

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
23 de junio de 2022 (23.06.2022)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2022/129668 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/6809 (2018.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2021/070899

(22) Fecha de presentación internacional:
15 de diciembre de 2021 (15.12.2021)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P202031253 15 de diciembre de 2020 (15.12.2020) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD DE GRANADA** [—/ES];
HOSPITAL REAL, AVDA. DEL HOSPICIO S/N, 18071
GRANADA (ES).

(72) Inventores: **MEDINA VICO, Pedro**; Universidad de Granada, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, 18071 Granada (ES). **CUADROS CELORRIO, Marta**; Universidad de Granada, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, 18071 Granada (ES). **ANDRADES DELGADO, Álvaro**; Universidad de Granada, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, 18071 Granada (ES). **GARCÍA GARCÍA, Daniel Jesús**; Universidad de Granada, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, 18071 Granada (ES). **RODRÍGUEZ LARA, María Isabel**; Universidad de Granada, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, 18071 Granada (ES). **ÁLVAREZ PÉREZ, Juan Carlos**; Universidad de Granada, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I, 18071 Granada (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: BIOMARKERS FOR DIAGNOSIS, PROGNOSIS, PREVENTION, IMPROVEMENT OR RELIEF IN THE TREATMENT OF CHILDHOOD B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

(54) Título: BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO, PROGNOSIS, PREVENCIÓN, MEJORA O ALIVIO EN EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B PEDIÁTRICA

(57) Abstract: The present invention describes the use of lncRNA AL133346.1, optionally combined with mRNAs, for the diagnosis, prognosis, prevention, improvement, relief or treatment of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia, and methods, kits and devices based on said use.

(57) Resumen: La presente invención describe el uso del lncRNA AL133346.1, combinado o no con mRNAs, para el diagnóstico, pronóstico, prevención, mejora, alivio o tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica y métodos, kits y dispositivos basados en dicho uso.



WO 2022/129668 A1

**BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO, PROGNOSIS, PREVENCIÓN,
MEJORA O ALIVIO EN EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA DE CÉLULAS B PEDIÁTRICA**

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo de la medicina clínica y, más específicamente, al diagnóstico, pronóstico, prevención, mejora, alivio o tratamiento del
10 cáncer.

El objeto principal de la presente invención está relacionado con el uso de RNA no codificante largo (lncRNA o RNAInc), particularmente el LNCRNA AL133346., y de mRNA (o RNAm), en particular del mRNA CCN2, como biomarcadores en el
15 diagnóstico, pronóstico, mejora, alivio o tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica, así como métodos, kits y dispositivos basados en dicho uso.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna infantil más común. La leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica (LLA-B) constituye una neoplasia heterogénea y agresiva en la que se requieren nuevas terapias dirigidas. En los últimos años, nuevas técnicas genómicas y transcriptómicas han acelerado el descubrimiento y la identificación de varios tipos de RNA no codificantes (ncRNA) que pueden
25 desempeñar un papel importante en la biología celular [7-10]. Los ncRNA largos (lncRNA) son transcripciones de más de 200 pb que carecen de capacidad de codificación de proteínas. Los lncRNA son reguladores cruciales de la expresión génica debido a su participación en las modificaciones postranscripcionales de los mRNA, incluido el empalme, la edición, el tráfico, la traducción y la degradación [11, 12].

30

La desregulación de los lncRNA se ha descrito en numerosas enfermedades humanas, incluido el cáncer [13-17]. Esta desregulación se ha asociado a fenotipos oncogénicos o a supresores de tumores [18]. Sin embargo, pocos lncRNA se han relacionado directamente con el desarrollo de la leucemia. En la leucemia mieloide aguda (LMA), la
35 leucemia linfocítica crónica (LLC) y el mieloma múltiple (MM), se ha observado una

desregulación de HOTAIR, y sus niveles elevados de expresión se asoció con una supervivencia menor en pacientes con LMA [19]. En la LMA t (8; 21) positiva, asociada con un buen pronóstico, la sobreexpresión de CCAT1 y PVT1 se correlacionó con un pronóstico desfavorable [20]. Aún es menor el número de estudios que han analizado la expresión de los lncRNA en pacientes pediátricos con LLA-B. Recientemente, la expresión de TCL6 se ha asociado con la LLA-B pediátrica ETV6-RUNX1-positiva. Asimismo, pacientes que expresaron niveles de expresión bajos de TCL6 tuvieron una supervivencia libre de enfermedad más baja que aquellos pacientes que expresaron niveles altos de TCL6 [21]. En otro estudio basado en microarrays, los niveles de expresión de BALR-2 estaban relacionados con: (i) anomalías citogenéticas como t (12; 21) [ETV6 / RUNX1], t (1; 19) [TCF3 / PBX1] y MLL -reorganizado; (ii) subtipos de enfermedades; y (iii) supervivencia de los pacientes con LLA-B [22]. Curiosamente, estos estudios y otros han demostrado que los perfiles de expresión de lncRNA pueden distinguir a nivel molecular distintos subtipos de leucemia [23-28].

A pesar de todos los perfiles de expresión de RNAInc ya descritos, aún no se ha identificado una firma consenso de RNAInc clínicamente relevante para LLA_B pediátrica. La identificación de una firma de RNAInc expresados diferencialmente y sus genes codificadores de proteínas asociados en la LLA-B pediátrica podría conducir a un mejor diagnóstico, a una mejor comprensión de la enfermedad y, en última instancia, a un mejor pronóstico para los pacientes.

Previamente, nuestro grupo de investigación desarrolló un estudio comparativo de los perfiles de expresión de RNAInc de LLA-B pediátrica con y sin la fusión génica ETV6-RUNX1 (Gene Expression Omnibus Accession GSE128254). La expresión elevada del RNAInc TCL6 se asoció con la LLA-B pediátrica ETV6-RUNX1-positiva y con una mejor supervivencia libre de enfermedad, incluso dentro del subtipo positivo para ETV6-RUNX1 [21]. En este trabajo, hemos realizado un estudio comparativo de los perfiles de lncRNA de pacientes pediátricos de LLA-B versus muestras normales, así como cohortes externas independientes.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Heatmap de los RNAIncs expresados diferencialmente en LLA-B vs médula ósea sana. En la parte superior del heatmap, las muestras LLA-B ETV6-RUNX1-

negativas aparecen en color azul, las muestras LLA-B ETV6-RUNX1-positivas aparecen en color rojo, y las médulas óseas sanas aparecen en color verde. La agrupación fue realizada en base al coeficiente de correlación de Spearman.

Figura 2. Volcano plot de los RNAIncs (A) y los genes codificantes de proteínas (B) expresados diferencialmente. en muestras pediátricas de LLA-B vs. médula ósea sana. La línea discontinua horizontal representa un umbral FDR = 0.05. La línea discontinua vertical representa un umbral “fold change” = -1,5 y 1,5. Los puntos rojos representan los RNAIncs expresados diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

Figura 3. Comparación de la expresión de AL133346.1/CCN2 entre muestras pediátricas LLA-B y LLA-T procedentes de los repositorios TARGET (a) y CCLE (b). Los gráficos de dispersión se encuentran coloreados en función del subtipo de LLA. Los tamaños de muestras y la correlación de expresión génica son: TARGET: 120 LLA-B (Coeficiente de correlación de Spearman = 0.717, $p < 0.0001$) vs. 200 LLA-T (Coeficiente de correlación de Spearman = 0.099, $p = 0.163$). CCLE: 14 LLA-B (Coeficiente de correlación de Spearman = 0.799, $p = 0.001$) vs. 16 LLA-T (No disponible).

Figura 4. Localización genómica de AL133346.1/CCN2 en el cromosoma 6. El cuadrado con rayas discontinuas representa un aumento de zoom en el locus. Se muestran todos los exones de CCN2, mientras que solo se incluye el primer exón de AL133346.1. Las regiones reguladoras GH06J131946 y GH06J131976 están representadas mediante cuadrados rojos.

Figura 5. Curvas de supervivencia general Kaplan-Meier de los pacientes LLA-B divididos en dos grupos según si la expresión de RNAm de CCN2 se encontraba por encima o por debajo de la mediana: “CCN2 high” y “CCN2 low”. Se muestran los p-valores del análisis univariable Cox.

Figura 6. Análisis Gene Ontology (GO) de los RNAs asociados con los RNAIncs expresados diferencialmente entre muestras pediátricas de LLA-B y médulas óseas sanas. Se muestran los términos GO regulados al alza (a) y a la baja (b) significativamente enriquecidos. Se incluyen únicamente los términos GO no redundantes tal como se describe en los Métodos.

Figura 7. Comparación de la expresión de AL133346.1 y CCN2 entre los diferentes cariotipos de pacientes pediátricos con LLA-B del microarray (A) y los diferentes subtipos de pacientes pediátricos con LLA-B de TARGET (B). Los diagramas de caja están coloreados según el subtipo de LLA. Los subtipos BCR-ABL y MLL tenían 3 y ninguna muestra respectivamente, por lo que fueron excluidos del diagrama de cajas. Tamaños de muestra: [TCF3-PBX1]: 7; Trisomía 4-10: 10; [ETV6-RUNX1]: 10.

Figura 8. Comparación de las características clínicas según la expresión de AL133346.1 en pacientes pediátricos con LLA-B del conjunto de datos de TARGET. Se muestran los p-valores ajustados por FDR del test exacto de Fisher. Abreviaciones: Chr: Cromosoma; CNS: Sistema Nervioso Central; CNS 1 significa ninguna implicación patológica en el CNS, CNS 2 un nivel muy bajo, and CNS 3 un nivel de implicación muy alto; NA: No Disponible; MLL: gen *MLL*; t(12;21): translocación(12;21); t(1;19): translocación(1;19); t(9;22): translocación(9;22); (+): Positivo; (-): Negativo.

Figura 9. Comparación de las características clínicas de acuerdo con la expresión de CCN2 en pacientes pediátricos con LLA-B del conjunto de datos TARGET. Se muestran los valores p ajustados por FDR del test exacto de Fisher. Abreviaturas: Chr: Cromosoma; SNC: sistema nervioso central; El SNC 1 significa que no hay afectación del SNC, el SNC 2 es un nivel muy bajo y el SNC 3 es una afectación definida del SNC; NA: no disponible; MLL: gen *MLL*; t (12; 21): translocación (12; 21); t (1; 19): translocación (1; 19); t (9; 22): translocación (9; 22); (+): Positivo; (-): Negativo.

Figura 10. Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier de pacientes pediátricos con LLA-B divididos en dos grupos según si la expresión de AL133346.1 estaba por encima o por encima de la mediana: "AL133346.1 alto" y "AL133346.1 bajo". Se muestra el valor p de los análisis univariados de Cox.

Figura 11. Curvas de supervivencia global de Kaplan-Meier de pacientes pediátricos con LLA-T divididos en dos grupos según si la expresión de AL133346.1 (a) y CCN2 (b) no era nula o nula: "AL133346.1 alta", "AL133346.1 bajo", "CCN2 alto" y "CCN2 bajo". Se muestran los valores p del análisis univariado de Cox.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores identificaron 48 RNAInc (RNA no codificante largo) que se expresaron diferencialmente entre LLA-B pediátrica y muestras de médula ósea sana. El par RNAInc/RNA_m más relevante fue AL133346.1/CCN2 (anteriormente conocidos como RP11-69I8.3/CTGF), cuya expresión se correlacionó positivamente y aumentó en las muestras de LLA-B. Su patrón de expresión diferencial y su fuerte correlación se validaron en datos externos de LLA-B del repositorio The Cancer Genome Atlas (TCGA). El análisis de la curva de supervivencia demostró que los pacientes con niveles de expresión de RNA_m "high" de CCN2 tenían una supervivencia general más alta que aquellos con niveles "low" ($p = 0,042$), de modo que este gen podría ser un biomarcador pronóstico independiente en LLA-B pediátrica. Estos hallazgos muestran una de las primeras descripciones detalladas de los perfiles de expresión de lncRNA en LLA-B pediátrica e indican que estos biomarcadores potenciales podrían ayudar en la clasificación de subtipos de leucemia y que la expresión de CCN2 podría predecir la supervivencia de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica.

Las secuencias fueron definidas previamente y están disponibles en Genbank: SEQ ID 1 o SEQ AL133346.1 se identifica con GenBank: AL133346.1 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AL133346.1>] mientras que SEQ ID 2, o SEQ CCN2 se identifica con GenBank ID: 1490 [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=1490>].

Así, un primer aspecto de la invención está relacionado con el uso de RNA_m y de RNA no codificante largo (lncRNA) en medicina. Particularmente con el uso del RNAInc AL133346.1 y el RNA_m CCN2 en medicina.

La invención describe específicamente un método para usar RNA_m para el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica, en el cual el RNA_m es un RNA largo no codificante (RNAInc), y más específicamente el RNAInc AL133346.1, que se usa como biomarcador para el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica. En este caso, junto con el RNAInc AL133346.1, se utilizan otros RNA_m también como marcadores para el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica, y más específicamente el RNA_m CCN2.

Una realización preferida se refiere al uso de AL133346.1 y CCN2 para el diagnóstico, pronóstico, prevención, mejora, alivio o tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica.

- 5 Otro aspecto de la invención se relaciona con un método *in vitro* para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico de la leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica y clasificación de los individuos en a) individuos con alto riesgo de padecer leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica b) individuos con bajo riesgo de padecer leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica, que comprende:
- 10 i) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
ii) cuantificar la cantidad del RNAInc AL133346.1 expresada en la muestra.

Adicionalmente, el método *in vitro* comprende incluye el siguiente paso:

- 15 iii) cuantificar la cantidad de uno o más RNAm presentes en la muestra, y más específicamente el RNAm CCN2.

En otra realización particular, el método *in vitro* de la invención compara los productos de expresión obtenidos en las etapas (ii) y (iii) con una referencia control.

- 20 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos previos (i) - (iii) y que además incluye asignar un individuo del paso (i) al grupo de individuos con alto riesgo de padecer de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátricas cuando los niveles de expresión de AL133346.1, de AL133346.1 y otros RNAm, o AL133346.1 y CCN2 son más altos en
25 comparación con un nivel de referencia.

Los pasos (ii) y/o (iii) de los métodos descritos anteriormente pueden automatizarse total o parcialmente, por ejemplo, mediante un equipo sensor robótico para detectar la cantidad en el paso (ii) o la comparación computarizada en el paso (iii).

30

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero no se limita a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica.

- 35 El término "individuo", como se usa en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente humanos. El término "individuo" no

pretende ser limitante en ningún aspecto; puede ser de cualquier edad, sexo o condición física.

El término "producto de expresión", también llamado "producto génico", se refiere al material bioquímico, ya sea RNA o proteína, resultante de la expresión de un gen. A veces, se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir cómo de activo se encuentra un gen.

En una realización particular, la detección del producto de expresión se realiza mediante al menos uno de los métodos seleccionados entre: HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), LC/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas), ELISA, DAS ELISA, inmunoprecipitación de proteínas, inmunoelectroforesis, Western Blot, inmunotinción de proteínas, Northern Blot, PCR de transcripción inversa (RT-PCR), PCR cuantitativa (q-PCR), RIA (radioinmunoensayo), hibridación in situ, ensayo de protección de nucleasas, secuenciación masiva, técnicas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicas, microarrays de DNA genómico, microarrays de proteínas, microarrays de RNA mensajero, microarrays de DNAC, microarrays de péptidos, micorarrays de tejidos, microarrays de células o transfección, microarrays de anticuerpos, microarraysde lisado o suero, microarrays de proteínas de fase reversa, microarrays de péptidos o microarrays de genotipado.

En otra realización particular, la detección de los productos de expresión SEQ AL133346.1 and SEQ CCN2 se lleva a cabo mediante RT-PCR cuantitativa.

KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION

Otro aspecto de la invención es un kit o dispositivo para el diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica que comprende todos los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de RNAm del RNAInc 133346.1 y/o CCN2.

Los elementos necesarios para el kit descrito en la reivindicación anterior podrían ser todos los cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de detectar y cuantificar las cantidades de RNAm expresadas usando la técnica de RT-PCR cuantitativa.

Además, el kit puede incluir todos los soportes y contenedores necesarios para la puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit también comprende instrucciones para realizar los métodos de la invención.

- 5 En una realización particular, el kit o dispositivo de la invención, que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar detectan los productos de expresión de RNAInc AL133346.1 y de CCN2:
- los cebadores son secuencias de oligonucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente entre 15 y 25 pares de bases, incluso más
 - 10 preferiblemente entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente alrededor de 20 pares de bases, que tienen una identidad de al menos 80% , más preferiblemente de al menos 90%, incluso más preferiblemente de al menos 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos 98%, y particularmente 100%, con un fragmento de la secuencia complementaria de AL133346.1,
 - 15 - las sondas son secuencias de oligonucleótidos de entre 30 y 1100 pares de bases, más preferiblemente entre 100 y 1000 pares de bases, e incluso más preferiblemente entre 150 y 500 pares de bases, que tienen una identidad de al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95%, aún mucho más preferiblemente al menos 98%, y particularmente
 - 20 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a CCN2

Otro aspecto se refiere al uso del kit de la invención para el diagnóstico, pronóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica y clasificación de los individuos en

a) individuos con alto riesgo de padecer leucemia linfoblástica aguda de células B

25 b) personas con bajo riesgo de padecer leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica,

INVENCION IMPLEMENTADA EN ORDENADOR

- 30 Otro aspecto de la invención se refiere a medios de almacenamiento legibles por computadora que comprenden instrucciones de programa capaces de hacer que una computadora realice los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

La invención también se extiende a programas de ordenador adaptados para que

35 cualquier medio de procesamiento pueda realizar los métodos de la invención. Dichos programas pueden adoptar la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente

compilada, o en cualquier otra forma adecuada para su uso en la implementación de los procesos según la invención. Los programas informáticos también abarcan aplicaciones en la nube basadas en este procedimiento.

- 5 En particular, la invención abarca programas informáticos dispuestos en o dentro de un soporte. El operador puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de respaldar el programa. Cuando el programa está incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, el portador puede estar compuesto por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, el portador
10 podría ser un circuito integrado en el que se incluya el programa, estando adaptado el circuito integrado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incrustados en un medio de almacenamiento, como una ROM, un CD ROM o una ROM de semiconductores, una memoria USB o un
15 medio de grabación magnético, por ejemplo, un disquete o un disco. Durado. Alternativamente, los programas podrían apoyarse en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría ser una señal eléctrica u óptica que podría ser transportada a través de un cable eléctrico u óptico, por radio o por cualquier otro medio.

La invención también se extiende a programas de ordenador adaptados para que
20 cualquier medio de procesamiento pueda realizar los métodos de la invención. Dichos programas pueden adoptar la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente compilada, o en cualquier otra forma adecuada para su uso en la implementación de los procesos según la invención. Los programas informáticos también abarcan aplicaciones
25 en la nube basadas en este procedimiento.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende
30 instrucciones de programa capaces de hacer que una computadora lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente en este documento, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, tanto
35 ribonucleótidos (RNA o RNA) como desoxirribonucleótidos (DNA o DNA). Los términos "secuencia de aminoácidos", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se

utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede ser codificante o no codificante modificado química o bioquímicamente.

- 5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención surgirán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden
- 10 limitar la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Materiales y métodos

- 15 A menos que se especifique lo contrario, todos los análisis se realizaron utilizando R (versión 4.0.1) y Bioconductor (versión 3.11).

Análisis estadístico

- La normalización de los datos continuos se evaluó mediante los gráficos Q-Q y el test de Shapiro-Wilk. Para los datos normales, se obtuvo la media y la desviación estándar,
- 20 y se realizaron pruebas t de Student de dos colas tras verificar la igualdad de las varianzas. Para los datos no normales, se obtuvo la mediana y los cuartiles, y se aplicaron pruebas de suma de rangos de Wilcoxon bilateral. Se realizaron ajustes de comparaciones múltiples utilizando el método Benjamini-Hochberg para los casos aplicables.

25 Análisis de los datos de microarray

- Los valores de expresión génica sin procesar y normalizados para cada muestra en el análisis de nuestro estudio previo de microarray [21] están disponibles públicamente en Gene Expression Omnibus (GSE128254). Los métodos para el procesamiento de muestras, la hibridación de microarrays y el análisis de los datos se explican de forma
- 30 detallada en la sección "Preprocesamiento de datos y análisis de expresión diferencial" de los Métodos Suplementarios de la publicación original [21]. Los RNAIncs/RNAs diferencialmente expresados entre muestras tumorales y normales se obtuvieron de aquellos que presentaban una tasa de descubrimiento falso (FDR) $< 0,05$ y un

incremento de expresión en valor absoluto (fold change) > 1,5 veces. Luego, realizamos un agrupamiento jerárquico basado en el coeficiente de correlación de Spearman para identificar los patrones de expresión de RNAm y RNAInc entre el tumor y las muestras de médula ósea sana.

5 **Análisis Gene Ontology**

Realizamos un análisis Gene Ontology para identificar rutas biológicas, funciones moleculares o componentes celulares significativamente enriquecidas relacionados con los RNAIncs expresados diferencialmente identificados en el análisis de microarray entre muestras tumorales y normales (FDR < 0,05, fold change (absoluto) > 1.5). Los genes codificantes de proteínas asociados a los pares RNAInc/RNAm expresados diferencialmente fueron predichos por el fabricante del microarray basándose en su proximidad genómica, uniones de RNAmi predichas y la literatura científica, tal como se describe en “Diseño de microarrays y regulación predicha entre RNAIncs y genes codificantes de proteínas” de los Métodos Suplementarios de la publicación original [21]. Usando estas predicciones, realizamos el análisis Gene Ontology de la siguiente manera:

- i. Encontrando los RNAIncs importantes regulados al alza o a la baja en nuestro análisis de LLA-B pediátrica frente a médula ósea sana. Analizamos los RNAIncs regulados al alza o a la baja de manera separada.
- ii. Usando las predicciones de RNAInc/RNAm, encontrando los RNAm que se predijeron que estaban asociados con los RNAIncs seleccionados.
- iii. Introducir la lista de RNAm en el programa Enrichr [39,40] para encontrar términos ontológicos de genes enriquecidos de forma significativa.
- iv. Simplificar los términos de la ontología genética utilizando el programa ReviGO [41] con los parámetros predeterminados y proporcionando los valores de FDR para cada término GO.

Análisis de conjuntos de datos externos

Descargamos los datos de expresión génica de los pacientes con LLA del portal de datos Genomic Data Commons (Proyecto TARGET, última actualización 6 Junio 2020; N = 506). Los datos fueron descargados utilizando el paquete de R TCGABiolinks (v2.16.0). En el caso de las muestras procedentes del mismo paciente, se descartaron aquellas con un menor tamaño de librería (N = 477). Para los datos de expresión, las lecturas crudas por gen fueron normalizadas utilizando el método TMM. Posteriormente,

estos valores fueron transformados a log2 (lecturas por millón) mediante el paquete de R edgeR (v3.30.3). Para el análisis de supervivencia, los pacientes mayores de 14.99 años fueron filtrados (N = 321). Así, se obtuvo la población que presentaba el subtipo B (N = 120) y el subtipo T (N = 200) para el análisis completo. En este caso, la población del subtipo B consistía en muestras pre-B (112/120, 93,33%) y muestras B (8/120, 6,67%), mientras que la población que presentaba el subtipo T mostraba únicamente muestras T.

Adicionalmente, descargamos los datos externos de expresión génica para las líneas celulares LLA procedentes del repositorio Cancer Cell Line Encyclopedia (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/data>). Se descargaron los datos de expresión génica normalizados en valores TPM procedentes del repositorio de dicha base de datos (version 2019-09-29, N = 1019). Gracias a la información sobre las líneas celulares disponible en el portal DepMap, se seleccionaron las líneas celulares LLA-B (N = 14) y LLA-T (N = 16). Los datos de expresión génica normalizados fueron transformados a la escala logarítmica log2 para los siguientes análisis. Estos últimos datos ya transformados se utilizaron para obtener la información de la expresión génica de ALL133346.1 y CCN2.

Los datos descargados de ambas bases de datos fueron utilizados para la comparación de la expresión génica entre ambos subtipos mencionados y para estudiar la correlación del RNAInc/RNA_m usando el coeficiente de correlación de Spearman.

Análisis de supervivencia

Los datos clínicos asociados a los pacientes con LLA procedentes del proyecto TARGET se descargaron del repositorio NCI-TARGET (Therapeutically Applicable Research To Generate Effective Treatments) (<https://target-data.nci.nih.gov/Public/ALL/clinical/>). Usamos los niveles de expresión de AL133346.1 y CCN2 de los datos de TARGET para analizar su correlación con la supervivencia general de los pacientes con LLA, considerando las muertes como eventos. Dividimos a los pacientes en dos grupos para ambos genes según sus niveles de expresión. Estas variables de expresión génica se dicotomizaron en subgrupos "Low" y "High" utilizando el valor de la mediana de la expresión génica como umbral para CCN2 y AL133346.1 para LLA-B. Estas variables se dicotomizaron en los mismos subgrupos mencionados si los valores de expresión eran nulos o no nulos para el subtipo T, respectivamente. La asociación entre las características clínicas y los grupos de expresión génica se midió utilizando la prueba exacta de Fisher. Representamos las curvas de Kaplan-Meier para los grupos de

pacientes "Low" y "High" para ambos genes utilizando los paquetes de R survival (v3.1-11) y survminer (v0.4.6), y la significancia se del análisis de midió usando el univariante prueba de rango logarítmico. Además, estudiamos el efecto de diferentes covariables clínicas sobre la supervivencia global de los pacientes realizando el test de rangos logarítmicos univariante. Las covariables clínicas que mostraron una $p < 0,2$ en el análisis univariante se utilizaron para una regresión de Cox multivariante.

Resultados

RNAInc expresados en LLA-B

Para determinar los perfiles de expresión de RNAInc en LLA-B pediátrica, comparamos los niveles de expresión de RNAInc en 42 muestras de pacientes pediátricos con LLA-B con 4 muestras de médula ósea sanaS (Figura 1), [42]. A pesar de la heterogeneidad molecular de la LLA-B pediátrica, identificamos un perfil de expresión diferencial común que podría distinguir las muestras de LLA-B pediátrica de las muestras de médula ósea sanas. Estableciendo un fold change $> 1,5$ y FDR $< 0,05$, identificamos 48 RNAInc que se expresaban de forma diferente entre todos los B-ALL muestras tumorales y sanas. De los 48, 20 estaban regulados al alza y 28 a la baja (Tabla de material suplementario 1, en [42]). Los lncRNA sobreexpresados en la LLA-B pediátrica fueron XLOC_007191 (~ 7 veces), PCNA-AS1 (~ 7 veces) y AL133346.1 (~ 6 veces), mientras que los reprimidos fueron RP11-807H22.6 (~ 14 veces), CXCR2P1 (~ 6 veces) y BC127858 (~ 4 veces) (Figura 2a). CCN2 fue el cuarto gen codificador de proteínas sobreexpresado ($\log_{2}FC = 2,56$, FDR = $3,0 \cdot 10^{-6}$) (Figura 2b) [42].

Debido a la falta de anotación funcional de los lncRNA, para analizar las funciones biológicas de los RNAInc expresados diferencialmente entre LLA-B pediátrica y las muestras de médula ósea sana, realizamos un análisis de Ontología de los genes codificantes de proteínas asociados a los RNAInc expresados diferencialmente según el fabricante de microarrays. En el top de los términos de la Ontología de Genes sobreexpresados aparecían términos relacionados con la regulación de la angiogénesis ($p = 0,019$) (ANGPTL4, NF1 y TNFAIP3), reparación del DNA ($p = 0,025$) (PCNA y UBE2V1) y la vía de transducción de señales de la proteína RAS. ($p = 0,025$) (NF1, RAB4A y RAB11B) (Figura 6a). Los términos de Ontología de Genes reprimidos incluían términos relacionados con la regulación negativa de la secreción de interleucina-1 ($p = 7,36 \cdot 10^{-5}$) (CARD17 y CARD18), la regulación de la respuesta al estímulo de daño del DNA ($p = 6,20 \cdot 10^{-4}$) (HMGA2 y FEM1B) y la regulación del proceso apoptótico ($p = 1,04 \cdot 10^{-3}$) (ACTN1, EPHA1, HMGA2, JUN y NOTCH2) (Figura 6b). En conjunto, estos

resultados sugieren una firma oncogénica general asociada con los perfiles de expresión de RNAInc/RNA_m en LLA-B pediátrica en comparación con muestras de médula ósea sana.

5 **Los niveles de expresión de AL133346.1/CCN2 están incrementados en LLA-B**

Al comparar los perfiles de expresión de RNAInc/RNA_m de los pacientes con LLA-B pediátrica vs. médulas óseas sanas, la pareja AL133346.1/CCN2 (anteriormente conocidos como RP11-69I8.3/CTGF) presentó diferencias entre ambos grupos de muestras. Asimismo, AL133346.1/CCN2 se sobreexpresaron en pacientes ETV6-
10 RUNX1-positivo vs. ETV6-negativo (fold change = 1,79, p ajustado = 0,036) [21]. Además, tanto AL133346.1 como CCN2 estuvieron, individualmente, entre los principales RNAInc expresados diferencialmente y genes codificantes de proteínas, respectivamente (Figura 2) [42]. En análisis anteriores de múltiples conjuntos de datos independientes, los niveles de expresión de AL133346.1 y CCN2 fueron los más
15 fuertemente correlacionados entre todos los pares RNAInc/RNA_m [21]. Sus patrones de expresión diferenciales y su fuerte correlación nos llevaron a investigar más a fondo AL133346.1 CCN2 en bases de datos externas.

Ampliamos el análisis de AL133346.1/CCN2 al **The Cancer Genome Atlas (TCGA)**
20 (TARGET-ALL-P1 y TARGET-ALL-P2), que es la mayor colección disponible de datos de expresión génica de ALL pediátrica. Después de excluir a los pacientes mayores de 14,99 años y aquellos sin datos de expresión de AL133346.1 y CCN2, la población TARGET consistió en 320 pacientes (120 LLA-B y 200 LLA-T). El conjunto de datos LLA-B pediátrica de TARGET consistió principalmente en muestras pre-B (112/120,
25 93,33%) siendo su cohorte más representativa el fenotipo común B (38/42, 90,48%). Debido a que no había mejores controles, evaluamos la especificidad de la expresión de AL133346.1 y CCN2 comparando su expresión en LLA-B y en LLA-T. Las LLA-B mostraron niveles de expresión mayores de AL133346.1 y CCN2 que LLA-T (Figura 3a). AL133346.1 y CCN2 se expresaron en todos los subtipos analizados de LLA-B
30 pediátrica, expresando mayor cantidad las LLA-B ETV6/RUNX1-positivas (Figura 7). Nuestros resultados se validaron también en la base de datos de líneas celulares Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (Figura 3b). En general, estos resultados confirman que AL133346.1 y CCN2 se expresan en LLA-B pediátrica y que su expresión es baja o ausente en LLA-T.

35

La expresión de AL133346.1/CCN2 está correlacionada en muestras pediátricas de LLA-B

Los RNAInc pueden regular la expresión de los RNAm mediante varios mecanismos, lo que puede dar como resultado un patrón de correlación significativo entre la expresión del RNAInc y el RNAm asociado [29]. Previamente, nuestro grupo de investigación publicó que existía una fuerte correlación positiva entre los niveles de RNAm de AL133346.1 y CCN2 en datos externos de tres estudios de microarrays con pacientes pediátricos con LLA-B [21].

Para confirmar estos hallazgos, realizamos un análisis de correlación de Spearman entre los niveles de expresión de AL133346.1 y CCN2 medidos por secuenciación de RNA en muestras LLA-B procedentes del proyecto TARGET y de la CCLE. Encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa entre la expresión de AL133346.1 y CCN2 en pacientes pediátricos de LLA-B de TARGET (N = 120, coeficiente de correlación de Spearman = 0,717, $p < 0,0001$). Por el contrario, los niveles de expresión de AL133346.1 y CCN2 no se correlacionaron en LLA-T pediátrica (N = 200, coeficiente de correlación de Spearman = 0,099, $p = 0,163$), sugiriendo que la correlación es específica de LLA-B o que AL133346.1 no se expresa en LLA-T. De manera similar, obtuvimos una fuerte correlación en las líneas celulares LLA-B de la CCLE (N = 14, coeficiente de correlación de Spearman = 0.799, $p = 0.001$), mientras que esta correlación no se encontró en las líneas celulares LLA-T (N = 16) porque AL133346.1 no se expresó en ninguna línea celular LLA-T. Además, los niveles de RNAm y proteínas de CCN2 están moderadamente correlacionados (coeficiente de correlación de Spearman = 0,518, $p = 0,001$) según los datos de Yang y cols [30].

Para evaluar si AL133346.1 podría estar involucrado en la regulación de otros genes, analizamos las correlaciones por pares de la expresión de AL133346.1 y la expresión de todos los genes (codificantes y no codificantes de proteínas) en nuestros datos del microarray y en TARGET. En nuestro propio microarray, que incluía 1906 genes codificadores de proteínas, la expresión de AL133346.1 solo se correlacionó significativamente con la expresión de CCN2. En los datos del proyecto TARGET, 9.080 genes mostraron una correlación estadísticamente significativa con la expresión de AL133346.1 en los datos de LLA-B pediátricos, y CCN2 se encontraba entre los 100 primeros. En cualquier caso, señalan que la correlación entre estos dos genes, AL133346.1 y CCN2, no significa necesariamente que uno de ellos modula al otro.

Análisis de los mecanismos de regulación de AL133346.1/CCN2

Aunque la expresión de un RNAInc y su gen codificante de proteína vecino se encuentre correlacionada, los RNAIncs podrían no estar regulando directamente a estos genes. Estudios de referencia en este campo han demostrado que la función de regulación que ejercen ciertos genes de RNAInc podrían no encontrarse en el mismo producto RNA sino en los elementos reguladores contenidos dentro del mismo gen del RNAInc. Así, un factor de transcripción común podría modular la expresión tanto del RNAInc como de su gen codificante de proteína vecino produciendo esta transcripción correlacionada [31,32]. Para evaluar si este fenómeno puede explicar la coexpresión de AL133346.1 y CCN2, los inventores estudiaron la localización genómica de ambos genes y buscaron los promotes cercanos y las regiones reguladoras proximales. AL133346.1 y CCN2 se localizan en el cromosoma 6 (q23.2) en diferentes cadenas. Ambos genes se encuentran orientados "head-to-head" solapando parcialmente y sus lugares de inicio de transcripción se encuentran separados 2,770 pb. De acuerdo a la base de datos GeneHancer [33], que integra información sobre promotores y potenciadores de la transcripción de distintas bases de datos, AL133346.1 y CCN2 comparten dos de sus promotores/potenciadores predichos con alta puntuación: GH06J131946 y GH06J131976 (Figura 4). Estos dos potenciadores de transcripción se clasifican como potenciadores de alta probabilidad (anotados como "élite") y muestran una fuerte asociación potenciador-gen. Los resultados de la correlación positiva mencionados anteriormente en LLA-B indican la posibilidad de que el gen codificante de proteína CCN2 y su RNAInc antisentido AL133346.1 se expresan de manera tejida específica cuando su locus se encuentra transcripcionalmente activo. Según estos resultados, los inventores proponen como modelo: (i) AL133346.1 regula la expresión de CCN2 en *cis*; o (ii) AL133346.1 y CCN2 se encuentran específicamente modulados en LLA-B por los mismos elementos reguladores.

Una elevada expresión de CCN2 se asocia con un mejor pronóstico

Para determinar el valor pronóstico de la expresión de AL133346.1 y CCN2, realizamos un análisis de supervivencia utilizando datos clínicos pediátricos de LLA-B de TARGET. La información clínica incluyó sexo, edad al diagnóstico, afectación del sistema nervioso central, t(12;21) [ETV6/RUNX1], t(1;19) [TCF3/PBX1], t(9;22) [BCR/ABL1], reordenamiento MLL, trisomía de los cromosomas 4 y 10 y número de cromosomas (Tabla de material complementario 2).

Encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre los subgrupos de pacientes con expresión "alta" y "baja" de AL133346.1 y CCN2 y covariables clínicas

(Figura 8, Figura 9; Tabla de material suplementario 3, en [42]). Dos de los parámetros clínicos más fiables para determinar la agresividad, las translocaciones t(12;21) [ETV6/RUNX1] y t(1;19) [TCF3/PBX1] [34], no se distribuyeron homogéneamente en los subgrupos analizados. Observamos que los subgrupos de expresión "alta" de AL133346.1 y CCN2 incluían el 90% y el 100% de los pacientes con la t(12;21) [ETV6-RUNX1], mientras que sólo tenían 29% y 0% de los pacientes con la t(1;19) [TCF3-PBX1], respectivamente (Figura 8, Figura 9; Tabla de material suplementario 3, en [42]). Los análisis univariantes de Cox para las variables tradicionalmente relacionadas con la supervivencia en la LLA-B pediátrica revelaron que el género masculino ($p = 0,030$), la fusión del gen TCF3-PBX1 ($p < 0,001$) y la ploidía (hipodiploidía: $p = 0,005$; hiperdiploidía parcial: $p = 0,033$; hiperdiploidía alta: $p = 0,019$) se asociaron significativamente con una supervivencia más corta, mientras que la edad al diagnóstico ($p = 0,186$), la afectación del SNC ($p = 0,943$), la fusión del gen ETV6-RUNX1 ($p = 0,490$), la fusión del gen BCR-ABL1 ($p = 0,689$) y la trisomía de los cromosomas 4 y 10 ($p = 0,418$) no fueron estadísticamente significativas en esta cohorte. Al dividir a los pacientes usando la mediana de la expresión de AL133346.1 o CCN2, encontramos que los pacientes con alta expresión de CCN2 (CCN2 "high") se asociaron con tiempos de supervivencia general (SG) más largos ($p = 0,042$; HR: 0,566, IC del 95%: 0,328-0,980) (Figura 5) mientras que no hubo asociación entre la SG y la expresión de AL133346.1 ($p = 0,77$) (Figura 10).

Aunque la expresión de AL133346.1 y CCN2 se correlacionaron significativamente, y CCN2 fue el gen codificante de proteína más altamente correlacionado con AL133346.1, sólo CCN2 se asoció significativamente con OS. Este hecho se puede explicar porque la correlación entre AL133346.1 y CCN2 no es perfecta. Esto sugiere que AL133346.1 puede participar en procesos biológicos independientes de CCN2, lo que interferiría con la asociación de AL133346.1 con OS. Además, todas las covariables clínicas con $p < 0,2$ en el análisis univariable de Cox, junto con la expresión de CCN2, se utilizaron para un análisis multivariable de Cox. El gen de fusión TCF3-PBX1 fue la variable más importante en la SG de LLA-B pediátrica ($p = 0,003$). Estos resultados revelaron que la expresión "alta" de CCN2 (CCN2 "high") podría ser un factor pronóstico asociado a una SG más prolongada ($p = 0,045$) (HR: 0,448, IC del 95%: 0,204-0,984) (Tabla de material suplementario 4, en [42]). Aunque el subgrupo de expresión "alta" de CCN2 se enriqueció significativamente en pacientes con la translocación t(12;21) [ETV6-RUNX1] ($p = 0,0001$) y sin la translocación t(1;19) [TCF3-PBX1] ($p = 0,002$) (Tabla de Material Complementario 3), no se encontró asociación entre t(12;21) [ETV6/RUNX1] y OS, y tuvieron en cuenta la translocación t(1;19) [TCF3-PBX1] en el modelo multivariable de

Cox. Por tanto, la expresión de CCN2 podría distinguir entre dos subgrupos clínicamente diferentes independientemente de las translocaciones en las leucemias.

Finalmente, para evaluar si CCN2 podría ser un biomarcador de pronóstico específico de LLA-B pediátrica, los inventores realizaron un análisis de supervivencia utilizando datos clínicos de LLA-T (Tabla S5). La expresión "alta" de CCN2 no se asoció ($p = 0,29$) con un beneficio en la supervivencia para los pacientes con LLA-T (Figura 11a), lo que indica un papel específico de CCN2 en LLA-B pediátrica. Además, no hubo asociación entre la SG y la expresión de AL133346.1 ($p = 0.39$) en pacientes pediátricos con LLA-T (Figura 11b).

CCN2 pertenece a la familia de proteínas Cellular Communication Network (CCN). Esta familia de proteínas asociadas a la matriz extracelular se caracteriza por tener cuatro dominios conservados ricos en cisteína y está implicada en la señalización intercelular [35]. En las neoplasias hematopoyéticas, la familia CCN juega un papel importante en la diferenciación de células madre hematopoyéticas (HSC) y células madre mesenquimales [36]. El valor pronóstico de la familia de proteínas CCN varía en las diferentes neoplasias hematológicas [36]. De acuerdo con sus resultados, varios estudios correlacionaron significativamente la expresión de CCN2 con una mayor supervivencia global en linfomas tratados con quimioterapia [37,38]. Sin embargo, se necesitan más estudios específicos en la LLA-B pediátrica para determinar si los niveles de expresión de CCN2 podrían influir en el resultado del tratamiento del paciente.

Referencias

1. Karol, S.E.; Pui, C. Personalized therapy in pediatric high-risk B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology* 2020; 11: 2040620720927575. DOI: 10.1177/2040620720927575.
2. Malouf, C.; Ottersbach, K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75(3): 417–446. DOI: 10.1007/s00018-017-2620-z.
3. Hein, D.; Borkhardt, A.; Fischer, U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev.* 2020; 39(1): 161–171. DOI: 10.1007/s10555-019-09841-1.
4. Mohseni, M.; Uludag, H.; Brandwein, J.M. Advances in biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and therapeutic implications. *Am J Blood Res.* 2018; 8(4): 29–56. PMID: 30697448.

5. Terwilliger, T.; Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017 Jun; 7(6): e577. DOI: 10.1038/bcj.2017.53.
6. Coccaro, N.; Anelli, L.; Zagaria, A.; Specchia, G.; Albano, F. Next-Generation Sequencing in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun; 20(12): 2929. DOI: 10.3390/ijms20122929.
7. Medina, P.P.; Slack, F.J. microRNAs and cancer: an overview. *Cell Cycle.* 2008 Aug 15;7(16):2485-92. DOI: 10.4161/cc.7.16.6453.
8. Trang, P.; Medina, P.P.; Wiggins, J.F.; Ruffino, L.; Kelnar, K.; Omotola, M.; Homer, R.; Brown, D.; Bader, A.G.; Weidhaas J.B.; Slack, F.J. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 2010 Mar 18;29(11):1580-7. DOI: 10.1038/onc.2009.445.
9. Medina, P.P.; Nolde, M.; Slack, F.J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature.* 2010 Sep 2; 467(7311): 86-90. DOI: 10.1038/nature09284.
10. Zhang, G.; Pian, C.; Chen, Z.; Zhang, J.; Xu, M.; Zhang, L.; Chen, Y. Identification of cancer-related miRNA-lncRNA biomarkers using a basic miRNA-lncRNA network. *PLoS One.* 2018; 13(5): e0196681. DOI: 10.1371/journal.pone.0196681.
11. Ponting, C.P.; Oliver, P.L.; Reik, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell.* 2009; 136(4), 629–641. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.006.
12. Marchese, F.P.; Raimondi, I.; Huarte, M. The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biology.* 2017; 18(1). DOI: 10.1186/s13059-017-1348-2.
13. Fu, S.; Wang, Y.; Hang, L.; Chen, L.; Liu, Q. Regulatory Networks of LncRNA MALAT-1 in Cancer. *Cancer Manag Res.* 2020 Oct 15; 12:10181-10198. DOI: 10.2147/CMAR.S276022.
14. Carlevaro-Fita, J.; Lanzós, A.; Feuerbach, L.; Hong, C.; Mas-Ponte, D.; Pedersen, J.S.; PCAWG Drivers and Functional Interpretation Group; Johnson, R.; PCAWG Consortium. Cancer LncRNA Census reveals evidence for deep functional conservation of long noncoding RNAs in tumorigenesis. *Commun Biol.* 2020 Feb 5; 3(1):56. DOI: 10.1038/s42003-019-0741-7.
15. Huarte, M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med.* 2015 Nov; 21(11):1253-61. DOI: 10.1038/nm.3981.
16. Gandhi, M.; Groß, M.; Holler, J.M.; Coggins, S.A.; Patil, N.; Leupold, J.H.; Munschauer, M.; Schenone, M.; Hartigan, C.R.; Allgayer, H.; Kim, B.; Diederichs, S. The lncRNA lincNMR regulates nucleotide metabolism via a YBX1 - RRM2 axis in

- cancer. *Nat Commun.* 2020 Jun 25; 11(1):3214. DOI: 10.1038/s41467-020-17007-9.
17. Schmitt, A.M.; Chang, H.Y. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell.* 2016; 29(4), 452–463. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.
 - 5 18. Peinado, P.; Herrera, A.; Baliñas, C.; Martín-Padrón, J.; Boyero, L.; Cuadros, M.; Coira, I.F.; Rodríguez M.I.; Reyes-Zurita, F.J.; Rufino-Palomares, E.E.; Lupiáñez, J.A.; Medina, P.P. Cancer and Noncoding RNAs: Chapter 6 - Long Noncoding RNAs as Cancer Biomarkers. In: SM Chakrabarti J, M. Sanga, editors. 2018; Vol. 1, Elsevier, p. 95-114.
 - 10 19. Tang, Q.; Hann, S.S. HOTAIR: An Oncogenic Long Non-Coding RNA in Human Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018; 47(3), 893–913. DOI: 10.1159/000490131.
 20. El-Khazragy, N.; Elayat, W.; Matbouly, S.; Seliman, S.; Sami, A.; Safwat, G.; Diab, A. The prognostic significance of the long non-coding RNAs “CCAT1, PVT1” in
15 t(8;21) associated Acute Myeloid Leukemia. *Gene.* 2019; 707, 172–177. DOI: 10.1016/j.gene.2019.03.055.
 21. Cuadros, M.; Andrades, A.; Coira, I.F.; Baliñas, C.; Rodríguez, M.I.; Álvarez-Pérez, J.C.; Peinado, P.; Arenas, A.M.; García, D.J.; Jiménez, P.; Camós, M.; Jiménez-Velasco, A.; Medina, P.P. Expression of the long non-coding RNA TCL6 is
20 associated with clinical outcome in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal.* 2019; 9(12). DOI: 10.1038/s41408-019-0258-9.
 22. Fernando, T.R.; Rodriguez-Malave, N.I.; Waters, E.V.; Yan, W.; Casero, D.; Basso, G.; Pigazzi, M.; Rao, D.S. LncRNA Expression Discriminates Karyotype and Predicts Survival in B-Lymphoblastic Leukemia. *Molecular Cancer Research.* 2015;
25 13(5), 839–851. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0006-T.
 23. Dou, B.; Jiang, Z.; Chen, X.; Wang, C.; Wu, J.; An, J.; Sheng, G. Oncogenic Long Noncoding RNA DARS-AS1 in Childhood Acute Myeloid Leukemia by Binding to microRNA-425. *Technol Cancer Res Treat.* Jan-Dec 2020; 19:1533033820965580. DOI: 10.1177/1533033820965580.
 - 30 24. Lu, J.; Wu, X.; Wang, L.; Li, T.; Sun, L. Long noncoding RNA LINC00467 facilitates the progression of acute myeloid leukemia by targeting the miR-339/SKI pathway. *Leuk Lymphoma.* 2020 Oct 15; 1-10. DOI: 10.1080/10428194.2020.1832667.
 25. Ghazavi, F.; et al.. Unique long non-coding RNA expression signature in ETV6/RUNX1-driven B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. 2016;
35 *Oncotarget*, 7(45), 73769–73780. DOI: 10.18632/oncotarget.12063.

26. Ouimet, M.; Drouin, S.; Lajoie, M.; Caron, M.; St-Onge, P.; Gioia, R.; Sinnett, D. A childhood acute lymphoblastic leukemia-specific lncRNA implicated in prednisolone resistance, cell proliferation, and migration. *Oncotarget*. 2016; 8(5), 7477–7488. DOI: 10.18632/oncotarget.13936.
- 5 27. Bárcenas-López, D.A. et al. S. Transcriptome Analysis Identifies LINC00152 as a Biomarker of Early Relapse and Mortality in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes (Basel)*. 2020 Mar 13;11(3):302. DOI: 10.3390/genes11030302.
28. Zuo, W.; Zhou, K.; Deng, M.; Lin, Q.; Yin, Q.; Zhang, C.; Zhou, J.; Song, Y. LINC00963 facilitates acute myeloid leukemia development by modulating miR-608/MMP-15. *Aging (Albany NY)*. 2020 Oct 4; 12(19):18970-18981. DOI: 10.18632/aging.103252.
- 10 29. Zhang, Y.; Xu, Y.; Feng, L.; Li, F.; Sun, Z.; Wu, T.; Shi, X.; Li, J.; Li, X. Comprehensive characterization of lncRNA-mRNA related ceRNA network across 12 major cancers. *Oncotarget*. 2016 Sep 27; 7(39): 64148–64167. DOI: 10.18632/oncotarget.11637.
- 15 30. Yang M., Vesterlund M., Siavelis I., Moura-Castro L.H., Castor A., Fioretos T. Proteogenomics and Hi-C reveal transcriptional dysregulation in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Communications*. Volume 10, Article number: 1519 (2019). DOI: 10.1038/s41467-019-09469-3).
- 20 31. Paralkar, V.R.; Taborda, C.C.; Huang, P.; Yao, Y.; Kossenkov, A.V.; Prasad, R.; Luan, J.; Davies, J.O.J.; Hughes, J.R.; Hardison, R.C.; Blobel, G.A.; Weiss, M.J. Unlinking an lncRNA from Its Associated cis Element. *Mol Cell*. 2016 Apr 7;62(1):104-10. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.029.
32. Kopp, F.; Mendell, J.T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell* 2018 Jan 25;172(3):393-407. DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.011.
- 25 33. Fishilevich, S.; Nudel, R.; Rappaport, N.; Hadar, R.; Plaschkes, I.; Stein, T.I.; Rosen, N.; Kohn, A.; Twik, M.; Safran, M.; Lancet, D.; Cohen, D. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database (Oxford)*. 2017; bax028. DOI: 10.1093/database/bax028.
- 30 34. Kang, H.; et al.. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010; 115(7), 1394–1405. DOI: 10.1182/blood-2009-05-218560.
- 35 35. Perbal, B. CCN proteins: A centralized communication network. *J Cell Commun Signal* 2013 Aug;7(3):169-77. DOI: 10.1007/s12079-013-0193-7.

36. Wells, J.E.; Howlett, M.; Cheung, L.C.; Kees, U.R. The role of CCN family genes in haematological malignancies. *J Cell Commun Signal* 2015 Sep;9(3):267-78. DOI: 10.1007/s12079-015-0296-4.
37. Lenz, G. et al. ; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008 Nov 27;359(22):2313-23. DOI: 10.1056/NEJMoa0802885.
38. Rimsza, L.M.; et al. Gene expression predicts overall survival in paraffin-embedded tissues of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3425-33. DOI: 10.1182/blood-2008-02-137372.
39. Chen, E.Y.; Tan, C.M.; Kou, Y.; Duan, Q.; Wang, Z.; Meirelles, G.V.; Clark, N.R.; Ma'ayan, A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14, 128. DOI: 10.1186/1471-2105-14-128.
40. Kuleshov, M.V.; et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8; 44(Web Server issue): W90–W97. DOI: 10.1093/nar/gkw377.
41. Supek, F.; Bosnjak, M.; Skunca, N.; Smuc, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*. 2011; e21800. DOI: 10.1371/journal.pone.0021800.
42. Cuadros, M., García, D. J., Andrades, A., Arenas, A. M., Coira, I. F., Balifias-Gavira, C., . & Medina, P. P. (2020). LncRNA-mRNA Co-Expression Analysis Identifies AL133346.1/CCN2 as Biomarkers in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers*, 12(12), 3803. [doi:10.3390/cancers12123803]

REIVINDICACIONES

1.- Uso del lncRNA AL133346.1 como marcador para el diagnóstico, pronóstico, prevención, mejora o alivio en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica.

2.- Uso del lncRNA AL133346.1 como marcador para el diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica.

3.- Uso, según reivindicación anterior, que además emplea al menos otros RNAs mensajeros (mRNA) para el diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda pediátrica.

4.- Uso, según reivindicación anterior, en el que el mRNA es CCN2.

5.- Método de obtención de datos útiles, para el diagnóstico, pronóstico, prevención, mejora o alivio en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, que comprende:

i) obtención de una muestra aislada de médula ósea del individuo

ii) cuantificar las cantidades de lncRNA AL133346.1 expresadas en dicha muestra.

6.- Método de obtención de datos útiles, según reivindicación anterior, que además comprende la cuantificación de las cantidades de uno o más mRNAs presentes en la muestra.

7.- Método de obtención de datos útiles, según reivindicación anterior, en la que el mRNA es CCN2.

8.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que además comprende:

iii) comparar las cantidades de mRNA cuantificadas con unas cantidades de referencia

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde los pasos (ii) e (iii) pueden ser total o parcialmente automatizados.

10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, que además comprende asignar al individuo del que se toma la muestra al grupo de individuos que padecen leucemia linfoblástica aguda pediátrica cuando presentan unos niveles de expresión del

lncRNA AL133346.1, de AL133346.1 y otro mRNA, o de AL133346.1 y CCN2, superiores a la cantidad de referencia.

11.- Método según las reivindicaciones anteriores, donde la muestra biológica es una muestra de médula ósea.

- 5 12.- Un kit o dispositivo para diagnosticar leucemia linfoblástica aguda pediátrica de células B que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de lncRNA AL133346.1

13.- Un kit o dispositivo según reivindicación anterior que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de lncRNA y al menos un mRNA.

- 10 14.- Un kit o dispositivo según reivindicación anterior que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de lncRNA y CCN2.

15.- Un kit, según reivindicaciones 12, 13 o 14, que comprende primers, sondas y/o anticuerpos capaces de detectar y cuantificar las cantidades de mRNA expresados mediante RT-PCR.

- 15 16.- Programa de ordenador que implementa el procedimiento para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a cabo los métodos según reivindicaciones 5 a 11.

FIGURAS

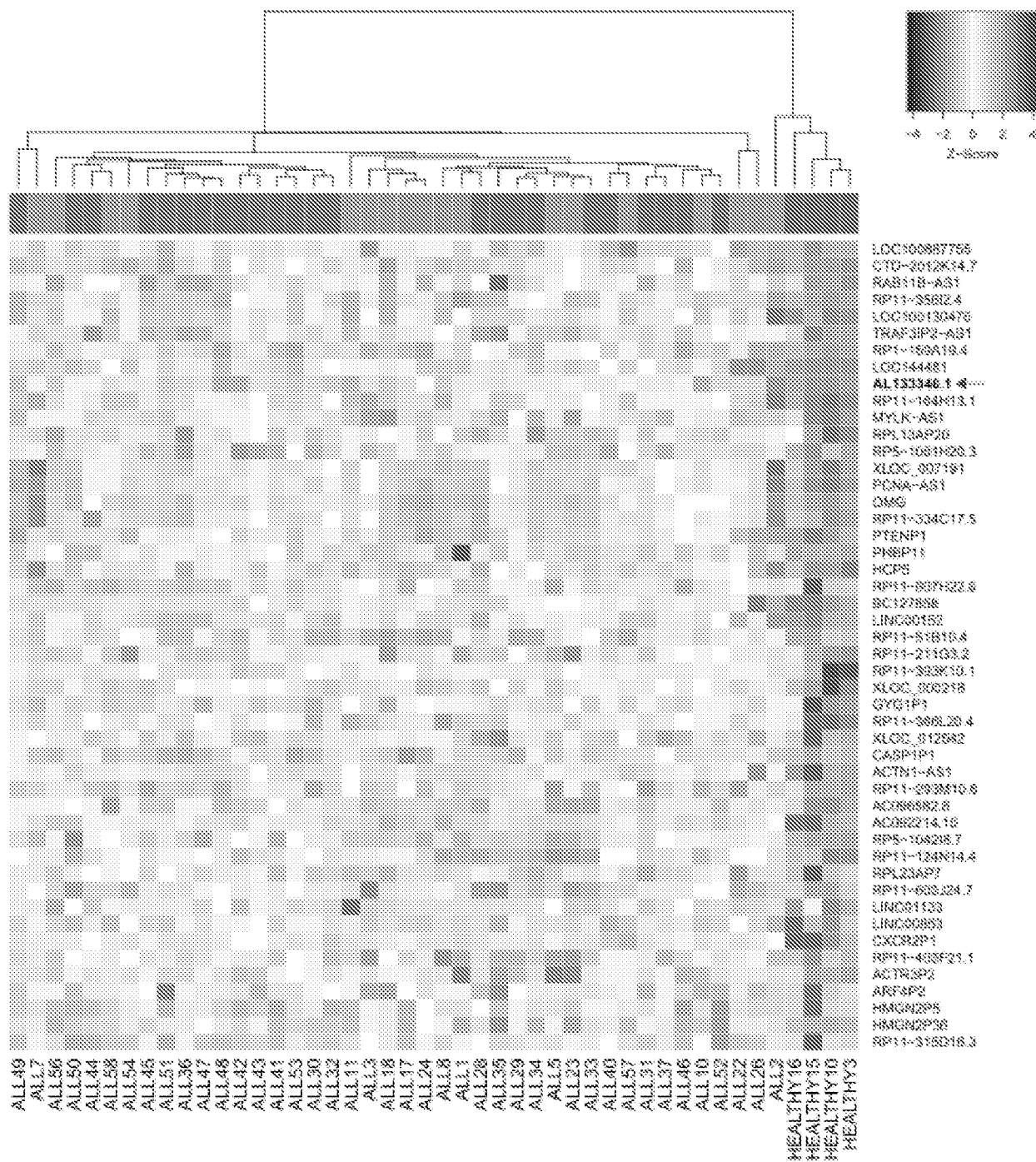


Figura 1

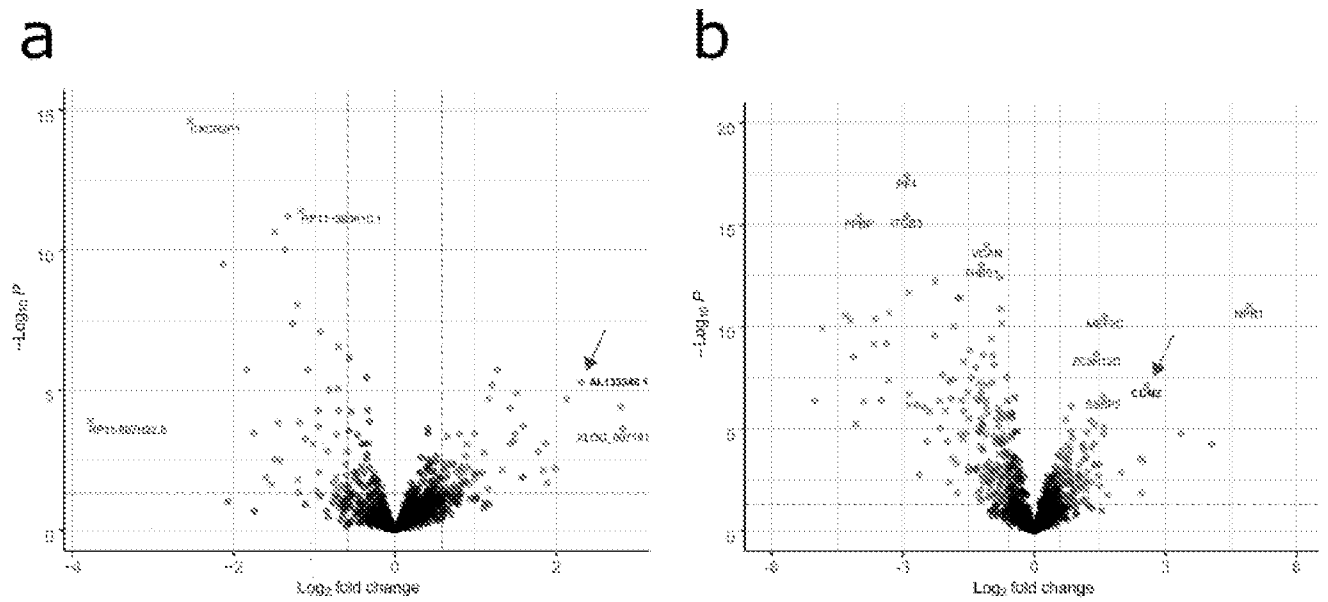


Figura 2

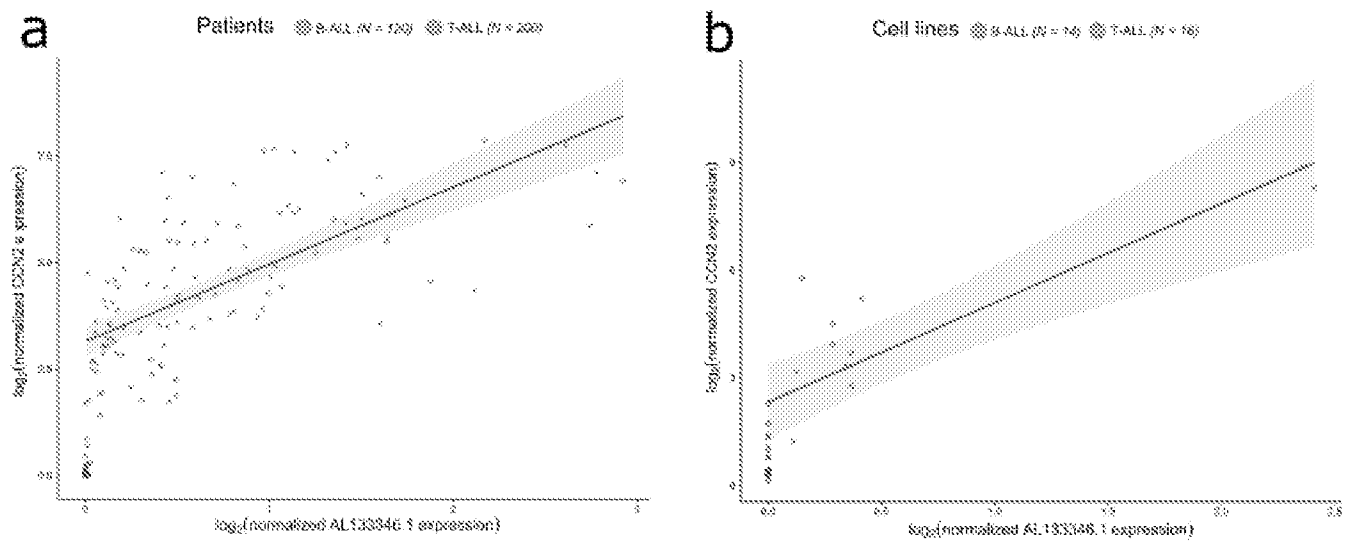


Figura 3

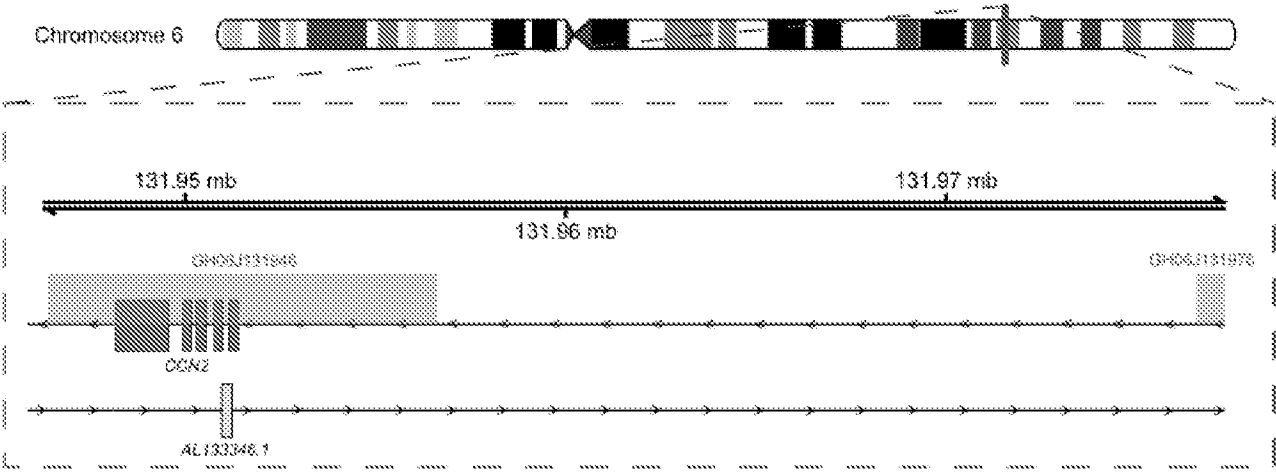


Figura 4

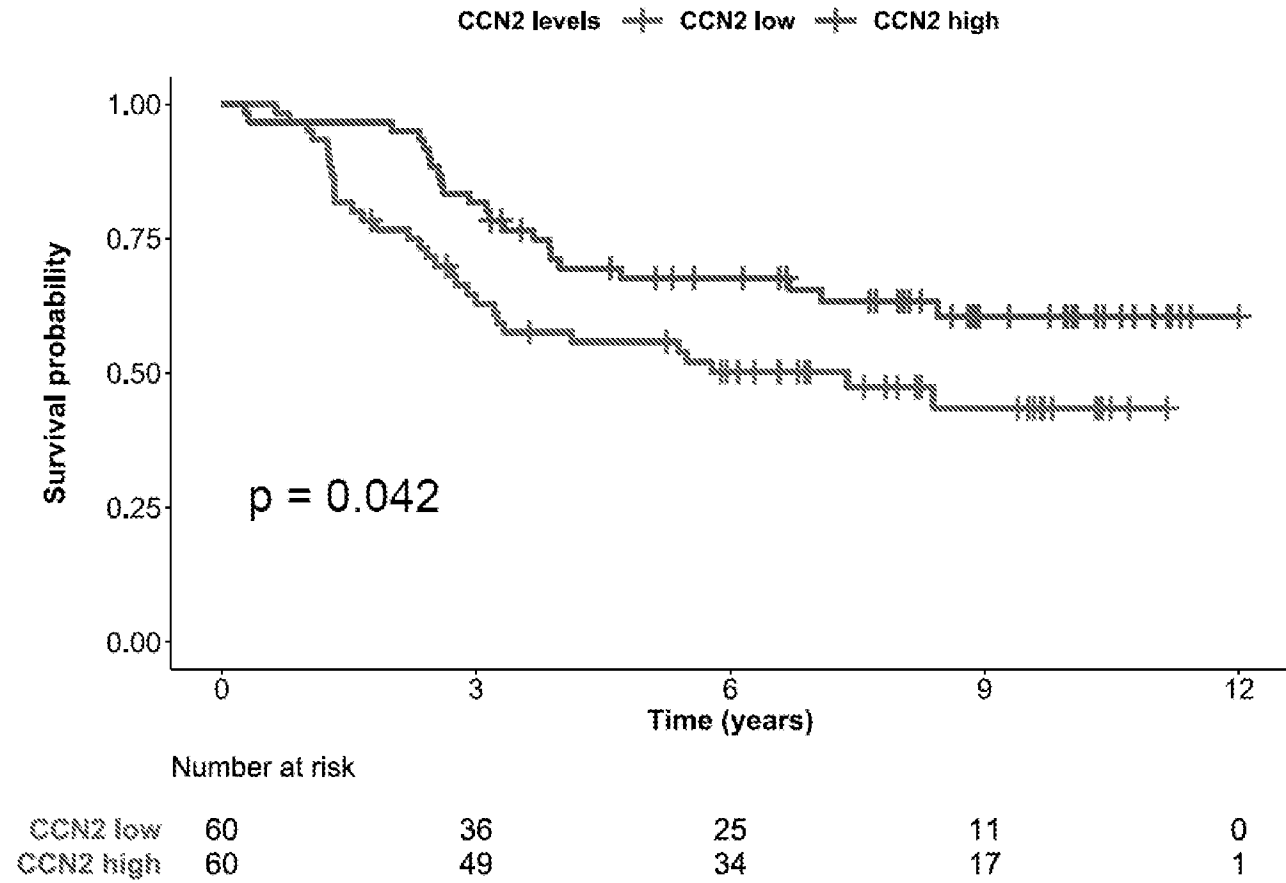


Figura 5

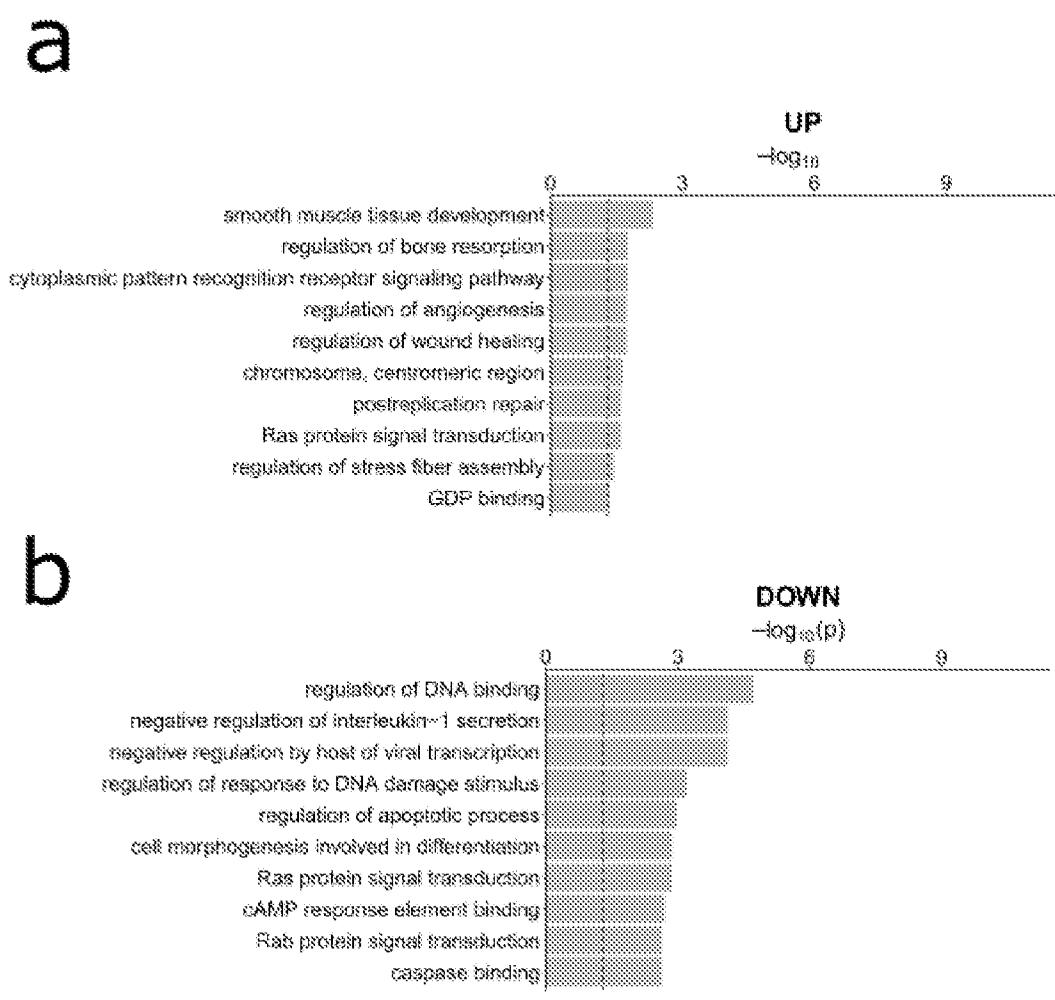


Figure 6

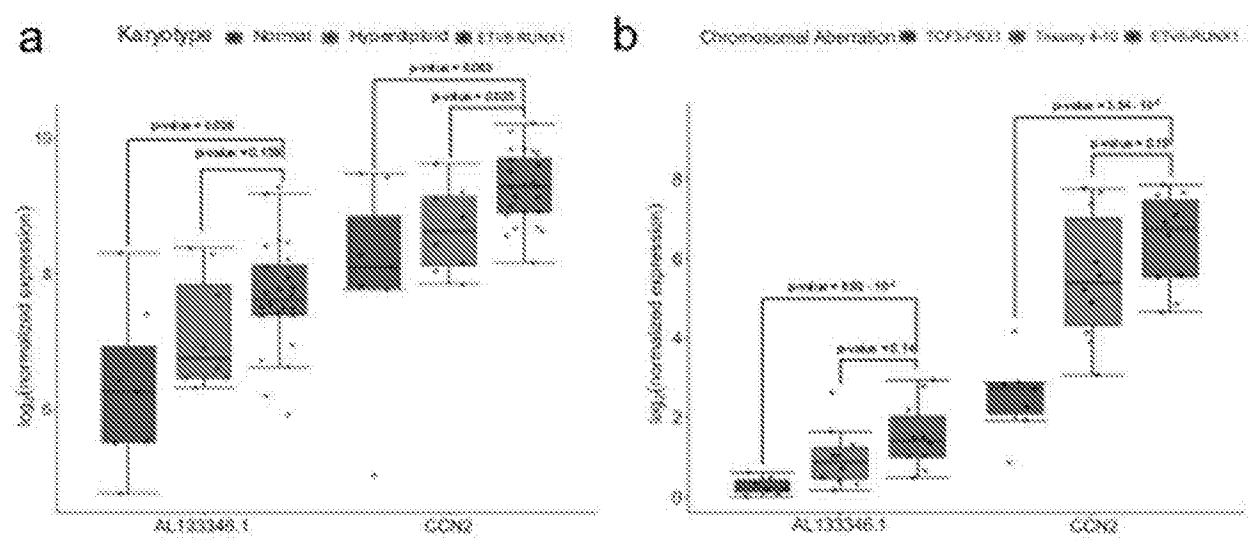


Figure 7

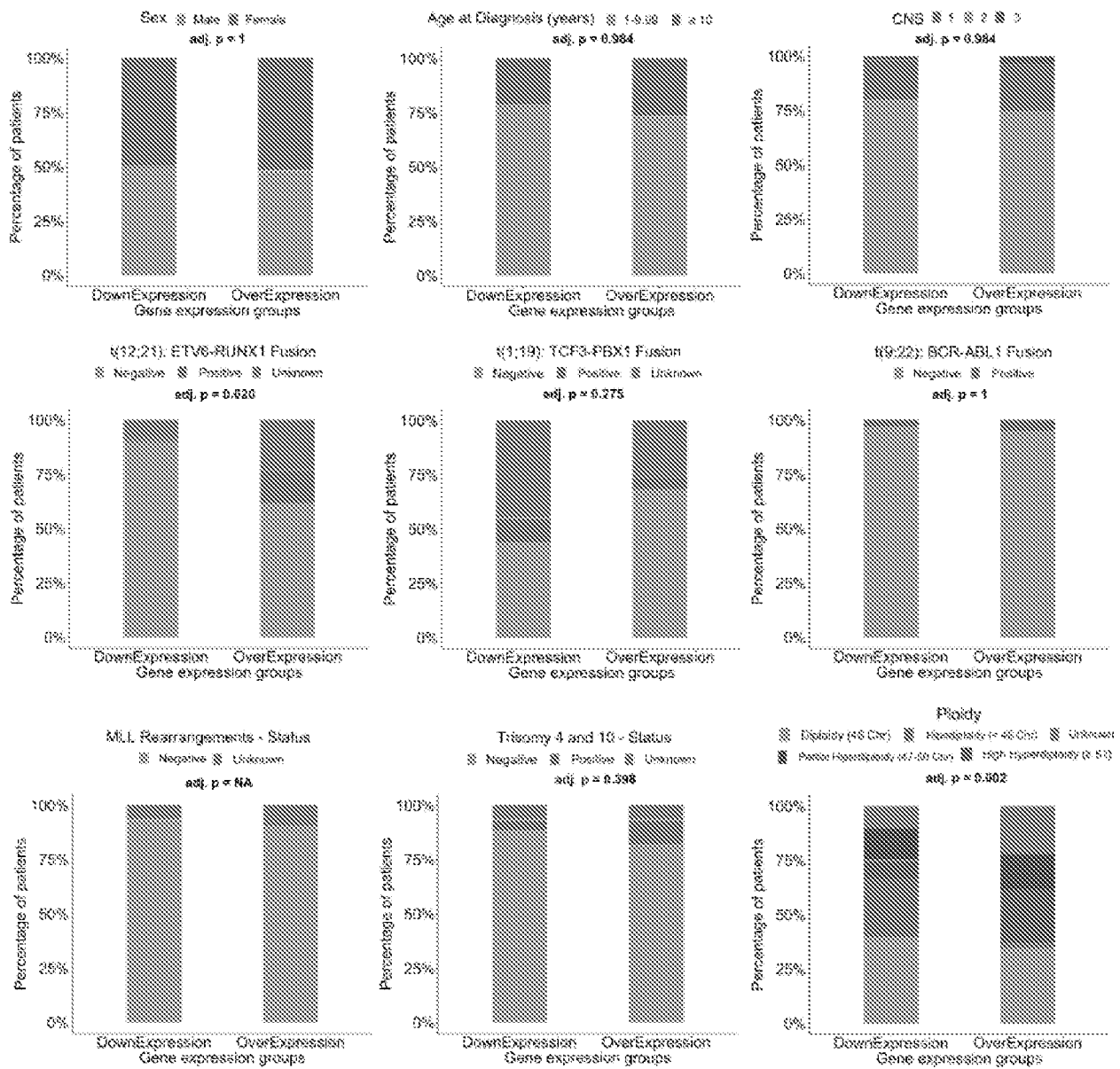


Figure 8

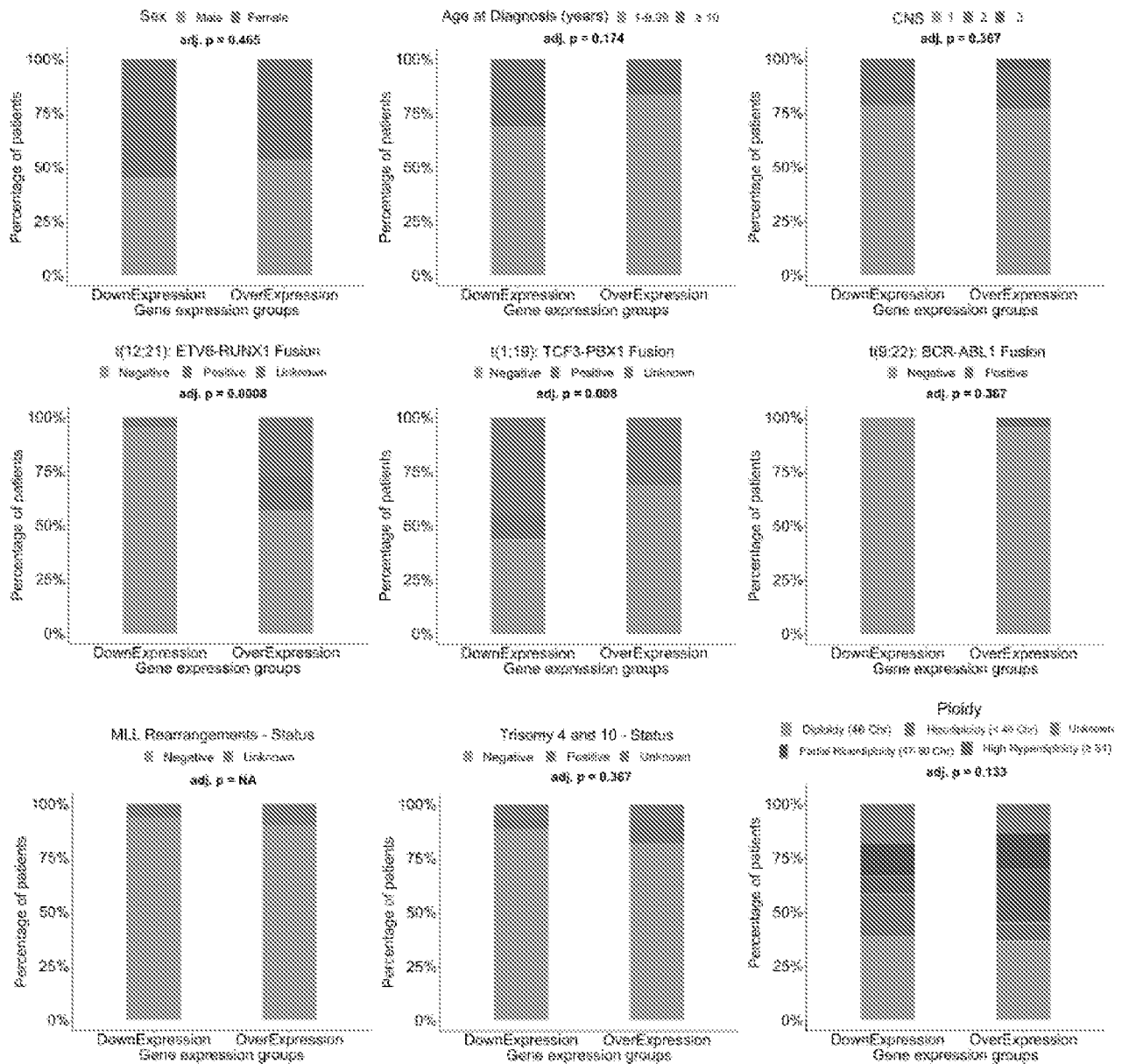


Figure 9

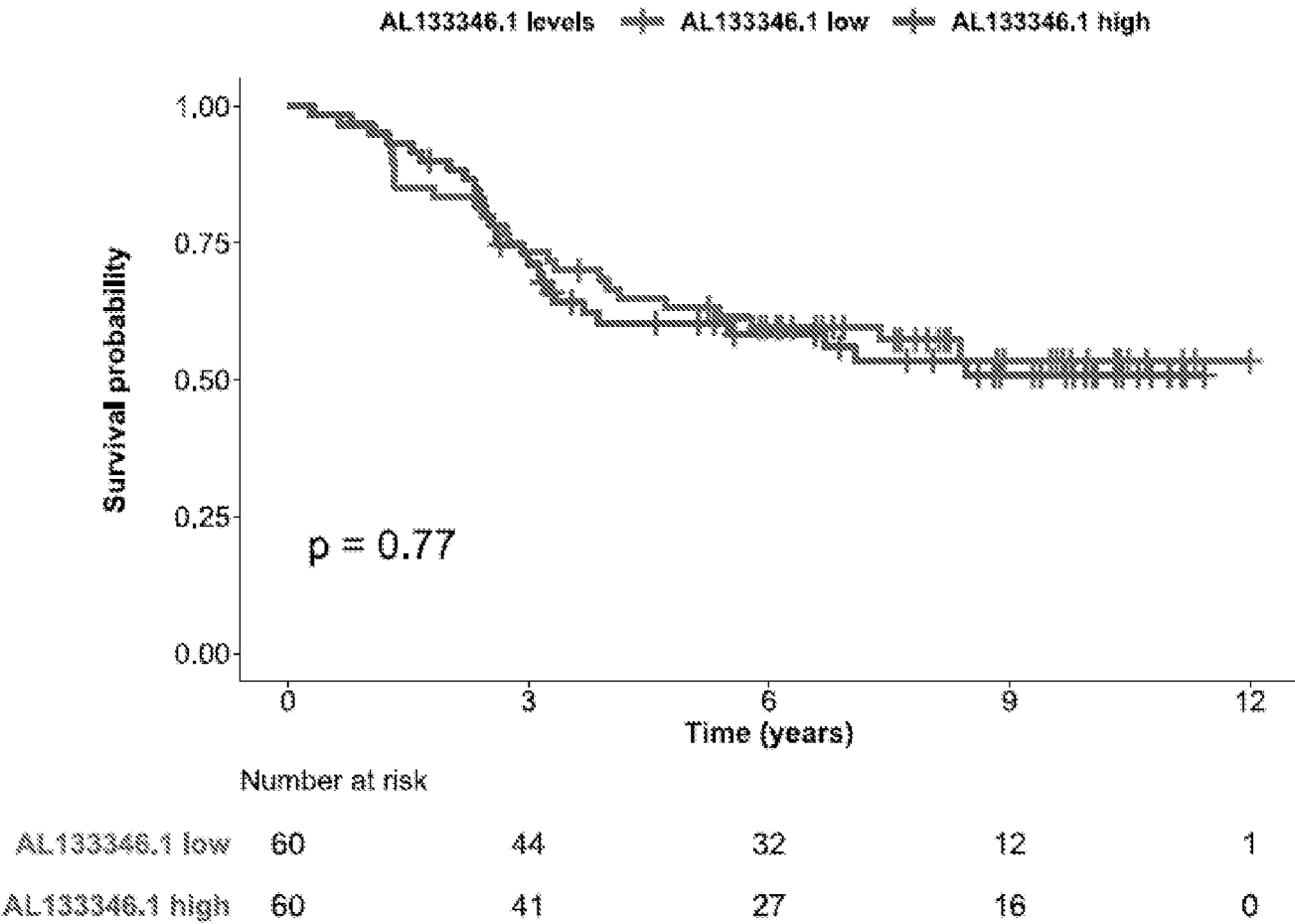


Figura 10

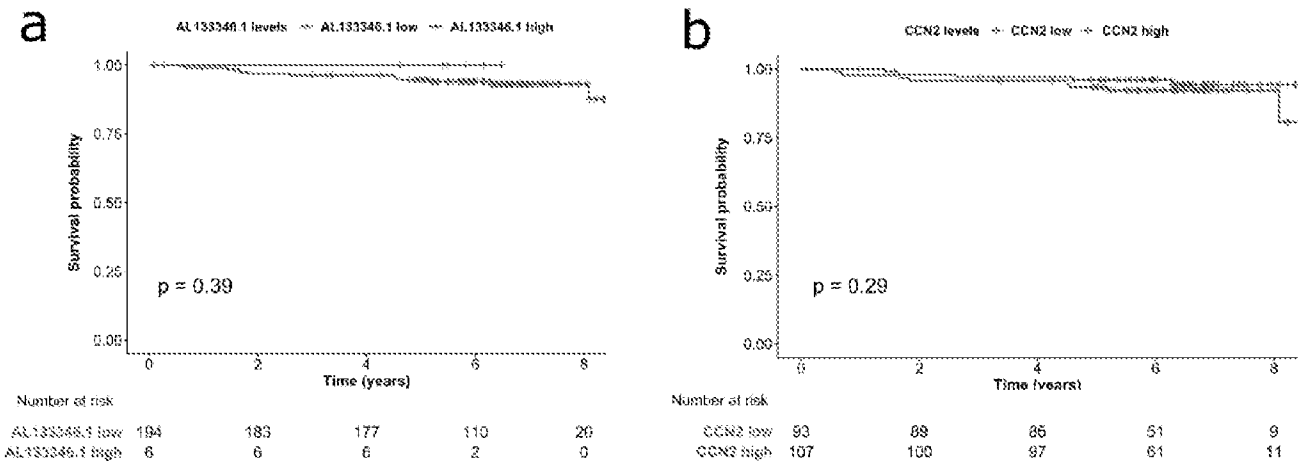


Figura 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/6809 (2018.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, PATENW, INVENES, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPD, NPL, XPOAC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CUADROS, M. et al. LncRNA-mRNA co-expression analysis identifies AL133346.1/CCN2 as biomarkers in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancers. 17 December 2020, Vol. 12, N° 12, Article N° 3803. ISSN 2072-6694 (electronic), <DOI: 10.3390/cancers12123803>. The whole document.	1-11, 16
P,X	GARCIA, D. et al. Bioinformatic analysis identifies specific co-expression of lncRNA/mRNA in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. Pediatric Blood and Cancer. November 2021, Vol. 68, Supplement 5, pages: S108-S109. ISSN 1545-5017, <DOI:10.1002/pbc.29349>. The whole document.	1-11, 16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16/03/2022

Date of mailing of the international search report
(23/03/2022)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
E. Relaño Reyes

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070899

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 5 relates to a subject matter that is considered by this International Searching Authority to be affected by PCT Rule 67.1(iv), concerning a method for treatment of the human or animal body by surgery.
Consequently, no search has been carried out in respect of step (i) of claim 5.
2. ☒ Claims Nos.: 1(partially), 3(partially), 5-8 (partially), 10(partially), 12-15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

SEE EXTRA SHEET
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070899

C (continuation).		
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AFFINITO, O. et al. LncRNAs-mRNAs co-expression network underlying childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a pilot study. Cancers. September 2020, Vol. 12, N° 9, Article N° 2489. ISSN 2072-6694 (electronic), <DOI:10.3390/cancers12092489>. Especially: paragraph 2.4.3; tables 1, S1.	1-11, 16
A	CUADROS, M. et al. Expression of the long non-coding RNA TCL6 is associated with clinical outcome in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood Cancer Journal. November 2019, Vol. 9, N° 12, Article N° 93. ISSN 2044-5385, <DOI: 10.1038/s41408-019-0258-9>. Especially: pages 1 - 4; supplementary tables S3, S5.	1-11, 16
A	WO 2010/056351 A2 (STC UNM) 20/05/2010, pages 47 - 48, 56-57; table S4.	1-11, 16
A	WANG, W. et al. Differential expression patterns of specific long noncoding RNAs and competing endogenous RNA network in acute lymphocyte leukemia. Hemasphere. June 2019, Vol. 3, Supplement 1, page 37. ISSN 2572-9241 (print). The whole document.	1-11, 16
A	SI, J.-J. et al. [Long Non Coding RNA RP11-69I8.3 expression in acute leukemia and its clinical significance]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. August 2018, Vol. 26, N° 4, pages 978 - 983. ISSN 1009-2137 (print), <DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.04.006> (abstract) [on line database] [retrieved the 16.03.2022] Retrieved from <Medline EPOQUE database> AN NLM30111394.	1-11, 16
A	LAJOIE, M. et al. Specific expression of novel long non-coding RNAs in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Plos One. March 2017, Vol. 12, N° 3, Article N° e0174124. ISSN 1932-6203 (print), ISSN 1932-6203 (electronic), <DOI: 10.1371/journal.pone.0174124>. Especially: pages 9 - 14; table S1.	1-11, 16

Claims 1, 3, 5 - 8, 10, and 12 - 15 are unclear and are not adequately supported by the description (PCT Article 6):

- Claim 1 is unclear and is not adequately supported by the description (PCT Article 6). The wording is ambiguous, since it is unclear if only AL133346.1 is used as a marker or if additional RNAs are used. In view of the dependent claims, it has been understood for the search that the scope of claim 1 is the use of at least lncRNA AL133346.1 as a marker. In addition, claim 1 lacks essential features, since it does not indicate the type of RNA modification or its relationship with diagnosis. Moreover, claim 1 is not adequately supported by the description, since it cannot be deduced from the description that the markers examined are therapeutically active. Furthermore, it is stated on page 17, line 19, that there was no link between survival and AL133346.1 expression levels. Consequently, the subject matter of claim 1 has been understood as the use of the expression of lncRNA AL133346.1 and mRNA of CCN2 in an isolated sample as markers in the diagnosis and prognosis of childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia (childhood B-LLA), wherein an increase in the expression of these markers in relation to values for healthy individuals is linked with the condition of childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia and an increase in the expression of mRNA of CCN2 is linked with a better prognosis for the disease. Therefore, the scope of claims 1 to 4 is the same.
- Claims 3, 6, 10 and 13 are not adequately supported by the description (PCT Article 6). Based on the information in the description, it follows only that there is a link between the expression of mRNA of CCN2 and B-LLA. Consequently, only this mRNA has been searched.
- Claims 5 - 8, and 10 are unclear and are not adequately supported by the description for the same reasons set forth for claim 1 (PCT Article 6). In addition, based on the description, it follows only that an increase in the expression of these RNAs is linked with the condition of childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia, this being the disease considered in the search. Therefore, the scope of claims 5 to 10 is the same.
- Claims 12 - 15 are unclear (PCT Article 6) since the functional definition provided in these claims for the essential reagents of the kit is unclear. In the case of claim 12, it should be noted that the combined measurement of RNAs AL133346.1 and CCN2 is required in order to carry out the method of the invention; hence, this claim is not supported by the description (PCT Article 6). In addition, claim 15 lacks clarity and is not supported by the description (PCT Article 6): first, the RNAs of the invention are expressed using microarrays, not using RT-PCR, since the application contains no reference to expression analysis using this technique; and, secondly, it is not common for antibodies to be used as essential reagents in RT-PCR. Therefore, these claims have not been searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070899

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010/056351 A2 -----	20.05.2010 -----	US 2011230372 A1 -----	22.09.2011 -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2021/070899

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD C12Q1/6809 (2018.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, WPI, PATENW, INVENES, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPTON, NPL, XPOAC

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
P,X	CUADROS, M. et al. LncRNA-mRNA co-expression analysis identifies AL133346.1/CCN2 as biomarkers in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancers. 17 diciembre 2020, Vol. 12, N° 12, Artículo N° 3803. ISSN 2072-6694 (electrónico), <DOI: 10.3390/cancers12123803>. Todo el documento.	1-11, 16
P,X	GARCIA, D. et al. Bioinformatic analysis identifies specific co-expression of lncRNA/mRNA in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. Pediatric Blood and Cancer. Noviembre 2021, Vol. 68, Suplemento 5, páginas: S108 - S109. ISSN 1545-5017, <DOI:10.1002/pbc.29349>. Todo el documento.	1-11, 16

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
16/03/2022

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
23 de marzo de 2022 (23/03/2022)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Relaño Reyes
N° de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2021/070899

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. Con respecto a **las listas de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
 - a. ☒ que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó:
 - ☒ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen.
 - b. ☐ presentada junto con la solicitud internacional de acuerdo a la Regla 13.ter.1a) del PCT exclusivamente a los fines de la búsqueda, en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25.
 - c. ☐ Presentada con posterioridad a la fecha de presentación únicamente a los fines de la búsqueda internacional:
 - ☐ en formato de archivo de texto según Anexo C/ST.25 (Regla 13ter.1a)).
 - ☐ en formato papel o en formato de archivo de imagen (Regla 13ter.1b) e Instrucciones Administrativas, sección 713).
2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la que formaba parte de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2021/070899

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 5
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

La reivindicación 5 se refiere a una materia que esta Administración considera que está afectada por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT, relativas a un método de tratamiento quirúrgico del cuerpo humano o animal. En consecuencia, no se ha buscado la etapa i) de la reivindicación 5.

2. ☒ Las reivindicaciones n°s: 1 (parcialmente), 3 (parcialmente), 5-8 (parcialmente), 10 (parcialmente), 12-15
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

Ver hoja adicional

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2021/070899

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	AFFINITO, O. et al. LncRNAs-mRNAs co-expression network underlying childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a pilot study. Cancers. Septiembre 2020, Vol. 12, N° 9, Artículo N° 2489. ISSN 2072-6694 (electrónico), <DOI:10.3390/cancers12092489>. Especialmente: apartado 2.4.3; tablas 1, S1.	1-11, 16
A	CUADROS, M. et al. Expression of the long non-coding RNA TCL6 is associated with clinical outcome in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. Blood Cancer Journal. Noviembre 2019, Vol. 9, N° 12, Artículo N° 93. ISSN 2044-5385, <DOI: 10.1038/s41408-019-0258-9>. Especialmente: páginas 1 - 4; tablas suplementarias S3, S5.	1-11, 16
A	WO 2010/056351 A2 (STC UNM) 20/05/2010, páginas 47 - 48, 56-57; tabla S4.	1-11, 16
A	WANG, W. et al. Differential expression patterns of specific long noncoding RNAs and competing endogenous RNA network in acute lymphocyte leukemia. Hemasphere. Junio 2019, Vol. 3, Suplemento 1, página 37. ISSN 2572-9241 (impreso). Todo el documento.	1-11, 16
A	SI, J.-J. et al. [Long non coding RNA RP11-69i8.3 expression in acute leukemia and its clinical significance]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. Agosto 2018, Vol. 26, N° 4, páginas 978 - 983. ISSN 1009-2137 (impreso), <DOI: 10.7534/j.issn.1009-2137.2018.04.006> (resumen) [base de datos en línea] [recuperado el 16.03.2022] Recuperado de <Base de datos Medline EPOQUE> AN NLM30111394.	1-11, 16
A	LAJOIE, M. et al. Specific expression of novel long non-coding RNAs in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. Plos One. Marzo 2017, Vol. 12, N° 3, Artículo N° e0174124. ISSN 1932-6203 (impreso), ISSN 1932-6203 (electrónico), <DOI: 10.1371/journal.pone.0174124>. Especialmente: páginas 9 - 14; tabla S1.	1-11, 16

Continuación del Recuadro II.

Las reivindicaciones 1, 3, 5 - 8, 10, 12 - 15 no son claras ni están fundadas adecuadamente en la descripción (art. 6 PCT):

- La reivindicación 1 no es clara ni está fundada adecuadamente en la descripción (art. 6 PCT). La redacción resulta ambigua, ya que no queda claro si solo se utiliza como marcador AL133346.1 o se usan ARNs adicionales. En vista de las reivindicaciones dependientes, en la búsqueda se ha entendido que el alcance de la misma es el uso de al menos el lncRNA AL133346.1 como marcador. Asimismo, faltan características esenciales, ya que no se indica el tipo de alteración que presenta el ARN ni su relación con el diagnóstico. Por otro lado, tampoco están fundadas adecuadamente en la descripción, ya que de ésta no se deduce que los marcadores estudiados tengan actividad terapéutica. Además, en la página 17, línea 19, se afirma que no hubo asociación entre la supervivencia y los niveles de expresión de AL133346.1. En consecuencia, el objeto de la reivindicación 1 se ha entendido que es el uso de la expresión del lncRNA AL133346.1 y del ARNm CCN2 en una muestra aislada como marcadores en el diagnóstico y pronóstico de la leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica (LLA-B pediátrica), donde el aumento de la expresión de estos marcadores con respecto a los valores de individuos sanos, se relaciona con el padecimiento de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica y el incremento de la expresión del ARNm de CCN2 con un mejor pronóstico de la enfermedad. Por lo tanto, el alcance de las reivindicaciones 1 a 4 es el mismo.
- Las reivindicaciones 3, 6, 10 y 13 no están adecuadamente fundadas en la descripción (art. 6 PCT). A partir de los datos de la descripción, tan solo se deduce que hay relación entre la expresión del ARNm de CCN2 y la LLA-B. Consecuentemente, solo se ha buscado este ARNm.
- Las reivindicaciones 5 - 8, 10 ni son claras ni están adecuadamente fundadas en la descripción por los mismos motivos expuestos para la reivindicación 1 (art. 6 PCT). Además, de la descripción solo se deduce que el aumento de la expresión de estos ARNs está relacionado con el padecimiento de leucemia linfoblástica aguda de células B pediátrica, siendo esta patología la que se ha considerado en la búsqueda. Por lo tanto, el alcance de las reivindicaciones 5 - 10 es el mismo.
- Las reivindicaciones 12 - 15 no son claras (art. 6 PCT) debido a que se incluye una definición funcional poco clara de los reactivos esenciales del kit. En el caso de la reivindicación 12 hay que tener en cuenta que para llevar a cabo el método de la invención se requiere la medición conjunta de los ARNs AL133346.1 y CCN2, por lo que tampoco está basada en descripción (art. 6 PCT). Además, la reivindicación 15 ni es clara ni está basada en la descripción (art. 6 PCT): por un lado, la expresión de los ARNs de la invención se realiza mediante microarrays, no mediante RT-PCR, no habiéndose incluido en la solicitud ningún dato referente a análisis de expresión con esta técnica, y por otro, no resulta habitual el uso de anticuerpos como reactivos esenciales en las RT-PCR. Por todos estos motivos, no se han buscado estas reivindicaciones.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES2021/070899

Información relativa a los miembros de familias de patentes			
Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2010/056351 A2 -----	20.05.2010 -----	US 2011230372 A1 -----	22.09.2011 -----