(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 445 185**

(51) Int. CI.:

G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/96 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2007 E 07848631 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2115472**

(54) Título: **Biomarcadores de cáncer**

(30) Prioridad:

19.12.2006 GB 0625321
10.10.2007 GB 0719792

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2014

(73) Titular/es:

THE UNIVERSITY OF SURREY (100.0%)
Guildford Surrey GU2 7XH , GB

(72) Inventor/es:

PANDHA, HARDEV y
MORGAN, RICHARD GEORGE LEONARD

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores de cáncer

La presente invención se refiere al uso de al menos un homeodominio que contiene factor de transcripción, tal como péptido HOX o péptido EN-2, como biomarcador para cáncer de próstata.

El cáncer de próstata es actualmente la principal causa de muerte relacionada con cáncer entre los hombres, siendo responsable de la muerte de 10.000 hombres al año solo en el Reino Unido. Sin embargo, la disponibilidad actual de biomarcadores para la detección no invasiva del cáncer de próstata está limitada esencialmente al Antígeno Específico de Próstata (PSA, del inglés "Prostate Specific Antigen"). Los niveles en suero de PSA se ven incrementados significativamente en pacientes con cáncer de próstata, y actualmente se usa el test de PSA para seguir la evolución de la enfermedad y su respuesta frente a un tratamiento.

Desafortunadamente, existe una serie de desventajas significativas con el test de PSA. Puesto que los niveles de PSA se ven incrementados significativamente en otras afecciones no cancerígenas de la próstata, tal como la prostatitis y la hipertrofia benigna, no siempre es seguro que la detección de un aumento de los niveles de PSA sea realmente indicativa de un cáncer de próstata en un paciente. Adicionalmente, los niveles de PSA no se correlacionan necesariamente con el volumen de la enfermedad o con el desarrollo de metástasis nodal u ósea.

Recientes intentos de usar otros indicios como la relación de PSA libre a PSA total y la "velocidad de PSA" han demostrado no ser válidos, debido al muy alto nivel de falsos positivos, que da como resultado un gran número de biopsias invasivas innecesarias.

De hecho, se cree que los niveles de PSA se elevan solo de forma muy lenta en el cáncer de próstata, de tal modo que la enfermedad a menudo está muy avanzada antes de obtener un resultado positivo, cuando se miden los niveles de PSA. Además, los niveles de PSA deben ser normalizados, ya que puede variar con la edad y el tamaño de la próstata.

También existe una serie de marcadores químicos potenciales adicionales del cáncer de próstata, que incluyen las calicreínas, y más recientemente, los fragmentos de 80 kDa de la e-caderina (Kuefer *et al.*, 2005). Nuevamente, dichos biomarcadores tienden a presentar muchas de las desventajas significativas discutidas anteriormente en relación al PSA.

Morgan *et al*. (Proc. Amer. Cancer Res. Vol. 47, 2006, p. 622) describe que EN-2 se transcribe tanto en la línea celular derivada de cáncer de próstata (LNCaP), como en las células de cáncer de próstata primarias. La proteína EN-2 también está presente dentro de dichas células, y en el medio de cultivo, en concurrencia con estudios previos que demuestran que la EN-2 es secretrada.

Bose *et al*. (Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. Vol. 48, 2007, p. 503) describen que EN-2 se expresa de forma aberrante en células de cáncer humano en comparación con células de próstata normales.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de un biomarcador de cáncer de próstata fiable.

Sorprendentemente, hemos descubierto que el factor de transcripción homeótico, HOXC4, es secretado desde tumores de próstata y su concentración en suero es significativamente elevada en pacientes de cáncer de próstata. Por tanto, la presencia de HOXC4 en fluidos corporales, tales como el suero, es un indicador útil de cáncer de próstata tanto en etapa temprana como en etapa avanzada.

También hemos descubierto que una segunda proteína HOX, la HOXB6, y una tercera proteína HOXB5, también presentan resultados similares. La HOXA3 y la HOXD9 también son consideradas útiles como biomarcadores.

Además hemos identificado el factor de transcripción que contiene homeodominio *Engrailed 2* (EN-2) como expresado tanto a nivel de ARN como de proteína en las líneas celulares derivadas de cáncer de próstata LNCaP y PC3, y también en células de cáncer de próstata primarias. Además, la proteína EN-2 puede ser secretada en el medio circundante de las células.

Sorprendentemente, se podrían detectar niveles elevados de todos estos marcadores de cáncer en pacientes de cáncer de próstata incluso cuando se obtenían niveles normales de PSA. Esto ilustra adicionalmente que los marcadores de la presente invención son más fiables en la diagnosis de cáncer de próstata que otros marcadores, tales como PSA.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o un fragmento del mismo, como biomarcador para cáncer de próstata. Los ejemplos de factores de transcripción que contienen homeodominio incluyen péptidos de EN-2. La invención también se refiere a un método para diagnosticar la enfermedad de cáncer de próstata que comprende detectar al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio en una muestra procedente de un paciente.

Se prefiere particularmente que el al menos un péptido EN-2, o fragmento del mismo, sea detectable en un fluido corporal.

Preferiblemente, el biomarcador es solo EN-2. Sin embargo, también se prefieren combinaciones. Dichas combinaciones incluyen EN-2 y HOXC4; EN-2 y HOXB5; EN-2 y HOXB6; EN-2, HOXC4 y HOXB5; EN-2, HOXC4 y HOXB6; EN-2, HOXB5 y HOXB6; EN-2, HOXC4, HOXB5 y HOXB6. Dichas combinaciones también pueden comprender adicionalmente uno o ambos de HOXA3 y/o HOXD9. Combinaciones adicionales incluyen HOXA3 y HOXD9; HOXA3 y HOXC4; HOXA3 y HOXB5; HOXA3 y HOXB6; HOXA3 y EN-2; HOXD9 y HOXC4; HOXD9 y HOXB5; HOXD9 y HOXB6 y EN-2. Una combinación particularmente preferida de marcadores comprende uno o más, preferiblemente todos, de HOXC4, HOXB5, HOXB6 y EN-2.

Preferiblemente, el fluido corporal es suero u orina.

Los genes HOX son una familia de factores de transcripción que contienen homeodominio que determinan la identidad de células y tejidos durante el desarrollo inicial (revisión de Morgan, 2006). Publicaciones recientes, que incluyen Miller *et al* 2003, han identificado de manera eficaz todas las proteínas que se expresan, y que son retenidas intracelularmente, en una célula tumoral de cáncer de próstata. Por supuesto, esto significa que se identificaron un total de entre 10.000 y 12.000 proteínas, incluyendo los péptidos HOX.

Sin embargo, sorprendentemente hemos descubierto que, entre estos miles de proteínas expresadas en las células de cáncer de próstata, la proteína HOXC4, por ejemplo, se encuentra extracelularmente y es un excelente biomarcador para el cáncer de próstata.

Esto es sorprendente por una serie de razones. En primer lugar, HOXC4 es un factor de transcripción y, por tanto, no sería esperable encontrarlo en el suero. En segundo lugar, aunque se conocen otros biomarcadores para el cáncer de próstata, encontrar un biomarcador fiable ha sido una misión infructuosa, véanse por ejemplo los problemas descritos anteriormente en relación al PSA. De hecho, HOXC4 es un biomarcador tanto de etapa temprana como, en particular, de etapa avanzada, tal como se muestra en la Figura 1.

Por tanto, esta proteína no ha sido identificada como biomarcador para el cáncer de próstata antes, aunque se sabe que se expresa en células de cáncer de próstata, junto con muchos miles de otras proteínas, muchas de las cuales no podrían ser descritas como biomarcadores para el cáncer de próstata. Esto también se aplica a otros péptidos HOX, que incluyen HOXB5 y HOXB6.

Como los péptidos HOX, las proteínas Engrailed (En) también son factores de transcripción que contienen homeodominio que muestran un grado muy elevado de conservación funcional durante el desarrollo (revisado por Morgan, 2006). El gen *En* original fue caracterizado en Drosophila, donde el mutante *En* no consigue formar una frontera entre el ala anterior y posterior (Garcia-Bellido y Santamaria, 1972). Del mismo modo, los homólogos de vertebrados de *En* presentan roles reguladores durante el desarrollo, que incluye el desarrollo de miembros y la especificación temprana y las migraciones axonales subsiguientes del sistema nervioso (Morgan, 2006).

Además de la regulación transcripcional, las proteínas EN tienen una serie de propiedades adicionales, aparentemente no relacionadas, que son importantes funcionalmente. La primera de ellas es la capacidad para ser secretadas desde las células, y para ser internalizadas por parte de otras (Cosgaya *et al*, 1998; Joliot *et al*, 1998, revisado por Morgan, 2006). La base mecanística exacta para este fenómeno es desconocida, aunque está claro que depende de la secuencia de exportación nuclear conservada localizada en el homeodominio (Maizel *et al*, 1999; Chatelin *et al*, 1996; Derossi *et al*, 1996; Joliot *et al*, 1997).

Además de su función en el desarrollo, recientemente se ha demostrado que *EN-2* es un oncogén potencial en el cáncer de mama (Martin *et al*, 2005). Líneas celulares mamarias murinas no tumorogénicas forzadas a expresar *EN-2* exhiben posteriormente una serie de características de malignidad que incluyen un acortamiento del ciclo celular y una pérdida de contacto célula a célula. Además, el silenciamiento de ARNi de *EN-2* indica que es requerido para el mantenimiento del fenotipo transformado en una línea celular de cáncer de mama humano.

Hemos descubierto que *EN-2* está sobreexpresada y es secretada en la línea celular derivada de cáncer de próstata LNCaP y en muestras de tejido humano procedentes de Adenocarcinoma prostático. Adicionalmente, *EN-2* es secretada desde células ductales y tumores de Adenocarcinoma y está presente en la orina de pacientes de cáncer de próstata. Esta es la primera vez que se ha sugerido EN-2 como marcador de cáncer de próstata.

Preferiblemente, se detecta la presencia o la ausencia de el al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, tal como un péptido EN-2, o fragmento del mismo.

En la presente memoria también se describe que el al menos un péptido HOX se selecciona entre cualquier péptido HOX de los enumerados más adelante, siempre que el péptido HOX, o fragmento del mismo, sea detectable en un fluido corporal tal como suero u orina.

También se describe en la presente memoria que el al menos un péptido HOX, o fragmento del mismo, procede de la subfamilia HOXA, HOXB, HOXC ó HOXD. Si se usa más de un péptido HOX, entonces éstos pueden proceder de

la misma familia o de una combinación de familias. También se contemplan las combinaciones de fragmentos, tanto fragmentos de la misma proteína como fragmentos de diferentes proteínas. Las combinaciones de péptidos diferentes pueden proporcionar un diagnóstico más preciso. Se prefiere que el péptido HOX no sea HOXA4, HOXA1, HOXA7, HOXB3 ó HOXB9.

También se describe en la presente memoria que el péptido HOX es el péptido HOXC4, y/o el péptido HOBX6 y/o el péptido HOXB5, y/o el péptido HOXA3, y/o el péptido HOXD9, o fragmentos de los mismos.

También se describe en la presente memoria que el péptido HOXC4 es el proporcionado en la SEQ ID NO. 1 (nº de acceso NBCI P09017, gi: 123279), o un fragmento de la misma. También se describe en la presente memoria que el péptido HOXB6 es el proporcionado en la SEQ ID NO. 2 (nº de acceso NBCI P17509, gi: 116242515), o un fragmento de la misma. También se describe en la presente memoria el péptido HOXB5, que es proporcionado en la SEQ ID NO. 3 (nº de acceso NBCI P09067, gi: 400000), o un fragmento de la misma. Preferiblemente, el péptido EN-2 es el proporcionado por la SEQ ID NO. 4 (nº de acceso NCBI P19622, gi: 21903415), o un fragmento de la misma. También se describe en la presente memoria que el péptido HOXA3 es el proporcionado en la SEQ ID NO. 5 (nº de acceso NBCI de ARNm NM_030661, gi: 84043946), o un fragmento de la misma. También se describe en la presente memoria que el péptido HOXD9 es el proporcionado en la SEQ ID NO. 6 (nº de acceso NBCI de ARNm NM_014213, gi: 23397673), o un fragmento de la misma.

Cuando se hace referencia a HOXC4, péptido HOXC4 o un fragmento del mismo, debe entenderse que dichos términos pueden usarse de forma intercambiable, a menos que la evidencia indique lo contrario. Lo mismo es aplicable para los otros péptidos HOX y EN-2.

Adicionalmente, cuando se hace referencia en la presente memoria a HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3 ó HOXD9, esto también se aplica a otros péptidos de HOX, o combinaciones de los mismos, a menos que la evidencia indique lo contrario.

De forma similar, cuando se haga referencia en la presente memoria a una secuencia particular, tal como una secuencia de referencia o una SEQ ID NO, esto se aplica a todas las SEQ ID NO y a cualquiera de las secuencias de HOX proporcionadas más adelante, a menos que la evidencia indique lo contrario.

Preferiblemente, el fragmento comprende al menos un 80% de homología de secuencia con la secuencia de referencia (p. ej., EN-2), más preferiblemente un 85%, más preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95%, más preferiblemente un 97%, más preferiblemente un 99% y lo más preferiblemente un 99,9% de homología de secuencia con la secuencia de referencia, o tan cerca de ello como sea apropiado. Los métodos adecuados para establecer la homología de secuencia incluyen el programa BLAST.

Preferiblemente, el fragmento comprende al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia (p. ej., EN-2), más preferiblemente un 85%, más preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95%, más preferiblemente un 97%, más preferiblemente un 99% y lo más preferiblemente un 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia, o tan cerca de ello como sea apropiado. Los métodos adecuados para establecer la identidad de secuencia incluyen el programa BLAST.

Se dice que dos polipéptidos son “homólogos”, tal como se usa el término en la presente memoria, si la secuencia de uno de los polipéptidos tiene un grado suficientemente elevado de identidad o de similitud con respecto a la secuencia del otro polipéptido. “Identidad” indica que en cualquier posición concreta de las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. “Similitud” indica que, en cualquier posición concreta de las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Los grados de identidad y de similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing, Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). El porcentaje de identidad, tal como es referido en la presente memoria, es tal cual se determina mediante BLAST versión 2.1.3 usando los parámetros por defecto especificados por el NCBI (National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) [Blosum 62 matrix; penalización de abertura de hueco = 11 y penalización de extensión de hueco = 1].

Preferiblemente, el fragmento comprende al menos cuatro aminoácidos consecutivos de la secuencia de referencia, más preferiblemente al menos 5, más preferiblemente al menos 6, más preferiblemente al menos 7, más preferiblemente al menos 8 aminoácidos consecutivos de la secuencia de referencia, tal como las SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, aunque también se prefieren fragmentos más largos de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 225 y hasta al menos 250 aminoácidos. Los fragmentos también incluyen péptidos truncados que tengan x aminoácidos eliminados del extremo N y/o del extremo C. En dichas eliminaciones, x puede ser 1 ó más (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ó más), pero preferiblemente menos de 150.

Sin pretender establecer ninguna teoría, se cree que HOXC4 es secretado a través de una ruta no clásica, sin requerir una secuencia señal. Por lo tanto, se cree que la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO. 1 es la misma que la proteína encontrada en el suero. Esto se corrobora mediante la observación de que la banda detectada es de un tamaño correspondiente (Mw) al tamaño predicho en base a la secuencia génica. Las proteínas HOX también pueden abandonar células a través de otros mecanismos, p. ej. lisis celular.

El término "biomarcador" se usa en la técnica y significa un indicador biológico o derivado biológicamente distintivo de un proceso, suceso o afección. En otras palabras, un biomarcador es indicativo de un estado biológico concreto, tal como la presencia de tejido canceroso. En algunos casos, diferentes formas de biomarcadores pueden ser indicativas de determinados estados de enfermedad pero, sin pretender establecer ninguna teoría, se cree que meramente la presencia de niveles elevados de un péptido HOXC4, o de un fragmento del mismo, en fluidos corporales tales como el suero, es indicativa de cáncer de próstata. Aunque actualmente no se contempla que se secreten diferentes glicoformas, por ejemplo, del péptido HOXC4, no obstante éstas son contempladas por la presente invención. Por ejemplo, todavía pueden determinarse glicoformas diferentes, tales como una estructura de glicoforma alterada o un contenido de sacáridos, para el HOXC4, pero éstas son contempladas y también pueden incluso ser indicativas del progreso del cáncer de próstata. Las truncaciones, mutaciones o eliminaciones, o las ligaciones practicadas al péptido HOXC4, o a un fragmento del mismo, también son contempladas.

Sin embargo, el principal descubrimiento que apoya la presente invención es que existe un incremento significativo del nivel de HOXC4 detectable en fluidos corporales, tal como el suero. Se cree que el HOXC4 es secretado, pero también se contempla que pueda ser debido a proteína HOXC4 lixiviada desde células moribundas. De forma similar, se puede secretar EN-2 o puede ser detectable en fluidos corporales debido a lixiviación desde células dañadas o muertas. Dichos niveles incrementados son indicativos de cáncer de próstata tanto de etapa temprana como de etapa avanzada. Aunque se produce un incremento significativo entre los niveles de control o normales y el cáncer de próstata de etapa temprana, también existe un incremento muy significativo entre el cáncer de etapa temprana y el de etapa avanzada. De forma general, es una ventaja de la presente invención el que se pueda detectar la sustancia y también el estado del cáncer de próstata. Esto ayuda en la prognosis y en la provisión de terapias adecuadas.

También es una ventaja de la presente invención que es capaz de distinguir por encima de afecciones tales como la hiperplasia prostática benigna BTH (BPH, del inglés "benign prostatic hiperplasia"). Dichas afecciones, que conducen a un crecimiento de la glándula prostática, pueden ser malinterpretadas como cáncer de próstata cuando se usan las técnicas establecidas para determinar la presencia de cáncer de próstata, tal como el Examen Rectal Digital (ERD). Otra ventaja de la presente invención es que se puede proporcionar un diagnóstico preciso sin recurrir a procedimientos invasivos desagradables y potencialmente dañinos, que también pueden ser imprecisos. Además, la presente invención es particularmente sensible. Preferiblemente, los métodos de la presente invención pueden detectar el inicio del cáncer de próstata antes que cualquier otro método de detección y antes del inicio de los síntomas manifiestos del cáncer de próstata. Por lo tanto, el cáncer puede ser tratado en una etapa temprana, cuando es más susceptible a dicho tratamiento y es menos probable que haya entrado en la etapa metastásica.

Se conocen diferentes tipos de cáncer de próstata. El más común comienza en las células de la glándula prostática y se conoce como adenocarcinoma de próstata. Sin embargo, existen otras formas de cáncer de próstata, tales como sarcomas, carcinomas de célula pequeña y carcinomas de célula transicional. Los métodos de la invención pueden usarse para detectar el inicio de cualquiera de estos tipos de cáncer, aunque se prefiere la detección de adenocarcinoma.

La progresión del cáncer es monitorizada a través de un proceso por etapas. Éste indica cómo de desarrollado se encuentra el cáncer y si se ha extendido. La puntuación tiene un rango entre uno y cuatro, haciéndose la prognosis progresivamente peor en cada etapa.

Etapa Uno: las células malignas están confinadas en la próstata; no se han extendido a los nodos linfáticos o a otros órganos; las puntuaciones de Gleason van de dos a cuatro, y menos de un cinco por ciento de la próstata está compuesta por crecimiento tumoral.

Etapa Dos: las puntuaciones de Gleason están en cinco o superior, o más del cinco por ciento de la glándula muestra un crecimiento anormal; el cáncer todavía está restringido a la próstata.

Etapa Tres: las células malignas se han extendido a las vesículas seminales, pero no a los nodos linfáticos o a otros órganos.

Etapa Cuatro: los nodos linfáticos, el tejido pélvico u órganos más distantes están afectados.

Preferiblemente, los métodos de la invención detectan el inicio del cáncer de próstata antes o durante las etapas uno o dos, más preferiblemente en la etapa uno.

Los biomarcadores de péptidos de la presente invención se pueden usar en métodos de diagnosis, por ejemplo en escrutinio clínico, y en métodos de determinación de prognosis, monitorizando los resultados de la terapia,

identificando pacientes con mayor probabilidad de responder a un tratamiento terapéutico particular, escrutinio de fármacos y desarrollo. Además, los biomarcadores de la presente invención y los usos de los mismos son valiosos para la identificación de nuevos tratamientos con fármacos y para el descubrimiento de nuevas dianas para el tratamiento con fármacos.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para diagnosticar o monitorizar la progresión de cáncer de próstata, que comprende la detección y/o la cuantificación de al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio tal como péptido EN-2 o un fragmento del mismo. Preferiblemente, el péptido comprende o consta de la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO 4. Preferiblemente, el al menos un péptido de EN-2, o un fragmento del mismo, está presente en una muestra biológica procedente de un sujeto evaluado, siendo dicha muestra biológica orina. También se prefiere que el fluido corporal esté sustancial o completamente libre de células enteras/intactas. Preferiblemente, el fluido corporal está libre de plaquetas y desechos celulares (tales como los producidos tras lisis de las células). Preferiblemente, el fluido corporal está libre tanto de células procarióticas como de células eucarióticas.

Dichos fluidos pueden obtenerse mediante una serie de medios conocidos en la técnica, tales como los evidentes para el especialista. Por ejemplo, una muestra de orina es fácil de obtener, mientras que las muestras de sangre o de suero pueden obtenerse parenteralmente usando una aguja y jeringa, por ejemplo. Las muestra libres de células o sustancialmente libres de células pueden obtenerse sometiendo al fluido corporal a varias técnicas conocidas por los especialistas en la técnica que incluyen, aunque sin limitación, centrifugación y filtración.

Aunque generalmente se prefiere no usar técnicas invasivas para obtener la muestra, todavía puede ser preferible obtener muestras tales como homogenatos de tejido, secciones de tejido y especímenes para biopsia.

Los métodos de monitorización de la presente invención pueden usarse para detectar el inicio, la progresión, la estabilización, el alivio y/o la remisión de cáncer de próstata. Por tanto, la detección del al menos un péptido de EN-2, o fragmento del mismo, puede usarse para determinar la progresión de la enfermedad, con el objetivo de orientar a un médico hacia un tratamiento particular.

Preferiblemente, se proporcionan al menos dos etapas de detección y/o cuantificación, preferiblemente separadas temporalmente, por ejemplo por unos días, semanas, años o, más preferiblemente, meses, para determinar si los niveles de el al menos un péptido de EN-2, o fragmento del mismo, han cambiado, indicando de este modo si ha habido un cambio en la progresión del cáncer. Esto permite realizar comparaciones entre un nivel del biomarcador en muestras tomadas en dos o más ocasiones, ya que un aumento del nivel del péptido con el tiempo es indicativo del inicio o la progresión del cáncer, mientras que un descenso del nivel del péptido puede indicar un alivio y/o una remisión del cáncer.

Preferiblemente, un método de diagnosis o de monitorización según la presente invención comprende comparar el nivel del péptido presente en una muestra de ensayo, con el nivel en uno o más controles. Preferiblemente, los controles pueden ser del mismo paciente de una muestra previa, para monitorizar así el inicio o la progresión. Sin embargo, también se prefiere que los controles puedan estar normalizados para una población, particularmente una población sana o normal, en la que no hay cáncer de próstata. En otras palabras, el control puede consistir en el nivel de un biomarcador observado en una muestra de control normal procedente de un sujeto normal.

Por lo tanto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer de próstata que comprende cuantificar o detectar la cantidad de al menos un péptido de EN-2, o fragmento del mismo, y comparar la cantidad de dicho péptido en dicha muestra de ensayo con la cantidad presente en una muestra biológica de control normal procedente de un sujeto normal o del mismo sujeto bastante antes de la incidencia de la enfermedad. Si en la muestra de ensayo se observa un aumento significativo del nivel del al menos un péptido de EN-2, o fragmento del mismo, entonces es indicativo de que la enfermedad se encuentra en progresión o se ha iniciado.

Como se ha indicado anteriormente, este método de detección de al menos un péptido de EN-2, o fragmento del mismo, es particularmente útil para la detección de cáncer de próstata de etapa temprana, y es más sensible que el test tradicional para detectar niveles de PSA. Por tanto, los métodos de la invención son particularmente útiles para confirmar el cáncer cuando un paciente ha dado negativo para cáncer usando métodos convencionales, tal como la detección de PSA.

En general, el nivel de la secreción del al menos un péptido de EN-2 en los fluidos corporales se encuentra en los rangos descritos más adelante.

Debe entenderse que los términos “péptido” y “proteína” son intercambiables tal como se usan en la presente memoria, a menos que lo contrario sea evidente.

La Tabla 1 y la Figura 1, por ejemplo, muestran un aumento muy destacable en las concentraciones de proteína HOXC4 en suero. La Tabla 2 y la Figura 2 muestran resultados similares para HOXB6. También hemos demostrado que HOXB6 es un biomarcador para cáncer de próstata de etapa avanzada (datos no mostrados). HOXB5 también

es un biomarcador, pero es menos preferido que HOXB6 ó HOXC4 (Tabla 3 y Figura 7). Otros biomarcadores alternativos incluyen HOXA3 y HOXD9 (véase la Figura 8).

Preferiblemente, el incremento es estadísticamente significativo, determinado usando métodos estándar, tales como un "test t" que proporciona intervalos de confianza preferiblemente inferiores a al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 97%, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente al menos el 99,5%, más preferiblemente al menos el 99,95%, y lo más preferiblemente al menos 99,99%.

Preferiblemente, el aumento entre el control y una muestra indicativa de cáncer de próstata de etapa temprana está aproximadamente en 110-200%, más preferiblemente aproximadamente en 120-180%, más preferiblemente aproximadamente en 130-160%, más preferiblemente aproximadamente en 140-150%, más preferiblemente aproximadamente en 110-140%, más preferiblemente aproximadamente en 115-130%, más preferiblemente aproximadamente en 120-130%, más preferiblemente aproximadamente en 120-140%, y lo más preferiblemente aproximadamente 125%. También se contemplan otras combinaciones de los puntos finales anteriores.

Con respecto a la determinación de cáncer de etapa avanzada, el aumento entre el control y una muestra indicativa de dicho cáncer de próstata de etapa avanzada se encuentra aproximadamente en 400-800%, más preferiblemente aproximadamente en 450-750%, más preferiblemente aproximadamente en 500-700%, más preferiblemente aproximadamente en 520-680%, más preferiblemente aproximadamente en 540-640%, más preferiblemente aproximadamente en 550-620%, más preferiblemente aproximadamente en 560-600%, más preferiblemente aproximadamente en 570-590%, y lo más preferiblemente aproximadamente 580%. El aumento también puede encontrarse en el intervalo 550-800% ó 400-600%. También se contemplan otras combinaciones de los puntos finales anteriores.

Un aumento entre el cáncer de etapa temprana y el de etapa avanzada se puede medir respecto a un control normal (es decir, sin cáncer) o respecto a un control o muestra de etapa temprana del mismo paciente. Respecto a una muestra de etapa temprana se prefiere un incremento de aproximadamente entre 100% y 300%, más preferiblemente de aproximadamente entre 150% y 250%, más preferiblemente de aproximadamente entre 175% y 225%, más preferiblemente de aproximadamente entre 185% y 215%, más preferiblemente de aproximadamente entre 100% y 220%, más preferiblemente de aproximadamente entre 170% y 300%, y lo más preferiblemente de aproximadamente 200%.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando se hace referencia en la presente memoria a al menos un péptido que contiene homeodominio, esto se aplica a péptidos HOX, tales como HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3 y HOXD9, y al péptido de EN-2, a menos que lo contrario sea evidente.

Cuando se hace referencia en la presente memoria a al menos un péptido HOX o péptidos HOX, esto se aplica a HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3 y HOXD9, en particular, así como a otros péptidos HOX enumerados más adelante, a menos que lo contrario sea evidente.

En términos de cantidades absolutas de al menos una proteína HOX ó EN-2 por mL de fluido corporal, preferiblemente suero, ésta está preferiblemente en aproximadamente 0,5-1,5 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 0,75-1,25 ng/mL, y lo más preferiblemente en aproximadamente 1,0 ng/mL para las muestras de control. Para las muestras de cáncer de etapa temprana, los intervalos preferidos se encuentran en aproximadamente 2,0-5,0 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 2,5-4,5 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 2,5-4,0 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 2,75-3,5 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 2,75-3,0 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 2,0-3,5 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 2,0-3,0 ng/mL, y lo más preferiblemente en aproximadamente 3,0 ng/mL.

Para las muestras de etapa avanzada, los intervalos preferidos se encuentran en aproximadamente 6,0-20 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 8,0-15 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 8,5-13 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 9,0-12 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 9,5-11 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 7-13 ng/mL, más preferiblemente en aproximadamente 8,5-16 ng/mL, y lo más preferiblemente en aproximadamente 10 ng/mL.

El término "diagnosis" abarca la identificación, la confirmación y/o la caracterización de la presencia o la ausencia de cáncer de próstata, junto con la etapa de desarrollo del mismo, tal como etapa temprana o etapa avanzada, o cáncer de próstata benigno o metastásico.

Cabe destacar que la naturaleza de la "etapa temprana" y de la "etapa avanzada" de los estados de enfermedad de cáncer pueden ser determinados por un médico. También se contempla que se puedan referir como no metastásico y metastásico, respectivamente.

La invención también proporciona un método para monitorizar la eficacia de un tratamiento para el cáncer de próstata, que comprende detectar y/o cuantificar el al menos un péptido de EN-2, o un fragmento del mismo, presente en una muestra biológica procedente de un sujeto. Como antes, puede ser preferible obtener dos

muestras, separadas temporalmente por, por ejemplo, un par de meses, a fin de determinar si ha habido algún progreso en el tratamiento, en otras palabras, si los niveles del al menos un péptido de EN-2, o fragmento del mismo, han aumentado o disminuido. Una disminución de los niveles de dicho al menos un péptido de EN-2 indica que la enfermedad está remitiendo y por tanto que el régimen de tratamiento está teniendo éxito. Dicha monitorización de una enfermedad mostrará rápidamente si un paciente está respondiendo a un tratamiento dado o si es refractario a un tratamiento dado. Si es lo último, entonces se puede proponer un tratamiento alternativo. Por lo tanto, dicho método proporciona una rápida indicación de si el régimen de tratamiento es efectivo y permite al médico alterar dicho régimen hasta que se observe un efecto en el paciente.

En el método de la presente invención, se prefiere que la cantidad del péptido, o de un fragmento del mismo, en una muestra de ensayo se compare con la cantidad presente en uno o más controles y/o en una o más muestras de ensayo previas tomadas con anterioridad a dicho mismo sujeto de ensayo. El periodo de tiempo entre las muestras anteriores y las posteriores a menudo puede ser de unos pocos días, pero puede llegar hasta varios meses o incluso varios años, y será determinado por el médico, en base a la progresión de la enfermedad y del historial médico del paciente. Alternativamente, el control puede ser una muestra de ensayo procedente de un paciente libre de enfermedad.

El péptido, o fragmento del mismo, se detecta confirmando la presencia de dicho biomarcador. La cuantificación de la cantidad de biomarcador presente en una muestra incluye preferiblemente la determinación de la concentración del péptido biomarcador en la muestra. Las etapas de detección y/o cuantificación pueden llevarse a cabo directamente sobre la muestra, o indirectamente sobre un extracto de las mismas, o una dilución de las mismas.

La presente invención se refiere a biomarcadores y cabe destacar que éstos deben ser detectables en el fluido corporal. Algunos miembros de la familia HOX pueden no ser detectables en fluidos corporales y, por tanto, no son biomarcadores según la presente invención.

Los niveles detectables del al menos un péptido HOX, el péptido EN-2, o los fragmentos de los mismos, se discuten en otras publicaciones, pero cabe destacar que puede haber una serie de razones por las que un péptido HOX, el péptido EN-2, o los fragmentos de los mismos, no sean detectables. Sin pretender establecer ninguna teoría, una razón puede ser que el péptido se degrade en el fluido corporal, es decir que no sea “estable”.

Por lo tanto, se prefiere que el al menos un péptido EN-2, o fragmentos del mismo, no se degrade sustancialmente y/o siga siendo detectable (es decir, esté presente en concentraciones detectables) en la periferia del cuerpo, es decir una vena cercana a la superficie de la piel, preferiblemente en el brazo, donde se pueda extraer una muestra con facilidad.

El péptido puede ser liberado en el fluido corporal, tanto por ruptura o lixiviación celular, como por secreción.

La detección y/o cuantificación del al menos un péptido EN-2, o fragmentos del mismo, pueden realizarse mediante cualquier método adecuado para detectar la presencia y/o la cantidad de una proteína o péptido específicos en una muestra biológica. Esto puede ser por detección directa del biomarcador, por ejemplo mediante MALDI-TOF o SELDI.

Sin embargo, también se prefiere que el al menos un péptido EN-2, o fragmento del mismo, sea detectado directa o indirectamente a través de la interacción con un ligando o ligandos. Dichos ligandos pueden incluir un anticuerpo anti-EN-2 o un fragmento de unión del mismo, un aptámero, o un oligonucleótido. Cabe destacar que dichos ligandos deben ser capaces de unirse específicamente al péptido EN-2, o a un fragmento del mismo. Puede estar marcado de forma adecuada y comprender una etiqueta de afinidad. Las etiquetas adecuadas pueden ser fluorescentes, radiactivas o luminiscentes. Las etiquetas pueden unirse directamente al anticuerpo, a través de un elemento de unión.

Por ejemplo, la detección y/o la cuantificación se pueden llevar a cabo mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en: MALDI-TOF, SELDI, sistemas de análisis basados en gel de 1D o de 2D, cromatografía de líquidos, que combina técnicas de cromatografía de líquidos y de espectrometría de masas. Estas últimas pueden incluir, preferiblemente, ICAT® ó iTRAQ® (ambas disponibles en Applied Biosystems, EE.UU.).

Las técnicas de cromatografía de líquidos pueden incluir HPLC (cromatografía de líquidos de alta presión) o incluso cromatografía de líquidos de baja presión (LPLC). Adicionalmente, también se prefieren métodos tales como cromatografía de capa fina, espectroscopia de RMN y cualquier otro método descrito en la presente memoria.

El péptido, o fragmento del mismo, puede ser detectado y/o cuantificado usando métodos inmunológicos, tal como inmunoensayos sándwich, por ejemplo un ensayo inmunoadsorbente ligado a enzima (ELISA), radio-inmunoensayos (RAI), inmunoensayos enzimáticos (EIA), ensayos de transferencia Western, inmunoprecipitación. También se prefieren los inmunoensayos basados en partículas, que pueden incluir, por ejemplo, el uso de partículas de oro, plata o látex, partículas magnéticas o puntos-Q. Dichos métodos pueden llevarse a cabo, por ejemplo, en formato de placa de microtitulación o de tira o sobre un “chip”.

Son particularmente preferidos los ELISAs que comprenden anticuerpos específicos para el al menos un péptido EN-2. El anticuerpo o anticuerpos anti-EN-2 son ligados preferiblemente, bien directamente o a través de un ligando, a una molécula indicadora, tal como un radioisótopo, una molécula fluorescente, una molécula luminiscente o una enzima. Un ejemplo de una enzima preferida es la fosfatasa alcalina, disponible en Invitrogen, R.U., aunque en la técnica se conocen otros indicadores.

Un ejemplo de anticuerpo anti-HOXC4 humano está disponible en Abcam, R.U., nº de catálogo ab24338. Se trata de un anticuerpo anti-HOXC4 humano de conejo y, por tanto, puede ser preferible usar un anticuerpo de IgG anti-conejo secundario ligado a un indicador, tal como fosfatasa alcalina, para detectar el complejo de anticuerpo de HOXC4. Un ejemplo de un anticuerpo anti-HOXB6 procede de Abcam, nº de catálogo ab26077. Un ejemplo de anticuerpo anti-HOXB5 procede de Abcam, nº de catálogo ab26079. Un ejemplo de anticuerpo anti-HOXA3 procede de Abcam, nº de catálogo ab28771. Un ejemplo de un anticuerpo anti-HOXA3 procede de Abcam, nº de catálogo ab28771. Un ejemplo de un anticuerpo anti-HOXD9 procede de Abcam, nº de catálogo ab60708. Se conocen ejemplos de otros anticuerpos anti-HOX. Un ejemplo de un anticuerpo anti-EN-2 procede de Abcam, nº de catálogo ab45867.

También se prefieren los métodos de transferencia Western, particularmente porque pueden proporcionar datos de densitometría.

Los niveles comparativos adecuados para la presencia del al menos un péptido EN-2 suficientes para distinguir entre el control, los cánceres de etapa temprana y de etapa avanzada, o combinaciones de los mismos, se han discutido anteriormente.

Cuando se emplean anticuerpos, éstos pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanizados o quiméricos. Los anticuerpos pueden consistir en una única cadena, pero preferiblemente consistirán en al menos una cadena ligera o una cadena pesada, pero cabe destacar que se requiere al menos una Región Determinante de la Complementariedad (CDR) a fin de unir un epítopo de HOX o un epítopo de EN-2.

Por supuesto, también cabe destacar que el epítopo o epítopos deben estar disponibles para la unión o el reconocimiento por parte del ligando, tal como un anticuerpo. Los anticuerpos anti-HOX y anti-EN-2 ya son conocidos, pero si se requieren otros anticuerpos o ligandos de unión, con diferentes especificidades, entonces podrían obtenerse. Los métodos de preparación de anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, si se desean anticuerpos policlonales, entonces se puede inmunizar un mamífero seleccionado, tal como un ratón, conejo, cabra o caballo con el antígeno seleccionado, tal como HOX ó EN-2 humanos. A continuación, el suero procedente del animal inmunizado es recolectado y tratado para obtener el anticuerpo, por ejemplo mediante cromatografía de inmunoafinidad. El HOX ó EN-2 humanos podrían, por ejemplo, ser inyectados en conejos disparando una respuesta inmune en el conejo, activando anticuerpos anti-HOX o anti-EN-2, que podrían ser aislados usando métodos estándar.

Por supuesto, los anticuerpos monoclonales podrían ser producidos mediante métodos conocidos en la técnica, y generalmente son preferidos. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales usando tecnología de hibridoma es bien conocida (véase, por ejemplo, Kohler, G. y Milstein, C., Nature 256: 495-497 (1975); Kozbor *et al*, Immunology Today 4: 72 (1983); Cole *et al*, 77-96 en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Por lo tanto, un anticuerpo, tal como son considerados en la presente memoria, debe consistir en una región de unión a epítopo, tal como CDR. Tal como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a moléculas intactas, así como a sus fragmentos, tal como Fab, Fab’, $F(ab')_2$ y Fv, que son capaces de unirse a un epítopo. Preferiblemente, el anticuerpo también comprende una porción efectora, tal como la región Fc.

El anticuerpo puede ser de cualquier clase adecuada, que incluye IgE, IgM, IgD, IgA y, en particular, IgG. También se contemplan las diversas subclases de estos anticuerpos.

Por tanto, también se prefiere que se use un biosensor para detectar el al menos un péptido biomarcador, o fragmento del mismo. El biosensor puede incorporar un método inmunológico, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, para la detección del biomarcador, o un medio o tecnología eléctrica, térmica, magnética, óptica, por ejemplo un holograma, o acústica. Al usar dichos biosensores, se contempla que el biomarcador sea detectado y/o cuantificado. Por tanto, es un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un biosensor para detectar y/o cuantificar el péptido, o un fragmento del mismo.

Preferiblemente, el al menos un biomarcador de EN-2 puede ser detectado usando un biosensor en base al uso de hologramas “inteligentes”, o sistemas acústicos de alta frecuencia, particularmente porque dichos sistemas son susceptibles de disponer configuraciones. Por ejemplo, con sensores de hologramas inteligentes, disponibles en Smart Holograms Limited, Cambridge, R.U., se almacena una imagen holográfica en una película polimérica delgada que es sensibilizada para reaccionar específicamente con el biomarcador. Al ser expuesto, el biomarcador reacciona con el polímero dando lugar a una alteración de la imagen mostrada por el holograma. El resultado de lectura del

test puede ver un cambio en el brillo óptico, la imagen, el color y/o la posición de la imagen. Esto puede ser leído incluso por el ojo.

Cabe destacar que se prefiere que los biosensores capaces de detectar y/o cuantificar el al menos un biomarcador de EN-2, combinen reconocimiento biomolecular con los medios apropiados para convertir la detección de la presencia, o la cuantificación, de dicho biomarcador en una muestra en una señal detectable. Por ejemplo, preferiblemente se pueden emplear elementos de reconocimiento imprimados, tecnología de transistor de película delgada, dispositivos resonantes acústicos magnéticos y otros sistemas acusto-eléctricos novedosos en el presente biosensor para la detección y/o la cuantificación del al menos un biomarcador de EN-2. Preferiblemente, un biosensor según la invención detectará uno o más, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o los seis de HOXC4, HOXB5, HOXB6, HOXA3, HOXD9 y EN-2. Otros biosensores adicionales preferidos también pueden detectar adicionalmente otros biomarcadores de HOX, como se ha referido anteriormente.

Preferiblemente, el biosensor incluye un ligando y/o un anticuerpo, tal como se ha discutido anteriormente. El biosensor puede ser proporcionado en un sistema o “chip” adecuado, de tal modo que el biosensor sea capaz de unirse específicamente a el al menos un péptido de EN-2, o fragmento del mismo, se proporciona un medio de detección. Los medios de detección adecuados se han discutido anteriormente, pero pueden incluir sistemas indicadores, tales como fosfatasa alcalina, u hologramas inteligentes, capaces de proporcionar una señal detectable para el usuario para indicar que se ha alcanzado la unión específica del al menos un péptido de HOX o EN-2, o un fragmento de los mismos, y, preferiblemente, una indicación de la concentración de HOX o EN-2 o del número de eventos de unión específica que se han producido en dicho sistema o chip.

La presente invención proporciona además kits para dicha detección y/o cuantificación. Dichos kits son útiles en la diagnosis y/o monitorización del cáncer de próstata. Por tanto, dichos kits preferiblemente comprenderán un biosensor tal como un ligando, preferiblemente un anticuerpo, capaz de unirse específicamente a al menos un péptido, o un fragmento del mismo, y un medio para indicar dicha unión específica para el usuario, por ejemplo usando un sistema indicador como se ha descrito anteriormente. Los kits particularmente preferidos incluyen un sistema o un chip.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un biosensor, preferiblemente un ligando y lo más preferiblemente un anticuerpo, capaz de unirse y reconocer específicamente al menos un péptido de EN-2, o un fragmento del mismo, para identificar una sustancia capaz de suprimir la generación del al menos un péptido de EN-2, o un fragmento del mismo. Preferiblemente, dicha sustancia es capaz de suprimir la producción del biomarcador por el cáncer de próstata. En otras palabras, el ligando puede ser usado para determinar la eficacia de un tratamiento anti-cáncer de próstata establecido o putativo.

Por lo tanto, un método para detectar la eficacia de un tratamiento anticancerígeno putativo puede incluir las etapas de:

(a) incubar una célula entera que exprese un péptido HOX o un péptido EN-2 y detectar la cantidad de péptido HOX o péptido EN-2 liberada,

(b) tratar la célula con un tratamiento anticancerígeno putativo,

(c) detectar la cantidad de péptido HOX o péptido EN-2 liberada después del tratamiento, y

(d) comparar la cantidad de péptido HOX o péptido EN-2 liberada tanto antes como después del tratamiento para ver si el tratamiento anticancerígeno putativo tiene efecto sobre la cantidad de péptido liberada.

Alternativamente, un método puede comprender las etapas de:

(a) incubar un ligando marcado con una célula entera que exprese un péptido HOX o un péptido EN-2 sobre la superficie celular, o una membrana celular que contiene un péptido HOX o un péptido EN-2,

(b) medir la cantidad de ligando marcado unido a la célula entera o a la membrana celular;

(c) añadir un agente anticancerígeno putativo a una mezcla de ligando marcado y la célula entera o la membrana celular de la etapa (a) y dejar que la mezcla alcance el equilibrio;

(d) medir la cantidad de ligando marcado unido a la célula entera o a la membrana celular después de la etapa (c); y

(e) comparar la diferencia de ligando marcado unido en las etapas (b) y (d), de tal modo que el compuesto que provoca la reducción de unión en la etapa (d) se considera un inhibidor de la expresión de HOX o EN-2 y por tanto un agente anticancerígeno.

Por ejemplo, en dicho ensayo se podría usar una línea celular tal como la línea celular de carcinoma de próstata LNCaP. Las células LNCaP podrían cultivarse en presencia o ausencia de un agente anticancerígeno putativo o establecido, y se compararía la expresión relativa de EN-2. Un menor nivel de expresión de EN-2 indicaría una mejor

actividad anticancerígena. Los niveles de expresión podrían detectarse detectando la proteína producida (es decir, el producto final) o detectando el ARN producido (es decir, un producto intermedio). Los métodos de predicción del producto proteínico se han discutido anteriormente. El ARN puede detectarse usando, por ejemplo, PCR cuantitativa o un sistema de oligonucleótidos.

Lo anterior también se refiere a los métodos y kits de la presente invención.

Otros métodos o kits para uso según la presente invención serán evidentes para el especialista en la técnica. Éstos pueden incluir, por ejemplo, sistemas de detección de biomarcador, que se describen en las solicitudes de patente US-2006-014301, US-2004-063216, WO 01/92879 y WO 02/054936.

Por tanto, la presente invención puede usarse para identificar nuevos tratamientos contra el cáncer de próstata, donde se detectan y/o cuantifican los niveles de al menos un péptido de EN-2, o de un fragmento del mismo, en presencia o en ausencia del agente anticancerígeno putativo, con el objetivo de determinar su eficacia. La presente invención también puede usarse en un método de tecnología de escrutinio de alto rendimiento, por ejemplo en un formato de sistema configurado, tal como sobre un chip o un sistema multipocillo.

Como el cáncer de próstata es una enfermedad masculina, cabe destacar que el sujeto o paciente es un hombre.

Descripción de las figuras

Figura 1: un ejemplo de un ensayo de transferencia Western en busca de proteína HOXC4 en suero. Los resultados también fueron analizados por densitometría, y se muestran como la media de las seis muestras de cada grupo. Las barras de error muestran el error estándar de la media. Estos datos indican que HOXC4 es potencialmente un marcador diagnóstico específico y preciso para el cáncer de próstata, tanto en la etapa temprana como en la etapa avanzada de la enfermedad.

Figura 2: detección de HOXB6 en seis pacientes con cáncer de próstata de etapa temprana, donde los tumores son pequeños y están confinados a la próstata, y de seis controles de la misma edad.

Figura 3: (a) análisis RT-QPCR de la expresión de EN-2 en LNCaP y células tumorales primarias (nivel de tránscrito como una proporción de β-actina). (b,c) Biopsia de núcleo de un adenocarcinoma prostático teñido con anticuerpo anti-En2. La tinción positiva de En2 (marrón) está presente en el citoplasma de las células tumorales, con una tinción más fuerte en el borde luminal (1). Las masas positivas de En2 son visibles y están unidas al borde luminal (2) o están libres en el lumen (3). Los núcleos son teñidos de azul. Aumentos: (a) x100, (b) x60.

Figura 4: secciones a través de biopsias de núcleo de TMA de (a) tejido de próstata normal, (b) hipertrofia benigna de la próstata, y (c y d) tumor de próstata maligno. La tinción de EN-2 (marrón) está presente en las células estromales (flecha blanca) y en las glándulas con la tinción aparente más fuerte en el borde luminal (cabezas de flecha). Los núcleos son teñidos de azul. Aumentos: (a-c) x60, (d) x100.

Figura 5: detección mediante transferencia Western de proteína EN-2 en medio de cultivo.

Figura 6: proteína EN-2 en orina. Se recolectó orina de individuos que estaban siendo examinados en busca de síntomas consistentes con cáncer de próstata, y que estaban siendo escrutados para determinar la presencia de proteína EN-2. La presencia o la ausencia de cáncer se evaluaron mediante biopsia. El PM predicho de la EN-2 es de 30 kDa pero también se detectó una segunda banda de 33 kDa en el control positivo (extracto de cerebelo de ratón). La banda de 30 kDa está presente exclusivamente en la orina del 50% de los pacientes que tenían células de cáncer de próstata en su biopsia (C Pa), no estaba presente en los pacientes con biopsias negativas o con hipertrofia benigna de la próstata (BHP) o con neoplasia intraepitelial prostática de grado alto (HGPIN).

Figura 7: detección de HOXB5 en tres pacientes con cáncer de próstata de etapa temprana donde los tumores son pequeños y están confinados a la próstata, tres pacientes con cáncer de próstata de etapa avanzada y tres controles de la misma edad.

Figura 8: se comparan los niveles de expresión de varios genes HOXA y HOXD en tejido tumoral con tejido normal adyacente. DU145 y PC3 son líneas celulares derivadas de tumores de próstata.

Ejemplo 1

HOXC4

Se obtuvo suero de seis pacientes con cáncer de próstata avanzado, refractario a hormonas, seis pacientes con cáncer de próstata de etapa temprana donde los tumores son pequeños y están confinados a la próstata, y seis controles de la misma edad. Éste fue desalinizado y fraccionado usando un gel PAGE/SDS al 12,5%. Se detectó proteína HOXC4 humana (UniProtKB / Swiss-Prot número de entrada P09017) usando ensayos de transferencia western con un anticuerpo anti-HOXC4 humano de conejo (Abcam, R.U., número de catálogo ab24338), junto con un anticuerpo secundario IgG anti-conejo ligado a fosfatasa alcalina (Invitrogen, R.U.). Usando este método,

detectamos niveles elevados de proteína HOXC4 en el suero de todos los pacientes de cáncer de próstata, pero solo niveles muy bajos en el suero de control de la misma edad (Figura 1).

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Se pudo usar HOXC4 como base de un ensayo diagnóstico y/o prognóstico para cáncer de próstata usando una técnica de ensayo estándar tal como ELISA. Esto implicaría el uso de un anticuerpo anti-HOXC4 ligado a un indicador tal como fosfatasa alcalina con el objetivo de cuantificar la cantidad de proteína HOXC4 en muestras de suero de pacientes. También podrían usarse otras metodologías, que incluyen los ensayos de transferencia western. La cantidad de proteína HOXC4 proporcionaría una indicación de si la enfermedad está presente y de qué etapa se ha alcanzado.

Nombre de gel: HOXC4 blot 131006 (Imagen 1D sin refinar)						
Índice	Nombre	Paciente	Diagnosis	Volumen DO*mm2	Vol. Ady. DO*mm2	% Vol. Ady.
1	U1	HR29	Cáncer	6,844796	0,272431	24,320686
2	U2	HR28	Cáncer	6,460027	0,092836	8,2877258
3	U3	HR27	Cáncer	9,731784	0,393355	35,115964
4	U4	SR5	Cáncer temprano	6,108735	0,086538	7,7255409
5	U5	SR2	Cáncer temprano	6,26387	0,01121	1,0007083
6	U6	SR1	Cáncer temprano	8,427193	0,15222	13,589161
7	U7	VR30	Sano	6,459172	0,045458	4,0581642
8	U8	VR23	Sano	9,760506	0,062926	5,6175665
9	U9	VR21	Sano	6,740683	0,003187	0,2844833

NB. Membranas probadas con anticuerpo primario solo durante 1 hora.

Valores medios				% de incremento
		sd	sem	
Control	0,037190112	0,030716	0,0177548	0
Cáncer temprano	0,08332277	0,07056	0,0407864	124,0455
Cáncer avanzado	0,252873795	0,151211	0,0874053	579,949

Tabla 1

SEQ ID NO. 1:

HOXC4 nº de acceso NCBI P09017

```
1   MIMSSYLMDS NYIDPKFPPC EEYSQNSYIP EHSPEYYGRT RESGFQHHHQ ELYPPPPPRP

61  SYPERQYSCT SLQGPGNSRG HGPAQAGHHH PEKSQSLCEP APLSGASASP SPAPPACSQP

121 APDHPSSAAS KQPIVYPWMK KIHVSTVNPN YNGGEPKRSR AAYTRQQVLE LEKEFHYNRY

181 LTRRRRIEIA HSLCLSERQI KIWFQNRRMK WKKDHRLPNT KVRSAPPAGA APSTLSAATP

241 GTSEDHSQSA TPPEQQRAED ITRL
```

Ejemplo 2

HOXB6

La detección de HOXB6 en estas muestras se realizó exactamente como para el HOXC4, excepto en que el anticuerpo primario era HOXB6 humano anti-conejo (de Abcam, nº cat. Ab26077). Los valores relativos para proteína HOXB6 fueron determinados mediante densitometría de la película de rayos-X (usando las bandas localizadas en su peso molecular predicho). Estos valores son la densidad óptica de la banda referidos a los del ruido de fondo local. Por lo tanto, cabe destacar que es posible un valor de densitometría comparativa negativo, tal como se muestra en los Controles de la misma edad (AMCs, del inglés “Age Matched Controls”), aunque cabe destacar que esto no se traduce en una cantidad negativa de proteína HOXB6.

Estos datos se muestran gráficamente en la Figura 2.

Tabla 2

HOXB6 en suero

Los valores son densidad óptica relativa de las bandas

			media	sd	sem
AMC1	-0,02671	AMC	-0,09016	0,064043	0,036977
AMC2	-0,08899	Cáncer temprano	0,261033	0,076253	0,044026
AMC3	-0,15478				
Temprano 1	0,182775				
Temprano 2	0,33511				
Temprano 3	0,265214				

SEQ ID NO. 2:

HOXB6 nº de acceso NCBI P17509

```
1   MSSYFVNSTF PVTLASGQES FLGQLPLYSS GYADPLRHYP APYGPGPGQD KGFATSSYYP

61  PAGGGYGRAA PCDYGPAPAF YREKESACAL SGADEQPPFH PEPRKSDCAQ DKSVFGETEE

121 QKCSTPVYPW MQRMNSCNSS SFGPSGRRGR QTYTRYQTLE LEKEFHYNRY LTRRRRIEIA

181 HALCLTERQI KIWFQNRRMK WKKESKLLSA SQLSAEEEEE KQAE
```

Ejemplo 3

EN-2

Se evaluaron los niveles de expresión de EN-2 usando PCR cuantitativa (QPCR) en la línea celular de carcinoma de próstata humano LNCaP (Horoszewicz et al., 1983). Esta es una línea celular derivada de una lesión metastásica de un adenocarcinoma de próstata humana, y se usa ampliamente como modelo *in vitro* de dicho cáncer. Además, se evaluó la expresión de EN-2 en tejido obtenido de biopsias de tumores de próstata. Ambas muestras expresaron EN-2. Las células tumorales primarias también expresaron EN-2 como proteína. Ésta pudo detectarse en secciones de adenocarcinomas prostáticos (Figura 3a). La tinción de EN-2 en estas secciones está presente tanto en los compartimentos citoplasmáticos como en los nucleares, pero tiene la máxima intensidad en los bordes luminales y en los bulbos secretores que entran en el lumen (Figura 3b,c).

Para examinar con más detalle el grado de presencia de EN-2 en tejido procedente de próstata normal, hipertrofia benigna y tumores malignos, se tiñó un microsistema de tejidos (TMA, del inglés “tissue microarray”) que contenía secciones representativas de cada uno con un anticuerpo anti-EN-2. Esto confirmó que EN-2 se expresa fuertemente en glándulas con malignidad, especialmente en los bordes luminales (Figura 4), aunque hay algo de tinción en glándulas procedentes de tejido normal e hipertrófico. Todos los tejidos mostraron tinción de EN-2 en las células estromales (Figura 4). Con el objetivo de cuantificar la tinción en las glándulas, se puntuó cada tejido entre 0 y 3, donde 0 representa que no hay tinción y 3 la tinción más fuerte. En base a esto, las glándulas de tejido normal (Figura 4a) obtuvieron una puntuación media de 0,5 (n=10, sd=0,52), de hiperplasia benigna (Figura 4b) 0,67 (n=6, sd=0,51), y de tumores malignos (Figura 4c-d) 2,3 (n=6, sd=0,52).

Estos datos demuestran claramente que EN-2 se expresa en dichas células de cáncer de próstata.

Ejemplo 4

El medio que rodea a LNCaP y las células de tumor de próstata primarias fue examinado para establecer si EN-2 puede ser secretada desde dichas células. El medio, usado para cultivar ambos tipos de células durante dos horas, fue desalinizado y concentrado. Las proteínas contenidas dentro de dicho concentrado fueron resueltas a continuación sobre un gel de acrilamida. La tinción western reveló la presencia de bandas específicas de EN-2 en el medio que rodea a ambos tipos de células (Figura 5), y la cuantificación usando cantidades estándar de proteína EN-2 transcrita *in vitro* indicó que la cantidad de EN-2 en el medio usado para cultivar células LNCaP fue de 3 ng/mL, mientras que las células tumorales primarias produjeron 1,75 ng/mL en 48 horas.

Ejemplo 5

Se obtuvieron muestras de orina de 17 individuos, que habían sido sometidos recientemente a biopsia y masaje prostático. De estos individuos, se observó que 10 tenían cáncer a través de la biopsia. De los demás, dos presentaban neoplasia intraepitelial prostática de grado elevado (HGPIN), tres mostraban signos de hipertrofia benigna y dos no tenían células cancerosas en la sección biopsiada. Cinco de los pacientes diagnosticados con cáncer presentaban grandes cantidades de EN-2 en su orina, mientras que ninguna de las muestras de orina de los individuos no diagnosticados con cáncer contenía una cantidad significativa de proteína EN-2 (Figura 6).

Ejemplo 6

HOXB5

La detección de HOXB5 en estas muestras fue realizada exactamente como para HOXC4 y HOXB6, excepto en que el anticuerpo primario fue HOXB5 humano anti-conejo (de Abcam, nº cat. Ab26079). Los valores relativos correspondientes a proteína HOXB5 fueron determinados mediante densitometría de la película de rayos-X (usando las bandas localizadas en su peso molecular predicho). Estos valores son la densidad óptica de la banda relativa al ruido de fondo local.

Tabla 3

Valores medios			sd	sem	% de aumento
	AMC	0,006597	0,005948	0,003438	0
	Cáncer temp.	0,244012	0,055004	0,031794	3598,808
	Cáncer avanz.	0,471597	0,154221	0,089145	7048,621

Estos datos se representan gráficamente en la Figura 7

Ejemplo 7

Se obtuvieron muestras de orina de 17 individuos, sospechosos de padecer cáncer de próstata y que posteriormente habían sido diagnosticados con la enfermedad. Se determinaron los niveles proteicos de EN2 en las muestras de orina tal como se ha descrito anteriormente. Las muestras de orina de 8 (47%) de estos individuos mostraron niveles

elevados de EN2. Por el contrario, en muestras de orina obtenidas de 15 pacientes sospechosos de padecer cáncer de próstata, pero en los que no se había confirmado posteriormente el cáncer, ninguno (0%) presentó niveles elevados de EN2. Cabe resaltar que 3 de los pacientes diagnosticados con cáncer de próstata, que mostraron niveles elevados de EN2 en sus muestras de orina, no presentaban niveles elevados de PSA. Esto ilustra que los métodos de la invención son efectivos en la detección de cáncer donde los métodos de detección convencionales han fallado.

Ejemplo 8

Detección de la expresión de genes HOX en tejido normal y tumoral.

Extracción de ARN: el ARN de tejido tumoral y normal adyacente fue adquirido a Ambion, EE.UU.

El ARN procedente de cultivos celulares fue extraído usando el Mini Kit RNeasy (Qiagen, R.U.).

Síntesis de ADNc: primero se desnaturalizó ARN calentando a 65ºC durante cinco minutos. Se incubaron 1-5 mg de ARN en un volumen de 50 mL a 37ºC durante una hora con concentraciones finales de DTT 10 mM, dNTPmix 1 mM, así como 100 mg/mL de cebadores polyT, 200 unidades de transcriptasa inversa (Invitrogen, EE.UU.) y 40 unidades de RNASEout (Invitrogen, EE.UU.). La reacción de síntesis de ADNc fue detenida colocando los tubos a 65ºC durante cinco minutos.

PCR en tiempo real: se llevó a cabo RT-PCR semi cuantitativa usando la máquina de PCR en tiempo real MX4000 de Stratagene. El Stratagene MX4000 mide la acumulación de producto de PCR durante la fase exponencial de la reacción, antes de que la amplificación se vuelva vulnerable a la limitación de reactivos y la variabilidad de los ciclos. La fluorescencia aumenta de acuerdo al aumento de los niveles de producto de PCR. La cantidad relativa de cada tránscrito se determinó como una relación con la cantidad de tránscrito de Beta-actina en cada muestra.

Los cebadores usados se muestran en la Tabla 4 mostrada a continuación.

Gen	**Cebador directo**	**Cebador inverso**
HOXA1	CTGGCCCTGGCTACGTATAA (SEQ ID NO: 7)	TCCAACTTTCCCTGTTTTGG (SEQ ID NO: 8)
HOXA2	TTCAGCAAAATGCCCTCTCT (SEQ ID NO: 9)	TAGGCCAGCTCCACAGTTCT (SEQ ID NO: 10)
HOXA3	ACCTGTGATAGTGGGCTTGG (SEQ ID NO: 11)	ATACAGCCATTCCAGCAACC (SEQ ID NO: 12)
HOXA4	CCCTGGATGAAGAAGATCCA (SEQ ID NO: 13)	AATTGGAGGATCGCATCTTG (SEQ ID NO: 14)
HOXA5	CCGGAGAATGAAGTGGAAAA (SEQ ID NO: 15)	ACGAGAACAGGGCTTCTTCA (SEQ ID NO: 16)
HOXA6	AAAGCACTCCATGACGAAGG (SEQ ID NO: 17)	TCCTTCTCCAGCTCCAGTGT (SEQ ID NO: 18)
HOXA7	TGGTGTAAATCTGGGGGTGT (SEQ ID NO: 19)	TCTGATAAAGGGGGCTGTTG (SEQ ID NO: 20)
HOXA9	AATAACCCAGCAGCCAACTG (SEQ ID NO: 21)	ATTTTCATCCTGCGGTTCTG (SEQ ID NO: 22)
HOXA10	ACACTGGAGCTGGAGAAGGA (SEQ ID NO: 23)	GATCCGGTTTTCTCGATTCA (SEQ ID NO: 24)
HOXA11	CGCTGCCCCTATACCAAGTA (SEQ ID NO: 25)	GTCAAGGGCAAAATCTGCAT (SEQ ID NO: 26)
HOXA13	GGATATCAGCCACGACGAAT (SEQ ID NO: 27)	ATTATCTGGGCAAAGCAACG (SEQ ID NO: 28)
HOXD1	TTCAGCACCAAGCAACTGAC (SEQ ID NO: 29)	TAGTGGGGGTTGTTCCAGAG (SEQ ID NO: 30)
HOXD3	CAGCCTCCTGGTCTGAACTC (SEQ ID NO: 31)	ATCCAGGGGAAGATCTGCTT (SEQ ID NO: 32)
HOXD4	TCAAATGTGCCATAGCAAGC (SEQ ID NO: 33)	TCCATAGGGCCCTCCTACTT (SEQ ID NO: 34)
HOXD8	TCAAATGTTTCCGTGGATGA (SEQ ID NO: 35)	GCTCTTGGGCTTCCTTTTTC (SEQ ID NO: 36)
HOXD9	TCCCCCATGTTTCTGAAAAG (SEQ ID NO: 37)	GGGCTCCTCTAAGCCTCACT (SEQ ID NO: 38)
HOXD10	GCTCCTTCACCACCAACATT (SEQ ID NO: 39)	AAATATCCAGGGACGGGAAC (SEQ ID NO: 40)
HOXD11	GGGGCTACGCTCCCTACTAC (SEQ ID NO: 41)	GCTGCCTCGTAGAACTGGTC (SEQ ID NO: 42)
HOXD12	CGCTTCCCCCTATCTCCTAC (SEQ ID NO: 43)	CTTCGGGCGCATAGAACTTA (SEQ ID NO: 44)

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
HOXD13	GGGATGTGGCTCTAAATCA (SEQ ID NO: 45)	AACCTGGACCACATCAGGAG (SEQ ID NO: 46)

Los resultados se muestran en la Figura 8. Usando este método, se identificaron HOXA3 y HOXD9 como biomarcadores potenciales para cáncer de próstata, ya que dichos genes se sobreexpresan claramente en muestras de tejido tumoral.

SEQ ID NO. 5 (polipéptido HOXA3)

MQKATYYDSSAIYGGYPYQAANGFAYNANQQPYPASAALGADGE
YHRPACSLQSPSSAGGHPKAHELSEACLRTLSAPPSQPPSLGEPPLHPPPPQAAPPAP
QPPQPAPQPPAPTPAAPPPPSSASPPQNASNNPTPANAAKSPLLNSPTVAKQIFPWMK
ESRQNTKQKTSSSSSGESCAGDKSPPGQASSKRARTAYTSAQLVELEKEFHFNRYLCR
PRRVEMANLLNLTERQIKIWFQNRRMKYKKDQKGKGMLTSSGGQSPSRSPVPPGAGGY
LNSMHSLVNSVPYEPQSPPPFSKPPQGTYGLPPASYPASLPSCAPPPPPQKRYTAAGA
GAGGTPDYDPHAHGLQGNGSYGTPHIQGSPVFVGGSYVEPMSNSGPALFGLTHLPHAA
SGAMDYGGAGPLGSGHHHGPGPGEPHPTYTDLTGHHPSQGRIQEAPKLTHL

SEQ ID NO. 6 (polipéptido HOXD9)

MSSSGTLSNYYVDSLIGHEGDEVFAARFGPPGPGAQGRPAGVAD
GPAATAAEFASCSFAPRSAVFSASWSAVPSQPPAAAAMSGLYHPYVPPPPLAASASEP
GRYVRSWMEPLPGFPGGAGGGGGGGGGPGRGPSPGPSGPANGRHYGIKPETRAAPAP
ATAASTTSSSSTSLSSSSKRTECSVARESQGSSGPEFSCNSFLQEKAAAATGGTGPGA
GIGAATGTGGSSEPSACSDHPIPGCSLKEEEKQHSQPQQQQLDPNNPAANWIHARSTR
KKRCPYTKYQTLELEKEFLFNMYLTRDRRYEVARILNLTERQVKIWFQNRRMKMKKMS
KEKCPKGD

Referencias

Chatelin, L., Volovitch, M., Joliot, A.H., Perez, F. y Prochiantz, A. (1996) Transcription factor hoxa-5 is taken up by cells in culture and conveyed to their nuclei. Mech. Dev. 55, 111-117.

Cosgaya, J.M., Aranda, A., Cruces, J. y Martin-Blanco, E. (1998) Neuronal differentiation of PC12 cells induced by engrailed homeodomain is DNA-binding specific and independent of MAP kinases. J. Cell Sci. 111 (Pt 16), 2377-2384.

Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A, Brunissen, A., Chassaing, G. y Prochiantz, A. (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. J. Biol. Chem. 271, 18188-18193.

Garcia-Bellido, A. y Santamaria, P. (1972) Developmental analysis of the wing disc in the mutant Engrailed of Drosophila melanogaster. Genetics 72, 87-104.

Joliot, A., Maizel, A., Rosenberg, D., Trembleau, A., Dupas, S., Volovitch, M. y Prochiantz, A. (1998) Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. Curr. Biol. 8, 856-863.

Kuefer R., Hofer M.D., Zorn C.S., Engel O., Volkmer B.G., Juarez-Brito M.A., Eggel M., Gschwend J.E., Rubin M.A., Day M.L. Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. Br. J. Cancer. 2005 Jun 6; 92(11): 2018-23.

Maizel, A., Bensaude, O., Prochiantz, A. y Joliot, A. (1999) A short region of its homeodomain is necessary for engrailed nuclear export and secretion. Development 126, 3183-3190.

Martin, N.L., Saba-El-Leil, M.K., Sadekova, S., Meloche, S. y Sauvageau, G. (2005) EN-2 is a candidate oncogene in human breast cancer. Oncogene 24, 6890-6901.

Miller G.J., Miller H.L., van Bokhoven A., Lambert J.R., Werahera P.N., Schirripa O., Lucia M.S., Nordeen S.K. Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. Cancer Res. 2003 Sep 15; 63(18): 5879-88.

Morgan R. Hox genes: a continuation of embryonic patterning? Trends Genet. 2006 Feb; 22(2): 67-9.

Morgan R. Engrailed: complexity and economy of a multi-functional transcription factor. FEBS Lett. 2006 May 15; 580(11): 2531-3.

Petricoin E.F., Ardekani A.M., Hitt B.A., Levine P.J., Fusaro V.A., Steinberg S.M., Mills G.B., Simone C., Fishman D.A., Kohn E.C., Liotta L.A. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. Lancet. 2002 Feb 16; 359(9306): 572-7.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The University of Surrey

<120> Cancer Biomarkers

<130> P048286WO

<150> GB0625321.5
<151> 19-12-2006

<150> GB0719792.4
<151> 10-10-2007

<160> 46

<170> SeqWin99, versión 1.02

<210> 1
<211> 264
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Ile Met Ser Ser Tyr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Ile Asp Pro Lys
1               5                  10                  15

Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Asn Ser Tyr Ile Pro Glu His
            20                  25                  30

Ser Pro Glu Tyr Tyr Gly Arg Thr Arg Glu Ser Gly Phe Gln His His
        35                  40                  45

His Gln Glu Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Arg Pro Ser Tyr Pro Glu
    50                  55                  60

Arg Gln Tyr Ser Cys Thr Ser Leu Gln Gly Pro Gly Asn Ser Arg Gly
65                  70                  75                  80

His Gly Pro Ala Gln Ala Gly His His His Pro Glu Lys Ser Gln Ser
                85                  90                  95

Leu Cys Glu Pro Ala Pro Leu Ser Gly Ala Ser Ala Ser Pro Ser Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Pro Ala Cys Ser Gln Pro Ala Pro Asp His Pro Ser Ser Ala
        115                 120                 125

Ala Ser Lys Gln Pro Ile Val Tyr Pro Trp Met Lys Lys Ile His Val
    130                 135                 140

Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Asn Gly Gly Glu Pro Lys Arg Ser Arg
145                 150                 155                 160

Ala Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His
                165                 170                 175
```

Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Ile Glu Ile Ala His Ser
180 185 190

Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg
195 200 205

Met Lys Trp Lys Lys Asp His Arg Leu Pro Asn Thr Lys Val Arg Ser
210 215 220

Ala Pro Pro Ala Gly Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ala Thr Pro
225 230 235 240

Gly Thr Ser Glu Asp His Ser Gln Ser Ala Thr Pro Pro Glu Gln Gln
245 250 255

Arg Ala Glu Asp Ile Thr Arg Leu
260

<210> 2
<211> 224
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ser Ser Tyr Phe Val Asn Ser Thr Phe Pro Val Thr Leu Ala Ser
1 5 10 15

Gly Gln Glu Ser Phe Leu Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Ser Ser Gly Tyr
20 25 30

Ala Asp Pro Leu Arg His Tyr Pro Ala Pro Tyr Gly Pro Gly Pro Gly
35 40 45

Gln Asp Lys Gly Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Tyr Pro Pro Ala Gly Gly
50 55 60

Gly Tyr Gly Arg Ala Ala Pro Cys Asp Tyr Gly Pro Ala Pro Ala Phe
65 70 75 80

Tyr Arg Glu Lys Glu Ser Ala Cys Ala Leu Ser Gly Ala Asp Glu Gln
85 90 95

Pro Pro Phe His Pro Glu Pro Arg Lys Ser Asp Cys Ala Gln Asp Lys
100 105 110

Ser Val Phe Gly Glu Thr Glu Glu Gln Lys Cys Ser Thr Pro Val Tyr
115 120 125

Pro Trp Met Gln Arg Met Asn Ser Cys Asn Ser Ser Ser Phe Gly Pro
130 135 140

Ser Gly Arg Arg Gly Arg Gln Thr Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr Leu Glu
145 150 155 160

Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
165 170 175

```
Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Thr Glu Arg Gln Ile Lys Ile
            180                 185                 190

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Ser Lys Leu Leu
        195                 200                 205

Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Glu Glu Glu Glu Glu Lys Gln Ala Glu
    210                 215                 220
```

<210> 3
<211> 269
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Met Ser Ser Tyr Phe Val Asn Ser Phe Ser Gly Arg Tyr Pro Asn Gly
1               5                   10                  15

Pro Asp Tyr Gln Leu Leu Asn Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Leu Ser Gly
            20                  25                  30

Ser Tyr Arg Asp Pro Ala Ala Met His Thr Gly Ser Tyr Gly Tyr Asn
        35                  40                  45

Tyr Asn Gly Met Asp Leu Ser Val Asn Arg Ser Ser Ala Ser Ser Ser
    50                  55                  60

His Phe Gly Ala Val Gly Glu Ser Ser Arg Ala Phe Pro Ala Pro Ala
65                  70                  75                  80

Gln Glu Pro Arg Phe Arg Gln Ala Ala Ser Ser Cys Ser Leu Ser Ser
                85                  90                  95

Pro Glu Ser Leu Pro Cys Thr Asn Gly Asp Ser His Gly Ala Lys Pro
            100                 105                 110

Ser Ala Ser Ser Pro Ser Asp Gln Ala Thr Ser Ala Ser Ser Ser Ala
        115                 120                 125

Asn Phe Thr Glu Ile Asp Glu Ala Ser Ala Ser Ser Glu Pro Glu Glu
    130                 135                 140

Ala Ala Ser Gln Leu Ser Ser Pro Ser Leu Ala Arg Ala Gln Pro Glu
145                 150                 155                 160

Pro Met Ala Thr Ser Thr Ala Ala Pro Glu Gly Gln Thr Pro Gln Ile
                165                 170                 175

Phe Pro Trp Met Arg Lys Leu His Ile Ser His Asp Met Thr Gly Pro
            180                 185                 190

Asp Gly Lys Arg Ala Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr Leu Glu
        195                 200                 205

Leu Glu Lys Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
    210                 215                 220
```

Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile
225 230 235 240

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp Asn Lys Leu Lys
245 250 255

Ser Met Ser Leu Ala Thr Ala Gly Ser Ala Phe Gln Pro
260 265

<210> 4
<211> 333
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Glu Asn Asp Pro Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ala Ala Val Glu
1 5 10 15

Gly Gln Arg Gln Pro Glu Ser Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Ser Pro Gly Glu Ala Asp Thr Gly Arg Arg Arg Ala Leu
35 40 45

Met Leu Pro Ala Val Leu Gln Ala Pro Gly Asn His Gln His Pro His
50 55 60

Arg Ile Thr Asn Phe Phe Ile Asp Asn Ile Leu Arg Pro Glu Phe Gly
65 70 75 80

Arg Arg Lys Asp Ala Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Gly Arg
85 90 95

Gly Gly Gly Ala Gly Gly Glu Gly Gly Ala Ser Gly Ala Glu Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ser Glu Gln Leu Leu Gly Ser Gly Ser Arg Glu
115 120 125

Pro Arg Gln Asn Pro Pro Cys Ala Pro Gly Ala Gly Gly Pro Leu Pro
130 135 140

Ala Ala Gly Ser Asp Ser Pro Gly Asp Gly Glu Gly Gly Ser Lys Thr
145 150 155 160

Leu Ser Leu His Gly Gly Ala Lys Lys Gly Gly Asp Pro Gly Gly Pro
165 170 175

Leu Asp Gly Ser Leu Lys Ala Arg Gly Leu Gly Gly Gly Asp Leu Ser
180 185 190

Val Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Gln Ala Gly Ala Asn Leu Gly Ala
195 200 205

Gln Pro Met Leu Trp Pro Ala Trp Val Tyr Cys Thr Arg Tyr Ser Asp
210 215 220

```
Arg Pro Ser Ser Gly Pro Arg Ser Arg Lys Pro Lys Lys Lys Asn Pro
225                 230                 235                 240

Asn Lys Glu Asp Lys Arg Pro Arg Thr Ala Phe Thr Ala Glu Gln Leu
                245                 250                 255

Gln Arg Leu Lys Ala Glu Phe Gln Thr Asn Arg Tyr Leu Thr Glu Gln
            260                 265                 270

Arg Arg Gln Ser Leu Ala Gln Glu Leu Ser Leu Asn Glu Ser Gln Ile
        275                 280                 285

Lys Ile Trp Phe Gln Asn Lys Arg Ala Lys Ile Lys Lys Ala Thr Gly
    290                 295                 300

Asn Lys Asn Thr Leu Ala Val His Leu Met Ala Gln Gly Leu Tyr Asn
305                 310                 315                 320

His Ser Thr Thr Ala Lys Glu Gly Lys Ser Asp Ser Glu
                325                 330
```

<210> 5
<211> 443
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

```
Met Gln Lys Ala Thr Tyr Tyr Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Gly Gly Tyr
1               5                   10                  15

Pro Tyr Gln Ala Ala Asn Gly Phe Ala Tyr Asn Ala Asn Gln Gln Pro
            20                  25                  30

Tyr Pro Ala Ser Ala Ala Leu Gly Ala Asp Gly Glu Tyr His Arg Pro
        35                  40                  45

Ala Cys Ser Leu Gln Ser Pro Ser Ser Ala Gly Gly His Pro Lys Ala
    50                  55                  60

His Glu Leu Ser Glu Ala Cys Leu Arg Thr Leu Ser Ala Pro Pro Ser
65                  70                  75                  80

Gln Pro Pro Ser Leu Gly Glu Pro Pro Leu His Pro Pro Pro Pro Gln
                85                  90                  95

Ala Ala Pro Pro Ala Pro Gln Pro Pro Gln Pro Ala Pro Gln Pro Pro
            100                 105                 110

Ala Pro Thr Pro Ala Ala Pro Pro Pro Pro Ser Ser Ala Ser Pro Pro
        115                 120                 125

Gln Asn Ala Ser Asn Asn Pro Thr Pro Ala Asn Ala Ala Lys Ser Pro
    130                 135                 140

Leu Leu Asn Ser Pro Thr Val Ala Lys Gln Ile Phe Pro Trp Met Lys
145                 150                 155                 160
```

```
Glu Ser Arg Gln Asn Thr Lys Gln Lys Thr Ser Ser Ser Ser Ser Gly
                165                 170                 175

Glu Ser Cys Ala Gly Asp Lys Ser Pro Pro Gly Gln Ala Ser Ser Lys
            180                 185                 190

Arg Ala Arg Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gln Leu Val Glu Leu Glu Lys
        195                 200                 205

Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Cys Arg Pro Arg Arg Val Glu Met
    210                 215                 220

Ala Asn Leu Leu Asn Leu Thr Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln
225                 230                 235                 240

Asn Arg Arg Met Lys Tyr Lys Lys Asp Gln Lys Gly Lys Gly Met Leu
                245                 250                 255

Thr Ser Ser Gly Gly Gln Ser Pro Ser Arg Ser Pro Val Pro Pro Gly
            260                 265                 270

Ala Gly Gly Tyr Leu Asn Ser Met His Ser Leu Val Asn Ser Val Pro
        275                 280                 285

Tyr Glu Pro Gln Ser Pro Pro Pro Phe Ser Lys Pro Pro Gln Gly Thr
    290                 295                 300

Tyr Gly Leu Pro Pro Ala Ser Tyr Pro Ala Ser Leu Pro Ser Cys Ala
305                 310                 315                 320

Pro Pro Pro Pro Pro Gln Lys Arg Tyr Thr Ala Ala Gly Ala Gly Ala
                325                 330                 335

Gly Gly Thr Pro Asp Tyr Asp Pro His Ala His Gly Leu Gln Gly Asn
            340                 345                 350

Gly Ser Tyr Gly Thr Pro His Ile Gln Gly Ser Pro Val Phe Val Gly
        355                 360                 365

Gly Ser Tyr Val Glu Pro Met Ser Asn Ser Gly Pro Ala Leu Phe Gly
    370                 375                 380

Leu Thr His Leu Pro His Ala Ala Ser Gly Ala Met Asp Tyr Gly Gly
385                 390                 395                 400

Ala Gly Pro Leu Gly Ser Gly His His His Gly Pro Gly Pro Gly Glu
                405                 410                 415

Pro His Pro Thr Tyr Thr Asp Leu Thr Gly His His Pro Ser Gln Gly
            420                 425                 430

Arg Ile Gln Glu Ala Pro Lys Leu Thr His Leu
        435                 440
```

<210> 6
<211> 342
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Asn Tyr Tyr Val Asp Ser Leu Ile
1               5                  10                  15

Gly His Glu Gly Asp Glu Val Phe Ala Ala Arg Phe Gly Pro Pro Gly
            20                  25                  30

Pro Gly Ala Gln Gly Arg Pro Ala Gly Val Ala Asp Gly Pro Ala Ala
        35                  40                  45

Thr Ala Ala Glu Phe Ala Ser Cys Ser Phe Ala Pro Arg Ser Ala Val
    50                  55                  60

Phe Ser Ala Ser Trp Ser Ala Val Pro Ser Gln Pro Pro Ala Ala Ala
65                  70                  75                  80

Ala Met Ser Gly Leu Tyr His Pro Tyr Val Pro Pro Pro Pro Leu Ala
                85                  90                  95

Ala Ser Ala Ser Glu Pro Gly Arg Tyr Val Arg Ser Trp Met Glu Pro
            100                 105                 110

Leu Pro Gly Phe Pro Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Pro Gly Arg Gly Pro Ser Pro Gly Pro Ser Gly Pro Ala Asn
    130                 135                 140

Gly Arg His Tyr Gly Ile Lys Pro Glu Thr Arg Ala Ala Pro Ala Pro
145                 150                 155                 160

Ala Thr Ala Ala Ser Thr Thr Ser Ser Ser Ser Thr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175

Ser Ser Lys Arg Thr Glu Cys Ser Val Ala Arg Glu Ser Gln Gly Ser
            180                 185                 190

Ser Gly Pro Glu Phe Ser Cys Asn Ser Phe Leu Gln Glu Lys Ala Ala
        195                 200                 205

Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Gly Ala Ala Thr
    210                 215                 220

Gly Thr Gly Gly Ser Ser Glu Pro Ser Ala Cys Ser Asp His Pro Ile
225                 230                 235                 240

Pro Gly Cys Ser Leu Lys Glu Glu Glu Lys Gln His Ser Gln Pro Gln
                245                 250                 255

Gln Gln Gln Leu Asp Pro Asn Asn Pro Ala Ala Asn Trp Ile His Ala
            260                 265                 270

Arg Ser Thr Arg Lys Lys Arg Cys Pro Tyr Thr Lys Tyr Gln Thr Leu
        275                 280                 285
```

Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Met Tyr Leu Thr Arg Asp Arg
290 295 300

Arg Tyr Glu Val Ala Arg Ile Leu Asn Leu Thr Glu Arg Gln Val Lys
305 310 315 320

Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Met Lys Lys Met Ser Lys Glu
325 330 335

Lys Cys Pro Lys Gly Asp
340

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA1 directo

<400> 7
ctggccctgg ctacgtataa 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA1 inverso

<400> 8
tccaactttc cctgttttgg 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA2 directo

<400> 9
ttcagcaaaa tgccctctct 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA2 inverso

<400> 10
taggccagct ccacagttct 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA3 directo

<400> 11
acctgtgata gtgggcttgg 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA3 inverso

<400> 12
atacagccat tccagcaacc 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA4 directo

<400> 13
ccctggatga agaagatcca 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA4 inverso

<400> 14
aattggagga tcgcatcttg 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA5 directo

<400> 15
ccggagaatg aagtggaaaa 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA5 inverso

<400> 16
acgagaacag ggcttcttca 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA6 directo

<400> 17
aaagcactcc atgacgaagg 20

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA6 inverso

<400> 18
tccttctcca gctccagtgt 20

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA7 directo

<400> 19
tggtgtaaat ctgggggtgt 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA7 inverso

<400> 20
tctgataaag ggggctgttg 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA9 directo

<400> 21
aataacccag cagccaactg 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA9 inverso

<400> 22
attttcatcc tgcggttctg 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador HOXA10 directo

<400> 23
acactggagc tggagaagga 20

<210> 24
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA10 inverso

<400> 24
gatccggttt tctcgattca 20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA11 directo

<400> 25
cgctgcccct ataccaagta 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA11 inverso

<400> 26
gtcaagggca aaatctgcat 20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA13 directo

<400> 27
ggatatcagc cacgacgaat 20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXA13 inverso

<400> 28
attatctggg caaagcaacg 20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD1 directo

<400> 29
ttcagcacca agcaactgac 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD1 inverso

<400> 30
tagtgggggt tgttccagag 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD3 directo

<400> 31
cagcctcctg gtctgaactc 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD3 inverso

<400> 32
atccagggga agatctgctt 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD4 directo

<400> 33
tcaaatgtgc catagcaagc 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD4 inverso

<400> 34
tccatagggc cctcctactt 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD8 directo

<400> 35
tcaaatgttt ccgtggatga 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD8 inverso

<400> 36
gctcttgggc ttccttttc 20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD9 directo

<400> 37
tcccccatgt ttctgaaaag 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD9 inverso

<400> 38
gggctcctct aagcctcact 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD10 directo

<400> 39
gctccttcac caccaacatt 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD10 inverso

<400> 40
aaatatccag ggacgggaac 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD11 directo

<400> 41
ggggctacgc tccctactac 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD11 inverso

<400> 42
gctgcctcgt agaactggtc 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD12 directo

<400> 43
cgcttccccc tatctcctac 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD12 inverso

<400> 44
cttcgggcgc atagaactta 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD13 directo

<400> 45
ggggatgtgg ctctaaatca 20

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador HOXD13 inverso

<400> 46
aacctggacc acatcaggag 20

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico o monitorización de la progresión de cáncer de próstata que comprende cuantificar o detectar la cantidad de al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o un fragmento del mismo, en orina y compararlo con la cantidad de dicho al menos un péptido en una muestra de ensayo de orina con la cantidad presente en una muestra de orina de control normal procedente de un sujeto normal sin cáncer, donde el factor de transcripción que contiene homeodominio es un péptido EN-2 que comprende la SEQ ID NO: 4, y donde el fragmento tiene al menos un 80% de homología de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 4, más preferiblemente un 85%, más preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95%, más preferiblemente un 97%, más preferiblemente un 99% y lo más preferiblemente un 99,9% de homología de secuencia con respecto a dicha SEQ ID NO: 4, donde un aumento del nivel del al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o de un fragmento del mismo, que se observe en la muestra de ensayo es indicativo de que la enfermedad está en progreso o de que se ha iniciado.

2. Un método según la reivindicación 1, donde (A) el aumento es significativo estadísticamente, determinado usando un "test-t" que proporciona intervalos de confianza de preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente al menos el 99,5%, más preferiblemente al menos el 99,95%, y lo más preferiblemente al menos el 99,99%. y/o (B) (i) un aumento entre el control y la muestra indicativo de cáncer de próstata en etapa temprana oscila aproximadamente entre 110 y 200%, y lo más preferiblemente está alrededor de 125%, o (ii) un aumento entre el control y una muestra indicativo de cáncer de próstata de etapa avanzada oscila aproximadamente entre 550 y 620%, más preferiblemente oscila aproximadamente entre 560 y 600%, más preferiblemente oscila aproximadamente entre 570 y 590%, y lo más preferiblemente está alrededor de 580%, o (iii) un aumento, relativo a una muestra o control de etapa temprana, que oscila aproximadamente entre 100 y 300%, y preferiblemente de aproximadamente 200%, es indicativo de progresión del cáncer desde una etapa temprana a una etapa avanzada.

3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, para detectar el inicio, la progresión, la estabilización, el alivio y/o la remisión de cáncer de próstata o la eficacia de un tratamiento para cáncer de próstata, donde opcionalmente se proporcionan al menos dos etapas de detección y/o cuantificación, espaciadas temporalmente.

4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la detección y/o la cuantificación del al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o un fragmento del mismo, detectable en orina se realiza mediante uno o más del grupo que consiste en: MALDI-TOF, SELDI, por interacción con un ligando o ligandos, sistemas de análisis basados en gel 1D ó 2D, Cromatografía de Líquidos que combine cromatografía de líquidos y técnicas de espectrometría de masas, incluyendo ICAT® o iTRAQ®, cromatografía de capa fina, y espectroscopía de RMN.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la detección y/o la cuantificación del al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o de un fragmento del mismo, se realiza mediante uno o más del grupo que consiste en: inmunoensayos tipo sándwich, ensayos inmunosorbentes ligados a enzima (ELISAs), radio-inmunoensayos (RAI), inmunoensayos enzimáticos (EIA), ensayos de transferencia Western, inmunoprecipitación, e inmunoensayos basados en partículas, que incluyen partículas de oro, plata ó látex, partículas magnéticas o puntos-Q, donde opcionalmente la detección y/o la cuantificación del al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o de un fragmento del mismo, se lleva a cabo sobre una placa de microtitulación, en formato de tira, sistema o sobre un chip, donde opcionalmente la detección y/o la cuantificación del al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o de un fragmento del mismo, se realiza mediante un ELISA que comprende anticuerpos específicos para el al menos un péptido EN-2, o un fragmento del mismo, preferiblemente unido a un indicador.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la detección y/o la cuantificación del al menos un péptido de EN-2, o de un fragmento del mismo, se realiza mediante un biosensor.

7. Un uso *in vitro* del al menos un factor de transcripción que contiene homeodominio, o de un fragmento del mismo, como biomarcador para cáncer de próstata, donde el factor de transcripción que contiene homeodominio es un péptido de EN-2 que comprende la SEQ ID NO: 4, y donde el fragmento tiene al menos un 80% de homología de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 4, más preferiblemente un 85%, más preferiblemente un 90%, más preferiblemente un 95%, más preferiblemente un 97%, más preferiblemente un 99% y lo más preferiblemente un 99,9% de homología de secuencia con respecto a dicha SEQ ID NO: 4, donde el uso comprende la detección de la cantidad del factor de transcripción que contiene homeodominio, o de un fragmento del mismo, en orina.

8. El uso según la reivindicación 7, donde dicho uso es en un método seleccionado del grupo que consiste en: escrutinio clínico, métodos de determinación de prognosis, monitorización de resultados de terapia, método de identificación de pacientes con mayor probabilidad de responder a un tratamiento terapéutico particular, y escrutinio y desarrollo de fármacos, donde opcionalmente dichos pacientes han sido diagnosticados previamente como negativos para cáncer usando un ensayo que detecta PSA.

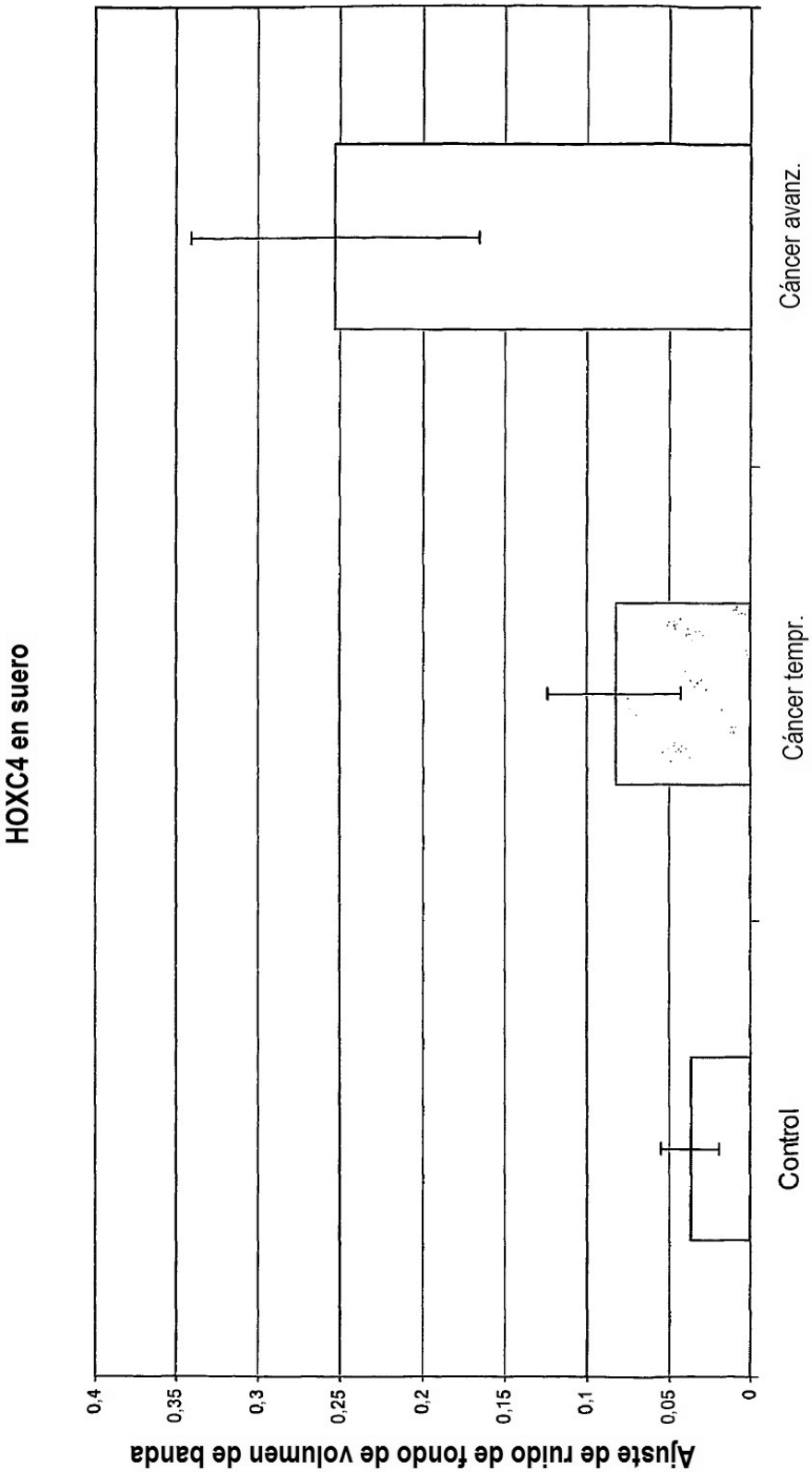

HOXC4 en suero
Ajuste de ruido de fondo de volumen de banda
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
Control
Cáncer tempr.
Cáncer avanz.

Figura 1

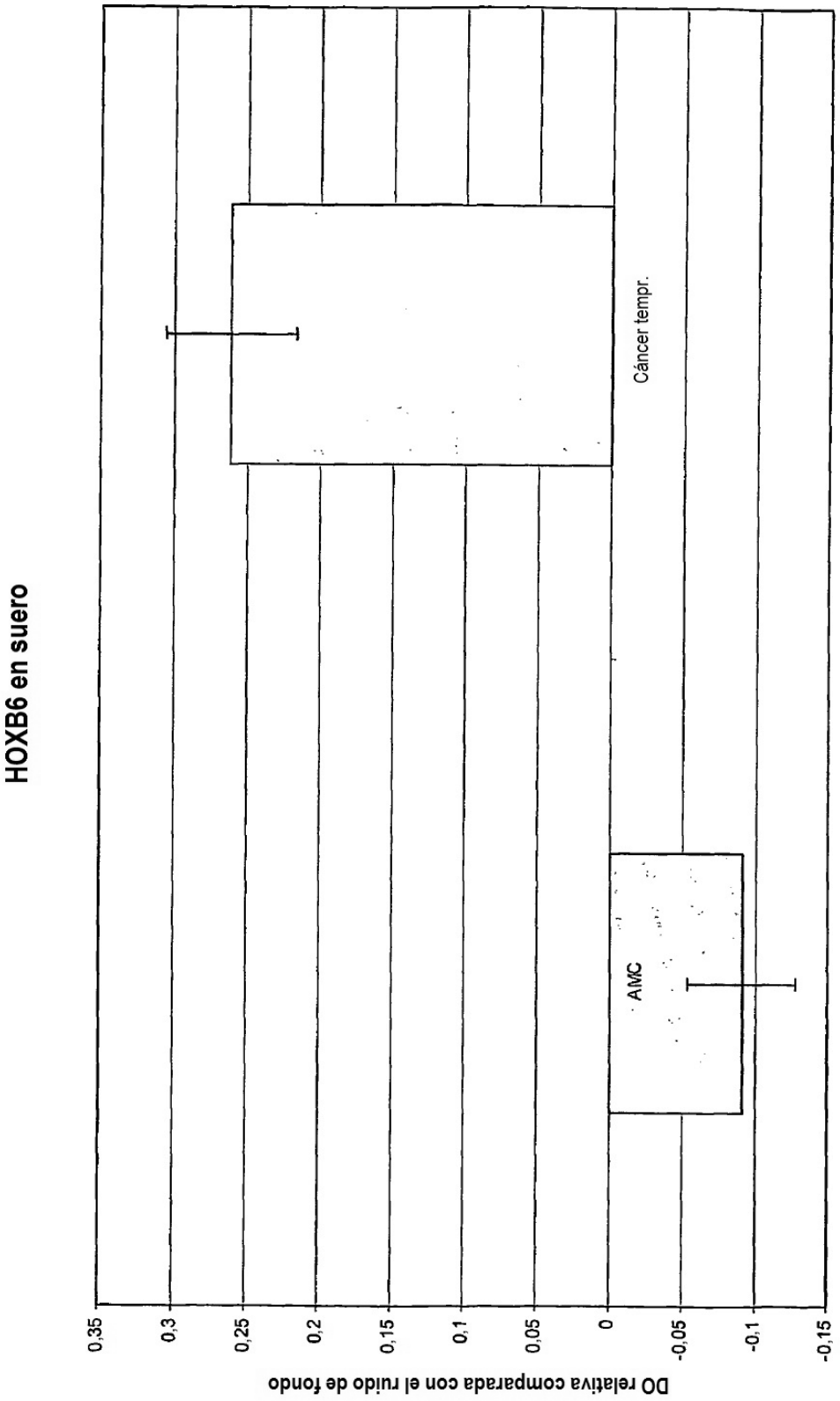
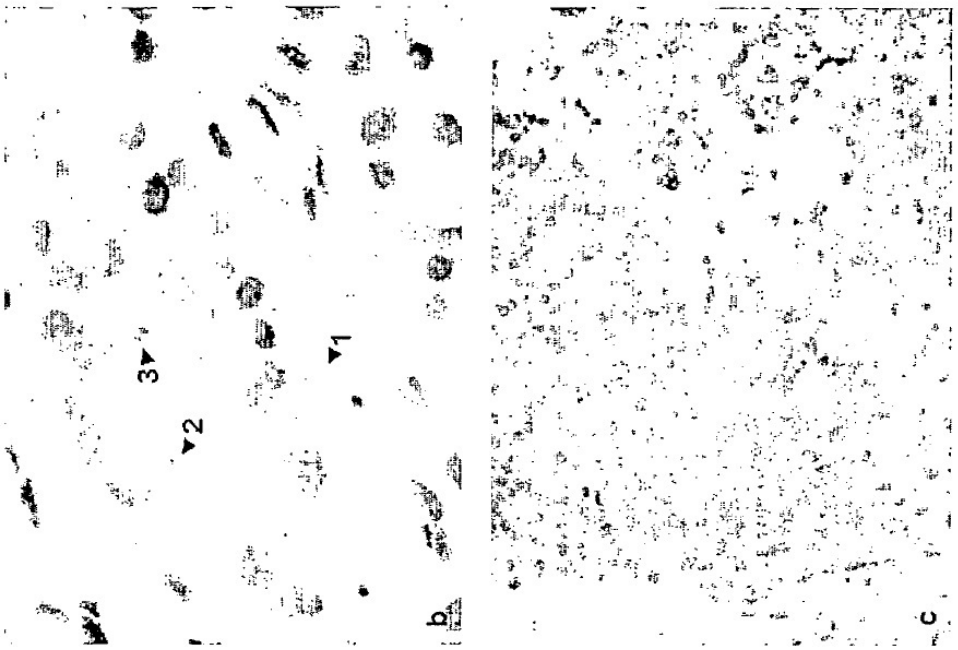

HOXB6 en suero
DO relativa comparada con el ruido de fondo
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
-0,05
-0,1
-0,15
Cáncer tempr.
AMC

Figura 2



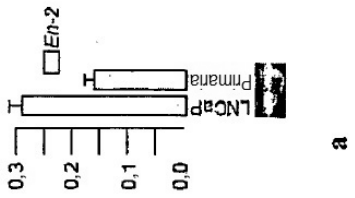


Figura 3

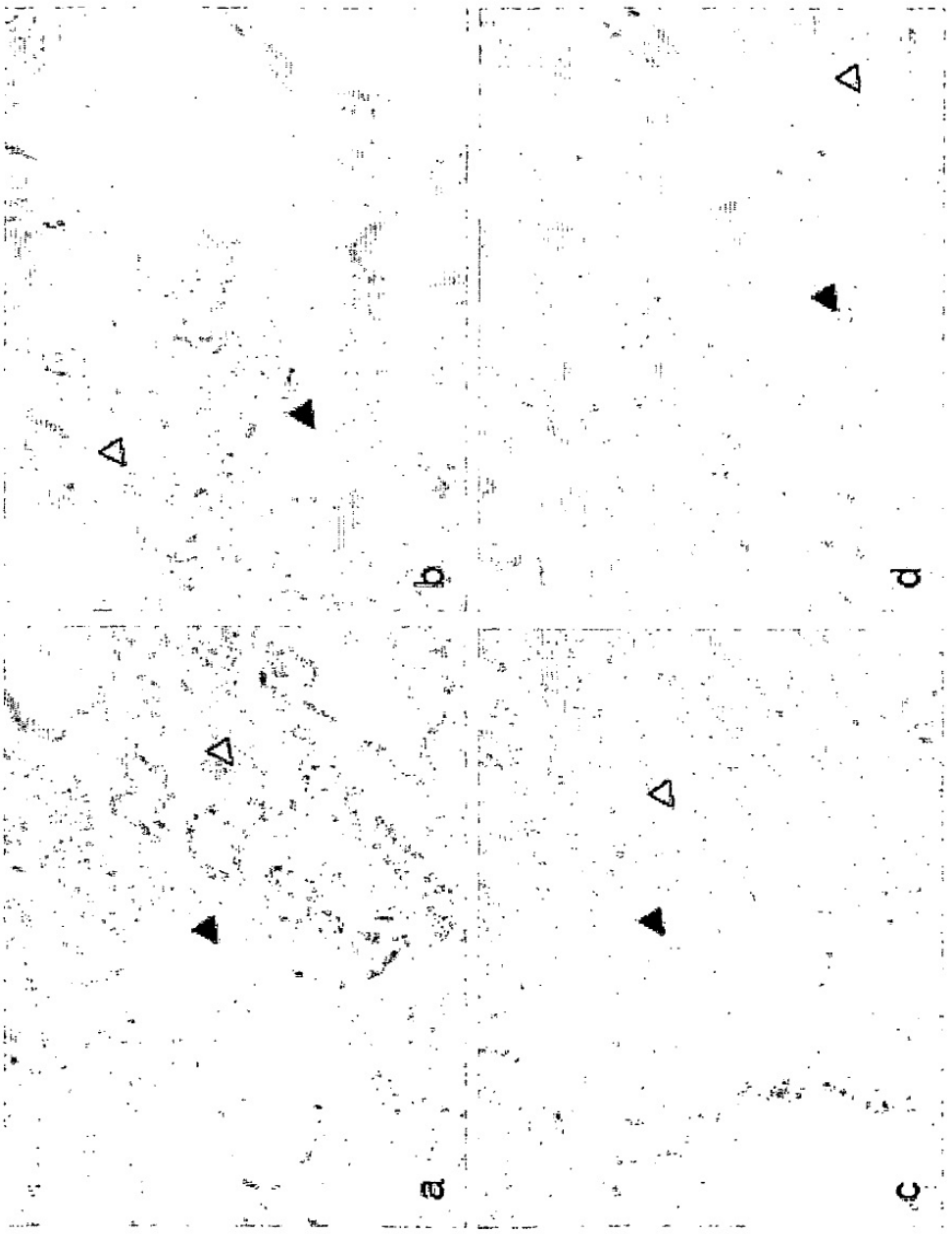


Figura 4

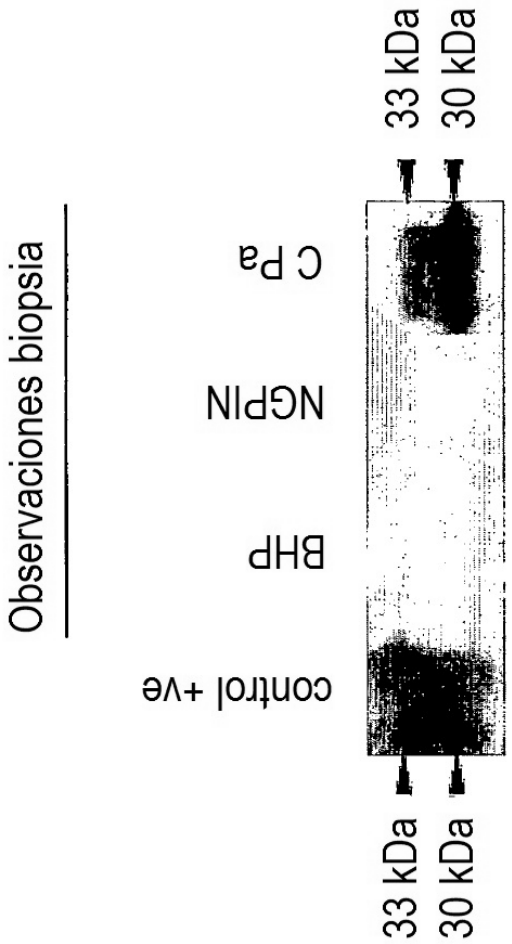


Figura 6

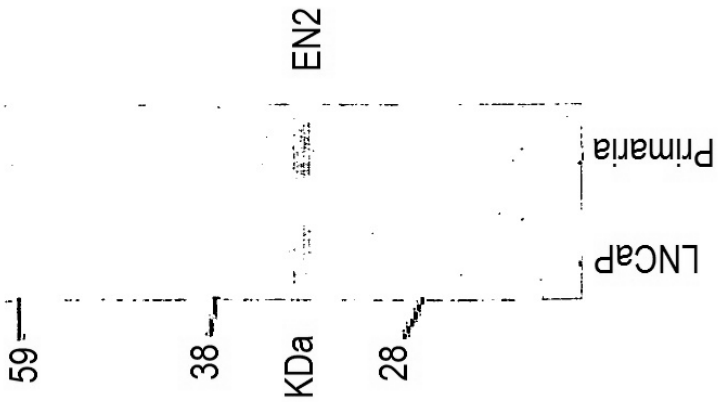


Figura 5

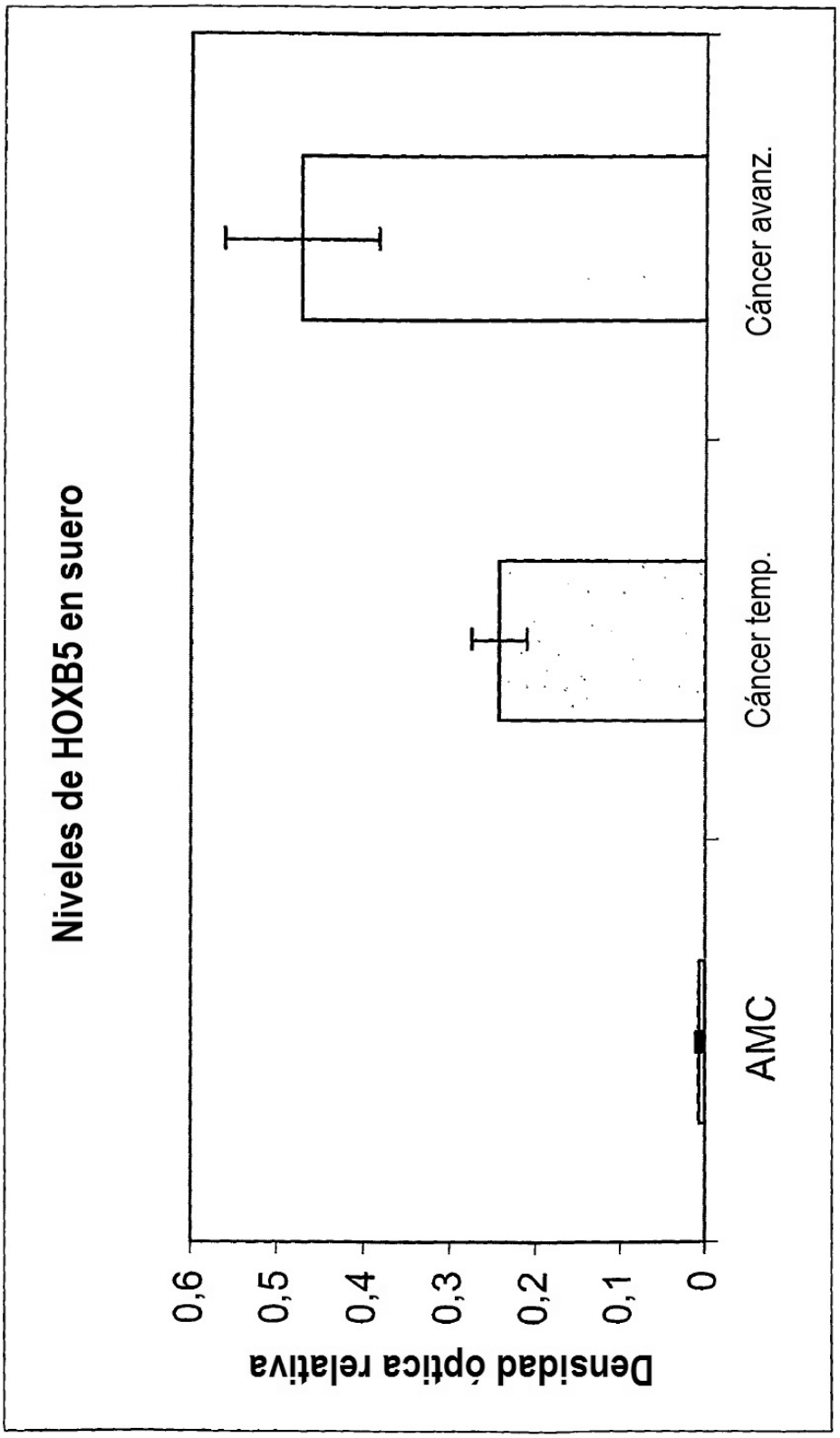
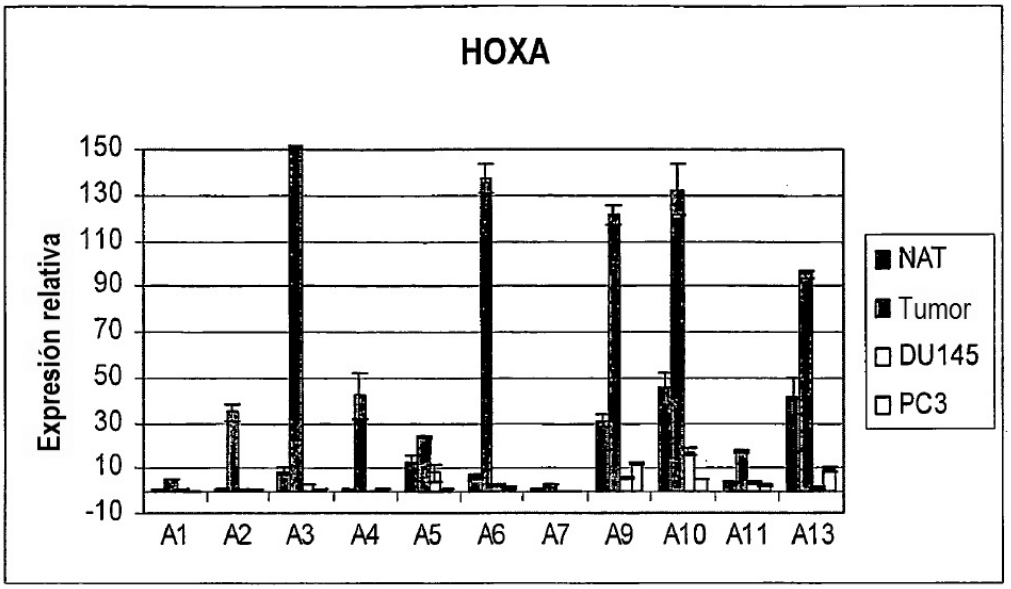
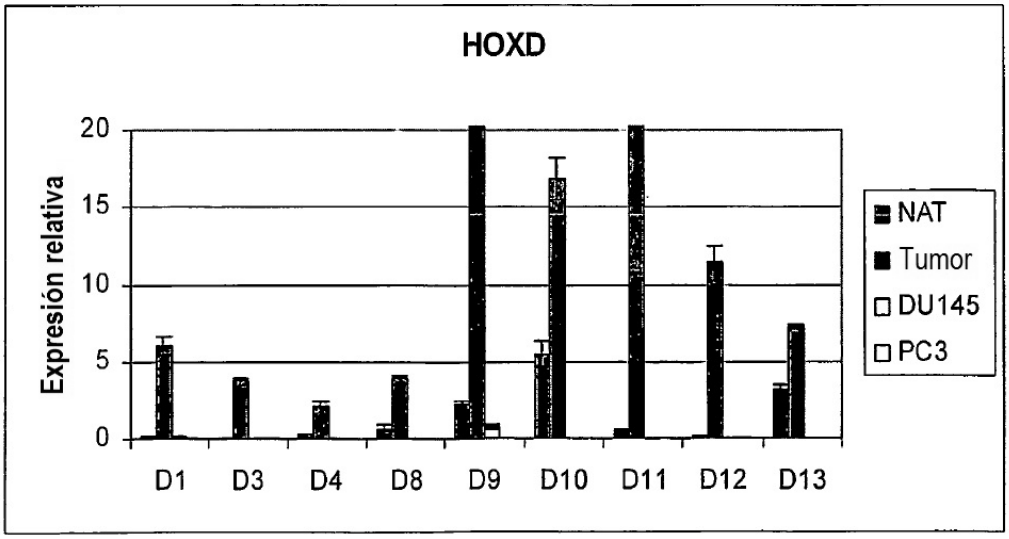

Niveles de HOXB5 en suero
Densidad óptica relativa
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
AMC
Cáncer temp.
Cáncer avanz.

Figura 7

Figura 8


HOXA
Expresión relativa
150
130
110
90
70
50
30
10
-10
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A9
A10
A11
A13
NAT
Tumor
DU145
PC3


HOXD
Expresión relativa
20
15
10
5
0
D1
D3
D4
D8
D9
D10
D11
D12
D13
NAT
Tumor
DU145
PC3