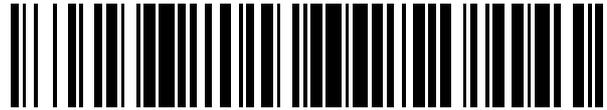


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 994**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2005 E 12150351 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2537942**

54 Título: **Uso de perfiles de expresión génica para predecir la supervivencia en un paciente con cáncer**

30 Prioridad:

21.05.2004 US 573669 P
01.09.2004 US 606319 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2016

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ARKANSAS SYSTEM (100.0%)
2404 North University Avenue
Little Rock, AR 72207-3608, US**

72 Inventor/es:

**SHAUGHNESSY, JOHN;
ZHAN, FENGHUANG y
BARLOGIE, BART**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 555 994 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de perfiles de expresión génica para predecir la supervivencia en un paciente con cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de la investigación del cáncer. Más específicamente, la presente invención se refiere a la creación de perfiles de expresión génica en pacientes con cáncer.

Descripción de la técnica relacionada

10 Un aspecto frustrante de la quimioterapia del cáncer es la variabilidad de la inducción o la duración de la respuesta y la supervivencia a largo plazo impredecibles. Una cantidad significativa de pacientes (aproximadamente el 20%) no obtiene ningún beneficio tangible de la terapia, pero se les sigue sometiendo a la toxicidad de los fármacos, a un riesgo secundario, a una reducción de la calidad de vida y a una demora en un tratamiento que podría haber sido eficaz.

15 El mieloma múltiple es una neoplasia maligna de los linfocitos B que es mortal de forma invariable, que se manifiesta en la etapa de diferenciación de una célula plasmática. Aunque el mieloma múltiple reside inicialmente en la médula ósea, se puede transformar en una enfermedad agresiva con un aumento de la proliferación (que da como resultado una mayor frecuencia de cariotipos anormales en metafase), LDH elevada y manifestaciones extramedulares (Barlogie B. et al., 2001). Además, el curso clínico del mieloma múltiple y su respuesta a una terapia, se ven influenciados por lesiones genéticas moleculares especiales y una interacción entre la célula tumoral-microambiente (Kuehl et al., 2002; Shaughnessy et al., 2003; Hideshima, et al., 2004; Fonseca et al., 2004). Aunque se puede obtener una respuesta completa en más del 40% de los pacientes con terapia de dosis elevada, la supervivencia puede variar desde unos pocos meses a más de quince años (Attal et al., 2003; Barlogie et al., 2004). Por otra parte, una enfermedad de alto riesgo se reconoce mejor mediante una citogenética anormal en metafase, presente en el 30% y el 50% (DeWald et al., 1985; Smadja et al., 2001; Shaughnessy et al., 2003) de los pacientes recién diagnosticados y que refleja una mayor capacidad proliferativa y una independencia de las células estromales del clon maligno. Sin embargo, los cariotipos de mieloma múltiple son notoriamente complejos y tienen hasta la fecha una resistencia a la clasificación citogenética. Sin embargo, un análisis correlativo integral de múltiples cariotipos de mieloma con la supervivencia del paciente, procedentes de múltiples laboratorios, revela ahora que las formas de la enfermedad hiperdiploides, no hiperdiploides, positivas para la delección del cromosoma 13, t(4;14)(p16;q32) y t(11;14)(q13;q32), probablemente representan subclases únicas con una evolución clínica divergente.

20 Aunque la presencia de un cariotipo anormal se ha convertido en la variable aislada más importante para el pronóstico en la predicción de la evolución en pacientes que reciben dosis altas de quimioterapia y trasplantes de células madre en tándem, esta variable, en combinación con otros parámetros clínicos históricamente relevantes, por ejemplo, seroalbúmina, b2M y lactato deshidrogenasa, representan no más del 30% de la variabilidad en la evolución en esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad de algoritmos de estratificación del riesgo más potentes para esta enfermedad.

35 El mieloma múltiple se caracteriza por cariotipos complejos e inestabilidad del cromosoma 1 a nivel citogenético. La inestabilidad del cromosoma 1 implica generalmente duplicaciones parciales, translocaciones de todo el brazo o translocaciones por salto de 1q identificadas por bandas G. Esta inestabilidad se ha caracterizado además recientemente usando una combinación de cariotipado espectral e hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con sondas para *satIII/III* (1q12), *BCL9* (1q21) e *IL6R* (1q21) en los cariotipos de 44 pacientes con aberraciones 1q conocidas (Sawyer et al., 2004). En ocho pacientes se produjo una duplicación segmentaria de 1q12-21 y de bandas adyacentes en cromosomas no homólogos. En cinco casos, 1q primero saltó a un cromosoma no homólogo, después de lo cual el segmento 1q12-21 se duplicó de nuevo posteriormente de una a tres veces. En tres casos adicionales, se produjeron duplicaciones segmentarias después de que el primer 1q saltara a un cromosoma no homólogo y se duplicara después el segmento del cromosoma no homólogo proximal adyacente, antes de saltar o insertarse en una nueva posición. Estos casos demuestran que las secuencias de ADN de *satIII/III* no solo están asociadas con la duplicación de segmentos cromosómicos distales adyacentes después de la translocación, sino que también están asociadas con la duplicación y el salto/inserción de segmentos cromosómicos no homólogos proximales (Sawyer et al., 2004).

40 En la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B y muchas otras neoplasias avanzadas, copias adicionales de 1q pueden conferir una ventaja proliferativa a las células tumorales. En la actualidad, no se conoce la(s) diana(s) molecular(es) principal(es) de la amplificación y el salto de 1q21 en 1q en el mieloma y en muchos otros tipos de cáncer. La técnica anterior por tanto no puede proporcionar un(os) marcador(es) del cromosoma 1 o un(os) marcador(es) del cromosoma 13, útil para la estadificación inicial, así como para un seguimiento de la enfermedad mieloma múltiple y otros tipos de cáncer. La presente invención satisface esta necesidad y deseo persistentes en la técnica.

Compendio de la invención

55 La creación de perfiles de expresión génica globales ha surgido como una herramienta poderosa para la

clasificación de subtipos de enfermedades y el desarrollo de modelos de pronóstico potentes en la leucemia y el linfoma (Shipp et al., 2002; Yeoh et al., 2002; Rosenwald et al., 2002; Bullinger et al., 2004; Valk et al., 2004). Estudios con micromatrices en mieloma también han proporcionado una información clave sobre su biología y comportamiento clínico (Zhan et al., 2002; De Vos et al., 2002; Claudio et al., 2003; Tian et al., 2003).

5 En la presente invención, se examinaron perfiles de expresión génica de células plasmáticas malignas en un esfuerzo para identificar las firmas moleculares del fracaso temprano de un tratamiento, después de una quimioterapia de dosis elevada y un trasplante de células madre autólogas de la sangre periférica. Los resultados descritos en este documento revelan una firma clara de expresión génica que presagia una forma muy agresiva de mieloma múltiple. Los marcadores identificados en el presente documento son útiles para la estadificación inicial y el
10 seguimiento de la enfermedad para predecir una recaída del mieloma múltiple y de otros tipos de cáncer. Además, estos genes predictivos, sus productos proteicos y las vías biológicas en las que actúan representan posibles puntos para una intervención terapéutica contra el mieloma múltiple y otros tipos de cáncer.

La presente invención proporciona un método para determinar el pronóstico de un paciente con mieloma múltiple, que comprende determinar el nivel de expresión génica de GNG10, PNPLA4, KIAA1754, AHCYL1, MCLC, EVI5, AD-020, PARG1, CTBS, FUCA1, RFP2, FLJ20489, LTBP1, TRIP13, AIM2, SELI, SLC19A1, LARS2, OPN3, ASPM, CCT2, UBE21, STK6, FLJ13052, FLJ12525, BIRC5, CKS1B, CKAP1, MGC57827, DKFZp7790175, PFN1, ILF3, IF116, TBRG4, PAPD1, EIF2C2, MGC4308, ENO1, DSG2, EXOSC4, TAGLN2, RUVBL1, ALDOA, CPSF3, MGC15606, LGALS1, RAD18, SNX5, PSMD4, RAN, KIF14, CBX3, TMPO, DKFZP586L0724, WEE1, ROBO1, TCOF1, YWHAZ y MPHOSPH1 en células plasmáticas aisladas a partir del sujeto, y comparar los niveles de
15 expresión con uno o varios controles adecuados y determinar si el paciente tiene un pronóstico malo basándose en la comparación, en donde una expresión reducida de GNG10, PNPLA4, KIAA1754, AHCYL1, MCLC, EVI5, AD-020, PARG1, CTBS, FUCA1, RFP2, FLJ20489 o LTBP1, respecto a un control con un pronóstico favorable; y la hiperexpresión de al menos uno entre OPN3, ASPM o CKS1B opcionalmente con hiperexpresión de TRIP13, AIM2, SELI, SLC19A1, LARS2, CCT2, UBE21, STK6, FLJ13052, FLJ12525, BIRC5, CKAP1, MGC57827, DKFZp7790175, PFN1, ILF3, IF116, TBRG4, PAPD1, EIF2C2, MGC4308, ENO1, DSG2, EXOSC4, TAGLN2, RUVBL1, ALDOA, CPSF3, MGC15606, LGALS1, RAD18, SNX5, PSMD4, RAN, KIF14, CBX3, TMPO, DKFZP586L0724, WEE1, ROBO1, TCOF1, YWHAZ o MPHOSPH1, respecto a un control con un pronóstico favorable, se asocia con un
20 pronóstico malo.

Otros aspectos y aspectos, características y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones actualmente preferidas de la invención. Estas realizaciones se proporcionan con el fin de describir.

Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A-B** muestran un análisis de la curva de supervivencia de Kaplan Meier de la supervivencia exenta de eventos (Figura 1B) y de la supervivencia global (Figura 1A) en relación con los niveles de expresión de *CSK1B*. Las muestras de los pacientes se agruparon en cuartiles basados en los niveles de expresión génica. Q1 era el cuartil más bajo y Q4 era el más alto. Hay que tener en cuenta la relación significativa entre Q4 y pronóstico malo.

La **Figura 2** muestra el análisis de la supervivencia global en pacientes con más de 1,5 años de seguimiento. Las muestras de los pacientes se agruparon en cuartiles basados en los niveles de expresión génica. Q1 era el cuartil más bajo y Q4 era el más alto. Hay que tener en cuenta la relación significativa entre un pronóstico malo y una expresión elevada de *ASPM*, *OPN3* y *CSK1B* (panel superior). El poder de predicción de la supervivencia se incrementó agrupando dos o más de los tres genes en el análisis (panel inferior).

La **Figura 3A** muestra que *ASPM*, *OPN3* y *CSK1B* también pueden predecir una supervivencia exenta de eventos. La **Figura 3B** muestra que la agrupación de dos o más de los genes *ASPM*, *OPN3* y *CSK1B* aumenta el poder de predicción de una supervivencia exenta de eventos.

La **Figura 4** muestra que un incremento de la expresión de *CSK1B* y del número de copias estaba asociado con una recaída.

Las **Figuras 5A-B** muestran que la expresión de *CSK1B* en células plasmáticas de mieloma varía y que niveles de expresión elevados de *CSK1B* definen una entidad de mieloma de alto riesgo. La **Figura 5A** muestra diagramas de cajas de la señal de Affymetrix transformada en logaritmo en base 2 (eje y) entre 351 casos, de acuerdo con los niveles de expresión del cuartil (eje x). La **Figura 5B** muestra que los gráficos de Kaplan-Meier de la supervivencia global revelan una evolución peor entre los 88 pacientes con niveles de expresión de *CSK1B* en el 4º cuartil, en comparación con los 263 pacientes restantes con niveles de expresión en los cuartiles 1-3.

Las **Figuras 6A-D** muestran que el aumento de la expresión de *CSK1B* se relaciona con el aumento del número de copias del ADN de *CSK1B* y el grado de amplificación del ADN está ligado a una mala supervivencia. La **Figura 6A** muestra un análisis de hibridación *in situ* fluorescente en metafase de *CSK1B* en 1q21 (señal roja) y *ASPM* en 1q31 (señal verde), realizado en células plasmáticas de un paciente con mieloma. Ténganse en cuenta las flechas que apuntan a las duplicaciones en tándem de *CSK1B* y su mayor prevalencia en relación con 1q31. La **Figura 6B** muestra el gráfico de cajas de la señal de Affymetrix transformada en logaritmo en base 2 (eje y) mediante

amplificación de *CSK1B* (N = 197). En los diagramas de cajas, las líneas de arriba, abajo y medias se correspondían a los percentiles 75°, 25° y 50°, respectivamente, y los bigotes se extendían hasta el punto más cercano no más allá de 1,5 veces el rango intercuartil, en donde las observaciones más allá de éstos se indicaban con líneas individuales. Se utilizó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para comparar la Señal a través de categorías de números de copias. La **Figura 6C** muestra que un gráfico de Kaplan-Meier de la supervivencia global en la cohorte de validación describe evoluciones peores entre los 89 pacientes con amplificación de *CSK1B*, en comparación con los restantes 135, según lo determinado mediante hibridación *in situ* fluorescente de la interfase. La **Figura 6D** muestra el gráfico de Kaplan-Meier, como en 6C, para la muestra combinada de 421 pacientes.

La **Figura 7** muestra que la expresión de *CSK1B* aumenta en un mieloma con recaída. Señal de *CSK1B* para 32 matrices emparejadas de diagnóstico y recaída. La línea de referencia del cuartil 4 fue tomada a partir de la muestra completa (n = 351) de matrices en el momento del diagnóstico. Téngase en cuenta que una mayoría de las muestras mostraba una mayor expresión en la recaída; los cambios más dramáticos se observaron en pacientes con niveles de expresión en el cuartil 1-3 en el momento del diagnóstico. Se utilizó una prueba t pareada modificada por Welch para comparar la Señal a escala logarítmica en el momento del diagnóstico y la recaída.

Las **Figuras 8A-E** muestran que el ARNm de *CSK1B* se correlaciona con los niveles de proteína nuclear y se correlaciona inversamente con CDKN1B, y el ARNs de *CKS1B* puede aumentar los niveles de p27 y reducir la proliferación celular. La **Figura 8A** muestra la señal de la expresión génica de *CSK1B* y la **Figura 8B** muestra la de *CDKN1B* (CDKN1B) en incrementos de 1000 unidades que se representa en el eje y. Los mielomas primarios con expresión de *CSK1B* en cuartil 1 (n = 13) y el cuartil 4 (n = 14) y las líneas celulares de mieloma (n = 7) se agruparon y se representaron de izquierda a derecha a lo largo del eje x. Cada barra representaba una muestra y la altura indicaba el nivel de expresión génica en la muestra. Se empleó un análisis con transferencia Western de extractos de proteínas nucleares para *CKS1B* (**figura 8C**), fosfo-thr-187-CDKN1B (**figura 8D**) e histona 1A (carga de control; **figura 8E**) procedentes de partes alícuotas de las mismas células plasmáticas utilizadas en 8A y 8B. Las muestras se ordenaron de izquierda a derecha directamente con el mismo orden en todos los paneles.

Descripción detallada de la invención

La variabilidad en la supervivencia entre los pacientes con mieloma puede oscilar desde un mes a más de 15 años. Los pacientes con mayor riesgo se identifican mejor por la presencia o ausencia de un cariotipo anormal. Sin embargo, esta prueba solo representa el ~15% de la variabilidad en la evolución. Por lo tanto, muchos pacientes que no presentan anomalías citogenéticas, experimentan recaídas rápidas y/o una muerte temprana. Para definir mejor una enfermedad de alto riesgo e identificar potencialmente mecanismos genéticos que dan lugar a esta mala supervivencia, se analizaron patrones de expresión génica en células plasmáticas recién aisladas de 40 pacientes recién diagnosticados con mieloma, los cuales fueron tratados a continuación con trasplantes de células madre en tándem. Los pacientes se separaron en dos grupos de 20 cada uno. Los del grupo de "supervivencia corta" murieron todos en un plazo de 900 días a partir del inicio de la terapia. Los pacientes del grupo de "supervivencia larga" sobrevivieron más de 1.453 días. El ARN procedente de las células plasmáticas se marcó y se hibridó con micromatrices U133Plus2.0. El valor de la expresión se transformó en logaritmo en base 2 y cada muestra se normalizó para proporcionar una media de 0 y una varianza de 1. Los análisis de Chi-cuadrado y las pruebas t se utilizaron para identificar genes cuyos patrones de expresión eran exclusivos de cada grupo.

Un total de 1770 grupos de sondas se expresaban significativamente de forma diferencial entre los dos grupos ($P < 0,05$). Un total de 1.025 (58%) de los grupos de sondas eran elevados en el grupo de supervivencia corta. Una abrumadora mayoría, 290 de los 1.770 genes (19%), se cartografiaron en el cromosoma 1. De los 1.770 grupos de sondas, 84 que mostraban una diferencia más de 2 veces superior en la expresión, se analizaron adicionalmente con análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. En esta prueba, 17 genes eran altamente significativos ($P < 0,0001$) (Tabla 1). De los 17 genes identificados, 10 (59%) se cartografiaron en el cromosoma 1. De estos 10 genes, los 4 genes del brazo p estaban infrarregulados, mientras que los 6 genes del brazo q estaban hiperregulados en el grupo de supervivencia corta.

Se ha demostrado previamente que el salto de 1q y la amplificación de los genes de 1q21 representan lesiones genéticas comunes en el mieloma. El análisis con hibridación *in situ* fluorescente de *BCL9* e *IL-6R* ha mostrado que estos genes pueden definir un amplicón 1q21. Sin embargo, *BCL9* e *IL-6R* no estaban relacionados con la evolución de la enfermedad. La presente invención ha descubierto que *CKS1B*, que se encuentra muy cerca del amplicón 1q21, se hiperexpresa en los mielomas y está altamente correlacionado con la supervivencia global (Figura 1A) y la supervivencia exenta de eventos (Figura 1B). *CKS1B* es una proteína conservada evolutivamente que interacciona genética y físicamente con cinasas dependientes de ciclina y promueve la mitosis. Se empleó una RT-PCR cuantitativa para confirmar los resultados para este gen de las micromatrices. Dado el papel importante de *CKS1B* en el control de la mitosis, la hiperexpresión de *CKS1B*, posiblemente como resultado de una amplificación génica, puede conferir un fenotipo altamente agresivo a las células plasmáticas malignas.

Utilizando estudios correlativos de micromatrices con 350 casos recién diagnosticados con una supervivencia global mayor o menor de 2 años desde el inicio de la terapia, se encontró que la expresión elevada de genes del cromosoma 1q era una característica evidente de muerte temprana. Con el uso de modelos estadísticos, en el presente documento se da a conocer un modelo de tres genes que podría reconocer >80% de todas las muertes

tempranas. Estos tres genes están todos ellos cartografiados en el cromosoma 1. Los genes de 1q desde los telómeros hasta el centrómero son: *OPN3* (1q43), *ASPM* (1q31.3) y *CKS1B* (1q21). La posición en el mapa cromosómico de *CKS1B*, telomérica en solamente 200 Kb de *IL6R*, sugiere que este gen es la diana de la amplificación de 1q21 en el mieloma. Además, dada la amplificación frecuente de 1q en muchos cánceres, es posible que *CKS1B*, solo o junto con los otros dos genes identificados anteriormente, pueda ser un marcador/diana ubicuo para el cáncer en general.

CKS1B y control del ciclo celular

CKS1B se definió originalmente por su capacidad para unirse a complejos CDK/ciclina. *CKS1B* es una proteína altamente conservada de 79 aminoácidos que tiene dos homólogos en eucariotas superiores. Los ortólogos humanos se pueden sustituir funcionalmente por *CKS1* en la levadura. La mayor información genética y bioquímica de un papel mitótico de las proteínas CKS. La pérdida de la función de *CKS1* da como resultado una detención de la fase M con cromosomas condensados pero no segregados, un huso extendido y niveles elevados de actividad cinasa Cdc2/ciclina B. *CKS1* también tiene una función G1. El inmunoagotamiento del ortólogo de *CKS1*, *Xep9*, procedente de extractos de óvulos en interfase, impedía la entrada en mitosis, mientras que el agotamiento de extractos mitóticos conducía a una detención de la fase M con niveles elevados de ciclina B y actividad cinasa CDK1/ciclina B. Estos datos sugieren que las proteínas CKS pueden ser necesarias tanto para la entrada como para la progresión de la mitosis.

La síntesis de ADN está mediada por la acción del complejo ciclina E/CDK2, que a su vez está regulado negativamente por el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina CDKN1B (Sherr y Roberts, 1999). La pequeña proteína *CKS1* conservada evolutivamente es necesaria para la ubiquitinación mediada por SCF^{Skp2} y la degradación proteasómica del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina, CDKN1B (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001). La degradación de CDKN1B no solo permite la replicación del ADN, sino que también asegura la progresión correcta de las células a través de la fase S en la mitosis (Nakayama et al., 2004) y las proteínas Cks interaccionan con el proteasoma para controlar la proteólisis de las ciclinas mitóticas, por medio de una regulación de la actividad transcripcional de *CDC20* (Morris et al., 2003), una subunidad reguladora de la ubiquitina ligasa del complejo que favorece la anafase/ciclosoma (Peters, 2002). Por lo tanto, *CKS1* y el eje SCF^{Skp2}-CDKN1B-Cdk1/2 parecen ser importantes tanto para la síntesis de ADN y como para la mitosis (Pagano, 2004). Los bajos niveles de proteína CDKN1B en las células cancerosas, en ausencia de mutaciones génicas, ha llevado a la especulación de que la hiperactivación de *CKS1B* y/o *SKP2*, puede explicar los bajos niveles de CDKN1B (Slingerland y Pagano, 2000). Por otra parte, *CKS1B* también regula la transición de G2 a M mediante el control de la degradación de la ciclina B por APC.

CKS1B y cáncer

Los resultados descritos a continuación identifican que *CKS1B* está ubicado en 1q21 como un gen potente candidato para conferir un pronóstico malo en pacientes que reciben trasplantes de células madre en tándem para su mieloma. El análisis de una hibridación *in situ* fluorescente confirmó una expresión elevada de *CKS1B*; por lo tanto, la supervivencia estaba directamente relacionada con la actividad de transcripción del gen *CKS1B* y el número de copias en pacientes recién diagnosticados. Ha habido una sugerencia de que la terapia previa y una latencia larga dan como resultado un evento de amplificación. Pacientes jóvenes (<50 años) son más propensos a presentar *CKS1B* elevado que los pacientes ancianos (>60 años). Los datos de 20 pacientes con muestras del valor inicial y de la recaída mostraron que la amplificación del gen *CKS1B* y un aumento de la expresión se incrementaban en pacientes que tenían valores iniciales normales. Estos datos sugieren que la amplificación de *CKS1B* puede estar presente en el momento del diagnóstico y estar relacionada con una mala supervivencia y se puede amplificar durante el curso de una recaída fulminante.

Aberraciones cromosómicas numéricas primarias observadas en múltiples cariotipos de mieloma, evolucionan aparentemente durante un periodo prolongado de tiempo, ya que la enfermedad permanece como un fenómeno subclínico (MGUS). En estadios posteriores de mieloma múltiple progresivo, se lleva a cabo la evolución citogenética, lo que da como resultado la adquisición de anomalías adicionales que, por lo general, implican al cromosoma 1. La trisomía del cromosoma 1 se observa en el 40% de los cariotipos de mieloma, y la trisomía del brazo largo del cromosoma 1q es común en muchos tipos de cáncer, como la leucemia y los linfomas. El 1q duplicado podría ser una mutación secundaria asociada con la progresión de la enfermedad. La trisomía de 1q también se ha relacionado con un potencial metastásico de carcinomas de colon y de células renales.

Este es el primer informe que indica que el gen *CKS1B* puede ser un oncogén, y que este oncogén tiene un papel en la adquisición de resistencia a los fármacos y la muerte rápida en el mieloma. La frecuencia de este defecto genético en el mieloma y en otros tipos de cáncer, como la leucemia, los linfomas, el cáncer de mama, el cáncer de colon y el cáncer de próstata, sugiere que la amplificación de *CKS1B* es un mecanismo frecuente por el que se desarrollan tumores altamente proliferativos y una enfermedad resistente a múltiples fármacos. El desarrollo de inhibidores de moléculas pequeñas de *CKS1B* puede ser una estrategia terapéutica futura y *CKS1B* podría ser un marcador de gran alcance para el estadio inicial y el seguimiento de la enfermedad, para predecir una recaída inminente mediante la detección de una amplificación de *CKS1B* con técnicas tales como la creación de perfiles de expresión génica, la hibridación *in situ* fluorescente o la inmunohistoquímica. Además de la hiperexpresión de un gen, la reducción de la

expresión del gen RFP2 en el cromosoma 13q14 ya sea sola o en combinación con la hiperexpresión del gen CKS1B, puede tener un papel significativo en el diagnóstico del mieloma múltiple.

En una realización de la presente invención, se proporciona un método para determinar el pronóstico de un paciente con mieloma múltiple, que comprende las etapas de: obtener células plasmáticas de dicho paciente, determinar la expresión génica de uno o varios genes del grupo que consiste en *GNG10*, *PNPLA4*, *KIAA1754*, *AHCYL1*, *MCLC*, *EV15*, *AD-020*, *PARG1*, *CTBS*, *FUCA1*, *RFP2*, *FLJ20489*, *LTBP1*, *TRIP13*, *AIM2*, *SELI*, *SLC19A1*, *LARS2*, *OPN3*, *ASPM*, *CCT2*, *UBE2I*, *STK6*, *FLJ13052*, *FLJ12525*, *BIRC5*, *CKS1B*, *CKAP1*, *MGC57827*, *DKFZp7790175*, *PFN1*, *ILF3*, *IFI16*, *TBRG4*, *PAPD1*, *EIF2C2*, *MGC4308*, *ENO1*, *DSG2*, *EXOSC4*, *TAGLN2*, *RUVBL1*, *ALDOA*, *CPSF3*, *MGC15606*, *LGALS1*, *RAD18*, *SNX5*, *PSMD4*, *RAN*, *KIF14*, *CBX3*, *TMPO*, *DKFZP586L0724*, *WEE1*, *ROBO1*, *TCOF1*, *YWHAZ*, *MPHOSPH1* en la célula plasmática, y comparar el nivel de expresión del (de los) gen(es) con el nivel de expresión del gen en un individuo de control, en donde una expresión reducida, una hiperexpresión de un gen o una combinación de ambas, en comparación con los niveles de expresión génica en células plasmáticas de un individuo de control, indica que el paciente tendrá un pronóstico malo.

Un paciente que tiene un pronóstico malo es el que tiene riesgo de desarrollar una forma agresiva de la enfermedad, padecer una recaída o tener una esperanza de vida más corta. En concreto, la reducción de la expresión de un gen, la hiperexpresión de un gen o una combinación de ambas en un paciente después del tratamiento, predice el riesgo de recaída en el paciente después del tratamiento. Ejemplos de un tratamiento que un paciente de este tipo habría padecido es la quimioterapia en dosis elevada y el trasplante de células madre autólogas de la sangre periférica. Ejemplos de los genes con una expresión reducida, aunque no limitados a los mismos, incluyen *GNG10*, *PNPLA4*, *KIAA1754*, *AHCYL1*, *MCLC*, *EV15*, *AD-020*, *PARG1*, *CTBS*, *FUCA1*, *RFP2*, *FLJ20489* o *LTBP1*. Además, ejemplos de los genes que se hiperexpresan, aunque no se limitan a los mismos, incluyen *TRIP13*, *AIM2*, *SELI*, *SLC19A1*, *LARS2*, *OPN3*, *ASPM*, *CCT2*, *UBE2I*, *STK6*, *FLJ13052*, *FLJ12525*, *BIRC5*, *CKS1B*, *CKAP1*, *MGC57827*, *DKFZp7790175*, *PFN1*, *ILF3*, *IFI16*, *TBRG4*, *PAPD1*, *EIF2C2*, *MGC4308*, *ENO1*, *DSG2*, *EXOSC4*, *TAGLN2*, *RUVBL1*, *ALDOA*, *CPSF3*, *MGC15606*, *LGALS1*, *RAD18*, *SNX5*, *PSMD4*, *RAN*, *KIF14*, *CBX3*, *TMPO*, *DKFZP586L0724*, *WEE1*, *ROBO1*, *TCOF1*, *YWHAZ* o *MPHOSPH1*. Específicamente, el gen que se hiperexpresa es el gen CKS1B y el gen con una expresión reducida es el gen RFP2. Adicionalmente, el individuo de control es un individuo sano, normal o un individuo diagnosticado con mieloma múltiple que carece de una hiperexpresión del gen, una reducción de la expresión del gen o una combinación de las mismas. Además, la expresión génica se puede determinar mediante micromatrices de ADN o RT-PCR.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un método para determinar el pronóstico de un paciente con mieloma múltiple, que comprende las etapas de: obtener células plasmáticas a partir del paciente y determinar el número de copias de uno o varios genes descritos anteriormente, en donde una disminución del número de copias, un aumento del número de copias o una combinación de los mismos en comparación con el número de copias en una célula plasmática de un individuo de control, indica que el paciente tendría un pronóstico malo. Como se ha descrito anteriormente, una disminución del número de copias, un aumento del número de copias del gen o una combinación de los mismos en un paciente después del tratamiento, predice el riesgo de recaída después del tratamiento. El tipo de tratamiento es el mismo que se ha descrito anteriormente.

Además, ejemplos de los genes con una disminución del número de copias son iguales que los genes con una expresión reducida, mientras que los ejemplos del gen con un mayor número de copias son iguales que los genes con hiperexpresión. Además, un gen preferido con un número de copias incrementado es el gen CKS1B y un gen preferido con un número de copias reducido es el gen RFP2. El individuo de control en este método es un individuo sano normal o un individuo diagnosticado con mieloma múltiple que carece de una disminución del número de copias, de un aumento del número de copias del gen o de una combinación de los mismos. Además, el número de copias del gen se determina mediante hibridación *in situ* fluorescente. En una realización adicional relacionada de la presente invención, es un kit que comprende; sonda(s) específica(s) para uno o varios de los genes que se han descrito anteriormente.

En todavía otra realización de la presente invención, se proporciona un método para determinar el riesgo de desarrollar un evento relacionado con una enfermedad, para un paciente con cáncer. Un método de este tipo comprende las etapas de: obtener muestras biológicas a partir del paciente y determinar los niveles de expresión génica, el número de copias o la combinación de uno o varios genes que pertenecen al grupo descrito anteriormente por tener hiperexpresión, en donde la hiperexpresión, el aumento del número de copias del gen o una combinación de los mismos, en comparación con los niveles de expresión génica, el número de copias de la combinación en un individuo normal, indica que el paciente tendría un mayor riesgo de desarrollar un evento relacionado con una enfermedad. Ejemplos representativos del gen que se hiperexpresa o que tiene un número de copias incrementado son el gen *OPN3*, *CKS1B* o *ASPM*.

Generalmente, el evento relacionado con una enfermedad consiste en la muerte, la progresión a una forma agresiva de la enfermedad y la recaída. Además, el paciente con cáncer puede ser un individuo con una amplificación de 1q21. Un individuo de este tipo puede ser un paciente con mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de colon o cáncer de próstata. Por otra parte, el individuo de control es el mismo que el que se ha descrito anteriormente en los métodos. Además, el nivel de expresión génica o el número de copias se determina antes o después del tratamiento del paciente. El tipo de tratamiento, el método utilizado para determinar el nivel de expresión génica y el número de

copias es el mismo que se ha descrito anteriormente. Además, el nivel de expresión génica se determina a nivel de proteína. Ejemplos de tales métodos, aunque sin estar limitados a los mismos, incluyen citometría de flujo, inmunohistoquímica y matriz tisular.

5 En otra realización de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento para un paciente con cáncer que tiene hiperexpresión del gen *CKS1B* o del producto génico de *CKS1B*, que comprende la etapa de administrar al paciente un agente que regula a la baja la expresión del gen *CKS1B* o del producto génico de *CKS1B*. Un paciente de este tipo puede ser un individuo con una amplificación de 1q21. Además, un individuo tal puede ser un paciente con mieloma múltiple, cáncer de mama, cáncer de colon o cáncer de próstata. Ejemplos de agentes que regulan a la baja la expresión del gen *CKS1B* no se limitan a los mismos, pero incluyen la interferencia mediada con ARN o un ácido nucleico peptídico (PNA). Ejemplos de agentes que regulan a la baja la expresión del gen *CKS1B* no se limitan a los mismos, pero incluyen un oligonucleótido anti-sentido, un anticuerpo o un inhibidor de molécula pequeña que son bien conocidos por un experto en la técnica.

15 En aún otra realización de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene mieloma múltiple de alto riesgo, que comprende administrar al individuo cantidades farmacéuticamente eficaces de un compuesto que regula a la baja la expresión del gen *CKS1B* o el producto génico de *CKS1B* y un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el gen *RFP2*. Los ejemplos de compuestos que regulan a la baja la expresión del gen *CKS1B* o de su producto génico, son los mismos que se han descrito anteriormente.

En aún otra realización de la presente invención, se proporciona un kit, que comprende; (a) una sonda específica para el gen *CKS1B*, (b) una sonda específica para el gen *RFP2*, o combinaciones de las mismas.

20 Los presentes ejemplos, junto con los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos descritos en esta memoria, son actualmente representativos de las realizaciones preferidas y no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los objetivos, fines y ventajas inherentes al presente documento. Cambios en la misma y otros usos que se engloban dentro del espíritu de la invención, tal como se definen por el alcance de las reivindicaciones, se les ocurrirán a los expertos en la técnica.

EJEMPLO 1

Supervivencia global relacionada con las ganancias de genes en el cromosoma 1

30 Este ejemplo revela datos de la creación de perfiles de expresión génica que identifican los genes cuya expresión en células plasmáticas malignas de pacientes recién diagnosticados con mieloma, se correlaciona significativamente con una muerte prematura en pacientes tratados con trasplantes de células madre en tándem.

35 La Figura 2 muestra un análisis de la supervivencia global en pacientes con más de 1,5 años de seguimiento. Las muestras de los pacientes se agruparon en cuartiles basándose en los niveles de expresión génica. Q1 es el cuartil más bajo y Q4 es el más alto. Había una relación significativa entre el pronóstico malo y una expresión elevada de *ASPM*, *OPN3* o *CSK1B* (Figura 2, panel superior). El poder de predicción de la supervivencia se incrementó mediante la agrupación de dos o más de estos tres genes en el análisis (Figura 2, panel inferior).

40 Estos tres genes capaces de predecir la supervivencia global también se pueden utilizar para predecir la supervivencia exenta de eventos (Figura 3A), y el poder de predicción se incrementó mediante la agrupación de dos o más de los tres genes en el análisis (Figura 3B). La Figura 4 muestra que un incremento de la expresión de *CSK1B* y del número de copias se asociaba con una recaída.

TABLA 1

Diecisiete genes cuyos niveles de expresión predicen una muerte temprana con mieloma múltiple

Grupo de sondas	Símbolo del gen	Cromosoma
1565951_s_at	OPN3	1q43
200850_s_at	AHCYL1	1p12
201897_s_at	CKS1B	1q21.2
201921_at	GNG10	9q32
202345_s_at	FABP5	8q21.13
202729_s_at	LTBP1	2p22-p21

Grupo de sondas	Símbolo del gen	Cromosoma
206513_at	AIM2	1q22
208540_x_at	S100A11	1q21
209717_at	EV15	1p22
210427_x_at	ANXA2	15q21-q22
213704_at	RABGGTB	1p31
219918_s_at	ASPM	1q31
222495_at	AD-020	1p13.3
224847_at	CDK6	7q21
227525_at	GLCCI1	7p22.1
230100_x_at	PAK1	11q13-q14
242488_at		1q43

EJEMPLO 2

Creación de perfiles de expresión génica para identificar genes candidatos para el diagnóstico, el pronóstico y posibles dianas de fenotipos de alto riesgo

- 5 Como se ha descrito anteriormente, el perfil de expresión génica global identificaba genes cuya hiperexpresión o falta de expresión podría ser útil para la estadificación y la realización de un seguimiento de la enfermedad mieloma múltiple y otros cánceres. Esta creación de perfiles génicos también se utilizó para identificar genes cuya expresión anormal podría causar un fenotipo de alto riesgo de mieloma.

(a) Sujetos:

- 10 En el estudio participaron 668 pacientes recién diagnosticados con mieloma múltiple sintomático o progresivo, el cual incluía 2 ciclos de melfalán de dosis alta (200 mg/m²) apoyados con células madre sanguíneas (Shaughnessy et al., 2003). Un subgrupo de 575 pacientes con mediciones genéticas disponibles, tal como se describe a continuación, constituían la muestra para este análisis. La mediana del seguimiento fue de 30 meses. Había 185 eventos de progresión o de muerte y 128 muertes. Las características de los pacientes eran las siguientes: el 20%
- 15 tenían 65 años o más, el 31% tenía niveles de beta-2-microglobulina ≥ 4 mg/L, el 55% tenían niveles de proteína C reactiva ≥ 4 mg/L; el 22% presentaba valores de hemoglobina ≤ 10 g/dL, el 10% tenía valores de creatinina ≥ 2 mg/dL; LDH era elevada (≥ 190 UI/L) en el 30%, la albúmina disminuía ($<3,5$ g/dL) en el 15%; se detectaron anomalías citogenéticas en el 33%. La mediana del seguimiento en este subgrupo era de 22 meses y hubo 98 eventos y 64 muertes.

- 20 (b) Creación de perfiles de expresión génica:

La creación de perfiles de expresión génica, utilizando la micromatriz de Affymetrix U133Plus2.0, se realizó en células plasmáticas enriquecidas con CD138, aisladas a partir de 351 pacientes consecutivos, como se ha descrito previamente (Zhan et al., 2002).

(c) Hibridación *in situ* fluorescente (FISH):

- 25 Los cromosomas artificiales bacterianos que incluían *CKS1B* en 1q21 (RP11-307C12) y *ASPM* (RP11-32D17) en 1q31 se adquirieron de BAC/PAC Resources (Oakland, CA) y se marcaron directamente con Spectrum-Verde o Spectrum-Rojo (Vysis Inc, Downers Grove, IL). La hibridación *in situ* fluorescente en metafase se realizó como se ha descrito previamente (Sawyer et al., 2005). Se confirmó que las sondas cartografiaban las bandas de 1q21 y 1q31 utilizando extensiones en metafase procedentes de linfocitos humanos normales. Los análisis de hibridación *in situ*
- 30 fluorescente en interfase con tres colores, del número de copias de los cromosomas 13 (D13S31) y 1q21 (*CKS1B*) se realizaron como se ha descrito (Shaughnessy et al., 2000) en un subgrupo de 421 pacientes (145 eventos y 100 muertes, seguimiento de 31 meses); la delección 13q se puntuó como positiva cuando \geq el 80% de las células clónicas mostraba una pérdida de señal en 13q14 como se ha descrito (McCoy et al., 2003). De estos 421 pacientes, 197 estaban entre los que tenían micromatrices y 224 no.

- 35 (d) Transferencia Western:

La proteína nuclear se aisló a partir de una parte alícuota de células plasmáticas enriquecidas con CD138 que también se analizaron mediante una micromatriz. La transferencia Western se realizó empleando el protocolo de inmunodetección quimioluminiscente WesternBreeze[®], como se ha descrito (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los anticuerpos para CKS1B y fosfo-thr-187-CDKN1B se adquirieron en Zymed Laboratories Inc, (South San Francisco, CA) y la anti-histona 1A se adquirió en Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA).

(e) Análisis estadístico:

La muestra de 351 micromatrices de Affymetrix U133Plus2.0 se procesó previamente utilizando el programa informático MAS5.01 y se normalizó utilizando la escala MAS5.01 convencional, como se detalla en los Métodos Complementarios. Las pruebas de rango logarítmico para la asociación univariada con la supervivencia relacionada con enfermedad, se realizaron para cada uno de los 54.675 resúmenes de "Señal". En concreto, se realizaron pruebas de rango logarítmico para el cuartil 1 frente a los cuartiles 2-4 y el cuartil 4 frente a los cuartiles 1-3, con el fin de identificar los genes subexpresados e hiperexpresados, respectivamente. Se aplicó un umbral de tasa de descubrimiento falso del 2,5% a cada lista de valores P del rango logarítmico (Storey et al., 2003), dando como resultado 19 grupos de sondas subexpresadas y 51 grupos de sondas hiperexpresadas. Para los 70 grupos, la pertenencia al cuartil extremo (Q1 o Q4) se asoció con un mayor riesgo de muerte relacionada con la enfermedad. Todos los demás EFS y la evolución de la supervivencia en este análisis fueron generales (es decir, no relacionados con la enfermedad). El método de Kaplan-Meier se utilizó para estimar las distribuciones de la supervivencia exenta de eventos y la supervivencia global y las pruebas de rango logarítmico se utilizaron para analizar su igualdad entre los grupos. Las pruebas de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher se utilizaron para la prueba de independencia de las categorías. La regresión de riesgos proporcionales multivariados se utilizó para ajustar los efectos de la expresión de *CKS1B* y la amplificación para otros indicadores, y se calcularon las proporciones de la heterogeneidad observada interpretadas por los indicadores combinados (es decir, R^2) (O'Quigley y Xu et al., 2001). El paquete estadístico R versión 2.0 (R Development Core Team, 2004) se utilizó para este análisis.

Los datos de las micromatrices de los 351 pacientes se han depositado en el "Gene Expression Omnibus" del NIH con el número de orden GSE2658. Téngase en cuenta que un análisis de las muestras del valor inicial para 174 de los mismos pacientes se había indicado anteriormente (De Vos et al., 2002) utilizando micromatrices U95Av2 de Affymetrix. Estas muestras se hibridaron de nuevo con micromatrices U133Plus2.0 para los análisis actuales.

(f) Índice de la amplificación de CKS1B basado en FISH:

Un punto de corte convencional, definido en laboratorio del 20% para la proporción de células plasmáticas clónicas con 3 señales o ≥ 4 señales, se utilizó para pruebas de asociación entre la expresión y la amplificación (Figura 6B y Tabla 5) y para la validación de la asociación entre la amplificación y la supervivencia global (Figuras 6C-D). Con la hipótesis de que 2 o más copias adicionales podrían conferir un riesgo adicional, en comparación con 1 copia adicional, el análisis multivariado de la supervivencia global (Tabla 4A) estimaba el tamaño del efecto independiente para la proporción de 3 señales y la proporción de ≥ 4 señales. Estos tamaños del efecto se utilizaron para definir el índice de amplificación como una suma ponderada: $(0,34 * \% \text{ de } 3 \text{ copias} + 0,66 * \% \text{ de } \geq 4 \text{ copias})/0,66$. El índice se adapta de manera que se incrementa en uno para cada incremento de unidad en la proporción con ≥ 4 señales. El índice es 0 para los pacientes con ≤ 2 señales en el 100% de las células clónicas, 51,5% para los pacientes con 3 señales en el 100%, y 100 para los pacientes con ≥ 4 señales en el 100%. Se observó el intervalo completo en estos pacientes. Un punto de corte para el índice de ≥ 46 minimizaba el valor P del rango logarítmico no ajustado para la supervivencia en el subgrupo de 421 pacientes (es decir, un corte óptimo). Téngase en cuenta que todos los puntos de corte para el índice de entre 3 y 88 tenían una $P < 0,003$.

(g) Subgrupos genéticos:

Casi el 50% de los mielomas recién diagnosticados contiene una de las cinco translocaciones cromosómicas recurrentes que dan como resultado la hiperactivación de *MAF*, *MAFB*, *FGFR3/MMSET*, *CCND3*, *CCND1* (Kuehl et 2002) con pronósticos divergentes (Fonseca et al., 2004), detectable como una expresión "enriquecida" mediante el análisis con micromatrices (Valk et al., 2004). Los subgrupos genéticos se clasificaron basándose en la presencia o ausencia de estos picos de translocación. Los pacientes también se clasificaron dentro del contexto de la citogenética en metafase por tener cariotipos normales (originados en células hematopoyéticas normales en el caso de mieloma hipoproliferativo) o por tener anomalías hiperdiploides, hipodiploides u "otras" anomalías citogenéticas. "Otras" se define como un cariotipo anormal en metafase, es decir, cambios estructurales y/o numéricos, con un número de cromosomas modal diploide. Por lo tanto, a diferencia del seminario de París (Fonseca et al., 2004), las entidades sin translocación se definieron por la citogenética en metafase en lugar de por la citogenética en interfase.

(i) Análisis de micromatrices

Los resúmenes de la "Señal" procesada previamente con Affymetrix MAS5.01 se utilizaron exclusivamente para este análisis, con una normalización de la matriz MAS5.01 realizada mediante una escala de la media recortada al 2% de señales de cada conjunto de sondas de la matriz para ser igual a 500. Para seleccionar los genes del foco, se utilizó un solo criterio para el filtrado del grupo de sondas y el análisis de significancia como una consecuencia del diseño

experimental particular. En lugar de comparar los niveles de expresión continua a través de categorías predefinidas, como suele ser el caso, el diseño requería comparar la distribución de la muerte relacionada con enfermedad temprana (mediana del seguimiento <2 años) a través de los cuartiles de la distribución de la expresión. El diseño estaba influido por la hipótesis biológica de que los genes de pronóstico malo que se "conectan" o desconectan, pueden estar asociados con una expresión en el cuartil inferior o superior de la muestra, respectivamente. Las pruebas de rango logarítmico para las diferencias de la supervivencia relacionada con la enfermedad a través de Q1 frente a otros, y Q4 frente a otros, se realizaron para todas las 54.675 señales de grupos de sondas, con la única restricción que la muestra contenía suficientes valores de señales únicos para el grupo de sondas, una condición que cumplían todos (es decir, un mínimo de 79 valores únicos). Entre los 70 grupos de sondas declarados significativos para la subexpresión o hiperexpresión, el número mínimo de valores únicos era 323 (percentil 30º de los 54675) y la mediana era 346 (percentil 83º). La varianza de la muestra mínima de las señales en logaritmo de base 2 era de 0,13 (percentil 0,6º) y la media era 0,52 (percentil 29º). La tasa de cambio mínimo sobre el intervalo de la señal era 2,13 (percentil 0,4º) y la mediana era 5,26 (percentil 40º). El examen de las distribuciones de la expresión de los grupos de sondas declarados significativos, no sugiere ninguna razón para que cualquiera de ellos deba ser "filtrado" por filtros de varianza mínima o de tasa de cambio, en particular ya que el valor de P mayor del rango logarítmico era 0,00003. El análisis de la significancia se realizó mediante el cálculo de las estimaciones de las tasas de falso descubrimiento que corresponden a puntos de corte con valores P especificados, como describen Storey y Tibshirani (Shaughnessy et al., 2003). La lista de 70 genes se basa en los puntos de corte del valor P con tasas de falso descubrimiento estimado de 2,5% para las listas del valor P subexpresado e hiperexpresado.

20 EJEMPLO 3

Resultados de la creación de perfiles de expresión génica global:

Sobre una base molecular para identificar genes que podrían contribuir a un mieloma de alto riesgo, los perfiles de expresión génica de células plasmáticas purificadas se correlacionaron con la supervivencia relacionada con la enfermedad y la global en 351 pacientes con diagnóstico reciente, tratados con 2 ciclos de dosis elevadas de melfalán.

Empleando las pruebas de rango logarítmico, se identificaron 70 genes para los que pertenecer al cuarto o al primer cuartil se correlacionaba con una alta incidencia de muerte relacionada con enfermedad (Tabla 2). Aunque el 10% de los genes en la micromatriz se había obtenido a partir del cromosoma 1, el 30% de los genes obtenidos se obtuvo a partir de ese cromosoma (P <0,0001); 9 de 51 genes del cuartil 4 se cartografiaron en el brazo 1q del cromosoma y 2 en el brazo 1p, mientras que 9 de 19 genes del cuartil 1 se cartografiaron en el brazo 1p del cromosoma y ninguno en el brazo 1q (Tabla 3). La hiperrepresentación de genes 1q en la lista de 70, y la observación de que la amplificación de 1q21 se asociaba con la progresión y un pronóstico malo en el mieloma (Smadja et al., 2001; Sawyer et al., 2005; Philip et al., 1980) justificó centrarse en esta región en busca de una base molecular para el mieloma de alto riesgo: 2 genes (*PSMD4* y *CKS1B*) se cartografiaron en 1q21, entre los cuales la pertenencia al cuartil 4 de *CKS1B* estaba asociada más fuertemente con la supervivencia en las pruebas de rango logarítmico no ajustado (Tabla 2).

TABLA 2A

Correlaciones de rangos - grupos de sondas con FDR del 2,5% del cuartil 4 con índice de amplificación de 1q21, el índice de marcado de *CKS1B* y PC y valores de P ajustados para asociaciones con la supervivencia global

Rango (Q4)	Cromosoma	Grupo de sondas	Símbolo	Índice de amplificación de <i>CKS1B</i> r^t	<i>CKS1B</i> r^t	PCLI r^*	Valor P ajustado de la supervivencia
1	8q21.13	202345_s_at	NA	0,20	0,22		0,001
2	Xp22.2-p22.1	1555864_s_at	NA	0,34	0,47		0,007
3	5p15.33	204033_at	<i>TRIP3</i>	0,19	0,45	0,20	0,001
4	1q22	206513_at	<i>AIM2</i>	0,15	0,13		0,089
5	2p24.1	1555274_a_	<i>SELI</i>	0,28	0,31		0,001
6	21 q22.3	211576_s_at	<i>SLC19A1</i>	0,17	0,23		0,007
7	3p21.3	204016_at	<i>LARS2</i>	-0,18			0,002
8	1q43	1565951_s_	<i>OPN3</i>	0,36	0,36		0,007
9	1q31	21991B_s_at	<i>ASPM</i>	0,36	0,64	0,17	0,010
10	12q15	201947_s_at	<i>CCT2</i>	0,23	0,43	0,13	0,004

ES 2 555 994 T3

Rango (Q4)	Cromosoma	Grupo de sondas	Símbolo	Índice de amplificación de CKS1B r ^t	CKS1B r ^t	PCLI r [*]	Valor P ajustado de la supervivencia
11	16p13.3	213535_s_at	<i>UBE21</i>		0,38		0,022
12	20q13.2 -q13.3	204092_s_at	<i>STK6</i>	0,31	0,51	0,19	0,044
13	1p36.33 - p36.21	213607_x_at	<i>FLJ13052</i>				0,150
14	Xq12-q13	208117_s_at	<i>FLJ12525</i>		0,34		0,006
15	17q25	210334_x_at	<i>BIRC5</i>	0,20	0,36	0,14	0,110
16	3q27	204023_at	<i>NA</i>	0,29	0,62	0,16	0,072
17	1q21.2	201897_s_at	<i>CKS18</i>	0,50	1,00	0,15	0,007
18	19q13.1 1-q13.12	216194_s_at	<i>CKAP1</i>	0,24	0,38		0,001
19	1q21	225834_at	<i>MGC57827</i>	0,39	0,66	0,23	0,140
20	19q13.1 2	238952_x_at	<i>DKFZp779 0175</i>		0,11		0,009
21	17p13.3	200634_at	<i>PFN1</i>	0,30	0,41		0,002
22	19p13.2	20893 1_s_	<i>ILF3</i>	0,22	0,22		0,220
23	1q22	206332_s_at	<i>IF16</i>	0,30	0,32	0,13	0,003
24	7p14-p13	220789_s_at	<i>TBRG4</i>		0,13	0,17	0,009
25	10p11.2.3	218947_s_at	<i>PAPD1</i>	0,31	0,30		0,150
26	8q24	213310_at	<i>EIF2C2</i>	0,28	0,37		0,031
27	3q12.1	224523_s_at	<i>MGC4308</i>	0,17	0,24	0,14	0,038
28	1p36.3-p36.2	201231_s_at	<i>ENO1</i>		0,23		< 0,001
29	18q12.1	217901_at	<i>DSG2</i>	0,15			0,005
30	6q22	226936_at	<i>NA</i>	0,15	0,52	0,17	0,027
31	8q24.3	58696_at	<i>EXOSC4</i>		0,20		0,330
32	1q21-q25	200916_at	<i>TAGLN2</i>	0,47	0,52		0,120
33	3q21	201614_s_at	<i>RUVBL1</i>	0,16	0,14		0,023
34	16q22-q24	200966_x_at	<i>ALDOA</i>	0,21	0,28		0,001
35	2p25.1	225082_at	<i>CPSF3</i>		0,39		0,073
36	1q43	242488_at	<i>NA</i>	0,18	0,27	0,14	0,090
37	3q12.3	243011_at	<i>MGC15606</i>		0,27		0,004
38	22q13.1	201105_at	<i>LGALS1</i>		0,31		0,051
39	3p25-p24	224200_s_at	<i>RAD18</i>	0,17	0,41	0,14	0,040
40	20p11	222417_s_at	<i>SNX5</i>				0,085
41	1q21.2	210450_s_at	<i>PSMD4</i>	0,58	0,59	0,13	0,067
42	12q24.3	200750_s_at	<i>RAN</i>	0,22	0,40		0,056
43	1pter-q31.3	206364_at	<i>KIF14</i>	0,41	0,57	0,25	0,019
44	7p15.2	201091_s_at	<i>CBX3</i>	0,14	0,20	0,16	0,150
45	12q22	203432_at	<i>TMPO</i>	0,32	0,59	0,18	0,007

ES 2 555 994 T3

Rango (Q4)	Cromosoma	Grupo de sondas	Símbolo	Índice de amplificación de CKS1B r^t	CKS1B r^t	PCLI r^*	Valor P ajustado de la supervivencia
46	17q24.2	221970_s_at	DKFZP586 L0724	0,27	0,47		0,081
47	11p15.3-p15.1	212533_at	WEE1	0,20	0,54	0,13	0,056
48	3p12	213194_at	ROB01				0,150
49	5q32-q33.1	244686_at	TCOF1				0,120
50	8q23.1	200638_s_at	YWHAZ	0,26	0,23		0,012
51	10q23.31	205235_s_at	MPHOSPH1		0,40	0,16	0,050

TABLA 2B

Grupos de sondas génicas del cuartil 1 cumplen el punto de corte con FDR del 2,5%

Rango (Q1)	Cromosoma	Grupo de sondas	Símbolo	Índice de amplificación de CKS1B r^t	CKS1B r^t	PCLI r^*	Valor P ajustado de la supervivencia ^a
1	9q31.3	201921_at	GNG10	-0,20	-0,30		0,600
2	1p13	227278_at	NA			-0,12	0,900
3	Xp22.3	209740_s_at	PNPLA4				0,029
4	20q11.21	227547_at	NA	-0,29	-0,28	-0,15	0,630
5	10q25.1	225582_at	KIAA1754	-0,21	-0,32		0,003
6	1p13.2	200850_s_at	AHCYL1			-0,13	0,019
7	1p13.3	213628_at	MCLC	-0,30	-0,28	-0,15	0,440
8	1p22	209717_at	EV15	-0,33	-0,29	-0,16	0,870
9	1p13.3	222495_at	AD-020	-0,30	-0,24	-0,20	0,920
10	6p21.31	1557277_a_a t	NA		-0,11		0,460
11	1p22.1	1554736_at	PARG1		-0,20	-0,11	0,280
12	1p22	218924_s_at	CTBS	-0,16	-0,11	-0,13	0,460
13	9p13.2	226954_at	NA	-0,22	-0,40		0,090
14	1p34	202838_at	FucA1	-0,17	-0,23		0,066
15	13q14	230192_at	RFP2	-0,28	-0,18		0,880
16	12q13.11	48106_at	FLJ20489	-0,23	-0,23	-0,11	0,300

ES 2 555 994 T3

Rango (Q1)	Cromosoma	Grupo de sondas	Símbolo	Índice de amplificación de CKS1B r [†]	CKS1B r [†]	PCLI r [*]	Valor P ajustado de la supervivencia ^a
17	11q13.1	237964_at	NA	-0,16	-0,20		0,044
18	2p22-p21	202729_s_at	<i>LTBP1</i>	-0,24	-0,21		0,097
19	1p13.1	212435_at	NA	-0,21	-0,21	-0,11	0,034

[†] Correlación entre la expresión a escala logarítmica de cada gen y el índice de amplificación de CKS1B (N = 197, todos los pacientes con GEP y FISH de 1q21). Las celdas en blanco se corresponden a correlaciones con P > 0,05. [‡] Correlación entre la expresión a escala logarítmica de cada gen y la expresión de CKS1B a escala logarítmica (N = 351, todos los pacientes con GEP). Las filas con CKS1B |r| ≥ 0,4 tienen el formato en negrita. La correlación entre la expresión de cada gen a escala logarítmica y el PCLI (N = 305, 46 pacientes no tienen PCLI). ^a Regresión de riesgos proporcionales multivariados de la supervivencia global sobre la expresión del cuartil extremo (Q1 o Q4) para cada gen, ajustada por FISH 13 80%, anomalías citogenéticas, B2M>4, CRP>4, ALB<3,5 y PCLI (N = 277, 74 pacientes han perdido al menos una medición).

Tabla 3. Distribución cromosómica de grupos de sondas génicas con FDR del 2,5%

Cromosoma	U133Plus2.0		Q1		Q4		Combinado		Valor de P *
	Número de Genes	%	Número de Genes	%	Número de Genes	%	Número de Genes	%	
1	3.659	9,9	9	47,4	12	23,5	21	30,0	<0,0001
2	2.522	6,9	1	5,3	2	3,9	3	4,3	
3	2.116	5,8	0	0,0	7	13,7	7	10,0	
4	1.456	4,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
5	1.718	4,7	0	0,0	2	3,9	2	2,9	
6	2.005	5,4		5,3	1	2,0	2	2,9	
7	1.798	4,9	0	0,0	2	3,9	2	2,9	
8	1.311	3,6	0	0,0	4	7,8	4	5,7	
9	1.463	4,0	2	10,5	0	0,0	2	2,9	
10	1.444	3,9	1	5,3	2	3,9	3	4,3	
11	2.069	5,6	1	5,3	1	2,0	2	2,9	
12	1.927	5,2	1	5,3	3	5,9	4	5,7	
13	730	2,0	1	5,3	0	0,0	1	1,4	
14	1.195	3,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	

	U133Plus2.0		Q1		Q4		Combinado		
Cromosoma	Número de Genes	%	Valor de P *						
15	1.152	3,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
16	1.507	4,1	0	0,0	2	3,9	2	2,9	
17	2.115	5,7	0	0,0	3	5,9	3	4,3	
18	582	1,6	0	0,0	1	2,0	1	1,4	
19	2.222	6,0	0	0,0	3	5,9	3	4,3	
20	1.072	2,9	1	5,3	2	3,9	3	4,3	
21	468	1,3	0	0,0	1	2,0	1	1,4	
22	906	2,5	0	0,0	1	2,0	1	1,4	
X	1.273	3,5	1	5,3	2	3,9	3	4,3	
Y	80	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
m	5	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
	36.795		19		51		70		
Desconocido	17.880								
	54.675								

* Se ha realizado una prueba exacta para las proporciones binomiales para comparar la proporción de grupos de sondas obtenidas que se cartografiaban en el cromosoma 1 con la proporción para toda la matriz.

5 Los niveles de expresión a escala logarítmica de genes asociados con la proliferación tendían a tener correlaciones elevadas con *CKS1B* (Tabla 2). Además, 25 de 29 genes (86%), correlacionados significativamente con el índice de marcado de células plasmáticas, estaban fuertemente correlacionados con *CKS1B*, lo que sugiere que este gen participaba en una red de señalización de la proliferación en pacientes con enfermedad de alto riesgo. *CKS1B* era un indicador independiente de la supervivencia global después del ajuste de la delección del cromosoma 13 mediante FISH en interfase, anomalías citogenéticas en metafase, factores de pronóstico clínico e índice de marcado ($P = 0,007$, Tabla 2, última columna, fila 17). Los valores de P ajustados se proporcionan para los otros 69 genes para comparar, y era evidente que algunos otros genes del cromosoma 1 eran fuertes indicadores independientes de la supervivencia, la proliferación y la amplificación del gen *CKS1B*.

15 Aunque la mediana de la edad de la actual cohorte era 57, más joven que la mediana de la edad en el momento del diagnóstico, el 25% entre 64 y 76 eran suficientes para considerar si la edad modificaba el efecto de la hiperexpresión o amplificación de *CKS1B* en el análisis multivariado en las Tablas 2 y 4b, respectivamente. Como una variable continua, la edad no era un modificador significativo del efecto de *CKS1B* sobre la supervivencia, en el análisis ($P = 0,37$, HR 1,03, para la expresión de *CKS1B* y $P = 0,81$, HR 0,99, para la amplificación), correspondiendo el efecto más fuerte a un riesgo más alto estimado del 3% para un 1 año más en la edad (los resultados son similares para EFS). Además, había una prevalencia algo mayor de la amplificación de *CKS1B* entre los pacientes mayores de 65 años ($P = 0,2$). Se especuló que genes asociados con la vía de la proliferación mediada por 1q21 dominaban como indicadores univariados de la supervivencia relacionada con la enfermedad en el seguimiento temprano. Los genes relacionados con otras lesiones genéticas, como *FGFR3/MMSET*, *MAF* y *MAFB* se clasificaban por debajo de 70, pero pueden aparecer con tasas elevadas de falso descubrimiento.

TABLA 4A

Análisis multivariado de riesgos proporcionales [†] (n = 369)

	Supervivencia exenta de eventos				Supervivencia		
	%	HR	P	r ² acumulado	HR	P	r ² acumulado
Índice de amplificación de CKS1B (0-100)		1,009	0,002	0,160	1,011	0,002	0,219
Deleción del cromosoma 13 FISH	25,5	1,786	0,006	0,224	1,879	0,014	0,308
Cariotipo anormal	35,0	1,875	0,001	0,272	2,298	<0,001	0,393
Beta-2-microglobulina >= 4 mg/L	35,8	1,478	0,046	0,305	1,396	0,170	0,422
Proteína C reactiva >= 4 mg/L	63,4	1533	0,028	0,320	1,586	0,055	0,448
Albúmina < 3,5 g/dL	16,5	1,660	0,019	0,336	1,698	0,044	0,461
Eventos/Muertes		127			84		

TABLA 4B

	Supervivencia exenta de eventos				Supervivencia		
	%	HR	P	r ² acumulado	HR	P	r ² acumulado
Índice de amplificación de CKS1B (0-100)	32,5	1,68	0,008	0,132	2,12	0,001	0,207
Deleción del cromosoma 13 FISH	25,5	1,74	0,010	0,204	1,83	0,020	0,293
Cariotipo anormal	35,0	1,94	<0,001	0,257	2,33	<0,001	0,383
Beta-2-microglobulina >= 4 mg/L	35,8	1,52	0,033	0,293	1,43	0,140	0,417
Proteína C reactiva >= 4 mg/L	63,4	1,49	0,038	0,312	1,56	0,060	0,443
Albúmina < 3,5 g/dL	16,5	1,69	0,016	0,331	1,73	0,035	0,455
Eventos/Muertes		127			84		

[†] 369 de los 421 pacientes con mediciones de la amplificación de CKS1B tenían mediciones completas para este análisis). a) Análisis multivariado de riesgos proporcionales con el índice de amplificación de CKS1B continuo. Un grupo de pacientes con un índice una unidad mayor que otro tiene un riesgo de progresión mayor estimado del 0,9% y un riesgo de muerte mayor del 1,1% (es decir, un aumento de aproximadamente 1% del riesgo con cada aumento de 1 en el índice). El índice de marcado no era significativo en ninguno de los análisis (P > 0,35, HR < 1,11, N = 325, eventos EFS = 116, muertes = 77, con 44 sujetos adicionales en los que faltaba el índice de marcado). b) El análisis multivariado de riesgos proporcionales con un corte >= 46 para el índice de amplificación de CKS1B. El

	Supervivencia exenta de eventos			Supervivencia			
	%	HR	P	r ² acumulado	HR	P	r ² acumulado
índice de marcado no era significativo en ninguno de los análisis (P> 0,32, HR <1,12, N = 325).							

Los niveles de *CKS1B* estaban fuertemente correlacionados con la evolución clínica (Figura 5): 25 muertes tuvieron lugar entre 88 pacientes con niveles de expresión en el cuartil 4, en comparación con solo 39 entre los 263 pacientes con niveles en el cuartil 1-3 (tasa de falsos descubrimientos (FDR), 2,5%); esto también era cierto para la supervivencia exenta de eventos (EFS) (34 de 88 en la cohorte del cuartil 4 habían experimentado un evento en comparación con 64 de 263 en el resto). Los niveles de *SKP2*, el gen asociado de *CKS1B*, eran uniformemente altos y no se asociaron significativamente con la supervivencia. Además, el análisis FISH en interfase reveló 3 o más copias de *CKS1B* en el 46% entre los 197 casos con datos de expresión simultánea de genes. Los niveles de expresión estaban relacionados significativamente con el número de copias de *CKS1B* (Figura 6B). A la inversa, la amplificación aumentaba la frecuencia a medida que los niveles de expresión de *CKS1B* se incrementaron desde el cuartil 1 al cuartil 4 (Tabla 5). Un examen de la amplificación génica de *CKS1B* en el contexto de los niveles de expresión de los 70 genes (Tabla 2) reveló, como era de esperar, correlaciones con genes en la banda 1q21 del cromosoma pero lo más importante era que también con genes relacionados con la proliferación celular que no se cartografiaban en 1q21.

15 Tabla 5.

Tabla 5. Cuartiles de expresión génica de *CKS1B* y amplificación de *CKS1B* mediante hibridación *in situ* fluorescente en interfase en mieloma diagnosticado recientemente.

Expresión de <i>CKS1B</i> [†]	AMPLIFICADO	
	Nº	%
cuartil 1 [‡] n = 44	9	20%
cuartil 2 n = 43	12	28%
cuartil 3 n = 51	26	51%
cuartil 4 n = 59	44	75%
Total 197	91	46%

20 [†] P <0,0001. La amplificación se define como >= 20% de las células con 3 o >= 4 señales de *CKS1B*, para la validación junto con la Figura 2c-d. Otras tablas utilizan el índice de amplificación de *CKS1B* y su punto de corte óptimo. [‡] Asignaciones a cuartiles basadas en 351 pacientes con GEP

25 Todas las líneas celulares de mieloma expresaban niveles elevados de *CKS1B* y *ASPM*, que se cartografiaban en 1q31 y en la lista de 51 genes hiperexpresados relacionados con la evolución en este análisis. El FISH en metafase para *CKS1B* y *ASPM* reveló de 3 a 8 copias de *CKS1B* en 21 líneas celulares, mientras que *ASPM* se amplificó (de 3 a 6 copias) en solo 16 líneas celulares (datos no mostrados). El FISH en metafase de un mieloma primario (Figura 6A) proporcionó una clara evidencia de la amplificación de *CKS1B* en ausencia de amplificación de *ASPM*. Por lo tanto, a pesar de que la hiperexpresión de ambos genes se relacionó con la supervivencia y que ambos genes estaban localizados en la misma banda del cromosoma, *CKS1B* se amplificó con más frecuencia que *ASPM* en el mieloma.

30 A continuación, se examinó la relación entre las anomalías citogenéticas que implicaban al cromosoma 1q y FISH de *CKS1B*. En 414 casos primarios con ambas anomalías citogenéticas y datos de FISH en interfase para la amplificación *CKS1B*, se observó una amplificación de *CKS1B* en 16 de 17 casos (94%) con una ganancia de 1q

mediante citogenética, mientras que la amplificación de *CKS1B* se observó por FISH en interfase en 61 de 112 casos que carecían de una evidencia obvia de anomalías en 1q, a pesar de la presencia de una citogenética anormal en metafase (datos no mostrados). En conjunto, estos datos sugerían que la amplificación de *CKS1B* no estaba simplemente reflejando una trisomía en el cromosoma 1.

5 El clon BAC utilizado para evaluar el número de copias del gen *CKS1B* también medía el número de copias de *PBXIP1* (que se cartografió centromérico a *CKS1B*) y *PB591*, *LENEP*, *ZFP67*, *FLJ32934*, *ADAM15* y *EFNA4* (todos cartografiados teloméricos a *CKS1B*). Al examinar la relación entre el número de copias génicas y los niveles de expresión de estos genes (Tabla 6), la expresión del ARN estaba correlacionada más fuertemente con el número de copias de ADN en el caso de *CKS1B*. Es importante destacar que ninguno de los otros genes que se cartografiaban en este BAC, se encontraba entre los 70 relacionados con la supervivencia corta. Por otra parte, la expresión de los genes candidatos *BCL9*, *MCL1*, *IL6R* y *RAB25*, que no se cartografiaban en el clon BAC, pero que se cartografiaron en 1q21, no estaba relacionada con la supervivencia en este análisis.

Tabla 6. Relación de la expresión génica en el cuartil 4 con la amplificación de genes localizados en el cromosoma artificial bacteriano (BAC) usado para medir la amplificación de 1q21

Símbolo	No amplificado		Amplificado*		Valor P [†]	Índice de amplificación r [‡]	Rango logarítmico Valor P ^a
	n/129	(%)	n/68	(%)			
<i>PBXIP1</i>	24	(18,6)	28	(41,2)	0,0012	0,29	0,5285
<i>CKS1B</i>	20	(15,5)	39	(57,4)	<0,0001	0,50	0,0002
<i>PB591</i>	23	(17,8)	38	(55,9)	<0,0001	0,43	0,0873
<i>LENEP</i>	31	(24,0)	18	(26,5)	0,8389	0,03	0,6507
<i>ZFP67</i>	27	(20,9)	29	(42,6)	0,0023	0,34	0,8717
<i>FLJ32934</i>	28	(21,7)	11	(16,2)	0,4606	-0,02	0,6207
<i>ADAM15</i>	23	(17,8)	29	(42,6)	0,0003	0,23	0,2808
<i>EFNA4</i>	26	(20,2)	23	(33,8)	0,0528	0,21	0,3212

15 * El índice de amplificación de *CKS1B* a escala 0-100 es una suma ponderada de las proporciones de células clónicas con 3 copias de *CKS1B* y ≥ 4 copias de *CKS1B*, definido por $(0,34\% \text{ con 3 copias} + 0,66\% \text{ con } \geq 4 \text{ copias}) / 0,66$. [†] Para una prueba de la independencia de la amplificación y la pertenencia al cuarto cuartil (N = 197). [‡] Correlación entre la expresión de cada gen y el índice de amplificación de *CKS1B* a escala 0-100. ^a Prueba de rango logarítmico para la asociación de la pertenencia a Q4 y la supervivencia global (N = 351, 64 muertes).

20 Por otra parte, la asociación de la amplificación de *CKS1B* con la supervivencia y la supervivencia exenta de eventos, fue validada en una cohorte de 224 pacientes que carecían de datos de micromatrices. Los niveles de amplificación de *CKS1B* se correlacionaron inversamente con la supervivencia exenta de eventos y la supervivencia global (Figura 6C). También se observaron estos efectos cuando se consideraron los 421 pacientes (supervivencia exenta de eventos, supervivencia global, Fig. 6D).

25 A continuación, se realizaron análisis multivariados de riesgos proporcionales con los 369 pacientes con datos de la amplificación de *CKS1B* y todos los datos de los factores de riesgo adicionales (Tabla 4). Los 3 factores de riesgo genético (amplificación de *CKS1B*, delección de la banda del cromosoma 13q14 y anomalías del cariotipo en metafase) conferían todos ellos de forma independiente tanto una supervivencia exenta de eventos como una supervivencia global, mientras que la hipoalbuminemia era el único de los tres factores de pronóstico convencional que conservaba implicaciones adversas para ambos criterios de valoración examinados. En conjunto, estas 6 variables representaron el 46% y el 33% de la variabilidad en la supervivencia y la supervivencia exenta de eventos, respectivamente, en donde los 3 parámetros convencionales, no genéticos contribuían solamente en un 7,2% y 7,4% adicionales. La amplificación de *CKS1B* era un indicador independiente de la evolución tanto como un índice de escala de 0 a 100 como con una categoría de dos grupos (Tabla 4A y B) después de ajustar las variables mencionadas anteriormente y el índice de marcado de células plasmáticas.

Los datos emparejados de la expresión de *CKS1B* en el momento del diagnóstico y la recaída, disponibles en 32 casos, revelaban una expresión incrementada en el 84% en la recaída ($P = 0,0001$, Figura 7), que era especialmente importante en pacientes con niveles de expresión en el cuartil 1-3 en el momento del diagnóstico. Los datos del número de copias de *CKS1B* emparejados en el momento del diagnóstico y en la recaída estaban disponibles para 17 pacientes: de 7 que carecían de amplificación en el momento del diagnóstico, 4 mostraron 3 o más copias en la recaída; de 10 casos con 3 copias en el momento del diagnóstico, 4 habían adquirido 4 copias o más en la recaída; pero 2 casos con 4 o más copias en el momento del diagnóstico no mostraron una amplificación adicional en la recaída.

Además, se examinó la relación entre la expresión de *CKS1B*, la amplificación de *CKS1B* y los subgrupos genéticos. La frecuencia de la expresión de *CKS1B* en el cuartil 4 variaba entre los subgrupos genéticos descritos anteriormente (Fonseca et al., 2004) (Tabla 7A). Con respecto a las translocaciones basadas en la expresión génica, casi dos tercios de los pacientes con activación de *MAF* o *MAFB*, un tercio cada uno con activación de *FGFR3/MMSET* y *CCND1*, y solo 18% sin estas translocaciones tenían hiperactivación de *CKS1B* ($P < 0,0001$). Cuando se examinaba en el contexto de cariotipos en metafase, la expresión de *CKS1B* en el cuartil 4 estaba presente en aproximadamente el 20% de los casos hiperdiploides o normales, es decir, cariotipos poco informativos, mientras que esta característica se observó en casi el 50% de los pacientes hipodiploides y con otras anomalías citogenéticas.

En un análisis multivariado distinto que se ajustaba a los subgrupos genéticos, la expresión de *CKS1B* en el cuartil 4 siguió siendo un indicador independiente de una evolución adversa (Tabla 7B); la categoría de translocación derivada de la expresión génica en su conjunto, confería una supervivencia exenta de eventos inferior ($P = 0,034$), pero no una supervivencia global ($P = 0,261$); lo que era compatible con los datos publicados (Fonseca et al., 2004), la activación de *CCND1* afectaba a ambos criterios de valoración favorablemente. Si bien no se ajustaba a las múltiples pruebas de rango logarítmico que identificaban los 70 genes, este análisis sugería que la expresión de *CKS1B* conservaba un poder explicativo dentro de los subgrupos genéticos pertinentes.

Tabla 7A. Anomalías genéticas y expresión de *CKS1B* en el cuartil 4

Anomalía	n / 347 (%)	CKS1B		Valor P*
		Q4		
Categoría †	n / 347 (%)	n	(%)	Valor P*
Translocación derivada de la expresión				
t(11;14)	60 (17,3)	20	(33,3)	<0,0001
t(4;14)	48 (13,8)	17	(35,4)	
t(14;16) y t(14;20)	14 (4,0)	9	(64,3)	
Sin pico de translocación	225 (64,8)	41	(18,2)	
Cariotipo en metafase				
Hiperdiploide	55 (15,9)	10	(18,2)	0,0002
No hiperdiploide	48 (13,8)	24	(50,0)	
Otras anomalías citogenéticas	9 (2,6)	4	(44,4)	
Sin anomalías citogenéticas	235 (67,7)	49	(20,9)	
Deleción del cromosoma 13	n / 334			
No	224 (67,1)	47	21,0	0,02

		CKS1B		
Sí	110 (32,9)	37	33,6	

5 † Las translocaciones se determinaron a partir de los picos de la expresión t(11;14)=CCND1, t(4;14)=FGFR3/MMSET, t(14;16)=MAF y t(14;20)=MAFB. La aneuploidía y otras anomalías citogenéticas se determinaron a partir de la citogenética, para las que faltaban 4 observaciones. * Prueba exacta de Fisher, de la independencia de cada categoría y de pertenencia de CKS1B al cuarto cuartil. Bajo la hipótesis nula, Q4 contiene en promedio 25% de los pacientes dentro de cada nivel, correspondiente a una distribución proporcional a través de Q1-3 y Q4.

Tabla 7B. Análisis multivariado de la expresión de CKS1B en el cuartil 4 y anomalías citogenéticas†

	Supervivencia exenta de eventos		Supervivencia	
	HR	P [‡]	HR	P [‡]
CKS1B Q4	1,97	0,003	2,16	0,005
Translocación derivada de la expresión*				
t(11;14)	0,59	0,034	0,82	0,261
t(4;14)	1,67		1,77	
t(14;16) y t(14;20)	1,48		1,12	
Cariotipo en metafase**				
Hiperdiploide	1,75	0,006	1,84	0,013
No hiperdiploide	2,29		2,56	
Otras anomalías citogenéticas	2,35		2,71	
r ²	0,218		0,223	
Eventos / Muertes	97		63	

10 † N = 347. De 351 pacientes con datos de expresión, de 4 faltaba la citogenética. ‡ Prueba de proporción de probabilidad parcial para el efecto general de la categoría. * El valor de P para la modificación del efecto de CKS1B sobre EFS mediante subgrupo de translocación es 0,74. ** El valor de P para la modificación del efecto de CKS1B sobre EFS mediante subgrupo de cariotipo es 0,27 y para la supervivencia es 0,17. Para la supervivencia, la proporción de riesgo para CKS1B se estima en 4,2 veces superior en el grupo de no hiperdiploide, en comparación con los que no tienen anomalías, con proporciones de riesgo más o menos iguales para los otros grupos.

15 Además, el análisis con transferencia Western de proteína nuclear procedente de células plasmáticas de 27 casos de mieloma recién diagnosticado y 7 líneas celulares de mieloma, mostraba una fuerte correlación entre el ARNm de CKS1B y la proteína, pero sin correlación entre la expresión del gen CDKN1B y la expresión del gen CKS1B, niveles de proteína o niveles de proteína CDKN1B. Sin embargo, la proteína CKS1B y los niveles de proteína CDKN1B mostraron una correlación inversa (Figura 8). La causa de discrepancias raras (por ejemplo, proteína CKS1B elevada en ausencia de una expresión génica elevada, no se entendía con claridad. Niveles uniformes de la proteína histona 1A indicaron una carga proteica igual en todas las muestras. Niveles citoplasmáticos y no fosforilado-thr-187-CDKN1B no se alteraron en lisados celulares de mieloma con respecto a la expresión de CKS1B. Los niveles de proteína CDKN1B no se correlacionaron con los niveles de ARNm de SKP2.

Discusión:

25 Los análisis de la expresión génica global de células plasmáticas muy purificadas procedentes de pacientes recién diagnosticados con mieloma, identificaron 70 genes que se correlacionaban significativamente con una mortalidad relacionada con una enfermedad temprana (mediana de tiempo de seguimiento de 22 meses). Es importante

destacar que 30% de estos genes se cartografiaron en el cromosoma 1, lo que sugiere un papel importante de este cromosoma en la progresión de la enfermedad mieloma. El aumento de la expresión de los genes 1q y la reducción de la expresión de los genes 1p eran compatibles con los datos citogenéticos de ganancias de 1q y pérdidas de 1p frecuentes en cariotipos de mieloma. (Nilsson et al., 2003; Gutierrez et al., 2004). Además, las duplicaciones en tándem y las translocaciones por salto que implicaban a 1q21, causadas por una descondensación de la heterocromatina pericentromérica, son características de la enfermedad en estadio terminal (Sawyer et al., 2005; Sawyer et al., 1998; Le Baccon et al., 2001).

La hiperexpresión/amplificación de *CKS1B*, cartografiada en 1q21, estaba relacionada con un pronóstico malo en el seguimiento temprano del mieloma recién diagnosticado. El papel de *CKS1B* en el control de la ubiquitinación mediada por SCF^{Skp2} y la degradación proteasómica del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina CDKN1B, hacen de él un gen candidato atractivo. Los niveles de proteína *CKS1B* se correlacionaron con la expresión génica y ambos se correlacionaron inversamente con los niveles de proteína CDKN1B. Investigaciones en *S. cerevisiae* han demostrado un papel esencial de *cks1* para favorecer la mitosis mediante la modulación de una activación transcripcional de *CDC20* (Morris et al., 2003). La expresión de *CKS1B* y *CDC20* se correlacionaron fuertemente ($r = 0,78$; $p < 0,0001$, datos no mostrados), lo que es compatible con que *CKS1B* favorece la mitosis mediante la regulación de la expresión de *CDC20* en células humanas. Por lo tanto, un aumento relacionado con la dosis génica de la expresión de *CKS1B* podría conducir a una mayor degradación de CDKN1B y también a una activación de *CDC20* en el mieloma.

En el contexto de los subgrupos genéticos relevantes para el pronóstico, recientemente reconocidos, la hiperactivación de *CKS1B* era menos frecuente en los casos hiperdiploides y con cariotipos normales; un tercio de los que tenían translocaciones de *CCND1* tenían niveles altos de *CKS1B*; y hasta dos tercios de las entidades de alto riesgo, *MAF*, *MAFB* e hipodiploidía mostraban hiperactivación de *CKS1B* (Tabla 7A). Además de conferir un pronóstico malo en los pacientes recién diagnosticados, la hiperexpresión y la amplificación de *CKS1B* eran comunes en la recaída de pacientes que carecían de estas características en el momento del diagnóstico. Por lo tanto, será importante determinar si la amplificación de *CKS1B* surge en todos los subgrupos y, cuando está presente, predice una progresión rápida de la enfermedad y la muerte. Además, dado que la amplificación de 1q21 es una observación frecuente en muchos tumores malignos sólidos y hematológicos avanzados, será importante determinar si la amplificación del gen *CKS1B* se asocia con una agresividad de la enfermedad en una mayor proporción de cánceres.

Además, la amplificación del gen *CKS1B* junto con la delección cromosómica de 13q14 y la citogenética anormal en metafase, representaban casi el 40% de la variabilidad de la supervivencia observada, lo que subraya que el riesgo de mieloma se determina mejor mediante pruebas genéticas moleculares y celulares. Una aplicación rutinaria de estos estudios, realizada sobre una muestra aislada de médula ósea, se recomienda por lo tanto para una estratificación adecuada del paciente en el diseño de un ensayo terapéutico. Además, el impacto sobre la supervivencia de nuevos agentes, tales como bortezomib y talidomida y sus derivados, será profundo si su eficacia clínica también se extiende al mieloma de alto riesgo definido genéticamente, que no ha sido investigado. Puesto que *CKS1B* parece interactuar directa o indirectamente con ligasas de ubiquitina y/o el proteasoma para regular puntos de control múltiples del ciclo celular (Pagano y Benmaamar, 2003), nuevas estrategias terapéuticas que se dirigen directamente a *CKS1B* o a vías relacionadas pueden representar medios nuevos y más específicos para tratar un mieloma de alto riesgo de novo y pueden prevenir su evolución secundaria.

Dado el impacto negativo de la delección de la banda cromosómica 13q14 sobre la supervivencia, hay que destacar que una expresión reducida de un gen aislado que se cartografía en el cromosoma 13q14, *RFP2/LEU5*, que se había identificado previamente como un gen supresor tumoral candidato, con homología significativa con *BRCA1* (Kapandaze et al., 1998), se asoció significativamente con una supervivencia mala en este análisis, y sugiere que justifica una investigación a fondo de la función de *RFP2* y un análisis de mutaciones en el mieloma.

Además, la desregulación de la ciclina D es un evento común en el cáncer y contribuye a la tumorigénesis favoreciendo la hiperfosforilación de la proteína RB1 y la activación de genes diana E2F importantes para favorecer la transición del punto de control temprano de G1 hasta S del ciclo celular. Un estudio anterior había informado de que una expresión mal regulada de una de las tres ciclinas de tipo D es probable que sea una lesión genética unificadora que inicia el mieloma múltiple. Basándose en la información disponible y los resultados presentados en este documento, se contempla un modelo patogénico de múltiples etapas de génesis de mieloma en el que la activación de una ciclina de tipo D es un evento iniciador temprano y la amplificación de *CKS1B* es un evento de progresión, lo que da como resultado la pérdida de ambos puntos de control temprano y tardío de G1 hasta S del ciclo celular y el establecimiento de una enfermedad agresiva resistente a múltiples fármacos.

Las siguientes referencias se citan en el presente documento:

Abraham R.S. et al., *Blood*, 2005,105:794-803.

Attal M. et al., *N Engl J Med*, 2003, 349:2495-502.

Barlogie B. et al., *Williams Hematology*, 2001,1279-1304.

- Barlogie B. et al. *Blood*, 2004, 103:20-32.
- Builinger L. et al., *N Engl J Med*, 2004, 350:1605-16.
- Claudio J.O. et al., *Blood*, 2002, 100:2171-4d
- De Vos J. et al., *Oncogene*, 2002, 21:6848-57.
- 5 DeWald G.W. et al., *Blood*, 1985, 66:380-390.
- Fonseca R. et al. *Cancer Res*, 2004, 64:1546-58.
- Ganoth D. et al., *Nat Cell Biol*, 2001, 3:321-4
- Gutierrez, N.C. et al., *Blood*, 2004, 104:2661-6.
- Hideshima T. et al., *Blood* 2004, 104:607-18.
- 10 Kapanadze, B. et al., *FEBS Lett.* 1998, 426:266-270.
- Kuehl W.M. y Bergsagel P.L., *Nature Rev Cancer* 2002, 2:175-187.
- Le Baccon, P. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001, 32:250-64.
- McCoy J. et al. *Blood*, 2003, 102:2512a.
- Morris M.C. et al., *Nature*, 2003, 423(6943): 1009-13.
- 15 Nakayama K. et al., *Dev Cell*, 2004, 6:661-72.
- Nilsson T. et al. *Br J Haematol.*, 2003, 120:960-9.
- O'Quigley J. y Xu R. Explained variation in proportional hazards regression. En: Crowley J, compilador. Handbook of Statistics in Clinical Oncology. Nueva York, NY: Marcel Dekker, 2001:397-410.
- Pagano M., *Mol Cell*, 2004,14:414-6.
- 20 Pagano, M. y Benmaamar, R. *Cancer Cell*, 2003, 4:251-6.
- Peters J.M. *Mol. Cell*, 2002, 95:931-43.
- Philip P. et al., *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1980, 2:243-257.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. 2004. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- 25 Rosenwald A., et al., *N Engl J Med*, 2002, 346:1937-47.
- Sawyer J.R. et al. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, 42:95-106.
- Sawyer, J.R. et al., *Blood*, 1998, 1:1732-41.
- Smadja N.V. et al., *Blood*, 2001; 98:2229-2238.
- Shaughnessy J. y Barlogie B. *Immunol Rev*, 2003, 94:140-63.
- 30 Shaughnessy J. et al., *Blood*, 2003, 101:3849-3856.
- Shaughnessy J Jr. et al., *Br J Haematol.* 2003, 120:44-52.
- Shaughnessy J. et al., *Blood* 2000, 96:1505-11.
- Sherr C.J. et al., *Genes Dev.*, 1999, 13:1501-12.
- Shipp M.A. et al., *Nat Med*, 2002, 8:68-74.
- 35 Slingerland J. y Pagano M., *J Cell Physiol*, 2000, 183,10-17.
- Spruck C. et al., *Mol Cell*, 2001,7:639-50.
- Storey y Tibshirani, *Proc Natl Acad Sci.* 2003, 100(16):9440-9445.

Tian E. et al., *N Eng J Med* 2003, 349:2483-94.

Valk P.J et al., *N Engl J Med*, 2004, 350:1617-28.

Yeoh E,J. et al., *Cancer Cell*, 2002, 1:133-143,

Zhan, F. et al., *Blood*, 2002, 99:1745-57.

- 5 Cualquier patente o publicación mencionada en esta memoria descriptiva es indicativa de los niveles de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el pronóstico de un paciente con mieloma múltiple, que comprende determinar el nivel de expresión génica de GNG10, PNPLA4, KIAA1754, AHCYL1, MCLC, EVI5, AD-020, PARG1, CTBS, FUCA1, RFP2, FLJ20489, LTBP1, TRIP13, AIM2, SELI, SLC19A1, LARS2, OPN3, ASPM, CCT2, UBE2I, STK6, FLJ13052, FLJ12525, BIRC5, CKS1B, CKAP1, MGC57827, DKFZp7790175, PFN1, ILF3, IF116, TBRG4, PAPD1, EIF2C2, MGC4308, ENO1, DSG2, EXOSC4, TAGLN2, RUVBL1, ALDOA, CPSF3, MGC15606, LGALS1, RAD18, SNX5, PSMD4, RAN, KIF14, CBX3, TMPO, DKFZP586L0724, WEE1, ROBO1, TCOF1, YWHAZ y MPHOSPH1 en células plasmáticas aisladas del sujeto, y comparar los niveles de expresión con uno o varios controles adecuados y determinar si el paciente tiene un pronóstico malo basándose en la comparación, en donde
 - 5 una expresión reducida de GNG10, PNPLA4, KIAA1754, AHCYL1, MCLC, EVI5, AD-020, PARG1, CTBS, FUCA1, RFP2, FLJ20489 o LTBP1, respecto a un control con un pronóstico favorable; y
 - 10 una hiperexpresión de al menos uno entre OPN3, ASPM o CKS1B opcionalmente con hiperexpresión de TRIP13, AIM2, SELI, SLC19A1, LARS2, CCT2, UBE2I, STK6, FLJ13052, FLJ12525, BIRC5, CKAP1, MGC57827, DKFZp7790175, PFN1, ILF3, IF116, TBRG4, PAPD1, EIF2C2, MGC4308, ENO1, DSG2, EXOSC4, TAGLN2, RUVBL1, ALDOA, CPSF3, MGC15606, LGALS1, RAD18, SNX5, PSMD4, RAN, KIF14, CBX3, TMPO, DKFZP586L0724, WEE1, ROBO1, TCOF1, YWHAZ o MPHOSPH1, respecto a un control con un pronóstico favorable, se asocia con un pronóstico malo.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la expresión reducida, la hiperexpresión o una combinación de las mismas de los genes en el paciente después de un tratamiento del mieloma múltiple predice el riesgo de recaída en el paciente después del tratamiento.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el tratamiento comprende una quimioterapia de alta dosis o un trasplante de células madre de la sangre periférica autólogas.
4. El método según la reivindicación 1, en el que el pronóstico es para la supervivencia global.
5. El método según la reivindicación 1, en el que el pronóstico es para la supervivencia exenta de eventos.
6. El método según la reivindicación 1, en el que la expresión génica se determina mediante una micromatriz de ADN o RT-PCR.
7. El método según la reivindicación 1, en el que dicha expresión génica se determina a nivel de proteína.
8. El método según la reivindicación 7, en el que la expresión génica se determina mediante un método seleccionado a partir del grupo que consiste en citometría de flujo, inmunohistoquímica y matriz tisular.
9. El método según la reivindicación 1, en el que las células plasmáticas son células plasmáticas enriquecidas con CD138, y los niveles de expresión génica se determinan sobre una micromatriz Affymetrix U133Plus2.0 usando las sondas enumeradas en las Tablas 2A y 2B, en donde se determina el nivel de expresión génica de genes que están hiperexpresados en un sujeto con un pronóstico malo utilizando las sondas de la Tabla 2A y el nivel de expresión génica de los genes que tienen una expresión reducida en un sujeto con un pronóstico malo se determinan usando las sondas de la Tabla 2B.

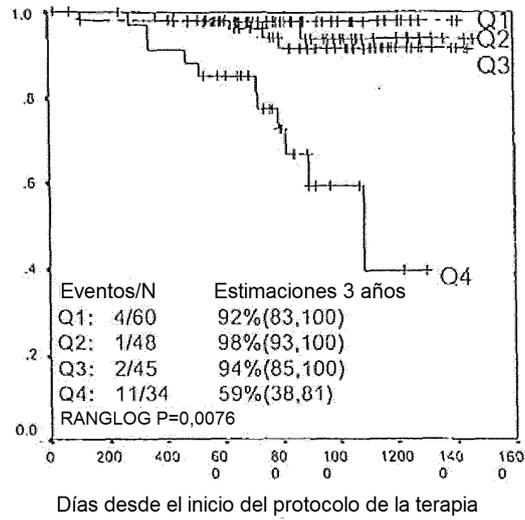


Fig. 1A

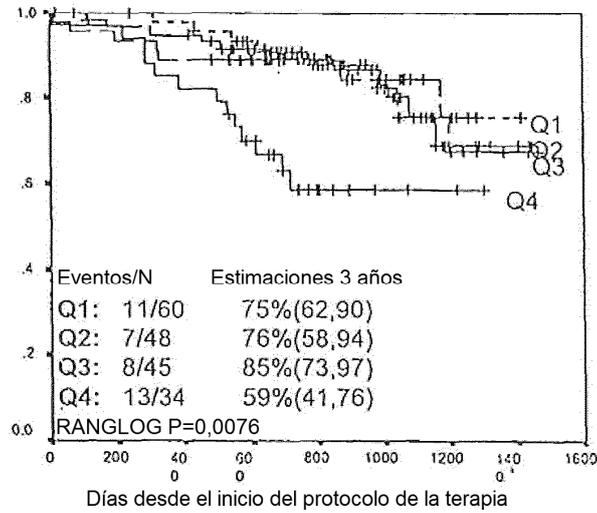


Fig. 1B

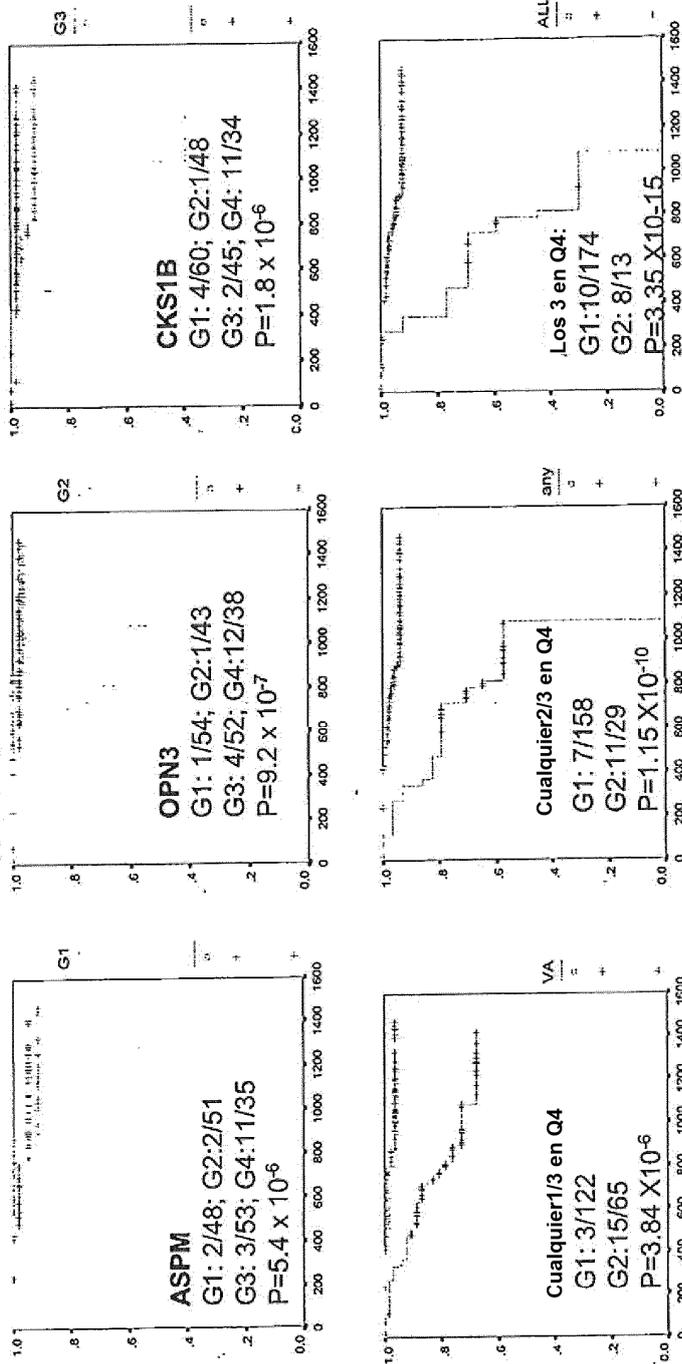


Fig. 2

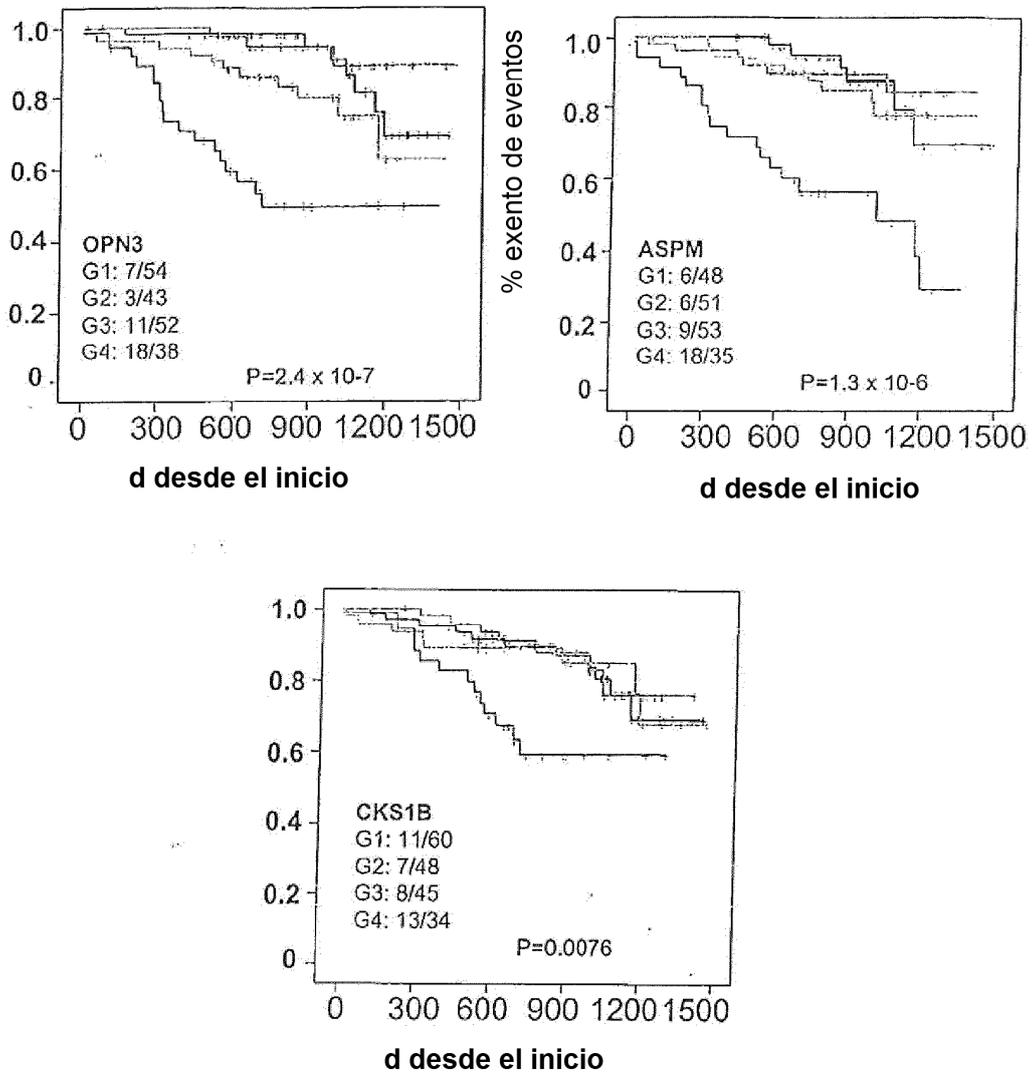


Fig. 3A

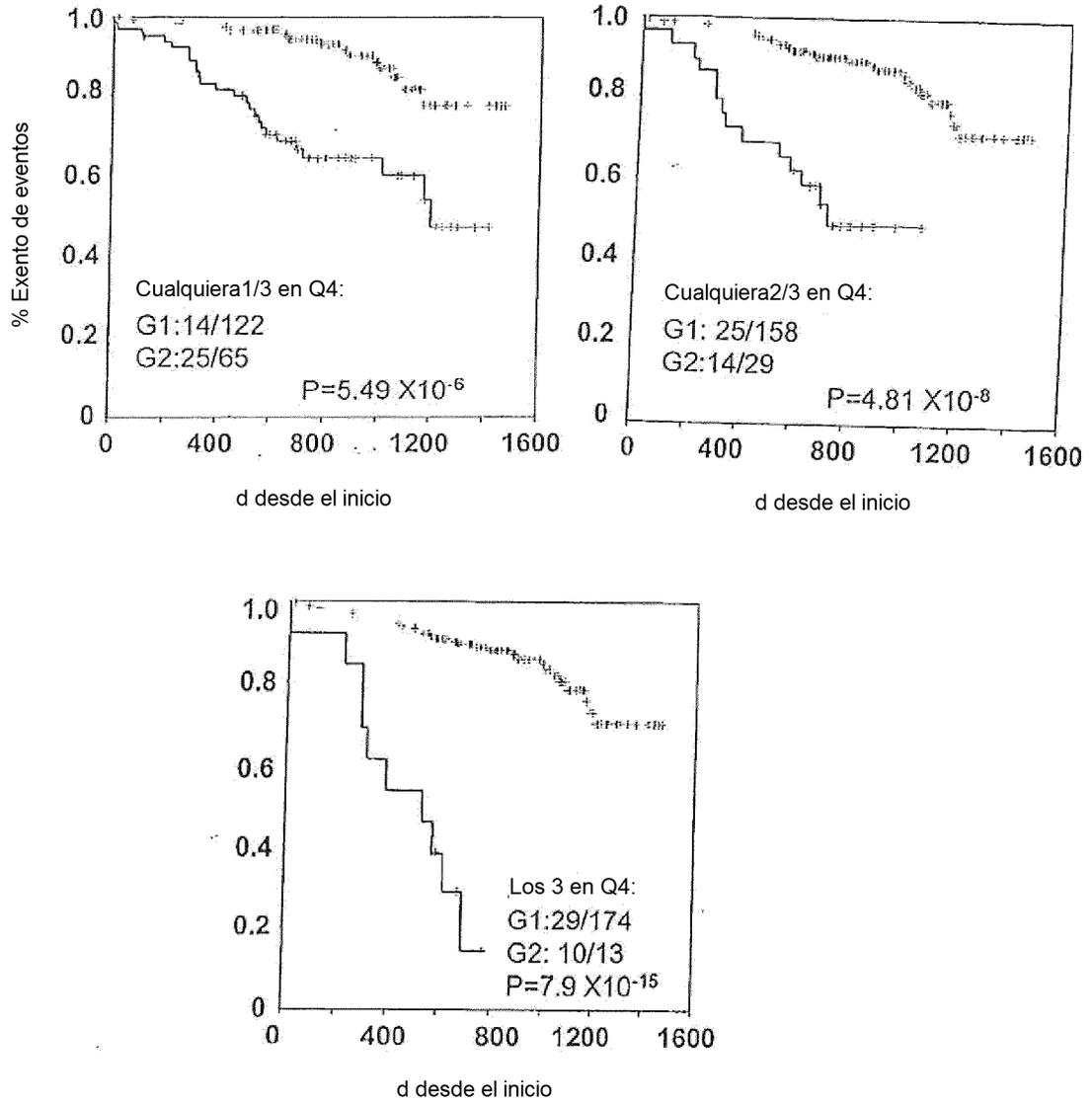


Fig. 3B

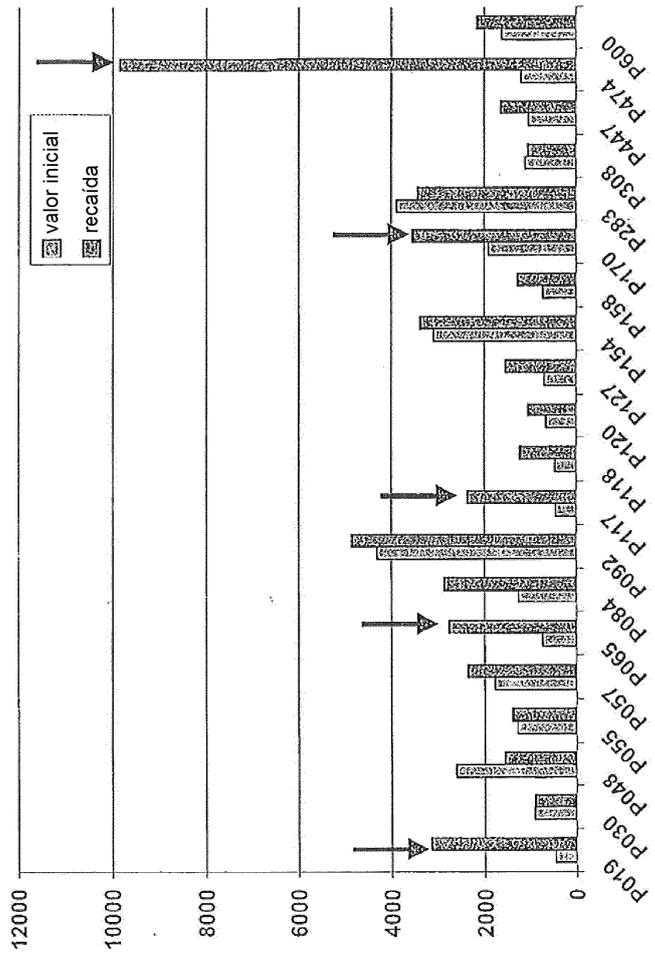


Fig. 4

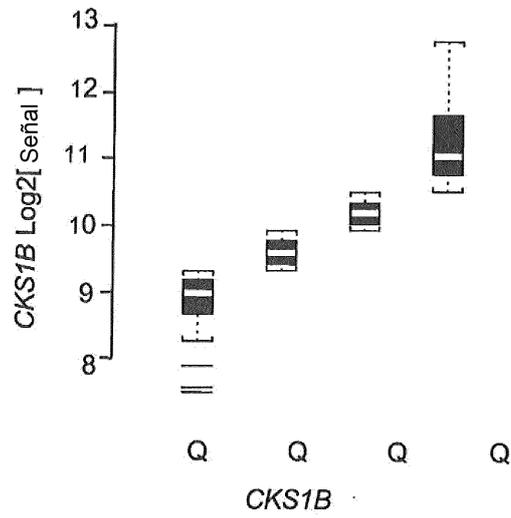


Fig. 5A

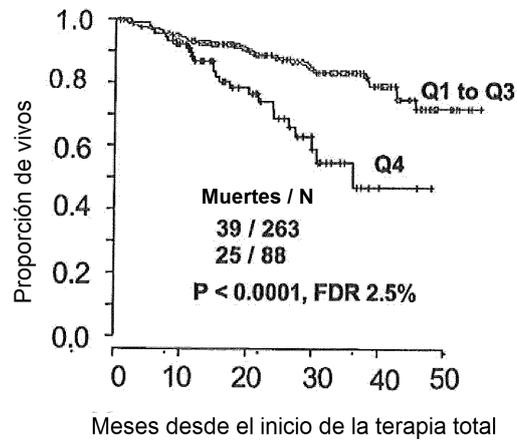


Fig.5B

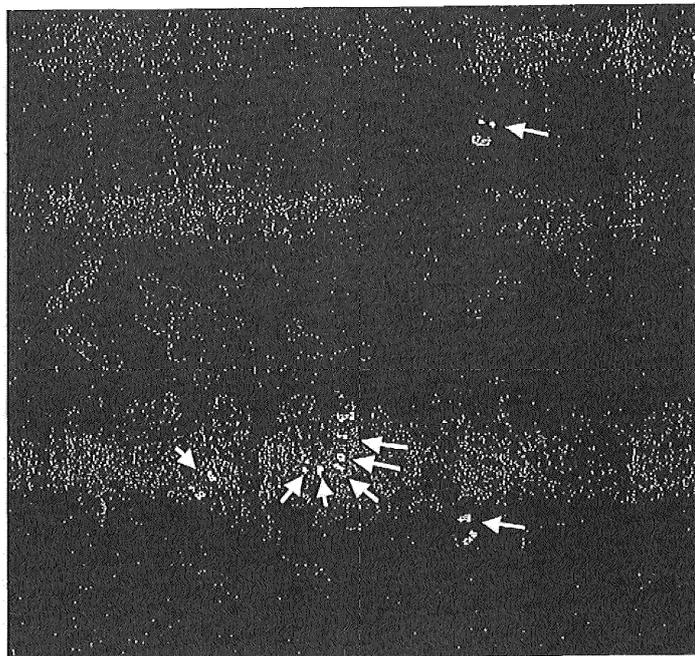


Fig.6A

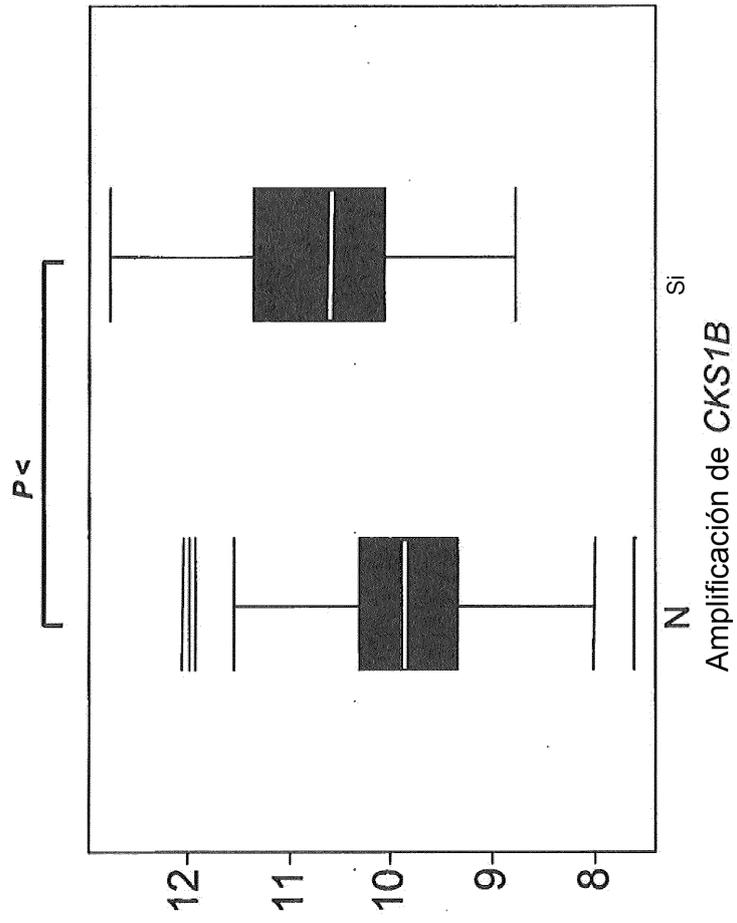


Fig. 6B

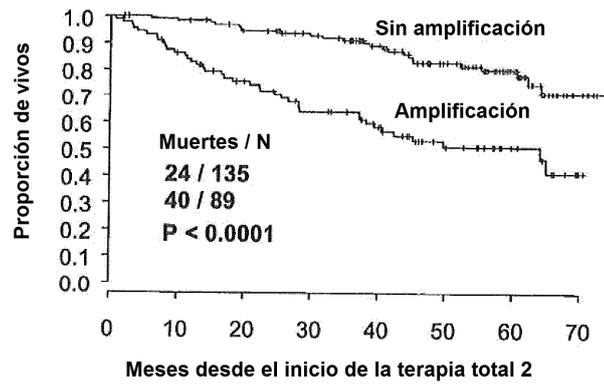


Fig. 6C

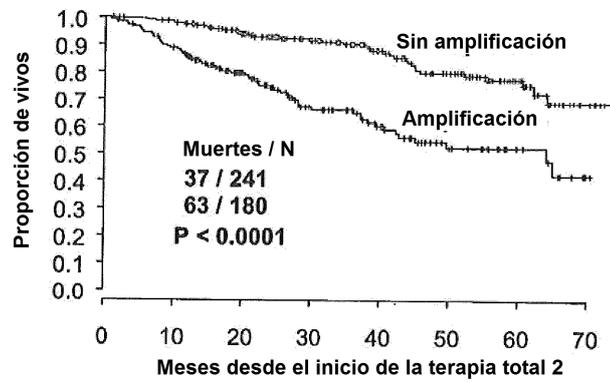


Fig. 6D

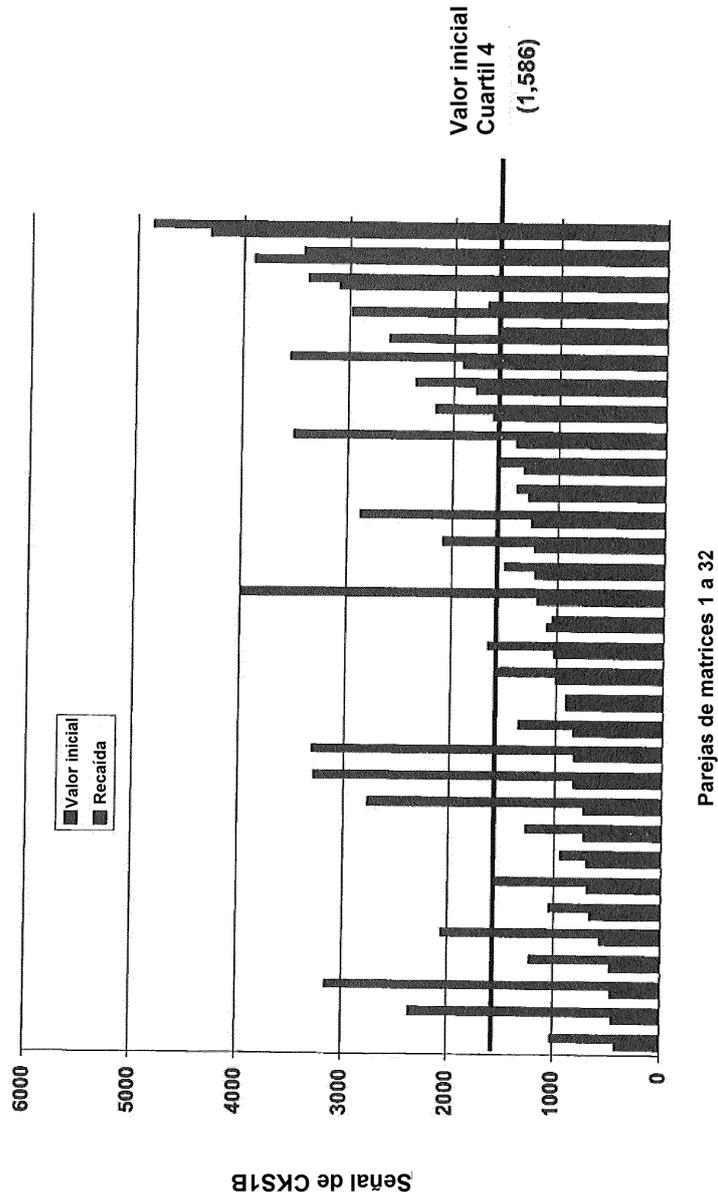


Fig. 7

Parejas de matrices 1 a 32

