República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0720371-3 B1

(22) Data do Depósito: 19/12/2007

(45) Data de Concessão: 28/05/2019

(54) Título: MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO OU MONITORAMENTO DA PROGRESSÃO DE CÂNCER DE PRÓSTATA EM UM INDIVÍDUO E USO IN VITRO DE PELO MENOS UM HOMEODOMÍNIO CONTENDO O FATOR DE TRANSCRIÇÃO COMO UM BIOMARCADOR PARA CÂNCER DE PRÓSTATA

(51) Int.Cl.: G01N 33/574; G01N 33/96.

(30) Prioridade Unionista: 10/10/2007 GB 07 19792.4; 19/12/2006 GB 06 25321.5.

(73) Titular(es): THE UNIVERSITY OF SURREY.

(72) Inventor(es): HARDEV PANDHA; RICHARD GEORGE LEONARD MORGAN.

(86) Pedido PCT: PCT GB2007004902 de 19/12/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/075056 de 26/06/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/06/2009

(57) Resumo: MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO OU MONITORAMENTO DA PROGRESSÃO DE CÂNCER DE PRÓSTATA EM UM INDIVÍ- DUO E USO IN VITRO DE PELO MENOS UM HOMEODOMÍNIO CONTENDO O FATOR DE TRANSCRIÇÃO COMO UM BIOMARCADOR PARA CÂNCER DE PRÓSTATA A presente invenção se refere a um biomarcador para detectar câncer, especialmente câncer de próstata em sujeito do sexo masculino, o biomarcador compreendendo um fator de transcrição contendo pelo menos um homeodomínio, tal como um peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, ou um fragmento destes. A invenção provê o uso do referido biomarcador na detecção e/ou tratamento de câncer de próstata, juntamente com métodos e kits para o mesmo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO OU MONITORAMENTO DA PROGRESSÃO DE CÂNCER DE PRÓSTATA EM UM INDIVÍDUO E USO *IN VITRO* DE PELO MENOS UM HOMEODOMÍNIO CONTENDO O FATOR DE TRANSCRIÇÃO COMO UM BIOMARCADOR PARA CÂNCER DE PRÓSTATA"**.

A presente invenção se refere ao uso de um fator de transcrição contendo ao menos um homeodomínio, tais como peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, como biomarcador para câncer de próstata.

Câncer de próstata é atualmente a principal causa de óbito por câncer em homens, matando 10.000 homens a cada ano somente no Reino Unido. No entanto, a disponibilidade atual de biomarcadores para a detecção não invasiva de câncer de próstata limita-se essencialmente ao Antígeno Prostático Específico (PSA). Níveis séricos de PSA estão significativamente elevados em pacientes com câncer de próstata, e o teste do PSA é utilizado atualmente para acompanhar a evolução da doença e sua resposta ao tratamento.

Infelizmente, há algumas desvantagens significativas com o teste do PSA. Como níveis de PSA estão também significativamente elevados em outras condições não cancerosas da próstata, como na prostatite e hipertrofia benigna, nem sempre é certo que a detecção de níveis aumentados de PSA seja efetivamente indicativa de câncer de próstata em um paciente. Além disso, níveis de PSA não se correlacionam necessariamente com o volume da doença ou ao desenvolvimento de metástase nodular ou óssea.

Tentativas recentes para utilizar indícios como a razão entre PSA livre e o total e a "velocidade do PSA" provaram ser, em grande parte, mal-sucedidas em decorrência ao nível muito alto de falsos positivos, resultando em grande número de biopsias invasivas desnecessárias.

De fato, acredita-se que os níveis do PSA elevem-se somente muito lentamente no câncer de próstata, de modo que a doença está frequentemente em fase bem avançada quando um resultado positivo é obtido ao serem medidos níveis de PSA. Ademais, níveis de PSA requerem norma-

Segue-se folha 1a

lização uma vez que podem variar em função da idade e tamanho da próstata.

Existem também alguns possíveis marcadores químicos adicionais de câncer de próstata, incluindo as calicreínas e, mais recentemente,

Segue-se folha 2

fragmentos de 80 kDa da e-cadherina (Kuefer *et al.*, 2005). Novamente, esses biomarcadores tendem a exibirem muitas das desvantagens importantes discutidas acima em relação ao PSA.

Dessa forma, há necessidade na técnica por um biomarcador confiável de câncer de próstata.

Surpreendentemente, os requerentes constataram que um fator de transcrição homeótico, HOXC4, é secretado por tumores da próstata e que sua concentração sérica está significativamente elevada em pacientes com câncer de próstata. Portanto, a presença de HOXC4 em líquidos do corpo, como o soro, é um indicador útil de câncer de próstata tanto em estágio precoce como em tardio.

Os requerentes constataram também que uma segunda proteína HOX, HOXB6, e uma terceira proteína HOXB5 exibem também resultados semelhantes. HOXA3 e HOXD9 são também consideradas úteis como biomarcadores.

Os requerentes identificaram ainda que o fator de transcrição, contendo o homeodomínio *Engrailed* 2 (EN-2) é expresso, em nível do RNA e protéico, na linhagem de células derivadas de câncer de próstata LNCaP e PC3, e também em células primárias de câncer de próstata. Além disso, a proteína EN-2 pode ser secretada no meio circundante das células.

Surpreendentemente, níveis aumentados de todos estes marcadores de câncer podiam ser detectados também em pacientes de câncer de próstata, mesmo quando os níveis encontrados do PSA são normais. Esse dado ilustra ainda mais que os marcadores da presente invenção são mais confiáveis no diagnóstico de câncer de próstata quando comparados a outros marcadores, tais como PSA.

Portanto, em uma primeira característica, a presente invenção provê o uso de um fator de transcrição contendo ao menos um homeodomínio, ou um fragmento deste, como biomarcador para câncer de próstata. Exemplos de fatores de transcrição contendo homeodomínio incluem os peptídeos HOX e EN-2. A invenção refere-se também a um método para diagnóstico da doença câncer de próstata, compreendendo a detecção de um

fator de transcrição contendo ao menos um homeodomínio em amostra proveniente de um paciente.

É especialmente preferido que o, ao menos único, peptídeo HOX ou EN-2, ou fragmento destes, possa ser detectado em um líquido corporal.

De preferência, o biomarcador é apenas HOXC4. É também preferido que o biomarcador seja apenas HOXB5 ou, mais preferivelmente, apenas HOXB6. É também preferido que o biomarcador seja apenas EN-2. É também preferido que o biomarcador seja apenas HOXA3. É também preferido que o biomarcador seja apenas HOXD9. No entanto, combinações são também preferidas. Estas combinações incluem HOXC4 e HOXB5; HOXC4 e HOXB6; HOXB5 e HOXB6; HOXC4, HOXB5 e HOXB6; EN-2 e HOXC4; EN-2 e HOXB5; EN-2 e HOXB6; EN-2, HOXC4 e HOXB5; EN-2, HOXC4 e HOXB6; EN-2, HOXB5 e HOXB6; EN-2, HOXC4, HOXB5 e HOXB6. Estas combinações podem compreender ainda um ou ambos entre HOXA3 e/ou HOXD9. Combinações adicionais incluem HOXA3 e HOXD9; HOXA3 e HOXC4; HOXA3 e HOXB5; HOXA3 e HOXB6; HOXA3 e EN-2; HOXD9 e HOXC4; HOXD9 e HOXB5; HOXD9 e HOXB6; HOXD9 e EN-2. Uma combinação especialmente preferida de marcadores compreende um ou mais, de preferência, todos, entre HOXC4, HOXB5, HOXB6 e EN-2.

De preferência, o líquido corporal é o soro ou urina. Outros líquidos corporais preferidos são discutidos abaixo.

Os genes HOX constituem uma família de fatores de transcrição contendo homeodomínio que determina a identidade de células e tecidos durante a fase inicial de desenvolvimento (revisado por Morgan, 2006). Publicações recentes, incluindo por Miller *et al* 2003, identificaram efetivamente cada proteína isolada que é expressa, e retida no meio intracelular, em célula tumoral do câncer de próstata. Evidentemente, isso seguida que um total em torno de 10.000 a 12.000 proteínas, incluindo os peptídeos HOX, foram identificadas.

No entanto, os requerentes descobriram surpreendentemente que, dentre esses milhares de proteínas expressas em células do câncer de próstata, a proteína HOXC4, por exemplo, é encontrada em meio extracelu-

lar e é um excelente biomarcador para câncer de próstata.

Esse dado é surpreendente por alguns motivos. Em primeiro lugar, HOXC4 é um fator de transcrição e, por conseguinte, não seria esperado que fosse encontrado no soro. Em segundo lugar, embora outros biomarcadores para câncer de próstata sejam conhecidos, a descoberta de um biomarcador confiável permanece imprecisa, vide, por exemplo, as questões descritas acima em relação ao PSA. De fato, HOXC4 é um biomarcador de estágio inicial e, especialmente, de estágio tardio, conforme apresentado na Figura 1.

Desse modo, esta proteína não foi identificada antes como biomarcador para câncer de próstata, embora se saiba que esteja expressa em células de câncer de próstata, juntamente com milhares de outras proteínas, muitas das quais não poderiam ser descritas como biomarcadores para câncer de próstata. O mesmo se aplica também a outros peptídeos HOX, incluindo HOXB5 e HOXB6.

Da mesma forma que os peptídeos HOX, as proteínas *Engrailed* (En) são também fatores de transcrição contendo homeodomínio que exibem grau muito alto de conservação funcional durante o desenvolvimento (revisado por Morgan, 2006). O gene *En* original foi caracterizado em drosófila, onde o *En* mutante não consegue formar uma borda entre a asa anterior e a posterior (Garcia-Bellido e Santamaria, 1972). Homólogos vertebrados de *En* desempenham da mesma forma papéis reguladores durante o desenvolvimento, os quais incluem desenvolvimento de membros e a especificação inicial e migrações axonais subseqüentes do sistema nervoso (Morgan 2006).

Além de regulação da transcrição, as proteínas EN exibem algumas outras propriedades, aparentemente não relacionadas, que são funcionalmente importantes. A primeira destas é a capacidade de serem secretadas de células e de serem internalizadas por outras (Cosgaya *et al.*, 1998; Joliot *et al.*, 1998, revisado por Morgan, 2006). O mecanismo básico exato para esse fenômeno é desconhecido, embora esteja claro que dependa de uma sequência conservada de exportação nuclear, localizada no homeodo-

mínio (Maizel *et al.*, 1999; Chatelin *et al.*, 1996; Derossi *et al.*, 1996; Joliot *et al.*, 1997).

Além de seu papel no desenvolvimento, recentemente *EN-2* demonstrou ser um possível oncogene em câncer de mama (Martin *et al.*, 2005). Linhagens de células mamárias murinas não tumorogênicas forçadas a expressarem *EN-2*, exibem subsequentemente algumas características malignas, incluindo encurtamento do ciclo celular e perda do contato célula a célula. Ademais, o silenciamento de *EN-2* pelo RNAi indica que este é necessário para a manutenção do fenótipo transformado em uma linhagem de células de câncer de mama.

Os requerentes descobriram que EN-2 é superexpressado e secretado da linhagem de células LNCaP derivadas de câncer de próstata e em amostras de tecido humano de adenocarcinoma prostático. Além disso, EN-2 é secretado de células ductais e tumores do tipo adenocarcinoma, e está presente na urina de pacientes com câncer de próstata. Esta é a primeira vez que EN-2 foi sugerido como marcador de câncer de próstata.

De preferência, é detectada a presença ou ausência do fator de transcrição contendo pelo menos um homeodomínio, como peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, ou fragmento destes.

De preferência, pelo menos único peptídeo HOX é selecionado entre qualquer peptídeo HOX, conforme listados abaixo, desde que o peptídeo HOX, ou fragmento deste, possa ser detectado em um líquido corporal, como soro ou urina.

De preferência, pelo menos único peptídeo HOX, ou fragmento deste, pertence à subfamília HOXA, a HOXB, a HOXC ou a HOXD. Se mais de um peptídeo HOX for utilizado, nesse caso, estes poderão ser da mesma família ou de uma combinação de família. Combinações de fragmentos são também contemplados, quer fragmentos da mesma proteína ou fragmentos de proteínas diferentes. Combinações de peptídeos diferentes podem fornecer diagnósticos mais acurados. É preferível que o peptídeo HOX não seja HOXA4, HOXA1, HOXA7, HOXB3 ou HOXB9.

É especialmente preferido que o peptídeo HOX seja o peptídeo

HOXC4 e/ou o peptídeo HOXB6 e/ou o peptídeo HOXB5 e/ou o peptídeo HOXA3 e/ou o peptídeo HOXD9 ou fragmentos destes.

De preferência, o peptídeo HOXC4 é aquele fornecido na Sequência ID NO. 1 (Nº. de acesso NCBI P09017, gi:123279), ou um fragmento deste. De preferência, o peptídeo HOXB6 é aquele fornecido na Sequência ID NO. 2 (Nº. de acesso NCBI P17509, gi:116242515), ou um fragmento deste. De preferência, o peptídeo HOXB5 é aquele fornecido na Sequência ID NO. 3 (Nº. de acesso NCBI P09067, gi:400000), ou um fragmento deste. De preferência, o peptídeo EN-2 é aquele fornecido na Sequência ID NO. 4 (Nº. de acesso NCBI P19622, gi:21903415) ou um fragmento deste. De preferência, o peptídeo HOXA3 é aquele fornecido na Sequência ID NO.5 (Nº. de acesso NCBI do mRNA NM_030661, gi: 84043946), ou um fragmento deste. De preferência, o peptídeo HOXD9 é aquele fornecido na Sequência ID NO. 6 (Nº. de acesso NCBI do mRNA NM_014213, gi: 23397673), ou um fragmento deste.

Embora seja feita referência a HOXC4, o peptídeo HOXC4 ou a um fragmento deste, será entendido que esses termos podem ser utilizados alternadamente, a não ser se evidente de outra forma. O mesmo segue para outros peptídeos HOX e EN-2.

Além disso, onde for feita referência, nesta exposição, a HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3 ou HOXD9, esta se aplica também a outros peptídeos HOX, ou combinações destes, a não ser se evidente de outra forma.

Igualmente, onde for feita referência, nesta exposição, a uma sequência em particular, tal como uma seqüência de referência ou uma Sequência ID NO, esta se aplica a todas as Seqüências ID NOs. e a quaisquer das seqüências fornecidas abaixo, a não ser se evidente de outra forma.

De preferência, o fragmento compreende pelo menos 80% de homologia de sequência à sequência de referência (por exemplo, HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3, HOXD9 ou EN-2), mais preferivelmente 85%, mais preferivelmente 90%, mais preferivelmente 95%, mais preferivelmente 97%, mais preferivelmente 99% e, o mais preferível, 99,9% de homologia de sequência à sequência de referência ou tão próximo à mesma quanto for

apropriado. Métodos adequados para estabelecimento de homologia de seqüência incluem o programa BLAST.

De preferência, o fragmento compreende pelo menos 80% de identidade de sequência à sequência de referência (por exemplo, HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3, HOXD9 ou EN-2), mais preferivelmente 85%, mais preferivelmente 90%, mais preferivelmente 95%, mais preferivelmente 97%, mais preferivelmente 99% e, o mais preferível, 99,9% de identidade de sequência à sequência de referência ou tão próximo à mesma quanto for apropriado. Métodos adequados para estabelecimento de identidade de sequência incluem o programa BLAST.

Dois polipeptídeos são ditos "homólogos", conforme o termo é utilizado nesta exposição, se a sequência de um dos polipeptídeos possuir grau elevado suficiente de identidade ou similaridade à seqüência do outro polipeptídeo. "Identidade" indica que, em qualquer posição em particular nas seqüências alinhadas, o resíduo de aminoácido for idêntico entre as sequências. "Similaridade" indica que, em qualquer posição em particular nas seqüências alinhadas, o resíduo de aminoácido é de tipo similar entre as seqüências. Graus de identidade e similaridade podem ser calculados rapidamente (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing. Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; e *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991). Percentual de identidade, conforme referido nesta exposição, é conforme determinado pelo programa BLAST versão 2.1.3 utilizando os parâmetros padrão especificados pelo NCBI (o National Center for Biotechnology Information; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) [Blosum 62 matrix; penalidade por abertura de lacuna = 11 e penalidade por extensão de lacuna = 1].

De preferência, o fragmento compreende pelo menos quatro aminoácidos consecutivos da sequência de referência, mais preferivelmente

pelo menos 5, mais preferivelmente pelo menos 6, mais preferivelmente pelo menos 7, mais preferivelmente pelo menos 8 aminoácidos consecutivos da sequência de referência, tal como a Sequência ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, embora fragmentos mais longos com pelo menos 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 225 e até pelo menos 250 aminoácidos sejam também preferidas. Fragmentos incluem também peptídeos truncados que possuem x aminoácidos excluídos do N-terminal e/ou C-terminal. Nessas trucagens, x pode ser 1 ou mais (ou seja, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ou mais), porém, de preferência, menos de 150.

Sem estar preso pela teoria, acredita-se que HOXC4 seja secretado por uma via não clássica, sem requerer seqüência de sinalização. A sequência fornecida na Sequência ID NO. 1 é, por conseguinte, supostamente a mesma da proteína encontrada no soro. Esse fato é corroborado pela observação de que a banda detectada é de tamanho correspondente (Mw) ao tamanho predito com base na seqüência gênica. As proteínas HOX podem sair das células através de outros mecanismos, por exemplo, lise celular.

O termo "biomarcador" é utilizado por toda a técnica e significa um indicador biológico distinto ou biologicamente derivado de um processo, evento ou condição. Em outras palavras, um biomarcador é indicativo de certo estado biológico, tal como a presença de tecido canceroso. Em alguns casos, formas diferentes de biomarcadores podem ser indicativas de certos estados de doença, porém, sem estar preso pela teoria, acredita-se que a mera presença de níveis elevados de um peptídeo HOXC4, ou de fragmentos deste, em líquidos corporais, tais como soro, é indicativo de câncer de próstata. Embora não seja atualmente contemplado que glicoformas diferentes, por exemplo, do peptídeo HOXC4, sejam secretadas, estas são não obstante abrangidas pela presente invenção. Por exemplo, glicoformas diferentes, tais como estrutura ou teor de açúcar alterado de glicoformas, podem ser ainda determinadas para HOXC4, porém estas são abrangidas e podem até mesmo ser indicativas da evolução do câncer de próstata. Trucagens, mutações ou deleções ou ligações ao peptídeo HOXC4, ou fragmentos des-

te, são também contemplados.

No entanto, a principal descoberta que fundamenta a presente invenção é a de que há um aumento significativo no nível de HOXC4 que pode ser detectado em líquidos corporais, tais como o soro. Acredita-se que HOXC4 seja secretada, porém é também contemplado que possa ser devido a extravasamento de proteína HOXC4 de células que estão morrendo. Igualmente, EN-2 pode ser secretada ou pode ser detectável em líquidos corporais devido a extravasamento de células danificadas ou mortas. Estes níveis aumentados são indicativos de câncer de próstata em estágio inicial e tardio. Enquanto que há uma elevação significativa entre níveis de controle e normais e câncer de próstata em estágio inicial, há também um aumento bem significativo entre câncer de próstata em estágio inicial e o em estágio tardio. Em termos gerais, uma vantagem da presente invenção é a de que a substância e também o estado do câncer de próstata podem ser detectados. Isso auxilia no prognóstico e administração de terapias adequadas.

Uma outra vantagem da presente invenção é a de ser capaz de distinguir condições como hiperplasia benigna da próstata (HBP). Estas condições que levam ao alargamento da glândula prostática podem ser erroneamente interpretadas como câncer de próstata, utilizando técnicas estabelecidas para determinação da presença de câncer de próstata, tais como Exame de Toque Retal (ETR). É uma outra vantagem da presente invenção que um diagnóstico acurado possa ser provido sem utilizar-se de procedimentos invasivos desagradáveis e potencialmente prejudiciais, os quais podem ser também inexatos. Além disso, a presente invenção é especialmente sensível. De preferência, os métodos da presente invenção podem detectar o início de câncer de próstata antes que qualquer outro método de detecção e antes que tenham início os sintomas evidentes de câncer de próstata. Dessa forma, o câncer pode ser tratado em estágio inicial quando é mais suscetível a este tratamento e que tenha menos possivelmente iniciado o estágio metastático.

Tipos diferentes de câncer de próstata são conhecidos. O mais comum inicia nas células da glândula prostática e é conhecido como adeno-

carcinoma de próstata. No entanto, existem outras formas de câncer de próstata, como sarcomas, carcinomas de células pequenas e carcinomas de células transicionais. Os métodos da invenção podem ser utilizados para detectar o início de qualquer um destes tipos de câncer, embora a detecção de adenocarcinoma seja preferida.

A progressão do câncer é monitorada por um processo de estadiamento. Este processo indica o nível de desenvolvimento do câncer e se já se disseminou. O escore é de um a quatro, com o prognóstico tornando-se progressivamente pior a cada estágio.

Estágio I: As células malignas estão circunscritas à próstata; não se disseminaram para os linfonodos ou outros órgãos; os escores de Gleason são entre dois e quatro, e menos de cinco por cento da próstata é composta por crescimento tumoral.

Estágio II: Escores de Gleason são cinco ou mais altos, ou mais de cinco por cento da glândula exibe crescimento anormal; o câncer ainda está restrito à próstata.

Estágio III: Células malignas disseminaram-se para as vesículas seminais, porém não para os linfonodos ou outros órgãos.

Estágio IV: Os linfonodos, tecido pélvico ou órgãos mais distantes estão afetados.

De preferência, os métodos da invenção detectam o início de câncer de próstata antes ou durante o estágio I ou estágio II, mais preferivelmente estágio I.

Os biomarcadores peptídicos da presente invenção podem ser utilizados em métodos de diagnóstico, por exemplo, investigação clínica, e em métodos de avaliação de prognóstico, monitoramento dos resultados de terapia, identificação de pacientes que mais possivelmente responderão um tratamento terapêutico em particular, seleção de fármaco e desenvolvimento. Além disso, os biomarcadores da presente invenção e usos dos mesmos são de valor para identificação de novos tratamentos de fármacos e para descoberta de novos alvos para tratamento de fármaco.

Dessa forma, em uma outra característica, a invenção provê um

método de diagnóstico ou monitoramento da progressão de câncer de próstata, compreendendo a detecção e/ou quantificação de um fator de transcrição contendo pelo menos um homeodomínio, como um peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, ou fragmentos destes. De preferência, o peptídeo compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de acordo com a SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. De preferência, pelo menos um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2 ou um fragmento destes está presente em uma amostra biológica proveniente de um sujeito em teste. A referida amostra biológica sendo, de preferência, uma amostra de líquido corporal.

O líquido corporal pode ser qualquer líquido corporal humano, incluindo líquido celular, líquido cefalorraquidiano (LCR), sêmen, urina, sangue, linfa ou saliva. No entanto, é especialmente preferido que o líquido corporal seja sangue total, especialmente soro sanguíneo, ou urina. É também preferido que o líquido corporal seja substancial ou completamente livre de células inteiras/intactas. De preferência, o líquido corporal não contém plaquetas ou resíduos celulares (como os produzidos na lise de células). De preferência, o líquido corporal não contém células procarióticas e eucarióticas.

Estes líquidos podem ser obtidos por quaisquer números de meios conhecidos na técnica, conforme será evidente para o técnico especializado. Por exemplo, uma amostra de urina é facilmente obtida, enquanto que amostras de sangue ou soro podem ser obtidas por via parenteral com uma agulha e seringa, por exemplo. Amostras livres ou substancialmente livres de células podem ser obtidas, submetendo-se o líquido corporal a várias técnicas conhecidas daqueles especializados na técnica, as quais incluem, entre outras, centrifugação e filtração.

Embora seja de modo geral preferido que não sejam utilizadas técnicas invasivas para obter a amostra, pode ainda ser preferível obter amostras como homogenatos de tecidos, cortes de tecidos e espécimes de biopsia.

Métodos de monitoramento da presente invenção podem ser utilizados para detectar o início, progressão, estabilização, melhora e/ou re-

missão de câncer de próstata. Dessa forma, a detecção do pelo menos um peptídeo HOX, peptídeo EN-2, ou de um fragmento destes, pode ser utilizada para determinar a progressão da doença com objetivo de orientar um médico para um tratamento em particular.

De preferência, pelo menos duas etapas de detecção e/ou quantificação são fornecidas, preferivelmente com intervalo temporal entre as mesmas, por exemplo, alguns dias, semanas, anos ou, mais preferivelmente, meses para determinar se os níveis de pelo menos um peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, ou um fragmento destes, alteraram-se, indicando dessa forma se houve uma alteração na progressão do câncer. O mesmo possibilita serem feitas comparações entre um nível do biomarcador em amostras coletadas em duas ou mais ocasiões, uma vez que aumento no nível do peptídeo sobre o tempo é indicativo do início ou progressão do câncer, enquanto que diminuição no nível do peptídeo pode indicar melhora e/ou remissão do câncer.

De preferência, um método de diagnóstico ou de monitoramento de acordo com a presente invenção compreende a comparação do nível do peptídeo presente em uma amostra em teste, com o nível em um ou mais controles. De preferência, os controles podem ser provenientes do mesmo paciente de uma amostra prévia para assim monitorar o início ou progressão. No entanto, é preferido também que os controles possam ser normalizados para uma população, especialmente uma população saudável ou normal, onde não há câncer de próstata. Em outras palavras, o controle pode consistir no nível de um biomarcador encontrado em amostra de controle normal proveniente de um sujeito normal.

Portanto, é provido um método de diagnóstico de câncer de próstata, compreendendo a quantificação ou detecção da quantidade de pelo menos um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2 ou de um fragmento destes, e a comparação da quantidade do referido peptídeo na referida amostra em teste com a quantidade presente em uma amostra biológica de controle, proveniente de um sujeito normal ou do mesmo sujeito bem anterior à incidência de doença. Se um aumento significativo no nível de pelo menos um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2 ou de um fragmento destes for encontrado na

amostra em teste, nesse caso, este é indicativo de que a doença está em progressão ou iniciou.

Conforme notado acima, este método de detecção de pelo menos um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2 ou de um fragmento destes é especialmente útil para detectar câncer de próstata em estágio inicial e é mais sensível do que o teste tradicional de detecção de níveis de PSA. Dessa forma, os métodos da invenção são especialmente úteis para confirmar câncer quando um paciente apresentar teste negativo com métodos convencionais, tais como a detecção de PSA.

Em geral, o nível de secreção do pelo menos um peptídeo HOX ou do peptídeo EN-2 nos líquidos corporais está incluído nas variações descritas abaixo.

Será entendido que os termos "peptídeo" e "proteína" podem ser alternados, conforme utilizados nesta exposição, a não ser se evidente de outra forma.

A Tabela 1 e Figura 1, por exemplo, exibem um aumento de tamanho bem considerável em concentrações séricas da proteína HOXC4. A Tabela 2 e Figura 2 exibem resultados semelhantes para HOXB6. Os requerentes mostraram também que HOXB6 é um biomarcador para câncer de próstata em estágio tardio (dados não apresentados). HOXB5 é também um biomarcador, porém menos preferido que HOXB6 ou HOXC4 (Tabela 3 e Figura 7). Biomarcadores alternativos incluem HOXA3 e HOXD9 (vide Figura 8).

De preferência, o aumento é estatisticamente significativo, determinado por métodos padrões, tais como "teste-t" fornecendo intervalos de confiança, de preferência, de pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 85%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, mais preferivelmente pelo menos 97%, mais preferivelmente pelo menos 99%, mais preferivelmente pelo menos 99,5%, mais preferivelmente pelo menos 99,95% e, o mais preferível, pelo menos 99,99%.

De preferência, o aumento entre o controle e uma amostra indicativo de câncer de próstata em estágio inicial é em torno de entre 110-

200%, mais preferivelmente em torno de entre 120-180%, mais preferivelmente em torno de entre 130-160%, mais preferivelmente em torno de entre 140-150%, mais preferivelmente em torno de entre 110-140%, mais preferivelmente em torno de entre 115-130%, mais preferivelmente em torno de entre 120-130%, mais preferivelmente em torno de entre 120-140% e, o mais preferível, em torno de 125%. Outras combinações dos pontos finais acima são também contempladas.

Em relação à determinação de câncer em estágio tardio ou avançado, o aumento entre o controle e uma amostra indicativo do referido câncer de próstata em estágio tardio é em torno de entre 400-800%, mais preferivelmente em torno de entre 450-750%, mais preferivelmente em torno de entre 500-700%, mais preferivelmente em torno de entre 520-680%, mais preferivelmente em torno de entre 540-640%, mais preferivelmente em torno de entre 550-620%, mais preferivelmente em torno de entre 560-600%, mais preferivelmente em torno de entre 570-590% e, o mais preferível, em torno de 580%. O aumento pode estar também no intervalo de 550-800% ou de 400-600%. Outras combinações dos pontos finais acima são também contempladas.

Um aumento entre câncer em estágio inicial e tardio pode ser medido em relação a um controle normal (ou seja, livre de câncer) ou a uma amostra de estágio inicial ou de controle no mesmo paciente. Em relação a uma amostra de estágio inicial, um aumento em torno de entre 100% e 300%, mais preferivelmente em torno de entre 150% e 250%, mais preferivelmente em torno de entre 175% e 225%, mais preferivelmente em torno de entre 185% e 215%, mais preferivelmente em torno de entre 100% e 220%, mais preferivelmente em torno de entre 170% e 300% e, o mais preferível, em torno de 200% é preferido.

Como mencionado acima, onde for feita referência, nesta exposição, a um peptídeo contendo pelo menos um homeodomínio, esta se aplica aos peptídeos HOX, tais como HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3 e HOXD9, e ao peptídeo EN-2, a não ser se evidente de outra forma.

Onde for feita referência, nesta exposição, a pelo menos um

peptídeo HOX ou peptídeos HOX, esta se aplica a HOXC4, HOXB6, HOXB5, HOXA3 e HOXD9, em particular, bem como aos outros peptídeos HOX listados abaixo, a não ser se evidente de outra forma.

Em termos de quantidades absolutas de pelo menos uma proteína HOX ou EN-2 por ml de líquido corporal, estas são preferivelmente em torno de entre 0,5-1,5 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 0,75-1,25 ng/ml e, o mais preferível, em torno de 1,0 ng/ml para amostras de controle. Para amostras de câncer em estágio inicial, os intervalos preferidos são em torno de entre 2,0-5,0 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 2,5-4,5 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 2,5-4,0 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 2,75-3,5 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 2,75-3,0 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 2,0-3,5 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 2,0-3,0 ng/ml e, o mais preferível, em torno de 3,0 ng/ml.

Para amostras de câncer em estágio tardio, os intervalos preferidos são em torno de entre 6,0-20 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 8,0-15 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 8,5-13 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 9,0-12 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 9,5-11 ng/ml, mais preferivelmente em torno de entre 7-13 ng/ml mais preferivelmente em torno de entre 8,5-16 ng/ml e, o mais preferível, em torno de 10 ng/ml.

O termo "diagnóstico" abrange identificação, confirmação e/ou caracterização da presença ou ausência de câncer de próstata, juntamente com o estágio de desenvolvimento do mesmo, tais como estágio inicial ou tardio, ou câncer de próstata benigno ou metastático.

Será apreciado que a natureza de "estágio inicial" e de "estágio tardio" dos estados de doença cancerosa pode ser determinada por um médico. É também contemplado que possam referir-se a não-metastática e metastática, respectivamente.

A invenção provê também um método de monitoramento da eficácia de um tratamento para câncer de próstata, compreendendo a detecção e/ou quantificação de pelo menos um peptídeo HOX, peptídeo EN-2 ou de

um fragmento destes, presente em uma amostra biológica de um sujeito. Conforme acima, pode ser preferível obter duas amostras, separadas temporalmente, por exemplo, por alguns meses, a fim de determinar se houve qualquer progresso no tratamento, em outras palavras, se os níveis de pelo menos um peptídeo HOX, peptídeo EN-2, ou um fragmento destes, aumentaram ou diminuíram. Uma diminuição nos níveis do referido pelo menos um peptídeo HOX ou peptídeo EN-2 indica que a doença está regredindo e, portanto, que o regime de tratamento é bem sucedido. Este monitoramento de uma doença revelará rapidamente se um paciente está respondendo a um tratamento ou se é refratário a um tratamento. Se o último, então um tratamento alternativo pode ser fornecido. Este método, portanto, oferece uma indicação rápida se um regime de tratamento é eficaz, e permite que o médico altere este regime até ser observado efeito no paciente.

No método da presente invenção, o preferido é que a quantidade do peptídeo, ou de um fragmento deste, em uma amostra em teste seja comparada à quantidade presente em um ou mais controles e/ou uma ou mais amostras prévias em teste, coletadas em tempo anterior do referido mesmo sujeito em teste. A extensão de tempo entre a amostra mais precoce e a mais tardia pode ser de somente alguns dias, porém pode ser de até vários meses ou até mesmo vários anos, e será determinada pelo médico, com base na progressão da doença e o histórico médico do paciente. Alternativamente, o controle pode ser uma amostra em teste de um paciente livre de doença.

O peptídeo, ou um fragmento deste, é detectado pela confirmação da presença do referido biomarcador. A quantificação da quantidade do biomarcador presente em uma amostra inclui, de preferência, a determinação da concentração do biomarcador peptídico na amostra. As etapas de detecção e/ou quantificação podem ser conduzidas diretamente na amostra, ou indiretamente em um extrato da mesma ou diluição da mesma.

A presente invenção refere-se a biomarcadores, e será apreciado que estes requeiram ser detectáveis no líquido corporal. Alguns membros da família HOX não podem ser detectados em líquido corporal e não são,

portanto, biomarcadores de acordo com a presente invenção.

Níveis detectáveis do pelo menos um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2 ou fragmentos destes são discutidos em outros locais no presente, porém será apreciado que poderá haver alguns motivos porque um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2 ou fragmentos destes não são detectáveis. Sem estar preso por teoria, um motivo pode ser que o peptídeo é degradado no líquido corporal, ou seja, não é "estável".

Dessa forma, é preferido que pelo menos um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2 ou fragmentos destes não sejam substancialmente degradados e/ou que sejam ainda detectáveis (isto é, estejam presentes em concentrações detectáveis) na periferia corporal, isto é, uma veia próxima à superfície da pele, de preferência, o braço, onde possam ser simplesmente coletados.

O peptídeo pode ser liberado no líquido corporal, quer por rompimento ou extravasamento celular ou por secreção.

A detecção e/ou quantificação de pelo menos um peptídeo HOX ou o peptídeo EN-2, ou fragmentos destes, pode ser efetuada por qualquer método adequado para detectar a presença e/o quantidade de uma proteína ou peptídeo específico em uma amostra biológica. O mesmo pode ser por detecção direta do biomarcador, por exemplo, por MALDI-TOF ou SELDI.

No entanto, é preferido também que pelo menos um peptídeo HOX ou o peptídeo EN-2, ou fragmento deste, seja detectado direta ou indiretamente por intermédio de interação com um ou mais ligantes. Estes ligantes podem incluir um anticorpo anti-HOX ou anti-EN-2 ou um fragmento de ligação a estes, um aptâmero ou um oligonucleotídeo. Será apreciado que estes ligantes deverão ser capazes de se ligarem especificamente ao peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, ou a um fragmento destes. Estes poderão ser adequadamente marcados e compreenderem uma etiqueta de afinidade. Marcações adequadas podem ser fluorescentes, radioativas ou luminescentes. As marcações podem ser unidas ao anticorpo diretamente ou por intermédio de um agente de ligação.

Por exemplo, a detecção e/ou quantificação podem ser realiza-

das por um ou mais métodos selecionados do grupo constituído por: MALDI-TOF, SELDI, sistemas de análises à base de gel em 1-D ou 2-D, cromatografia líquida e técnicas que combinam cromatografia líquida e espectrometria de massa. As últimas podem incluir, de preferência, ICAT® ou iTRAQ® (ambos disponibilizados pela Applied Biosystems, EUA).

Técnicas de cromatografia líquida podem incluir HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) ou até mesmo cromatografia líquida de baixa pressão. Além disso, métodos como cromatografia em camada delgada, espectroscopia NMR e qualquer outro método descrito nesta exposição são também preferidos.

O peptídeo, ou um fragmento deste, pode ser detectado e/ou quantificado por métodos imunológicos, tais como imunoensaios do tipo sanduíche, por exemplo, ensaio imunoenzimático de absorção (ELISA), radio-imunoensaios (RAI), ensaios imunoenzimáticos (EIA), *Western Blotting*, imunoprecipitação. Também preferidos são imunoensaios à base de partículas, os quais podem incluir, por exemplo, o uso de partículas de ouro, prata ou látex, partículas magnéticas ou *Q-dots*. Estes métodos podem ser realizados, por exemplo, em placa de microtitulação ou em formato de faixa ou sobre um chip.

Especialmente preferidos são ensaios do tipo ELISA compreendendo anticorpos específicos para o pelo menos um peptídeo HOX ou o peptídeo EN-2. O anticorpo ou anticorpos anti-HOX ou anti-EN-2 são ligados, de preferência, indiretamente ou por intermédio de um agente de ligação, a uma molécula repórter, como um radioisótopo, uma molécula fluorescente, uma molécula luminescente ou uma enzima. Um exemplo de uma enzima preferida é fosfatase alcalina, disponibilizada pela Invitrogen, Reino Unido, embora outros repórteres sejam conhecidos na técnica.

Um exemplo e anticorpo anti-HOXC4 humano é disponibilizado pela Abcam, Reino Unido, nº. de catálogo ab24338. Este é um anticorpo anti-HOXC4 humano de Coelho e, por conseguinte, pode ser preferível utilizar um anticorpo secundário anti-IgG de Coelho ligado a um repórter, tal como fosfatase alcalina, para detectar o complexo HOXC4-anticorpo. Um exemplo

de anticorpo anti-HOXB6 é fornecido pela Abcam, nº. de catálogo ab26077. Um exemplo de anticorpo anti-HOXB5 é fornecido pela Abcam, nº. de catálogo ab26079. Um exemplo de anticorpo anti-HOXA3 é fornecido pela Abcam, nº. de catálogo ab28771. Um exemplo de anticorpo anti-HOXD9 é fornecido pela Abcam, nº. de catálogo ab60708. Exemplos de outros anticorpos anti-HOX são conhecidos. Um exemplo de anticorpo anti-EN-2 é fornecido pela Abcam, nº. de catálogo ab45867.

Métodos de *Western blotting* são preferidos também, especialmente os que são capazes de fornecer dados de densitometria.

Níveis adequados para comparação da presença do pelo menos um peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, suficientes para distinguir entre o controle, cânceres em estágio inicial e em estágio tardio, ou combinações destes, são discutidos acima.

Onde utilizados, os anticorpos podem ser policlonais, monoclonais, biespecíficos, humanizados ou quiméricos. Podem consistir em uma única cadeia, mas, de preferência, consistiriam de pelo menos uma cadeia leve ou uma cadeia pesada, porém, será apreciado que é necessária pelo menos uma Região Determinadora de Complementaridade para que ocorra ligação a um epítopo de HOX ou epítopo de EN-2.

Evidentemente, será apreciado também que o epítopo ou epítopos deverão estar disponíveis para ligação ou reconhecimento pelo ligante, tais como um anticorpo. Anticorpos anti-HOX e anti-EN-2 já são conhecidos, porém se anticorpos ou ligantes adicionais para ligação, com especificidades diferentes forem necessários, então, estes poderiam ser obtidos. Métodos para produção de anticorpos são conhecidos na técnica. Por exemplo, se anticorpos policlonais forem desejados, um mamífero pode ser selecionado nesse caso, tal como camundongo, coelho, cabra ou cavalo, e imunizado com o antígeno de escolha, como HOX ou EN-2 humano. O soro do animal imunizado é coletado, em seguida, e tratado para ser obtido o anticorpo, por exemplo, por cromatografia por imunoafinidade. HOX ou EN-2 humano poderia, por exemplo, ser injetado em coelhos desencadeando uma resposta imune do coelho e sendo cultivados anticorpos anti-HOX ou anti-EN-2, os

quais podem ser isolados em conseqüência, utilizando métodos convencionais.

Evidentemente, anticorpos monoclonais poderiam ser produzidos por métodos conhecidos na técnica e são, de modo geral, preferidos. A metodologia geral para produção de anticorpos monoclonais utilizando tecnologia de hibridoma é bem conhecida (vide, por exemplo, Kohler, G. e Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, 77-96 em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)).

Por conseguinte, anticorpo, conforme referido nesta exposição, deverá consistir em uma região epítopo-ligação, tal como CDR. Conforme utilizado nesta exposição, o termo "anticorpo" refere-se a moléculas intactas, bem como a fragmentos destas, como Fab, Fab', $F(ab')_2$ e Fv, os quais são capazes de se ligarem a epítopo. De preferência, o anticorpo compreende também uma porção efetora, como a região Fc.

O anticorpo pode ser de qualquer classe adequada, incluindo IgE, IgM, IgD, IgA e, em particular, IgG. As várias subclasses destes anticorpos são contempladas também.

Dessa forma, é preferido também que um biossensor seja para detector pelo menos um biomarcador peptídico, ou um fragmento deste. O biossensor pode incorporar um método imunológico, conforme descrito acima, por exemplo, para detecção do biomarcador, ou meios ou tecnologias elétricas, térmicas, magnética ou óptica, por exemplo, um holograma, ou acústicos. Utilizando estes biossensores, é contemplado que o biomarcador seja detectado e/ou quantificado. Portanto, em uma outra característica, a presente invenção provê o uso de um biossensor para detectar e/ou quantificar o peptídeo ou um fragmento deste.

De preferência, pelo menos um biomarcador HOX ou EN-2 pode ser detectado utilizando um biossensor, fundamentado no uso de hologramas "inteligentes", ou sistemas acústicos de alta freqüência, especialmente uma vez que estes sistemas são sensíveis a configurações de arranjos. Por exemplo, com sensores de hologramas inteligentes, disponibilizados pela

Smart Holograms Limited, Cambridge, Reino Unido, uma imagem holográfica é armazenada em filme polimérico fino que é sensibilizado para reagir especificamente com o biomarcador. Na exposição, o biomarcador reage com o polímero levando a uma alteração na imagem exibida pelo holograma. A leitura do resultado do teste pode observar uma alteração na luminosidade óptica, imagem, cor e/ou na posição da imagem. Esta alteração pode ser lida até mesmo a olho nu.

Será apreciado que é preferido que os biossensores capazes de detectar e/ou quantificar pelo menos um biomarcador HOX ou EN-2 combinam reconhecimento biomolecular com recursos apropriados para converter a detecção da presença, ou a quantificação, do referido biomarcador em uma amostra em sinal detectável. Por exemplo, elementos impressos de reconhecimento, tecnologia do transistor em filme fino, dispositivo com ressonadores acústicos magnéticos e outros novos sistemas acústico-elétricos podem ser preferivelmente empregados no presente biossensor para detecção e/ou quantificação de pelo menos um biomarcador HOX ou EN-2. De preferência, um biossensor de acordo com a invenção detectará um ou mais, de preferência, dois, três, quatro, cinco ou todos os seis entre HOXC4, HOXB5, HOXB6, HOXA3, HOXD9 e EN-2. Biossensores ainda mais preferidos podem detectar ainda outros biomarcadores HOX conforme referidos acima.

De preferência, o biossensor inclui um ligante e/ou um anticorpo, conforme discutido acima. O biossensor pode ser fornecido em um arranjo adequado ou chip, de modo que o biossensor seja capaz de ligação específica ao pelo menos um peptídeo HOX, o peptídeo EN-2, ou um fragmentos destes, e um meio de detecção é fornecido. Meios adequados de detecção são discutidos acima, porém podem incluir sistemas de repórter, como fosfatase alcalina, ou hologramas inteligentes capazes de fornecer um sinal detectável para o usuário de modo a indicar que ligação específica ao pelo menos um peptídeo HOX ou peptídeo EN-2, ou a um fragmento destes, foi alcançada e, de preferência, uma indicação da concentração de HOX ou EN-2 ou do número de eventos de ligação específica que ocorreram no referido

arranjo ou *chip*.

A presente invenção provê ainda kits para a referida detecção e/ou quantificação. Estes kits são úteis no diagnóstico e/ou monitoramento de câncer de próstata. Dessa forma, estes kits compreenderão de preferência um biossensor como um ligante, de preferência um anticorpo, capaz de ligar-se especificamente a pelo menos um peptídeo ou um fragmento deste, e meios para indicar a referida ligação específica para o usuário, por exemplo, utilizando um sistema de repórter conforme descrito nesta exposição. Os kits especialmente referidos incluem um arranjo ou um *chip*.

Em uma outra característica, a invenção provê o uso de um biossensor, de preferência um ligante e, o mais preferível, um anticorpo, capaz de ligação específica e reconhecimento do pelo menos um peptídeo HOX ou EN-2, ou um fragmento destes, para identificar uma substância capaz de suprimir a geração do pelo menos um peptídeo HOX ou o peptídeo EN-2, ou um fragmento destes. De preferência, esta substância é capaz de suprimir a produção do biomarcador pelo câncer de próstata. Em outras palavras, o ligante pode ser utilizado para determinar a eficácia ou não de um suposto tratamento ou estabelecido contra câncer de próstata.

Por conseguinte, um método para detecção da eficácia de um suposto tratamento contra câncer pode incluir as etapas de:

(a) incubação de uma célula inteira que expressa um peptídeo HOX ou um peptídeo EN-2, e detecção da quantidade liberada de peptídeo HOX ou de peptídeo EN-2,

(b) tratamento da célula com um suposto tratamento contra câncer,

(c) detecção da quantidade liberada de peptídeo HOX ou de peptídeo EN-2 após o tratamento, e

(d) comparação da quantidade liberada de peptídeo HOX ou de peptídeo EN-2, antes e depois do tratamento, para observar se o suposto tratamento contra câncer possui efeito sobre a quantidade liberada de peptídeo.

Alternativamente, um método pode compreender as etapas de:

(a) incubação de um ligante marcado com uma célula inteira que expresse peptídeo HOX ou peptídeo EN-2 sobre a superfície celular, ou uma membrana celular contendo um peptídeo HOX ou um peptídeo EN-2;

(b) medição da quantidade de ligante marcado ligado à célula inteira ou à membrana celular;

(c) adição de um suposto agente anticâncer à mistura de ligante marcado e a célula inteira ou a membrana celular da etapa (a) e permitir que a mistura atinja equilíbrio;

(d) medição da quantidade de ligante marcado ligado à célula inteira ou a membrana celular após a etapa (c); e

(e) comparação da diferença no ligante marcado ligado na etapa (b) e (d), de modo que o composto que causa a redução em ligação na etapa (d) é considerado inibidor da expressão de HOX ou EN-2 e, por conseguinte, um agente anticâncer.

Por exemplo, uma linhagem de células como a linhagem de células LNCaP de carcinoma de próstata poderia ser utilizada neste ensaio. As células LNCaP poderiam ser cultivadas na presença ou ausência de um suposto ou estabelecido agente anti-cancer, e ser comparada a expressão relativa de EN-2. Um nível mais baixo de expressão de EN-2 indicaria melhor atividade anticâncer. Os níveis de expressão poderiam ser detectados pela detecção da proteína produzida (ou seja, o produto final) ou pela detecção do RNA produzido (ou seja, um produto intermediário). Métodos de detecção da proteína produzida são discutidos acima. O RNA pode ser detectado utilizando, por exemplo, PCR quantitativa ou arranjo de oligonucleotídeos.

O precedente refere-se também aos métodos e kits da presente invenção.

Outros métodos ou kits a serem utilizados de acordo com a presente invenção serão evidentes para o versado na técnica. Estes podem incluir, por exemplo, sistemas de detecção de biomarcadores que são expostos em US-2006-014301, US-2004-063216, WO 01/92879 e WO 02/054936.

Portanto, a presente invenção pode ser utilizada para identificar

novos tratamentos contra câncer de próstata, em que os níveis de pelo menos um peptídeo HOX ou EN-2, ou um fragmento destes, são detectados e/ou quantificados na presença ou ausência do suposto agente anticâncer, a fim de determinar a eficácia deste. A presente invenção pode ser utilizada também em um método com tecnologia de seleção de alto rendimento, por exemplo, em formato de arranjo configurado, como sobre um chip ou em arranjo de multicavidades.

Uma vez que câncer de próstata é uma doença relacionada ao sexo masculino, será apreciado que o sujeito ou paciente pertence ao sexo masculino.

Descrição das Figuras

Figura 1: Exemplo do aspecto pela técnica de *western blotting* da proteína HOXC4 no soro. Os resultados foram analisados também por densitometria e são apresentados como a média de todas as seis amostras de cada grupo. Barras de erro mostram o erro padrão da média. Esses dados indicam que HOXC4 é potencialmente um marcador diagnóstico específico e preciso para câncer de próstata, nos estágios inicial e tardio da doença.

Figura 2: Detecção de HOXB6 em seis pacientes com câncer de próstata em estágio inicial, onde os tumores são pequenos e circunscritos à próstata, e de seis controles de idades correspondentes.

Figura 3: (a) Análise por RT-QPCR da expressão de EN-2 em células LNCaP e primárias do tumor (nível de transcrito, em proporção a β-actina). (b,c) Biopsia de núcleo de adenocarcinoma de próstata corado com anticorpo anti-En2. Coloração positiva para En2 (marrom) presente no citoplasma de células tumorais, com coloração mais forte na borda luminar (1). Bolsas positivas para EN-2 visíveis, presas à borda luminar (2) ou livres no interior do lúmen (3). Os núcleos estão corados em azul. Aumento: (a) x100, (b) x60.

Figura 4: Cortes através de biopsia de núcleo em TMA de (a) tecido prostático normal, (b) hipertrofia benigna da próstata e (c e d) tumor maligno de próstata. Coloração de EN-2 (marrom) presente nas células estromais (seta preenchida de branco) e nas glândulas com coloração mais forte aparente na borda luminar (pontas preenchidas de setas). Os núcleos estão corados

em azul. Aumento: (a-c) x60, (d) x100.

Figura 5: Detecção por *Western blotting* de proteína EN-2 em meio de cultura.

Figura 6: Proteína EN-2 na urina. A urina foi coletada de pessoas que estavam sendo examinadas e exibiam sintomas compatíveis com câncer de próstata e que eram investigadas quanto à presença da proteína EN-2. A presença de ausência de câncer foi testada por biopsia. O MW predito de EN-2 é de 30 kDa, porém uma segunda banda de 33 kDa é detectada também no controle positivo (extrato de cerebelo de camundongo). A banda de 30 kDa está presente exclusivamente na urina de 50% dos pacientes que apresentavam células de câncer de próstata em suas biopsias (C Pa), não estando presente em pacientes com biopsias negativas ou com hipertrofia benigna da próstata (BHP) ou neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (HGPIN).

Figura 7: Detecção de HOXB5 em três pacientes com câncer de próstata em estágio inicial, onde os tumores são pequenos e circunscritos à próstata, três pacientes com câncer de próstata em estágio tardio e de três controles de idades correspondentes.

Figura 8: Níveis de expressão de vários genes HOXA e HOXD em tecido tumoral comparado a tecido normal adjacente. DU145 e PC3 são linhagens de células derivadas de tumores de próstata.

Exemplo 1

HOXC4

Foi obtido soro de seis pacientes com câncer de próstata refratário a hormônio em estágio avançado, seis pacientes com câncer de próstata em estágio inicial onde tumores são pequenos e circunscritos à próstata e de seis controles com idades correspondentes. O soro foi dessalgado e fracionado pelo método de PAGE/SDS em gel a 12,5%. A proteína HOXC4 humana (UniProtKB / Swiss-Prot número de registro P09017) foi detectada pela técnica de *Western Blotting* com anticorpo de coelho anti-HOXC4 humana (Abcam, Reino Unido, número de catálogo ab24338), juntamente com um anticorpo secundário anti-IgG de coelho ligado à fosfatase alcalina (Invitro-

gen, Reino Unido). Com este método, foram detectados altos níveis da proteína HOXC4 no soro de todos os pacientes com câncer de próstata, porém somente níveis muito baixos em soro de controles de idades correspondentes (Figura 1).

Os resultados são apresentados abaixo na Tabela 1.

HOXC4 poderia ser utilizada como base para teste diagnóstico e/ou prognóstico de câncer de próstata, utilizando uma técnica padrão de ensaio como a de ELISA. O procedimento envolveria o uso de um anticorpo anti-HOXC4 ligado a um repórter, como fosfatase alcalina, de modo a ser quantificada a proteína HOXC4 presente em amostras do soro do paciente. Outras metodologias poderiam também ser utilizadas, incluindo a técnica de *Western Blotting*. A quantidade da proteína HOXC4 forneceria uma indicação se a doença estaria presente e qual estágio teria atingido.

Nome do gel: HoxC4 blot 131006 (Imagem bruta em 1-D)						
Índice	Nome	Paciente	Diagnóstico	Volume OD*mm^2	Vol. Adj. OD*mm^2	% Vol. Adj.
1	U1	HR29	Câncer	6,844796	0,272431	24,320686
2	UI	HR28	Câncer	6,460027	0,092836	8,2877258
3	U3	HR27	Câncer	9,731784	0,393355	35,115964
4	U4	SR5	Câncer em estágio inicial	6,108735	0,086538	7,7255409
5	U5	SR2	Câncer em estágio inicial	6,26387	0,01121	1,0007083
6	U6	SR1	Câncer em estágio inicial	8,427193	0,15222	13,589161
7	U7	VR30	Saudável	6,459172	0,045458	4,0581642
8	U8	VR23	Saudável	9,760506	0,062926	5,6175668
9	U9	VR21	Saudável	6,740683	0,003187	0,2844833

Nota: Membranas sondadas com anticorpo primário por somente 1 hora.

	Valores médios			% aumento
		DP	sem	
Controle	0,037190112	0,030716	0,0177548	0
Câncer em estágio inicial	0,08332277	0,07056	0,0407864	124,0455
Câncer em	0,252873795	0,151211	0,0874053	579,949

Valores médios % aumento

estágio tardio

Tabela 1

SEQ ID NO. 1:

HOXC4 Número de acesso do NCBI: P09017

1 MIMSSYLMDS NYIDPKFPPC EEYSQNSYIP EHSPEYYGRT RESGFQ-HHHQ ELYPPPPPRP

61 SYPERQYSCT SLQGPGNSRG HGPAQAGHHH PEKSQSLCEP APLS-GASASP SPAPPACSQP

121 APDHPSSAAS KQPIVYPWMK KIHVSTVNPN YNGGEPKRSR AAY-TRQQVLE LEKEFHYNRY

181 LTRRRRIEIA HSLCLSERQI KIWFQNRRMK WKKDHRLPNT KVRSAP-PAGA APSTLSAATP

241 GTSEDHSQSA TPPEQQRAED ITRL

Exemplo 2

HOXB6

A detecção de HOXB6 nestas amostras foi efetuada exatamente conforme para HOXC4, exceto que o anticorpo primário foi o anticorpo de coelho anti-HOXB6 humana (da Abcam, Nº. de catálogo ab26077). Os valores relativos para a proteína HOXB6 foram avaliados por densitometria do filme de raios-x (usando as bandas localizadas em seu peso molecular predito). A densidade óptica da banda, em relação àquela do fundo local, é representada por estes valores. Por conseguinte, será apreciado que um valor de densitometria comparativo negativo é possível, conforme mostrado pelos Controles de Idades Correspondentes (AMCs), embora deva ser apreciado que o mesmo não traduza uma quantidade negativa da proteína HOXB6.

Esses dados são apresentados graficamente na Figura 2.

Tabela 2

HOXB6 no soro					
Os valores representam as densidades ópticas relativas de bandas					
			Média	DP	sem
AMC1	-0,02671	AMC	-0,09016	0,064043	0,036977
AMC2	-0,08899	Câncer em	0,261033	0,076253	0,044026

	HOXB6 no soro estágio inicial
AMC3	-0,15478
Inicial 1	0,182775
Inicial 2	0,33511
Inicial 3	0,265214

SEQ ID NO. 2: HOXB6 Número de acesso do NCBI: P17509

1 MSSYFVNSTF PVTLASGQES FLGQLPLYSS GYADPLRHYP APYGPGPGQD KGFATSSYYP

61 PAGGGYGRAA PCDYGPAPAF YREKESACAL SGADEQPPFH PE-PRKSDCAQ DKSVFGETEE

121 QKCSTPVYPW MQRMNSCNSS SFGPSGRRGR QTYTRYQTLE LE-KEFHYNRY LTRRRRIEIA

181 HALCLTERQI KIWFQNRRMK WKKESKLLSA SQLSAEEEEE KQAE

Exemplo 3

EN-2

Os níveis de expressão de EN-2 foram testados, utilizando PCR quantitativa (QPCR), na linhagem de células LNCaP de carcinoma de próstata humano (Horoszewicz *et al.*, 1983). Esta linhagem é de células derivadas de uma lesão metastática de adenocarcinoma de próstata humano e amplamente utilizada como modelo *in vitro* desse tipo de câncer. Além disso, a expressão de EN-2 foi testada em tecido obtido de biopsias de tumores da próstata. Ambas as amostras expressaram EN-2. As células primárias do tumor expressaram também *EN-2* como proteína. Esse fato pode ser detectado em cortes de adenocarcinomas prostáticos (Figura 3a). A coloração de EN-2, nestes cortes, está presente no compartimento citoplasmático e no nuclear, porém é mais intensa nas bordas luminares e em bolsas secretoras que penetram o lúmen (Figura 3b,c).

A fim de examinar mais detalhadamente a extensão que EN-2 está presente em tecido normal, hipertrofia benigna e em tumores malignos da próstata, foi efetuada a coloração com anticorpo anti-EN-2 de um microarranjo de tecidos (TMA) contendo cortes representativos de cada um destes. O procedimento confirmou alto nível de expressão de EN-2 em glândulas malignas, especi-

almente nas bordas luminares (Figura 4), embora ocorra algum nível de coloração em glândulas de tecido normal e hipertrófico. Todos os tecidos exibiram também coloração de EN-2 nas células estromais (Figura 4). A fim de quantificar a coloração nas glândulas, cada tecido foi pontuado de 0 a 3, onde 0 representa ausência de coloração, e 3 a coloração mais forte. Com essa base, as glândulas de tecido normal (Figura 4a) exibiram pontuação em valor médio de 0,5 (n = 10, DP = 0,52), as com hiperplasia benigna (Figura 4b) 0,67 (n = 6, DP = 0,51), e as com tumores malignos (Figura 4c e d) 2,3 (n = 6, DP = 0,52).

Esses dados demonstram claramente que EN-2 está expressa nestas células de câncer de próstata.

Exemplo 4

O meio circundante de células LNCaP e de tumor primário de próstata foi examinado para estabelecer se EN-2 pode ser secretada a partir destas células. O meio, utilizado para cultivar ambos os tipos de células por duas horas, foi dessalgado e concentrado. As proteínas contidas nesse concentrado foram em seguida definidas por resolução em gel de acrilamida. A análise por *Western blotting* revelou a presença de bandas específicas de EN-2 no meio que circundava ambos os tipos de células (Figura 5), e a quantificação utilizando quantidades padrão de proteína EN-2 transcrita *in vitro* indicou que a quantidade de EN-2 no meio utilizado para cultura de células LNCaP era de 3ng/ml, enquanto células do tumor primário produziram 1,75ng/ml em 48 horas.

Exemplo 5

Foram obtidas amostras de urina de 17 indivíduos que haviam se submetido recentemente a biopsia e massagem da próstata. Dentre estes indivíduos, foi constatado que 10 apresentavam câncer na biopsia. Dentre os outros, dois eram portadores de neoplasia intraepitelial prostática de alto grau, (HGPIN), três exibiam sinais de hipertrofia benigna e dois não possuíam células cancerosas no corte da biopsia. Cinco dos pacientes diagnosticados com câncer apresentavam grandes quantidades de EN-2 na urina, enquanto nenhuma das amostras de urina dos indivíduos não diagnostica-

dos com câncer continha quantidade significativa da proteína EN-2 (Figura 6).

Exemplo 6

HOXB5

A detecção de HOXB5 nestas amostras foi efetuada exatamente conforme para HOXC4 e HOXB6, exceto que o anticorpo primário foi o anticorpo de coelho anti-HOXB5 humana (da Abcam, nº. de catálogo ab26079). Os valores relativos para proteína HOXB5 foram avaliados por densitometria do filme de raios x (utilizando as bandas localizadas em seu peso molecular predito). A densidade óptica da banda, em relação àquela do fundo local é representada por estes valores.

Tabela 3

	Valores médios			% aumento
		DP	sem	
Controle	0,006597	0,005948	0,003438	0
Câncer em estágio inicial	0,244012	0,055004	0,031794	3598,808
Câncer em estágio tardio	0,471597	0,154221	0,089145	7048,621

Esses dados são representados graficamente na Figura 7.

Exemplo 7

Foram obtidas amostras de urina de 17 indivíduos com suspeita de câncer de próstata e que foram diagnosticados subsequentemente com a doença. Os níveis protéicos de EN-2, nas amostras de urina, foram avaliados conforme descrito acima. As amostras de urina de 8 (47%) destes indivíduos exibiram níveis elevados de EN-2. Por outro lado, em amostras de urina obtidas de 15 pacientes com suspeita de câncer de próstata, porém nos quais o câncer não foi confirmado subsequentemente, nenhuma (0%) apresentava níveis elevados de EM-2. Cabe observar que 3 dos pacientes diagnosticados com câncer de próstata que exibiam níveis elevados de EN2 em suas amostras de urina, não apresentavam níveis elevados de PSA. Esse dado ilustra que os métodos da invenção são capazes de detectar câncer onde métodos convencionais de detecção não o conseguiram.

Exemplo 8

Detecção da expressão de genes HOX em tecido normal e tumoral.

Extração de RNA: Foi adquirido RNA de tecido adjacente tumoral e normal da Ambion, EUA. RNA de culturas de células foi extraído com o mini Kit RNeasy (Qiagen, Reino Unido).

Síntese de cDNA: O RNA foi inicialmente desnaturado por aquecimento até 65 °C por cinco minutos. 1-5 mg de RNA foram incubados em volume de 50 ml a 37 °C por uma hora com concentrações finais de DTT a 10 mM, dNTPmix a 1 mM, bem como 100 mg/ml de *primers* polyT, 200 unidades de transcriptase reversa (Invitrogen, EUA) e 40 unidades de RNASE-out (Invitrogen, EUA). A reação de síntese de cDNA foi finalizada colocando-se os tubos a 65 °C por cinco minutos.

PCR em tempo real: RT-PCR semiquantitativa foi realizada utilizando a máquina MX4000 da Stratagene MX4000 de PCR em Tempo Real. A máquina MX4000 da Stratagene mede o produto da PCR que se acumula durante a fase exponencial da reação, antes que a amplificação se torne vulnerável à limitação de reagentes e variabilidade dos ciclos. A fluorescência aumenta de acordo com níveis crescentes do produto da PCR. A quantidade relativa de cada transcrito foi determinada em termos de razão com a quantidade do transcrito de Beta-actina em cada amostra.

Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 4 abaixo.

Gene	*Primer forward*	*Primer reverse*
HOXA1	CTGGCCCTGGCTACGTATAA (SEQ ID NO:7)	TCCA-ACTTTCCCTGTTTTGG (SEQ ID NO:8)
HOXA2	TTCAGCAAAATGCCCTCTCT (SEQ ID NO:9)	TAGGCCAGCTCCA-CAGTTCT (SEQ ID NO:10)
HOXA3	ACCTGTGATAGTGGGCTTGG (SEQ ID NO:11)	ATACAGCCATTCCAGCA-ACC (SEQ ID NO:12)
HOXA4	CCCTGGATGAAGAAGATCCA (SEQ ID NO:13)	AATTGGAGGATCG-CATCTTG (SEQ ID NO:14)
HOXA5	CCGGAGAATGAAGTGGAAAA (SEQ ID NO:15)	ACGAGAACAGGGCTTCTT-CA (SEQ ID NO:16)

Gene	*Primer forward*	*Primer reverse*
HOXA6	AAAGCACTCCATGACGAAGG (SEQ ID NO:17)	TCCTTCTCCAGCTC-CAGTGT (SEQ ID NO:18)
HOXA7	TGGTGTAAATCTGGGGGTGT (SEQ ID NO:19)	TCTGATAA-AGGGGGCTGTTG (SEQ ID NO:20)
HOXA9	AATAACCCAGCAGCCAACTG (SEQ ID NO:21)	ATTTT-CATCCTGCGGTTCTG (SEQ ID NO:22)
HO-XA10	ACACTGGAGCTGGAGAAGGA (SEQ ID NO:23)	GATCCGGTTTTCTCGATT-CA (SEQ ID NO:24)
HO-XA11	CGCTGCCCCTATACCAAGTA (SEQ ID NO:25)	GTCAAGGGCAAAATCTG-CAT (SEQ ID NO:26)
HO-XA13	GGATATCAGCCACGACGAAT (SEQ ID NO:27)	ATTATCTGGGCAAAGCA-ACG (SEQ ID NO:28)
HOXD1	TTCAGCACCAAGCAACTGAC (SEQ ID NO:29)	TAGTGGGGGTTGTTCCA-GAG (SEQ ID NO:30)
HOXD3	CAGCCTCCTGGTCTGAACTC (SEQ ID NO:31)	ATCCAGGGGAA-GATCTGCTT (SEQ ID NO:32)
HOXD4	TCAAATGTGCCATAGCAAGC (SEQ ID NO:33)	TCCATAGGGCCCTCC-TACTT (SEQ ID NO:34)
HOXD8	TCAAATGTTTCCGTGGATGA (SEQ ID NO:35)	GCTCTTGGGCTTCCTTTTT C (SEQ ID NO:36)
HOXD9	TCCCCCATGTTTCTGAAAAG (SEQ ID NO:37)	GGGCTCCTCTAAGCCT-CACT (SEQ ID NO:38)
HOXD1 0	GCTCCTTCACCACCAACATT (SEQ ID NO:39)	AAATATCCAGGGACGG-GAAC (SEQ ID NO:40)
HOXD1 1	GGGGCTACGCTCCCTACTAC (SEQ ID NO:41)	GCTGCCTCGTAGA-ACTGGTC (SEQ ID NO:42)
HOXD1 2	CGCTTCCCCCTATCTCCTAC (SEQ ID NO:43)	CTTCGGGCGCATAGAACT-TA (SEQ ID NO:44)
HOXD1 3	GGGGATGTGGCTCTAAATCA (SEQ ID NO:45)	AACCTGGACCACATCAG-GAG (SEQ ID NO:46)

Os resultados são apresentados na Figura 8. Utilizando este método, HOXA3 e HOXD9 foram identificadas como possíveis biomarcadores para câncer de próstata, uma vez que estes genes estão claramente superexpressados em amostras de tecido tumoral.

Sequência ID NO. 5 (polipeptídeo HOXA3)

MQKATYYDSSAIYGGYPYQAANGFAYNANQQPYPASAALGADGE
YHRPACSLQSPSSAGGHPKAHELSEACLRTLSAPPSQPPSLGEPPLHPPPPQAAPPAP
QPPQPAPQPPAPTPAAPPPPSSASPPQNASNNPTPANAAKSPLLNSPTVAKQIFPWMK
ESRQNTKQKTSSSSSGESCAGDKSPPGQASSKRARTAYTSAQLVELEKEFHFNRYLCR
PRRVEMANLLNLTERQIKIWFQNRRMKYKKDQKGKGMLTSSGGQSPSRSPVPPGAGGY
LNSMHSLVNSVPYEPQSPPPFSKPPQGTYGLPPASYPASLPSCAPPPPPQKRYTAAGA
GAGGTPDYDPHAHGLQGNGSYGTPHIQGSPVFVGGSYVEPMSNSGPALFGLTHLPHAA
SGAMDYGGAGPLGSGHHHGPGPGEPHPTYTDLTGHHPSQGRIQEAPKLTHL

Sequência ID NO.6 (Polipeptídeo HOXD9)

MSSSGTLSNYYVDSLIGHEGDEVFAARFGPPGPGAQGRPAGVAD
GPAATAAEFASCSFAPRSAVFSASWSAVPSQPPAAAAMSGLYHPYVPPPPLAASASEP
GRYVRSWMEPLPGFPGGAGGGGGGGGGPGRGPSPGPSGPANGRHYGIKPETRAAPAP
ATAASTTSSSSTSLSSSSKRTECSVARESQGSSGPEFSCNSFLQEKAAAATGGTGPGA
GIGAATGTGGSSEPSACSDHPIPGCSLKEEEKQHSQPQQQQLDPNNPAANWIHARSTR
KKRCPYTKYQTLELEKEFLFNMYLTRDRRYEVARILNLTERQVKIWFQNRRMKMKKMS
KEKCPKGD

Referências

Chatelin, L., Volovitch, M., Joliot, A.H., Perez, F. e 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. e 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. e 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. e 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.

e Prochiantz, A. (1998) *Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein.* Curr. Biol. 8, 856-863.

Kuefer R, Hofer MD, Zorn CS, Engel O, Volkmer BG, Juarez-Brito MA, Eggel M, Gschwend JE, Rubin MA, Day ML. *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. e 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. e Sauvageau, G. (2005) *EN-2 is a candidate oncogene in human breast cancer.* Oncogene 24, 6890-6901.

Miller GJ, Miller HL, van Bokhoven A, Lambert JR, Werahera PN, Schirripa O, Lucia MS, Nordeen SK. *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 EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. *Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer.* Lancet. 2002 Feb 16;359(9306):572-7.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para diagnóstico ou monitoramento da progressão de câncer de próstata, caracterizado pelo fato de que compreende:

i) detecção e/ou quantificação de pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição em uma amostra de urina do referido indivíduo;

ii) comparação do nível do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição presente na amostra de urina com o nível do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição em uma ou mais amostras controle; e

iii) determinação de que o indivíduo está acometido com câncer de próstata ou que o câncer de próstata do indivíduo progrediu se o nível do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição presente na amostra de urina do referido indivíduo está aumentado em relação ao nível na amostra controle;

sendo que o pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é um peptídeo EN-2 compreendendo SEQ ID NO: 4; e

desse modo diagnosticando ou monitorando a progressão do câncer de próstata no referido indivíduo.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que que são providas pelo menos duas etapas de detecção e/ou quantificação, espaçadas por intervalo temporal.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que as pelo menos duas etapas são espaçadas para determinar se os níveis do peptídeo EN-2 mudaram, indicando dessa forma se houve mudança na progressão do câncer, possibilitando serem feitas comparações entre um nível do peptídeo EN-2 em amostras coletadas em duas ou mais ocasiões, em que um aumento no nível do peptídeo EN-2 em relação ao tempo é indicativo do início ou progressão do câncer, em que uma diminuição no nível do peptídeo EN-2, ou fragmento do mesmo, pode indicar melhora e/ou remissão do câncer.

4. Método para diagnóstico de câncer de próstata em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) detecção e/ou quantificação de pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição em uma amostra de urina do referido indivíduo;

(ii) comparação do nível do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição presente na amostra de urina com o nível do pelo menos um homeodmínio contendo o fator de transcrição presente em uma amostra controle de um indivíduo normal sem câncer, e

(iii) determinação de que o indivíduo está acometido com câncer de próstata se o nível do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição presente na amostra de urina do referido indivíduo está aumentado em relação ao nível na amostra controle;

sendo que o homeodomínio contendo o fator de transcrição é um peptídeo EN-2 compreendendo SEQ ID NO: 4, e

desse modo diagnosticando ou monitorando a progressão do câncer de próstata no referido indivíduo.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a significância estatística do aumento é determinada pelo uso de um "teste-t" fornecendo intervalos de confiança de pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,95%, ou pelo menos 99,99%.

6. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o aumento entre a amostra controle e a amostra de urina é em torno de 110-200%, ou em torno de 125%, e é indicativo de câncer de próstata em estágio inicial.

7. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o aumento entre a amostra controle e a amostra de urina é em torno de 550-620%, ou em torno de 560-600%, ou em torno de 570-590%, ou em torno de 580%, e é indicativo de câncer de próstata em estágio tardio.

8. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o aumento entre a amostra controle e a amostra de urina é em

torno de 100% e 300%, ou em torno de 200% e é indicativo de progressão do câncer do estágio inicial para o estágio tardio da doença.

9. Método para monitoramento da eficácia de um tratamento para câncer de próstata, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) detecção e/ou quantificação de pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição presente em duas amostras de urina separadas temporalmente de um indivíduo recebendo o referido tratamento;

(ii) comparação dos níveis do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição nas duas amostras de urina; e

(iii) determinação de que o tratamento é eficaz se uma diminuição temporal no nível do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é encontrado; ou

(iv) determinação de que o tratamento não é eficaz se uma diminuição temporal no nível do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é encontrado;

sendo que o pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é um peptídeo EN-2 compreendendo SEQ ID NO: 4, e

desse modo monitorando a eficácia de um tratamento para câncer de próstata.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4 ou 9, caracterizado pelo fato de que a detecção e/ou quantificação do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é alcançada através de um método selecionado a partir de MALDI-TOF, SELDI, via interação com um ligante ou ligantes, sistemas de análise à base de gel 1-D ou 2-D, Cromatografia Líquida combinada com técnicas de espectrometria de massa, cromatografia em camada delgada e espectroscopia NMR.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4 ou 9, caracterizado pelo fato de que a detecção e/ou quantificação do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é alcançada por um método selecionado a partir de imunoensaios do tipo sanduíche, ensaios imunoenzimáticos (ELISAs), radioimunoensaios (RAI), imunoensaios enzi-

máticos (EIA), *Western Blotting*, imunoprecipitação e imunoensaios à base de partículas, incluindo o uso de partículas de ouro, prata ou látex, partículas magnéticas ou *quantum-dots*.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra de urina é livre de células inteiras ou intactas.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a amostra de urina é de um indivíduo que foi diagnosticado previamente como negativo para câncer usando um ensaio que detecta PSA.

14. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a detecção e/ou quantificação do pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é realizada em placa de microtitulação, em formato de tira, arranjo ou sobre um *chip*.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4 ou 9, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição é detectado direta ou indiretamente via interação com um ligante.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o ligante é selecionado a partir do grupo consistindo em um anticorpo anti-EN-2, um aptâmero, e um oligonucleotídeo.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 9, caracterizado pelo fato de que o controle é retirado de um indivíduo normal.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 9, caracterizado pelo fato de que a amostra de urina e o controle são retirados do mesmo indivíduo, e em que o controle é retirado antes da incidência da doença.

19. Uso *in vitro* de pelo menos um homeodomínio contendo o fator de transcrição como um biomarcador para câncer de próstata, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o homeodomínio contendo o fator de transcrição é o peptídeo EN-2 compreendendo SEQ ID NO: 4, em que o uso compreende detecção da quantidade do homeodomínio contendo o fator de transcrição em urina.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o referido uso é em um método selecionado a partir do grupo

consistindo de: triagem clínica, métodos de avaliação de prognóstico, monitoramento dos resultados da terapia, método para identificar pacientes mais prováveis em responder a um tratamento terapêutico em particular, e triagem e desenvolvimento de fármaco, opcionalmente em que os referidos pacientes foram diagnosticados previamente como negativos para câncer usando um ensaio que detecta PSA.

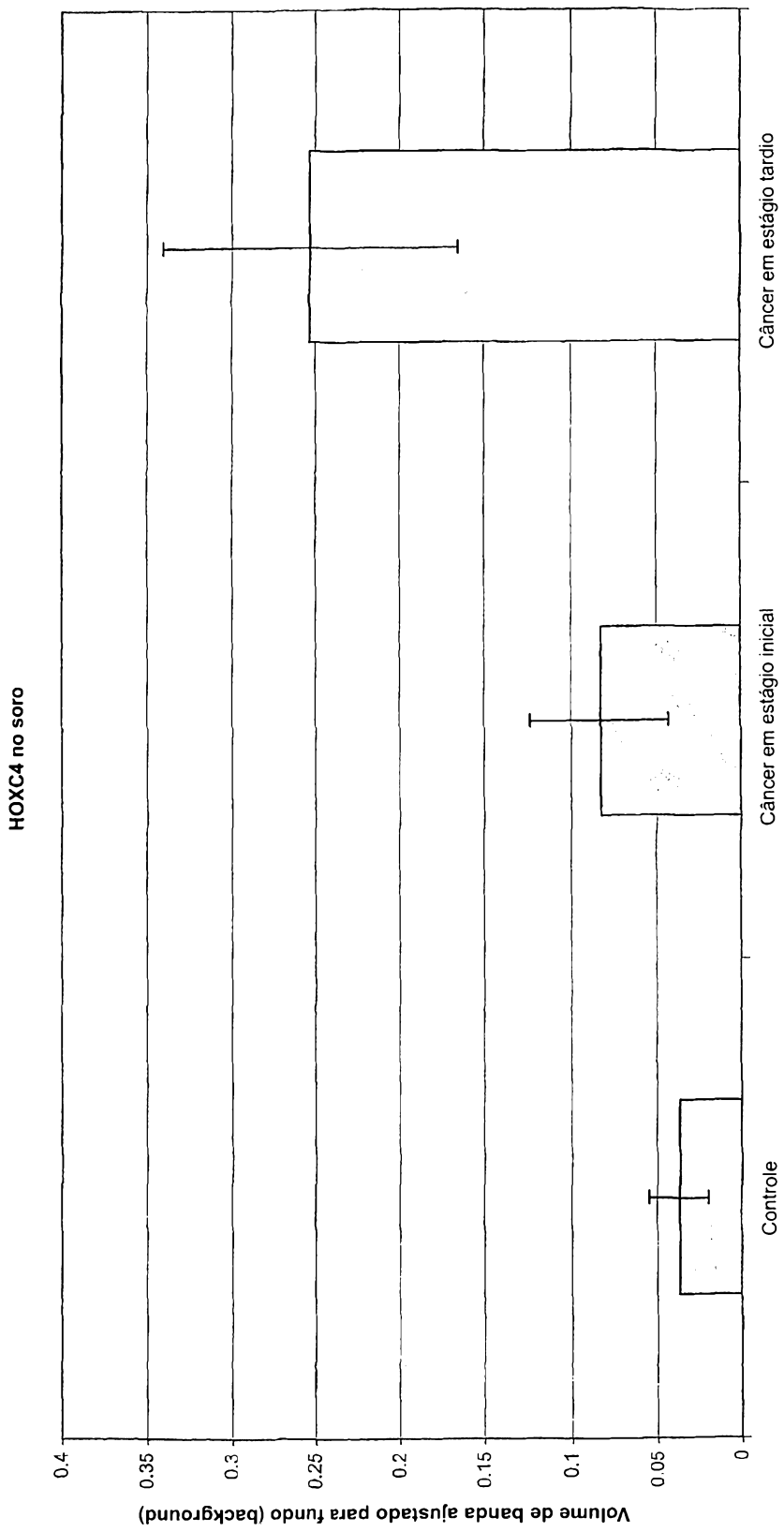

HOXC4 no soro
Volume de banda ajustado para fundo (background)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Controle
Câncer em estágio inicial
Câncer em estágio tardio

Fig. 1

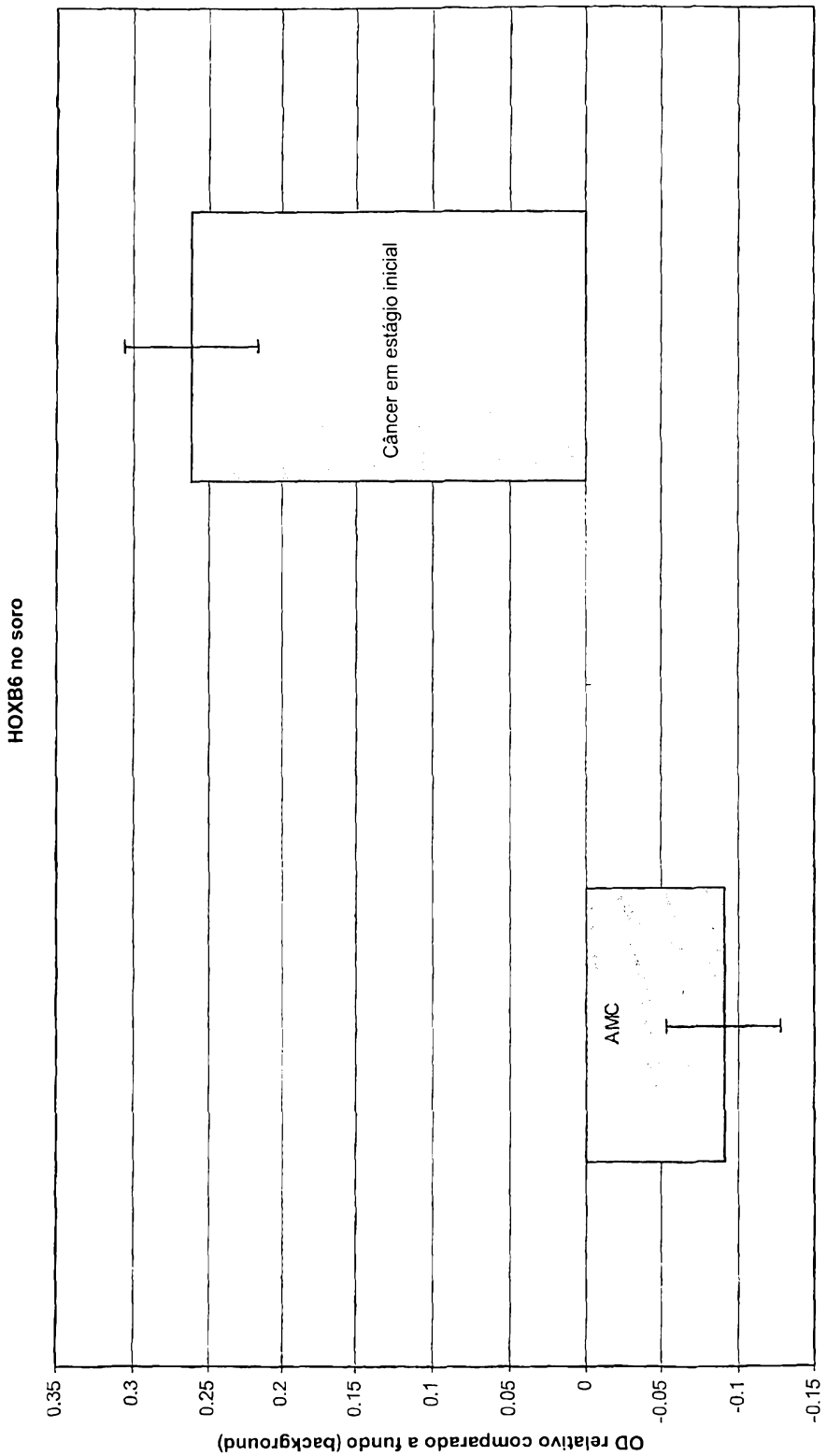
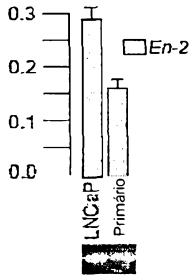

HOXB6 no soro
Câncer em estágio inicial
AMC
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
OD relativo comparado a fundo (background)

Fig. 2



a

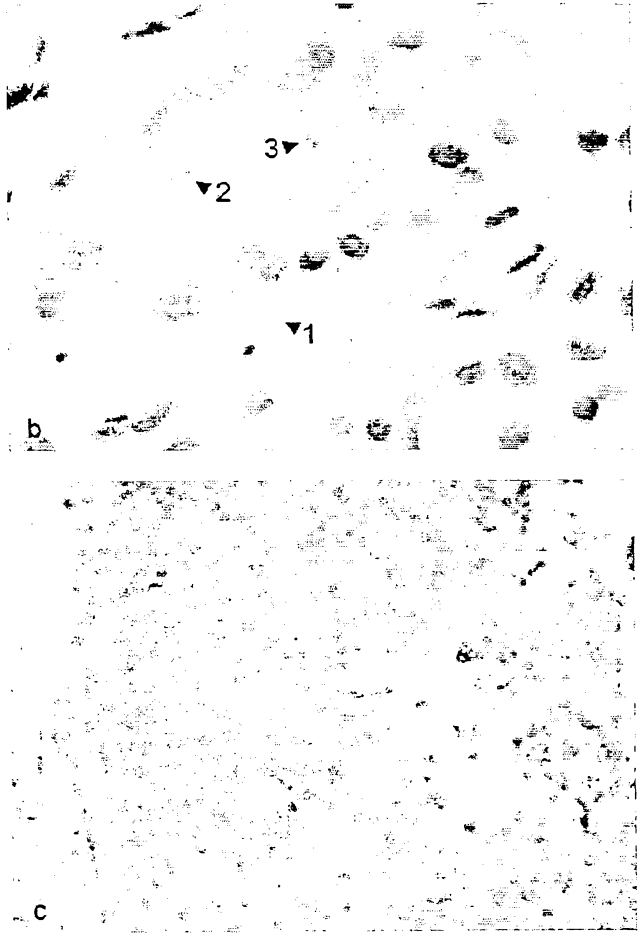


Fig. 3

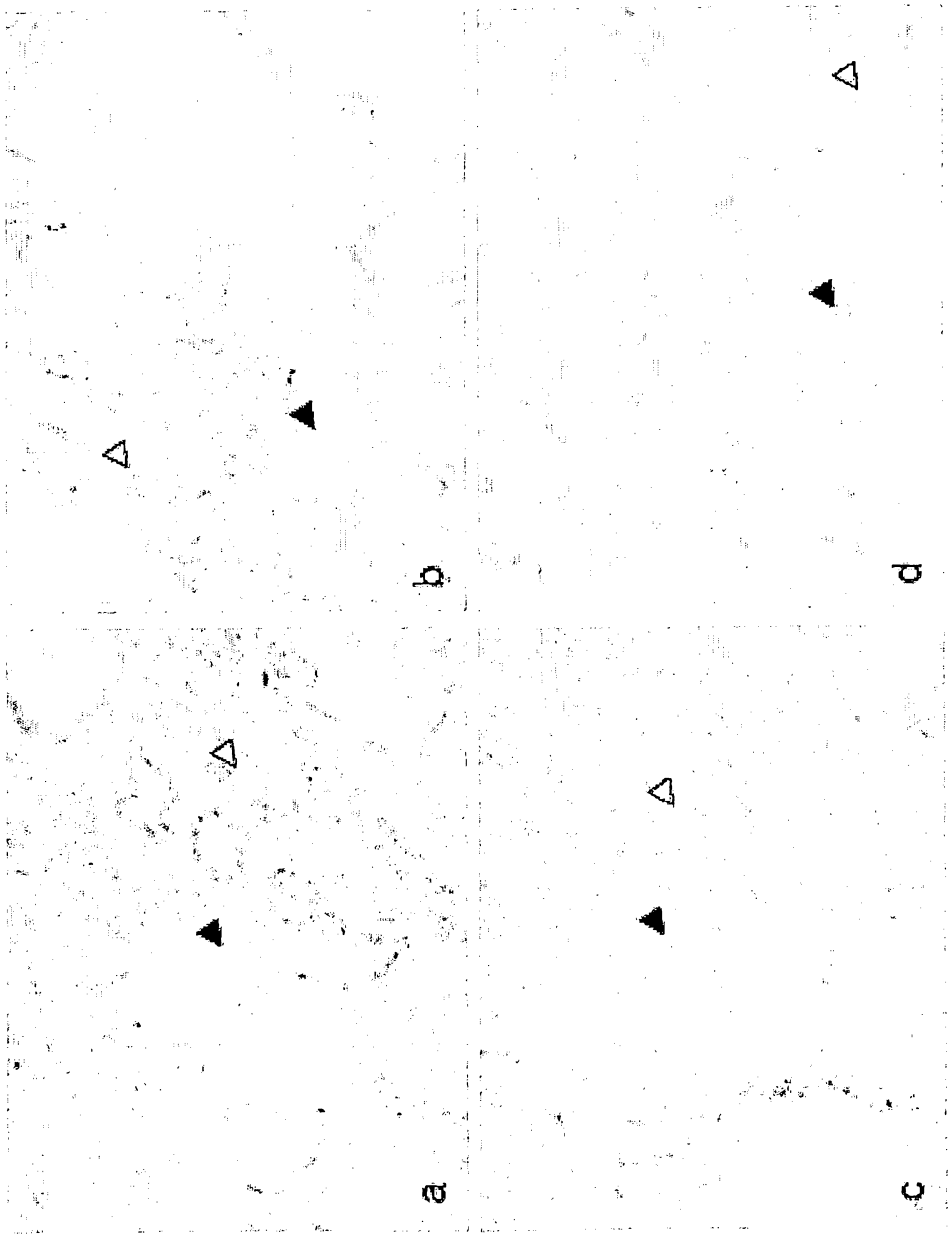


Fig. 4

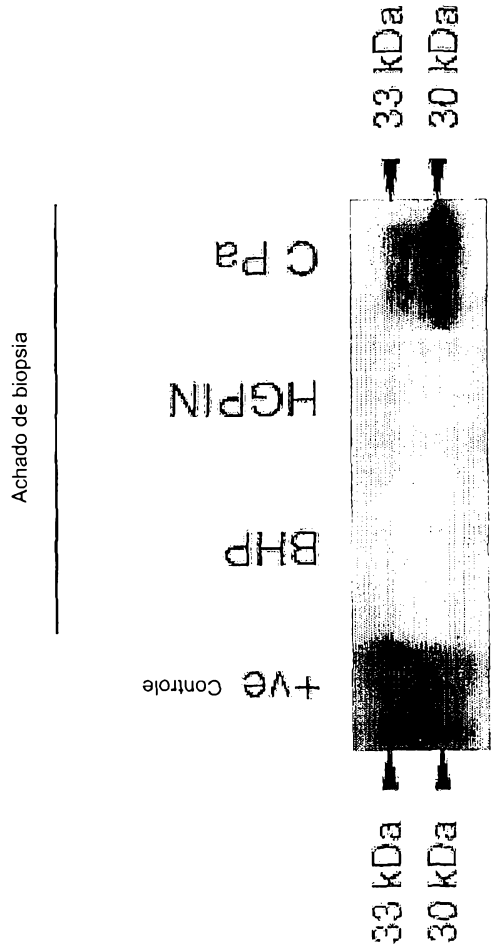

33 kDa
30 kDa
+VE Controle
BHP
HGPIN
C Pa
Achado de biopsia
33 kDa
30 kDa

Fig. 6

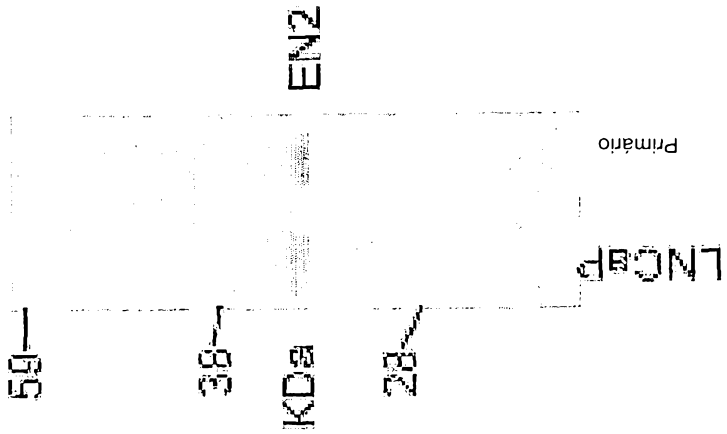

59
38
KDa
28
EN2
LNCaP
Primário

Fig. 5

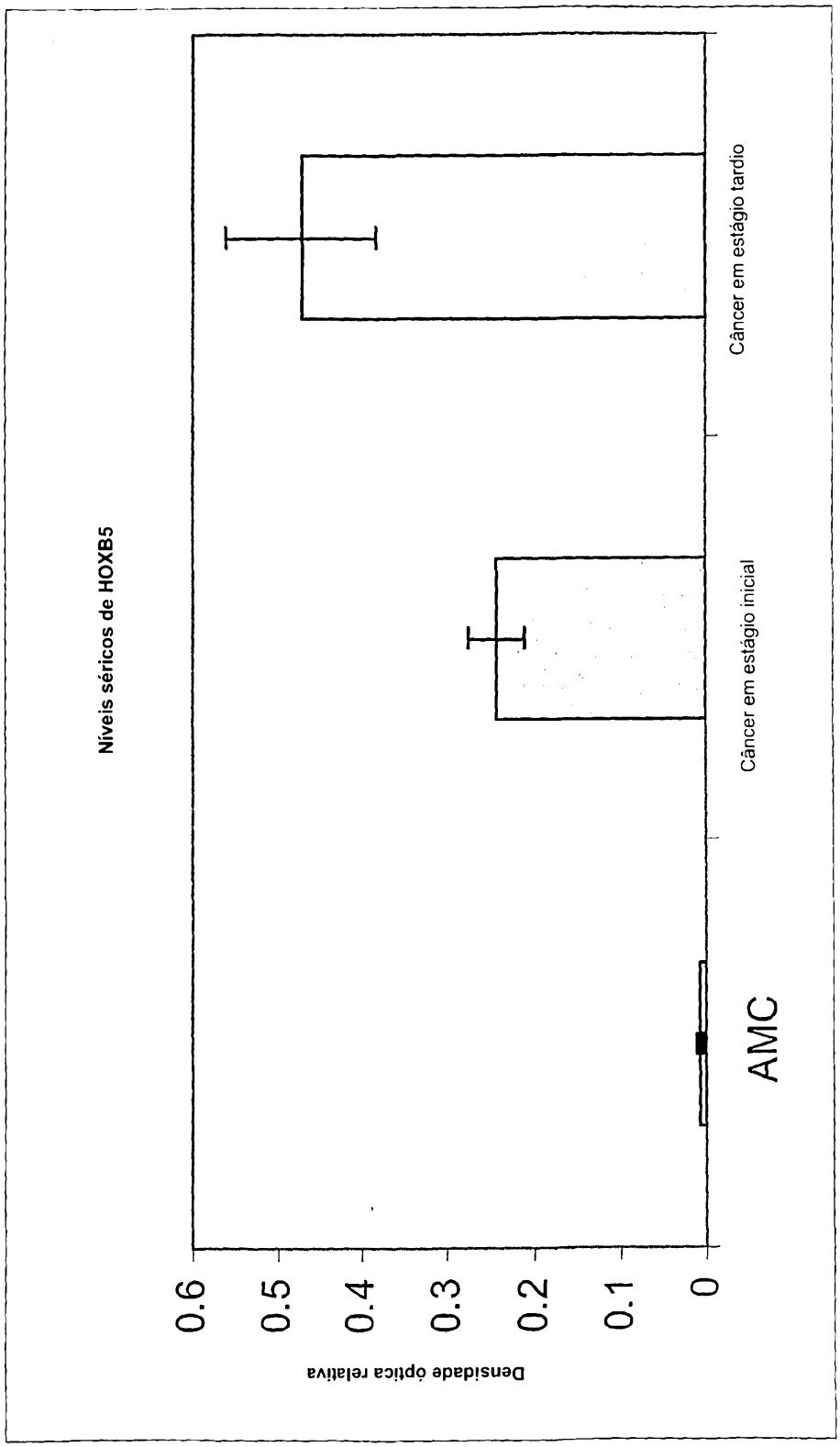
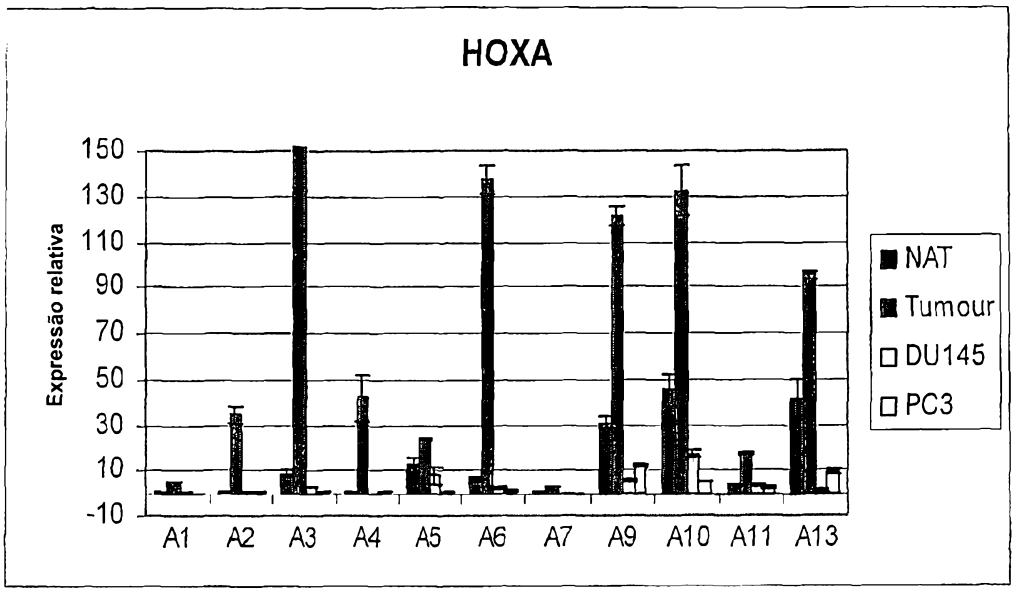
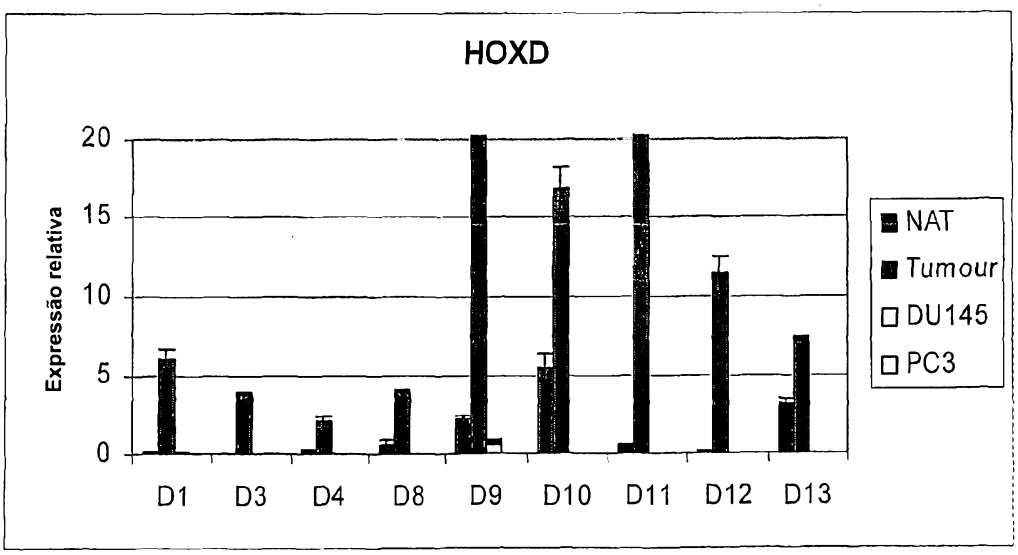

Níveis séricos de HOXB5
Densidade óptica relativa
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
AMC
Câncer em estágio inicial
Câncer em estágio tardio

Fig. 7

Fig. 8


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


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