

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 165**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2012 PCT/EP2012/063722**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2012 E 12733765 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2732048**

54 Título: **Nuevo clasificador para la clasificación molecular de mieloma múltiple**

30 Prioridad:

14.07.2011 EP 11173971

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

19.09.2017

73 Titular/es:

**ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER
ROTTERDAM (100.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GD Rotterdam, NL**

72 Inventor/es:

**KUIPER, ROWAN y
SONNEVELD, PIETER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 633 165 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

Nuevo clasificador para la clasificación molecular de mieloma múltiple

Introducción

5 La presente invención se encuentra en el campo del diagnóstico molecular. La descripción proporciona un método para clasificar muestras obtenidas de pacientes diagnosticados con mieloma múltiple. La descripción también proporciona un método para determinar el pronóstico de un individuo diagnosticado con mieloma múltiple, así como un método para la predicción de la respuesta al tratamiento de un individuo diagnosticado con mieloma múltiple.

Antecedentes de la invención

10 El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por la acumulación de células plasmáticas monoclonales malignas en la médula ósea. La supervivencia media total (OS) es de 3 a 4 años, pero varía ampliamente entre los pacientes. Actualmente, el International Staging System (ISS), basado en el suero β 2m y albúmina, se utiliza ampliamente en clínica para clasificar a los pacientes con MM en tres categorías de pronóstico. [1]

15 Con base en citogenética, se pueden distinguir dos clases de MM con implicaciones para la biología y el pronóstico de MM. El MM hiperdiploide, ~ 60% de los pacientes, caracterizado por trisomías de múltiples cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, y 21) tiene un pronóstico relativamente bueno. El MM no hiperdiploide, ~ 40% de los casos, se caracteriza por translocaciones recurrentes que involucran al gen de la cadena pesada de inmunoglobulina en 14q32, dando como resultado la activación transcripcional de CCND1, CCND3, MAF, MAFB o FGFR3/MMSET. [2, 3] La translocación t(11;14), que involucra CCND1, confiere un pronóstico relativamente favorable mientras que la translocación t(4;14), que involucra FGFR3 y MMSET, tiene mal pronóstico. [4, 5] Las translocaciones t(14;16) y t(14;20), que involucran los oncogenes de MAF, también confieren un mal pronóstico, aunque recientemente ha sido debatido [6]. Además, se informó que del(17p), del(13q) y 1q-gain detectados mediante detección convencional del cariotipo están asociados con un mal pronóstico. [7]

25 Con base en el análisis de la expresión génica, se han publicado varias clasificaciones para MM que incluyen la clasificación de la Universidad de Arkansas para Ciencias Médicas (UAMS) y más recientemente una clasificación por nuestro propio grupo. La clasificación molecular de la UAMS del mieloma consiste en siete grupos distintos de expresión génica, incluidos los grupos de translocación MS, MF y CD-1/2, así como un grupo hiperdiploide (HY), un grupo con genes asociados a la proliferación (PR), y un grupo caracterizado por un bajo porcentaje de enfermedad ósea (LB). [8] Nuestra clasificación de MM dio lugar a tres grupos adicionales: NFkB, CTA y PRL3. [9]

30 La expresión génica es capaz de explicar una cantidad aún mayor de varianza en la supervivencia en comparación con el ISS y la citogenética. Una de las primeras firmas de supervivencia basadas en la expresión génica fue la génica UAMS-70 y la génica más refinado UAMS-17. [10,11]. Otros clasificadores incluyen la firma Millennium, la firma de genes MRC-IX-6 y el clasificador IFM. [12-14] Además, se informó que las firmas predicen la proliferación de células plasmáticas, tal como el índice de proliferación de expresión génica (GPI) publicado recientemente. [15]

35 El documento EP1964930 A1 describe un clasificador molecular de 15 genes útil para evaluar la probabilidad de supervivencia de pacientes con MM. El método analiza el nivel de expresión de estos genes en una matriz de ADN.

El documento WO2010/064016 A2 describe una firma de expresión de 97 genes que está asociada con un mal pronóstico (es decir, alto riesgo) en pacientes con MM. El análisis del nivel de expresión descrito en el mismo se lleva a cabo utilizando una matriz de ADN.

40 El documento US 2008/274911 A1 también utiliza análisis de expresión de matrices de ADN, pero utiliza diferentes genes marcadores.

El objetivo del estudio, tal como se describe en la presente memoria, era desarrollar una firma de pronóstico, basada en perfiles de expresión génica (GEP) de pacientes con MM, tratados ya sea con tratamiento de inducción estándar o inducción con bortezomib, seguidos en ambos casos por dosis altas de melfalán y mantenimiento.

Sumario de la invención

45 Se presenta aquí un clasificador que comprende un conjunto de 92 genes capaz de distinguir entre pacientes con alto riesgo y pacientes con un riesgo bajo. En un análisis de supervivencia de pacientes con mieloma múltiple recién diagnosticados (MM), el clasificador arrojó excelentes resultados en los que la clasificación en el grupo de bajo riesgo identificó pacientes con una buena supervivencia general, mientras que el grupo identificado como de alto riesgo mostraron tasas de supervivencia significativamente peores.

50 La presente descripción se refiere a un método para determinar el resultado de la enfermedad o el pronóstico de un paciente diagnosticado con mieloma múltiple clasificando dicho paciente en una categoría de alto riesgo o de bajo riesgo, comprendiendo dicho método las etapas de

a) proporcionar un chip genético que comprende sondas para la detección de al menos el conjunto de 92 genes de

acuerdo con la tabla 1,

b) poner en contacto el chip genético con una muestra que comprende ARNm de un paciente,

c) determinar los niveles de expresión del conjunto de 92 genes en la muestra,

5 d) normalizar los niveles de expresión utilizando normalización media/varianza para obtener el valor de expresión normalizado,

e) multiplicar el valor de expresión normalizado con el valor beta de acuerdo con la tabla 1 para obtener el valor calculado para una sonda individual,

f) determinar una puntuación de EMC-92 por suma de los valores calculados de las sondas individuales,

10 en donde una puntuación de EMC-92 por encima de un umbral predeterminado indica que el paciente debe clasificarse en la categoría de alto riesgo y una puntuación en o por debajo del umbral predeterminado indica que el paciente debe clasificarse en la categoría de bajo riesgo.

Descripción detallada de la invención

15 Se presenta aquí un clasificador que comprende un conjunto de 92 genes capaz de distinguir entre pacientes con alto riesgo y pacientes con un riesgo bajo. En un análisis de supervivencia de pacientes recién diagnosticados con mieloma múltiple (MM), el clasificador arrojó excelentes resultados en los que la clasificación en el grupo de bajo riesgo identificó pacientes con una buena supervivencia general, mientras que el grupo identificado como de alto riesgo mostraron tasas de supervivencia significativamente peores.

20 El clasificador se validó en un entorno experimental en el que los pacientes con una supervivencia general pobre (OS) se distinguían de los pacientes con OS estándar. Por lo tanto, se construyó un modelo SPCA utilizando los datos de HOVON65/GMMG-HD4 como un conjunto de entrenamiento (véase la sección experimental a continuación). Se encontró que una serie de 1088 conjuntos de sondas estaban asociadas con la supervivencia libre de progresión (PFS) en un análisis de regresión de Cox univariado (FDR <10%). Con base en estos conjuntos de sondas, se desarrolló un clasificador con 92 conjuntos de sondas (tabla 1). Este clasificador se denominará la firma de genes EMC-92.

25

Tabla 1

#	Sondas	Beta	Gen	Cromosoma	Banda
1	226217_at	-0,0319	SLC30A7	1	p21.2
2	208967_s_at	0,0113	AK2	1	p35.1
3	202553_s_at	0,0054	SYF2	1	p36.11
4	217728_at	0,0773	S100A6	1	q21.3
5	223381_at	-0,0070	NUF2	1	q23.3
6	218365_s_at	0,0035	DARS2	1	q25.1
7	211963_s_at	0,0303	ARPC5	1	q25.3
8	222680_s_at	0,0205	DTL	1	q32.3
9	221826_at	0,0200	ANGEL2	1	q32.3
10	201795_at	0,0067	LBR	1	q42.12
11	202813_at	0,0548	TARBP1	1	q42.2
12	202322_s_at	0,0129	GGPS1	1	q42.3
13	202728_s_at	-0,1105	LTBP1	2	p22.3
14	209683_at	-0,0561	FAM49A	2	p24.2
15	201930_at	-0,0090	MCM6	2	q21.3
16	228416_at	-0,0778	ACVR2A	2	q22.3

ES 2 633 165 T3

#	Sondas	Beta	Gen	Cromosoma	Banda
17	206204_at	0,0477	GRB14	2	q24.3
18	215177_s_at	-0,0768	ITGA6	2	q31.1
19	224009_x_at	-0,0520	DHRS9	2	q31.1
20	AFFX-HUMISG F3A/M97935_MA_at	0,0525	STAT1	2	q32.2
21	222154_s_at	0,0154	SPATS2L	2	q33.1
22	207618_s_at	0,0746	BCS1L	2	q35
23	239054_at	-0,1088	SFMBT1	3	p21.1
24	217852_s_at	0,0008	ARL8B	3	p26.1
25	219510_at	-0,0097	POLQ	3	q13.33
26	202107_s_at	0,0225	MCM2	3	q21.3
27	220351_at	0,0420	CCRL1	3	q22.1
28	208942_s_at	-0,0997	SEC62	3	q26.2
29	233437_at	0,0446	GABRA4	4	p12
30	225366_at	0,0140	PGM2	4	p14
31	218662_s_at	-0,0176	NCAPG	4	p15.31
32	204379_s_at	0,0594	FGFR3	4	p16.3
33	201307_at	0,0165	SEPT11	4	q21.1
34	202542_s_at	0,0870	AIMP1	4	q24
35	205046_at	0,0087	CENPE	4	q24
36	226218_at	-0,0644	IL7R	5	p13.2
37	202532_s_at	-0,0006	DHFR	5	q14.1
38	226742_at	-0,0345	SAR1B	5	q31.1
39	231738_at	0,0686	PCDHB7	5	q31.3
40	214150_x_at	-0,0349	ATP6V0E1	5	q35.1
41	201555_at	-0,0052	MCM3	6	p12.2
42	209026_x_at	0,0255	TUBB	6	p21.33
43	211714_x_at	0,0221	TUBB	6	p21.33
44	213002_at	-0,0418	MARCKS	6	p22.2
45	221041_s_at	-0,0520	SLC17A5	6	q13
46	217824_at	-0,0041	NCUBE1	6	q15
47	223811_s_at	0,0556	SUN1 / GET4	7	p22.3
48	202842_s_at	-0,0626	DNAJB9	7	q31.1
49	208232_x_at	-0,0493	Desconocido	8	p12
50	208732_at	-0,0618	RAB2A	8	q12.1

ES 2 633 165 T3

#	Sondas	Beta	Gen	Cromosoma	Banda
51	201398_s_at	-0,0254	TRAM1	8	q13.3
52	233399_x_at	-0,0184	ZNF252	8	q24.3
53	200775_s_at	0,0163	HNRNPK	9	q21.32
54	230034_x_at	-0,0330	MRPL41	9	q34.3
55	204026_s_at	0,0046	ZWINT	10	q21.1
56	243018_at	0,0407	Desconocido	11	p14.1
57	222713_s_at	0,0278	FANCF	11	p14.3
58	221755_at	0,0396	EHBP1L1	11	q13.1
59	231210_at	0,0093	C11orf85	11	q13.1
60	202884_s_at	0,0714	PPP2R1B	11	q23.1
61	219550_at	0,0559	ROBO3	11	q24.2
62	238780_s_at	-0,0529	Desconocido	11	q24.3
63	208747_s_at	-0,0874	C1S	12	p13.31
64	38158_at	0,0423	ESPL1	12	q13.13
65	217732_s_at	-0,0252	ITM2B	13	q14.2
66	214482_at	0,0861	ZBTB25	14	q23.3
67	200701_at	-0,0210	NPC2	14	q24.3
68	238662_at	0,0490	ATPBD4	15	q14
69	217548_at	-0,0423	C15orf38	15	q26.1
70	213007_at	-0,0106	FANCI	15	q26.1
71	231989_s_at	0,0730	SMG1	16	p12.3
72	238116_at	0,0661	DYNLRB2	16	q23.2
73	212282_at	0,0530	TMEM97	17	q11.2
74	203145_at	-0,0002	SPAG5	17	q11.2
75	201292_at	-0,0372	TOP2A	17	q21.2
76	210334_x_at	0,0175	BIRC5	17	q25.3
77	212055_at	0,0384	C18orf10	18	q12.2
78	242180_at	-0,0585	TSPAN16	19	p13.2
79	208904_s_at	-0,0334	RPS28	19	p13.2
80	213350_at	0,0056	RPS11	19	q13.3
81	200875_s_at	0,0437	NOP56	20	p13
82	212788_x_at	-0,0164	FTL	19	p13
83	215181_at	-0,0342	CDH22	20	q13.12
84	221677_s_at	0,0126	DONSON	21	q22.11

#	Sondas	Beta	Gen	Cromosoma	Banda
85	201102_s_at	0,0349	PFKL	21	q22.3
86	208667_s_at	-0,0390	ST13	22	q13.2
87	216473_x_at	-0,0576	DUX4	4/10	q35.2 / q26.3
88	200933_x_at	-0,0323	RPS4X	X	q13.1
89	218355_at	0,0116	KIF4A	X	q13.1
90	221606_s_at	0,0208	HMG5	X	q21.1
91	225601_at	0,0750	HMGB3	X	q28
92	214612_x_at	0,0496	MAGEA6	X	q28

5 Un umbral de corte de dicotomización se basó en la definición clínicamente relevante de pacientes de alto riesgo tal como aquellos pacientes que tienen una supervivencia general de menos de 2 años. Esto equivale a una proporción del 21,7% en el conjunto de entrenamiento y un valor de corte de 0,827. En los cuatro bases de datos TT2 (n = 351) [11], TT3 (n = 208) [11], MRC-IX (n = 247) [14] y APEX (n = 264) [12], la firma de genes EMC-92 discriminó a un grupo de alto riesgo, que se diferenció significativamente del grupo de riesgo estándar (Figuras 1a hasta d).

10 En los bases de datos que contienen pacientes recién diagnosticados, la firma de genes EMC-92 seleccionó una población de alto riesgo de 17,7% en promedio, con un OS significativamente más corto y una relación de riesgo de 3,52 ($p = 2,5 \times 10^{-8}$; TT2), 2,7 ($p = 0,07$; TT3) y 2,38 ($p = 3,6 \times 10^{-6}$; MRC-IX). En la recaída, la firma de genes EMC-92 también filtró a los pacientes de alto riesgo con una razón de alto riesgo de 3,14 ($p = 5,3 \times 10^{-9}$; APEX). La proporción de pacientes de alto riesgo en este último estudio fue menor en comparación con los estudios de MRC-IX y TT2, pero no significativa (15,9%, n = 264 frente a 19,6%, n =; $p = 0,2$) (Tabla 1.1).

15 En un análisis de covarianza multivariante, la firma de genes EMC-92 fue independiente de la mayoría de los factores de pronóstico estándar y características clínicas. Tres bases de datos estaban disponibles para este análisis: HOVON65/GMMG-HD4, APEX y MRC-IX. El análisis multivariante del estudio HOVON65/GMMG-HD4 demuestra que junto con la firma EMC-92, $\beta_2m \geq 3,5mg/L$ y el trasplante alogénico estaban significativamente relacionados con una supervivencia menor, mientras que se encontró que el estatus de OMS [0] estaba significativamente relacionado con una supervivencia mayor. En el APEX, el nivel de albúmina, se encontró que ISS y el isotipo IgG estaban significativamente relacionados. Para el MRC-IX, se encontraron principalmente covariantes ISS relacionadas. WHO [2], 1q gain y IGHsplit mostraron una clara contribución. IGHsplit indica todos los pacientes con aberración citogenética del locus IGH. La edad tenía una proporción de riesgo pequeña pero significativa aquí. En los tres bases de datos, la firma de genes EMC-92 sigue siendo un fuerte predictor de supervivencia después de la corrección de las variables disponibles.

25 A las muestras de los cuatro conjuntos de validación se les asignó una etiqueta de agrupamiento molecular por la clasificación del vecino más cercano. La regresión logística para la asociación entre los grupos moleculares y los resultados de alto riesgo reveló una relación significativa entre la clasificación de alto riesgo y los grupos MF, MS, PR y HY.

30 Comparando el conjunto génico UAMS-17 y EMC-92 en bases de datos independientes (es decir, TT3, MRC-IX y APEX), una proporción significativamente mayor de pacientes fue clasificada como de alto riesgo mediante la firma de genes EMC-92 ($p = 0,009$). Además, las razones de riesgo estimadas (alto riesgo/riesgo estándar) fueron mayores en el clasificador de genes EMC-92, con la excepción del estudio de TT3.

35 En la población de estudio de MRC-IX, el clasificador de genes EMC-92 identificó exclusivamente 31 pacientes correctamente como pacientes de alto riesgo, que se perdieron en el clasificador de genes UAMS-17 (tasa de supervivencia del 50% de 11, 24 y 51 meses para el grupo de alto riesgo compartido, el grupo de alto riesgo intermedio y los grupos de riesgo estándar, respectivamente). Además, el clasificador de genes UAMS-17 identificó exclusivamente 10 pacientes como pacientes de alto riesgo con una menor proporción de riesgo en comparación con los 31 pacientes clasificados como de alto riesgo por el clasificador de genes EMC92.

40 La superioridad del clasificador EMC-92 fue aún más clara en la población de APEX. En este caso, 24 pacientes fueron identificados exclusivamente como de alto riesgo en el clasificador EMC-92, que se perdieron en el clasificador UAMS-17. Estos 24 pacientes formaron un grupo cuya supervivencia general después de 20 meses fue del 14%, mientras que la población de alto riesgo identificada en el clasificador EMC-92 y UAMS-17 mostró una supervivencia general del 25% después de 20 meses.

Además, se aplicaron a los bases de datos el clasificador de genes UAMS-70, la firma de genes MRC-IX-6, la puntuación GPI, la firma Millennium e IFM. En un par de análisis multivariante con base en los bases de datos independientes agrupados, incluyendo dos clasificadores a la vez y la corrección por estudio y la edad, el clasificador de genes EMC-92 tuvo las relaciones de riesgo más altas y los valores p más bajos de todos los clasificadores.

La intersección de los pacientes de alto riesgo entre los clasificadores de genes EMC-92 y UAMS-17 fue de ~ 8% de la población total. Alrededor del 14% de los pacientes fueron clasificados como de alto riesgo por cualquiera de estos clasificadores. El grupo de alto riesgo que se entrecruzó mostró las diferencias más grandes en comparación con el grupo de intersección de riesgo estándar, según lo indicado por las relaciones de riesgo (HR = 5,40; $p = 3,1 \times 10^{-3}$; TT3), (HR = 3,84; $p = 5 \times 10^{-7}$, MRC-IX) y (HR = 3,39, $p = 1,9 \times 10^{-5}$, APEX). El 14% de los pacientes únicamente clasificados como de alto riesgo por cualquiera de las firmas, mostró una relación de riesgo intermedia. Para el grupo de alto riesgo del clasificador de genes UAMS-17 esto dio como resultado relaciones de riesgo de 4,08 ($p = 7,6 \times 10^{-2}$), 1,92 ($p = 7,7 \times 10^{-2}$) y 2,31 ($p = 2,3 \times 10^{-2}$) para el TT3, MRX-IX y APEX. El grupo de alto riesgo del clasificador de genes EMC-92 produjo relaciones de riesgo de 0 ($p = 1,0$ sin eventos), 1,98 ($p = 2,9 \times 10^{-34}$) y 3,21 ($p = 1,6 \times 10^{-6}$) para el TT3, MRX-IX y APEX.

En la práctica clínica, el pronóstico de pacientes con MM se basa principalmente en la etapa de ISS y en la hibridación *in situ* por fluorescencia de interfase (FISH). Varias aberraciones cromosómicas detectadas por FISH tienen implicaciones en el pronóstico [25]. Del(17p) se considera el más importante, asociado con un resultado desfavorable y presente en el 9% de los pacientes [26, 27]. Sin embargo, el 60% de los pacientes con esta supresión no muestran un mal resultado específico [28]. La combinación de la aberración cromosómica, t(4; 14), del(17p) e ISS, han delineado aún más a los pacientes con mal pronóstico [29].

Anteriormente, en la clasificación de UAMS, los grupos MS, MF y PR mostraron PFS y OS menores, mientras que los grupos HY, LB, CD-1 y CD-2 se asociaron con PFS y OS mayores [8]. En este sentido, se evaluó la variabilidad en PFS y OS en los grupos con base en GEP de la clasificación de HOVON65. Los pacientes tratados con VAD muestran diferencias significativas en PFS y OS entre grupos con una supervivencia claramente reducida para el subgrupo MF, mientras que en pacientes tratados con bortezomib (PAD) no se encontraron diferencias significativas.

Se ha demostrado que el tratamiento con base en bortezomib supera ciertos marcadores de pronóstico adverso tales como del(13q) dando como resultado una mejor PFS y OS en pacientes con marcadores de pronóstico más pobres tales como ISS-3, del(17p) y t(4; 14) [16]. Tanto los marcadores cromosómicos como la clasificación con base en GEP de HOVON65 varían con el tratamiento y no son aplicables para diagnosticar con precisión a los pacientes de alto riesgo. Por lo tanto, se desarrolló una firma de GEP de alto riesgo.

Los clasificadores anteriores incluyen a los clasificadores de genes UAMS-17/70 y MRC-IX-6, ambos capaces de predecir en bases de datos independientes [11, 14]. Por el contrario, las firmas Millennium y el IFM muestran un menor desempeño sólido en conjuntos de validación independiente [12, 13].

La firma de expresión de genes EMC-92 presentada en este documento, es altamente discriminatoria para pacientes con alto riesgo frente a riesgo estándar de MM a través de regímenes diferentes (de inducción). La validación en ensayos TT2 de UAMS (con base en talidomida) [17], TT3 (con base en bortezomib) [18] y MRC-IX (mantenimiento con talidomida tanto en pacientes jóvenes como ancianos) [19, 20] mostró un alto rendimiento en estos ambientes de prueba independientes. Esto es cierto tanto para el ajuste continuo del modelo -que es un indicador de la bondad del ajuste- así como para la salida dicotomizada en riesgo alto/riesgo estándar, que es un requisito para el uso práctico en un entorno clínico.

En análisis multivariante, la firma de alto riesgo de genes EMC-92 sigue siendo un predictor fuerte para muerte temprana. Sin embargo, hay pruebas sólidas de que la estadificación del ISS (niveles de albúmina de suero y β_2m) resulta ser otro factor importante para explicar la varianza relacionada con la supervivencia en presencia de la firma. Por lo tanto, incorporar ISS en la firma podría conducir potencialmente a una predicción aún mejor de la supervivencia.

Los pacientes clasificados como de alto riesgo están sobrerrepresentados dentro de los grupos moleculares MF, MS y PR y están subrepresentados dentro del grupo HY. Esto se correlaciona bien con datos previos: HY representa a los pacientes hiperdiploides con un pronóstico generalmente favorable; por otro lado, MS y MF representan pacientes con translocaciones t(4; 14) y t(14; 16/20) que suelen tener un pronóstico desfavorable. Por último, PR representa el grupo de proliferación, que se demostró que se asocia con mal pronóstico [8, 11, 15]. En relación con esto, el análisis de vía de la firma de genes EMC-92 demostró que la regulación del ciclo celular estaba entre las principales funciones encontradas.

En la firma de genes EMC-92, así como el conjunto de genes enlazados a la supervivencia en el análisis univariado, la localización cromosómica de 1q se enriqueció en gran medida (tabla 1) como se mostró anteriormente para la firma de genes UAMS-17 [11]. Además, los conjuntos de sondas situados en el cromosoma 4 están enriquecidos. Se encontró que estos conjuntos de sondas estaban dispersos sobre todo el cromosoma y no sólo en el extremo distal del brazo p donde se localizan MMSET y FGFR3. El cromosoma 4 no se había considerado previamente como un

factor de riesgo, pero se ha reportado una baja frecuencia de múltiples ganancias y/o pérdidas que afectan a este cromosoma [30].

5 La firma de genes EMC-92 se comparó en un análisis multivariable con el clasificador de genes UAMS-17/70, MRC-IX-6, el puntaje de GPI, los clasificadores IFM y Millennium. Se formaron tres bases de datos agrupadas a partir de las bases de datos públicamente disponibles de MM, lo que permite una comparación independiente de las firmas que no fueron entrenadas en esas bases de datos (Kuiper, R. et al., Leukemia 2012). Los resultados de las firmas se introdujeron en un modelo de riesgos proporcionales de Cox, véase la Tabla 2. En las tres comparaciones, la firma de EMC-92 obtuvo la relación de riesgo (HR) más significativa, y por lo tanto el factor de pronóstico más relevante de todas las firmas (incluyendo las UAMS-70 de Signal Genetics).

10 Tabla 2 Comparación de EMC 92 con ensayos convencionales (HR = relación de riesgo)

	Bases de datos agrupadas	Firma	HR	valor P
Comparación 1	MRCIX + APEX + TT3	SKY92 ¹¹	1,75	4,60E-04
		UAMS17 ¹⁰	1,22	3,30E-01
		UAMS70 ¹⁰	1,80	1,10E-03
		IFM15 ¹²	1,25	9,10E-02
Comparación 2	APEX + TT2 + TT3	SKY92	2,53	3,70E-09
		MRCIX6 ¹³	1,50	4,10E-03
		IFM15	1,38	2,50E-02
Comparación 3	MRCIX + TT2 + TT3	SKY92	2,95	5,60E-12
		Millennium100 ¹⁴	0,81	1,30E-01
		IFM15	1,13	4,00E-01

15 La firma de genes EMC-92 resulta tener el mejor comportamiento dicotomizado en sus conjuntos de validación. Además, en comparación con otros clasificadores, la proporción de pacientes de alto riesgo es mayor. Uno podría esperar que las diferencias entre riesgo alto y riesgo estándar se vuelvan menos pronunciadas a medida que aumenta la proporción de alto riesgo. Debe mencionarse que incluso en esta proporción alta, las diferencias en el tiempo de supervivencia son mayores para EMC-92 en comparación con otros clasificadores que seleccionan grupos de riesgo más pequeños.

En un análisis multivariante que combina las firmas, la firma de genes EMC-92 tenía la capacidad discriminativa más fuerte.

20 En conclusión, se desarrolló una firma de alto riesgo altamente discriminatoria para pacientes con alto riesgo frente a riesgo estándar de MM, independientemente del régimen de tratamiento, edad y recaídas. El uso de esta firma en el contexto clínico puede conducir a una elección de tratamiento más informada y un resultado potencialmente mejor para el paciente.

25 En conclusión, nuestro estudio se refiere al desarrollo de una robusta firma de alto riesgo, incorpora la mayoría de los marcadores de pronóstico conocidos, clínicos, citogenéticos y GEP, y muestra que la firma desarrollada de genes EMC-92 es el marcador conocido de pronóstico independiente más fuerte para supervivencia pobre. Esta firma de genes EMC-92 es capaz de seleccionar un grupo de alto riesgo de pacientes con MM para quienes, en el futuro, deben buscarse tratamientos alternativos más intensivos.

30 La presente descripción se refiere a un método para determinar el resultado o pronóstico de la enfermedad de un paciente diagnosticado con mieloma múltiple clasificando dicho paciente en una categoría de alto riesgo o de bajo riesgo, comprendiendo dicho método las etapas de

a) proporcionar un chip genético que comprende sondas para la detección de al menos el conjunto de genes 92 de acuerdo con la tabla 1,

b) poner en contacto el chip genético con una muestra que comprende ARNm de un paciente,

35 c) determinar los niveles de expresión del conjunto de 92 genes en la muestra,

d) normalizar los niveles de expresión utilizando normalización media/varianza para obtener el valor de expresión normalizado,

e) multiplicar el valor de expresión normalizado con el valor beta de acuerdo con la tabla 1 para obtener el valor calculado para una sonda individual,

5 f) determinar una puntuación de EMC-92 por suma de los valores calculados de las sondas individuales,

en donde una puntuación de EMC-92 por encima de un umbral predeterminado indica que el paciente debe clasificarse en la categoría de alto riesgo y una puntuación igual o inferior al umbral indica que el paciente debe clasificarse en la categoría de bajo riesgo.

10 Como se detalla adicionalmente aquí, un valor de umbral preferido es al menos 0,75, se prefiere especialmente un valor de umbral de 0,827.

15 En resumen, aquí se informa sobre la generación y validación de la firma de EMC-92, que se basó en el ensayo clínico HOVON65/GMMG-HD4. Los marcadores de pronóstico convencionales como la etapa de ISS y una citogenética adversa se han incrementado con firmas basadas en la expresión génica con el fin de aumentar la precisión en la predicción de los resultados en MM. Un pronóstico más preciso puede conducir al desarrollo de programas de tratamiento que están específicamente dirigidos a mejorar la supervivencia de los pacientes con alto riesgo de MM.

20 Para la relevancia clínica, una firma debe tener tanto la capacidad de separar grupos de riesgo tan claramente como sea posible y de predecir grupos estables de tamaño relevante. La firma EMC-92 cumple ambos criterios. En todos los conjuntos de validación un grupo de pacientes de alto riesgo puede ser significativamente determinado y la proporción de pacientes de alto riesgo es estable a través de los conjuntos de validación. Los conjuntos de validación representan diferentes regímenes de fármacos, incluyendo talidomida (MRC-IX, TT2) y bortezomib (APEX, TT3). Además, la firma es relevante tanto para los pacientes elegibles para trasplante (por ejemplo, TT3) como para aquellos que no son elegibles para trasplante (subconjunto de MRC-IX), así como los pacientes recientemente diagnosticados (por ejemplo, TT2) y recidivantes (APEX). Por el contrario, las predicciones de las firmas IFM-15 y MILLENIUM-100 en los conjuntos de validación no alcanzan significación en bases de datos independientes tales como MRC-IX y TT3.

25 En conclusión, se ha desarrollado una firma de riesgo que es altamente discriminatoria para los pacientes con alto riesgo frente a riesgo estándar de MM, independientemente del régimen de tratamiento, la edad y la recaída. El uso de esta firma en el contexto clínico puede conducir a una elección de tratamiento más informada y un resultado potencialmente mejor para el paciente.

30 Leyenda de las figuras

Figura 1. Rendimiento del clasificador EMC-92 en la predicción de la supervivencia general. Firma de alto riesgo en cuatro conjuntos de validación con un valor de corte fijo de 0,827. A: Terapia total UAMS 2. B: Terapia total UAMS 3. C: MRC-IX. D: APEX.

35 Figura 2. Relación entre el umbral y el rendimiento de rango logarítmico de la firma EMC-92 en la OS HOVON-65/GMMG-HD4. El modelo tiene un rendimiento óptimo para umbrales de al menos 0,75. Un punto de corte de alto riesgo se basó en una definición de alto riesgo como un OS de <2 años dentro del conjunto de entrenamiento que correspondió a un umbral de 0,827.

Ejemplos.

40 Ejemplo 1: Pacientes

Se utilizaron cinco bases de datos previamente descritas, de las cuales se disponía tanto de supervivencia como de GEP de células plasmáticas purificadas obtenidas de aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma. Estos son HOVON65/GMMG-HD4 (n = 320) (GSE19784) [9], Terapia Total 2 (TT2) (n = 351) [11], TT3 (n = 208) (GSE2658) [11], MRC-IX (n = 247) (GSE15695) [14], y APEX (n = 264) (GSE9782) [12].

45 Los datos de HOVON65/GMMG-HD4 se usaron como un conjunto de entrenamiento. Este ensayo multicéntrico comparó la eficacia del bortezomib (PAD) con el tratamiento estándar (VAD) en pacientes recién diagnosticados. Los pacientes fueron asignados al azar para el tratamiento de inducción con tres ciclos de VAD o PAD [16] para un total de 290 pacientes tanto de seguimiento como GEP estaban disponibles [9].

50 Las otras cuatro bases de datos independientes se utilizaron como validación. Dos bases de datos, TT2 y TT3, se derivaron de ensayos clínicos realizados en pacientes recién diagnosticados tratados con un régimen complejo. El primero fue un ensayo de tratamiento prospectivo realizado al azar en el que los pacientes fueron asignados aleatoriamente para recibir o no recibir talidomida durante todas las fases del tratamiento [17]. Este último, fue llevado a cabo por el mismo grupo de acuerdo con el mismo régimen, pero con la adición de bortezomib al brazo de talidomida [18]. TT3 es un conjunto muy pequeño con sólo 15 eventos OS, pero se incluye aquí para completar.

El ensayo de MRC-IX incluyó tanto pacientes jóvenes como mayores, recién diagnosticados. Para los pacientes más jóvenes el tratamiento consistió en inducción con vincristina o sin vincristina seguida de trasplante. Los pacientes mayores fueron tratados inicialmente con un tratamiento a base de talidomida frente a melfalán. El mantenimiento de pacientes jóvenes y ancianos fue una comparación de talidomida frente a sin talidomida [19, 20]. El ensayo y la base de datos mencionada aquí como APEX consistió de tres ensayos APEX, SUMMIT y CREST. Estos ensayos tenían como objetivo probar la eficacia del bortezomib en casos de recaída [21 - 23].

La base de datos IFM en el que se basó la firma de IFM no había sido evaluado debido a una plataforma de GEP incompatible [13].

Ejemplo 2 Análisis de expresión génica.

Se usaron dos tipos de plataformas de expresión génica Affymetrix. Se utilizó la matriz Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 en HOVON65/GMMG-HD4, TT2, TT3 y MRC-IX, mientras que se usaron los chips de Affymetrix HG U133 A/B en el estudio APEX. Para permitir la validación en diferentes estudios, sólo se incluyeron conjuntos de sondas presentes en ambas plataformas. Se fijó un límite de expresión de conjunto de sonda inferior a la expresión más baja del 5% para los controles de hibridación bioB en el conjunto HOVON65/GMMG-HD4. Se excluyeron los conjuntos de sondas con una expresión menor a $\geq 95\%$ de los pacientes de HOVON65/GMMG-HD4. Todos los datos fueron normalizados con MAS5, transformados con \log_2 y escalados con varianza media.

La clasificación molecular de HOVON65/GMMG-HD4 se realizó previamente [9]. Para asignar una etiqueta de grupo a nuevas muestras de validación, se utilizó un algoritmo del vecino euclidiano más cercano siendo HOVON65/GMMG-HD4 el conjunto de referencia.

Se usó HOVON65/GMMG-HD4 como conjunto de entrenamiento para construir un clasificador de supervivencia con base en GEP. El modelo se construyó utilizando un marco de Análisis de componente principal supervisado (SPCA). Todos los cálculos se realizaron en el entorno estadístico R utilizando el paquete de supervivencia para el análisis de supervivencia. El paquete maxstat se utilizó para determinar el valor de corte óptimo para alto riesgo.

Los datos se analizaron utilizando Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems®, www.ingenuity.com). Se analizaron tanto el conjunto de genes correspondiente al clasificador de supervivencia con base en SPCA como el conjunto de genes generado por la clasificación univariable inicial (FDR <10%). Se utilizaron como referencia los conjuntos de sondas presentes tanto en las plataformas HG U133 Plus 2.0 como A/B. Los valores P se derivaron de las pruebas exactas de Fisher de cola derecha corregidas para pruebas múltiples usando la corrección de Benjamini Hochberg.

Ejemplo 3 Comparación con firmas publicadas de genes

Se propuso evaluar el rendimiento de la firma EMC-92 en relación con las firmas de pronóstico disponibles con base en GEP para OS en MM. Para ello se evaluaron las siguientes firmas: UAMS-70, UAMS-17, UAMS-80, IFM-15, índice de proliferación génica (GPI-50), MRC-IX-6 y MILLENNIUM-100.

Estas firmas se evaluaron tanto como variables continuas, así como utilizando los valores de corte publicados (Figura 2 y Figuras 2a-e en la referencia 31, y los documentos suplementarios A y B en la referencia 31). En general, se observó que el rendimiento de la firma EMC-92 era sólido y consistente, lo que se compara favorablemente con las firmas publicadas anteriormente. Específicamente, las firmas EMC-92, UAMS, MRC-IX y GPI-50 demostraron significancia en todos los conjuntos de validación analizados tanto para los valores dicotomizados como para los continuos de las firmas. La significancia se alcanzó en tres de cada cinco estudios para la firma IFM-15 utilizando un modelo dicotomizado, mientras que la firma MILLENNIUM-100 tuvo un desempeño significativo en el modelo dicotomizado en uno de cada cuatro estudios independientes. Por lo tanto, el rendimiento fue menos robusto para las firmas IFM-15 y MILLENNIUM-100. Aunque se encontró que el índice de proliferación GPI-50 era significativo en todos los conjuntos de validación ensayados, la proporción de pacientes de alto riesgo era mucho menor en comparación con la proporción encontrada usando las firmas EMC-92 o UAMS-80. Las proporciones clasificadas y ponderadas como de alto riesgo son GPI: 10,0%, UAMS-17: 12,4%, UAMS-70: 13,0%, MRC-IX-6: 13,3%, EMC-92: 19,1% y UAMS-80: 23,4%. Para determinar qué firma explicaba mejor la supervivencia observada, se realizaron comparaciones en pares. Para cada comparación el EMC-92 fue el predictor más fuerte para OS probado en un entorno independiente (Figura 3 y la Tabla suplementaria S9 en la referencia 31).

Ejemplo 4: Clasificadores de riesgo combinado

El comportamiento de la firma EMC-92 estaba en consonancia con las firmas UAMS, aunque se derivaban de poblaciones de pacientes bastante diferentes. La intersección de los pacientes de alto riesgo entre las firmas EMC-92 y UAMS-70 fue $\sim 8\%$ de la población total en las bases de datos agrupados que eran independientes de nuestro conjunto de entrenamiento y el conjunto de entrenamiento UAMS-70 (es decir, MRC-IX, TT3 y APEX, Tabla Suplementaria S11 en la referencia 31). Aproximadamente el 13% de los pacientes fueron clasificados como de alto riesgo por cualquiera de estas firmas. El grupo de intersección de alto riesgo tuvo el HR más alto en comparación con el grupo de riesgo estándar de intersección (HR = 3,87, 95% CI = 2,76-5,42, P = $3,6 \times 10^{-15}$). Los pacientes clasificados como de alto riesgo por cualquiera de las firmas mostraron un riesgo intermedio, es decir, con un HR de

2,42, 95% CI = 1,76-3,32, para la firma EMC-92 ($P = 5,1 \times 10^{-8}$) y un HR de 2,22, 95% CI = 1,20-4,11, para la firma UAMS-70 ($P = 1,1 \times 10^{-2}$, Tabla Suplementaria S12 en la referencia 31).

Ejemplo 5: firma EMC-92 y FISH

5 Para comparar la composición de poblaciones de alto riesgo definida por las firmas EMC-92 y UAMS-70, se
determinaron las frecuencias de aberraciones citogenéticas en ambas poblaciones usando un conjunto
independiente para el que se conocían variables citogenéticas, es decir, MRC-IX (Figura 4 y Tabla Suplementaria
S13 en la referencia 31). Como se esperaba, el pobre pronóstico de aberraciones citogenéticas 1q gain, del(17p),
t(4; 14), t(14; 16), t(14; 20) y del(13q) se enriquecieron en las poblaciones de alto riesgo (Figura 5 en la referencia
10 31), mientras que las aberraciones citogenéticas de riesgo estándar tales como t(11; 14) disminuyeron en las
poblaciones de alto riesgo. Por el contrario, sólo el 15% (6 de 39) de los casos de MRC-IX con estatus de alto riesgo
como se determinó según la firma EMC-92 mostraron ausencia de cualquier aberración citogenética mal
pronosticada, frente al 44% (74 de 168) en casos de riesgo estándar ($P = 1,8 \times 10^{-3}$). Del mismo modo, de los
15 pacientes de alto riesgo definidos por UAMS-70 el 4% (1 de 23) no tenía ninguna citogenética de pronóstico
deficiente, mientras que de los pacientes con riesgo estándar definido por la UAMS-70, esta proporción fue del 43%
(79 de 183) ($P = 5,3 \times 10^{-3}$).

Referencias

1. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005 May 20; 23(15): 3412-20. □
- 20 2. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular Pathogenesis and a Consequent Classification of Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 10; 23(26): 6333-8.
3. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood.* 2003 Oct 1; 102(7): 2562-7.
4. Fonseca R, Hoyer JD, Aguayo P, Jalal SM, Ahmann GJ, Rajkumar SV, et al. Clinical significance of the translocation (11;14) (q13; q32) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1999; 35(5-6): 599-605.
- 25 5. Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood.* 2003 Feb 15; 101(4): 1520-9. □
6. Avet-Loiseau H, Malard F, Campion L, Magrangeas F, Sebban C, Lioure B, et al. Translocation t(14;16) and multiple myeloma: is it really an independent prognostic factor? *Blood.* 2011 Feb 10; 117(6): 2009-11.
- 30 7. Cremer FW, Bila J, Buck I, Kartal M, Hose D, Itrich C, et al. Delineation of distinct subgroups of multiple myeloma and a model for clonal evolution based on interphase cytogenetics. *Genes, chromosomes & cancer.* 2005 Oct; 44(2): 194-203. □
8. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood.* 2006 Sep 15; 108(6): 2020-8.
- 35 9. Broyl A, Hose D, Lokhorst H, de Knegt Y, Peeters J, Jauch A, et al. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood.* 2010 Oct 7; 116(14): 2543-53. □
10. Chng WJ, Kuehl WM, Bergsagel PL, Fonseca R. Translocation t(4;14) retains prognostic significance even in the setting of high-risk molecular signature. *Leukemia.* 2008 Feb; 22(2): 459-61.
- 40 11. Shaughnessy JD, Jr., Zhan F, Burington BE, Huang Y, Colla S, Hanamura I, et al. A validated gene expression model of high-risk multiple myeloma is defined by deregulated expression of genes mapping to chromosome 1. *Blood.* 2007 Mar 15; 109(6): 2276-84. □
12. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B, Zhan F, Chng WJ, Roels S, et al. Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood.* 2007 Apr 15; 109(8): 3177-88.
- 45 13. Decaux O, Lode L, Magrangeas F, Charbonnel C, Gouraud W, Jezequel P, et al. Prediction of survival in multiple myeloma based on gene expression profiles reveals cell cycle and chromosomal instability signatures in high-risk patients and hyperdiploid signatures in low-risk patients: a study of the Intergroupe Francophone du Myelome. *J Clin Oncol.* 2008 Oct 10; 26(29): 4798-805.
14. Dickens NJ, Walker BA, Leone PE, Johnson DC, Brito JL, Zeisig A, et al. Homozygous deletion mapping in myeloma samples identifies genes and an expression signature relevant to pathogenesis and outcome. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar 15; 16(6): 1856-64.
- 50 15. Hose D, Reme T, Hielscher T, Moreaux J, Messner T, Seckinger A, et al. Proliferation is a central independent prognostic factor and target for personalized and risk-adapted treatment in multiple myeloma. *Haematologica.* 2011 Jan; 96(1): 87-95. □

16. Sonneveld P, Schmidt-Wolf I, van der Holt B, Jarari Le, Bertsch U, Salwender H, et al. HOVON-65/GMMG-HD4 Randomized Phase III Trial Comparing Bortezomib, Doxorubicin, Dexamethasone (PAD) Vs VAD Followed by High-Dose Melphalan (HDM) and Maintenance with Bortezomib or Thalidomide In Patients with Newly Diagnosed Multiple Myeloma (MM). *Blood*. 2010 Nov 19; 116(21): 40-.
- 5 17. Barlogie B, Pineda-Roman M, van Rhee F, Haessler J, Anaissie E, Hollmig K, et al. Thalidomide arm of Total Therapy 2 improves complete remission duration and survival in myeloma patients with metaphase cytogenetic abnormalities. *Blood*. 2008 Oct 15; 112(8): 3115-21.□
18. Pineda-Roman M, Zangari M, Haessler J, Anaissie E, Tricot G, van Rhee F, et al. Sustained complete remissions in multiple myeloma linked to bortezomib in total therapy 3: comparison with total therapy 2. *British journal of haematology*. 2008 Mar; 140(6): 625-34.
- 10 19. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Bell SE, Szubert AJ, Navarro-Coy N, et al. Thalidomide Maintenance Significantly Improves Progression-Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) of Myeloma Patients When Effective Relapse Treatments Are Used: MRC Myeloma IX Results. *Blood*. 2010 Nov 19; 116(21): 623-□
20. Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Rawstron AC, Bell S, Cocks K, et al. Thalidomide Combinations Improve Response Rates; Results from the MRC IX Study. *Blood*. 2007 Nov 16; 110(11): 3593-.
- 15 21. Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, Siegel D, Irwin D, Richardson PG, et al. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *British journal of haematology*. 2004 Oct; 127(2): 165-72.□
22. Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine*. 2003 Jun 26; 348(26): 2609-17.
- 20 23. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2005 Jun 16; 352(24): 2487-98. 24. Bair E, Hastie T, Paul D, Tibshirani R. Prediction by Supervised Principal Components. *J Amer Statistical Assoc*. 2006 Mar 1; 101 (473): 119-37.
- 25 25. Avet-Loiseau H, Magrangeas F, Moreau P, Attal M, Facon T, Anderson K, et al. Molecular Heterogeneity of Multiple Myeloma: Pathogenesis, Prognosis, and Therapeutic Implications. *J Clin Oncol*. 2011 May 10; 29(14): 1893-7.□
26. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood*. 2007 Apr 15; 109(8): 3489-95.
- 30 27. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*. 2009 Dec; 23(12): 2210-21.
28. Avet-Loiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P, Guerin-Charbonnel C, Caillot D, et al. Bortezomib plus dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del(17p). *J Clin Oncol*. 2010 Oct 20; 28(30): 4630-4.
- 35 29. Neben K, Jauch A, Bertsch U, Heiss C, Hielscher T, Seckinger A, et al. Combining information regarding chromosomal aberrations t(4;14) and del(17p13) with the International Staging System classification allows stratification of myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Haematologica*. 2010 Jul; 95(7): 1150-7.
- 40 30. Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, Zhang Y, Sinha R, Feng B, et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell*. 2006; 9(4): 313-25.□
31. Kuiper, R. et al., *Leukemia* 2012, 1 - 8 advance on line publication, 22 june 2012; doi:10.1038/leu.2012.127.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el resultado o pronóstico de la enfermedad de un paciente diagnosticado con mieloma múltiple clasificando al paciente en una categoría de alto riesgo o de bajo riesgo usando el análisis de expresión génica de al menos 92 genes como se indica en la tabla 1, en donde el método comprende las etapas de:

- 5
- a. proporcionar un conjunto de sondas para la detección de al menos el conjunto de genes 92 según la tabla 1,
 - b. poner en contacto el conjunto de sondas con una muestra que comprende ARNm de un paciente,
 - c. determinar el nivel de expresión de cada gen individual del conjunto de 92 genes establecidos en la muestra.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el análisis de la expresión génica se realiza en un chip de genes.

Figura 1A

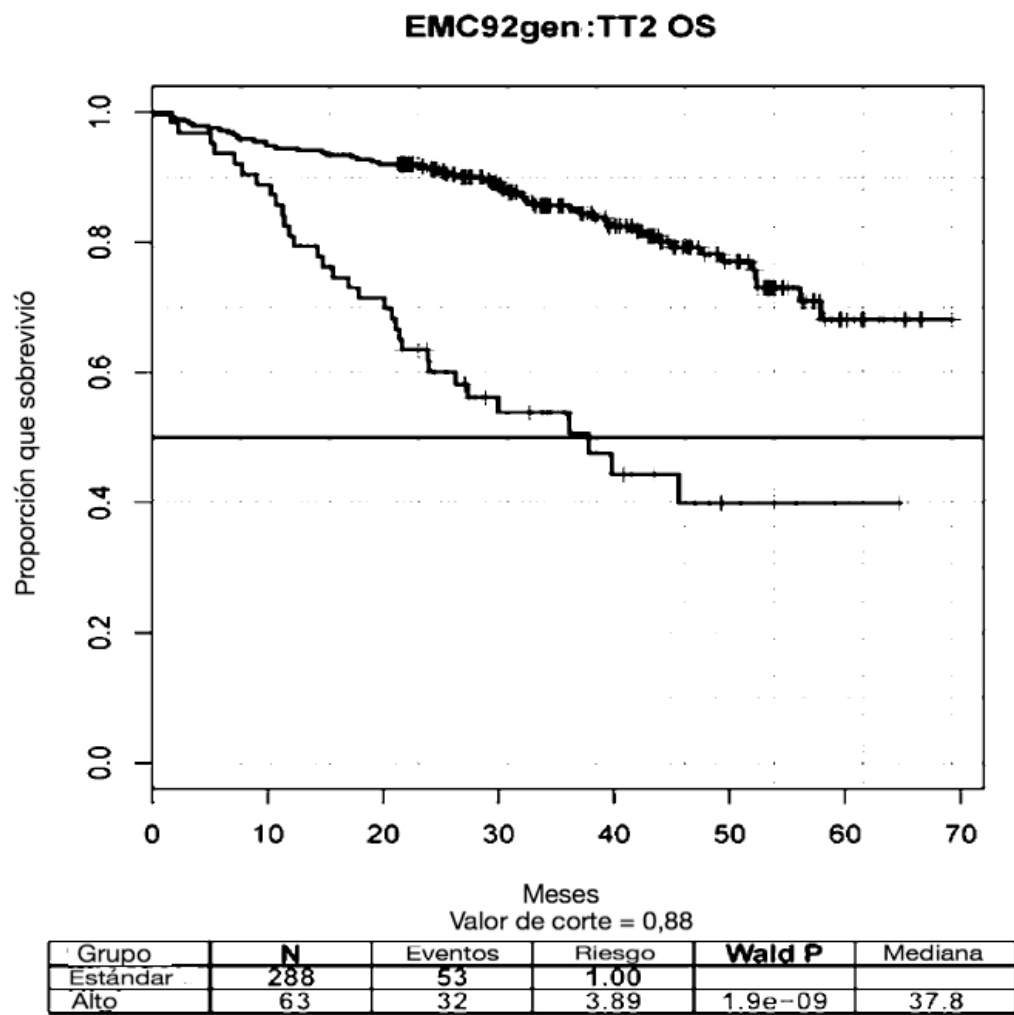


Figura 1B

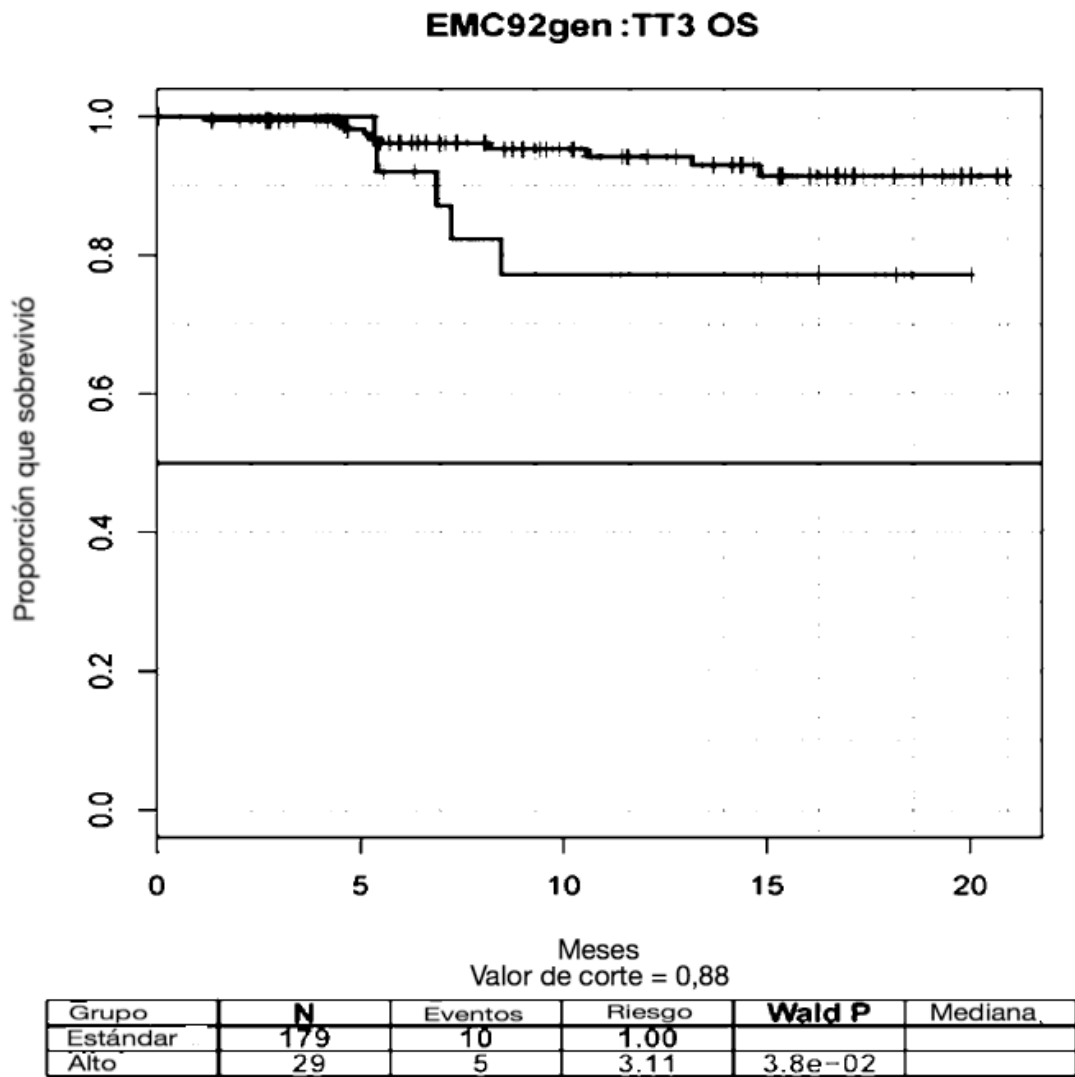


Figura 1C

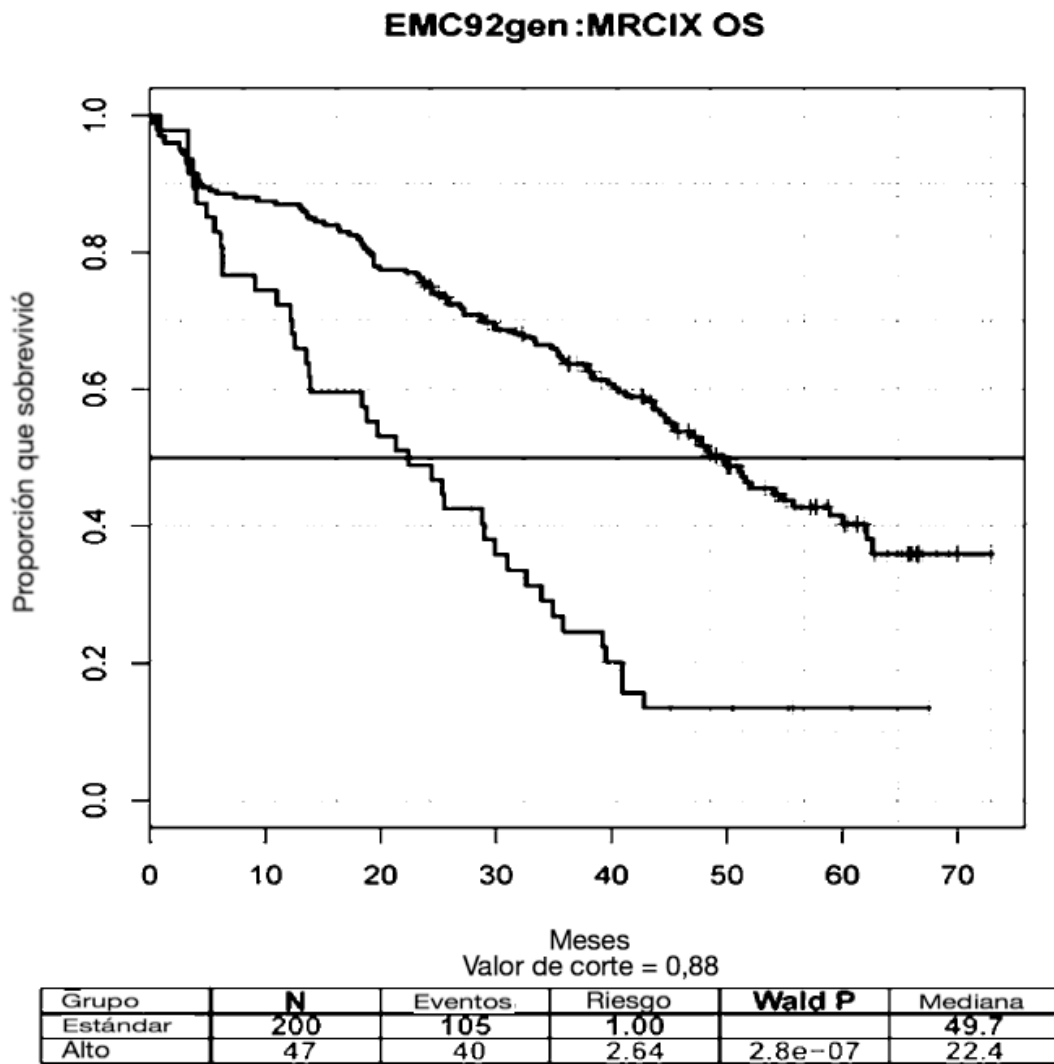


Figura 1D

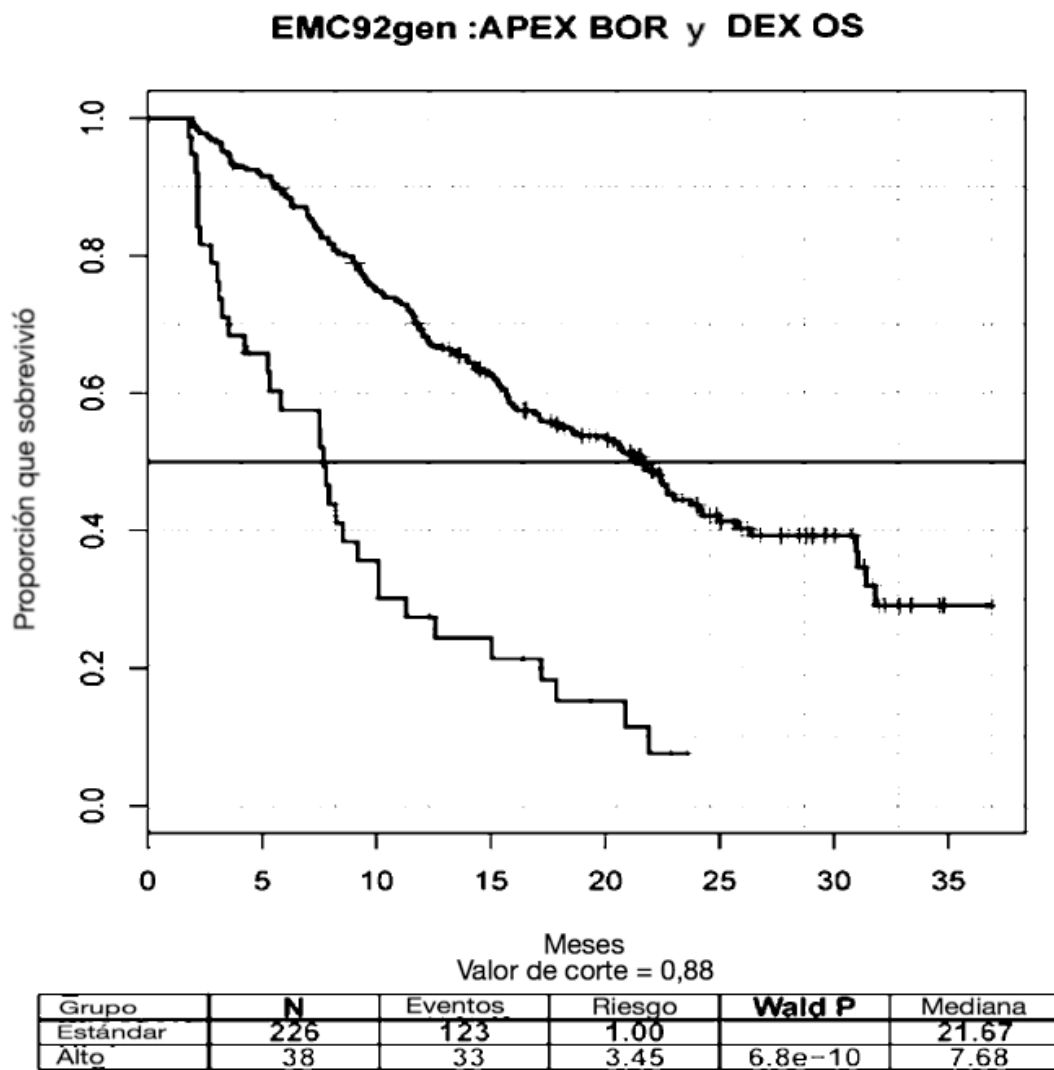


Figura 2.

