



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 376**

51 Int. Cl.:
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01923782 .5**
86 Fecha de presentación : **10.04.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1272525**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Anticuerpos que reconocen específicamente el PSA libre inactivo, y sus aplicaciones.**

30 Prioridad: **10.04.2000 FR 00 04591**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **BIO MERIEUX**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile, FR

72 Inventor/es: **Charrier, Jean-Philippe;**
Jolivet-Reynaud, Colette y
Michel, Sandrine

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 269 376 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

Anticuerpos que reconocen específicamente el PSA libre inactivo, y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno específico de la próstata (o PSA, para Prostate Specific Antigen) en su forma libre inactiva, así como a los híbridos que producen tales anticuerpos.

10 La presente invención se refiere asimismo a reactivos para ensayos inmunológicos que contienen dichos anticuerpos, así como a ensayos inmunológicos que comprenden el uso de dichos reactivos.

La presente invención se refiere además a un método de diagnóstico de un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto del que se sospecha que padece tal patología.

15 La presente invención se refiere asimismo a un método de diagnóstico que permite diferenciar entre una patología benigna de la próstata y un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto en el que se sospecha que padece de una de estas enfermedades.

20 Finalmente, la presente invención se refiere al kit de diagnóstico que permite diagnosticar un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto en el que se sospecha que padece de un adenocarcinoma, o que permite diferenciar entre una patología benigna de la próstata y un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto en el que se sospecha que padece de una de estas enfermedades.

25 El PSA está producido por el epitelio glandular de la próstata humana, probablemente en forma de zimógeno inactivo (Lundwall *et al.* FEBS Lett. 1987), y se segrega en el líquido seminal en forma activa (Lilja, J. Clin Invest 1985). La actividad biológica del PSA en el líquido seminal está relacionada con su fragmentación proteolítica limitada de las proteínas predominantes segregadas mediante las vesículas seminales (Lilja, J. Clin. Invest 1985; Lilja *et al.* J. Clin Invest 1987; Mc Gee *et al.* Biol. Reprod. 1988).

30 El PSA es el principal marcador del cáncer de la próstata que afectará, a lo largo de su vida, a uno de cada seis hombres en el mundo occidental. Esta proteasa de la familia de las calicreínas, principalmente segregada mediante el epitelio prostático, se encuentra a una concentración de 0,5 a 5 mg/ml en el líquido seminal, y a una concentración un millón de veces menor en el suero de un paciente. Así, el PSA se encuentra normalmente a una concentración menor que 2,5 ng/ml en el suero. Sin embargo, esta concentración aumenta, en principio notablemente, durante un cáncer de la próstata, y moderadamente durante alteraciones benignas tales como la hipertrofia de la próstata benigna (BPH) o la prostatitis aguda.

35 Se determinó la secuencia proteica del PSA. Se trata de una glicoproteína que comprende 237 aminoácidos ("Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA", Lundwall A., Lilja H., 1987. FEBS Lett. 214: 317-322).

40 Se ha propuesto un método de diagnóstico que consiste en medir la concentración de PSA sérica y en compararla después con un valor límite que es de 4 ng/ml. Sin embargo, se constató que este método de diagnóstico lleva a sospechar falsamente de tres pacientes de cada cuatro, lo que es perjudicial. Además, este método no permite diagnosticar 30 a 45% de los casos de cánceres confinados en la glándula, lo que constituye sin embargo un estado precoz de la enfermedad potencialmente curable cuyo diagnóstico sería por lo tanto particularmente deseable. De hecho, el carácter poco satisfactorio de este método se demuestra mediante el estudio publicado en el artículo "Prostate Cancer Detection in Men UIT FERUM PSA Concentrations of 2.6 to 4.0 ng/ml and Benign Prostate Examination", Catalona *et al.* JAMA, 14 de mayo de 1997 - Vol. 277, N° 18, que muestra que el valor límite debe de ser menor que 4 ng/ml para detectar precozmente un cáncer de la próstata.

45 Por otra parte, se mostró recientemente que en el suero el PSA se asociaba con inhibidores de proteasa, tales como α -1-antiquimiotripsina (ACT), y α -2-macroglobulina (A2M). Estas asociaciones conllevan a la desactivación de la actividad quimiotripsina del PSA, tal como se demostró en el artículo "Enzymatic activity of prostate specific antigen and its reactions with ultracellular serine proteinase inhibitors" A. Christensson, C.B. Laurell, H. Lilja, 1990 Eur. J. Biochem 194: 755-763. Entonces, se propuso el uso de la relación de PSA libre a PSA total, a fin de mejorar la especificidad del diagnóstico.

50 Así, la solicitud de patente WO-A-97/12245 describe un método que permite diagnosticar un adenocarcinoma de la próstata sin biopsia. Este método consiste en medir, en el suero o en la sangre de los pacientes, la cantidad total de PSA. Si este valor está comprendido entre 2,5 y 20 ng/ml, se mide asimismo la concentración de PSA libre. Después, se calcula la relación de PSA libre a PSA total. Si esta relación es menor que 7%, el diagnóstico se orienta hacia un adenocarcinoma de la próstata.

55 Sin embargo, el uso de un límite de 7%, para el diagnóstico de un cáncer de la próstata, se discute por numerosos autores, tal como se muestra en la publicación de Lein *et al.* "Relation of free PSA/total PSA in serum for differentiating between patients with prostatic cancer and benign prostate hyperplasia: Wich cutoff should be used?". En este documento publicado en la revista Cancer Investigation, 16(1), 45-49, 1998, se demostró que es difícil, mediante esta relación, diferenciar sistemáticamente un cáncer de la próstata de una BPH.

ES 2 269 376 T3

Por estas razones, el solicitante se interesó, en una solicitud de patente WO-A-00/02052, presentada con prioridad el 3 de julio de 1998, en la presencia en el suero de formas escindidas del PSA. Las formas moleculares de PSA sérico de pacientes que padecen de cáncer o de BPH se cartografiaron mediante electroforesis bidimensional, asociada con una detección mediante quimioluminiscencia, a fin de observar el conjunto de las formas de PSA, es decir las formas libres, complejadas y escindidas.

Los perfiles de electroforesis de sueros de sujetos que padecen de adenocarcinoma de la próstata son relativamente homogéneos, presentando sustancialmente la forma no escindida del PSA, mientras que los de sujetos que padecen de BPH pueden comprender una proporción relativamente importante de forma escindida y puntos ligeramente más básicos sin forma escindida. El aumento de la relación de PSA libre sérico a PSA total sérico observada en los pacientes que padecen de BPH estaría por lo tanto esencialmente relacionado con la existencia de PSA escindido, que podría ser enzimáticamente inactivo y por lo tanto capaz de unirse al ACT, así como con la presencia de una forma de PSA libre ligeramente más básica que la forma de PSA libre activa, que podría corresponder a la forma cimógena, inactiva, del PSA.

En función de estas observaciones, se han descrito métodos de diagnóstico de adenocarcinoma de la próstata que comprenden la cuantificación, después de la separación mediante electroforesis bidimensional, del PSA escindido y/o no escindido, y el uso de estos valores a fin de establecer un diagnóstico.

Sin embargo, estos métodos necesitan la implementación de electroforesis bidimensional. Por consiguiente, son bastante caros y necesitan mucho tiempo de manipulación.

Se conocen del documento WO 98/49323 anticuerpos que reconocen específicamente la forma cimógena del PSA y su uso en métodos de diagnóstico del cáncer de la próstata.

Se ha descubierto entonces que era posible disponer de métodos de diagnóstico de adenocarcinomas de la próstata que no presentan los inconvenientes antes citados, y que disponen de una excelente especificidad y sensibilidad, mediante el uso de reactivos inmunológicos. En efecto, se ha descubierto que era posible obtener anticuerpos dirigidos específicamente contra el PSA libre inactivo. Se ha descubierto asimismo que, ventajosamente, tales anticuerpos se pueden usar especialmente en métodos de diagnóstico del cáncer de la próstata y del BPH.

Así, la presente solicitud tiene por objeto anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, siendo dichos anticuerpos policlonales purificados o anticuerpos monoclonales.

Mediante la expresión “fragmentos de anticuerpos”, se entiende, en general en la presente solicitud, cualquier fragmento de anticuerpo que haya conservado la especificidad del anticuerpo de origen, y en particular fragmentos de tipo Fab y F(ab')₂. En la presente solicitud, la palabra “anticuerpo” designa a continuación unos fragmentos de anticuerpos cuando lo permite el sentido.

Mediante la expresión “anticuerpos que se unen específicamente a una forma dada de PSA”, se designa claramente un anticuerpo que se une esencialmente a dicha forma de PSA. Por ejemplo, el producto que se encuentra unido al anticuerpo está constituido de al menos 80%, preferentemente de al menos 90%, de dicha forma de PSA.

Mediante la expresión “PSA libre inactivo”, se entiende, en la presente solicitud, una forma libre del PSA, es decir no complejada, dicho de otra forma no asociada con sus inhibidores, tales como ACT. Además, esta forma libre es inactiva. Mediante el término “inactivo” se designa una forma de PSA que presenta una actividad proteolítica (en particular de tipo quimiotrópica) claramente menor que la del PSA libre presente en el suero de sujetos sanos, por ejemplo, menor que al menos 80% o más.

La presente invención tiene especialmente por objeto anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1.

La presente invención tiene asimismo por objeto hibridomas que producen anticuerpos monoclonales tales como se definen anteriormente.

Se conoce bien la obtención de hibridomas, y no se volverá a recordar aquí. Se seleccionan los hibridomas que reconocen específicamente el PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, de la manera indicada a continuación. Se descubrió que algunos clones producían anticuerpos que, fijados a una columna de cromatografía, retenían solamente una fracción del PSA total sérico de diferentes individuos, y que esta fracción era, con algunos de estos anticuerpos, una forma libre y sensiblemente inactiva (tal como se define anteriormente) del PSA.

Por otra parte, se constató que las fracciones de PSA no retenidas mediante estos anticuerpos contenían todavía un PSA libre, y conservaban prácticamente toda la actividad proteolítica del suero de partida.

Así, se pudo obtener fracciones enriquecidas en PSA libre inactivo, que sirvieron después para ensayar sistemáticamente clones de hibridomas obtenidos como antes.

ES 2 269 376 T3

Entre los hibridomas obtenidos después de la inmunización de ratones mediante PSA de origen seminal comercializado por la compañía SCIPAC, se constató que aproximadamente 1,5% producían anticuerpos que se unen específicamente al PSA libre inactivo así obtenido.

5 La presente invención tiene asimismo por objeto un reactivo para ensayo inmunológico que contiene anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como se definen anteriormente.

10 En los reactivos según la invención, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al PSA libre inactivo se pueden usar tal cual o bien especialmente en formas fijadas a un soporte sólido y/o unidos a un marcador.

15 Se conoce bien la fijación de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos a un soporte sólido. El soporte se puede realizar con cualquier material sólido, biológico o sintético, provisto de propiedades adsorbentes o capaces de unirse a un agente de acoplamiento. Se conocen materiales, y se describen en la bibliografía. Entre los materiales sólidos capaces de unir los anticuerpos mediante adsorción, se citarán, por ejemplo, el poliestireno, polipropileno, los látex, etc. Entre los materiales que permiten unir los anticuerpos covalentemente con la ayuda de un agente de acoplamiento, se pueden citar, especialmente, el dextrano, la celulosa, etc. El soporte se puede presentar, por ejemplo, en forma de discos, tubos, perlas o placas, en particular de placas de microtitulación.

20 La unión de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a un marcador, ya sea radioactivo, enzimático, coloreado o de cualquier otro tipo comúnmente usado en técnicas inmunológicas, es bien conocida, y se describe en la bibliografía.

25 La presente invención tiene además por objeto un ensayo inmunológico para la determinación cuantitativa del PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra biológica extraída de un sujeto, en el que se pone en contacto dicha muestra con un reactivo tal como se define anteriormente, y se evalúa la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, unido a los anticuerpos del reactivo.

30 La muestra biológica extraída del sujeto es generalmente una muestra de sangre o de suero. Si se desea, puede haber sufrido una etapa de concentración o dilución previa a su puesta en contacto con el reactivo que contiene anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al PSA libre inactivo.

La cuantificación del PSA libre inactivo unido a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se puede realizar de distintas maneras bien conocidas.

35 Por ejemplo, la cantidad de PSA libre inactivo se puede evaluar mediante ensayos de tipo sándwich. Según un modo de realización particular, se pone en contacto un reactivo para un ensayo inmunológico, en el que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al PSA libre inactivo se fijan al soporte, con la muestra biológica para la que se desea determinar el contenido de PSA libre inactivo, después, tras el lavado, se pone en contacto dicho soporte con un segundo anticuerpo marcado que se une al PSA. Después de un nuevo lavado, se mide la cantidad de marcador fijado, y se deduce el contenido de PSA libre inactivo mediante comparación con una curva patrón establecida previamente.

45 Según otra forma de realización de los ensayos inmunológicos de la invención, se evalúa además la cantidad de una forma de PSA distinta de la forma libre inactiva, presente en una muestra de misma naturaleza extraída del mismo sujeto.

50 Mediante la expresión “muestra de la misma naturaleza extraída del mismo sujeto”, se entiende dos fracciones de una misma muestra, o bien dos muestras que provienen de dos extracciones distintas, pero que deben de ser de la misma naturaleza, por ejemplo muestras séricas.

Por supuesto, cuando las cantidades medidas se destinan a ser comparadas, conviene que estos valores sean comparables. En otros términos, conviene que los valores medidos se corrijan a la misma dilución o concentración eventual de la muestra, así como al mismo volumen.

55 Las formas distintas de la forma libre inactiva del PSA son, especialmente, PSA complejo, PSA libre total, PSA libre activo y PSA total, es decir el conjunto de las formas activas o inactivas, libres o complejadas, del PSA.

Se conoce la determinación de cada una de estas distintas formas, especialmente con la ayuda de anticuerpos específicos.

60 El PSA complejo se determina, por ejemplo, con la ayuda de anticuerpos descritos en la solicitud de patente WO-A-98/22509.

65 El PSA total se determina, por ejemplo, con la ayuda de anticuerpos descritos por H. Nagasaki *et al.* (1999), Clin. Chem. 45: 4486-496.

El PSA libre se determina, por ejemplo, con la ayuda de anticuerpos descritos en la Solicitud de Patente WO 92/01936, o con la ayuda de anticuerpos monoclonales comercializados por CHUGAI (Japón).

ES 2 269 376 T3

La presente invención tiene en particular por objeto un ensayo inmunológico tal como se define anteriormente, en el que se determina además el PSA libre activo. La cantidad de PSA libre activo se puede evaluar de distintas maneras.

Así, según un primer modo de realización, la cantidad de PSA libre activo se evalúa con la ayuda de anticuerpos que se unen específicamente al PSA libre activo que se pueden obtener mediante inmunización con la ayuda de fracciones de PSA total o fracciones enriquecidas en PSA libre activo. Asimismo, la cantidad de PSA libre activo se puede evaluar de manera indirecta mediante evaluación de la cantidad de PSA libre total, de la cual se resta la cantidad de PSA libre inactivo ya evaluado como antes.

La presente invención tiene además por objeto un ensayo inmunológico para determinar la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA libre total,

o la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA libre activo,

o la relación de la cantidad de PSA libre activo a la cantidad de PSA libre total,

o la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA total,

o la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA complejo,

o la relación de la cantidad de PSA libre activo a la cantidad de PSA total,

o la relación de la cantidad de PSA libre activo a la cantidad de PSA complejo,

o las inversas de estas relaciones, o combinaciones de estas relaciones,

en una muestra biológica extraída de un sujeto, en el que:

- se evalúa la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra biológica extraída de un sujeto, poniendo en contacto dicha muestra con un reactivo según la invención tal como se define anteriormente,

- se evalúa una de las cantidades seleccionadas de entre la cantidad de PSA libre activo, la cantidad de PSA libre total, la cantidad de PSA total y la cantidad de PSA complejo, en una muestra de la misma naturaleza extraída de un mismo sujeto, y

- se determina dicha relación o dicha relación inversa, o dicha combinación de relaciones.

La presente invención se refiere a distintos métodos de diagnósticos que, de manera general, se aplican a sujetos que presentan una concentración sérica de PSA superior a 2 ng/ml o a 2,5 ng/ml.

La presente invención tiene asimismo por objeto un método de diagnóstico de un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto en el que se sospecha que padece de dicho adenocarcinoma, sin practicar biopsia, en el que se implementa uno o varios ensayos inmunológicos tales como se definen aquí arriba.

En efecto, se descubrió que la concentración (por ejemplo sérica) de PSA libre inactivo es claramente más elevada en el caso de una BPH que en el caso de un adenocarcinoma de la próstata.

Por lo tanto, la invención se refiere especialmente a un método de diagnóstico de BPH o de diferenciación entre un cáncer de la próstata y una BPH, en el que se mide el contenido de PSA libre activo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra que procede de un individuo, y se compara este contenido con una escala de valores predeterminados, siendo dichos valores aquellos observados en los pacientes que padecen de una BPH reconocida, y los observados en los pacientes que padecen de un adenocarcinoma de la próstata reconocido, y se concluye, del resultado de esta comparación, que existe una BPH o bien que existe un adenocarcinoma de la próstata. Este método equivale en la práctica a comparar el valor medido con un valor límite.

Por supuesto, estas variaciones del contenido de PSA libre inactivo influyen en diferentes relaciones tales como las relaciones de la cantidad de PSA libre inactivo a la cantidad de PSA libre total o a la cantidad de PSA total. Se pueden determinar también otras relaciones, tal como se precisa a continuación.

Se sabe que, de manera general, los resultados de los ensayos inmunológicos dependen en gran medida de las características de especificidad y afinidad de los anticuerpos usados, y que estas características influyen en los valores medidos con estos anticuerpos. Por lo tanto, se entiende que no es posible dar valores límites precisos y que se pueden determinar valores límites adaptados a cada anticuerpo usado, en cada caso, mediante sencillos experimentos de rutina.

ES 2 269 376 T3

Se debe entender claramente que en la presente memoria se denomina valor límite a un valor discreto o bien a un intervalo de valores que corresponden a una zona de indeterminación. Por supuesto, cuando el valor medido se incluye en el intervalo de indeterminación, o es muy próximo al valor límite en el caso de un valor discreto, no se puede sacar una conclusión definitivamente, y conviene realizar investigaciones suplementarias.

Por supuesto, cuando se determina un valor límite para un tipo de relación dado, se puede deducir valores límites que corresponden a otros tipos de relaciones.

La presente invención tiene particularmente por objeto un método de diagnóstico tal como se ha definido anteriormente, en el que, además, se compara el valor de la relación así determinado con un valor límite predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación mayores o, respectivamente, menores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen de un adenocarcinoma de la próstata reconocido, y de manera que, a la inversa, los valores de dicha relación menores o, respectivamente, mayores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en los sujetos reconocidos como no afectados por un adenocarcinoma de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe un adenocarcinoma o que no existe un adenocarcinoma de la próstata.

La presente invención tiene asimismo por objeto un método de diagnóstico que permite diferenciar entre una patología benigna de la próstata y un adenocarcinoma de la próstata, en un sujeto en el que se sospecha que padece de una de estas enfermedades, en el que se implementa un ensayo inmunológico tal como se define anteriormente.

La presente invención tiene en particular por objeto tal método en el que, además, se compara el valor de una de las relaciones mencionadas anteriormente con un valor de diferenciación predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación que son mayores o, respectivamente, menores, que dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen una patología benigna reconocida de la próstata, y de manera que, a la inversa, los valores de dicha relación que son menores o, respectivamente, mayores, que dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en sujetos reconocidos por estar afectados por un adenocarcinoma reconocido de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe una patología benigna de la próstata o un adenocarcinoma de la próstata.

En la práctica, los valores de diferenciación son análogos a los valores límites mencionados anteriormente.

La presente invención tiene asimismo por objeto un método de diagnóstico de un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto del que se sospecha que padece de dicho adenocarcinoma, en el que:

- se determina la cantidad de PSA libre activo y la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra extraída de este sujeto,
- llegado el caso, se determina la cantidad de una forma de PSA distinta del PSA libre activo, y distinta del PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra de la misma naturaleza extraída del mismo sujeto, siendo dicha otra forma tal como se define en la reivindicación 18,
- se determina el valor de una de las siguientes relaciones:
 - relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA libre activo,
 - relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA libre total,
 - relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA total,
 - relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA complejo,

o las inversas de estas relaciones, o combinaciones de estas relaciones,

- se compara el valor de la relación así determinado con un valor límite predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación mayores o, respectivamente, menores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen de un adenocarcinoma reconocida de la próstata, y de manera que, a la inversa, los valores de dicha relación menores o, respectivamente, mayores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en sujetos reconocidos como no afectados por un adenocarcinoma de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe o que no existe un adenocarcinoma de la próstata.

ES 2 269 376 T3

La presente invención tiene además por objeto un método de diagnóstico que permite diferenciar entre una patología benigna de la próstata y un adenocarcinoma de la próstata, en un sujeto del que se sospecha que padece de una de estas enfermedades, en el que:

- 5 - se determina la cantidad de PSA libre activo y la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra extraída de este sujeto,
- llegado el caso, se determina la cantidad de una forma de PSA distinta del PSA libre activo, y distinta del PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra de la misma naturaleza
10 extraída del mismo sujeto, siendo dicha otra forma tal como se define en la reivindicación 15,
- se determina el valor de una de las siguientes relaciones:
 - 15 • relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA libre activo,
 - relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA libre total,
 - 20 • relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA total,
 - relación de la cantidad de PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, a la cantidad de PSA complejo,
 - 25 o las inversas de estas relaciones, o combinaciones de estas relaciones,
- se compara el valor de la relación así determinado con un valor de diferenciación predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación mayores o, respectivamente, menores, que dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen una patología benigna reconocida de la próstata, y de manera que, a la inversa, los valores de dicha relación menores o, respectivamente, mayores, que dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en sujetos reconocidos como afectados por un adenocarcinoma reconocido de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe una patología benigna de la próstata o que existe un adenocarcinoma de la próstata.
30
35

La presente invención tiene también por objeto un kit de diagnóstico que permite diagnosticar un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto del que se sospecha que padece dicho adenocarcinoma, o que permite diferenciar entre una patología benigna de la próstata y un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto del que se sospecha que padece una de estas enfermedades, comprendiendo dicho kit:

- 40 - anticuerpos según la invención para determinar el PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, en una muestra biológica,
- 45 - medios para determinar el PSA libre activo en una muestra biológica de la misma naturaleza, y eventualmente
- medios para determinar una forma de PSA distinta del PSA libre inactivo, tal como se define en la reivindicación 1, y distinta del PSA libre activo, en una muestra biológica de la misma naturaleza, siendo dicha
50 distinta forma tal como se define en la reivindicación 19.

Entre los medios usables en dicho kit, se usan en particular anticuerpos que se unen específicamente a la forma de PSA que se desea cuantificar.

55 Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin, sin embargo, limitarla.

Ejemplo 1

Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales

Producción de anticuerpos monoclonales que se unen al PSA

60 Se inmunizan ratones hembra BALB/c JYCo, de 4 a 6 semanas (IFFA Credo), mediante inyección intraperitoneal con 15 μ g de PSA purificado (PSA de origen seminal suministrado por SCIPAC) emulsionados con un volumen igual de adyuvante completo de Freund, seguido de cinco inyecciones de adyuvante incompleto, espaciándose las inyecciones dos semanas. Cuatro días después de la última inyección, las células del bazo se extraen y se fusionan, según el método de Köhler y Milstein, con células de la línea celular de mieloma de ratón Sp 2/0-Ag14. Después, las células se cultivan durante 12 a 14 días. Los sobrenadantes de los cultivos se recogen y después se someten a un

ES 2 269 376 T3

ensayo según un método de ELISA, en el que la fase sólida se reviste con el antígeno usado para la inmunización. Las colonias positivas, es decir, que reaccionan positivamente frente a PSA, se subclonan dos veces mediante dilución límite. Se cultivan clones seleccionados mediante ascitos, de manera conocida. La fracción IgG de cada fluido ascítico se purifica mediante cromatografía en columna de proteína A-Sefarosa 4 FF, según las instrucciones del fabricante (PHARMACIA).

Ejemplo 2

Determinación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales frente a formas libres, complejadas y totales del PSA

Se revisten placas de 96 pocillos (Nunc) con 100 μ l de una disolución que comprende 1 mg/l de PSA no complejado (suministrado por SCIPAC), de complejo PSA-ACT (suministrado por los laboratorios SCRIPPS) o de ACT (igualmente suministrado por los laboratorios SCRIPPS) en 0,05 moles/l de tampón de carbonato, pH 9,6. Después de incubar una noche a temperatura ambiente, las placas se lavan tres veces con una disolución salina tamponada con fosfato (PBS; 50 mmoles/l de tampón de fosfato, pH 7,2, 150 mmoles/l de NaCl) que contiene 0,5 ml/l de Tween 20 (PBS-T), y se bloquea durante 1 hora a 37°C con un PBS que contiene 10 g/l de extracto de leche liofilizada. Después, las placas se lavan una segunda vez con PBS-T. Se añaden a cada pocillo de cada placa 100 μ l de fluido ascítico diluido de 10^{-1} a 10^{-6} en PBS-T, y después se incuba durante una hora a 37°C. Después, las placas se lavan con PBS-T, y se añaden a cada pocillo de cada placa 100 μ l de IgG de cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories) a una dilución de 1:2000 en PBS-T que contiene 10 g/l de seroalbúmina bovina (BSA) (SIGMA). Las placas se incuban durante una hora a 37°C, y después se lavan con PBS-T.

Se añade el sustrato, una disolución de fosfato de p-nitrofenilo (SIGMA), durante 30 minutos. La actividad enzimática se bloquea con una disolución de NaOH de 1 ml/l, y se mide la absorbancia a 405 nm con un lector de placas ELISA (BioMérieux).

Así, se pudo seleccionar varios anticuerpos que reconocen el PSA libre, pero que no reconocen ni el PSA complejo, ni el ACT.

Ejemplo 3

Caracterización de la especificidad frente a formas inactivas y activas del PSA

Con el fin de continuar la caracterización de la especificidad de los anticuerpos, se preparó un PSA que presenta las características deseadas.

Así, se sintetiza un PSA mediante la línea celular LNCaP según la técnica descrita en los artículos "LNCaP Produces both putative zymogen and inactive, free form of prostate specific antigen", E. Corey *et al.*, 1998, Prostate 35:135-143, "Androgen-Sensitive human prostate cancer cell, LNCaP, Produce both N-terminally mature and truncated prostate specific antigen isoform", A. Herrala *et al.*, 1997, Eur. J. Biochem. 255:329-335, "Production of milligram concentration of free prostate specific antigen (fPSA) from LNCaP cell culture: Difference between fPSA from LNCaP cell and seminal plasma" J.T. Wu *et al.*, 1998, J. Clin. Lab. Anal. 12:6-13.

El PSA así producido mediante la línea celular LNCaP está compuesto de PSA zimógeno, de PSA enzimáticamente maduro activo, de PSA completo inactivo, así como formas escindidas o truncadas inactivas del PSA.

Además, el cultivo de la línea se realiza en presencia de suero de ternera fetal, que contiene ACT, estando así una proporción de complejo PSA-ACT igualmente presente. Este PSA de origen celular es, por lo tanto, una buena herramienta para demostrar la especificidad de reconocimiento de los distintos anticuerpos monoclonales anti-PSA libre obtenidos en el ejemplo 2.

Se cultivan células LNCaP en un medio sintético en el que se añadió suero de ternera fetal. Se reúnen los diferentes sobrenadantes de cultivo que contienen el PSA segregado, y se dividen en fracciones idénticas de 380 ml.

Se realizan inmunoabsorbentes acoplado de manera idéntica los anticuerpos monoclonales anti-PSA obtenidos en el ejemplo 2 a resina de sefarosa. Así, se forman columnas de afinidad que contienen cantidades de resina idénticas. Cada fracción de PSA celular se inmunopurifica sobre una de estas columnas de afinidad, y el PSA fijado por cada anticuerpo monoclonal se eluye de la columna, en primer lugar con una disolución ácida (glicina 0,1 M y pH 2,8), después con una disolución básica (DEA 0,1 M y pH 11). Después, los eluatos se neutralizan inmediatamente para preservar la actividad del PSA.

Se analiza el PSA contenido en las distintas fracciones obtenidas: después de haber sido cuantificado, se mide su actividad enzimática. Después, se caracterizan las distintas formas de PSA contenidas en los eluatos mediante transferencia Western tras electroforesis sobre gel de SDS-PAGE.

ES 2 269 376 T3

(i) Cantidad de PSA contenido en los eluatos

La cantidad de PSA en cada fracción ácida o básica se determina mediante un método de ELISA usando un anticuerpo policlonal anti-PSA a fin de asegurar que el PSA se determinará en su totalidad.

En la tabla 1 siguiente, se proporcionan los resultados obtenidos con 3 anticuerpos particulares, específicos de la forma libre del PSA, obtenidos en el ejemplo 2.

TABLA 1

<i>Determinación del PSA inmunopurificado con los anticuerpos monoclonales anti-PSA (fracciones "eluciones ácidas" y "eluciones básicas")</i>						
Anticuerpos monoclonales	ELUCIÓN ÁCIDA			ELUCIÓN BÁSICA		
	Concentración (µg/ml)	Volumen de fracción (ml)	Cantidad de PSA eluido (µg)	Concentración (µg/ml)	Volumen de fracción (ml)	Cantidad de PSA eluido (µg)
1	0,289	3,6	1,0	0,003	9,5	0,0
2	0,412	7,1	2,9	0,001	10,0	0,0
3	0,593	5,1	3,0	0,006	9,4	0,1
Sobrenadante celular de partida	0,061	380,0	23,2			

Los resultados de la tabla 1 muestran que el PSA se encuentra exclusivamente en las fracciones de "eluatos ácidos", y que no todos los anticuerpos monoclonales han retenido la misma cantidad de PSA.

(ii) Actividad enzimática específica del PSA purificado con la ayuda de estos anticuerpos

La actividad enzimática del PSA contenido en las fracciones de "elución ácida" se mide sobre un sustrato de tipo quimiotripsina, S-2586(MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA.HCl) obtenido de Chromogenix AB (Möln dal, Suecia). Esta actividad se determina en 60 µl de muestra, y la actividad específica se calcula a partir de la concentración determinada en el párrafo anterior.

Los resultados se proporcionan en la tabla 2 siguiente.

TABLA 2

Actividad enzimática específica del PSA celular inmunopurificado	
Anticuerpos monoclonales	Actividad específica del PSA (Δ DO/min./µg de PSA x 1000)
1	21,6
2	1,2
3	0,9
Sobrenadante celular de partida	11,6

Los resultados muestran que la actividad enzimática específica del eluato ácido obtenido con el anticuerpo anti-PSA nº 1 es dos veces más elevada que la actividad del sobrenadante celular de partida, antes de la inmunopurificación.

Dicho anticuerpo enriqueció, por lo tanto, el PSA purificado en forma enzimáticamente activa. Además, este anticuerpo nº 1 reconoce una forma libre del PSA. Por consiguiente, el anticuerpo nº 1 reconoce esencialmente la forma libre activa del PSA.

La actividad enzimática específica de los eluatos ácidos obtenidos con los anticuerpos nº 2 y 3 es muy baja. Esto muestra que estos anticuerpos han retenido esencialmente un PSA en su forma inactiva. Puesto que estos anticuerpos son específicos de una forma libre del PSA, éstos reconocen esencialmente el PSA en su forma libre inactiva.

Además, se sabe que la tripsina es capaz de transformar el PSA zimógeno en PSA enzimáticamente activo. Por esta razón, a fin de determinar si el PSA zimógeno había sido retenido, durante las operaciones de cromatografía de afinidad descritas aquí arriba, mediante los anticuerpos monoclonales anti-PSA, se midió la actividad enzimática de los "eluatos ácidos" en presencia de tripsina. La actividad específica de los eluatos, determinada con o sin tripsina,

ES 2 269 376 T3

es idéntica. Por consiguiente, los eluatos ácidos obtenidos con los anticuerpos nº 1, 2 y 3, tal como se describen aquí arriba, no contienen PSA en su forma zimógeno.

Por lo tanto, ninguno de los anticuerpos 1, 2 ó 3 reconoce la forma zimógena del PSA.

5

2) *Inmunoanálisis efectuado tras electroforesis sobre gel de SDS-PAGE*

10

Se separaron mediante electroforesis sobre gel de acrilamida en condiciones reductoras las distintas formas de PSA presentes en los eluatos que provienen de las columnas a las que se fijan los anticuerpos nº 1, 2 y 3, y se realiza la detección del PSA mediante transferencia Western con un anticuerpo monoclonal que reconoce el PSA total.

15

Las transferencias Western realizadas confirman que está presente un PSA en todas las muestras ensayadas que proceden de la elución ácida, en proporciones en correlación con las cantidades determinadas en la tabla 1, mientras que las muestras que proceden de las eluciones básicas no contenían PSA.

20

Las transferencias Western realizadas confirman igualmente que los anticuerpos nº 1, 2 y 3 no han retenido el complejo PSA-ACT. Finalmente, en comparación con el PSA obtenido según se indica en el ejemplo 3 utilizado como testigo, las eluciones ácidas contienen formas de PSA que tienen un peso molecular normal (33 kDa), e igualmente formas que tienen un menor peso molecular.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 269 376 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente al PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, siendo dichos anticuerpos anticuerpos policlonales purificados o anticuerpos monoclonales.
2. Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos según la reivindicación 1, que son anticuerpos monoclonales.
- 10 3. Hibridoma que produce anticuerpos monoclonales según la reivindicación 2.
4. Reactivo para ensayo inmunológico que contiene anticuerpos o fragmentos de anticuerpos tales como los definidos en la reivindicación 1 ó 2.
- 15 5. Reactivo para ensayo inmunológico según la reivindicación 4, en el que dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se fijan sobre un soporte y/o se unen a un marcador.
- 20 6. Ensayo inmunológico para la determinación cuantitativa del PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, en una muestra biológica extraída de un sujeto, en el que se pone en contacto dicha muestra con dicho reactivo, según la reivindicación 4 ó 5, y se evalúa la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA unido a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.
- 25 7. Ensayo inmunológico según la reivindicación 6, en el que además se evalúa la cantidad de una forma de PSA distinta de la forma libre inactiva, presente en una muestra de la misma naturaleza extraída del mismo sujeto.
8. Ensayo inmunológico según la reivindicación 7, en el que dicha forma distinta de PSA se elige entre PSA libre activo, PSA libre total, PSA complejo y PSA total.
- 30 9. Ensayo inmunológico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en el que además se determina por lo menos una relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de dicha forma distinta, o las inversas de estas relaciones, o combinaciones de estas relaciones.
- 35 10. Ensayo inmunológico según la reivindicación 9, en el que además se determina al menos una relación seleccionada de entre la relación de la cantidad de PSA libre activo a la cantidad de PSA libre total, o la relación de la cantidad de PSA libre activo a la cantidad de PSA total, o la relación de la cantidad de PSA libre activo a la cantidad de PSA complejo, o las inversas de estas relaciones, o combinaciones de estas relaciones.
- 40 11. Ensayo inmunológico según las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicha forma distinta es el PSA libre activo.
- 45 12. Método de diagnóstico de una patología benigna de la próstata o de diferenciación entre una patología benigna de la próstata y un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto, en el que se mide el contenido en PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido por PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, en una muestra que procede de dicho sujeto, mediante un ensayo inmunológico tal como se define en las reivindicaciones 6 a 11.
- 50 13. Método según la reivindicación 12, en el que además se compara dicho contenido con una escala de valores predeterminados, siendo dichos valores aquellos observados en los pacientes afectados por una patología benigna reconocida de la próstata, y aquellos observados en los pacientes que padecen un adenocarcinoma reconocido de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de esta comparación, que existe una patología benigna de la próstata o que existe un adenocarcinoma de la próstata.
- 55 14. Método según la reivindicación 12 ó 13, en el que además se compara el valor de la relación así determinada con un valor de diferenciación predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación que son superiores o, respectivamente, inferiores, a dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen una patología benigna reconocida de la próstata, y de manera que, inversamente, los valores de dicha relación que son inferiores o, respectivamente, superiores, a dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en sujetos reconocidos que padecen un adenocarcinoma de la próstata reconocido, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe una patología benigna de la próstata o que existe un adenocarcinoma de la próstata.
- 60 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que:
 - 65 - se determina la cantidad de PSA libre activo y la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, en una muestra extraída de este sujeto,

ES 2 269 376 T3

- en caso necesario, se determina la cantidad de una forma de PSA distinta del PSA libre activo y distinta del PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, en una muestra de la misma naturaleza extraída del mismo sujeto, siendo dicha forma elegida entre PSA libre total, PSA total y PSA complejo,

5

- se determina el valor de una de las relaciones siguientes:

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA libre activo,

10

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA libre total,

15

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA total,

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA complejo,

20

o las inversas de estas relaciones, o combinaciones de estas relaciones,

- se compara el valor de la relación así determinada con un valor de diferenciación predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación superiores o, respectivamente, inferiores, a dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen una patología benigna reconocida de la próstata, y de manera que, a la inversa, los valores de dicha relación menores o, respectivamente, mayores, que dicho valor de diferenciación sean representativos de los valores observados en sujetos reconocidos como afectados por un adenocarcinoma reconocido de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe una patología benigna de la próstata o un adenocarcinoma de la próstata.

25

30

16. Método de diagnóstico de un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto del que se sospecha que padece de dicho adenocarcinoma, sin realizar biopsia, en el que se implementa un ensayo inmunológico tal como se define en las reivindicaciones 6 a 11.

35

17. Método según la reivindicación 16, en el que, además, se compara el valor de la relación así determinada con un valor límite predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación mayores o, respectivamente, menores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen un adenocarcinoma reconocido de la próstata, y de manera que, a la inversa, los valores de dicha relación menores o, respectivamente, mayores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en sujetos reconocidos que no padecen un adenocarcinoma de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe o no un adenocarcinoma de la próstata.

40

18. Método según la reivindicación 16 ó 17, en el que:

45

- se determina la cantidad de PSA libre activo y la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, en una muestra extraída de este sujeto,

50

- llegado el caso, se determina la cantidad de una forma de PSA distinta del PSA libre activo y distinta del PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, en una muestra de la misma naturaleza extraída del mismo sujeto, siendo dicha forma elegida entre PSA libre total, PSA total y PSA complejo,

55

- se determina el valor de una de las siguientes relaciones:

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA libre activo,

60

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA libre total,

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA total,

65

• la relación de la cantidad de PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, a la cantidad de PSA complejo,

o las inversas de estas relaciones, o combinaciones de estas relaciones,

ES 2 269 376 T3

- se compara el valor de la relación así determinada con un valor límite predeterminado elegido, dependiendo del tipo de relación usada, de manera que los valores de dicha relación mayores o, respectivamente, menores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en los pacientes que padecen un adenocarcinoma reconocido de la próstata, y de manera que, a la inversa, los valores de dicha relación menores o, respectivamente, mayores, que dicho valor límite sean representativos de los valores observados en sujetos reconocidos que no padecen un adenocarcinoma de la próstata, y se concluye, a partir del resultado de dicha comparación, que existe o no un adenocarcinoma de la próstata.

19. Kit de diagnóstico que permite diagnosticar un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto del que se sospecha que padece dicho adenocarcinoma, o que permite diferenciar entre una patología benigna de la próstata y un adenocarcinoma de la próstata en un sujeto del que se sospecha que padece una de estas enfermedades, comprendiendo dicho kit:

- anticuerpos tales como se definen en la reivindicación 1 ó 2 para determinar el PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, en una muestra biológica, y/o
- medios para determinar el PSA libre activo en una muestra biológica de la misma naturaleza, y eventualmente
- medios para determinar una forma de PSA distinta del PSA libre inactivo, estando dicho PSA libre inactivo constituido de PSA libre inactivo escindido y de la forma zimógena del PSA, y distinta del PSA libre activo, en una muestra biológica de la misma naturaleza, seleccionada de entre PSA libre total, PSA total y PSA complejo.

20. Kit según la reivindicación 19, en el que dichos medios son anticuerpos.