



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1272525 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 16/30 (2006.01) **G01N 33/574** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.04.10**

(30) Prioridade(s): **2000.04.10 FR 0004591**

(43) Data de publicação do pedido: **2003.01.08**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.08.16**
012/2006

(73) Titular(es):

BIO MERIEUX

F-69280 MARCY-L ETOILE

FR

(72) Inventor(es):

JEAN-PHILIPPE CHARRIER

COLETTE JOLIVET-REYNAUD

SANDRINE MICHEL

FR

FR

FR

(74) Mandatário:

MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA

RUA ARCO DA CONCEIÇÃO, N.º 3, 1º ANDAR 1100-028

LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPO QUE RECONHECE ESPECIFICAMENTE O PSA LIVRE INACTIVO, E SUA APLICAÇÕES**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

ANTICORPO QUE RECONHECE ESPECIFICAMENTE O PSA LIVRE INACTIVO, E SUAS APLICAÇÕES

A presente invenção refere-se a anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno específico da próstata (ou PSA, de Prostate Specific Antigen) sob a forma livre inactiva, assim como aos hibridomas que produzem tais anticorpos.

A presente invenção refere-se igualmente a reactivos para testes imunológicos compreendendo a utilização de tais reactivos.

A presente invenção refere-se entre outros a um método de diagnóstico de um adenocarcinoma da próstata num indivíduo que se suspeite estar atingido por tal patologia.

A presente invenção refere-se igualmente a um método de diagnóstico que permite diferenciar entre uma patologia benigna da próstata e um adenocarcinoma da próstata num indivíduo que se suspeite estar atingido por uma destas patologias.

A presente invenção refere-se finalmente ao *kit* de diagnóstico que permite diagnosticar um adenocarcinoma da próstata num indivíduo que se suspeite estar atingido por um adenocarcinoma ou que permite diferenciar entre uma patologia benigna da próstata e um adenocarcinoma da próstata num indivíduo que se suspeite estar atingido por uma destas patologias.

O PSA é produzido pelo epitélio glandular da próstata humana, provavelmente sob uma forma de zimogénio activa (Lundwal et al. FEBS Lett 1987), e é secretado no líquido seminal na sua forma activa (Lilja, J. Clin. Invest. 1985). A actividade biológica do PSA no líquido seminal está ligada à sua fragmentação proteolítica limitada das proteínas predominantes secretadas pelas vesículas seminais (Lilja, J. Clin. Invest. 1985; Lilja et al. J. Clin. Invest. 1987; McGee et al. Biol. reprod. 1988).

O PAS é o marcador do cancro da próstata principal que afectará, ao longo da sua vida, um homem em seis no Ocidente. Esta protease da família das **kallikréines**, principalmente secretada pelo epitélio prostático, encontra-se numa concentração de 0,5 a 5 mg/mL no líquido seminal e a uma concentração de um milhão de vezes mais baixa no soro de um paciente. Assim, o PSA encontra-se normalmente numa concentração inferior a 2,5 ng/mL no soro. No entanto, esta concentração aumenta em princípio especialmente aquando de um cancro da próstata e moderadamente aquando de alterações benignas tais como a hipertrofia benigna da próstata (BPH) ou a prostatite aguda.

A sequência protéica do PSA foi determinada. Trata-se de uma glicoproteína compreendendo 237 aminoácidos ("Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA", Lundwall A., Lilja H., 1987, *FEBS Lett* 214: 317-322).

Foi proposto um método de diagnóstico que consiste em medir a concentração de PSA sérica e compará-la com um valor alvo que é de 4 ng/mL. No entanto, constatou-se que este método de diagnóstico conduz em suspeitar erradamente cerca de três pacientes em cada quatro o que é prejudicial. Além disso,

este método não permite diagnosticar 30 a 45% dos casos de cancros confinados à glândula, o que constitui no entanto um estado precoce da doença potencialmente curável e cujo diagnóstico seria particularmente desejável. O carácter pouco satisfatório deste método é por outro lado mostrado pelo estudo apresentado no artigo "Prostate Cancer Detection in Men With Serum PSA Concentrations of 2.6 to 4.0 ng/ml and Benign Prostate Examination", Catalona et al., JAMA, 14 de Maio de 1997 - Vol. 277, No. 18, que mostra que o valor alvo deve ser inferior a 4 ng/mL para despistar precocemente um cancro da próstata.

Por outro lado, mostrou-se recentemente que no soro, o PSA se associava a inibidores de protease, tais como a α -antiquimotripsina (ACT), e a α -2 macroglobulina (A2M). Estas associações envolvem a inactivação da actividade de quimotripsina da PSA, como foi demonstrado no artigo "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. A utilização da razão PSA livre em relação ao PSA total foi então proposta para melhorar a especificidade do diagnóstico.

Deste modo, o pedido de patente WO-A-97/12245 descreve um método que permite diagnosticar um adenocarcinoma da próstata sem biópsia. Este método consiste em medir, no soro ou no sangue dos pacientes, a quantidade total de PSA. Se este valor estiver compreendido entre 2,5 e 20 ng/mL, mede-se igualmente a concentração de PSA livre. Calcula-se de seguida a razão PSA livre sobre PSA total. Se esta razão for inferior a 7%, o diagnóstico orienta-se na direcção de um adenocarcinoma da próstata.

No entanto, a utilização de um alvo a 7%, para o diagnóstico de um cancro da próstata, é contestado por vários autores, como mostra a publicação de Lein et al. "Relation of free PSA/total PSA in serum for differentiating between patients with prostatic cancer and benign prostate hyperplasia: which cutoff should be used?". Nesse documento, publicado na revista Cancer Investigation, 16(1), 45-49, 1998, mostrou-se que é difícil, com base nesta razão, diferenciar sistematicamente um cancro da próstata de uma BPH.

Por estes motivos, o requerente interessou-se num pedido de patente WO-A-00/02052, registado com prioridade de 3 de Julho de 1998, pela presença no soro da forma clivada do PSA. As formas moleculares de PSA sérica de pacientes atingidos por cancro ou BPH foram cartografados por electroforese bidimensional, associada a uma detecção por quimioluminescência, de modo a se observar o conjunto das formas de PSA, ou seja, as formas livres, complexadas e clivadas.

Os perfis de electroforese de soros de indivíduos que sofrem de um adenocarcinoma da próstata são relativamente homogéneos, apresentando essencialmente a forma não clivada do PSA, enquanto que aqueles dos indivíduos que sofrem de BPH podem comportar uma proporção relativamente importante da forma clivada e **spots** ligeiramente mais básicos sem forma clivada. O aumento da razão PSA livre sérico em relação ao PSA total sérico observado em pacientes que sofrem de BPH seria então essencialmente devido à existência de PSA clivado, que poderia ser enzimaticamente inactivo e então incapaz de se ligar à ACT assim como à presença de uma forma de PSA livre ligeiramente mais básica que a forma de PSA

livre activa, que poderia corresponder à forma de zimogénio, inactiva, do PSA.

Em função destas observações, o requerente descreveu métodos de diagnóstico de adenocarcinoma da próstata compreendendo a quantificação, após separação por electroforese bidimensional, do PSA livre clivado e/ou não clivado e a utilização destes valores de modo a estabelecer um diagnóstico.

No entanto, estes métodos requerem a utilização de electroforese bidimensional. São por conseguinte relativamente caras e necessitam de bastante tempo de manipulação.

De WO 98/49323 conhecem-se anticorpos que reconhecem especificamente a forma de zimogénio do PSA e a sua utilização em métodos de diagnóstico do cancro da próstata.

Descobriu-se agora que era possível dispor de métodos de diagnóstico de adenocarcinomas da próstata que não apresentam os inconvenientes citados anteriormente e que dispõem de uma especificidade e sensibilidade excelentes através da utilização de reactivos imunológicos. Com efeito, descobriu-se que é possível obter anticorpos dirigidos especificamente contra o PSA livre inactivo. Descobriu-se igualmente que tais anticorpos podem ser vantajosamente utilizados especialmente em métodos de diagnóstico do cancro da próstata e da BPH.

O presente pedido tem então como objectivo anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente ao PSA livre inactivo, tal como definido na reivindicação 1, sendo

os referidos anticorpos anticorpos policlonais purificados ou anticorpos monoclonais.

Por fragmentos de anticorpos, entende-se em geral no presente pedido, qualquer fragmento de anticorpo tendo conservado a especificidade do anticorpo de origem e em particular dos fragmentos de tipo Fab e $F(ab')_2$. No presente pedido, o termo "anticorpo" designa no que se segue igualmente os fragmentos de anticorpos desde que apropriado.

Pela "expressão anticorpos que se ligam especificamente a uma dada forma de PSA", designa-se naturalmente um anticorpo que se liga essencialmente à referida forma de PSA. Por exemplo, o produto que se encontra ligado ao anticorpo é constituído por pelo menos 80% e de preferência por pelo menos 90%, da referida forma de PSA.

Por "PSA livre inactivo", entende-se no presente pedido uma forma livre do PSA, ou seja não complexada, dito de outro modo não associada aos seus inibidores tais como o ACT. Ainda, esta forma livre é inactiva. Pelo termo "inactivo", designa-se uma forma de PSA que apresenta uma actividade proteolítica (em particular do tipo quimotripsina) claramente inferior à do PSA livre presente no soro de indivíduos sãos, por exemplo inferior em pelo menos 80% ou **davantage**.

A presente invenção tem especialmente como objecto anticorpos ou fragmentos de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente ao PSA livre inactivo, tal como definido na reivindicação 1.

A presente invenção tem igualmente como objecto hibridomas que produzem anticorpos monoclonais tais como definidos anteriormente.

A obtenção de hibridomas é bem conhecida e não será aqui recordada. Seleccionam-se os hibridomas que reconhecem especificamente o PSA livre inactivo, tal como definido na reivindicação 1, como indicado de seguida. Descobriu-se que certos clones produziam anticorpos que, fixados numa coluna de cromatografia, apenas retêm uma fracção do PSA sérico total de diferentes indivíduos, e que esta fracção era, com alguns destes anticorpos, uma forma livre e sensivelmente activa (tal como definido anteriormente) do PSA.

Por outro lado, constatou-se que as fracções de PSA não retidas por estes anticorpos continha ainda PSA livre e tinha conservado praticamente toda a actividade proteolítica do soro de partida.

Consegui-se assim obter fracções enriquecidas em PSA livre inactivo que serviram de seguida para testar sistematicamente clones de hibridomas obtidos como anteriormente.

Entre os hibridomas obtidos após imunização de ratinhos com PSA de origem seminal comercializado pela sociedade SCIPAC, constatou-se que cerca de 1,5% produziam os anticorpos que se ligam especificamente ao PSA livre inactivo assim obtido.

A presente invenção tem igualmente como objecto um reactivo para teste imunológico contendo anticorpos ou fragmentos de anticorpos tais como definidos anteriormente.

Nos reactivos de acordo com a invenção, os anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente ao PSA livre inactivo podem ser utilizados tal qual ou ainda especialmente sob uma forma fixados num suporte sólido e/ou ligados a um marcador.

A fixação de anticorpos ou de fragmentos de anticorpos num suporte sólido é bem conhecida. O suporte pode ser realizado com qualquer material sólido, biológico ou sintético, dotado de propriedades adsorventes ou capazes de fixar um agente de ligação. São conhecidos materiais e descritos na literatura. Entre os materiais sólidos capazes de fixar os anticorpos por adsorção, citar-se-á por exemplo o poliestireno, o polipropileno, os látexes, etc. Entre os materiais que permitem fixar os anticorpos por covalência com auxílio de um agente de acoplamento, pode-se citar especialmente o dextrano, a celulose, etc. O suporte pode-se apresentar, por exemplo, sob a forma de discos, de tubos, de esferas ou de placas, em particularmente em placas de microtitulação.

A ligação de um anticorpo ou de um fragmento de anticorpo a um marcador, quer seja radioactivo, enzimático, corado ou de qualquer outro tipo convencionalmente utilizado em técnicas imunológicas, é bem conhecida e descrita na literatura.

A presente invenção tem entre outros como objecto um teste imunológico para a determinação quantitativa do PSA livre inactivo, tal como definido na reivindicação 1, numa amostra biológica recolhida num indivíduo, no qual se põe em contacto a referida amostra com um reactivo tal como definido anteriormente e avalia-se a quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, ligada aos anticorpos do reactivo.

A amostra biológica recolhida no indivíduo, é geralmente uma amostra de sangue ou de soro. Se tal for desejado, pode-se naturalmente ter percorrido uma etapa de concentração ou de diluição prévia ao seu contacto com o reactivo contendo anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente ao PSA livre inactivo.

A quantificação do PSA livre ligado aos referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpos pode ser realizada de diferentes modos bem conhecidos.

Por exemplo, a quantidade de PSA livre inactivo pode ser avaliada por testes do tipo sanduiche. Segundo um modo de realização particular, coloca-se em contacto um reactivo para teste imunológico, no qual os anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente ao PSA livre inactivo são fixados ao suporte, com a amostra biológica cujo teor em PSA livre inactivo se pretende determinar , e depois após lavagem coloca-se o referido suporte em contacto com um segundo anticorpo marcado que se liga ao PSA. Após uma nova lavagem, mede-se a quantidade de marcador fixado e deduz-se o teor em PSA livre inactivo por comparação com uma curva de calibração previamente estabelecida.

Segundo um outro modo de realização dos testes imunológicos da invenção, avalia-se entre outros a quantidade de uma forma de PSA que não a forma livre inactiva presente numa amostra da mesma natureza recolhida no mesmo indivíduo.

Pela expressão "amostra da mesma natureza recolhida no mesmo indivíduo", entende-se ou duas fracções de uma mesma recolha, ou duas amostras provenientes de duas recolhas diferentes mas

que devem ser da mesma natureza, por exemplo, amostras séricas.

Naturalmente, quando as quantidades medidas destinam-se a ser comparadas, é conveniente que estes valores sejam comparáveis. Por outros termos, é conveniente que os valores medidos sejam referentes a uma mesma diluição ou concentração eventual da amostra assim como a um mesmo volume.

As outras formas para além da forma livre inactiva do PSA são especialmente o PSA complexado, o PSA livre total, o PSA livre activo e o PSA total, ou seja, o conjunto das formas activas ou inactivas livres ou complexadas, do PSA.

É conhecida a dosagem de cada uma destas formas diferentes especialmente com auxílio de anticorpos específicos.

O PSA complexado é doseado, por exemplo, com o auxílio de anticorpos descritos no pedido de patente WO-A-98/22509.

O PSA total é doseado, por exemplo, com o auxílio de anticorpos descritos por H. Nagasaki et al. (1999), Clin. Chem. 45: 4486-496.

O PSA livre é doseado por exemplo com o auxílio de anticorpos descritos no pedido de patente 92/01936, ou o auxílio de anticorpos monoclonais comercializados por CHUGAI (Japão).

A presente invenção tem em particular como objecto um teste imunológico tal como definido anteriormente no qual se doseia, entre outros, o PSA livre activo. A quantidade de PSA livre activo pode ser avaliada de diferentes maneiras.

Deste modo, segundo um primeiro modo de realização, a quantidade de PSA livre activo é avaliada com auxílio de anticorpos que se ligam especificamente ao PSA livre activo que podem ser obtidos através da imunização com auxílio de fracções de PSA total ou de fracções enriquecidas em PSA livre activo. A quantidade de PSA livre activo põe ser igualmente avaliada de modo indirecto por avaliação da quantidade de PSA livre total, da qual subtrai a quantidade de PSA livre inactivo já avaliada como anteriormente.

A presente invenção tem, entre outros, como objecto um teste imunológico para determinar a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definida na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA livre total,

ou a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA livre activo,

ou a razão da quantidade de PSA livre activo, em relação à quantidade de PSA livre total,

ou a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA total,

ou a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA complexado,

ou a razão da quantidade de PSA livre activo, em relação à quantidade de PSA total,

ou a razão da quantidade de PSA livre activo, em relação à quantidade de PSA complexado,

ou os inversos destas razões, ou combinações destas razões, numa amostra biológica recolhida num indivíduo, na qual:

- se avalia a quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, numa amostra biológica recolhida num indivíduo, colocando a referida amostra em contacto com um reactivo de acordo com a invenção tal como definido anteriormente,
- avalia-se uma das quantidades escolhidas entre a quantidade de PSA livre activo, a quantidade de PSA livre total, a quantidade de PSA total e a quantidade de PSA complexado, numa amostra da mesma natureza recolhida no mesmo indivíduo, e
- determina-se a referida razão ou a referida razão inversa, ou a referida combinação de razões.

A presente invenção refere-se a diferentes métodos de diagnóstico que, de modo geral, se aplicam a indivíduos que apresentam uma concentração serica de PSA superior a 2 ng/mL ou a 2,5 ng/mL.

A presente invenção tem igualmente como objecto um método de diagnóstico de um adenocarcinoma da próstata num indivíduo suspeito de estar atingido pelo referido adenocarcinoma, sem praticar biópsia, no qual se utiliza um ou vários testes imunológicos tais como definidos abaixo.

Descobriu-se com efeito que a concentração (por exemplo sérica) em PSA livre inactivo é nitidamente mais elevada no caso de uma BPH do que naquele de um adenocarcinoma da próstata.

A invenção refere-se então especialmente a um método de diagnóstico da BPH ou de diferenciação entre um cancro da próstata e um BPH, na qual se mede o teor em PSA livre

inactivo, tal como definido na reivindicação 1, numa amostra proveniente de um indivíduo, e compara-se este teor a uma escala de valores predeterminados, sendo os referidos valores aqueles observados nos pacientes afectados por uma BPH reconhecida e aqueles observados nos pacientes afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e conclui-se do resultado desta comparação seja a presença de uma BPH, seja a presença de um adenocarcinoma da próstata. Este método resume-se na prática à comparação do valor medido a um valor-alvo.

Naturalmente, estas variações do teor de PSA livre inactivo influenciam diferentes razões tais como razões da quantidade de PSA livre inactivo em relação à quantidade de PSA livre total. Pode-se ainda determinar outras razões, como aquela precisada de seguida.

Sabe-se que, de modo geral, os resultados dos testes imunológicos dependem no entanto em grande parte das características de especificidade e de afinidade dos anticorpos utilizados, e que estas características influenciam os valores medidos com estes anticorpos. Concebe-se então que não é possível fornecer valores alvo precisos e que podem ser determinados valores alvo adaptados a cada anticorpo utilizado em cada caso através de experiências simples de rotina.

É necessário compreender bem que aqui se denomina de valor alvo quer um valor discreto quer um intervalo de valores correspondente a uma zona de indeterminação. Naturalmente, quando o valor determinado está incluído no intervalo de indeterminação ou se estiver muito próximo do valor alvo no caso de um valor discreto, não se pode concluir

definitivamente e convém conduzir investigações suplementares.

Naturalmente, quando se determinou um valor alvo para um dado tipo de razão, podem-se deduzir valores alvo correspondentes a outros tipos de razões.

A presente invenção tem especialmente como objecto um método de diagnóstico tal como definido anteriormente, no qual, entre outros, se compara o valor da razão assim determinado com o valor alvo predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizada, de modo a que os valores observados nos pacientes afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e de modo que inversamente os valores da referida relação inferiores ou, respectivamente, superiores ao referido valor alvo sejam representativos dos valores observados nos indivíduos reconhecidos como não estando afectados por um adenocarcinoma da próstata, e conclui-se do resultado da referida comparação seja a presença seja a ausência de um adenocarcinoma da próstata.

A presente invenção tem igualmente como objecto um método de diagnóstico que permite diferenciar entre uma patologia benigna da próstata e um adenocarcinoma da próstata, num indivíduo que se suspeite estar atingido por uma destas doenças no qual se realiza um teste imunológico tal como definido anteriormente.

A presente invenção tem em particular como objecto um tal método no qual, entre outros, se compara o valor de uma das razões mencionadas anteriormente com um valor de diferenciação predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizado, de modo que os valores da referida razão que

sejam superiores, ou respectivamente, inferiores ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados nos pacientes afectados por uma patologia benigna da próstata reconhecida, e de modo inverso que os valores da referida razão que sejam inferiores ou, respectivamente, superiores, ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados em indivíduos reconhecidos como estando afectados pelo adenocarcinoma da próstata reconhecido, e conclui-se do resultado da referida comparação ou da presença de uma patologia benigna da próstata ou a presença de um adenocarcinoma da próstata.

Na prática, os valores de diferenciação são análogos aos valores alvo discutidos acima.

A presente invenção tem ainda como objecto um método de diagnóstico de um adenocarcinoma da próstata num indivíduo que se suspeite estar atingido pelo referido adenocarcinoma, no qual:

- se determina a quantidade de PSA livre activo e a quantidade de PSA livre inactivo tal como definida na reivindicação 1, numa amostra recolhida desse indivíduo,
- neste caso, determina-se a quantidade de uma forma de PSA diferente do PSA livre activo e diferente do PSA livre inactivo tal como definida na reivindicação 1, numa amostra da mesma natureza recolhida do mesmo indivíduo, sendo a referida outra forma tal como definida na reivindicação 18.
- determina-se o valor de uma das seguintes razões:

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA livre activo,

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA livre total,

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA total,

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA complexado,

ou os inversos destas razões, ou combinações destas razões,

- compara-se o valor da razão assim determinada com um valor alvo predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizado, de modo que os valores da referida razão sejam superiores ou, respectivamente inferiores ao referido valor alvo sejam representativos dos valores observados em pacientes afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e de modo que inversamente os valores da referida razão inferiores ou, respectivamente, superiores ao referido valor alvo sejam representativos dos valores observados em indivíduos reconhecidos como não estando afectados por um adenocarcinoma da próstata e que se conclui do resultado da referida comparação seja da presença ou da ausência de um adenocarcinoma da próstata.

A presente invenção tem, entre outros, como objectivo um método de diagnóstico que permite diferenciar entre uma patologia benigna da próstata e um adenocarcinoma da

próstata, num indivíduo suspeito de estar atingido por uma destas doenças, no qual:

- se determina a quantidade de PSA livre activo e a quantidade de PSA livre inactivo tal como definida na reivindicação 1, numa amostra recolhida desse indivíduo,

- neste caso, determina-se a quantidade de uma forma de PSA diferente do PSA livre activo e diferente do PSA livre inactivo tal como definida na reivindicação 1, numa amostra da mesma natureza recolhida do mesmo indivíduo, sendo a referida outra forma tal como definida na reivindicação 15,

- determina-se o valor de uma das seguintes razões:

- * a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA livre activo,

- * a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA livre total,

- * a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA total,

- * a razão da quantidade de PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, em relação à quantidade de PSA complexado,

ou os inversos destas razões, ou combinações destas razões,

- compara-se o valor da razão assim determinada com um valor alvo predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizado, de modo que os valores da referida razão sejam

superiores ou, respectivamente inferiores ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados em pacientes afectados por uma patologia benigna da próstata reconhecida, e de modo que inversamente os valores da referida razão que sejam inferiores ou, respectivamente, superiores ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados em indivíduos reconhecidos como estando afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e que se conclui do resultado da referida comparação seja da presença de uma patologia benigna da próstata, seja da presença de um adenocarcinoma da próstata.

A presente invenção tem ainda como objecto um *kit* de diagnóstico que permite diagnosticar um adenocarcinoma da próstata num indivíduo suspeito de estar atingido pelo referido adenocarcinoma, ou permitindo diferenciar entre uma patologia benigna da próstata e um adenocarcinoma da próstata num indivíduo suspeito de estar atingido por uma destas doenças, compreendendo o referido *kit*:

- anticorpos de acordo com a invenção para dosear o PSA livre inactivo tal como definido na reivindicação 1, numa amostra biológica,
- meios para dosear o PSA livre activo numa amostra biológica da mesma natureza, e eventualmente
- meios para dosear uma forma de PSA diferente do PSA livre inactivo, tal como definido na reivindicação 1, e diferente do PSA livre activo numa amostra biológica da mesma natureza, sendo a referida outra forma tal como definida na reivindicação 19.

Entre os modos utilizáveis no referido *kit*, utiliza-se em particular anticorpos que se ligam especificamente à forma de PSA que se pretende quantificar.

Os exemplos seguintes ilustram a invenção sem no entanto a limitar.

Exemplo 1: Produção e caracterização de anticorpos monoclonais

Produção de anticorpos monoclonais que se ligam à PSA

Imunizam-se ratinhos fêmea BALB/c JYCo, com 4 a 6 semanas de idade (IFFA Credo) por injeção intraperitoneal com 15 µg de PSA purificado (PSA de origem seminal fornecido por SCIPAC) emulsificados com um volume idêntico de adjuvante completo de Freund, seguida por cinco injeções de adjuvante incompleto, sendo as injeções espaçadas de duas semanas. Quatro dias após a última injeção, as células do ratinho são recolhidas e **fusionées**, segundo o método de Köhler e Milstein, com células da linha celular de mieloma de ratinho Sp 2/0-Ag14. Depois, estas células são colocadas em cultura durante 12 a 14 dias. Os sobrenadantes das culturas são recuperados e depois submetidos a um teste segundo um método ELISA no qual a fase sólida é revestida com o antígeno utilizado para a imunização. As colónias positivas, ou seja, que reagem positivamente em relação ao PSA, são sub-clonadas duas vezes por **diluição limite**. Clutiva-se os clones seleccionados em **ascites** do modo convencional. A fracção IgG de cada fluido ascítico é purificada por cromatografia em coluna de proteína A-Sepharose 4 FF, segundo as instruções do fabricante (PHARMACIA).

Exemplo 2: Determinação da especificidade dos anticorpos monoclonais em relação à forma livre, complexada e total do PSA

Revestem-se placas de 96 poços (Nunc) com 100 µL de uma solução compreendendo 1 mg/L de PSA não complexado (fornecido por SCIPAC), de complexo PSA-ACT (fornecido pelos laboratórios SCRIPPS) ou de ACT (igualmente fornecido pelos laboratórios SCRIPPS) em 0,05 mmol/L de tampão carbonato, pH 9,6. Após incubação durante uma noite à temperatura ambiente, as placas são lavadas três vezes com uma solução salina tamponizada com fosfato (PBS; 50 mmol/L de tampão fosfato, pH 7,2, 150 mmol/L NaCl) contendo 0,5 mL/L de Tween 20 (PBS-T), e bloqueada durante 1 hora a 37°C com PBS contendo 10 g/L de extracto de leite liofilizado. Depois as placas são lavadas uma segunda vez com PBS-T. Adiciona-se em cada poço de cada placa 100 µL de fluido ascítico diluído de 10^{-1} a 10^{-6} em PBS-T, e depois incuba-se durante uma hora a 37°C. Lava-se de seguida as placas com PBS-T, e adiciona-se em cada poço de cada placa 100 µL de IgG de cabra anti-ratinho conjugado com fosfatase alcalina (Jackson ImunoResearch Laboratoris) com uma diluição de 1:2000 em PBS-T contendo 10 g/L de albumina sérica bovina (BSA); (SIGMA). Incuba-se as placas durante uma hora a 37°C e depois lavam-se com PBS-T.

O substrato, uma solução de p-nitrofeni-fosfato (SIGMA) é adicionado durante 30 minutos. A actividade enzimática é bloqueada com uma solução de NaOH a 1 mol/L e a absorvância é medida a 405 nm com um leitor de placas ELISA (BioMérieux).

Pode-se assim seleccionar vários anticorpos que reconhecem o PSA livre, mas que não reconhecem nem o PSA complexado, nem o ACT.

Exemplo 3: Comparação da especificidade em relação às formas inactiva e activa do PSA

De modo a se prosseguir a caracterização da especificidade dos anticorpos, preparou-se PSA que apresenta as características desejadas.

Assim, realizou-se a síntese de PSA através da linha celular LNCaP segundo a técnica descrita nos artigos "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, produces both N-terminally mature and truncated prostate specific antigen isoform", A. Herrala et al., 1997, Eur. J. Biochem. 255: 329-335, e "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.

O PSA assim produzido pela linha celular LNCaP é composto de PSA na forma de zimogénio, de PSA **maturo** enzimaticamente activo, de PSA inteiro inactivo assim como de formas clivadas ou truncadas inactivas de PSA.

Além disso, a cultura da linha celular é realizada na presença de soro fetal bovino, que contém ACT, estando igualmente presente uma proporção do complexo PSA-ACT. Este PSA de origem celular é então uma boa ferramenta para evidenciar a especificidade de reconhecimento dos diferentes anticorpos monoclonais anti-PSA livre obtidos no exemplo 2.

São cultivadas células LNCaP num meio sintético ao qual se juntou soro fetal bovino. Os diferentes sobrenadantes de cultura contendo o PSA secretado são reunidos, divididos em fracções idênticas de 380 mL.

Realizam-se imunoabrorventes através do acoplamento de modo idêntico de anticorpos monoclonais anti-PSA obtidos no exemplo 2 num aresina de Sepharose. Formam-se assim colunas de afinidade contendo quantidades de esina idênticas. Cada fracção de PSA celular é imunopurificada numa destas colunas de afinidade, e o PSA fixado por cada anticorpo monoclonal é eluído da coluna, primeiro através de uma solução ácida (glicina 0,1 M e pH 2,8), depois por uma solução básica (DEA 0,1 M e pH 11). Os eluatos são de seguida imediatamente neutralizados para preservar a actividade do PSA.

O PSA contido nas diferentes fracções obtidas é analisado: após se ter quantificado, a sua actividade enzimática é medida. Depois, as diferentes formas de PSA contidas nos eluatos são caracterizadas por Western Blot após electroforese em gel de SDS-PAGE.

(i) Quantidade de PSA contida nos eluatos

A quantidade de PSA em cada fracção ácida ou básica é determinada por um método ELISA utilizando um anticorpo policlonal anti-PSA de modo a assegurar que o PSA será doseado na sua totalidade.

Na tabela 1 abaixo, apresentam-se os resultados obtidos com 3 anticorpos particulares, específicos da forma livre do PSA, obtidos no exemplo 2.

TABELA 1

Doseamento do PSA imunopurificado com os anticorpos monoclonais anti-PSA (fracções "eluições ácidas" e "eluições básicas")						
	ELUIÇÃO ÁCIDA			ELUIÇÃO BÁSICA		
Anticorpos monoclonais	Concentração (µg/mL)	Volume da fracção (mL)	Quantidade de PSA eluída (µg)	Concentração (µg/mL)	Volume da fracção (mL)	Quantidade de PSA eluída (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			

Os resultados obtidos da tabela 1 mostram que o PSA se encontra exclusivamente nas fracções "eluatados ácidos" e que todos os anticorpos monoclonais não retiveram a mesma quantidade de PSA.

(ii) Actividade enzimática específica do PSA purificado com auxílio destes anticorpos

A actividade enzimática do PSA contido nas fracções "eluição ácida" é medida num substrato do tipo quimotripsina, S-2586 (MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA.HCl), obtida de Chromogenix AB (Möln dal, Suécia). Esta actividade é determinada em 60 µL de amostra, e a actividade específica é calculada a partir da concentração determinada no parágrafo anterior.

Os resultados são apresentados na tabela 2 abaixo.

TABELA 2

<i>Actividade enzimática específica do PSA celular imunopurificado</i>	
Anticorpos monoclonais	Actividade específica do PSA (Δ DO/min/ μ g de PSA x 1000)
1	21,6
2	1,2
3	0,9
Sobrenadante celular de partida	11,6

Os resultados mostram que a actividade enzimática específica do eluato ácido obtido com o anticorpo anti-PSA nº1 é duas vezes mais elevada do que a actividade do sobrenadante celular de partida, antes da imunopurificação.

Este anticorpo enriqueceu assim o PSA purificado de forma enzimaticamente activa. Além disso, este anticorpo nº1 reconhece uma forma livre do PSA. Por conseguinte, o anticorpo nº1 reconhece essencialmente a forma livre activa do PSA.

A actividade enzimática específica dos eluatos ácidos obtidos com os anticorpos nº2 e 3 é muito fraca. Tal mostra que estes anticorpos retiveram essencialmente PSA sob a sua forma inactiva. Como estes anticorpos são específicos de uma forma livre do PSA, reconhecem essencialmente o PSA sob a sua forma livre inactiva.

Além disso, sabe-se que a tripsina é capaz de transformar o PSA na forma de zimogénio em PSA enzimaticamente activo. É por isso que de modo a determinar se o PSA na forma de zimogénio tinha sido retido, aquando das operações de

cromatografia de afinidade descritas acima, pelos anticorpos monoclonais anti-PSA, a actividade enzimática dos "eluatoss ácidos" foi medida na presença de tripsina. A actividade específica dos eluatos, determinada com ou sem tripsina, é idêntica. Por conseguinte, os eluatos ácidos obtidos com os anticorpos nº 1, 2 e 3, como descrito acima, não contêm PSA sob a forma de zimogénio.

Assim, nenhum dos anticorpos nº 1, 2 e 3 reconhece forma de zimogénio do PSA.

2) Imunoanálise efectuada após electroforese em gel SDS-PAGE

As diferentes formas de PSA presentes nos eluatos provenientes das colunas nas quais são fixadas os anticorpos nº 1, 2 e 3 foram separadas por electroforese em gel de acrilamida em condições redutoras, e a detecção do PSA por *Western Blot* é realizada com um anticorpo que reconhece o PSA total.

Os *Western Blot* realizados confirmam que está presente PSA em todas as amostras testadas provenientes da eluição ácida, em proporções correlacionadas com as quantidades determinadas na tabela 1, enquanto que as amostras provenientes das eluições básicas não o contêm.

Os *Western Blot* realizados confirmam igualmente que os anticorpos nº 1, 2 e 3 não retiveram o complexo PSA-ACT. Finalmente, por comparação com o PSA obtido como indicado no exemplo 3 utilizado como controlo, as eluições ácidas contêm formas de PSA tendo um peso molecular normal (33 kDa), e igualmente formas com um peso molecular inferior.

24-10-2006

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos que se ligam especificamente ao PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA, os referidos anticorpos sendo anticorpos policlonais purificados ou anticorpos monoclonais.
2. Anticorpos ou fragmentos de anticorpos segundo a reivindicação 1, que são anticorpos monoclonais.
3. Hibridoma que produz anticorpos monoclonais tais como definidos na reivindicação 2.
4. Reactivo para teste imunológico contendo anticorpos ou fragmentos de anticorpos tais como definidos na reivindicação 1 ou 2.
5. Reactivo para teste imunológico tal como definido na reivindicação 4, no qual os referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpos estão fixados a um suporte e/ou estão ligados a um marcador.
6. Teste imunológico para a determinação quantitativa de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA numa amostra biológica recolhida num indivíduo, no qual se coloca em contacto a referida amostra com um reactivo tal como definido na reivindicação 4 ou 5, e se avalia a quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA ligado aos referidos anticorpos ou fragmentos de anticorpos.

7. Teste imunológico segundo a reivindicação 6, no qual, entre outros, se avalia a quantidade de uma forma de PSA diferente da forma livre inactiva presente numa amostra da mesma natureza recolhida no mesmo indivíduo.

8. Teste imunológico segundo a reivindicação 7, no qual a referida outra forma de PSA é escolhida entre o PSA livre activo, o PSA livre total, o PSA complexado e o PSA total.

9. Teste imunológico segundo qualquer uma das reivindicações 7 a 8, no qual, entre outros, se determina pelo menos uma razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA à quantidade da outra forma referida, ou os inversos destas razões, ou combinações destas razões.

10. Teste imunológico segundo a reivindicação 9, no qual, entre outros, se determina pelo menos uma razão escolhida entre a razão da quantidade de PSA livre em relação à quantidade de PSA livre total, ou a razão da quantidade de PSA livre activo em relação à quantidade de PSA total, ou a razão da quantidade de PSA livre activo em relação à quantidade de PSA complexado, ou os inversos destas razões, ou combinações destas razões.

11. Teste imunológico segundo as reivindicações 8 a 10, na qual a referida outra forma é o PSA livre activo.

12. Método de diagnóstico de uma patologia benigna da próstata ou de diferenciação entre uma patologia benigna da próstata e um adenocarcinoma da próstata num indivíduo, no qual se mede o teor em PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo

clivado e pela forma de zimogénio do PSA numa amostra proveniente do referido indivíduo por intermédio de um teste imunológico tal como definido nas reivindicações 6 a 11.

13. Método segundo a reivindicação 12, na qual, entre outros, se compara o referido teor a uma escala de valores predeterminados, sendo os referidos valores aqueles observados nos pacientes afectados por uma patologia benigna da próstata reconhecida e aqueles observados em pacientes afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e conclui-se do resultado desta comparação seja a presença de uma patologia benigna da próstata seja a presença de uma denocarcinoma da próstata.

14. Método segundo as reivindicações 12 ou 13, no qual, entre outros, se compara o valor da razão assim determinada com um valor de diferenciação predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizado, de modo que os valores da referida razão que sejam superiores, ou respectivamente, inferiores ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados nos pacientes afectados por uma patologia benigna da próstata reconhecida, e de modo inverso que os valores da referida razão que sejam inferiores ou, respectivamente, superiores, ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados em indivíduos reconhecidos como estando afectados pelo adenocarcinoma da próstata reconhecido, e conclui-se do resultado da referida comparação ou da presença de uma patologia benigna da próstata ou a presença de um adenocarcinoma da próstata.

15. Método segundo qualquer uma das reivindicações 12 a 14, no qual:

- se determina a quantidade de PSA livre activo e a quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA numa amostra recolhida desse indivíduo,

- neste caso, determina-se a quantidade de uma forma de PSA diferente do PSA livre activo e diferente do PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA numa amostra da mesma natureza recolhida do mesmo indivíduo, sendo a referida forma escolhida entre o PSA livre total, o PSA total e o PSA complexado,

- determina-se o valor de uma das seguintes razões:

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA livre activo,

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA livre total,

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA total,

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA complexado,

ou os inversos destas razões, ou combinações destas razões,

- compara-se o valor da razão assim determinada com um valor de diferenciação predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizado, de modo que os valores da referida razão sejam superiores ou, respectivamente inferiores ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados em pacientes afectados por uma patologia benigna da próstata reconhecida, e de modo que inversamente os valores da referida razão que sejam inferiores ou, respectivamente, superiores ao referido valor de diferenciação sejam representativos dos valores observados em indivíduos reconhecidos como estando afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e que se conclui do resultado da referida comparação seja da presença de uma patologia benigna da próstata, seja da presença de um adenocarcinoma da próstata.

16. Método de diagnóstico de um adenocarcinoma da próstata num indivíduo suspeito de ser atingido pelo referido adenocarcinoma, sem praticar qualquer biópsia, no qual se utiliza um teste imunológico tal como definido segundo as reivindicações 6 a 11.

17. Método segundo a reivindicação 16, no qual, entre outros, se compara ao valor da razão assim determinado com um valor alvo predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizado, de modo que os valores da referida razão que sejam superiores, ou respectivamente, inferiores ao referido valor alvo sejam representativos dos valores observados nos pacientes afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e de modo inverso que os valores da referida razão que sejam inferiores ou, respectivamente, superiores, ao referido valor alvo sejam representativos dos valores observados em indivíduos reconhecidos como não estando afectados pelo adenocarcinoma da próstata

reconhecido, e conclui-se do resultado da referida comparação ou da presença ou da ausência de um adenocarcinoma da próstata.

18. Método segundo a reivindicação 16 ou 17, no qual:

- se determina a quantidade de PSA livre activo e a quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA numa amostra recolhida desse indivíduo,

- neste caso, determina-se a quantidade de uma forma de PSA diferente do PSA livre activo e diferente do PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA numa amostra da mesma natureza recolhida do mesmo indivíduo, escolhida entre o PSA livre total, o PSA total, o PSA complexado,

- determina-se o valor de uma das seguintes razões:

- * a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA livre activo,

- * a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA livre total,

- * a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA total,

* a razão da quantidade de PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA em relação à quantidade de PSA complexado,

ou os inversos destas razões, ou combinações destas razões,

- compara-se o valor da razão assim determinada com um valor alvo predeterminado escolhido, segundo o tipo de razão utilizado, de modo que os valores da referida razão sejam superiores ou, respectivamente inferiores ao referido valor alvo sejam representativos dos valores observados em pacientes afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e de modo que inversamente os valores da referida razão que sejam inferiores ou, respectivamente, superiores ao referido valor alvo sejam representativos dos valores observados em indivíduos reconhecidos como não estando afectados por um adenocarcinoma da próstata reconhecido, e que se conclui do resultado da referida comparação seja da presença ou da ausência de um adenocarcinoma da próstata.

19. *Kit* de diagnóstico que permite diagnosticar um adenocarcinoma da próstata num indivíduo suspeito de estar atingido pelo referido adenocarcinoma, ou permitindo diferenciar entre uma patologia benigna da próstata e um adenocarcinoma da próstata num indivíduo suspeito de estar atingido por uma destas doenças, compreendendo o referido *kit*:

- anticorpos de acordo com a reivindicação 1 ou 2 para dosear o PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA numa amostra biológica, e/ou

- meios para dosear o PSA livre activo numa amostra biológica da mesma natureza, e eventualmente
- meios para dosear uma forma de PSA diferente do PSA livre inactivo, sendo o referido PSA livre inactivo constituído por PSA livre inactivo clivado e pela forma de zimogénio do PSA e diferente do PSA livre activo numa amostra biológica da mesma natureza, escolhia entre o PSA livre total, o PSA total e o PSA complexado.

20. *Kit* segundo a reivindicação 19, no qual os referidos meios são anticorpos.

24-10-2006