

Universidad de Ciencias Médicas de la Habana



Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB



**“GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA EL
ANTÍGENO ESPECÍFICO DE PRÓSTATA (PSA) PARA LA
DETECCIÓN DEL PSA Y SU PURIFICACIÓN”**

**Tesis presentada en opción al grado científico
de Doctor en Ciencias Médicas**

BORIS ERNESTO ACEVEDO CASTRO

La Habana, Cuba

2012

Universidad de Ciencias Médicas de la Habana
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB

**“GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA EL
ANTÍGENO ESPECÍFICO DE PRÓSTATA (PSA) PARA LA
DETECCIÓN DEL PSA Y SU PURIFICACIÓN”**

**Tesis presentada en opción al grado científico
de Doctor en Ciencias Médicas**

Autor: Dr. Boris Ernesto Acevedo Castro

Tutor: Lic. Jorge Víctor Gavilondo Cowley, Dr. C.

La Habana, Cuba

2012

SÍNTESIS

El cáncer de próstata en Cuba es un problema de salud (2 672 casos diagnosticados y 2 769 defunciones en el 2007). Varios métodos diagnósticos se han implementado para la detección y manejo de esta enfermedad, destacando entre ellos la determinación serológica del antígeno específico de próstata (PSA).

En el presente trabajo se generó y caracterizó un panel de 11 anticuerpos monoclonales (AcMs) IgG1 que detectan con alta afinidad los epítomos principales descritos del PSA, tanto en solución como adherido a la placa del ensayo.

A partir del panel de AcMs obtenidos se realizó la estandarización de un ensayo tipo ELISA para la detección equimolar del PSA sérico total (asociado y libre), basado en el anticuerpo monoclonal CB-PSA.4 en el recubrimiento y el CB-PSA.9 acoplado con biotina como trazador, con un límite de detección de 0,15 ng/mL. Igualmente, se estandarizó un sistema para la detección en suero del PSA libre, basado en los AcMs CB-PSA.4 (recubrimiento) y CB-PSA.2 acoplado con biotina (trazador), con un límite de detección de 0,5 ng/mL.

Finalmente, con el propósito de emplear el PSA como estándar en los ensayos tipo ELISA, se desarrolló un método simple de inmunopurificación basado en el AcM CB-PSA.2, con el que se obtuvo el PSA con un grado de pureza superior al 90%.

El Centro de Inmunoensayo tomando como base el panel de AcMs y los resultados del presente trabajo, desarrolló y registró dos sistemas diagnósticos para la detección del PSA en el suero humano.

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Cáncer de próstata: concepto	12
2.2 Incidencia, prevalencia y factores de riesgo del cáncer de próstata	12
2.3 Diagnóstico del cáncer de próstata	15
2.4 Antígeno específico de próstata	15
2.4.1 Características bioquímicas del PSA.....	16
2.4.2 Producción, secreción y función del PSA	17
2.4.3 Asociaciones moleculares del PSA en el suero.....	18
2.5 Causas principales de la elevación del PSA total	19
2.6 Relación del PSA libre / PSA total.....	21
2.7 Sistemas comerciales que detectan el PSA libre y PSA total	22
2.8 Nuevos conceptos en la interpretación de los valores de PSA.....	25
2.9 Otros marcadores diagnósticos del cáncer de próstata	26
2.9.1 Fosfatasa ácida de próstata.....	27
2.9.2 Calicreína humana de próstata.....	27
2.9.3 Antígeno específico de membrana	28
2.9.4 Gen “supresor” de tumor p53.....	28
2.10 Manejo actual del diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata.....	28
2.11 Métodos para la purificación del PSA	32
2.12 Generación de AcMs contra el PSA.....	34
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Seroteca	37
3.2 Patrones del PSA	37
3.3 Esquema de inmunización	38
3.4 Generación de AcMs anti-PSA.....	40
3.5 Caracterización de los AcMs anti-PSA.....	44
3.6 Desarrollo de un ELISA de doble anticuerpo para la detección del PSA total en suero	48
3.7 Desarrollo de un ELISA de doble anticuerpo para la detección del PSA libre en suero	51
3.8 Purificación del PSA a partir del plasma seminal.....	52
3.9 Análisis estadísticos	56
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1 Generación de los AcMs anti-PSA de ratón. Técnica de fusión celular para la obtención de hibridomas secretores	58
4.2 Caracterización funcional del panel de anticuerpos monoclonales.....	60
4.2.1 Caracterización del reconocimiento de los AcMs anti-PSA	60
4.2.2 Subclase de los AcMs.....	61
4.2.3 Determinación de la afinidad y el límite de detección para los AcMs anti-PSA.....	61
4.2.4 Competencia de los AcMs en el reconocimiento del PSA. Tipo de epítipo reconocido	63
4.2.5 Especificidad de antígeno.....	66
4.3 Desarrollo de un ensayo ELISA de doble anticuerpo para la detección de PSA total...66	66
4.3.1 Concordancia del sistema PSA total con el ensayo comercial CIS bio PSA total (Francia).....	68
4.3.2 Determinación de la equimolaridad en la detección del PSA-ACT y PSA libre.....	69

4.3.3 Especificidad del sistema	71
4.3.4 Estudio de la precisión intra e interensayo.....	71
4.4 Desarrollo de un ELISA de doble anticuerpo para la determinación del PSA libre	72
4.5 Inmunopurificación del PSA a partir del plasma seminal.....	77
5. CONCLUSIONES.....	85
6. RECOMENDACIONES	86
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	95
9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA RELACIONADA CON LA TESIS	99

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CP) es actualmente en Cuba la neoplasia más frecuente entre los hombres, con aparición a edades avanzadas (usualmente más de 50 años). En la mayoría de los países desarrollados se ubica en el segundo lugar, en cuanto a incidencia y mortalidad, entre todas las enfermedades tumorales para este sexo. En los países en vías de desarrollo se encuentra entre las diez primeras causas de muerte relacionadas a tumores, constituyendo un problema global de salud¹.

El cáncer de próstata en Cuba es un problema creciente. Diversos factores se asocian con el manejo e impacto de los mismos en la sociedad cubana. La tasa de incidencia en Cuba es la tercera más alta entre los tumores que afectan a los hombres (47,5 por 100 000 habitantes), con 2 672 casos diagnosticados con cáncer de próstata durante el año 2007², sin que exista una pesquisa general de la población en riesgo. En el año 2007 fallecieron 2 769 hombres por complicaciones relacionadas con el cáncer de próstata². El incremento de la esperanza de vida de la población cubana y el alto porcentaje relativo de sujetos de raza negra en esta población, raza que se asocia con las variantes más agresivas del tumor, son aspectos que inciden en la epidemiología de la enfermedad en Cuba. Igualmente, el diagnóstico presuntivo masivo con la aplicación del examen digital rectal (*DRE*, siglas en inglés) como alternativa simple y barata choca contra costumbres culturales enraizadas en la sociedad cubana que no posibilitan establecer una campaña efectiva empleando dicho método. El acceso gratuito a la salud y el esfuerzo del gobierno por situar la salud como un bienestar de todos los cubanos, favorecen la implementación de políticas extensivas para el diagnóstico a tiempo y la terapia efectiva de las enfermedades, por lo cual existen condiciones propicias para

establecer políticas generales que conlleven un manejo integral y favorable del CP en la sociedad cubana.

Varios métodos diagnósticos se han implementado para la detección de esta enfermedad, estos comprenden desde el *DRE* o el ultrasonido transrectal (*TRUS*, siglas en inglés), hasta el empleo de marcadores tumorales como la fosfatasa ácida de próstata (*PAP*, siglas en inglés) y el antígeno específico de próstata (*PSA*, siglas en inglés). No obstante, se acepta que para el diagnóstico definitivo del CP es necesario realizar una biopsia de la glándula prostática.

Aunque todos estos métodos diagnósticos presentan sus ventajas y desventajas, y han sido utilizados de forma combinada con el objetivo de aumentar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la enfermedad, la introducción del PSA como marcador tumoral *per se*, revolucionó el diagnóstico del CP.

Entre las múltiples ventajas de la determinación serológica de PSA se encuentran: (a) permite detectar tumores que con frecuencia, por su localización anatómica en la glándula y el estadio del tumor, escapan al DRE y al TRUS, (b) con su empleo se logra una mayor especificidad en el diagnóstico del CP en comparación con el DRE y el TRUS, (c) constituye un método menos invasivo, que puede ser realizado como un análisis de rutina en laboratorios clínicos, por personal no profesional, sin requerir grandes recursos. Además, la determinación del PSA no solo es la herramienta más importante en el diagnóstico del CP sino que también puede ser utilizada en la determinación del estadio tumoral, el pronóstico y la detección de recidivas de la enfermedad a la terapia indicada^{3,4}.

Las ventajas que ofrece el PSA en el diagnóstico del CP, principalmente en la detección temprana de la enfermedad, donde el tumor se encuentra confinado a la próstata, aumentan las posibilidades de éxito de las terapias disponibles como son la prostatectomía radical y la radioterapia, con el consiguiente incremento en la calidad y la esperanza de vida de los pacientes afectados por esta patología.

Ningún método diagnóstico es infalible y en particular la determinación del PSA conlleva un incremento de los gastos en el servicio de salud, asociado con la determinación serológica del PSA y las evaluaciones posteriores tanto diagnósticas, como las requeridas para la selección, seguimiento y modificación de terapias en los pacientes con CP⁵.

En Cuba, el DRE se indica de rutina como diagnóstico presuntivo de la enfermedad. Esto implica que se detecte aproximadamente un 50% del total de los casos de CP que pudieran registrarse con el empleo del PSA⁶. Además, como consecuencia del bajo valor predictivo positivo del examen con el DRE (solo 28%)⁵, es de esperar que se realicen un gran número de biopsias innecesarias con el consiguiente costo económico y molestias al paciente.

Problema científico

Tomando en cuenta que la población cubana se encuentra entre las más afectadas por esta enfermedad a escala mundial, que el desarrollo de un inmunoensayo para la cuantificación del PSA en el suero humano significa un paso importante en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del CP en nuestro país, unido a que el acceso a estos sistemas comerciales conlleva una erogación importante de dinero, se presenta la necesidad de contar con estos ensayos propios para su empleo en Cuba y otros países.

Hipótesis

Para abordar el problema antes mencionado se formuló la siguiente hipótesis de trabajo: “Es posible obtener anticuerpos monoclonales de alta afinidad contra el antígeno específico de próstata con capacidad para la detección equimolar de las variantes séricas principales del PSA y para purificar dicho antígeno a partir del plasma seminal”.

Con vistas a desarrollar el trabajo experimental nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Generar y caracterizar anticuerpos monoclonales (AcMs) de ratón que reconozcan de manera específica al PSA.
2. Desarrollar un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA ultrasensible (Inmunoensayo enzimático en fase sólida, siglas en inglés) de doble anticuerpo, con la capacidad de cuantificar de forma equimolar el PSA sérico total (asociado y libre).
3. Desarrollar un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA ultrasensible de doble anticuerpo, con la capacidad de cuantificar el PSA libre en el suero humano.
4. Evaluar la capacidad de los AcMs para purificar el antígeno específico de próstata a partir del plasma seminal, para su posible empleo como estándar en los inmunoensayos que detecten PSA total o libre.

Las tareas principales a desarrollar para dar cumplimiento a los objetivos propuestos son:

Generación de anticuerpos monoclonales anti-PSA

1. Inmunización de ratones BALB/c con PSA seminal. Medición de los títulos de anticuerpos IgG anti-PSA.

2. Desarrollo de la fusión celular de esplenocitos murinos con mielomas mediante el empleo del polietilenglicol (PEG) como agente fundente y la selección de los hibridomas mediante el empleo de medios selectivos.
3. Pesquisa de los hibridomas secretores de anticuerpos IgG anti-PSA. Selección y clonaje de los hibridomas potenciales.
4. Purificación, mediante Proteína A, de los anticuerpos monoclonales anti-PSA obtenidos.
5. Caracterización funcional del panel de anticuerpos obtenidos: determinación de la subclase, afinidad, mapeo epitópico, especificidad, reconocimiento en solución, entre otros parámetros.

Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA de doble anticuerpo para la detección equimolar del PSA total

1. Selección de la combinación de anticuerpos monoclonales con mejor perfil de detección del PSA total en suero.
2. Determinación del límite de detección y rango lineal del ensayo ELISA.
3. Caracterización del sistema ELISA desarrollado. Evaluación de la detección equimolar del PSA total en el suero humano.

Desarrollo de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA para la detección del PSA libre

1. Selección de las variantes de anticuerpos monoclonales con mejor perfil de detección.
2. Determinación del límite de detección y rango lineal del ensayo ELISA.
3. Caracterización del sistema ELISA desarrollado.

Purificación del PSA a partir de plasma seminal empleando anticuerpos monoclonales (inmunopurificación)

1. Selección del AcM y condiciones de elución.
2. Inmovilización de los AcMs seleccionados.
3. Purificación del PSA a partir de plasmas seminales y caracterización del método de purificación empleado.

Novedad científica

La novedad de esta investigación, de relevancia y actualidad para la salud en nuestro país, radica en la obtención de un panel de anticuerpos que incluye AcMs anti-PSA útiles para el desarrollo de ensayos equimolares que muestran características analíticas similares a los empleados a nivel mundial y que permiten implementar pesquisas del cáncer de próstata en Cuba.

Dentro del panel de AcMs se caracteriza el AcM anti-PSA.4, con una alta afinidad por el PSA y un reconocimiento equimolar de las variantes principales de este antígeno en suero.

De igual forma se caracteriza un método para la inmunopurificación del PSA a partir de plasma seminal, empleando un AcM anti-PSA del panel obtenido, lo que constituye una nueva metodología para la obtención de este antígeno de manera simple y con un alto grado de pureza.

Estos resultados fueron el soporte de la patente CUB 125/2000, titulada: “Anticuerpos monoclonales contra el antígeno específico de próstata y su empleo en el diagnóstico y la inmunopurificación”, otorgada en Cuba en el año 2004.

Impacto económico y social

A partir de los resultados del presente trabajo, el Centro de Inmunoensayo (CIE) tomando como base el panel de AcMs, desarrolló y registró dos sistemas diagnósticos para la detección del PSA total y libre en el suero humano, así como el empleo del sistema de inmunopurificación descrito en el presente trabajo para la obtención de los patrones de PSA necesarios en estos sistemas diagnósticos. Estos sistemas de diagnóstico se encuentran registrados en Cuba, Venezuela, México, Colombia, Brasil, Perú y Argentina.

En Cuba desde el 2009 se han realizado 1 271 808 determinaciones, con el consiguiente ahorro de divisas para el país. En Venezuela se han empleado 992 736 determinaciones de estos sistemas, constituyendo una fuente de exportaciones para nuestro país.

En estos momentos se crea en Cuba una red de unidades para la pesquisa activa de enfermedades, que incluye el empleo de los sistemas registrados por el CIE, basados en el panel de AcMs generado en el presente trabajo. El diagnóstico temprano de la enfermedad brinda la oportunidad de un tratamiento personalizado y mejores condiciones de vida. Igualmente, estos sistemas de detección del PSA permiten el seguimiento periódico de la respuesta del paciente a la terapia indicada, lo que posibilita el ajuste de la conducta terapéutica en cada paciente. Al constituir una de las principales causas de muerte en Cuba, el impacto en la familia es indudable.

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido objeto de las siguientes publicaciones en revistas internacionales de impacto (publicaciones arbitradas):

- (1) Acevedo B, Perera Y, Ruiz M y colaboradores. Development and validation of a quantitative ELISA for the measurement of PSA concentration. *Clinica Chimica Acta* 2002; 317: 55-63.
- (2) Acevedo B, Perera Y, Torres E y colaboradores. Fast and novel purification method to obtain the prostate specific antigen (PSA) from human seminal plasma. *The Prostate* 2006; 66: 1029-36.

Este trabajo formó parte de un proyecto multinacional de la OIEA (Organización Internacional de la Energía Atómica) con evaluaciones satisfactorias y la publicación en la revista de esta organización (Colectivo de autores. Development of kits for Radioimmunoassays for tumor markers. IAEA-TECDOC-1307 2002: 35-45). De igual forma constituyó la base de tesis de opción de grado universitario en Cuba y para el entrenamiento de un conjunto de científicos en Malasia con financiamiento de la OIEA. Una parte de estos resultados constituyeron un logro anual institucional del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el panel de anticuerpos se comercializa por el CIGB de Santi Spíritus.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cáncer de próstata: concepto

El cáncer de próstata o adenocarcinoma es una enfermedad neoplásica del tejido epitelial de la próstata y por tanto exclusiva del sexo masculino. Presenta una evolución lenta cuyo estadio final es la aparición de metástasis ósea en la región de la pelvis, como sitio más frecuente.

La neoplasia intraepitelial prostática (*PIN*, siglas en inglés) se considera la lesión pre-maligna de la próstata que conduce al desarrollo del CP⁷. Estas lesiones aparecen generalmente en edades comprendidas entre los 30 y 40 años en varios sitios de la próstata y se localizan en un 85% de los casos con esta enfermedad. La PIN se caracteriza por la proliferación de las células del epitelio luminal de la próstata, en la región de los vasos linfáticos, pero sin extenderse más allá de los nódulos y generalmente no producen síntomas. Por su desarrollo multifocal, la PIN conlleva a la aparición de células tumorales en diferentes sitios de la glándula⁸. De acuerdo a la severidad de los cambios citológicos ocurridos en el tejido, se clasifican en dos categorías: bajo grado y alto grado de PIN; este último se corresponde con un mayor riesgo del desarrollo del CP.

2.2 Incidencia, prevalencia y factores de riesgo del cáncer de próstata

El cáncer de próstata constituye uno de los tumores más comunes entre la población masculina mundial. En EE.UU. se ubica en el segundo lugar en incidencia con 217 730 nuevos casos detectados en 2010, y un estimado de 32 050 muertes para ese mismo año, siendo la edad y la raza los factores claves de diferenciación epidemiológica⁹.

En Cuba se registraron 2 672 nuevos casos en el 2007, ocupando el segundo lugar en mortalidad entre las enfermedades tumorales, con cerca de 2 769 defunciones².

Un análisis de proporción poblacional, para comparar los indicadores en Cuba con lo referido en Estados Unidos situarían las cifras cubanas en menos de un 30% de los casos diagnosticados y con una mortalidad 2,5 veces superior a la registrada en los Estados Unidos. Diversos factores inciden en estas cifras, lo que requiere un estudio profundo por nuestro sistema de salud y sociedad en su conjunto, con la finalidad de instrumentar las medidas correctas que permitan mejorar la salud de nuestra población.

Existen grandes diferencias geográficas en la incidencia del CP, la región de Norte América presenta la mayor incidencia seguida por Australia y Europa del Este, mientras que en los países del sudeste asiático se describen menores valores de incidencia. La mortalidad también es menor en esta última región^{10,11}.

Las diferencias en cuanto a incidencia y mortalidad del CP entre las diferentes regiones geográficas pueden estar relacionadas con los factores de riesgo de la enfermedad. Se conoce que el CP se encuentra relacionado con factores de origen ambiental y genético. Entre los factores ambientales que influyen en la incidencia del CP se encuentra la composición de la dieta, que varía de una región a otra¹². La ingestión de alimentos ricos en grasas de origen animal y algunas de origen vegetal, así como el exceso en la ingestión de carne, aumentan la incidencia del CP. Por el contrario, se ha sugerido que el consumo de alimentos vegetales ricos en carotenos y vitamina E puede desempeñar un papel protector en el desarrollo de la enfermedad.

La relación entre el CP y los factores genéticos se manifiesta en el aumento del riesgo de padecer la enfermedad entre los individuos que presentan una historia familiar de CP¹³.

Se conoce que los individuos de raza negra presentan los mayores niveles de incidencia y mortalidad a causa del CP, un 31% y 117% respectivamente, más que las personas de raza blanca¹⁴. Las diferencias encontradas en cuanto a la incidencia del CP entre las diferentes razas, pueden ser explicadas por la influencia de los factores genéticos en el desarrollo del tumor. Se ha descrito por Thompson y colaboradores que en individuos de raza negra existe una mayor actividad de la enzima 5- α -reductasa¹⁵, enzima que participa en el metabolismo de la hormona testosterona. Otros autores también han descrito diferencias en la actividad de esta enzima entre diferentes grupos étnicos¹⁶. La testosterona promueve la proliferación celular en el tejido prostático normal, pero también se encuentra relacionada con el desarrollo del CP debido a que la mayoría de los tumores prostáticos dependen de ella para su crecimiento. La conversión de esta hormona en dihidrotestosterona, un derivado mucho más potente en su función estimuladora de la multiplicación celular sobre la próstata, es catalizada por la enzima 5- α -reductasa¹⁷.

Un factor de riesgo de gran importancia en el desarrollo del CP es la edad del individuo. Se ha demostrado que el número de sujetos con CP aumenta en relación con el incremento de la edad⁶. En autopsias realizadas a personas mayores de 50 años, que murieron sin presentar síntomas clínicos de la enfermedad, se detectó un 30% de prevalencia de CP¹⁸.

2.3 Diagnóstico del cáncer de próstata

La Sociedad Americana del Cáncer recomienda aplicar anualmente el DRE y la medición serológica de los niveles del PSA para la detección temprana del CP. Estos exámenes deben implementarse a partir de los 45 años de edad para los sujetos de raza negra (mayor incidencia y severidad de la enfermedad) o en los casos de antecedentes de CP familiar, y a los 50 años para el resto de los individuos¹⁹. Para el diagnóstico definitivo, se realiza una biopsia de la glándula con el objetivo de comprobar la naturaleza tumoral de la enfermedad.

El diagnóstico de la posible recurrencia del CP después de realizada la extirpación quirúrgica de la próstata (prostatectomía radical), se basa en la determinación de los niveles del PSA en suero³.

2.4 Antígeno específico de próstata

El PSA es considerado un marcador tumoral del cáncer de próstata. Es producido por las células cancerosas del tejido prostático y secretado hacia la sangre en cantidades proporcionales a la magnitud y localización del tumor, por lo que constituye una valiosa herramienta en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad²⁰. No obstante, el PSA se expresa normalmente en el tejido prostático, aunque a niveles basales (0,4 - 3 ng/mL), por lo que no constituye un marcador específico del tumor²¹. Otras patologías de la próstata como son la hiperplasia benigna de próstata (*BPH*, siglas en inglés) y la prostatitis, también producen aumentos en las concentraciones de PSA por encima del valor basal²².

También se ha descrito la producción de cantidades concomitantes de PSA en varios tejidos extra-prostáticos como son el páncreas, las mamas, las glándulas salivares y periuretrales, así como en los tejidos neoplásicos de pulmón, ovario, páncreas y mamas^{23,24}.

No obstante, debido al pequeño aporte (decenas de pg/mL) de estos tejidos al contenido total del antígeno en suero²⁵, no se ve afectada la utilidad clínica del PSA en el diagnóstico del CP.

2.4.1 Características bioquímicas del PSA

El antígeno específico de próstata es una glicoproteína (8% de glicosilación) de 237 aminoácidos (aa), y aproximadamente 34 kilodaltons (kDa), que pertenece a la familia enzimática de las serín-proteasas. Está constituida por una sola cadena polipeptídica. Presenta de tres a cinco isómeros con puntos isoeléctricos comprendidos entre pH 6,8 y 7,5. Estos isómeros se diferencian entre sí en su composición sacarídica²⁶. Se desconoce el papel biológico y la relación de los isómeros del PSA con el desarrollo y evolución del CP.

El PSA humano es codificado por un gen localizado en el cromosoma 19, donde también se encuentran los genes de otras dos proteínas de la familia de las calicreínas, la calicreína pancreática humana (hK1) y la calicreína prostática humana (hK2), con las que presenta una homología aminoacídica del 60% y 80%, respectivamente²⁶. El gen que codifica para el PSA se clonó en 1989²⁷.

A diferencia de la hK1 y la hK2, el PSA tiene sustituido el aa serina (posición 183) por el ácido aspártico en la triada catalítica (histidina, ácido aspártico, serina), característica de

las serín-proteasas. Este cambio en el centro activo de la molécula del PSA hace que su especificidad de corte sea semejante a la enzima quimiotripsina (residuos hidrofóbicos de tirosina y leucina). El resto de las calicreínas identificadas, poseen actividad enzimática semejante a la tripsina⁹.

La generación de AcMs que reconocen diferentes regiones del PSA con alta afinidad (en el rango de 10^7 a 10^9 L/mol) ha sido descrita previamente²⁸. En los estudios realizados por la ISOBM (International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, siglas en inglés) empleando 82 AcMs de ratón, se determinó la existencia de seis zonas antigénicas en la molécula del PSA⁹.

Varios autores han descrito las posibles localizaciones de algunos de los epítomos secuenciales del PSA. Piironen y colaboradores²⁹, localizaron estos epítomos entre los aa 1-13, 53-64, 80-91 y 151-164, mientras Corey y colaboradores³⁰, describieron las regiones comprendidas entre los aa 50-59 y 155-175 como posibles epítomos secuenciales.

Como consecuencia de la gran homología en la secuencia aminoacídica entre el PSA y la hK2 (80%), es de esperar que una parte de los AcMs generados contra el antígeno específico de próstata muestren reactividad cruzada con la hK2. Se han identificado al menos dos regiones lineales, aa 1-13 y aa 53-64, en la hK2 que son reconocidas por AcMs anti-PSA⁹.

2.4.2 Producción, secreción y función del PSA

El PSA es producido en su mayoría en la región glandular de la próstata, específicamente por las células lumbinales secretoras, y en menor medida, por las células

neuroendocrinas²¹. Es sintetizado en el retículo endoplasmático y liberado por exocitosis a los conductos exocrinos de la glándula, desde donde pasa a formar parte del fluido prostático que aporta el 15% del volumen total del semen²². La concentración de esta proteína en el semen de sujetos sanos varía entre 0,4-3 mg/mL³¹ y se conoce que aproximadamente un 70% de la proteína es enzimáticamente activa³². En condiciones fisiológicas normales una pequeña cantidad del PSA escapa a la circulación sanguínea, donde alcanza una concentración generalmente inferior a 4 ng/mL³³.

Su función biológica es contribuir a la licuefacción del semen mediante la degradación del coágulo seminal, compuesto mayoritariamente por las proteínas semenogelina 1 y 2, aumentando la movilidad de los espermatozoides. También se ha descrito su participación en la inactivación de la proteína de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP-3, siglas en inglés) y su posible papel en la estimulación del crecimiento tumoral²¹.

2.4.3 Asociaciones moleculares del PSA en el suero

Los inhibidores de proteasas que con más frecuencia se asocian al PSA en el suero son: la α_2 -Macroglobulina (α_2 -MG), la α -1-antiquimiotripsina (ACT), la α -antitripsina (α -PI) y la proteína-C-inhibidora (PCI)³⁴.

Aproximadamente un 50% del PSA en suero forma un complejo covalente con la α_2 -MG³⁵, un inhibidor de proteasas producido en el hígado que se encuentra en el suero, a una concentración 100 veces superior al PSA. En esta asociación la molécula de α_2 -MG enmascara todos los epítomos conocidos del PSA, por lo que este complejo no puede ser detectado por los inmunoensayos comerciales disponibles.

Entre un 70-85% del PSA restante (no unido a la α_2 -MG) se asocia mayoritariamente mediante un enlace covalente acil-enzima³⁶ (1:1) con la ACT, un inhibidor de enzimas serín-proteasas que también excede en concentración al PSA (aproximadamente 100 veces). Esta interacción forma un complejo de 90 kDa donde permanecen expuestos varios epítomos de la molécula, y representa la forma inmunodetectable principal del antígeno en suero³⁷.

El PSA que se encuentra libre constituye aproximadamente el 20% del total de la forma inmunodetectable en el suero. La presencia del antígeno libre a pesar del exceso de proteínas inhibitorias, se corresponde con la pérdida de la actividad enzimática para esta fracción²⁶.

Otros inhibidores de serín-proteasas como la α -PI y PCI también se asocian con el PSA en el suero, pero solo representan ~1% del PSA inmunodetectable.

Los ensayos que determinan el PSA en el suero pueden detectar PSA libre (fracción de antígeno no asociado a ningún inhibidor) o PSA total (fracción compuesta por el PSA libre y el complejo PSA-ACT). Se excluye del PSA total la asociación molecular PSA- α_2 -MG por no ser detectada mediante los inmunoensayos disponibles, así como, la asociación del PSA con los inhibidores PCI y α -PI porque constituyen un porcentaje muy bajo del total del antígeno presente en el suero³⁷.

2.5 Causas principales de la elevación del PSA total

La concentración de PSA en el suero de sujetos sanos se mantiene por debajo de 4 ng/mL²². Ligeros incrementos del PSA en el suero pueden detectarse asociados al

coito sexual, por lo cual en ocasiones, para determinar PSA, se recomienda abstinencia sexual al menos dos días antes de la toma de la muestra³⁸.

También se ha descrito que en individuos sanos los valores del PSA total en suero se incrementan con la edad³⁹. Esto ocurre, al parecer, debido al aumento de la permeabilidad de las barreras fisiológicas de la próstata con el envejecimiento del organismo. Se han encontrado otras variaciones en los niveles de PSA total entre individuos de diferentes razas⁴⁰.

La presencia del PSA total en el suero humano en cantidades por encima de 4 ng/mL se interpreta como indicativo de una alteración prostática, que puede estar relacionada con causas tan diversas como: (a) hiperplasias benignas de la próstata (b) adenocarcinomas prostáticos, (c) inflamaciones (prostatitis), o (d) traumatismos³.

Se considera que un 80% de las personas que padecen CP, poseen concentraciones de PSA total superiores a 4 ng/mL³³, valor considerado como línea de corte para esta forma molecular del antígeno en el diagnóstico de la enfermedad. No obstante la determinación del PSA total con valores por debajo de 10 ng/mL no discrimina entre la presencia de una BPH o un CP. Según Chodack, el 43% (136/319) de los pacientes con cáncer confinado a la próstata mostraron valores del PSA total por debajo de 10 ng/mL. Además, cerca de un 25% de los casos con BPH tuvieron un valor sérico del PSA total por encima de 4 ng/mL⁴¹.

El mayor solapamiento en los valores del PSA total para estas dos enfermedades (CP y BPH) ocurre entre los 4 ng/mL y los 10 ng/mL⁴², por lo que en este intervalo de concentraciones disminuye significativamente la especificidad del ensayo.

2.6 Relación del PSA libre / PSA total

En 1992 Hans Lilja patentó una idea novedosa que redujo la inespecificidad de los ensayos que detectan el PSA⁴³. En la patente se expone la diferencia significativa que existe entre sujetos con CP o BPH, en cuanto a la relación sérica entre el PSA libre y el asociado a la ACT. Refieren este y otros autores, que en los pacientes con cáncer de próstata esta relación tiende a ser menor del 18%, mientras que en sujetos normales o con hiperplasia benigna de la próstata, el porcentaje del PSA libre con respecto al PSA total se eleva por encima del 18%^{44,45,46}. Con la combinación de estas dos determinaciones (PSA total y PSA libre) se alcanzan valores de sensibilidad y especificidad del 95%⁴⁷. A partir de estos resultados, en algunos países se implementó el tamizaje masivo para la detección temprana del cáncer de próstata empleando la relación PSA libre / PSA total, dirigido según la edad, la raza y los antecedentes familiares⁶.

El porcentaje menor del PSA libre detectado en las personas que padecen CP ha sido atribuido a la producción de ACT en las propias células neoplásicas y su asociación pericelular con el PSA antes de entrar a la circulación sanguínea. Esto no sucede en la BPH donde la producción de ACT en el propio tejido es escasa y la formación del complejo ocurre ya en la sangre, condiciones en las cuales, la asociación parece estar menos favorecida⁷.

Otra hipótesis para explicar este fenómeno es la descrita por Chen y colaboradores⁴⁸, donde las diferencias entre los porcentajes del PSA libre encontrados para cada enfermedad son atribuidas a la forma en que esta molécula alcanza la circulación

sanguínea. Según estos autores, en el tejido prostático normal y en la BPH, el PSA pasa al suero por difusión desde el líquido extracelular de la propia glándula; durante este proceso la molécula puede degradarse por proteasas presentes en dicho fluido. Esta degradación disminuye la capacidad del PSA de asociarse con la ACT después de pasar a la sangre. En el CP producto de la pérdida de la arquitectura normal del tejido, el PSA puede alcanzar directamente la circulación sanguínea sin ser degradado, por lo que conserva su capacidad de asociarse a la ACT.

2.7 Sistemas comerciales que detectan el PSA libre y PSA total

En los últimos años han estado disponibles en el mercado al menos 30 inmunoensayos diferentes para la detección de PSA. Los sistemas de determinación del PSA total pertenecientes a las empresas norteamericanas Hybritech, Abbott, Tosoh y Ciba-Corning han sido aprobados por la Agencia Reguladora de Drogas y Alimentos en EE.UU. (FDA, siglas en inglés) para el seguimiento de pacientes con cáncer de próstata⁴⁹.

Como estándar de oro se aprobó el empleo del ensayo inmunoradiométrico Tandem-R y el inmunoenzimático Tandem-E, ambos pertenecientes a Hybritech Inc. Las características de algunos de los inmunoensayos de PSA total disponibles comercialmente³³ se recogen en la tabla 1.

Acorde a las variaciones observadas en la concentración del PSA total en suero en relación con la edad y la composición étnica de la población, el establecimiento de valores de corte para cada grupo en particular contribuye a mejorar la sensibilidad y especificidad del ensayo en el diagnóstico del CP. No obstante, el intervalo de referencia de 0-4,0 ng/mL (valor de corte 4 ng/mL) es ampliamente utilizado⁹ para los valores

normales del PSA total, definido por la compañía Hybritech empleando el suero de hombres sanos menores de 40 años de edad³⁸.

Tabla 1. Características de los inmunoensayos aprobados por la FDA para la detección del PSA total.

	Hybritech Tandem-R¹	Abbott MXI²	Corning ACS-180²
Matriz	Suero	Suero	Suero
Volumen de muestra (µL)	50	150	100
Límite de detección (ng/mL)	0,1	0,1	0,2
Rango del ensayo (ng/mL)	0,1-100	0,1-100	0,2-200
Tiempo total (horas)	3	3	3

Leyenda: ¹, AcMs en la captura y en la detección del PSA; ² AcM en la captura y anticuerpo policlonal en la detección del PSA.

El empleo de la relación entre el PSA libre y el total en el algoritmo de diagnóstico médico del cáncer de próstata conllevó al desarrollo de ensayos equimolares para la cuantificación de este antígeno⁵⁰. Esto implica que los anticuerpos anti-PSA desarrollados para detectar el PSA total tienen que originar la misma señal en el sistema al detectar un mol de PSA-ACT y un mol del PSA libre³⁴.

Varios ensayos equimolares tipo ELISA de doble anticuerpo se encuentran disponibles comercialmente. Estos se basan en dos AcMs que reconocen el PSA, uno de ellos fijado a una superficie sólida y el otro como anticuerpo trazador acoplado a enzimas, u otros marcadores. Generalmente el anticuerpo de la fase sólida detecta de forma equimolar los niveles del PSA total. Ejemplos de estos ensayos equimolares son el Tandem-E y Tandem-R PSA Assays (Hybritech, La Jolla, California, EE.UU.) (Tabla 1) y el ensayo PSA total de CIS bio (Francia).

Otros ensayos no muestran un reconocimiento equimolar hacia ambas formas moleculares del PSA. Por ejemplo, el PROS-CHECK PSA, de Yang Laboratories, Inc. (China), es un radioinmunoensayo competitivo que emplea anticuerpos policlonales de conejo como recubrimiento y el PSA marcado con ¹²⁵I.

Existen ensayos comerciales que se basan en un ELISA de doble anticuerpo no competitivo con un AcM en contacto con la fase sólida y anticuerpos policlonales como trazadores. En sentido general, los ensayos del PSA total que utilizan anticuerpos policlonales no muestran un reconocimiento equimolar hacia las dos formas moleculares. Esta mezcla de anticuerpos reconoce un gran número de epítomos sobre la molécula del PSA libre, parte de los cuales son ocultados por la unión del PSA a la ACT. Este hecho implica que mientras mayor sea la proporción del antígeno libre en la mezcla, mayor será el reconocimiento y por tanto la señal del ensayo. Ejemplos de estos ensayos son el Abbott IMx.RTM PSA Assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) y el ACSTM PSA Assay (Ciba-Corning Diagnostics Corporation, East Walpole, Massachusetts, EE.UU.). Este último, como consecuencia del reconocimiento preferencial del PSA libre, produce resultados un 60% por encima de los correspondientes al ensayo de Hibritech²⁸.

Con el objetivo de estandarizar los inmunoensayos que detectan el PSA, Stamey y colaboradores desarrollaron un estándar de PSA compuesto por un 90% de PSA-ACT y un 10% del PSA libre⁵¹. La composición de este estándar simula la matriz y la forma en que el analito debe ser medido en el suero²⁶. Con su empleo disminuyen las diferencias a valores menores de un 10% entre los ensayos que detectan el PSA de forma equimolar³³.

2.8 Nuevos conceptos en la interpretación de los valores de PSA

Aunque los valores del PSA en el suero son ampliamente utilizados en la detección temprana y el seguimiento del cáncer de próstata, debido a las dificultades que existen en el diagnóstico diferencial entre esta enfermedad tumoral y la BPH, otros conceptos que utilizan el PSA han sido desarrollados⁴².

Considerando como premisa el descubrimiento de la relación entre el aumento de los valores del PSA total en el suero de individuos sanos y el envejecimiento, para el tamizaje masivo del CP se ha propuesto el establecimiento de rangos de referencia relacionados con la edad⁴¹ (Tabla 2), en sustitución del rango absoluto anteriormente empleado (< 4,0 ng/mL de PSA total).

Tabla 2. Valores de concentración en suero del PSA total en individuos sanos en relación con la edad.

Rango de edad (años)	C(PSA total) en ng/mL *
40-49	< 2,5
50-59	< 3,5
60-69	< 4,5
70-79	< 6,5

Leyenda: *, El límite superior del intervalo de concentración de PSA total en el suero de sujetos sanos se corresponde con el percentil 95 de los valores para cada rango de edad; C(PSA total), concentración de PSA total.

El empleo de rangos de PSA total acordes a la edad, permitió incrementar la sensibilidad del ensayo en los intervalos de edad entre 40-49 y 50-59 años, ya que considera que los

valores de corte para el diagnóstico del CP en los individuos comprendidos entre estas edades son de 2,5 y 3,5 ng/mL de PSA total, respectivamente. De acuerdo con Wolf y colaboradores, para individuos con edades superiores a los 60 años la implementación de los rangos de PSA total acorde a la edad pudiera representar una disminución significativa del número de biopsias innecesarias¹⁹.

Por su parte, Albertsen y colaboradores describieron la velocidad en el incremento de la concentración del PSA total en los pacientes con CP en comparación con aquellos que padecen de BPH, y su importancia en el diagnóstico diferencial entre estas dos enfermedades¹⁴. Un aumento anual mayor de 0,75 ng/mL es indicativo de la presencia del tumor con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 90% para este valor de corte. No obstante, la aplicación de este parámetro tiene entre sus limitaciones la variabilidad biológica en las concentraciones del PSA total entre individuos.

La densidad de PSA es otro concepto con aplicación clínica, el cual relaciona la concentración de antígeno total en suero con el volumen de la glándula prostática. Se considera que una relación mayor de 0,15 indica la presencia del CP. Este método presenta serias limitaciones relacionadas con la estimación del volumen real de la próstata²³.

2.9 Otros marcadores diagnósticos del cáncer de próstata

Con vistas a implementar un diagnóstico adecuado del CP se han desarrollado ensayos que detectan diferentes moléculas. Ninguno de los diagnósticos en prueba o implementados en la detección del CP cumplen con los requisitos de detectar

marcadores tumorales, pero en cada caso buscan brindar una nueva información, o complementar la que se obtiene a través de la determinación del PSA.

2.9.1 Fosfatasa ácida de próstata

La fosfatasa ácida de próstata es reconocida desde 1930 como un marcador asociado al tumor. Es una glicoproteína de aproximadamente 100 kDa de masa molecular, constituida por dos subunidades idénticas. Su síntesis y secreción al plasma seminal son dependientes de la presencia de andrógenos, y tiene como función biológica hidrolizar los monoésteres fosfóricos que se encuentran en este fluido. La PAP representa del 10 al 25% de la fracción total con actividad de fosfatasa ácida en el suero del individuo sano⁴¹.

En la detección del CP utilizando este marcador, la sensibilidad y especificidad se encuentran entre un 31-61% y un 78-99%, respectivamente²⁶. Otra desventaja de este ensayo, es la elevada reactividad cruzada con la fosfatasa ácida de origen no prostático presente en el suero. También se describe la inestabilidad de la PAP, que requiere de una manipulación cuidadosa durante el ensayo para preservar sus características inmunológicas, así como, la presencia de variaciones diurnas en los niveles plasmáticos.

2.9.2 Calicreína humana de próstata

El aumento de los niveles de hK2 en el suero se asocia con la presencia del cáncer de próstata. No obstante, la concentración de este antígeno en suero no es proporcional al valor de PSA total. Este antígeno se encuentra en fase de investigación clínica, pues la hK2 a diferencia del PSA, es altamente expresada en las células cancerosas. Esta

diferencia se hace más pronunciada en las estirpes celulares pobremente diferenciadas y en las metástasis a los nódulos linfáticos³².

2.9.3 Antígeno específico de membrana

El antígeno específico de membrana (*PSMA*, siglas en inglés) es una glicoproteína de la membrana celular con 100 kDa de masa molecular, que se expresa en la neoplasia intraepitelial prostática, los tumores primarios y en la metástasis del CP. La concentración del PSMA en suero se eleva bajo estas condiciones, sin embargo, no ocurre así en los pacientes con BPH.

2.9.4 Gen “supresor” de tumor p53

El gen p53 es un gen “supresor” de tumores que codifica una proteína de 393 aa y 53 kDa de masa molecular, que está involucrada en la regulación del ciclo celular⁵². La pérdida de la actividad normal de la P53 está asociada con la carcinogénesis *in vivo*. Las alteraciones en el gen y en los niveles de la proteína son los cambios más comunes encontrados en los tumores humanos. Se ha descrito que la acumulación de esta proteína en el núcleo de la célula puede estar asociada con un estado avanzado del CP.

2.10 Manejo actual del diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata

La FDA aprobó el empleo de la determinación de PSA de conjunto con el DRE para el pesquiasaje de cáncer de próstata, en sujetos con 50 años o más. La combinación de ambos métodos permite definir qué pacientes deben someterse a una biopsia de próstata con el objetivo de realizar el diagnóstico positivo del tumor.

De igual forma, la FDA aprobó el empleo del ensayo de PSA para evaluar pacientes diagnosticados con un CP.

La pesquisa poblacional del cáncer de próstata debe tener en cuenta que un paciente con sospecha de padecer cáncer de próstata requiere ser evaluado con un ensayo de orina (para descartar la presencia de una infección), un TRUS para tener información del volumen de la próstata y las características de los tejidos adyacentes, y una citoscopia para evaluar la posible afectación de la vejiga.

La biopsia de próstata requiere de agujas para la toma de la muestra, un ultrasonido para guiar el proceder a los sitios de interés dentro del órgano y de un microscopio para, con el personal capacitado, realizar la evaluación de la misma.

De manera resumida las opciones terapéuticas en pacientes con cáncer de próstata se basan en criterios quirúrgicos, tratamientos hormonales, radioterapia y quimioterapia.

En caso de un diagnóstico positivo de CP, acorde a las guías prácticas en Oncología para el tratamiento de estos pacientes⁵³, en los EE.UU. se establecen las siguientes opciones:

1. A pacientes que por su calidad de vida, los años potenciales de vida y la evaluación clínica general, se le puede recomendar una fase de vigilancia y espera durante la cual se mantiene una evaluación periódica del PSA, de la sintomatología y en función de la evolución se toman otras decisiones terapéuticas. El CP es una enfermedad crónica, por lo que en el balance beneficio-riesgo se tienen en cuenta muchos factores que posibilitan ajustar de manera personalizada la conducta a seguir en cada caso.

2. Se debe considerar que un paciente en la fase de vigilancia y espera ha empeorado si en tres años o menos el PSA total se duplica, o en cualquier momento aparece un incremento de 0,75 ng/mL de PSA total.
3. De igual forma se debe considerar que una prostatectomía radical ha fallado si luego de la operación los valores de PSA no disminuyen a niveles no detectables o se detectan más de 0,3 ng/mL de PSA total en dos evaluaciones subsecuentes luego de haber estado indetectable en un período de tiempo.
4. En el caso de recibir radioterapia, acompañada o no de terapia hormonal, se considera que la terapia fracasa cuando los niveles de PSA total se incrementan por encima de 2 ng/mL desde valores indetectables o muy bajos.

Entre las limitaciones fundamentales de la medición del PSA se encuentran que en la pesquisa se pueden detectar tumores pequeños cuyo tratamiento no siempre conlleva a una ganancia de años de vida. Tampoco permite discernir entre los tumores más agresivos de la próstata.

Otra limitación es la aparición de casos falsos positivos, que generan ansiedad en los pacientes y gastos financieros. Solamente un 25 a 30% de los pacientes con un PSA elevado tienen un cáncer de próstata⁵⁴. También pueden aparecer casos falsos negativos, en los cuales los valores séricos de PSA son negativos y el paciente se encuentra afectado por un CP.

La pesquisa del cáncer de próstata, si bien se aplica en varios países, se mantiene como una medida controversial en los análisis de costo-beneficio. Los criterios en contra se fundamentan en que el cáncer de próstata es una enfermedad crónica con una evolución

de más de 10 años y que el tratamiento establecido conlleva complicaciones, por lo que el diagnóstico excesivo de CP empleando la pesquisa activa conlleva el riesgo de padecer complicaciones asociadas a la terapia, sin un beneficio real. Entre las complicaciones principales se pueden mencionar los sangramientos e infecciones que ocurren en los pacientes por el procedimiento de la biopsia, las incontinencias urinarias y disfunciones sexuales que frecuentemente ocurren en los procedimientos quirúrgicos (prostatectomía), y las complicaciones habituales relacionadas con la quimioterapia o radioterapia que pueden ser indicadas en estos casos. Hay que añadir los daños psíquicos que pueden producirse en los pacientes que se encuentren en la etapa de vigilancia y espera activa, puesto que en la población general la presencia de un cáncer se asocia a la certeza de muerte en un corto plazo de tiempo, por lo cual estos pacientes sufren la incertidumbre de padecer una enfermedad mortal.

Los beneficios de la pesquisa se encuentran en evaluación por el Instituto Nacional del Cáncer (EE.UU.) que realiza un ensayo a largo plazo en cuatro localizaciones tumorales: próstata, pulmón, colon y ovario. Esta investigación persigue evaluar el beneficio de la pesquisa en la reducción de la mortalidad asociada a estos tumores. En el caso de próstata se evalúa el beneficio de la pesquisa basada en la realización del tacto rectal y la determinación sérica de PSA total y libre.

Los resultados iniciales en los primeros siete años de seguimiento muestran que no hay una reducción en la mortalidad y se incrementó un 23% la cantidad de pacientes con cáncer de próstata en el grupo sometido a la pesquisa en comparación con el grupo control⁵⁵.

Este estudio muestra que se incrementa el número de pacientes diagnosticados y tratados por un cáncer de próstata sin recibir un beneficio en supervivencia. Sin embargo, no se puede excluir que el beneficio pueda ser demostrado en una evaluación a más largo plazo. El estudio se mantendrá hasta 13 años de evolución a los pacientes incluidos.

Por otra parte, el estudio europeo para la pesquisa de cáncer de próstata demostró un 20% de reducción en la mortalidad para los pacientes sometidos a la pesquisa con los ensayos de PSA. Los pacientes fueron seguidos por nueve años y emplearon un límite de detección de PSA total más bajo que en el estudio norteamericano (3 y 4 ng/mL, respectivamente). Para salvar una vida en el período estudiado fue necesario pesquisar 1 410 hombres y detectar 48 sujetos con CP⁵⁶.

2.11 Métodos para la purificación del PSA

La purificación del PSA es importante para el desarrollo de los patrones necesarios en los inmunoensayos cuantitativos de esta molécula. También, el PSA con alta pureza puede ser acoplado a un vehículo apropiado, e inyectado a un individuo con el objetivo de desarrollar una respuesta inmune capaz de destruir células que expresen este antígeno⁵⁷.

Las fuentes del PSA se pueden clasificar en naturales y recombinantes. Entre las fuentes del PSA natural, la que proporciona una cantidad mayor de la proteína es el semen, con valores entre 0,4 y 3 mg/mL. Otra fuente natural posible con relativa abundancia es el tejido prostático, para el cual se registran valores cercanos a 0,5 mg/g de tejido. También se ha publicado la obtención del PSA empleando como fuente primaria el sobrenadante del cultivo *in vitro* de la línea tumoral LNCaPs, derivada de un

tumor humano de la próstata, aunque la concentración del PSA en el sobrenadante es muy baja (entre 1 y 3 µg/mL).

En 1984, Chu y colaboradores⁵⁸ patentaron un procedimiento para la obtención del PSA desde el tejido prostático. El proceder contempla cuatro pasos básicos: extracción del tejido prostático, precipitación con sulfato de amonio y cromatografías secuenciales de intercambio iónico y de filtración en gel. Este procedimiento toma dos semanas de trabajo, su rendimiento es de apenas 0,5 g de PSA por cada 100 g de tejido empleado, lo que representa solo el 1% del PSA extraído del tejido prostático⁵⁹.

En la literatura se describen otros métodos de purificación del PSA. En sentido general, son procedimientos que implican cromatografías de filtración en gel⁶⁰ o intercambio iónico⁶¹, electroelución de la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio⁶² (PAGE-SDS), empleo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía líquida para la purificación rápida de proteínas (FPLC)⁶⁰, o matrices de Concanavalina A⁶³.

Schaller y colaboradores desarrollaron un método donde el plasma seminal se somete a dos cromatografías sucesivas de filtración en gel y las fracciones que contienen PSA se mezclan, son purificadas nuevamente y se someten a una cromatografía mediante FPLC⁶⁰.

El método originalmente patentado por Chu y colaboradores (ya descrito), fue modificado al emplear en el último paso de la purificación una cromatografía de intercambio iónico, con el consiguiente aumento del recobrado hasta lograr 1 a 2 mg/100 g de tejido⁵⁹.

En 1990, Stamey y colaboradores describieron un método en el cual sometieron el plasma seminal a una cromatografía de filtración en gel y sucesivamente dos cromatografías de intercambio iónico. Este proceso se extiende por cuatro días, y el rendimiento es de 45 mg/100 mL de plasma seminal⁶¹. Este método se empleó para purificar el patrón de la Universidad de Stanford, con el cual se han realizado las pruebas para comprobar la equimolaridad de los ensayos que cuantifican el PSA⁵⁰.

La purificación del PSA desde el sobrenadante de cultivo de la línea celular de cáncer de próstata LNCaPs, fue descrita por Jette y colaboradores⁶⁴. Para ello inmovilizaron una mezcla de dos AcMs anti-PSA en una columna de Sepharose 4B (Pharmacia), activada con bromuro de cianógeno. La elución se realizó con una disolución de glicina de concentración 100 mmol/L pH 2,5 y se obtuvo un recobrado de 1,37 mg de PSA a partir de un volumen de sobrenadante de 1,5 L.

Por otra parte, Tessmer y colaboradores electroeluyeron PSA del plasma seminal a partir de PAGE-SDS⁶². Con este procedimiento se obtuvieron valores de recobrado del 60%, en tres días.

En resumen, todos estos procederes resultan costosos, toman tres o más días, son técnicamente laboriosos y sus rendimientos son muy variables, además de presentar contaminaciones con la proteína hK2.

2.12 Generación de AcMs contra el PSA

La detección y cuantificación del PSA serológico requiere de potentes herramientas que permitan capturar, dentro de una mezcla de moléculas complejas, la proteína de interés.

Estas herramientas son los AcMs, que reconocen específicamente y con una afinidad determinada la molécula contra la que fueron generados.

La generación de AcMs mediante la fusión de linfocitos esplénicos con mielomas de una misma especie marcó una nueva era en el desarrollo de las ciencias biológicas. El descubrimiento realizado por Georges Köhler y Cesar Milstein entre los años 1974 y 1975 mientras estudiaban los mecanismos de control genético de la síntesis de inmunoglobulinas, ha permitido obtener preparaciones específicas, reproducibles e ilimitadas de anticuerpos con funciones predefinidas. Köhler y Milstein realizaban sus investigaciones fusionando células productoras de anticuerpos diferentes y determinando en cada caso las restricciones existentes en los híbridos obtenidos para la asociación de las cadenas pesadas y ligeras provenientes de cada célula fusionada.

La obtención de los AcMs no hubiera sido posible sin la existencia de un procedimiento que permitiera aislar las células híbridas generadas, con el objetivo de obtener a partir de una sola célula, una población homogénea de células idénticas que secretan anticuerpos con una misma especificidad, clase y afinidad. El clonaje, como se denomina este procedimiento, permitió obtener preparaciones bien caracterizadas y reproducibles de anticuerpos, sustituyendo casi totalmente las preparaciones policlonales anteriormente empleadas en la medicina, obtenidas mediante la inmunización repetida de varias especies de animales.

Las preparaciones policlonales tienen entre sus múltiples desventajas la heterogeneidad en su composición e irreproducibilidad producto de la diversidad de la respuesta inmune,

así como los problemas relacionados con la reactividad cruzada fundamentalmente cuando el antígeno es una molécula compleja⁶⁵.

Los AcMs son ampliamente utilizados en la caracterización de poblaciones celulares, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias, la purificación y caracterización de un gran número de moléculas, la detección y cuantificación de moléculas circulantes, la facilitación del trasplante de órganos y tejidos, y la catálisis de reacciones enzimáticas. Otra aplicación importante de los AcMs relacionada con los objetivos de este trabajo es en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los tumores malignos⁶⁵.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Seroteca

Sueros de mujeres sanas. Con el objetivo de demostrar la especificidad del ensayo de determinación del PSA total se analizaron 45 sueros de mujeres sanas, provenientes del Hospital Ginecobstétrico “Eusebio Hernández”.

Sueros de pacientes bajo sospecha clínica de cáncer de próstata. Se extrajo 1 mL de suero a 65 pacientes que acudieron a la consulta del Servicio de Urología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, La Habana. Estas muestras se emplearon para evaluar la correlación entre el ensayo para la determinación del PSA total, estandarizado en el presente trabajo y el sistema comercial CIS bio PSA total (Francia).

Panel de sueros de la Universidad de Stanford (Stanford, California): Este panel está aprobado por la Federación Internacional de Química Clínica (*IFCC*, siglas en inglés), y fue evaluado por el Comité Nacional de Estándares para los Laboratorios Clínicos (*NCCLS*, siglas en inglés) para determinar las características equimolares de los ensayos que cuantifican el PSA⁶⁶. El panel lo conforman nueve sueros previamente cuantificados por 10 sistemas comerciales equimolares⁵¹.

3.2 Patrones del PSA

El PSA comercial es una preparación de dicho antígeno con un nivel de pureza de ~90% (Biomira, Edmonton, Canadá) proveniente de la purificación a partir de plasma seminal. El método de obtención fue similar al descrito por Wang y colaboradores⁵⁹.

Se preparó una curva con dicho PSA (0,15 - 25 ng/mL) para ser utilizada como estándar secundario en los ensayos ELISA de doble anticuerpo para la cuantificación del PSA

total. La concentración del PSA en la preparación comercial se determinó mediante el empleo del estuche comercial CIS bio PSA total (CIS bio, Francia). Este ensayo inmunorradiométrico (*IRMA*, siglas en inglés), cuantifica de forma equimolar las diferentes formas moleculares del PSA en el suero, y presenta una alta correlación con el ensayo comercial Hybritech-E (EE.UU.), considerado como ensayo de oro para la cuantificación del PSA total. La concentración del PSA en el estándar secundario se estimó calculando la media de 20 ensayos⁶⁷.

Se utilizó la curva del sistema comercial CIS bio PSA total (0,9 - 100 ng/mL) como estándar para la cuantificación del PSA total en los ensayos ELISA desarrollados, con el objetivo de estudiar el reconocimiento equimolar. En el resto de los ensayos se empleó el estándar secundario.

3.3 Esquema de inmunización

Para la obtención de una respuesta policlonal dirigida al PSA, se emplearon dos fuentes de inmunógenos: plasma seminal y el PSA comercial.

El plasma seminal se obtuvo mediante la centrifugación a 250 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C) de una mezcla de semen de tres eyaculaciones de un voluntario sano. El sobrenadante (plasma seminal) se filtró por membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Amersham, Reino Unido). La concentración aproximada del PSA se calculó mediante la medición de la absorbancia de la muestra a 280 nm (el PSA es la proteína mayoritaria en este fluido), considerando el factor de extinción molar igual a 1.

Tanto el plasma seminal como el PSA comercial se conservaron a -70 °C.

Se inmunizaron cuatro ratones BALB/c con el objetivo de desarrollar una respuesta inmune contra el antígeno específico de próstata. El esquema de inmunización contó con un total de 11 dosis. La dosis inicial consistió en la inoculación subcutánea de 100 µg de plasma seminal (proteínas de este fluido) a cada ratón empleando el adyuvante completo de Freund. Posteriormente, los ratones recibieron siete dosis sucesivas (50 µg por ratón) de plasma seminal, por la misma vía pero empleando el adyuvante incompleto de Freund. Por último, se aplicaron tres dosis empleando el PSA comercial (10 µg por ratón) mezclado con adyuvante incompleto de Freund. Las dosis se aplicaron con un intervalo de 15 días entre cada una.

El ratón seleccionado para la fusión (ver más adelante), recibió una inmunización adicional intraperitoneal 72 y 24 horas antes de la fusión. La dosis seleccionada fue de 50 µg del PSA en H₂O destilada, con el objetivo de estimular a los linfocitos B del bazo a una nueva etapa de división celular, y aumentar la eficiencia de fusión bajo estas circunstancias⁶⁵.

3.3.1. Determinación de los títulos de anticuerpos anti-PSA en suero

Con el objetivo de seleccionar para la fusión celular el ratón con mayor respuesta policlonal de anticuerpos contra el PSA, se realizó un ELISA indirecto. Todos los reactivos químicos utilizados en los experimentos descritos fueron de calidad analítica.

Placas de poliestireno (PolySorp, Nunc, Alemania) se recubrieron con 100 µL/pozo del PSA a la concentración de 5 µg/mL en PBS (NaCl 140 mmol/L; KCl 270 mmol/L; KH₂PO₄ 1,5 mmol/L; Na₂HPO₄·2H₂O 6,5 mmol/L, pH 7,2), y se incubaron durante tres horas a 37 °C. Después del bloqueo de los posibles sitios libres, con 200 µL/pozo de leche

descremada al 1% (p/v) en PBS (PBS-L 1%), se adicionaron 100 μ L/pozo de los sueros de los ratones inmunizados, en diluciones seriadas 1:2 en PBS, partiendo de la dilución inicial 1:200. La placa se incubó una hora a 37 °C.

Después de lavar (cinco veces) con Tween 20 0,05% en PBS (PBS-T 0,05%), se añadió el conjugado comercial anti-inmunoglobulina IgG de ratón acoplado a peroxidasa (anti IgG-POD, Sigma, EE.UU.) a una dilución 1:5 000 en PBS-L 1%, y se incubó durante una hora a 37 °C. La reacción fue revelada, después del lavado, con 100 μ L/pozo de la disolución sustrato para ELISA (ortofenilendiamina 0,05%; H₂O₂ 0,015% en la disolución reguladora Na₂HPO₄·2H₂O 5,4 mmol/L; ácido cítrico monohidratado C₆H₈O₇·H₂O 24,3 mmol/L, pH 5,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C), y detenida con 50 μ L/pozo de la disolución H₂SO₄ 2,5 mol/L.

La densidad óptica (DO) del ensayo a 492 nm se determinó en el lector de placas ELISA Multiskan (Labsystems, Finlandia). Como control negativo del experimento se utilizó el suero de un ratón no relacionado. El título de anticuerpos se definió como la mayor dilución del suero que presentó una DO al menos tres veces superior al control negativo.

3.4 Generación de AcMs anti-PSA

3.4.1 Fusión celular y selección de híbridos positivos

Se realizó la fusión celular según los procedimientos convencionales, empleando como agente fundente polietilenglicol⁶⁵ (PEG 1 300 - 1 600, Sigma). Para ello se extrajeron 87 millones de linfocitos mediante la perfusión del bazo del ratón seleccionado, y se mezclaron, en presencia del PEG al 42% (p/v), con 10 millones de células de mieloma de la línea P3/x63.Ag8.653 (*American Tissue and Cell Colection*, ATCC, siglas en inglés)

mantenidas en la fase exponencial del crecimiento. Los híbridos resultantes fueron cultivados en placas de 96 pozos en presencia del medio selectivo HAT (Hipoxantina 0,1 mmol/L; Aminopterina 400 mmol/L y Timidina 0,016 mmol/L). A partir del cuarto día, se determinó la eficiencia de fusión como el porcentaje de los pozos con híbridos del total de pozos sembrados.

Los sobrenadantes de las células en crecimiento fueron ensayados, a una dilución 1:2 en PBS, mediante un ensayo tipo ELISA indirecto similar al descrito en la sección anterior, con el objetivo de seleccionar los pozos con hibridomas secretores de anticuerpos específicos para el PSA.

Se utilizó como control positivo del experimento el suero del ratón empleado en la fusión, diluido 1:3 000 y como control negativo el sobrenadante de cultivo de los hibridomas CB-Glut.1 (hibridomas que secretan AcMs específicos a las gliadinas del trigo).

3.4.2 Reconocimiento del PSA en solución

La capacidad de los anticuerpos anti-PSA, secretados por los híbridos, de reconocer el PSA en solución se estudió mediante un ensayo de competencia en formato ELISA. Se recubrieron placas de poliestireno con 100 µL/pozo de una disolución del PSA a 1 µg/mL en PBS durante tres horas a 37 °C, y se bloquearon de manera similar a lo descrito en la sección 3.3.1. A continuación, se pre-incubaron 100 µL del sobrenadante de cultivo de los híbridos resultantes de la fusión, con 100 µL de PSA natural a 1,0 µg/mL o 0 µg/mL en PBS, durante dos horas a 37 °C. La mezcla se añadió a la placa a razón de 100 µL/pozo, y se incubó durante una hora a 37 °C. Los pasos fueron similares a lo descrito en la sección 3.3.1. El ensayo se realizó al menos dos veces.

La inhibición del reconocimiento de los anticuerpos al PSA adherido a la placa en presencia de PSA en solución se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{1 - \text{DO muestra}}{\text{DO a } 0 \mu\text{g/mL de PSA}} \times 100$$

La señal disminuye si los anticuerpos reconocen el PSA en solución. Se fijó arbitrariamente que la inhibición ocurre en aquellas muestras donde el porcentaje de inhibición es mayor que un 70%.

3.4.3 Clonaje de los híbridos seleccionados

El clonaje de los híbridos positivos, de acuerdo a los resultados de los ensayos realizados a la fusión, se realizó por el método de la dilución limitante. Para considerar el clonaje exitoso se siguieron los requerimientos ya descritos por Gavilondo y colaboradores⁶⁵.

3.4.4 Reactividad cruzada de los AcMs generados

Se estudió la reactividad cruzada de los AcMs generados hacia antígenos no relacionados. Con este objetivo se recubrieron placas de poliestireno con 10 $\mu\text{g/mL}$ de los siguientes antígenos recombinantes: (a) p24 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), (b) Antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B (*HBcAg*, siglas en inglés), (c) Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (*HBsAg*, siglas en inglés), y (d) Proteína A de la membrana del *Treponema Pallidum* (*TMPA*, siglas en inglés), y como antígeno natural se empleó la albúmina de suero bovino (*BSA*, siglas en inglés). El control positivo fue el PSA a 1 $\mu\text{g/mL}$.

Después de incubar tres horas a 37 °C se bloquearon los sitios libres con 200 μL /pozo de PBS-L 1%. A continuación, se añadieron 100 μL /pozo de los sobrenadantes de cultivo

de los hibridomas secretores de AcMs anti-PSA (dilución 1:2 en PBS), y se incubó durante una hora a 37 °C. Los pasos restantes fueron similares a los descritos en la sección 3.3.1.

Se consideró que los AcMs presentaban reactividad cruzada en aquellos casos donde la DO del experimento fue dos veces mayor que la del control negativo (AcM no relacionado CB-Glut.1).

3.4.5 Purificación de los AcMs a partir del fluido ascítico de ratón

Los AcMs anti-PSA se purificaron a partir de la ascitis de ratones BALB/c mediante una cromatografía de afinidad Proteína A Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech AG, Suecia). Para la purificación se preparó una columna (1x10 cm) con 7 mL de Proteína A Sepharose CL-4B. Se equilibró la columna con tampón Glicina 1,5 mol/L; NaCl 3 mol/L, pH 8,9. Para el registro de la señal se empleó un detector (Uvicord S II, LKB, Islas Nassau) a 280 nm de longitud de onda y una sensibilidad de 1 unidad de absorbancia para la aplicación de la muestra de ascitis y 0,5 unidades de absorbancia para el resto de los pasos de la purificación y una velocidad constante del papel de 0,5 mm/min. La purificación se desarrolló a temperatura ambiente (20 a 25 °C) y todas las fracciones se conservaron a -20 °C.

En resumen, la ascitis se filtró a través de papel de filtro (Whatman, Reino Unido), y se diluyó 1:4 en la disolución tampón Glicina 1,5 mol/L; NaCl 3 mol/L, pH 8,9, antes de ser aplicada a la columna de afinidad a un flujo aproximado de 30 mL/h. La elución secuencial de los AcMs se realizó a 20 mL/h mediante un gradiente discontinuo de pH, empleando tampón ácido cítrico 0,1 mol/L desde pH 6 hasta pH 3⁶⁵.

3.5 Caracterización de los AcMs anti-PSA

3.5.1 Determinación de la subclase y constante de afinidad

La determinación de la subclase de los AcMs generados se realizó mediante un ELISA indirecto similar al descrito en la sección 3.3.1, en el que se emplearon diferentes conjugados comerciales (Sigma, EE.UU.) que reconocen específicamente cada subclase de IgG de ratón.

Los parámetros cinéticos de la interacción entre el PSA natural y algunos AcMs que lo reconocen (CB-PSA.2, CB-PSA.4, CB-PSA.8 y CB-PSA.9), se determinaron a través de la medición de la Resonancia Plásmica de Superficie⁶⁸ con el equipo BIAcore (BIAcore AB, Uppsala, Suecia). La superficie del sensor se recubrió con una preparación de anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el fragmento Fc de las IgG de ratón (Sigma) y se inyectaron los AcMs anti-PSA a una concentración de 100 µg/mL en el tampón diluyente (PBS-T 0,1%; EDTA 3,4 mmol/L). Finalmente, se inyectó el PSA natural a 20 µg/mL en el mismo diluyente y se registró la cinética de asociación–disociación del complejo.

Como control negativo, el proceso se realizó simultáneamente sobre un sensor recubierto de la misma manera, pero sin la adición de los AcMs anti-PSA. Las constantes de velocidad de las reacciones de asociación y disociación, así como las constantes de afinidad se calcularon de acuerdo al programa de evaluación de resultados adjunto al equipo BIAcore.

3.5.2 Biotinilación de los AcMs y el PSA

Se conjugó el PSA para su empleo en los experimentos de mapeo epitópico y captura del antígeno en solución por los AcMs generados. Acorde al mismo procedimiento, se conjugaron a biotina los AcMs generados CB-PSA.3, CB-PSA.6, CB-PSA.8 y CB-PSA.9, así como el AcM comercial Suresh 66 (control positivo), con el objetivo de evaluar su comportamiento en los ensayos ELISA de doble anticuerpo para la detección del PSA en suero.

Se dializaron 400 μ L de las muestras de AcMs y PSA, en dos litros de una disolución NaHCO_3 50 mmol/L, pH 8,5, durante 16 horas en agitación a 150 rpm (Belly Dancer, Sigma, EE.UU.), a 4 °C. Se realizó un cambio de la disolución transcurridas las dos primeras horas de diálisis.

Se diluyó aproximadamente 1 mg de NHS-biotina (Sigma, EE.UU.) en 75 μ L de dimetilsulfóxido (DSMO, Sigma) y se mezcló con los AcMs y el PSA previamente dializados, a una relación molar 50:1 (50 moles de biotina por mol de AcM o PSA). La mezcla se incubó en hielo, con agitación a 150 rpm, durante tres horas. Después de concluida la incubación, se repitió la diálisis bajo las mismas condiciones, con el objetivo de eliminar el exceso de biotina libre. Finalmente las muestras se envasaron y conservaron a 4 °C.

3.5.3 Determinación del límite de detección del PSA en la captura

Se recubrieron placas de poliestireno con 100 μ L/pozo de los AcMs anti-PSA desarrollados, a 5 μ g/mL en PBS, y se incubaron durante tres horas a 37 °C. Después de bloquear la placa con BSA 1% (p/v) en PBS (PBS-BSA 1%) durante una hora a

37 °C, se añadieron concentraciones del PSA biotinilado (PSA-biotina) entre 0,4-30 ng/mL en PBS-BSA 0,1% y se incubó una hora a 37 °C. A continuación del lavado con PBS-T 0,05%, se añadió el conjugado comercial estreptavidina-peroxidasa (ST-POD, Amersham), dilución 1:1 500 en PBS-BSA 0,1%, y se incubó durante una hora a 37 °C. La reacción se reveló, después de lavar, acorde a lo descrito en la sección 3.3.1.

El límite de detección se determinó como la concentración de PSA-biotina que se detectó con un valor de DO al menos tres veces superior al control negativo. Se utilizó como control negativo el CB-Glut.1 y como control positivo el AcM comercial de captura Suresh 66.

3.5.4 Caracterización epitópica de los AcMs generados

Con el objetivo de determinar las regiones antigénicas de la molécula del PSA reconocidas por los AcMs generados, se desarrolló un ELISA de competencia. El recubrimiento y bloqueo de la placa se realizó de modo similar a lo descrito en la sección anterior. A continuación, se pre-incubaron durante una hora a 37 °C, 100 µL del conjugado PSA-biotina a 25 y 100 ng/mL con 100 µL de los AcMs purificados, a las siguientes concentraciones: (a) 0 (máxima señal); (b) 0,5; (c) 1 y (d) 2 µg/mL. Posteriormente, se añadieron 100 µL de las muestras a cada pozo, y la placa se incubó durante una hora a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS-T 0,05%, y se incubaron 40 minutos a 37 °C con el conjugado ST-POD, dilución 1:5 000 en PBS-BSA 0,1%. Los pasos siguientes, a partir de la adición del sustrato, fueron similares a los descritos en la sección 3.3.1.

Las muestras se analizaron por duplicado y el ensayo se repitió al menos dos veces.

El valor del porcentaje de inhibición se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{1 - \text{DO muestra}}{\text{DO a } 0 \mu\text{g/mL de PSA}} \times 100$$

Se fijó arbitrariamente que si el porcentaje de inhibición del experimento es mayor que 70% para las tres variantes de concentración de AcMs empleadas, el AcM de captura y el AcM en solución, reconocen un mismo epítipo o un epítipo cercano en la molécula del PSA.

Con el objetivo de determinar la naturaleza conformacional o secuencial de los epítipos reconocidos por los AcMs en el PSA se realizó un experimento de transferencia puntual (*Dot Blot*).

Se fijó a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) aproximadamente 1 µg de PSA por pozo, en las siguientes condiciones:

Variante A. 50 µL/pozo del PSA a 20 µg/mL en PBS (PSA nativa).

Variante B. 50 µL/pozo del PSA a 20 µg/mL en una disolución de PBS-Betamercaptoetanol al 2,5% (v/v), incubada a 90 °C durante 10 minutos (PSA desnaturalizada).

Se utilizó como antígeno no relacionado la BSA a 20 µg/mL en una disolución semejante a la de la variante A.

Posteriormente se bloqueó la nitrocelulosa con una disolución de PBS-L 2% durante 16 horas, se cortó en tiras y cada tira se incubó con uno de los siguientes AcMs: CB-PSA.1 al CB-PSA.9, el AcM comercial Suresh 66 (control positivo: reconoce un epítipo

conformacional), o el CB-glut.1 (control negativo) a 5 µg/mL en PBS. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron en agitación (100 rpm) a 37 °C durante una hora (Belly Dancer, Sigma, EE.UU.). Después de realizar cinco lavados con PBS-T 0,1%, se añadió el conjugado anti IgG-POD a una dilución 1:1 000 y se incubó como se procedió en el paso anterior. Finalmente, después de repetir el lavado, se adicionó la disolución sustrato (Diaminobencidina 0,05%; H₂O₂ 0,05%; en PBS). La reacción se detuvo al eliminar el sustrato mediante lavados con H₂O destilada.

3.6 Desarrollo de un ELISA de doble anticuerpo para la detección del PSA total en suero

Los AcMs CB-PSA.3, CB-PSA.6, CB-PSA.8, CB-PSA.9, CB-PSA.10 y CB-PSA.11 conjugados a biotina se ensayaron como trazadores para detectar PSA total mediante un ELISA de doble anticuerpo con el AcM CB-PSA.4 (seleccionado como anticuerpo de captura) en el recubrimiento.

En cada variante, el AcM CB-PSA.4 se fijó a las placas de poliestireno a razón de 100 µL/pozo a varias concentraciones (1, 5, 10 y 15 µg/mL en PBS), y se incubó 16 horas a 4 °C. El bloqueo de los sitios libres fue similar al descrito en la sección 3.5.3. Como muestra se empleó el estándar secundario del PSA a concentraciones entre 0,15-25 ng/mL de PSA en PBS-BSA 0,1% y se incubó a razón de 50 µL/pozo durante una hora a 37 °C. Después de lavar con PBS-T 0,05% (cinco lavados manuales), las placas fueron incubadas con el AcM trazador conjugado a biotina en un rango de concentraciones desde 0,25 a 5 µg/mL. Finalmente se adicionó el conjugado ST-POD dilución 1:4 000 y la placa se incubó una hora a 37 °C. La reacción fue revelada después

del lavado, con la disolución sustrato para ELISA previamente descrita, y detenida con H_2SO_4 2,5 mol/L a los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

Se definió el límite de detección de cada variante como la concentración de PSA que produjo un valor de DO tres desviaciones estándar (DE) por encima del valor de DO correspondiente al "0" de la curva (PBS-BSA 0,1%). La sensibilidad analítica para cada ensayo se determinó como la pendiente de la curva (ajuste lineal) para un rango de concentraciones dado. Las muestras se analizaron por duplicado y el ensayo se realizó al menos cinco veces.

El CB-PSA.4 en el recubrimiento, con el AcM CB-PSA.9 o CB-PSA.8 conjugados a biotina como anticuerpos trazadores, se ensayó a diferentes tiempos de incubación de la curva PSA y del conjugado (15, 40 y 60 minutos). El resto de los pasos para este ensayo fueron similares a los descritos en el párrafo anterior.

3.6.1 Caracterización del sistema ELISA desarrollado

Con el objetivo de estudiar las características del ELISA de cuantificación del PSA total, se determinaron las concentraciones del PSA presentes en el suero de 65 pacientes que asistieron a la consulta del Servicio de Urología del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, La Habana. Los sueros fueron evaluados paralelamente mediante el sistema comercial PSA total de CIS bio, acorde con las recomendaciones del fabricante. Las muestras se clasificaron mediante ambos sistemas, de acuerdo a los valores del PSA total, en tres intervalos de concentraciones (menores de 4 ng/mL, entre 4 y 10 ng/mL, y mayores de 10 ng/mL).

Las placas se recubrieron con el AcM CB-PSA.4 a 5 µg/mL y se incubaron 16 horas a 4 °C. Después del bloqueo con PBS-BSA 1% durante una hora a 37 °C, se añadieron 50 µL de la curva del estándar secundario del PSA a concentraciones entre 0,15-25 ng/mL en PBS-BSA 0,1%, y en otros pocillos 50 µL de los sueros a ensayar. La placa se incubó una hora a 37 °C. Se adicionó el AcM CB-PSA.9 conjugado a biotina (CB-PSA.9-biotina) a 0,5 µg/mL en PBS-BSA 0,1% y se incubó durante 40 minutos a 37 °C. Finalmente se añadió el conjugado ST-POD dilución 1:4 000. Los pasos siguientes del ensayo, así como todos los lavados, se realizaron de acuerdo a lo descrito en el experimento anterior.

Las muestras con concentraciones elevadas del PSA (por encima del límite superior de la curva) se diluyeron en PBS-BSA 0,1%.

Con vistas a demostrar el reconocimiento equimolar del ensayo hacia las diferentes formas moleculares del PSA en el suero, se determinaron las concentraciones del PSA en nueve sueros controles. Estos sueros forman parte del estudio de estandarización de los sistemas PSA total de la IFCC realizados por Rafferty y colaboradores, constituyéndose desde el año 2000 en el criterio de oro para la selección de los sistemas equimolares⁵¹. Los sueros del panel fueron evaluados con nueve sistemas comerciales: (1) Hybritech Tamden PSA (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, Estados Unidos), (2) Enzymun (Boehringer Mannheim, Alemania), (3) Abbot IMx (Illinois, Estados Unidos), (4) Cis Bio PSA-RIACT (Gif-sur-Yvette, Francia), (5) Immunotech IRMA (República Checa), (6) Kulpe J (sistema casero), (7) Tosoh PSA (Japón), (8) Immunolite

PSA (Siemens, Alemania), (9) Fulla Y (ensayo casero, Francia). Los resultados de nuestro ensayo fueron comparados con los descritos en este estudio.

La especificidad del sistema se estudió mediante la determinación de los valores del PSA total en el suero de 45 mujeres sanas con las mismas condiciones del ensayo ELISA antes mencionado. Estos sueros fueron previamente evaluados con el sistema comercial CIS bio PSA total y se obtuvieron valores por debajo del límite de detección (LD) para este ensayo (0,9 ng/mL).

Finalmente, se determinaron los coeficientes de variación intraensayo e interensayo (estudio de precisión) del ELISA PSA total desarrollado. Para ello se adicionaron a la placa 50 µL/pozo de cada una de las siguientes concentraciones (baja, media y alta, respectivamente) del PSA: (a) 1 ng/mL, (b) 5 ng/mL y (c) 10 ng/mL en PBS-BSA 0,1%. El coeficiente de variación (CV) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{DE}{\bar{x}} \times 100$$

Donde: DE y \bar{x} son las desviaciones estándar y el promedio de cada concentración ensayada, respectivamente.

Para determinar el CV intraensayo se realizaron 20 réplicas de cada una de las concentraciones antes descritas, y para el cálculo del CV interensayo (5 réplicas de cada muestra) se repitió cinco veces el ensayo.

3.7 Desarrollo de un ELISA de doble anticuerpo para la detección del PSA libre en suero

Los pocillos fueron recubiertos con los AcMs CB-PSA.4, CB-PSA.8 y CB-PSA.9 y luego se bloquearon de manera similar a lo mencionado en la sección 3.5.3. En cada variante,

el AcM se fijó a las placas de poliestireno a razón de 100 μL /pozo a varias concentraciones (1, 5, 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS) y se incubó 16 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$. Como muestra, se empleó el estándar secundario del PSA a concentraciones entre 0,15-25 ng/mL de PSA en PBS-BSA 0,1% y se incubó a razón de 50 μL /pozo durante una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$. Después de lavar con PBS-T 0,05% (cinco lavados manuales), las placas se incubaron con el AcM trazador CB-PSA.2 conjugado a biotina, a concentraciones diferentes (desde 0,25 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Finalmente, se adicionó el conjugado ST-POD dilución 1:4 000 y la placa se incubó una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$. La reacción fue revelada después del lavado, con la disolución sustrato para ELISA previamente descrita, y detenida con H_2SO_4 2,5 mmol/L a los 10 minutos de incubación a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$).

Se definió el límite de detección de cada variante como la concentración de PSA que produjo un valor de DO, tres DE por encima del valor de DO correspondiente al "0" de la curva (PBS-BSA 0,1%). La sensibilidad analítica para cada ensayo se determinó como la pendiente de la curva (ajuste lineal) para un rango de concentraciones dado. Las muestras se analizaron por duplicado y el ensayo se realizó al menos cinco veces.

3.8 Purificación del PSA a partir del plasma seminal

3.8.1 Selección del AcM y el mejor agente de elución

Con el objetivo de realizar la purificación del PSA, se realizó un experimento de inmunoafinidad en placa para seleccionar la mejor variante de AcM y elegir el mejor agente de elución.

Se recubrieron placas de poliestireno (Nunc, Costar Medium Binding, EE.UU.) con 100 μL de los AcMs CB-PSA.1, CB-PSA.2, CB-PSA.4, CB-PSA.5, CB-PSA.6, CB-PSA.8 y CB-PSA.9 a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS, y se incubaron durante 16 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$. Después de lavar (cinco lavados manuales) con $\text{H}_2\text{O}/\text{Tween 20}$ 0,05%, se bloqueó a razón de 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ con PBS-BSA 1% durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. La placa se incubó con 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ del conjugado PSA-biotina a 40 ng/mL durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Después del lavado, similar al anterior, se adicionaron 200 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de una de las siguientes soluciones: (a) MgCl_2 2 mol/L pH 5,6; (b) glicina 0,2 mmol/L pH 3,5; (c) Tris 20 mmol/L pH 11,6; (d) Urea 8 mol/L pH 9; (e) KSCN 3 mol/L y (f) PBS. Cada variante se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}\text{C}$) en agitación continua a 100 rpm. El conjugado ST-POD y la disolución sustrato se emplearon acorde a lo descrito en la sección 3.6.1.

Para este ensayo, se consideró como condición de elución mínima, aquella que se produjo en PBS (control negativo), por tanto la DO obtenida será máxima. En consecuencia, los resultados del experimento se expresaron para cada AcM como:

$$\text{Porcentaje de elución} = \frac{1 - \text{DO muestra}}{\text{DO a 0 } \mu\text{g}/\text{mL de PSA}} \times 100$$

3.8.2 Inmovilización en la matriz Sepharose 4B del AcM anti-PSA seleccionado

El AcM anti-PSA seleccionado fue purificado a partir de líquido ascítico y se acopló a la matriz Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno a 5 mg de AcM por mg de gel seco, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Pharmacia Biotech AG, Suecia). Para ello, se mezclaron 5 mL del AcM (~3,6 mg/mL), previamente dializado en la disolución de acoplamiento ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,1 mol/L ; NaCl 0,5 mol/L , pH 8,3), con

3,5 mL del gel hidratado y reactivado, en la misma disolución de acoplamiento. La mezcla se incubó durante tres horas a temperatura ambiente (20-25 °C) en agitación continua a 100 rpm. A continuación se procedió a bloquear los sitios libres de la matriz con glicina 1 mmol/L pH 8, durante una hora en las mismas condiciones de agitación. Finalmente, se realizó una corrida en blanco con las soluciones que se emplearon en la purificación, para eluir la fracción de AcMs que no se acopló a la columna.

La cantidad de AcM anti-PSA inmovilizado (índice de inmovilización) se determinó acorde a la recomendación del fabricante mediante: Porcentaje de AcM anti-PSA inmovilizado

$$\text{inmovilizado} = \frac{\text{mg AcM anti-PSA añadidos}}{\text{mg no unidos}} \times 100$$

$$\text{AcM anti-PSA no unido (mg/mL)} = 1,55 \times DO_{280\text{nm}} - 0,76 \times DO_{260\text{nm}}$$

3.8.3 Purificación del PSA por cromatografía de inmunoafinidad

Para la purificación se preparó una columna (1x10 cm) con 5 mL del AcM anti-PSA seleccionado inmovilizado en Sepharose 4B. Se equilibró la columna con Na_2HPO_4 10 mmol/L, pH 7,2. Para el registro de la señal se empleó un detector (Uvicord S II, LKB, Islas Nassau) a 280 nm de longitud de onda y una sensibilidad de 0,5 unidades de absorbancia en toda la corrida y una velocidad del papel de 0,5 mm/min. La purificación se desarrolló a temperatura ambiente (20 a 25 °C) y todas las fracciones se conservaron a -20 °C.

La muestra de partida para la purificación del PSA consistió en una mezcla de semen proveniente de 10 pacientes del Instituto de Endocrinología “Manuel Fajardo”

(La Habana) sometidos a un estudio de fertilidad. La mezcla se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la purificación.

Con el objetivo de preparar la muestra para el proceso de purificación se centrifugó a 250 g durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante (plasma seminal) con un volumen aproximado de 10 mL, se diluyó 1:5 en Na_2HPO_4 10 mmol/L, pH 7,2 (tampón de acoplamiento), y se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius, Alemania). El material a purificar se aplicó a la columna a un flujo de 20 mL/h. Después de realizar dos lavados secuenciales a 30 mL/h con NaCl 2,5 mol/L pH 8 y MgCl_2 1 mol/L pH 5,5, el PSA adsorbido a la matriz se eluyó con MgCl_2 2 mol/L pH 5 a 30 mL/h.

La concentración del PSA en la muestra de partida y en cada una de las fracciones de la purificación, se determinó mediante el ELISA descrito en la sección 3.6.1.

La pureza de la proteína en cada fracción se determinó mediante la técnica de SDS-PAGE al 12,5%, empleando el programa de aplicación ManagerVer 2.0 (Bio Rad, EE.UU.).

La masa de AcM contaminante en las fracciones (por desprendimiento desde la matriz cromatográfica) se estimó mediante un ensayo tipo ELISA⁶⁹. Para ello se recubrió una placa de poliestireno con anticuerpos policlonales tipo IgG de carnero anti-IgG de ratón durante 16 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de bloquear los sitios libres de modo similar a lo descrito en la sección 3.5.3, se adicionaron las fracciones eluidas durante la purificación. Finalmente la placa se incubó con la misma preparación policlonal de carnero anti-IgG

de ratón unido a la POD (Sigma). La reacción fue revelada de acuerdo a lo descrito en la sección 3.6.

Las fracciones de la purificación se analizaron mediante Western Blot. Para ello, se realizó una SDS-PAGE al 12%, y las proteínas fueron transferidas (Electroforesis Power Supply, Pharmacia-LKB, Suecia) a una membrana de nitrocelulosa (RPN203E Amersham, EE.UU.) a 24 mV. Después de realizada la transferencia, se bloquearon los sitios libres de la membrana con PBS-L 2% durante 16 horas a 4 °C, y se adicionó el AcM CB-PSA.4 a 5 µg/mL, incubando una hora a 37 °C en agitación a 100 rpm. Los pasos siguientes fueron similares a los realizados en el Dot Blot descrito en la sección 3.5.4. Como control positivo del experimento se utilizaron 20 µg del PSA comercial.

3.9 Análisis estadísticos

Con los valores obtenidos de la fusión celular, se estimaron los intervalos de confianza al 95%, que permiten contar con un rango de valores entre los cuales se puede esperar se encuentre el porcentaje de positividad.

Se realizaron modelos de regresión lineal a las curvas de concentración de PSA obtenidas en los ensayos de PSA total y libre.

Para el estudio de equimolaridad, considerando que los valores estimados se derivan de dos réplicas, tamaño de muestra numéricamente pequeño, se estimaron los intervalos de confianza desde el punto de vista bayesiano⁷⁰, basado en simulaciones de datos cuya distribución converge a la media de la concentración calculada. Se compararon los intervalos estimados con los rangos de los ensayos comerciales a través de los puntos de intersección.

Se usó el software EPIDAT versión 3.1 (Dirección de Sanidad, España), programa para análisis epidemiológico de datos tabulados.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Generación de los AcMs anti-PSA de ratón. Técnica de fusión celular para la obtención de hibridomas secretores

El PSA se encuentra generalmente a 1 mg/mL en el fluido seminal³¹. El empleo del plasma seminal como inmunógeno para la generación de hibridomas secretores de AcMs no ha sido descrito previamente; solo se han descrito inmunizaciones con PSA semipurificado a partir del semen, con un porcentaje de pureza cercano al 70%⁷¹, con el propósito de generar anticuerpos monoclonales. La presencia del resto de las proteínas del plasma seminal en la muestra utilizada en nuestra experimentación puede potenciar una respuesta inmune diferente en los ratones, al enfrentarse su sistema inmune a un grupo complejo de antígenos humanos adyuvados. Considerando dicha posibilidad, se diseñó un esquema de dosis múltiples por encima del patrón habitual y las evaluaciones del título de respuesta se realizaron con un PSA de muy alto grado de pureza, evitando en las evaluaciones la detección de respuesta contra otros antígenos del plasma seminal.

Producto de las dosis repetidas de inmunización con el plasma seminal se obtuvieron ratones BALB/c hiperinmunes al PSA (títulos > 1/800), lo que soporta la utilidad del semen como inmunógeno para antígenos contenidos en este líquido corporal. Se seleccionó el ratón #3 para la fusión celular (Figura 1), pues presentó el mayor título sérico de anticuerpos policlonales tipo IgG dirigidos contra el PSA (1/9 600).

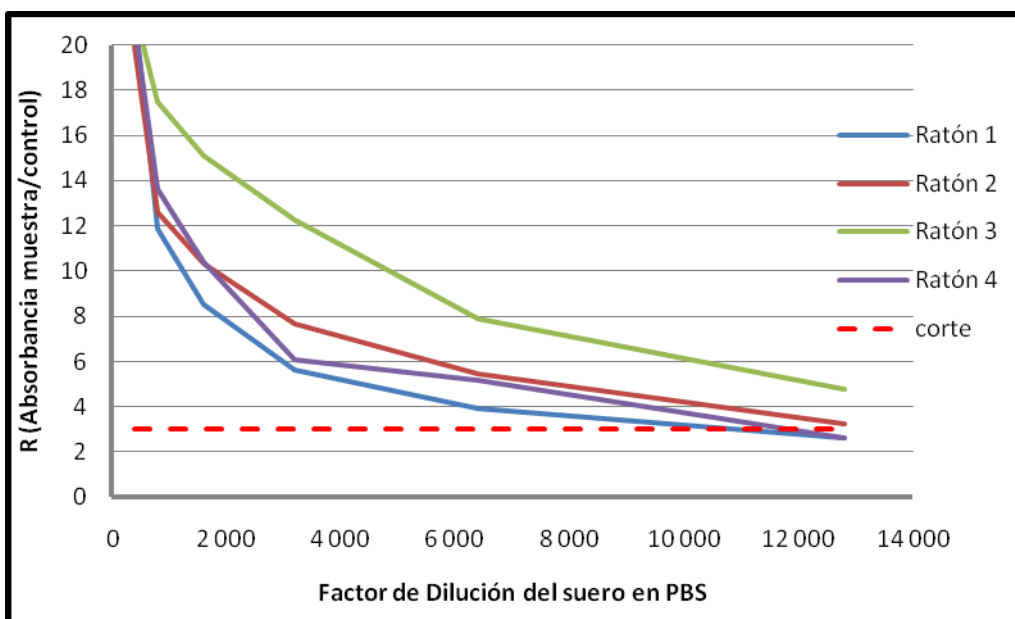


Figura 1. Título de anticuerpos IgG anti-PSA en ratones

Leyenda: R, relación de la absorbancia (492 nm) de las diluciones del suero en PBS y el valor de un suero de un ratón no inmunizado.

Para la obtención de los hibridomas secretores de AcMs anti-PSA, se realizó la fusión celular. La fusión celular presentó un 100% de eficiencia y del total de pocillos ensayados empleando un ELISA indirecto para detectar secreción de IgG anti-PSA, descrito en el capítulo de Materiales y Métodos 3.4.1, el 6,5% resultó positivo (76 pocillos de 1 154 ensayados, IC 95%: 5,1-8,1). Solo 22 de los 76 originalmente positivos (1,9% del total original, IC 95%: 1,1-2,7) se mantuvieron positivos en posteriores evaluaciones y expansiones, considerando a estos clones los secretores estables de IgG anti-PSA (Tabla 3).

Entre los híbridos positivos estables en placas de 24 pocillos, se seleccionaron 17 para el clonaje y finalmente se obtuvieron 11 clones estables secretores de anticuerpos anti-PSA (Tabla 3). Los híbridos escogidos poseían la capacidad de secretar anticuerpos IgG

que reconocían el PSA fijado al soporte sólido con una DO, como mínimo, tres veces por encima de la DO del control negativo. Se realizaron purificaciones de los clones inoculados en la cavidad peritoneal de los ratones BALB/c, tomando la ascitis como material de partida. En todos los casos se obtuvieron porcentajes de purificación superiores al 95% y concentraciones de 1 mg/ml.

Tabla 3. Resultados alcanzados en la evaluación de la fusión celular

	Fusión celular	Clones estables	Hibridomas
N	1 154	76	17
Positivos	76	22	11
Porcentaje (%)	6,5	1,9	0,9
IC 95%	(5,1 – 8,1)	(1,1 – 2,7)	(0,3 – 1,6)

Leyenda: N, total de pocillos evaluados de la fusión celular o clones expandidos para evaluar los clones estables u obtener hibridomas; Porcentaje, se basa sobre el total de pocillos con células, obtenidos en la fusión celular (1 154); IC, Intervalo de confianza.

4.2 Caracterización funcional del panel de anticuerpos monoclonales

Se realizó la caracterización de los AcMs generados, determinando la subclase, la constante de afinidad y la capacidad de captura del PSA en solución. Los AcMs se clasificaron en grupos de acuerdo a los resultados de la competencia epitópica y se determinó el tipo de epítipo (conformacional o secuencial) reconocido por ellos.

4.2.1 Caracterización del reconocimiento de los AcMs anti-PSA

Con el objetivo de identificar el reconocimiento preferencial hacia el PSA en solución o fijado al soporte sólido, se diseñó un ELISA competitivo (ver sección 3.4.2), en el cual los sobrenadantes de cultivo se pre-incubaron con una concentración fija del PSA, y esta mezcla se añadió a la placa de ELISA que tenía el PSA previamente fijado. En tres casos (híbridos correspondientes a los clones finales CB-PSA.1, CB-PSA.2 y

CB-PSA.11) los anticuerpos secretados reconocieron preferencialmente el PSA adherido a la placa, mientras que los ocho híbridos estables restantes, contenían anticuerpos capaces de reconocer preferencialmente al antígeno en solución, lo que permitió establecer grupos de AcMs según el patrón preferencial de reconocimiento al PSA.

4.2.2 Subclase de los AcMs

La subclase de los AcMs generados se determinó mediante un ELISA indirecto que se basó en el empleo de conjugados comerciales específicos para cada subclase IgG de ratón. En la evaluación de la fusión se empleó un conjugado que reconoce específicamente la región constante de la IgG murina, sin reactividad cruzada con otras subclases. Todos los AcMs anti-PSA obtenidos fueron de la subclase IgG1, que se corresponde con la más frecuente entre las subclases de IgG de ratón. La subclase de anticuerpo obtenida también se relaciona con el tipo de inmunógeno, la frecuencia y ruta de las inmunizaciones, factores que pueden influir en el tipo y subclase de anticuerpo generado⁶⁵.

4.2.3 Determinación de la afinidad y el límite de detección para los AcMs anti-PSA

Los cálculos de afinidad arrojaron valores por encima de 10^8 L/mol para los AcMs ensayados (Tabla 4). Las constantes de afinidad calculadas para los AcMs evaluados estuvieron comprendidas entre los valores descritos en la literatura²⁸ (10^7 a 10^9 L/mol), e incluso el AcM CB-PSA.9 presentó una afinidad mayor (10^{10} L/mol) a lo descrito para anticuerpos anti-PSA.

El límite de detección se calculó mediante un ELISA en el cual cada AcM adherido a la fase sólida se incubó con una curva de PSA-biotina (0,4 a 30 ng/mL). El AcM CB-PSA.4

detectó la concentración límite ensayada con valores de DO similares a los obtenidos con el AcM Suresh 66. El AcM Suresh 66 se utiliza adherido al soporte sólido de un sistema comercial⁷¹. El resto de los AcMs generados detectaron valores de PSA-biotina iguales o mayores que 0,8 ng/mL.

Tabla 4. Valores de constante de afinidad y límite de detección en la captura de PSA-biotina de los AcMs anti-PSA generados y los comerciales Suresh 10, Suresh 30 y Suresh 66.

AcMs	Constante de afinidad (L/mol)	Límite de detección^a (ng/mL)
CB-PSA.1*	N.R	7
CB-PSA.2*	1,3 x 10 ⁹	1,8
CB-PSA.3	N.R	3,3
CB-PSA.4	3,7 x 10 ⁹	0,4**
CB-PSA.5	N.R	7
CB-PSA.6	N.R	1,3
CB-PSA.7	N.R	3,3
CB-PSA.8	6 x 10 ⁹	3,3
CB-PSA.9	4,7 x 10 ¹⁰	0,8
CB-PSA.10	N.R	13
CB-PSA.11*	N.R	3,3
Suresh 10	N.R	1,3
Suresh 30	N.R	13
Suresh 66	6,9 x 10 ⁹	0,4**

Leyenda: ^a El límite de detección del ensayo con PSA-biotina se corresponde con la menor concentración de PSA-biotina detectada con un valor de DO a 492 nm al menos tres veces mayor que el control negativo; *, reconocen preferencialmente el antígeno PSA adherido a la placa; **, al menos detectan esa concentración; N.R., No realizado.

4.2.4 Competencia de los AcMs en el reconocimiento del PSA. Tipo de epítipo reconocido

Los AcMs anti-PSA se clasificaron en grupos de acuerdo con los resultados de los ensayos de inhibición realizados en formato ELISA. En estos ensayos se pre-incubaron diferentes concentraciones de los AcMs con el conjugado PSA-biotina y se adicionaron a una placa recubierta con 5 µg/mL de cada AcM. La inhibición del reconocimiento del complejo antígeno-anticuerpo en solución por el AcM de captura se determinó de acuerdo a lo descrito en la sección 3.5.4 del capítulo de Materiales y Métodos. Se incluyeron dentro de un mismo grupo aquellos AcMs que al unirse al antígeno en solución, produjeron una inhibición por encima del 70%.

La clasificación de los AcMs generados y de algunos comerciales en correspondencia con los resultados de los experimentos de inhibición se recoge en la tabla 5. La clasificación en cinco grupos como resultado de experimentos de inhibición semejantes se ha descrito anteriormente para un panel de AcMs anti-PSA obtenidos por diferentes laboratorios⁷².

Tabla 5. Clasificación de los AcMs anti-PSA acorde a los epítipos reconocidos en el PSA

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Suresh 66*	Suresh 30**	Suresh 10*	CB-PSA.9 (S)	CB-PSA.3
CB-PSA.4 (S)	CB-PSA.2	CB-PSA.8	CB-PSA.6 (S)	CB-PSA.10
CB-PSA.1			CB-PSA.7 (S)	CB-PSA.11
CB-PSA.5				

Leyenda: AcMs comerciales que reconocen: *PSA total, ** PSA libre; (S), epítipo secuencial.

Los cinco grupos de AcMs obtenidos se corresponden con el número de regiones epitópicas de la molécula del PSA que son reconocidas por nuestro panel de AcMs. La competencia dentro de cada grupo puede ocurrir debido a uno de los siguientes eventos: (a) los AcMs (AcM pre-incubado con PSA-biotina y AcM de captura) reconocen el mismo epítipo, (b) los AcMs reconocen epítopos solapados, o (c) reconocen epítopos cercanos en la molécula del PSA⁶⁸.

Los AcMs incluidos en el grupo 1 (Tabla 5) pueden ser utilizados para la detección del PSA total. Estos AcMs compitieron con el AcM comercial Suresh 66, que reconoce el PSA total.

El AcM CB-PSA.2 compitió con el AcM comercial Suresh 30 (reconoce PSA libre), por lo cual seleccionamos el CB-PSA.2 para evaluar la detección del PSA en su forma libre.

Por otra parte, Wan y colaboradores demostraron que solo un grupo epitópico de la molécula del PSA, entre los seis grupos epitópicos descritos por ellos, permanece oculto en el complejo PSA-ACT²⁸, mientras los cinco grupos restantes son reactivos a sus AcMs específicos. Por lo tanto, los AcMs incluidos en los grupos 1, 3, 4 y 5 pueden ser utilizados potencialmente para la detección del PSA total considerando que el AcM del grupo 2 sea el único obtenido con un epítipo relacionado con el PSA libre.

Otros estudios similares de caracterización epitópica de la molécula del PSA desarrollados por Corey y colaboradores⁷², demuestran la existencia de epítopos de naturaleza diferente (secuencial o conformacional) dentro de una misma zona antigénica. Corey y colaboradores clasificaron un panel de 10 AcMs en cinco grupos de acuerdo a sus posibilidades de constituir parejas en un ELISA de doble anticuerpo, y posteriormente, definieron la naturaleza del epítipo reconocido por ellos en

experimentos de Western Blot, en condiciones reductoras y no reductoras. Los resultados demostraron que en uno de los grupos existían AcMs que reconocían epítopos secuenciales y conformacionales.

Con el objetivo de clasificar el tipo de epítipo (conformacional o secuencial) reconocido por cada AcM del panel obtenido, se determinó el reconocimiento de los AcMs generados al PSA en condiciones desnaturalizantes y no desnaturalizantes.

Acorde con los resultados experimentales, los AcMs CB-PSA.4, CB-PSA.6, CB-PSA.7 y CB-PSA.9 reconocieron epítopos secuenciales en la molécula del PSA (Figura 2). Estos AcMs detectaron el PSA con una intensidad similar tanto en la molécula en su conformación nativa, como en la condición desnaturalizada. Los AcMs restantes reconocieron epítopos conformacionales (CB-PSA.1, CB-PSA.2, CB-PSA.3, CB-PSA.5, y CB-PSA.8). Este experimento confirma que en cada grupo descrito en la tabla 5 se pueden incluir AcMs que reconocen diferentes epítopos, aunque cercanos o solapados, tal es el caso del AcM CB-PSA.4, que reconoce un epítipo secuencial y compite con el CB-PSA.1 y CB-PSA.5 que reconocen un epítipo conformacional en la molécula del PSA.

El carácter conformacional del epítipo reconocido por el AcM CB-PSA.2 (Figura 2) coincide con lo descrito en la literatura por Pettersson y colaboradores⁷³ sobre la naturaleza del epítipo que se encuentra expuesto solamente en el PSA libre y no en el complejo PSA-ACT. A la vez, el AcM comercial Suresh 30 que reconoce el PSA libre, detectó un epítipo de naturaleza conformacional (datos no mostrados).

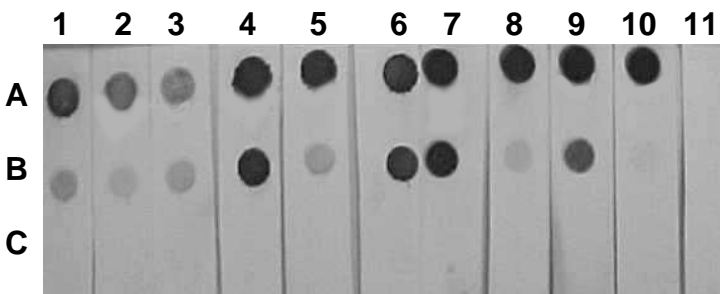


Figura 2. Reconocimiento del PSA por el panel de AcMs (*Dot Blot*).
Leyenda: PSA en condiciones nativas (A); desnaturalizantes (B); empleando BSA (C) como control negativo. Carriles 1 al 9 (CB-PSA.1 al CB-PSA.9), el AcM Suresh 66 (carril 10) y el CB-Glut.1 (carril 11) se emplearon como controles.

4.2.5 Especificidad de antígeno

Ninguno de los AcMs anti-PSA obtenidos presentó reactividad cruzada hacia los antígenos recombinantes (p24 del VIH, HBcAg, HBsAg, y TMPA), o natural (BSA) ensayados. Esto no implica que los AcMs desarrollados puedan reconocer otras moléculas que presenten homología con el PSA (hK1 o hK2), las cuales por la no disponibilidad de las mismas fue imposible incluir en este experimento. El reconocimiento de la proteína hK1 por AcMs anti-PSA es poco frecuente por las diferencias estructurales entre ambas proteínas, mientras que es más común el reconocimiento de la proteína hK2, aunque es mínimo en la mayoría de los AcMs, a diferencia de los anticuerpos policlonales^{74,75}.

4.3 Desarrollo de un ensayo ELISA de doble anticuerpo para la detección de PSA total

Para el desarrollo del ensayo ELISA de doble anticuerpo se seleccionó el AcM CB-PSA.4 de acuerdo a los resultados de los experimentos de inhibición y en correspondencia con el mayor límite de detección en la captura del antígeno en solución para este AcM (0,4 ng/mL del PSA, ver tablas 4 y 5). Como trazadores, se evaluaron los

AcMs conjugados a biotina incluidos en los grupos del 3 al 5. Los AcMs del grupo 1 (CB-PSA.1 y CB-PSA.5) compiten con el CB-PSA.4 por lo cual no son útiles para realizar la pareja del ELISA que detecte PSA total. En el caso del grupo 2 (CB-PSA.2), solo debe reconocer la molécula de PSA libre, por lo tanto se eliminó de estos ensayos.

Para la selección del AcM trazador y las condiciones óptimas del ensayo, se empleó una curva del estándar secundario del PSA en un intervalo de 0,15-25 ng/mL. Estas concentraciones comprenden el intervalo de decisión clínica en el diagnóstico del cáncer de próstata⁷⁶ y también incluye los valores del PSA que se registran en el suero de los pacientes después de aplicada la radioterapia o la prostatectomía radical. Con el objetivo de cuantificar las variaciones serológicas del PSA en los pacientes sometidos a las terapias antes mencionadas y detectar la posible recurrencia de la enfermedad, los sistemas comerciales para cuantificar PSA total deben poseer un LD por debajo de 0,4 ng/mL⁷⁷.

Las mejores variantes (parejas de AcMs) para la detección del PSA total se obtuvieron con el AcM CB-PSA.4 a 5 µg/mL en el recubrimiento y utilizando el AcM trazador, conjugado a biotina, CB-PSA.8 o el CB-PSA.9 a 0,5 µg/mL (Figura 3). Se determinó que los tiempos óptimos de incubación para la curva y el conjugado fueron 60 y 40 minutos, respectivamente.

Se determinó el límite de detección de cada variante como la concentración del PSA que produjo un valor de DO tres DE por encima del valor correspondiente al "0" de la curva. Para las parejas (anticuerpo en recubrimiento/trazador) CB-PSA.4/CB-PSA.9 y CB-PSA.4/CB-PSA.8 el LD fue de 0,15 y 0,31 ng/mL del PSA, respectivamente. La

pendiente de la curva para ambas combinaciones fue similar, mientras el rango de trabajo de la curva se ubicó entre 0,15 y 12 ng/mL, para ambos casos.

En correspondencia con el límite de detección y el rango de la curva alcanzado, se seleccionó el conjugado CB-PSA.9-biotina como anticuerpo trazador.

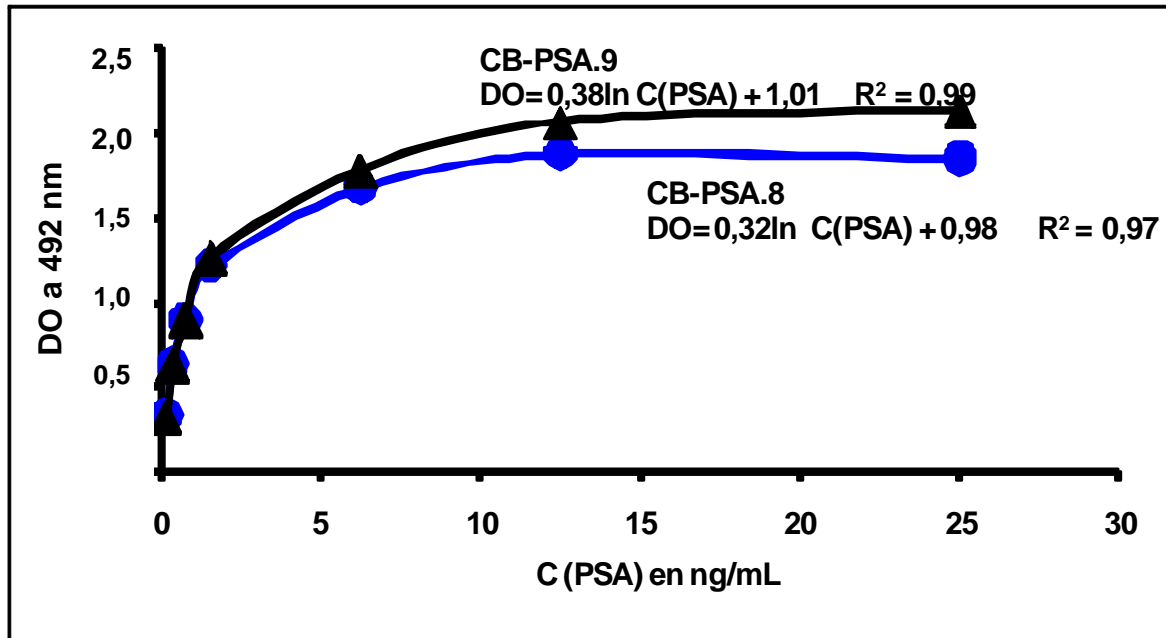


Figura 3. Curvas de cuantificación del PSA total con el empleo de los AcMs conjugados a biotina CB-PSA.8 (O), y CB-PSA.9 (Δ).
 Leyenda: R^2 , coeficiente de regresión lineal con un ajuste logarítmico; C (PSA), concentración de PSA

4.3.1 Concordancia del sistema PSA total con el ensayo comercial CIS bio PSA total (Francia)

Con el objetivo de validar nuestro ensayo de determinación del PSA total (CB-PSA.4/CB-PSA.9) se estimaron los valores del PSA total a 65 sueros de pacientes con sospecha clínica de presentar cáncer de próstata. Los sueros se evaluaron en paralelo con el sistema comercial CIS bio PSA total (Francia). Las muestras se agruparon en las tres

categorías descritas con valor clínico (menores de 4 ng/mL, entre 4 y 10 ng/mL, y mayores de 10 ng/mL⁴¹). El 100% de las muestras fueron clasificadas dentro de los mismos grupos por ambos sistemas (Tabla 6), demostrando la similitud de resultados con respecto a sistemas comerciales bajo empleo en la práctica médica.

Tabla 6. Clasificación de las muestras dentro de los intervalos de valor clínico utilizando el ensayo de PSA total en comparación con el sistema CIS bio PSA total (Francia)

	Concentración del PSA (ng/mL)	PSA total		
		< 4	4 a 10	> 10
CIS bio PSA total	< 4 (n= 45)	45		
	4 a 10 (n= 10)		10	
	> 10 (n=10)			10

Leyenda: n, número de muestras ensayadas

4.3.2 Determinación de la equimolaridad en la detección del PSA-ACT y PSA libre

Para demostrar la detección equimolar del PSA total (PSA-ACT y PSA libre) por el ELISA de doble anticuerpo desarrollado, se empleó un panel de referencia con nueve sueros provenientes de la Universidad de Stanford, California. El panel de la Universidad de Stanford se acepta como el “estándar de oro” para caracterizar los sistemas diagnósticos que detectan el PSA⁵¹. Los ensayos que se ubican dentro del rango definido se consideran equimolares, detectando de manera similar el PSA acoplado a ACT y el PSA libre.

La determinación del PSA total se realizó con el empleo del CB-PSA.4 fijado a la placa de poliestireno y el CB-PSA.9 acoplado a biotina como anticuerpo trazador. Se empleó un estándar comercial desde 0,9 ng/mL hasta 100 ng/mL de concentración del PSA

(Cis bio curve), dando como resultado una curva con un coeficiente de regresión lineal de 0,994 (ajuste logarítmico).

Las concentraciones de PSA detectadas se encuentran comprendidas entre los valores descritos para cada suero por los nueve ensayos comerciales previamente evaluados (Figura 4). Los intervalos de confianza estimados con nuestro sistema y los intervalos descritos para los ensayos comerciales tienen un amplio rango de intersección.

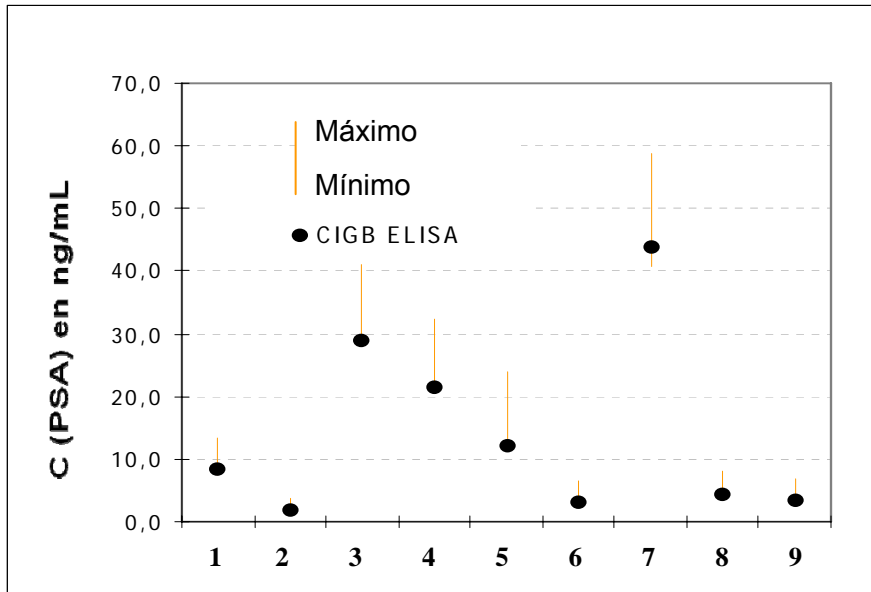


Figura 4. Estudio de la equimolaridad. Resultados de la evaluación de los sueros del panel de Stanford (sueros 1 al 9) con nuestro sistema de determinación del PSA total.

Leyenda: Para cada suero se muestra el rango de valores (|) determinados con los sistemas comerciales; C (PSA), Concentración de PSA total.

Por tanto, el sistema de cuantificación del PSA total (CB-PSA.4 en la captura y CB-PSA.9 en la detección), reconoce de forma equivalente 1 mol del PSA-ACT y 1 mol del PSA libre, bajo las condiciones de nuestro ensayo. Los nueve ensayos comerciales que detectan el PSA total de manera equimolar se basan en un mismo AcM anti-PSA, siendo

el CB-PSA.4 el segundo anticuerpo de captura descrito con la capacidad de detección equimolar.

4.3.3 Especificidad del sistema

Con el objetivo de demostrar la especificidad del ensayo de PSA total, se determinaron los valores de PSA total en el suero de 45 mujeres sanas. Los sueros de mujeres sanas deben presentar valores de PSA total sérico cercanos a 0,1 ng/mL, aunque en ocasiones pueden ser mayores⁷⁸. Ninguno de los sueros analizados superó el valor de 0,35 ng/mL, lo cual demuestra la alta especificidad del sistema.

4.3.4 Estudio de la precisión intra e interensayo

Los CV intraensayo e interensayo del ELISA de PSA total desarrollado fueron inferiores al 5% y al 20% respectivamente (Tabla 7), para las tres concentraciones del PSA total ensayadas (baja, media y alta).

Un CV intraensayo inferior al 5% es una medida de un rango bajo de diferencia entre muestras evaluadas en un mismo ensayo, mientras que el rango de variación interensayo refleja la variabilidad de una misma muestra evaluada en diferentes ensayos. En los inmunoensayos cuantitativos se aceptan valores del coeficiente de variación interensayo inferiores a un 20%⁶⁷.

Tabla 7. Precisión intra e interensayo del ELISA PSA total desarrollado

PSA (ng/mL)	Intraensayo (n=20)		Interensayo (n=5)	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
1	0,12	4,32	0,15	12,34
4	0,25	3,18	0,28	4,67
10	0,85	2,97	0,95	3,89

Leyenda: DE, Desviación Estándar; CV, Coeficiente de Variación.

La detección equimolar del PSA total, la alta sensibilidad obtenida, la excelente correlación con el sistema comercial empleado, así como la especificidad y el resto de los parámetros evaluados, permiten considerar que la combinación de los AcMs CB-PSA.4 en la captura y CB-PSA.9 en la detección, es la base para desarrollar un sistema comercial para la cuantificación del PSA total.

4.4 Desarrollo de un ELISA de doble anticuerpo para la determinación del PSA libre

Con la finalidad de desarrollar un ELISA para la cuantificación del PSA libre en suero, se seleccionó el AcM CB-PSA.4 de acuerdo a los resultados de los experimentos de detección en la captura del antígeno en solución para este AcM (0,4 ng/mL del PSA, ver tabla 4), la zona de reconocimiento coincidente con la descrita en otros ensayos comerciales, así como la demostración realizada de que este anticuerpo monoclonal capturaba de manera equimolar el PSA libre y el asociado en suero.

Del panel de AcMs generados, el CB-PSA.2 fue el único anticuerpo que podíamos emplear como trazador para detectar el PSA libre, dado que reconocía al PSA por la única zona epitópica descrita que se mantiene oculta cuando se forma el complejo PSA-ACT⁷³, como se refleja en la tabla 5.

La sensibilidad analítica del sistema se evaluó con una curva patrón de PSA diluida en suero. En la figura 5 se muestra la linealidad obtenida con la combinación de los monoclonales ensayados. Se pudieron detectar concentraciones de PSA menores que 1 ng/mL, y obtener un rango lineal de trabajo amplio, que cubre los rangos de concentración habitualmente encontrados en las muestras de suero humano.

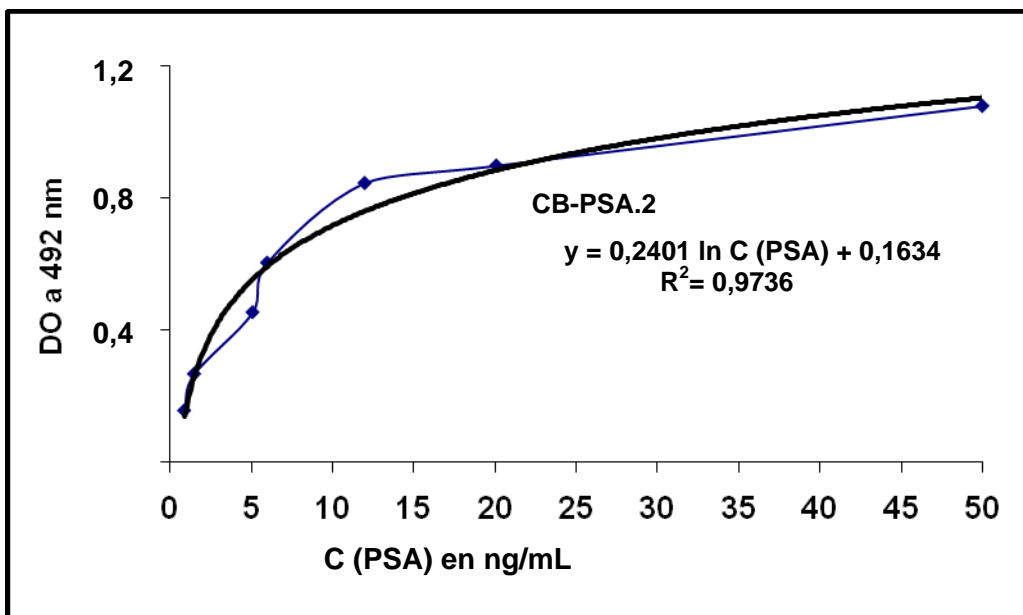


Figura 5. Curva de cuantificación del PSA libre, empleando el AcM CB-PSA.2 conjugado a biotina y CB-PSA.4 en la captura.
 Leyenda: R^2 , coeficiente de regresión lineal con un ajuste logarítmico C (PSA), Concentración de PSA total.

Resultados similares se alcanzaron con las variantes del CB-PSA.8 y CB-PSA.9 en el recubrimiento con respecto a lo referido en la figura 5 para el CB-PSA.4. Sin embargo, para el resto de las caracterizaciones, el trabajo experimental se realizó con el CB-PSA.4 en el recubrimiento, al tratarse de un AcM que reconoce de manera equimolar el PSA libre y asociado.

El rango de linealidad se logró para curvas de PSA desde 0 a 50 ng/mL, lo que permite el desarrollo de un ensayo comercial para la cuantificación del valor de PSA libre. El límite de detección del ensayo para cuantificar el PSA libre fue de 0,5 ng/mL.

Un sistema para la detección en muestras de suero del PSA total y otro para la detección del PSA libre fueron registrados por el Centro de Inmunoensayo (TecnoSUMA

Internacional SA, Cuba) en el año 2003. Se trata de un sistema UMELISA (ultra micro-ELISA) basado en los anticuerpos obtenidos y caracterizados en el presente trabajo⁷⁹.

El UMELISA[®]PSA se comercializa en un estuche que contiene placas recubiertas con el AcM CB-PSA.4, una curva de sueros estándares calibrados contra patrones internacionales (IRP 96/70 OMS) y los conjugados CB-PSA.9 y CB-PSA.2 acoplados a biotina, para la detección del PSA total y del PSA libre, respectivamente. El conjugado empleado es la estreptavidina-fosfatasa alcalina y como sustrato fluorigénico emplean el 4-Metilumbeliferil fosfato. El tiempo total del ensayo es de 1 hora y 30 minutos.

El ensayo UMELISA PSA total en las condiciones experimentales ajustadas posee un rango lineal de trabajo desde 0,62 ng/mL hasta 20 ng/mL de PSA, mientras que para el caso del UMELISA PSA libre, el rango de linealidad va desde 0,31 a 20 ng/mL de PSA (Figura 6).

Para la evaluación de la precisión de estos dos sistemas se emplearon tres muestras con concentraciones conocidas de PSA (1, 4 y 16 ng/mL). Para la evaluación de la precisión intraensayo se evaluaron estos tres rangos de concentraciones en 15 réplicas y el mismo ensayo fue repetido veinte veces en días diferentes para la precisión interensayo. El coeficiente de variación fue menor al 9% para todas las condiciones experimentales ensayadas.

En función de evaluar la exactitud del sistema UMELISA PSA total, se tomaron tres sueros de pacientes con concentraciones conocidas de PSA total (en el rango de 4 a 16 ng/mL). El porcentaje de recuperación al comparar los resultados obtenidos con los valores esperados para cada muestra promedió un $96,2 \pm 4\%$. En el caso de la evaluación de la precisión del sistema UMELISA PSA libre en el rango ensayado (4,4 a

16 ng/mL) se obtuvo un $104,85 \pm 2,37\%$. Los valores aceptables de exactitud mediante el ensayo de recuperación deben encontrarse en el rango de 90 a 110%⁸⁰.

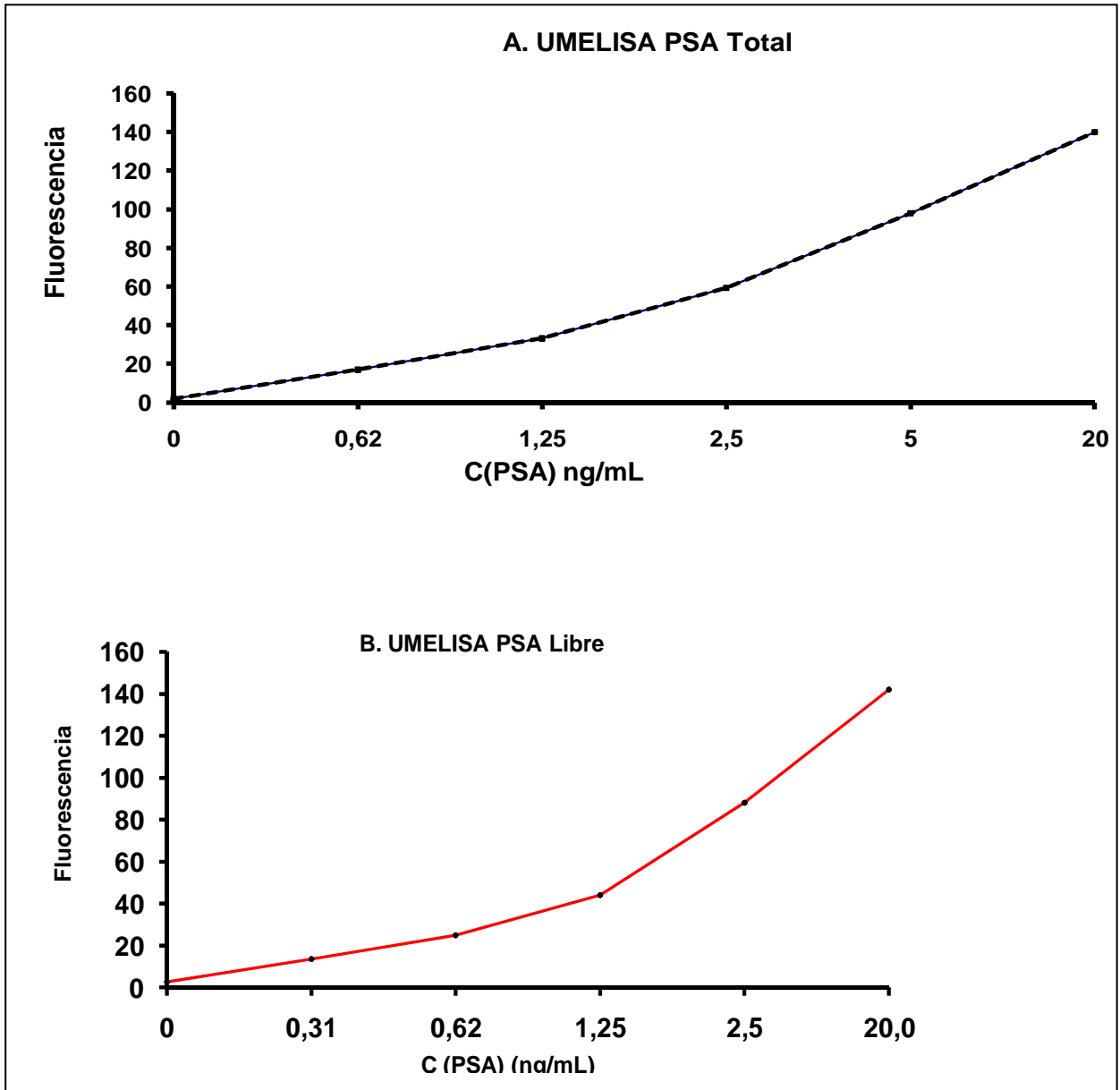


Figura 6. Curva de cuantificación de los sistemas comerciales UMELISA[®] PSA total y UMELISA[®] PSA libre.

Leyenda: C (PSA), concentración de PSA

La detectabilidad fue evaluada como la concentración calculada para la fluorescencia equivalente a un suero negativo (tomando el patrón internacional IRP 96/670 de la OMS

como referencia) más dos DE. Para el sistema UMELISA PSA la detectabilidad para el ensayo de PSA total fue de 0,02058 ng/mL y para el ensayo de PSA libre fue de 0,013 ng/mL.

Los UMELISA[®]PSA total y libre han sido registrados en Cuba, México, Venezuela, Colombia, Brasil, Perú y Argentina. En Cuba, desde el año 2009, se han realizado empleando este ensayo 1 271 808 determinaciones.

El sistema UMELISA[®]PSA total ha sido evaluado en diferentes trabajos. Recientemente, Castro y colaboradores estudiaron 19 981 muestras de suero de individuos de la provincia de Santiago de Cuba (período 2008-2010), de los cuales un 4,12% de los casos tenían valores por encima de 10 ng/mL y alrededor de un 6,35% en el rango de 3,7 a 10 ng/mL. Estas últimas fueron evaluadas con el UMELISA[®]PSA libre y un 74% resultaron catalogadas como de riesgo, al encontrarse valores de la relación PSA libre/PSA total menores al 25%. De la evaluación realizada concluyeron que 167 casos fueron detectados con cáncer de próstata luego de completar las evaluaciones requeridas, resaltando que en más de un 67% sus tumores clasificaban en estadio I-II, en contraste con la práctica habitual médica en dicho servicio donde alrededor de un 70% del diagnóstico del cáncer de próstata ocurre en los estadios III-IV⁸¹.

Los resultados de Castro y colaboradores ilustran el problema actual que tenemos en Cuba con el diagnóstico y manejo del cáncer de próstata. La principal causa de muerte en los hombres en la provincia Santiago de Cuba es el cáncer de próstata⁸¹. Este patrón de mortalidad se reproduce en otras provincias del país. Un análisis comparativo con los datos de los EE.UU., considerando una población similar sitúa las cifras cubanas en un 30% menos de casos diagnosticados y una mortalidad 2,5 veces superior a la de los

Estados Unidos. El cáncer de próstata es una enfermedad crónica de larga duración. El diagnóstico temprano que combine el empleo de la medición de PSA y la biopsia en los casos positivos permitiría diagnosticar la presencia del tumor en estadios más tempranos y brindar una terapia ajustada a las condiciones de cada paciente.

La pesquisa basada en un sistema fabricado en Cuba, posibilita un ahorro de recursos al país si decide establecer la misma para el beneficio de la población. Los datos epidemiológicos actuales permiten apreciar que en Cuba el cáncer de próstata está teniendo un impacto directo en los años de vida perdidos, por lo que la implementación del diagnóstico y la conducta terapéutica requieren una revisión y adecuación, teniendo en cuenta las características culturales de la población masculina cubana que es reacia a la implementación del examen digital rectal y disfruta de un sistema gratuito de salud enfocado en mejorar la calidad de vida de sus ciudadanos.

4.5 Inmunopurificación del PSA a partir del plasma seminal

Con el objetivo de seleccionar el AcM para ser inmovilizado en la columna y purificar el PSA natural, se evaluó un panel de siete AcMs anti-PSA con cuatro condiciones de elución diferentes (pHs extremos, fuerza iónica, agentes desnaturizantes y caotrópicos). El experimento consistió en disociar la unión del AcM con PSA-biotina, empleando diferentes condiciones de elución en un formato ELISA donde el PSA fue “capturado” por cada uno de los AcMs anti-PSA del panel obtenido. Esta metodología permite la selección de manera simple de variantes a evaluar en los experimentos de purificación.

Un alto porcentaje de desprendimiento se correspondió con el mejor agente de elución. El desprendimiento con PBS pH 7,2 se consideró basal, por lo que la

absorbancia registrada en este punto se definió como el “0”% de elución (Tabla 8), siendo la absorbancia máxima.

La utilización de urea (agente desnaturizante) y KSCN (agente caotrópico), permitió eluir más del 70% del PSA con cualquiera de los AcMs de captura (Tabla 8). Un resultado similar se obtuvo empleando pH básico (Tris 20 mmol/L, pH 11,6). Sin embargo, para la variante con el pH ácido (Glicina 0,2 mol/L, pH 3,5), la disociación del PSA fue ligera o mínima (menor del 25%) para la mayoría de los AcMs. Los AcMs CB-PSA.2 y CB-PSA.6 presentaron un porcentaje de elución cercano al 60% para esta condición. El empleo de un agente de elución con alta fuerza iónica ($MgCl_2$ 2 mol/L) posibilitó el desprendimiento de más de un 70% del PSA asociado al AcM CB-PSA.2 y CB-PSA.6, sin efectos en la disociación del PSA para el resto de los AcMs ensayados (< 46%).

Tabla 8. Resultados de los experimentos de elución sometiendo el panel de AcMs anti-PSA a diferentes condiciones de elución.

Porcentaje de elución empleando diferentes soluciones (%)						
	PBS pH 7,2*	KSCN 3 mol/L	MgCl₂ 2 mol/L	Tris 20 mmol/L pH 11,6	Urea 8 mol/L	Glicina 0,2 mol/L pH 3,5
CB-PSA.1	1,2	89,7	8,3	91,6	91,6	25,0
CB-PSA.2	0,8	87,7	76,3	79,6	90,5	60,1
CB-PSA.4	1,4	80,3	45,6	72,9	91,9	15,8
CB-PSA.5	0,5	88,8	-6,0	80,0	80,0	20,0
CB-PSA.6	0,4	84,4	74	88,8	88,4	57,4
CB-PSA.8	0,6	87,9	11,7	83,3	83,3	16,6
CB-PSA.9	0,5	72,8	0	80,0	80,0	20,0

Leyenda: *, Condición experimental que representa el 0% de elución para cada variante de AcM ensayada

Con vistas a inmunopurificar el PSA, decidimos emplear el $MgCl_2$ 2 mol/L como agente de elución de acuerdo a que: (a) permitió eluir más de un 70% del PSA asociado a los

AcMs CB-PSA.2 y CB-PSA.6 y (b) la elución empleando agentes con alto contenido iónico se considera un proceso “suave” para la estructura molecular de la proteína cuando se compara con la elución por agentes caotrópicos, desnaturizantes y pHs extremos⁸².

La elución con soluciones de alta fuerza iónica se basa en la ruptura de las interacciones electrostáticas que se establecen entre el antígeno y su ligando (AcM). En el caso particular de la disolución MgCl_2 2 mol/L se describen dos efectos adicionales: las ligeras características caotrópicas del anión cloruro y el efecto sobre la disociación del complejo antígeno-anticuerpo del pH ácido (pH inferior a 6), producto de la hidrólisis de esta sal⁸².

Las soluciones de KSCN y urea, a pesar de que presentan los mayores porcentajes de elución, no fueron seleccionadas porque generalmente producen cambios más severos en la estructura de las proteínas. Los agentes caotrópicos y desnaturizantes pueden desplegar parcial o totalmente la estructura tridimensional de las proteínas, con la consiguiente pérdida de su actividad biológica⁸². Por tanto ambas moléculas, el antígeno a purificar (PSA) y el anticuerpo inmovilizado en la matriz, pueden ser afectados durante la elución bajo estas condiciones. La baja estabilidad de los AcMs fijados a la matriz en los procesos que emplean estas soluciones, ha sido descrita por varios autores^{69,83}. En todos los casos se registra una disminución del tiempo de vida media del inmunoabsorbente cuando se compara con otros procedimientos de elución, con el consiguiente aumento del costo económico.

El uso de una estrategia de elución “suave” durante la purificación, permite realizar un mayor número de procesos con una menor pérdida de la capacidad de captura del antígeno por el AcM inmovilizado. Estas condiciones también pueden contribuir a obtener el antígeno con una estructura conformacional mucho menos afectada que con el empleo de los restantes agentes de elución. La conservación de la estructura nativa del PSA es imprescindible para el empleo de este antígeno en los inmunoensayos diagnósticos⁵⁰.

Finalmente, seleccionamos al AcM CB-PSA.2 para su inmovilización a una columna de Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno y como fuente del PSA se escogió el semen, por el alto contenido de dicho antígeno en este fluido.

Se seleccionó el AcM CB-PSA.2 por su reconocimiento preferencial hacia el PSA libre (a diferencia del CB-PSA.6), lo que permite que este anticuerpo acoplado a la matriz pueda ser también utilizado en la purificación del antígeno libre a partir de otras fuentes como el suero, donde la mayor parte del PSA se encuentra formando un complejo con la ACT.

Se realizaron tres purificaciones del PSA a partir del plasma seminal. En las purificaciones realizadas se detectó el PSA en diferente proporción y grado de pureza en las fracciones correspondientes a NaCl 2,5 mol/L, MgCl₂ 1 mol/L y MgCl₂ 2 mol/L (Tabla 9). La fracción del PSA más pura (> 90% de pureza) se obtuvo con la disolución MgCl₂ 2 mol/L y un recobrado del 23,3%. Los lavados con NaCl 2,5 mol/L y MgCl₂ 1 mol/L (carriles 6 y 7, Figura 7) posibilitaron eliminar contaminantes adsorbidos

inespecíficamente a la columna, fundamentalmente el lavado con NaCl 2,5 mol/L donde la pureza del PSA fue inferior al 15% (Tabla 9).

Tabla 9. Cuadro resumen de la purificación del PSA a partir de plasma seminal

	Fracciones				
	Inicial*	No unida	NaCl 2,5 mol/L	MgCl ₂ 1 mol/L	MgCl ₂ 2 mol/L
PSA (mg totales)	5,14	1,69	0,49	1,23	1,20
Pureza (%)	2,36	1,10	14,75	42,50	91,03
Recobrado (%)	—	—	9,53	23,92	23,34

Leyenda: *, Se aplicó una mezcla de plasma seminal diluida 1:5 en el tampón de acoplamiento (50 mL de volumen total); Recobrado, relación porcentual entre los mg de PSA de una fracción dada y los mg de PSA en la muestra aplicada. Los valores son el promedio de las tres purificaciones realizadas.

A pesar del bajo nivel relativo de recobrado, este indicador no es un inconveniente para la purificación del PSA a partir del líquido seminal, pues no se incurre en un costo alto ni las cantidades necesarias justifican un mayor nivel de recobrado. Por los métodos convencionales y más laboriosos se han descrito recobrados de un 7 al 30%^{84,85}.

El principal inconveniente del empleo del líquido seminal es el riesgo biológico potencial durante su manipulación. Sin embargo, el resto de los sistemas evaluados para la obtención del PSA recombinante (expresión en bacteria⁸⁶, Baculovirus⁸⁷ o células superiores⁸⁸) no evidencian recobrados superiores a los obtenidos con nuestra metodología. Por otra parte, la estructura del PSA recombinante se afecta en los procesos de renaturalización requeridos al purificar el PSA expresado en bacteria e igualmente se afecta por el clivaje de las formas proenzimáticas del PSA cuando se expresa en Baculovirus o células superiores. Todos estos aspectos conspiran contra el empleo del PSA recombinante como estándar para los sistemas diagnósticos.

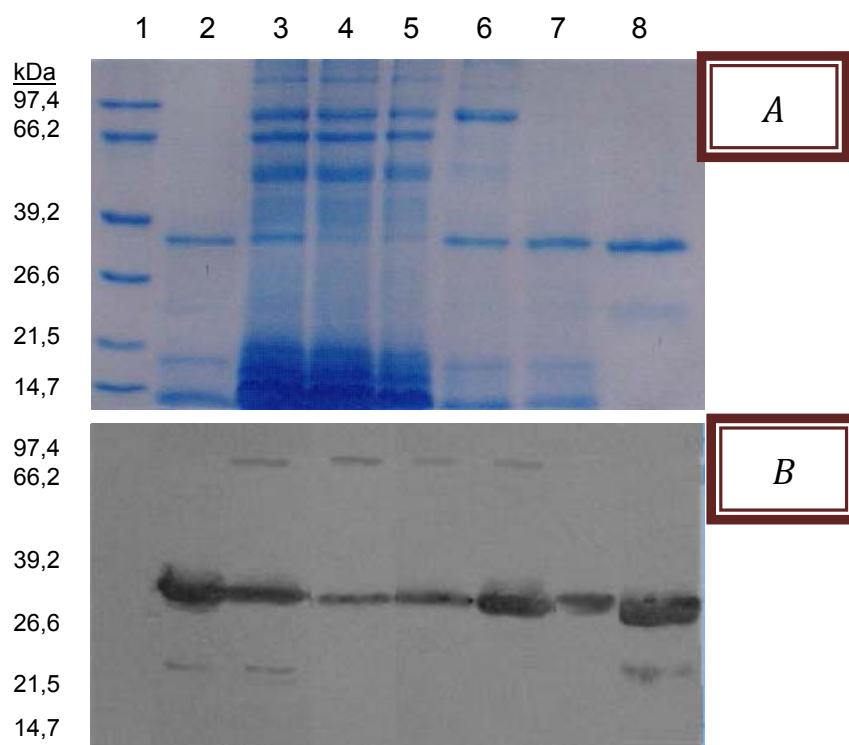


Figura 7. Electroforesis y *Western Blot* de las fracciones de la inmunopurificación del PSA
 Leyenda: A.- Electroforesis (SDS-PAGE al 12,5%); B.- *Western Blot*.

Carril 1 (patrón de masas moleculares, Boehringer Mamhein), carril 2 (PSA comercial), carril 3 (muestra de partida).

Fracciones de la inmunopurificación del PSA: carriles 4 y 5 (fracción no unida 1 y 2), carril 6 (NaCl 2,5 mol/L), carril 7 (MgCl₂ 1 mol/L), y carril 8 (MgCl₂ 2 mol/L).

Se detectó mediante el *Western Blot* una banda de ~34 kDa (carriles del 2-8) que coincide con lo descrito previamente para esta proteína⁸⁹ (Figura 7). En la fracción MgCl₂ 2 mol/L (carril 8) se evidenció una banda de ~23 kDa reconocida por el AcM anti-PSA empleado, lo que se correspondió con un producto de la degradación del PSA en el plasma seminal al detectarse en la muestra inicial (carril 3).

En los carriles del 3 al 6 del *Western Blot* se observó una banda de ~90 kDa que coincide con lo descrito para la asociación del PSA con el PCI en el plasma seminal⁹⁰. Se ha descrito que aproximadamente un 5% del total del PSA en este fluido se asocia

con dicho inhibidor³⁶. Esta banda no se encuentra presente en la variante de elución con MgCl_2 1 y 2 mol/L.

La presencia de degradaciones de la propia molécula del PSA en purificaciones realizadas a partir del semen, fue previamente evidenciada por Frenette y colaboradores⁹⁰. La degradación antes señalada no debe interferir en el empleo del PSA como estándar, pues la misma se encuentra presente en el estándar comercial evaluado (carril 2, Figura 7B). Sin embargo, para el desarrollo de pruebas con propósito clínico o desarrollo de sistemas diagnósticos, es necesario calibrar el PSA purificado con respecto al estándar primario de la Universidad de Stanford⁵¹. Este estándar fue aprobado por el NCCLS con vistas a la preparación de los patrones secundarios empleados en los sistemas diagnósticos actuales.

Pérez y colaboradores publicaron recientemente una metodología que se basa en la inmunopurificación del PSA empleando el AcM CB-PSA.4⁹¹. En dicho trabajo describen el desarrollo de lavados empleando NaCl 1 mol/L y D-glucosa 10 mmol/L para eliminar el material unido de manera inespecífica a la columna, empleando en la elución una disolución de Tris 20 mmol/L pH 11,6 para romper las interacciones antígeno-anticuerpo sin desnaturalizar al antígeno.

En los experimentos realizados, los autores reproducen con la columna de inmunoespecificidad los resultados en nuestras condiciones *in vitro* de elución con la disolución de Tris, obteniendo un recobrado del 66%, validando que el método de inmunopurificación descrito en nuestro trabajo funciona en un intervalo de condiciones

de trabajo, siendo simple y de utilidad para obtener el estándar de PSA requerido en los sistemas diagnósticos que cuantifiquen este antígeno.

5. CONCLUSIONES

1. Se generó un panel de hibridomas de ratón, compuesto por 11 clones secretores de AcMs, que reconocen por diferentes sitios la molécula de PSA natural con alta afinidad.
2. Empleando la combinación de los AcMs CB-PSA.4 y CB-PSA.9 se desarrolló un ensayo cuantitativo que detecta de forma ultrasensible (150 pg/mL) y equimolar al PSA-ACT y libre en el suero humano.
3. Empleando la combinación de los AcMs CB-PSA.4 y CB-PSA.2 se desarrolló un ensayo cuantitativo que detecta de forma ultrasensible (500 pg/mL) el PSA libre en el suero humano.
4. Empleando el AcM CB.PSA-2, se estableció un método para la purificación del PSA a partir del plasma seminal con un alto nivel de pureza (> 90%).

6. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la especificidad del panel de AcMs anti-PSA con antígenos que poseen homología con el PSA, como la hK1 y la hK2.
2. Evaluar el PSA purificado para su empleo como estándar en el ELISA de cuantificación sérica del PSA total o libre.
3. Evaluar la instrumentación de un programa de salud en Cuba que permita la pesquisa, diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata, empleando para esto los ensayos comerciales desarrollados por el CIE para la detección del PSA total y libre, con los AcMs CB-PSA.4, CB-PSA.9 y CB-PSA.2.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Welch HG, Albertsen PC. Prostate cancer diagnosis and treatment after the introduction of prostate-specific antigen screening: 1986-2005. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101: 1325-9.
- ² Anuario Estadístico de Salud 2010. Ministerio de Salud de la República de Cuba. La Habana, Cuba, abril 2011.
- ³ Ross LE, Berkowitz Z y Ekwueme DU. Use of the prostate-specific antigen test among U.S. men: findings from the 2005 National Health Interview Survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17: 636-44.
- ⁴ Greene K, Albertsen P, Babaian R y colaboradores. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol.* 2009; 182: 2232-41.
- ⁵ Schenk-Braat EA y Bangma CH. The search for better markers for prostate cancer than prostate-specific antigen. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2006; 150: 1286-1290.
- ⁶ Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A y colaboradores. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101: 374-83.
- ⁷ Kirby R. *Prostate Cancer: Principles and Practice Handbook*, 2011.
- ⁸ Goldstein, AS, Huang, J, Guo, C y colaboradores. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* 2010; 329: 568–571.
- ⁹ <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010>. Revisado en mayo 2011.
- ¹⁰ <http://pccaribbean.wordpress.com>. Revisado en abril 2010.
- ¹¹ Kobayashi T, Kamoto T, Nishizawa K y colaboradores: Prostate-specific antigen (PSA) complexed to alpha1-antichymotrypsin improves prostate cancer detection using total PSA in Japanese patients with total PSA levels of 2.0-4.0 ng/mL. *BJU Int.* 2005; 95: 761-5.
- ¹² Reid ME, Duffield-Lillico AJ, Slate E y colaboradores. The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day selenium treatment. *Nutr Cancer.* 2008; 60: 155-163.
- ¹³ Lim LS y Sherin K. ACPM Prevention Practice Committee. Screening for prostate cancer in U.S. men ACPM position statement on preventive practice. *Am J Prev Med.* 2008; 34: 164-170.
- ¹⁴ Albertsen PC, Hanley JA, Penson DF y colaboradores. 13-year outcomes following treatment for clinically localized prostate cancer in a population based cohort. *J Urol.* 2007; 177: 932-6.

-
- ¹⁵ Thompson IM, Ankerst DP, Chi C y colaboradores. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/mL or lower. *JAMA*. 2005; 294: 66-70.
- ¹⁶ Makridakis N, Ross RK, Pike MC y colaboradores. A Prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -Reductase. *Cancer Research* 1997; 57: 1020-2.
- ¹⁷ Nick Warde. Prostate cancer: Could the use of 5 α -reductase inhibitors during active surveillance reduce the risk of disease progression? *Nature Reviews Urology* 2011; 8: 117.
- ¹⁸ Yin M, Bastacky S, Chandran U y colaboradores. Prevalence of incidental prostate cancer in the general population: a study of healthy organ donors. *J Urol*. 2008; 179: 892-5.
- ¹⁹ Wolf AMD, Wender RC, Etzioni RB y colaboradores. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Prostate Cancer: Update 2010. *Cancer Journal Clin* 2010; 60: 70-98.
- ²⁰ www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Prostate Cancer Early Detection. v2.2010. Revisado en julio 2011.
- ²¹ Rubial A y Herranz M. Tumor Markers: Current Situation. *Cancer Chemotherapy Reviews* 2010; 5: 1-11.
- ²² Loeb S, Roehl KA, Antenor JA y colaboradores. Baseline prostate-specific antigen compared with median prostate-specific antigen for age group as predictor of prostate cancer risk in men younger than 60 years old. *Urology* 2006; 67: 316-20.
- ²³ Yu H. Clinical implications of prostate-specific antigen in men and women. *The journal of Gender-specific Medicine* 2000; 3: 45-8.
- ²⁴ Hameed O y Humphrey PA. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology of the prostate. *Semin Diagn Pathol*. 2005; 22: 88-104.
- ²⁵ Meola J, Goulart L, Oliveira J y colaboradores. Differential expression of KLK2 and KLK3 genes in peripheral blood and tissues of patients with prostate cancer. *Genetics and Molecular Biology* 2006; 29: 193-9.
- ²⁶ So A, Goldenberg L, Gleave ME. Prostate specific antigen: An updated review. *Can J Urol*. 2003; 10: 2040-2050.
- ²⁷ Lundwall A. Characterization of the gene for Prostate-Specific Antigen, a human glandular kallikrein. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 1989; 161: 1151-9.
- ²⁸ Wan XS, Xu YA, Ware JH y Kennedy AR: Three immunoassays based on monoclonal antibodies specific for prostate specific antigen (PSA), alpha-1-antichymotrypsin (ACT), and the PSA-ACT complex. *Prostate* 2003; 56: 131-41

-
- ²⁹ Piironen T, Villoutreix BO, Becker C y colaboradores. Determination and analysis of antigenic epitopes of Prostate Specific Antigen (PSA) and Human Glandular Kallikrein (hK2) using synthetic peptides and computer modeling. *Protein. Sci.* 1998; 7: 259-69.
- ³⁰ Corey E, Wegner SK, Corey MJ y colaboradores. Prostate-Specific Antigen: characterization of epitopes by synthetic peptide mapping and inhibition studies. *Clin. Chem.* 1997; 43: 575-84.
- ³¹ Costello LC y Franklin RB. Prostatic fluid electrolyte composition for the screening of prostate cancer: A potential solution to a major problem. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2009; 12: 17-24.
- ³² Stamey TA y Yemoto CE. Examination of the 3 molecular forms of serum prostate specific antigen for distinguishing negative from positive biopsy: relationship to transition zone volume. *J Urol.* 2000; 163: 119-126.
- ³³ Carroll P, Coley C, McLeod D y colaboradores. Prostate-specific antigen best practice policy-part I: Early detection and diagnosis of prostate cancer. *Urology.* 2001; 57: 217-224.
- ³⁴ Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ y colaboradores. A precursor form of prostate-specific antigen is more highly elevated in prostate cancer compared with benign transition zone prostate tissue. *Cancer Res* 2000; 60: 756-759
- ³⁵ Zhang WM, Finne P, Leinonen J y colaboradores. Determination of prostate-specific antigen complexed to alpha(2)-macroglobulin in serum increases the specificity of free to total PSA for prostate cancer. *Urology* 2000; 56: 267-272.
- ³⁶ Peter J, Unverzagt C y Hoesel W. Analysis of Free Prostate-specific Antigen (PSA) after Chemical Release from the Complex with alpha1-Antichymotrypsin (PSA-ACT). *Clin. Chem.* 2000; 46: 474 - 482.
- ³⁷ Gretzer M y Partin A. PSA markers in prostate cancer detection. *Urologic Clinics of North America* 2003; 30: 677-86.
- ³⁸ Svatek R, Shulman M, Benaim E y colaboradores. Change in Prostate Specific Antigen Following Androgen Stimulation is an Independent Predictor of Prostate Cancer Diagnosis *J Urol.* 2008; 179: 2192-2196.
- ³⁹ Moul J, Sun L, Hotaling J y colaboradores. Age Adjusted Prostate Specific Antigen and Prostate Specific Antigen Velocity Cut Points in Prostate Cancer Screening. *J Urol.* 2007; 177: 499-504.

-
- ⁴⁰ Sasaki R, Habuchi T, Sato K y colaboradores. The Clinical Utility of Measuring Total PSA, PSA Density, γ -Seminoprotein and γ -Seminoprotein/Total PSA in Prostate Cancer Prediction. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2000; 30: 337-42.
- ⁴¹ Gerald Chodak. Prostate Cancer: Epidemiology, Screening, and Biomarkers. *Rev Urol.* 2006; 8: S3-S8.
- ⁴² Lee R, Localio AR, Armstrong K y colaboradores. A meta-analysis of the performance characteristics of the free prostate-specific antigen test. *Urology* 2006; 67: 762-768.
- ⁴³ Lilja H y Stenman UH. Assay of free and complexed Prostate-Specific Antigen (PSA). WO 92/01936, 1992.
- ⁴⁴ Shaw PA, Pepe MS, Todd A y Etzioni R. Methods for Assessing Improvement in Specificity When a Biomarker is Combined With a Standard Screening Test. *Statistics in Biopharmaceutical Research* 2009; 1: 18-25.
- ⁴⁵ Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A y colaboradores. Quantifying the Role of PSA Screening in the US Prostate Cancer Mortality Decline. *Cancer Causes and Control.* 2008; 19: 175-81.
- ⁴⁶ Stephan C, Stroebel G, Heinau M y colaboradores. The ratio of prostate-specific antigen (PSA) to prostate volume (PSA density) as a parameter to improve the detection of prostate carcinoma in PSA values in the range of < 4ng/mL. *Cancer.* 2005; 104: 993-1003.
- ⁴⁷ Schroder FH y Roobol MJ. Defining the optimal prostate-specific antigen threshold for the diagnosis of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2009; 19: 227-31.
- ⁴⁸ Chen Z, Chen H y Stamey TA. Prostate Specific Antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. *J. Urol.* 1997; 157: 2166-70.
- ⁴⁹ Kawachi MH, Bahnson RR, Barry M y colaboradores. Prostate cancer early detection. Clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* 2007; 5: 714-36.
- ⁵⁰ Murphy GP. The second Stanford conference on international standardization of Prostate Specific Antigen assays. *Cancer* 1995; 75: 122-8.
- ⁵¹ Rafferty B, Rigsby P, Rose M y colaboradores. Reference Reagents for Prostate-specific Antigen (PSA): Establishment of the First International Standards for Free PSA and PSA (90:10). *Clin. Chem.* 2000; 46: 1310-1317.
- ⁵² Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE y colaboradores. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J Urol.* 2003; 169: 1219-28.

-
- ⁵³ http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/prostate.pdf. National Comprehensive Cancer Network (2009). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™: Prostate Cancer v.2.2009. Revisado en mayo 2009.
- ⁵⁴ Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, y colaboradores. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or = 4.0 ng per milliliter. *New England Journal of Medicine* 2004; 350: 2239–2246.
- ⁵⁵ Andriole G, Crawford E, Grubb R, et al. Seven year mortality results and related findings from the prostate component of the PLCO randomized cancer screening trial. *New England Journal of Medicine* 2009; 360: 1310–1319.
- ⁵⁶ Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, y colaboradores. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *New England Journal of Medicine* 2009; 360: 1320–1328.
- ⁵⁷ Spitler L. Method to elicit an antitumor response with human Prostate-Specific Antigen. U.S. Pat. No. 5,925,362, 1999.
- ⁵⁸ Chu TM, Wang MC, Papsidero L, y colaboradores. Purified human prostate antigen. U.S. Pat No. 4,446,122, 1984.
- ⁵⁹ Wang M.C, Valenzuela LA, Murphy GP y colaboradores. A simplified purification procedure for human prostate antigen. *Oncology* 1982; 39: 1-5.
- ⁶⁰ Schaller J, Akiyama K, Tsuda R y colaboradores. Isolation, characterization and aminoacid sequence of gamma-seminoprotein, a glicoprotein from human seminal plasma. *European J. Biochem.* 1987; 170: 111-20.
- ⁶¹ Stamey TA, Teplow DB y Graves HCB. Identity of PSA purified from seminal fluid by different methods: Comparison by amino acid analysis and assigned extinction coefficients. *J. Urol.* 1990; 144: 1523.
- ⁶² Tessmer U, Quack T, Donn F y colaboradores. Biological activity of Prostate-Specific Antigen isolated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electroelution. *Electrophoresis* 1995; 16: 793-9.
- ⁶³ Bindukumar B, Kawinski E, Cherrin C y colaboradores. Two step procedure for purification of enzymatically active prostate-specific antigen from seminal plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 813: 113-120.
- ⁶⁴ Jette DC, Kreutz FT, Malcolm BA y colaboradores. Epitope mapping of Prostate-Specific Antigen with monoclonal antibodies. *Clin.Chem.* 1996; 42: 12.

-
- ⁶⁵ Gavilondo JV. Anticuerpos Monoclonales, Elfos Scientiae Pub.1995.
- ⁶⁶ Stephan C, Bangma C, Vignati G y colaboradores. 20-25% lower concentrations of total and free prostate-specific antigen (PSA) after calibration of PSA assays to the WHO reference materials--analysis of 1098 patients in four centers. *Int J Biol Markers* 2009; 24: 65-9.
- ⁶⁷ Wild D. *The Immunoassay Handbook* 1994.
- ⁶⁸ Daiss JL, y Scalice ER. *Methods in Enzymology* 1994; 6:143. Epitope mapping on BIAcore: theoretical and practical considerations. *Methods in Enzymology* 1994; 6: 143-46.
- ⁶⁹ Ibarra N, Caballero A, González E y colaboradores. Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen. *J. of Chromatography B* 1999; 735: 271-7.
- ⁷⁰ Berry DA. *Statistics: A Bayesian perspective*. Belmont, California: Duxbury Press; 1996.
- ⁷¹ Leinonen J, Niemela P, Lovgren J y colaboradores. Characterization of monoclonal antibodies against prostate specific antigen produced by genetic immunization. *Journal of Immunological Methods* 2004; 289: 157-167.
- ⁷² Corey E, Wegner SK, Stray JE y colaboradores. Characterization of 10 new monoclonal antibodies against Prostate-Specific Antigen by analysis of affinity, specificity and function in sandwich assays. *J. Cancer* 1997; 71: 1019-28.
- ⁷³ Pettersson K, Piironen T, Seppala M y colaboradores. Free and complexed Prostate-Specific Antigen (PSA): in vitro stability, epitope map, and development of immunofluorometric assays for specific and sensitive detection of free PSA and PSA- α -1-Antichymotrypsin complex. *Clin. Chem.* 1995; 4: 1480-8.
- ⁷⁴ Finlay JA, Day JR y Rittenhouse HG. Polyclonal and Monoclonal Antibodies to Prostate-Specific Antigen can cross-react with Human Kallikrein 2 and Human Kallikrein 1. *Urology* 1995; 53: 746-51.
- ⁷⁵ Haese A, Vaisanen V, Finlay JA y colaboradores. Standardization of two immunoassays for human glandular kallikrein 2. *Clin Chem* 2003; 49: 601-610.
- ⁷⁶ Froehner M, Hakenberg OW, Koch R y colaboradores. Comparison of the clinical value of complexed PSA and total PSA in the discrimination between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urol Int.* 2006; 76: 27-30.
- ⁷⁷ Lein M, Kwiatkowski M, Semjonow A y colaboradores. A multicenter clinical trial on the use of complexed prostate specific antigen in low prostate specific antigen concentrations. *J Urol.* 2003; 170: 1175-1179.

-
- ⁷⁸ Daniels, R. Delmar's guide to laboratory and diagnostic tests. New York: Delmar-Thomson 2002.
- ⁷⁹ <http://www.radiobayamo.icrt.cu/noticia.php?id=5399>. Revisado en agosto 2011.
- ⁸⁰ Ochoa R. Bases metodológicas para la evaluación de anticuerpos en ensayos clínicos de vacunas mediante técnicas inmunoenzimáticas. Finlay Ediciones, 2008.
- ⁸¹ Castro B, Perera F, Callard K y Sabournin M. Pesquisa activa del cáncer de próstata en Santiago de Cuba 2008-2010 empleando un Ultra Micro ELISA de producción nacional. Vaccimonitor 2011; 20: 48-9.
- ⁸² Yarmush ML, Pickard K, Sundaram S y colaboradores. Immunoabsorption: strategies for antigen elution and production of reusable absorbents. Biotechnol. Prog. 1992; 8: 168-78.
- ⁸³ Almagro I, Agraz A, Fernández de Cossio ME y colaboradores. Purificación del AGSHB-R por cromatografía de inmunoafinidad. Biotecnología Aplicada 1994; 11: 175-9.
- ⁸⁴ Zhang WM, Leinonen J, Kalkkinen N y colaboradores. Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. Clin Chem. 1995; 41: 1567-1573.
- ⁸⁵ Sensabaugh GF y Blake ET. Seminal plasma protein p30: simplified purification and evidence for identity with prostate specific antigen. J Urol 1990; 144: 1523-6.
- ⁸⁶ Bei R, Paravitana C, Milenic D y colaboradores. Generation, purification, and characterization of a recombinant source of human prostate-specific antigen. J Clin Lab Anal 1995; 9: 261-8.
- ⁸⁷ Takayama TK, Fujikawa K y Davie EW. Characterization of the precursor of prostate specific antigen. J Biol Chem 1997; 272: 21582-8.
- ⁸⁸ Kumar A, Mikolajczyk SD y Goel AS. Expression of active pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. Cancer Res 1997; 57: 3111-3114.
- ⁸⁹ Qian Y, Sensibar JA, Zelner DJ y colaboradores. Two-dimensional gel electrophoresis detects Prostate-Specific Antigen- α -1-Antichymotrypsin complex in serum but not in prostatic fluid. Clin Chem. 1997; 43: 352-9.
- ⁹⁰ Frenette G, Gervais Y, Tremblay RR, y colaboradores. Contamination of purified Prostate-Specific Antigen preparations by Kallikrein hK2. J Urol 1998; 159: 1375-8.

-
- ⁹¹ Pérez L, Zulueta O, Melchor A y colaboradores. Purification of Human Prostatic-Specific Antigen (hPSA) from Seminal Plasma by Immunoaffinity Chromatography Using a Monoclonal Antibody Anti Total PSA. *Hybridoma* 2011; 30: 247-251.

8. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

α_2 -MG: α_2 -Macroglobulina

α -PI: α -antitripsina

aa: aminoácidos

AcMs: Anticuerpos monoclonales

ACT: α -1-antiquimiotripsina

ATCC: American Tissue and Cell Colection, siglas en inglés

BPH: Hiperplasia benigna de próstata, siglas en inglés

BSA: Albúmina de suero bovino, siglas en inglés

CIE: Centro de Inmunoensayo

CIGB: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

CP: Cáncer de próstata

CV: Coeficiente de variación

DE: desviaciones estándar

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidad óptica

DRE: Examen digital rectal, siglas en inglés

ELISA: Inmunoensayo enzimático en fase sólida, siglas en inglés

FDA: Agencia Reguladora de Drogas y Alimentos en EE.UU., siglas en inglés

FPLC: Cromatografía líquida para la purificación rápida de proteínas, siglas en inglés

g: gravedades

HBcAg: Antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B, siglas en inglés

HBsAg: Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, siglas en inglés

hK1: Calicreína pancreática humana, siglas en inglés

hK2: Calicreína prostática humana, siglas en inglés

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión, siglas en inglés

IC: Intervalo de confianza

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica, siglas en inglés

IGFBP-3: Proteína de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina, siglas en inglés

IgG: Inmunoglobulina G

IRMA: Ensayo inmunorradiométrico, siglas en inglés

IRP: Patrón Internacional de Referencia

ISOBM: International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, siglas en inglés

kDa: kilodaltons

LD: Límite de detección

LNCaP: Línea celular de cáncer de próstata

NCCLS: Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos, siglas en inglés

OIEA: Organización Internacional de la Energía Atómica

OMS: Organización Mundial de la Salud

p/v: peso por volumen

PAGE-SDS: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, siglas en inglés

PAP: Fosfatasa ácida de próstata, siglas en inglés

PBS: tampón fosfato salina, siglas en inglés

PCI: Proteína-C-inhibidora

PEG: Polietilenglicol

PEG: Polietilenglicol

PIN: Neoplasia intraepitelial prostática, siglas en inglés

POD: Peroxidasa

PSA: Antígeno específico de próstata, siglas en inglés

PSMA: Antígeno específico de membrana, siglas en inglés

ST: Estreptavidina

TMPA: Proteína A de la membrana del Treponema Pallidum, siglas en inglés

TRUS: Ultrasonido transrectal, siglas en inglés

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

Development and validation of a quantitative ELISA for the measurement of PSA concentration

Boris Acevedo^{a,*}, Yasser Perera^a, Miriam Ruiz^b, Gertrudis Rojas^a, Jesús Benítez^a,
Marta Ayala^a, Jorge Gaviñondo^a

^aRecombinant Antibodies Laboratories, Pharmaceutical Division, Center for Genetic Engineering and Biotechnology,
Ave 31 and 58, Cubanacán, P.O. Box 6162, 10600 Havana, Cuba

^bIsotopes Center, Havana, Cuba

Received 2 July 2001; received in revised form 25 September 2001; accepted 27 September 2001

Abstract

Background: Prostate-specific antigen (PSA) has been used for the diagnosis and follow up of prostate cancer (PCa). **Methods:** Mouse monoclonal antibodies (MAbs) were generated against human prostate-specific antigen (PSA) for the development of a sensitive total PSA (t-PSA) assay. Two MAbs, denoted CB-PSA.4 and CB-PSA.9, with affinities of 3.7×10^9 and 4.7×10^{10} l/mol, respectively, were used to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantifying serum t-PSA concentration. **Results:** The detection limit (DL) of the assay was 0.1 $\mu\text{g/l}$ ($n=20$, mean of “zero” standard + 3S.D.), and the recovery of t-PSA was 96–103%. The within-run and between-day coefficients of variation (CV) ranged from 2.1% to 3.2%, and from 2.8% to 6.3% for PSA concentrations of 10 and 1 $\mu\text{g/l}$, respectively. The equimolar detection of t-PSA and free-PSA was demonstrated by two different methods, one consisted in the comparative evaluation of a sera panel ($n=9$) with our enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and four commercial total PSA assays and the concordance with CIS bio total PSA assay. The assay had a linear range of 0.12 to 25 $\mu\text{g/l}$. **Conclusions:** The analytical performance characteristics of our PSA ELISA suggest that it will provide clinically useful PSA results, particularly when diagnostic algorithms are used. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: PSA; ELISA; Equimolar detection; Monoclonal antibodies

1. Introduction

In serum, two different forms of prostate-specific antigen (PSA) are immunologically detectable: a free form (MW = 30 kDa) and a complex with α -1-anti-chymotrypsin (ACT-PSA, MW = 100 kDa) [1]. PSA measurement requires equimolar determination of both molecular forms [2]. Moreover, equimolar total PSA (t-PSA) determination (free PSA + ACT-PSA), the ratio between total PSA and free PSA, digital rectal examination (DRE) and biopsy, are included in

Abbreviations: MAbs, monoclonal antibodies; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; PSA, prostate-specific antigen; PCa, prostate cancer; PBS, phosphate buffer solution; OPD, *o*-phenylenediamine; SDS-PAGE, sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel; DL, detection limit; EMR, equimolar response; SKR, skewed molar-response.

* Corresponding author. Tel.: +53-7-218008; fax: +53-7-214764.

E-mail address: boris.acevedo@cigb.edu.cu (B. Acevedo).

multiple prostate cancer (PCa) diagnostic algorithms [3]. The prostate-specific antigen (PSA) blood test provides an effective means for monitoring established prostate cancer. However, its use in a screening context is the subject of controversy [4].

Measuring t-PSA for diagnostic or follow-up purposes requires assays that detect a broad range (0.1 to 20 $\mu\text{g/l}$) of concentrations [5,6,7]. For diagnostic purposes, t-PSA values $>4 \mu\text{g/l}$ are considered an indicator of suspicion of PCa. For the follow up of PCa patients after surgical or chemotherapy procedures, the doubling time of t-PSA in a range of 0.1 to 1 $\mu\text{g/l}$ has been used to monitor disease progression. In 95% of PCa patients with metastasis, t-PSA values $>10 \mu\text{g/l}$ have been reported [8]. For these reasons, t-PSA assays with a broad linear range are necessary. Traditional immunoassays for t-PSA (e.g., CIS bio total PSA, Abbott IMx PSA, and Beckman Coulter total PSA assay) cover a linear range $>4 \mu\text{g/l}$ of t-PSA in serum samples. These immunoassays are based on enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) with TMB as substrate or IRMA [9]. The “second line” of equimolar t-PSA assays, based on the automated operation and/or the use chemiluminescent substrates [10], cover a linear range $<1 \mu\text{g/l}$ (e.g., DPC-Immulite PSA assay, Bayer Immuno 1 PSA) [11,12].

Parameter estimates for t-PSA assay include sensitivity in the range of 70% and positive predictive values of 26% to 52% [13,14]. It must be noted that the positive predictive value is markedly influenced by the prevalence of the disease in the population that is being studied. The potential value of the test appears to be in its simplicity, objectivity, reproducibility, lack of invasiveness, and lower cost relative to ultrasound. It is, therefore, more commonly used as an adjunct to or replacement for digital rectal examination (DRE). PSA has increased the detection rate of early-stage cancers, many of which may be curable by local modality therapies [6]. PSA cutoff will substantially increase the number of cancers detected, particularly in blacks [15]. An initial PSA of $<2.5 \mu\text{g/l}$ is associated with a very low risk of cancer detection within a 4-year follow up [16]. Data are now available that indicate that PSA is not organ-specific [17]. However, the serum PSA detection limits (DLs) with the currently employed assays permit its practical use as a prostate-specific marker.

In this paper, we report the generation of a panel of mouse monoclonal antibodies (MAbs) with high affinity for natural PSA, and the development and validation of a single ELISA assay able to detect a very broad range of equimolar concentrations of t-PSA.

2. Materials and methods

2.1. Prostate-specific antigen (PSA), reference anti PSA MAbs and total PSA assay

Natural PSA was obtained from Immunocreations (Edmonton, Canada) in lyophilized form (purity, 80%). PSA was diluted in distilled water, as recommended by the supplier, to a concentration of 1 mg/ml, aliquoted, and stored at -80°C to avoid degradation. Reference MAbs 10, 30, and 66 were obtained from the same source. An equimolar total PSA assay was obtained from CIS bio (France).

2.2. Generation of a panel of anti-PSA MAbs

BALB/c mice (CENPALAB, Cuba) were immunized subcutaneously every 15 days with semen, at 100 μg of total protein/dose, for a total of eight immunizations, followed by two doses of 50 μg of pure PSA. The first immunization used complete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, MO), and the rest were prepared in incomplete Freund's adjuvant (Sigma). Mouse spleen cells were fused with myeloma cells (P3/ \times 63.Ag8.653 cell line) using the method of Kearney et al. [18]. The splenocyte/myeloma ratio was 10:1 and the fused cell mixture was distributed in conventional 96 well-culture plates at a final concentration of 1×10^5 cells per well. The culture medium (RPMI-1460 with 10% fetal bovine serum, Gibco, USA) was supplemented with the selection marker Hypoxanthine–Aminopterin–Thymidine (Sigma).

Selection of positive clones was carried out using an ELISA assay. Polystyrene EIA strips (Polysorp, Nunc, Denmark) were coated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of the purified PSA in phosphate buffered saline (PBS, 0.13 mol/l NaCl, 0.27 mol/l KCl, 0.0015 mol/l KH_2PO_4 , 0.0065 mol/l Na_2HPO_4) pH 7.2, 100 $\mu\text{l/well}$, at 37°C for 3 h. Plates were then blocked with PBS-1% skimmed milk (Oxoid, England), 200 $\mu\text{l/well}$. Hybrid-

oma supernatant fluids were diluted 1:2 in PBS and incubated in the wells for 1 h at 37 °C. After washing with PBS-0.05% Tween 20 (PBS-T), the strips were incubated with an anti-mouse IgG polyclonal sheep antibodies horseradish peroxidase conjugate (anti-IgG HRP) (Sigma) for 1 h at 37 °C. The reaction was developed with citrate-phosphate buffer, pH=5.5, 0.014% H₂O₂, and 0.25% OPD (*ortho*-phenylenediamine, Sigma) for 10 min, and stopped with 2.5 mol/l sulfuric acid (50 µl per well). The absorbance (ABS) was measured at 492 nm using a spectrophotometer (SensIDENT Scan, Merck, Germany). An unrelated MAb was used as negative control.

2.3. Production and purification of MAbs

MAbs isotype determination was made with concentrated culture supernatant and specific anti-mouse IgG isotype reagents from Sigma, using radial double diffusion [19]. Ascitic fluid was obtained by the intraperitoneal inoculation of hybridoma anti-PSA cells at 1 × 10⁶ cells/mice (BALB/c). Purification of the immunoglobulins from the ascitic fluid was carried out by the protein A method, using a pH gradient according to the method of Ey et al. [20]. Briefly, sepharose protein A was equilibrated in 3 mol/l NaCl, 1.5 mol/l glycine buffer, pH 8.9. Ascitic fluid samples were put into the column and the nonbound materials were discarded. Mouse IgGs were eluted using 0.1 mol/l citric acid in a pH gradient of pH 6 to 3.

2.4. Characterization of anti-PSA MAbs

To identify the PSA epitope profile recognized by our MAbs, a competition ELISA was developed. Polystyrene plates (Polysorp, Nunc) were coated with 1 µg/ml of different PSA MAbs in PBS for 3 h, and blocked with PBS-1% bovine serum albumin (BSA, BDH, England) for 1 h at 37 °C. Purified MAbs were preincubated at 37 °C with different concentrations of PSA conjugated with NHS-biotin (Sigma). One-hundred microliters of the preincubated samples were added to the plates followed by incubation for 1 h at 37 °C. A Streptavidin-HRP conjugate (Amersham, England) was then added to the wells at a 1:2500 dilution and the plates incubated for 30 min. The other steps were similar to the ones described previously above. Assays were performed in duplicate, and the

experiment was repeated at least twice. Percent inhibition was calculated using the formula:

$$\% \text{ inhibition} = [100 - (\text{ABS sample} / \text{ABS at } 0 \text{ } \mu\text{g/ml of PSA})] \times 100.$$

Competition was considered to have occurred when the signal decreased > 50% in comparison with the sample without anti-PSA MAbs.

2.5. Calculation of affinity constants for selected MAbs

Association and dissociation rate constants for the MAbs to PSA were determined by surface plasmon resonance [21] on a Biacore instrument (Pharmacia, Sweden). Briefly, the sensor chip was activated for immobilization according to methods outlined by Pharmacia. Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulin antibodies (Sigma) were coupled to the surface. Mouse anti-PSA MAbs at 100 µg/ml in PBS-0.1% Tween 20/3.4 mmol/l EDTA were injected onto the sensor chip. Binding to the antigen was studied by injection of pure PSA at 20 µg/l in the same diluent. Association and dissociation rate constants were calculated using Biacore kinetics evaluation software (Pharmacia).

2.6. PSA epitope recognition by Western Blot

A Western Blot technique was developed to characterize the epitope recognition pattern for every MAb. PSA was ran in 12% denaturing (2 mercaptoethanol) or nondenaturing sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane using the semi-dry procedure [22]. The membranes were blocked with PBS-1% BSA (BDH) and incubated for 1 h with 750 µl of each MAb. After washing with PBS-T, the membranes were incubated for 1 h at 37 °C with a commercial sheep anti mouse-IgG-HRP conjugate (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The reaction was developed with PBS, 0.25% 3,3 diaminobenzidine (Sigma) for 15 min, and stopped by washing with water.

2.7. Detection of PSA by anti-PSA MAbs

Polystyrene EIA strips (Polysorp, Nunc) were coated with 1 µg/ml of anti-PSA MAbs in PBS and

incubated at 37 °C for 3 h. The plates were blocked with 200 µl/well of PBS-1% BSA. Biotin-PSA at different concentrations (between 1 and 100 µg/l) in PBS-0.1% BSA was incubated in the wells for 1 h at 37 °C. After washing with PBS-T, the strips were incubated for 30 min at 37 °C with a Streptavidin-HRP conjugate (Amershan, England) at a 1:2500 dilution. The reaction was developed with citrate-phosphate buffer, pH=5.5, 0.014% H₂O₂, 0.25% OPD for 10 min, and stopped with 50 µl/well of 2.5 mol/l sulfuric acid. The absorbance was measured at 492 nm. An unrelated MAb that recognizes gliadins was used as negative control. The positive control was anti-PSA MAb 66 (Immunocreations).

2.8. Standardization of a sandwich ELISA to detect total PSA

Different ELISA variations were developed to detect PSA using our MAbs. Polystyrene EIA strips (Polysorp, Nunc) were coated at 37 °C for 3 h with CB-PSA.4 MAb (1 µg/ml) in PBS buffer pH 7.2, 100 µl/well. After that, the strips were blocked at 37 °C for 1 h, with PBS-1% BSA. A secondary standard curve of natural PSA (0.1–100 µg/l) was prepared using a standard containing 90% PSA-ACT and 10% free PSA (90:10 standard) obtained from Stanford University [23] and strips incubated for 30 min at 37 °C. After washing with PBS-T, the strips were incubated with MAbs-biotin conjugates [24] at different concentrations (0.25 to 5 µg/ml) and incubation times (15 min to 1 h). The rest of the steps were similar to the ELISA described in the previous section. Each assay was performed in duplicate, and each experiment was repeated at least twice.

The ELISA variation with the best detection limit determined by 3S.D. from the zero was selected for further evaluation. In addition, serum samples from 45 healthy females were obtained from the Institute of Oncology and Radiobiology of Havana and assayed using our standardized assay. Within-run and between-day coefficients of variation (CV) were determined at PSA concentrations of 10 to 1 µg/l [25]. The sample material consisted of two sera from a cancer patient and healthy individual (t-PSA concentrations of 10 and 1 µg/l, respectively, as determined by using the CIS bio total PSA assay). The inter-assay (within-run) precision was calculated with 20 replicates of

each serum, distributed equidistantly on the same plate. The inter-assay (between-run) precision was calculated from estimating t-PSA in the above samples 20 times.

Recovery evaluation was carried out using three serum samples with PSA values of 0.5 µg/l. Natural PSA was added to each sample in different concentrations (0, 1, 10 and 50 µg/l) to determine the recovery of the assay[25].

2.9. Equimolar and concordance evaluation of the ELISA

Patients' serum ($n=9$) were obtained from Stanford University that had been previously assayed for PSA concentration using at least four different commercial equimolar PSA assays (Enzymun Roche Diagnostics, PSA total CIS bio, Immunotech, Tosoh Immulite) [26]. The interval for every serum sample was obtained according to the maximum and minimum values reported in the evaluation of the samples with the commercial assays.

We evaluated the equimolar detection of PSA by our ELISA. Polystyrene EIA strips (Polysorp, Nunc) were coated with 1 µg/ml of CB-PSA.4 MAb in PBS, 100 µl/well, and incubated at 37 °C for 3 h, and blocked with PBS-1% BSA. Secondary Stanford PSA standards (PSA-ACT 90:10 free PSA) at different concentrations (between 0.1 and 100 µg/l) were used as standard curve, by incubating for 30 min at 37 °C. Patients' serum samples (100 µl) with a predetermined value of PSA were incubated for the same time and at the same temperature as the standards. After washing with PBS-T, the strips were incubated with CB-PSA.9-biotin at 0.5 µg/ml for 30 min. The other steps were similar to the ELISA described in the previous section. The assay was performed in duplicate, and the experiment was repeated at least twice.

The effect of a changing ratio of free:complexed PSA on the quantity of t-PSA measured was evaluated in samples containing 7.5 µg/l of t-PSA. The evaluation was developed with the mixtures of PSA-ACT and free PSA in five molar ratios of free:complexed PSA: 0:100, 25:75, 50:50, 72:25, and 100:0. In all, 20 solutions were prepared, representing all four possible combinations: total PSA: 20, 10, 5 and 2.5 µg/l. Each solution was divided into aliquots, which were stored at -70 °C. The other steps were similar to the

ELISA. The standardized ELISA, three equimolar PSA assays (Roche Diagnostics, CIS bio, and Tosoh) and a skewed assay (Abbott), were evaluated in parallel using the same standard t-PSA curves.

2.10. Concordance of the new ELISA assay with the commercial CIS bio total PSA assay

Concordance was evaluated in parallel with an equimolar commercial PSA assay. The CIS bio total PSA assay (France) was performed according to the manufacturer's instructions. A panel of 65 human sera was collected under written consent at the Institute of Oncology and Radiobiology of Havana. These include samples from patients evaluated for screening, benign prostatic hyperplasia, and follow up of prostate cancer patients. Serum samples were aliquoted and frozen at -80°C until use.

The ELISA assay was performed in a similar way as described in the previous section. The secondary PSA standard curve from 0 to 100 $\mu\text{g/l}$ was used. The assay was performed in duplicate, and the experiment was developed at least two times. The slope, y-intercept of the line-of-best-fit, and regression statistics for the comparison by our ELISA vs. those obtained on the same serum samples using the CIS bio assay were obtained using Excel 97 software (Microsoft, Seattle, WA).

3. Results and discussion

3.1. Generation and characterization of the anti-PSA MAbs panel

Eleven mouse hybridoma clones were obtained that secreted IgG1 antibodies recognizing PSA fixed on a plastic well EIA surface. MAbs were classified to five different groups according to their competition ELISA profile (Table 1). Some MAbs apparently recognized epitopes similar or close to those identified by the anti-PSA MAbs from commercial sources.

Western Blot experiments indicated that MAbs from Group 4 (CB-PSA.6, CB-PSA.7, and CB-PSA.9), and CB-PSA.4, recognized linear epitopes or in close proximity on the PSA aa backbone because they reacted with similar or higher signal vs. the PSA antigen submitted either to denaturing or nondenatur-

Table 1

Anti-PSA MAbs grouped according to the recognized epitope characterization

Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
MAb 66 ^a	MAb 30 ^b	MAb 10 ^a	CB-PSA.6 (S)	CB-PSA.3
CIS bio 1 ^a	CB-PSA.2	CIS bio 2 ^a	CB-PSA.7 (S)	CB-PSA.10
CB-PSA.1		CB-PSA.8	CB-PSA.9 (S)	CB-PSA.11
CB-PSA.4 (S)				
CB-PSA.5				

Anti-PSA MAbs placed in every group recognized the PSA molecule by the same or closed epitope (see Materials and Methods). Sequential or conformational structure was defined by western blotted assay; (S) = Sequential epitope.

^a Reference MAbs against total PSA.

^b MAb that only recognizes free PSA.

ing conditions (results not shown in detail). The other members of the panel detected conformational epitopes on the PSA molecule, not reacting with the antigen submitted to denaturing conditions.

Interestingly, CB-PSA.4 recognized a sequential epitope while the rest of the MAbs from the same group reacted with a conformational epitope (Table 1). Antigenic regions could be formed by close or overlapping epitopes with sequential and/or conformational patterns [27]. Corey [28] described the competition profile of 10 MAbs against PSA, indicating the presence of at least five antigenic zones on the PSA molecule. One of them included antibodies to sequential and conformational epitopes, a pattern similar to what we found for group 1 (Table 1).

The capability to capture PSA in solution was assayed by the coat of each anti-PSA MAb and the incubation with PSA-biotin at different concentrations (between 1 and 100 $\mu\text{g/l}$). CB-PSA.4, like the reference MAb 66, captured the limit value of PSA assessed (1 $\mu\text{g/l}$). None of the rest of the anti-PSA MAbs captured PSA at values lower than 3 $\mu\text{g/l}$ (data not shown in detail).

3.2. Standardization of a sandwich ELISA assays to detect total PSA

Based on the results of the competition experiments, we evaluated several pairs of anti-PSA MAbs that recognized the antigen by different zones. The best sandwich pair for t-PSA detection was CB-PSA.4 as the coating antibody, and biotin conjugated CB-

Table 2
Intra-assay (within-run) and inter-assay (between-day) coefficients of variation (CV) for our assay (imprecision data)

Sample	PSA concentration ($\mu\text{g/l}$)		
	Mean	S.D.	CV (%)
<i>Intra-assay (n = 20 replicates)</i>			
I	0.91	0.0291	3.2
II	9.9	0.2058	2.1
<i>Inter-assay (n = 20 runs)</i>			
I	0.93	0.0585	6.3
II	10.8	0.3024	2.8

I and II are the serum samples assayed with PSA concentration of 1 and 10 $\mu\text{g/l}$, respectively. S.D., Standard deviation; CV (%), coefficients of variation = S.D./Mean \times 100.

PSA.9 as the tracer. In this sandwich anti-PSA assay, the detection limit (DL) was 0.12 $\mu\text{g/l}$, which corresponded to 3S.D. of the $\text{OD}_{492 \text{ nm}}$ value for the standard at a PSA concentration of 0 $\mu\text{g/l}$. For our experimental conditions, the within-run and between-day CVs ranged from 2.1% to 3.2%, and 2.8% to 6.3%, respectively, for the serum t-PSA concentrations assayed (10 and 1 $\mu\text{g/l}$ of natural PSA, Table 2). The recovery ranged from 96.1% to 102.9%.

According to its clinical usefulness, the relevant range of PSA concentrations is between 0.1 and 20 $\mu\text{g/l}$. Some commercial t-PSA determinations have a linear range between 1 and 100 $\mu\text{g/l}$ (e.g., the Tandem, Beckman Coulter, Abbott IMx). Most commercial kits have detection limits around 0.1 $\mu\text{g/l}$. More recently, increased emphasis has been given to designing assays with a 10 to 100-fold better analytical sensitivity. Such “ultrasensitive” assays are more useful as monitoring tools (for example, Immulite[®] immunochemiluminescent third-generation assay). Our assay exhibits a linear range from 0.12 to 25 $\mu\text{g/l}$, that covers PSA measurements in the interval with clinical utility: (a) values $> 4 \mu\text{g/l}$ for detection of PCa patients [29], (b) PSA values $> 10 \mu\text{g/l}$ for high probability of metastatic PCa [30], and (c) values from 0.1 to 1 $\mu\text{g/l}$ for the follow up of treated patients [31]. In addition, serum samples ($n=45$) from healthy women were analyzed using our assay. All PSA values on these samples were below the detection limit (0.12 $\mu\text{g/l}$) of our assay, evidence that the assay is free from interference by various other factors (e.g., lipemia, icterus,

hemolysis, human kallikrein II, etc.) and recognized specifically PSA [32].

3.3. Equimolar detection of free and ACT-PSA complex

Equimolar standardization is a useful method for any assay that detects free and bound forms of a ligand [33]. Different immunoassays for PSA detect these two forms in different molar ratios. Graves et al. [34] classified two types of PSA assays: (a) “equimolar-response” (EMR) assays recognize equally both free PSA and PSA-ACT, and (b) “skewed molar-response” (SKR) assays, which quantify the two forms differently. One approach to classify PSA assays consists of comparing the values of PSA obtained with the standardized system, and a reference immunoassay that detects both forms of PSA in equal molar ratios (i.e., EMR assay). A set of serum samples containing known values of free PSA and ACT-PSA can be useful as secondary serum-based reference material for the calibration of PSA immunoassays. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) had published proposed guidelines for the purification and characterization of PSA and PSA-ACT (α -1-antichymotrypsin) complexes for primary standards. Furthermore, the Second Stanford PSA Conference proposed a mixture of 90% PSA-ACT and 10% PSA (90:10 standard) with a biochemically defined concentration to calibrate total PSA assays. A significant improvement in agreement bet-

Table 3
Total PSA concentration using a sera panel for the evaluation of equimolarity

Serum sample	PSA concentration ($\mu\text{g/l}$)		
	Lowest	Highest	Assay to validate
1	7.2	13.1	8.9
2	1.2	3.2	2
3	28	40.6	30.2
4	20.3	31.4	25.1
5	15.3	23.5	17.3
6	2.9	6.3	3.3
7	40.2	58.1	43.8
8	5.2	8.1	6
9	4.1	6.7	5.1

“Lowest” and “Highest” are the extreme values obtained from the evaluation of the sera panel with four commercial t-PSA kits using the Stanford 90:10 PSA standard for the calibration.

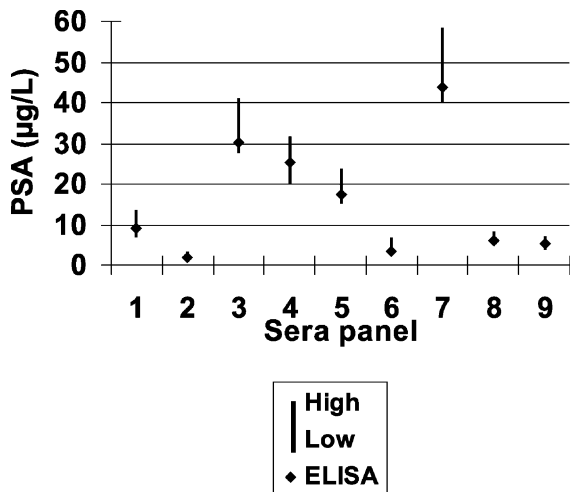


Fig. 1. PSA concentration (µg/l) obtained for the evaluation of the sera panel with the ELISA and four commercial total PSA assays.

ween assays was observed with the 90:10 standard as compared to results with kit calibrators. The NCCLS has reviewed and adopted the 90:10 proposal [35].

According to the WHO criteria, Rafferty et al. [36] recommended the Stanford standard PSA panel (90:10 standard) to measure total and free PSA. PSA values need to be assigned to PSA-containing calibrators. These secondary serum-based reference materials can be used by manufacturers and regulatory agencies to

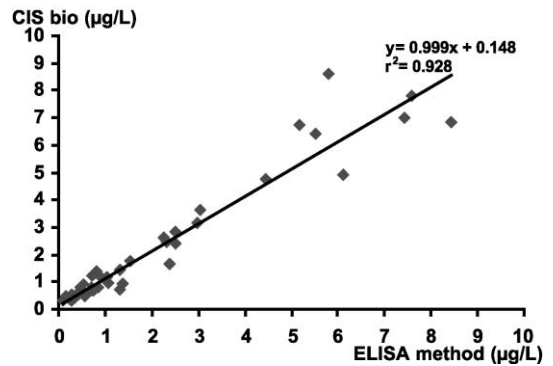


Fig. 3. Concordance of the CIS bio total PSA assay and the new developed ELISA.

develop and monitor the performance of their PSA assays.

For the evaluation of our assay as an EMR or SKR assay, we analyzed nine serum samples from the reference panel of Stanford University using the NCCLS and WHO recommended PSA standard 90:10. Total PSA intervals for every serum sample were calculated taking the maximum and minimum values of PSA reported in the evaluation with four commercial equimolar PSA assays (Table 3 and Figs. 1 and 2). Our ELISA detected a PSA value in the expected interval for every serum, in comparison with the equimolar

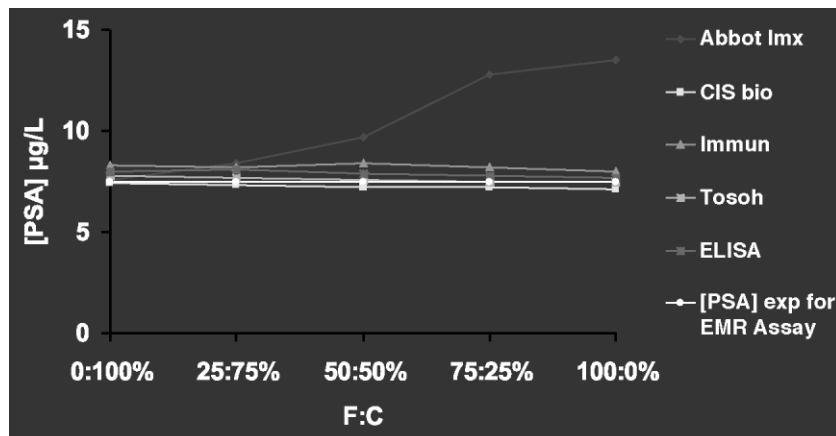


Fig. 2. Effect of a changing ratio of F:C PSA on the quantity of *t*-PSA measured by five PSA assays in samples containing *t*-[PSA] = 7.5 µg/l.

assays. We thus concluded that our assay detects free and ACT-PSA in an equimolar manner.

3.4. Concordance with CIS bio total PSA assay and the ELISA

Using our assay, we evaluated samples from Cuban patients ($n = 65$) in parallel with the CIS bio total PSA assay (Fig. 3). Samples were classified according to the values commonly employed in clinical prostate evaluation. The slope, y -intercept and correlation coefficient were 0.999, 0.148 and 0.929, respectively. The outcomes of these assays were highly correlated by the Pearson correlation ($r = 0.9741$, $p < 0.01$) in the range from 0.12 to 10 $\mu\text{g/l}$ of total PSA. This result corroborated the equimolar detection of PSA for the pair of MAbs selected.

4. Conclusions

We developed and validated a new assay that could be employed in screening for the detection and follow up of patients with PCa. The assay demonstrated high analytical sensitivity in a broad range of linearity using our high affinity capture and signal MAbs (3.7×10^9 and 4.7×10^{10} l/mol for CB-PSA.4 and CB-PSA.9, respectively). The assay presented an equimolar response to detect free and complexed PSA molecule in the sera of patients with a high correlation with CIS bio total PSA assay.

Acknowledgements

This work was supported partially by grants from International Atomic Energy Agency, IAEA (project no. 9817).

References

- [1] Lilja H, Christensson A, Dahlen U, et al. Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha-1 antichymotrypsin. *Clin Chem* 1991;37:1618–25.
- [2] Becker C, Lilja H. Individual prostate specific antigen (PSA) forms as prostate tumor markers. *Clin Chim Acta* 1997;257:117–32.
- [3] Abrahamsson PA, Lilja H, Oesterling JE. Molecular forms of serum prostate-specific antigen. The clinical value of percent free prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am* 1997;24(2):353–65.
- [4] Partin AW, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate specific antigen: update. *J Urol* 1994;152(5):1358–68.
- [5] Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, et al. Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA, J Am Med Assoc* 1993;270(7):860–4.
- [6] Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 1991;324(17):1156–61.
- [7] Brawer MK. Prostate-specific antigen: current status. *Cancer J Clin* 1999;49(5):264–81.
- [8] Jurincic CD, Pixberg HU, Gasser A, Klippel KF. Prostate-specific antigen in prostatic carcinoma. *Urol Int* 1990;45(3):153–9.
- [9] Reiter W, Stieber P, Schmeller N, Nagel D, Hofmann K, Fateh-Moghadam A. Total and free PSA: a methodical and clinical evaluation of five assays. *Anticancer Res* 1997;17(6D):4759–65.
- [10] Ferguson RA, Yu H, Kalyvas M, Zammit S, Diamandis EP. Ultrasensitive detection of prostate-specific antigen by a time-resolved immunofluorometric assay and the immulite immunochemiluminescent third-generation assay: potential applications in prostate and breast cancers. *Clin Chem* May 1996;42(5):675–84.
- [11] Haese A, Huland E, Graefen M, Hammerer P, Noldus J, Huland H. Ultrasensitive detection of prostate specific antigen in the followup of 422 patients after radical prostatectomy. *J Urol* 1999;161(4):1206–11.
- [12] Morris DL, Dillon PW, Very DL, Ng P, Kish L, Goldblatt JL, et al. Bayer Immuno 1 PSA assay: an automated, ultrasensitive method to quantitate total PSA in serum. *J Clin Lab Anal* 1998;12(1):65–74.
- [13] Dundas GS, Porter AT, Venner PM. Prostate-specific antigen. Monitoring the response of carcinoma of the prostate to radiotherapy with a new tumor marker. *Cancer* 1990;66(1):45–8.
- [14] Armbruster DA. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem* 1993;39(2):181–90.
- [15] Smith DS, Carvalhal GF, Mager DE, Bullock AD, Catalona WJ. Use of lower prostate specific antigen cut-offs for prostate cancer screening in black and white men. *J Urol* 1998;160(5):1734–8.
- [16] Lodding P, Aus G, Bergdahl S, Frosing R, Lilja H, Pihl CG, et al. Characteristics of screening detected prostate cancer in men 50 to 66 years old with 3 to 4 ng/ml. Prostate specific antigen. *J Urol* 1998;159(3):899–903.
- [17] Diamandis EP, Yu H. Editorial: new biological functions of prostate-specific antigen? *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(5):1515–7.
- [18] Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B, Rajewsky K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J Immuno* Oct 1979;123(4):1548–50.

- [19] Ouchterlony O, Nielsso LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Handbook of experimental immunology. Blackwell Scientific Publication; 1978. p. 196.
- [20] Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 1978;15:429–36.
- [21] O'Shannessy DJ. Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: a critique of the surface plasmon resonance literature. *Curr Opin Biotechnol* 1994;5(1):65–71.
- [22] Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gel to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1979;76:4350–4.
- [23] Segurado OG, Volmer W, Dowell B. PSA standardization: a review of NCCLS, Stanford and Abbott efforts. *Anticancer Res* 1997;17:2919–20.
- [24] Leary JJ, Brigati DJ, Ward DC. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bioblots. *Proc Natl Acad Sci U S A* July 1983;(13):4045–9.
- [25] Wild D. The immunoassay handbook. Macmillan; 1994. p. 83–100.
- [26] Chen Z, Prestigiacomo A, Stamey TA. Purification and characterization of prostate-specific antigen (PSA) complexed to alpha 1-antichymotrypsin: potential reference material for international standardization of PSA immunoassays. *Clin Chem Sept* 1995;41(9):1273–82.
- [27] Daiss JL, Scalice ER. Epitope mapping on BIAcore: theoretical and practical considerations. *Methods Enzymol* 1994;6: 143–6.
- [28] Corey E, Wegner SK, Stray JE, et al. Characterization of 10 new monoclonal antibodies against prostate-specific antigen by analysis of affinity, specificity and function in sandwich assays. *J Cancer* 1997;71:1019–28.
- [29] Catalona WJ, et al. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen based-screening. *JAMA, J Am Med Assoc* 1993;270:948–54.
- [30] Vesella RL, Lange P. Issues in the assessment of prostate-specific antigen immunoassays. An update. *Urol Clin North* 1997;24:261–8.
- [31] Partin AW, Oesterling JE. The clinical usefulness of prostate-specific antigen: update 1994. *J Urol* 1994;152:1358–68.
- [32] Yu H, Diamandis EP. Measurement of serum prostate specific antigen levels in females and in prostatectomized males with an ultrasensitive immunoassay technique. *J Urol* 1995;153: 1004–8.
- [33] Graves HC. Issues on standardization of immunoassays for prostate-specific antigen: a review. *Clin Invest Med* 1993; 16(6):415–24.
- [34] Graves HC. Standardization of immunoassays for prostate specific antigen—a problem of prostate-specific antigen or a problem of assay design? *Cancer* 1993;72:3141–4.
- [35] Segurado OG, Volmer W, Dowell B. PSA standardization: a review of NCCLS, Stanford and Abbott efforts. *Anticancer Res* July 1997;17(4):2919–20.
- [36] Rafferty B, Rigsby P, Rose M, Stamey T, Gaines DR. Reference reagents for prostate specific antigen (PSA): establishment of the first international standards for free PSA (90:10). *Clin Chem* 2000;46(9):1310–7.

Fast and Novel Purification Method to Obtain the Prostate Specific Antigen (PSA) From Human Seminal Plasma

Boris Acevedo,^{1*} Yasser Perera,¹ Edel Torres,² David Pentón,¹ Marta Ayala,¹ and Jorge Gavilondo¹

¹Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

²Center for Genetic Engineering and Biotechnology, S. Spiritus, Cuba

BACKGROUND. Prostate specific antigen (PSA) is a relevant antigen in diagnosis; follow-up, and therapeutic approaches for fighting the prostate cancer. Several methods have been published previously to obtain a high purity preparation of PSA. In general, these methods are expensive, time-consuming, laborious, and in some cases produce low yields.

METHODS. Based on a panel of 7 anti-PSA Mab's we carried on binding and elution experiments of PSA antigen in 96-well plates. The selected Mab were immobilized in a Sepharose CL-4B activated matrix with the purpose of purify PSA from human seminal fluid. In order to optimize the purification procedure, we test several washing and elution conditions (chaotropic agents, high ionic strength solution, and extreme pH).

RESULTS. We selected a high ionic strength solution (2 M MgCl₂) as elution condition, and a previous washing step with a mix of two ionic solutions (2.5 M NaCl pH 8/1 M MgCl₂ pH 5.5) in order to purify PSA. Using such conditions we obtained a PSA preparation with 90% of purity and 50% of recovery.

CONCLUSION. In this article, we report a simple, quickly, and non-expensive procedure to obtain free-PSA from human seminal plasma at high purity levels. *Prostate* 66: 1029–1036, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: PSA; PSA purification; monoclonal antibodies

INTRODUCTION

The human glandular kallikrein genes family contains three members encoding the pancreatic renal kallikrein (hK1), kallikrein hK2, and prostate specific antigen (PSA, hK3), respectively [1]. PSA is a 34 KDa glycoprotein produced almost exclusively by the prostatic tissue [2]. The protein displays a chymotrypsin-like enzymatic activity and participates in the cleavages of high molecular mass complexes present in the seminal fluid, contributing to the liquefaction of seminal clot [3]. In normal subjects, some PSA leak to the serum, but the level increase in prostatic diseases such as benign prostatic hypertrophy and prostate cancer [4], as well as in other types of cancers [5,6]. Most of the serum PSA is associated with several circulating serpins, such as α -1-antichymotrypsin

(ACT), α 2-macroglobulin, and in a lesser extend with α 1-antitrypsin and protein-C-inhibitor (PCI) [7].

The measurement of serum PSA has become an important diagnostic tool of prostatic diseases since last decade [3,8]. Immunoassays for PSA are used to detect early-stage prostate cancer, monitor disease progress, and evaluate therapeutic response [2]. PSA at high purity is required to develop immunoassays

Grant sponsor: International Atomic Energy Agency, IAEA; Grant number: 9817.

*Correspondence to: Dr. Boris Acevedo, Recombinant Antibodies Laboratories, Pharmaceutical Division. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 and 58. Cubanacán. P.O. 6162, 10600 Habana, Cuba. E-mail: boris.acevedo@cigb.edu.cu

Received 13 January 2005; Accepted 15 February 2005

DOI 10.1002/pros.20267

Published online 5 April 2006 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com).

calibrators, as well as for use in clinical trials as antigen in the cancer vaccines [9].

Several authors reported the isolation and purification of PSA from different sources. The PSA have been obtained from prostatic tissue [10], prostatic carcinoma cell lines (LnCAPs) [11], serum, and seminal fluid [12] by a myriad of methods. In 1990, Sesanbaugh and Blake [13] reported a method to purify PSA from seminal plasma, the richest source (PSA ranges between 0.5 and 3 mg/ml) [14]. This method included one gel filtration plus two sequential ionic interchange chromatographic steps, and was adopted by Stanford University to prepare PSA standards intended to calibrate commercial PSA assays [15]. In general, the above listed procedures to purify PSA are expensive, time-consuming, and in some cases can produce low yields.

In this article, we report a simple, quickly, and non-expensive procedure to obtain free PSA from seminal plasma at high purity levels. The method consists on a single immunoaffinity chromatographic step using a previously described murine monoclonal antibody against PSA [16].

MATERIALS AND METHODS

Sources of PSA

Natural PSA was purchased from Immunocreations, Inc. (Edmonton, Canada) in lyophilized form (purity 80%). PSA was diluted in distilled water, as recommended by the supplier, to a concentration of 1 mg/ml, aliquoted, and stored at -70°C to avoid degradation.

Samples for purification of natural PSA were carried out from seminal fluids. Seminal fluids from 10 healthy male were mixed and collected in the Endocrinology Institute of Havana. Samples were centrifuged at 250g by 10 min and the supernatant material was conserved at -70°C until the purification was carried out.

Anti-PSA Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibodies (mAb) were obtained from hybridomas by a traditional technique and published previously [16]. Briefly, 11 mouse hybridoma clones (CB-PSA.1 to CB-PSA.11) were obtained that secreted IgG1 antibodies recognizing PSA fixed on a plastic well EIA surface. MAbs were classified into five different groups according to their competition ELISA profile. Only one of them (CB-PSA.2) recognized free PSA.

Binding and Elution of the Antigen Using 96-Well Plates

Polystyrene EIA strips (Polysorp, Nunc, Denmark) were coated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each anti-PSA mAb in phosphate buffered saline (PBS, 0.13 M NaCl, 0.27 M KCl, 0.0015 M KH_2PO_4 , 0.0065 M Na_2HPO_4) pH 7.2, 100

$\mu\text{L}/\text{well}$, at 37°C for 3 hr. MAb solution was removed and the blocking step was performed using 200 μL per well of PBS-1% bovine serum albumin (BSA, BDH, England). After three washing with PBS 0.05% Tween 20 (PBS-T), each anti-PSA mAb was incubated with 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PSA conjugated with NHS-biotin (Sigma, St. Louis, Missouri). After the incubation for 1 hr at 37°C , the strips were washed three times using PBS-T.

Elution of PSA from the strips was carried out by adding 100 μL per well of different elution agents: (a) 3 M KSCN, (b) 8 M urea in PBS, (c) 4.5 M MgCl_2 , (d) 0.02 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) adjusted pH 11.6, (e) 0.2 M glycine adjusted pH 3, and (f) PBS pH 7.2 as negative control. Plates were incubated by 1 hr at 37°C . A Streptavidin-HRP conjugated (Amersham, England) was then added to the wells at a 1:2,500 dilution and the plates incubated for 30 min. The reaction was developed with citrate-phosphate buffer, pH = 5.5, 0.014% H_2O_2 , and 0.05% OPD (*ortho*-phenylenediamine, Sigma, St. Louis, Missouri) for 10 min, and stopped with 2.5 M sulphuric acid (50 μL per well). The absorbance (ABS) was measured at 492 nm using a spectrophotometer (SensIDENT Scan, Merck, Germany).

Assays were performed in duplicate, and the experiment was repeated twice. Percent elution was calculated using the following formula: % elution $[E] = (1 - A/B) \times 100$, where A is the absorbance of each elution condition, and B is the absorbance of the negative control (eluted with PBS).

Binding and Elution of the Antigen Using Immunoaffinity Column, Optimization of the Washing and Elution Steps

Sepharose CL-4B activated by CNBr method was acquired (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden). CB-PSA.2 and CB-PSA.6 mAb were coupled as recommended by the manufacturer. Briefly, 10 mg of each anti PSA mAbs in 0.1 M $\text{NaHCO}_3/0.5$ M NaCl pH 8.3 were coupled with 2 g of dried gel previously reconstituted in 1 mM HCl. After that, free remnant active sites on the gel were blocked using 0.1 M Tris-HCl pH 8. The ligand coupling density was determined by measuring the total protein before and after the coupling reaction, and it was about 5 mg/mL of gel for both columns.

The gels were packed on a K 16/20 column (5 cm \times 1.6 cm I.D.) and equilibrated with PBS. The column was loaded with seminal plasma in the same starting buffer at a PSA concentration calculated by ELISA method [16]. Subsequently, different variants of washing procedures were tried: (A) 1 M NaCl/0.1% Tween-20; (B) 2.5 M NaCl/1 M MgCl_2 ; (C) 1 M NaCl; (D) 1 M NaCl/1 M KSCN. After washing the columns were eluted using 4.5 M MgCl_2 .

The purity of the eluted material from each variant was estimated through densitometry from conventional SDS-PAGE (LKB Bromma 2202 Ultrascan Laser Densitometer). Yield was calculated as the relation (%) of PSA (mg) respect to total PSA applied. PSA concentration was measured by the home ELISA method described below.

Further experiments were carried out with the immune-ligand CB-PSA.2 in order to improve the washing protocol. Column was loaded up at the same conditions described previously. After that, variants of washing buffers (NaCl₂ or MgCl₂) at different molar concentrations (1–4.5 M) were applied at the column. Elution step was developed using a molar gradient of MgCl₂. Purity and PSA concentration were analyzed as previously mentioned.

Purification of Seminal PSA Using CB-PSA.2 as Immunoligand

Seminal samples previously centrifuged and stored at -70°C were unfreeze at room temperature by 30 min. After that, seminal fluid was diluted (1:5) in coupling buffer (10 mM NaHPO₄ pH 7.2) and filtered through 0.2- μm -membrane filter (Sartorius, Germany). It was introduced into the column at a constant flux of 0.32 ml/min. The wash step was developed with a mix of two ionic solutions (2.5 M NaCl pH 8/1 M MgCl₂ pH 5.5) at 0.5 mL/min. Elution was carried out with 2 M MgCl₂. Each peak was monitored at 280 nm and collected for all running.

PSA concentration was calculated using ELISA method described below. Purity of the fractions was estimated as described previously. Western Blott was developed to identify degradations of PSA.

Presence of Mabs contaminants was calculated in the fractions by an ELISA method, previously described [17]. Briefly, polystyrene plates were incubated with IgG polyclonal in sheep anti-IgG of mice at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by 16 hr at 4°C . Fractions were added after blocking free sites of the plate with PBS-BSA 2%. Preparation of pure IgG from mice was used as standard (0.1–10 ng/ml). After washing with PBS-T, strips were incubated with commercial sheep anti-mouse-IgG-HRPO conjugated (Sigma), according to the manufacturer's instructions. The reaction was developed as described previously.

Determination of Binding Affinities by Biacore

Association and dissociation rate constants for the MABs to PSA were determined by surface plasmon resonance [18] on a Biacore instrument (Pharmacia, Sweden). Briefly, the sensor chip was activated for immobilization according to methods outlined by Pharmacia. Polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulin antibodies (Sigma) were coupled to the surface. Mouse anti-PSA MABs at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS 0.1% Tween

20/3.4 mM EDTA were injected onto the sensor chip. Binding to the antigen was studied by injection of pure PSA at 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ in the same diluent. Association and dissociation rate constants were calculated using Biacore kinetics evaluation software (Pharmacia, Sweden).

Determination of PSA Concentrations

Briefly, polystyrene plates were coated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CB.PSA-4 Mab in PBS, 100 $\mu\text{l}/\text{well}$, at 37°C for 3 hr, and blocked with PBS-1% BSA. Secondary PSA standards at different concentrations (between 100 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$) were used as standard curve, by incubating for 30 min at 37°C . Samples (100 μl) were incubated for the same time and in the same temperature as the standards. After washing with PBS-T, the strips were incubated with CB-PSA.9-biotin at 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ during 30 min. After washing with PBS-T, the strips were incubated for 1 hr at 37°C with a Streptavidin-HRPO conjugate (Amershan, England) at a 1:2,500 dilution for 30 min. The reaction was developed as was described previously.

Electrophoresis and Western Blot

Samples were ran in 12% denaturing (2-mercaptoethanol) sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and transferred onto a nitrocellulose membrane using the semi-dry procedure [19]. The membranes were blocked with PBS-1% BSA (BDH, England), and incubated for one hour with 750 μl of CB-PSA.4-biotin. After washing with PBS-T, the membranes were incubated for 1 hr at 37°C with a commercial Streptavidin-HRPO conjugate (Amershan, England) according to the manufacturer's instructions. The reaction was developed with PBS, 0.25% 3,3 Diaminobenzidine (Sigma) for 15 min, and stopped by washing with water.

RESULTS AND DISCUSSION

Eleven mouse hybridoma clones (CB-PSA.1 to CB-PSA.11) that produced IgG1 antibodies recognizing PSA fixed on a plastic well EIA surface had been obtained and reported by us elsewhere [16]. According to the competition profile, these MABs were classified in five groups due to their recognition of different epitopes within the PSA molecule. The selection of Mabs for antigen immunopurification was done based on their performance with different PSA elution agents, and washing procedures.

Elution of Bound Antigen With Different Agents

The selection of the appropriate anti-PSA MAB and the elution agents was carried out using 96-well plates. Polystyrene plates were coated with the purified

TABLE I. PSA Elution With Different Agents

Mabs	Elution (%)					
	PBS pH 7.2 ^a	3 M KSCN	4.5 M MgCl ₂	Tris pH 11.6	8 M Urea	0.2 M Glyc. pH 3
CB-PSA.1	1.2	89.7	8.3	91.6	91.6	25
CB-PSA.2	0.8	87.7	76.3	79.6	90.5	60.1
CB-PSA.4	1.4	80.3	45.6	72.9	91.9	15.8
CB-PSA.5	0.5	88.8	-6	80	80	20
CB-PSA.6	0.4	84.4	74	88.8	88.4	57.4
CB-PSA.8	0.6	87.9	11.7	83.3	83.3	16.6
CB-PSA.9	0.5	72.8	0	80	80	20

^aAll values in column are optical density at 492 nm. The rest of the Table shows percentages calculated by dividing optical density values of eluates, by the PBS values.

antibodies, incubated with biotinylated antigen, and treated with either 4.5 M MgCl₂, 8 M urea, 3 M KSCN, 0.1 M TRIS pH 11.6 or 0.2 M Glycine pH 3 (Table I). PSA recovery was measured with streptavidin-peroxidase.

The elution with the ionic agent MgCl₂ was appropriate only for CB-PSA.2 (76.3%) and CB-PSA.6 (74%), but chaotropic agents as urea or thiocyanate, and basic pH, showed the highest elution efficiencies with a majority of antibodies, with recoveries between 72.8 and 91.6% of bound antigen (Table I). In contrast, extreme acid pH had a low elution effect.

The affinity constant had a little or no correlation with the elution pattern of the MAbs as immune-ligands [20]. CB-PSA.2, CB-PSA.4, CB-PSA.6, and CB-PSA.9 exhibited nanomolar affinity constants (1.3×10^9 , 3.7×10^9 , 6×10^9 , 4.7×10^{10} , respectively), while the rest had affinity constant values in the micromolar range.

Final selection of the ionic strength solution (MgCl₂) as the elution agent was based in the percent of elution of

PSA obtained with CB-PSA.2 (76%) and CB-PSA.6 (74%), and the fact that chaotropic agents have been reported to affect the tridimensional structure of the proteins, and their biological activity [21], as well as confers a low stability to MAbs used as immunopurification ligands [22]. MgCl₂ has also two additional properties that could support the high percent of elution found: (a) a slight chaotropic effect from the Cl⁻ anion; and (b) an antigen-antibody dissociation effect mediated by the acid pH of the salt hydrolysis [21].

Finally, immune-ligands CB-PSA.2 and CB-PSA.6 were selected for subsequent experiments.

Optimization of Washing and Elution Steps With CB-PSA.2 and CB-PSA.6

Gel columns with CB-PSA.2 and CB-PSA.6 were constructed and tested, under different washing procedures. Results are summarized in Table II. Antigen purity levels higher than 90% were obtained with

TABLE II. PSA Yields and Purity With Immunoaffinity Columns Prepared With CB-PSA.2 and CB-PSA.6, Using Different Washing Protocols

Washing protocol ^a	Amount of PSA (mg)				PSA yield (%)	Purity (%)
	Applied	Non-bound	Washing	Elution		
1. CB-PSA.2						
A	2.5	0.5	1.1	0.4	16	80–90
B	2.5	0.5	0.6	1.3	52	>90
C	2.5	0.5	0.6	1.3	52	70–80
D	2.5	0.2	1.8	0.3	12	70–80
2. CB-PSA.6						
A	2.5	0.4	1.3	0.6	24	70–80
B	2.5	0.4	0.7	1	40	>90
C	2.5	0.5	0.9	1	40	70–80
D	2.5	0.4	1.6	0.1	4	70–80

^aVariante A, 1 M NaCl/0.1% Tween-20; Variante B, 2.5 M NaCl/1 M MgCl₂; Variante C, 1 M NaCl; Variante D, 1 M NaCl/1 M KSCN. In all cases the elution solution was 4.5 M MgCl₂. PSA concentrations were estimated as we described in section 7.

both CB-PSA.2 and CB-PSA.6 using washing protocol B (2.5 M NaCl/1 M MgCl₂).

Concerning recovery of natural PSA, buffers B and C were adequate using CB-PSA.2 as immunoligand. Solutions A and D showed a significant loss of PSA in the washing fractions, probably due to the presence either of detergent (Tween-20) or a chaotropic agent (KSCN). Even though CB-PSA.6 had at least four times more affinity than CB-PSA.2 ($6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ versus $1.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, respectively), recovery with CB-PSA.6 was poor (less than 40%, Table II).

Further experiments were carried out with the immune-ligand CB-PSA.2 in order to improve the B washing protocol, with respect to the NaCl and MgCl₂ content. No differences in the elution profile were obtained with NaCl in the range of 2.5 M to 4.5 M and a high percent of PSA was lost if the columns were previously washed with MgCl₂ higher than 1 M (data not show). On the other hand, we obtained a similar elution profile using 2 M MgCl₂ instead the previously described 4.5 M MgCl₂ (data not shown).

Purification of Seminal PSA Using CB-PSA.2 as Immuno-Ligand

Purification of natural PSA from seminal plasma was developed with CB-PSA.2 as immune-ligand (Table III). The sequential washing step with 2.5 M NaCl and 1 M MgCl₂ (B washing protocol) was effective in removing contaminants, with a loss of only 17% of the semen PSA content. The elution procedure with 2 M MgCl₂ rendered PSA with >90% purity and a final yield of 46% (Table III; Fig. 1: lane 7) (Fig. 2).

The proposal method described here to immunopurify PSA is outline as follow: CB-PSA.2 as immuno-ligand, seminal plasma diluted 1:5 in the coupling buffer (10mM NaHPO₄ pH 7.2). After it, two sequential washing steps procedures were implemented with

TABLE III. PSA Purification From seminal Plasma Using CB-PSA.2 as Immune-Ligand (n = 10)

	Fractions (x)			
	Initial ^a	Non bound	Washing step	2 M MgCl ₂
PSA (mg totals)	5.14	1.69	0.49	2.4
Purity (%)	2.36	1.10	42.50	91.03
Yield (%)	—	32.8	17.53	47.2

^aSample was a mixed of seminal plasma from ten patients diluted 1:5 in coupling buffer (50 ml of total volume); Yield, relation (%) of PSA (mg) respect to total PSA applied. Washing step was performed with 2.5 M NaCl/1 M MgCl₂.

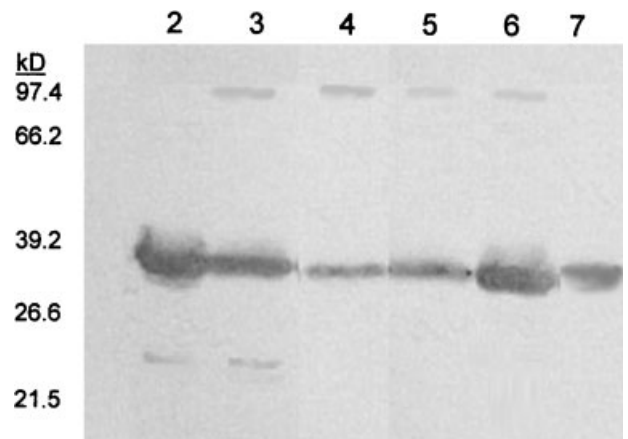


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of fractions from the purification of natural PSA: line 1 (MW, Boehringer Mamhein), line 2 (commercial PSA), line 3 (seminal plasma), lines 4 and 5 (Non bound 1 and 2), line 6 (2.5 M NaCl/1M MgCl₂), line 7 (eluted fraction 2 M MgCl₂).

2.5 M NaCl and 1 M MgCl₂ and finally, the elution procedure was carried out with 2 M MgCl₂.

The purified natural PSA was detected by Western blot according to previous descriptions of this molecule (~34 kDa, Fig. 1B) [23]. While a degradation product was detected in the sample (~23 kDa, Fig. 1B, lane 3), this was absent in the purified material (Fig. 1B, lane 7). Such degradation pattern has been reported previously by Christensson et al. [24] who demonstrated that nearly 30% of natural PSA was nicked in seminal plasma.

CB-PSA.2 Mab seems to only recognize intact PSA, and the nicked PSA is discarded in the non-bound fraction (Fig. 1A,B). Degradation of PSA has been extensively associated with the lost of enzymatic activity [24–27]. In one study conducted by Chen et al. [26], the authors analyzed the enzymatic activity of the PSA protein isolated from benign prostatic hyperplasia

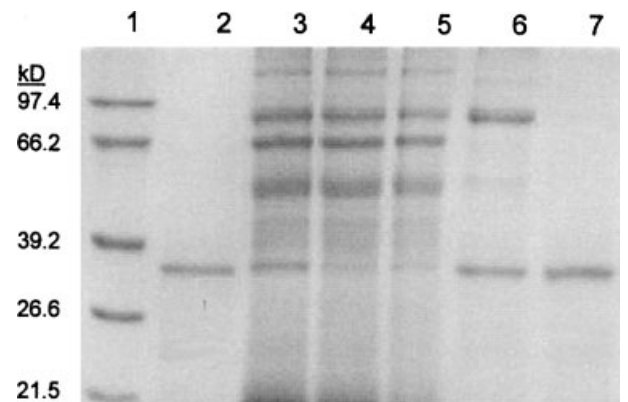


Fig. 2. Western blot analysis of fractions from the purification of natural PSA. The samples were applied as was described in figure 1.

(BPH) nodules and seminal plasma. The PSA was also submitted to SDS-PAGE electrophoresis in denaturing (2-mercaptoethanol) and non-denaturing condition. Both migrated as a single band in non-denaturing condition, but in denaturing condition the PSA isolated from BPH nodules was markedly nicked in comparison to PSA isolated from seminal plasma. These experimental findings were associated by the authors with the fact that only 20% of BPH nodule's PSA were enzymatically active whereas 50% of seminal plasma PSA was active. Furthermore, Leinonen et al. [27] associated the lack of enzymatic activity of the PSA fraction with PSA degradations by a different group of experiments. They purified seven PSA isoforms and studied the reactivity of each with protease inhibitors in vitro. Only two isoforms were enzymatically active, the other five contained internal cleavages that left them with very little or no enzymatic activity.

Tacking into account that we obtained a final PSA preparation without any detectable degradations of the protein in denature conditions (Fig. 1B, lane 7), and the fact that we used in our purification procedure a mild washing and elution conditions we assumed that a significant amount of purified PSA comprises a fully active enzyme. Nevertheless, enzymatic activity of the PSA protein obtained by this method should be evaluated.

We also detect a protein band with approximate size of 90 kDa in the original material, in the non-bound fraction, and in the first washing step with 2.5M NaCl (Fig. 1A, fractions 3–6). We assumed that this band corresponds to the PSA-PCI protein complex (PSA and protein C inhibitor, ~90 kDa), which represents 5% of total PSA fraction from seminal plasma [28]. The putative complex was absent in the final material.

Piironen et al. [29] based on results from peptide mapping, computer modeling, and previously published sandwich binding studies demonstrated that the antigenic region exposed only in free PSA and not in the PSA-ACT or PSA-PCI complexes are not shared by the highly homologous hK2 molecule [30]. In a previous work, we showed that CB-PSA.2 only recognized free PSA [16]. Since we used CB-PSA.2 anti-PSA Mab in the purification procedure we excluded the possibility that final PSA product contain an hK2 contaminating fraction [31].

The purification Western blots were also processed with anti-mouse IgG antibodies. None signal of contamination of the pure PSA preparations with Mab was evidenced (result not shown) by an ELISA method, indicating its potential usefulness for the preparation of standards [15] and for direct inoculation of humans for cancer therapy purposes [32].

This paper describes a method to purify PSA from seminal plasma with some advantages over the

traditional method reported by Sesanbaugh and Blake [13]. Our procedure can be accomplished in 1 day with a similar PSA recovery to the aforementioned method (50%) and with a purity of 90%, suitable for the preparation of the recommended 90:10 PSA standard [13]. The 90:10 PSA standard consist of 90% of PSA- α -1-antichymotrypsin (PSA-ACT) complex and 10% of free PSA mixed on a molar basis, and was proposed at the Second Stanford Conference with the rationale that these proportions of PSA are similar to those observed in patients with prostate cancer [33].

Tacking into account that CB-PSA.2 Mab only recognizes free PSA, the procedures described here could be applied to obtain the free PSA fraction of the standard. Additionally, it could be used to remove the residual free PSA from in vitro prepared PSA-ACT complexes [34], and combined with a second purification method (to remove the residual ACT) in order to obtain the final PSA-ACT preparation.

Regarding of the selection of seminal fluid as a source of antigen, so far the biological risks concerning the manipulation of human semen, the use of recombinant PSA (rPSA) obtained from a variety of expression systems such as *Escherichia coli* [35], Baculovirus [36,37], Semliki forest virus [38], and Syrian hamster tumor cells [39] involves several problems. Additionally to low yields, the isolation and refolding of rPSA from *E. coli* [35], and the variable efficiency in the cleavage of the proenzyme forms obtained from other expression systems [37–39] need to be solve. More recently Habeck et al. [40] reported the use of *Pichia pastoris* as expression system to obtain a mature recombinant PSA molecule. Although Habeck et al. demonstrated that both glycosylated or not glycosylated purified PSA are equally active in terms of enzymatic activity [40], the effect of the nature and degree of glycosylation of recombinant PSA on either immunometric and biological assays can not be predicted.

CONCLUSION

We developed a simple, quick, and non-expensive immunoaffinity method to purify PSA from seminal plasma with a purity of 90% and 50% of recovery. The method is feasibly to obtain free PSA with the purpose of prepare the 90:10 standard PSA-ACT recommended as a universal calibrator for the international standardization of PSA immunoassays. PSA preparations with diagnostic or therapeutic purposes currently under development could be obtained using this method.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported partially by a grant from International Atomic Energy Agency, IAEA (project no. 9817).

REFERENCES

- Riegman PHJ, Vliestra RJ, Suurmeijer J, Cleutjens CB, Trapman J. Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics* 1992;14:6–11.
- Armbruster DA. Prostate-specific antigen: Biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem* 1993; 39(2):181–195.
- Lilja H. Kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985;76: 1899–1903.
- Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *New Engl J Med* 1987;317:909–1016.
- Levesque M, Yu H, D'costa M, Tadross L, Diamandis EP. Immunoreactive prostate-specific antigen in lung tumors. *J Clin Lab Anal* 1995;9:375–379.
- Kucera E, Kainz C, Tempfer C, Zeillinger R, Koelbl H, Sliutz G. Prostate specific antigen (PSA) in breast and ovarian cancer. *Anticancer Res* 1997;17:4735–4737.
- Abrahamsson PA, Lilja H, Oesterling JE. Molecular forms of serum prostate-specific antigen. *Urologic Clin North America* 1997;24:353–365.
- Partin AW, Carter HB, Chan DW, Epstein JI, Oesterling JE, Rock RC, Weber JP, Walsh PC. Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: Influence of tumor differentiation, tumor volume and benign hyperplasia. *J Urol* 1990;143:747–752.
- Spitler L. Method to elicit an antitumor response with human Prostate-Specific Antigen. US patent N 5.925.362.
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy G, Chu TM. A simplified purification procedure for human prostate antigen. *Oncology* 1982;39:1–5.
- Jette DC, Kreutz FT, Malcolm BA, Wishart DS, Noujaim AA, Suresh MR. Epitope mapping of prostate-specific antigen with monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1996;42:12.
- Tessmer U, Quack T, Donn F, Leuner A, Dernick R. Biological activity of prostate-specific antigen isolated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electroelution. *Electrophoresis* 1995;16:793–799.
- Sesanbaugh GF, Blake ET. Seminal plasma protein p30: Simplified purification and evidence for identity with prostate specific antigen. *J Urol* 1990;144:1523–1526.
- Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Lynne CM, Brackett NL. PSA concentrations in seminal plasma. *Clin Chem* 1998;44:895–896.
- Segurado OG, Volmer W, Dowell B. PSA standardization: A review of NCCLS, Stanford and Abbott efforts. *Anticancer Res* 1997;17(4):2919–2920.
- Acevedo B, Perera Y, Ruiz M, Rojas G, Benitez J, Ayala M, Gavilondo J. Development and validation of a quantitative ELISA for the measurement of PSA concentration. *Clin Chim Acta* 2002;317:55–63.
- Ibarra N, Caballero A, Gonzalez E, Valdes R. Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen. *J Chromatography B* 1999;735:271–277.
- O'Shannessy DJ. Determination of kinetic rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions: A critique of the surface plasmon resonance literature. *Curr Opin Biotechnol* 1994;5(1):65–71.
- Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979;76:4350–4354.
- Sada E, Katoh S, Kiyokawa A, Kondo A. Characterization of fractionated polyclonal antibodies for immunoaffinity chromatography. *Biotechnol Bioeng* 1988;31:635–642.
- Yarmush ML, Pickard K, Sundaram S, Yarmush DM. Immunoabsorption: Strategies for antigen elution and production of reusable absorbents. *Biotechnol Prog* 1992;8:168–178.
- Almagro I, Agraz A, Fernández de Cossio ME. Purificación del AGSHB-R por cromatografía de inmunoafinidad. *Biocología Aplicada* 1994;11:175–179.
- Qian Y, Sensibar JA, Zelner DJ, Schaeffer AJ, Finlay JA, Rittenhouse HG, Lee CH. Two-dimensional gel electrophoresis detects Prostate-Specific Antigen- α -1-Antichymotrypsin complex in serum but not in prostatic fluid. *Clin Chem* 1997;43:352–359.
- Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *Eur J Biochem* 1990;194:755–763.
- Zhang WM, Leinonen J, Kalkkinen N, Dowell B, Stenman UH. Purification and Characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. *Clin Chem* 1995;41:1567–1573.
- Chen Z, Chen H, Stamey T. Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: Purification and characterization. *J Urol* 1997;157:2166–2170.
- Leinonen J, Zhang WM, Stenman UH. Complex formation between PSA isoenzymes and protease inhibitors. *J Urol* 1996;155:1099–1103.
- Becker C, Lilja H. Individual Prostate-Specific Antigen (PSA) forms as prostate tumor markers. *Clin Chim Acta* 1997;257:117–132.
- Piironen T, Villoutreix BO, Becker CH, Hollingsworth K, Vihinen M, Bridon D, Qiu X, Rapp J, Dowell B, Lovgren T, Pettersson K, Lilja H. Determination and analysis of antigenic epitopes of prostate specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) using synthetic peptides and computer modeling. *Protein Science* 1998;7:259–269.
- Schendlich LJ, Bennetts BH, Morris BJ. Primary structure of a human glandular kallikrein gene. *DNA* 1987;6:429–437.
- Frenette G, Gervais Y, Tremblay RR, Dube JY. Contamination of purified Prostate-Specific Antigen preparations by Kallikrein hK2. *J Urology* 1998;159:1375–1378.
- Meidenbauer N, Harris DT, Spitler LE, Whiteside TL. Generation of PSA-reactive effector cells after vaccination with a PSA-based vaccine in patients with prostate cancer. *Prostate* 2000; 43(2):88–100.
- Stamey TA. Second Stanford Conference on International Standardization of Prostate-Specific Antigen Immunoassays. *Urology* 1995;45:173–174.
- Prestigiacomo AF, Chen Z, Stamey TA. A universal calibrator for prostate specific antigen (PSA). *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995;221:57–59.
- Takayama TK, Fujikawa K, Davie EW. Characterization of the precursor of prostate specific antigen. *J Biol Chem* 1997;272: 21582–21588.
- Bei R, Paranavitana C, Milenic D, Kashmiri SV, Schlom J. Generation, purification, and characterization of a recombinant

- source of human prostate-specific antigen. *J Clin Lab Anal* 1995;9:261–268.
37. Kurkela R, Herrala A, Henttu P, Nai H, Vihko P. Expression of active secreted human prostate-specific antigen by recombinant baculovirus-infected cells on a pilot scale. *Biotechnology* 1995;13:1230–1234.
38. Lovgren J, Rajakoski K, Kart M, Lundwall A, Lilja H. Activation of the zymogen form of prostate-specific antigen by human glandular kallikrein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238:549–555.
39. Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS. Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2. *Cancer Res* 1997;57:3111–3114.
40. Habeck LL, Belagaje RM, Becker GW, Hale JE, Churgay LM, Ulmer M, Yang XY, Shackelford KA, Richardson JM, Johnson MG, Mendelsohn LG. Expression, purification, and characterization of active recombinant prostate-specific antigen in *Pichia pastoris* (Yeast). *The Prostate* 2001;46:298–306.