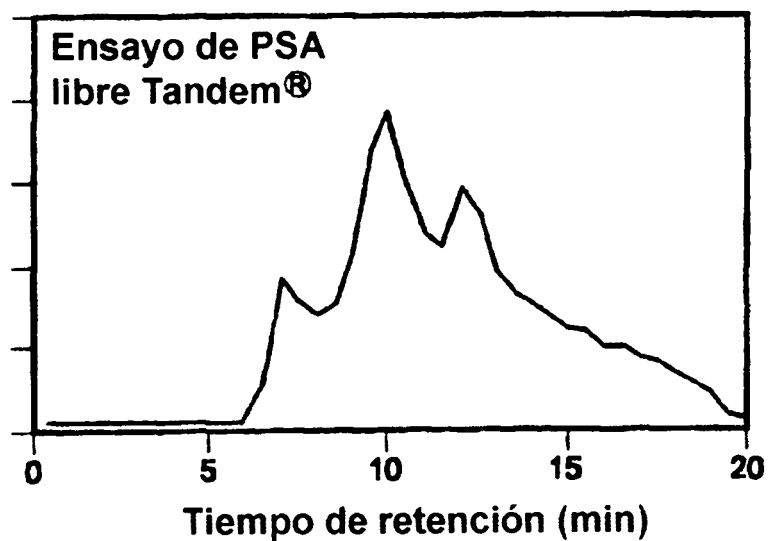


Fig. 6B

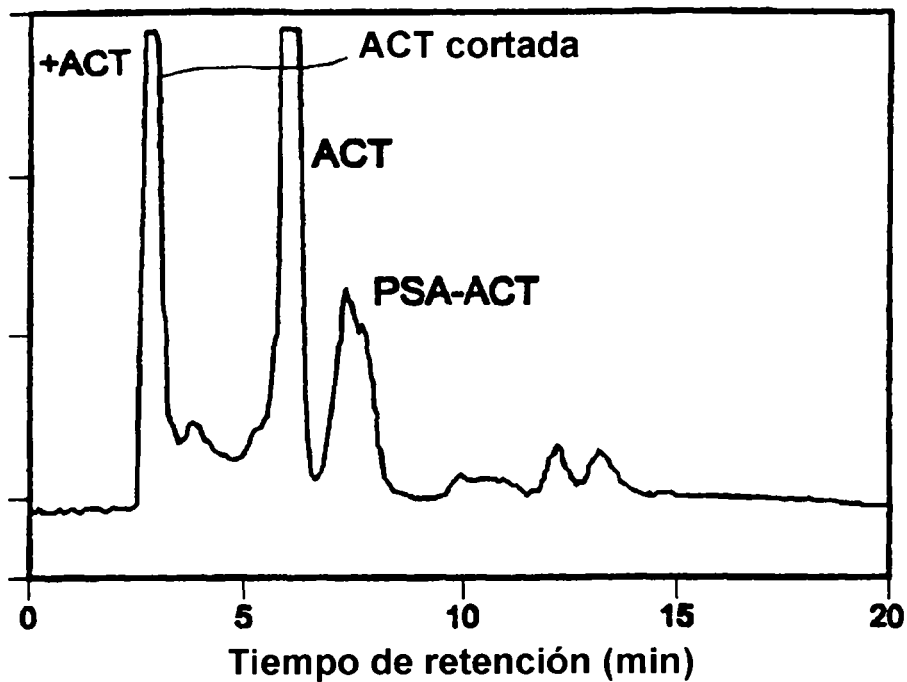


Fig. 7A

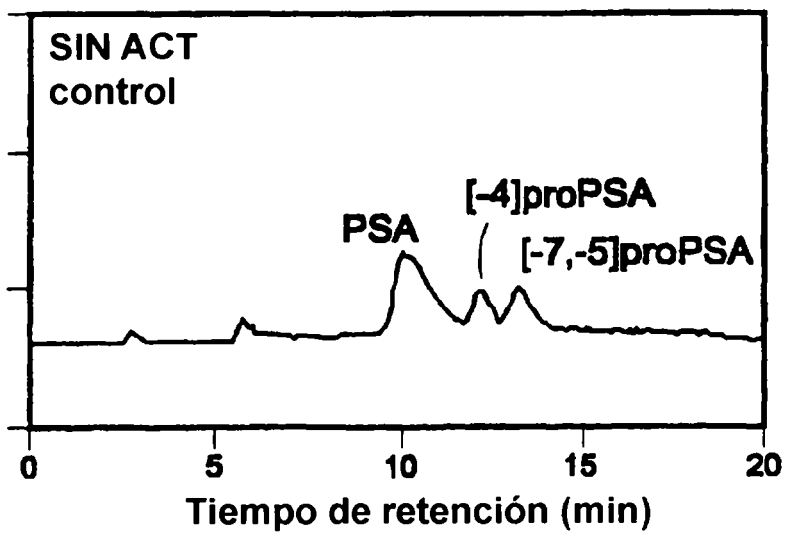


Fig. 7B

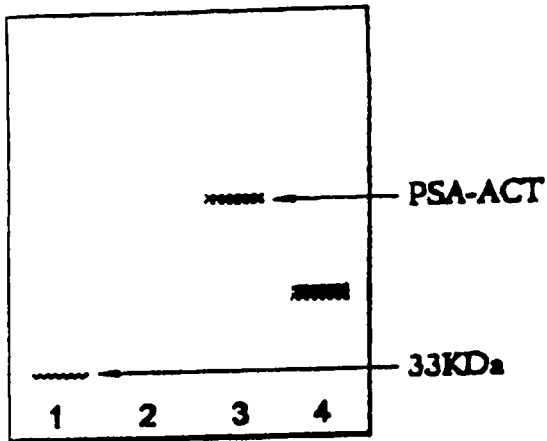


Fig. 8A

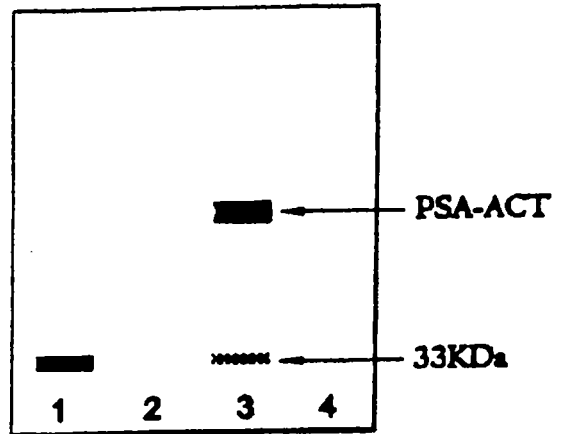


Fig. 8B

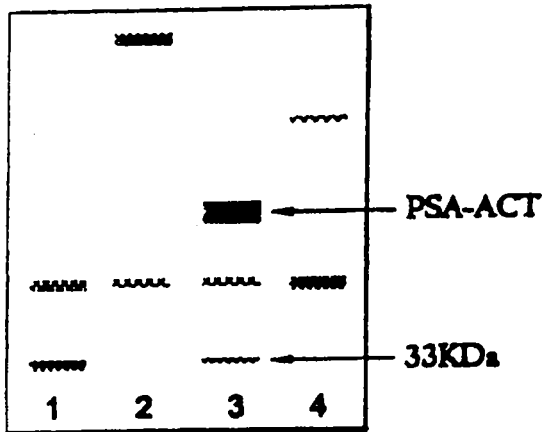


Fig. 8C

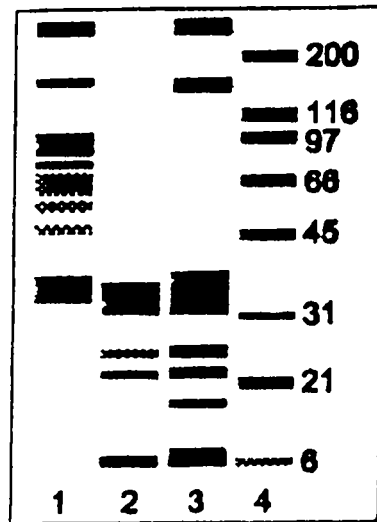


Fig. 9