

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 728**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2019 PCT/IB2019/052042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2019 WO19175802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2019 E 19719623 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3765519**

54 Título: **Anticuerpo anti-CXCR4 combinado con linfocitos citolíticos naturales activados y expandidos para inmunoterapia contra el cáncer**

30 Prioridad:

13.03.2018 US 201862642313 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2024

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA
PAZ (50.0%)
Planta-1 Paseo de la Castellana, 261
28046 Madrid, ES y
FUNDACIÓN DEL SECTOR PÚBLICO ESTATAL
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
ONCOLÓGICAS CARLOS III (F.S.P. CNIO) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VELA CUENCA, MARÍA;
GONZÁLEZ NAVARRO, PABLO;
VALENTÍN QUIROGA, JAIME;
ESCUADERO LÓPEZ, ADELA;
FERNÁNDEZ CASANOVA, LUCÍA y
PÉREZ MARTÍNEZ, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 973 728 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

Anticuerpo anti-CXCR4 combinado con linfocitos citolíticos naturales activados y expandidos para inmunoterapia contra el cáncer

5 A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a varias publicaciones entre paréntesis por nombre del autor y fecha, o por N.º de Patente o N.º de Publicación de Patente. Las citas completas de estas publicaciones se pueden encontrar al final de la memoria descriptivamente inmediatamente anterior a las reivindicaciones.

10 **Referencia cruzada a la solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud provisional de los EE.UU. N.º 62/642.313, presentada el 13 de marzo de 2018.

15 **Listado de secuencias**

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII. La copia ASCII se creó el 11 de marzo de 2019, se denomina 20190311_SEQ_13108WOPCT.txt y tiene un tamaño 26.678 bytes.

20 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a usos médicos para tratar un cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo (Ab) anti-Receptor 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) en combinación con inmunoterapia con linfocitos citolíticos naturales activados y expandidos (NKAE).

Antecedentes de la invención

30 La metástasis, la diseminación de células cancerosas desde el tumor primario a los tejidos circundantes y a órganos distantes, es la principal causa de morbilidad y mortalidad por cáncer, se estima que es responsable de aproximadamente el 90 % de las muertes por cáncer (Chaffer y Weinberg, 2011; Seyfried y Huysentruyt, 2013). Los sarcomas afectan principalmente a niños y adultos jóvenes, pero a pesar del tratamiento agresivo, casi la mitad de los niños con tumores sólidos tales como rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing y neuroblastoma tienen una enfermedad progresiva. El pronóstico es particularmente malo para aquellos pacientes con enfermedad metastásica, al menos dos tercios de los cuales tienen progresión de la enfermedad (Oberlin *et al.*, 2008; Heare *et al.*, 2009; Mateo *et al.* 2009). Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos enfoques terapéuticos que eviten los mecanismos celulares de resistencia a los fármacos, en particular para pacientes con características de alto riesgo, tal como la enfermedad metastásica.

40 La metástasis es un proceso complejo de múltiples etapas que incluye la invasión tisular local de células metastásicas, su supervivencia en la circulación, "migración dirigida" a y extravasación en un órgano secundario, y proliferación/crecimiento en los sitios metastásicos (Nguyen *et al.*, 2009). Las quimiocinas que interactúan con los receptores de quimiocinas expresados por células tumorales en metástasis tienen funciones cruciales en la dirección de las células migratorias hacia órganos secundarios. Esto está bien documentado para la quimiocina CXCL12 y su receptor, CXCR4. Müller y sus compañeros postularon y descubrieron inicialmente el eje de migración dirigida CXCL12-CXCR4 en la metástasis del cáncer (Müller *et al.*, 2001). Demostraron que las células de cáncer de mama que expresaban CXCR4 migraban preferentemente hacia extractos de proteínas del pulmón, que expresa CXCL12 abundantemente.

50 En el presente documento se desvela un enfoque inmunoterápico novedoso para tratar el cáncer, incluyendo el cáncer metastásico, que comprende administrar a un paciente con cáncer un Ab anti-CXCR4 en combinación con terapia con linfocitos NKAE.

55 CXCR4, también conocido como CD184, es un receptor de la superficie celular de dominio siete transmembrana, acoplado a proteína G, que se sobreexpresa en la mayoría de los cánceres humanos y, junto con su ligando endógeno CXCL12, desempeña una función fundamental en la patogenia del cáncer, incluyendo la contribución al crecimiento y la proliferación, la adhesión, la invasión, la metástasis, la angiogénesis y la supervivencia tumorales (Domanska *et al.* 2013; Duda *et al.*, 2011; Balkwill, 2004; Pitt *et al.*, 2015; Passoro *et al.*, 2015; documento WO 2008/060367). La unión de CXCL12 a CXCR4 estimula el flujo de calcio intracelular, activa las vías de señalización de AKT y ERK y regula positivamente la formación de adherencias focales, lo que en última instancia da como resultado una mayor migración a lo largo de gradientes de quimiocinas secretadas y expresadas localmente (Chatterjee *et al.*, 2014). También conduce a la transcripción de genes que promueve la supervivencia y la proliferación celulares. CXCR4 se encuentra en diversos tejidos con expresión predominante en células del linaje hematopoyético, incluyendo los linfocitos B y T, monocitos, macrófagos, citolíticos naturales (NK) y células dendríticas, así como células progenitoras de médula ósea CD34⁺ (Lee *et al.*, 1999).

El ulocuplumab (anteriormente denominado BMS-936564 o MDX-1338, y designado F7GL en el documento WO 2008/060367) es un anticuerpo monoclonal (mAb) IgG4 (S224P) totalmente humano que se une específicamente a CXCR4 expresado en la superficie de una célula. Ulocuplumab comprende regiones V_H y V_L que comprenden aminoácidos unidos consecutivamente que tienen las secuencias mostradas como SEQ ID NO: 33 y 37, respectivamente. El bloqueo de la señalización de CXCR4 por ulocuplumab puede alterar las interacciones tumor-estroma, sensibilizar las células tumorales a los agentes citotóxicos y reducir la carga metastásica. Además, el ulocuplumab inhibe directamente el crecimiento y la proliferación tumorales e induce la apoptosis, de células tumorales que expresan CXCR4 (documento WO 2008/060367; documento WO 2013/071068; Kuhne *et al.*, 2013).

El potencial conocido de las células inmunitarias para reconocer y destruir células tumorales sugiere su función potencial en el tratamiento contra el cáncer, lo que se ha logrado recientemente con el desarrollo de inhibidores de puntos de control para potenciar la citotoxicidad de los linfocitos T citolíticos (Chen y Mellman, 2013; Lesokhin *et al.*, 2015). Los linfocitos citolíticos naturales (NK, por sus siglas en inglés) son una subpoblación de linfocitos mononucleares, implicados en la inmunidad y en el sistema de vigilancia inmunitaria del hospedador. Sus propiedades biológicas incluyen el direccionamiento y la destrucción de células diana que no expresan las proteínas "propias" del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)/antígeno leucocitario humano (HLA), y/o células tumorales u otras células enfermas que expresan ligandos para la activación de los receptores de NK. La capacidad de estas células para dirigirse y destruir con precisión células madre cancerosas y células alteradas genotóxicamente sin necesidad de inmunización o activación previa, manteniendo al mismo tiempo la tolerancia a las células sanas, los convierte en efectores terapéuticos atractivos para todas las formas de cáncer, incluyendo la metástasis (Vivier *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha publicado que su combinación con fármacos quimioterápicos e irradiación local es útil para romper la tolerancia inmunitaria y crear un microambiente favorable para la terapia celular adoptiva (Zheng *et al.*, 2015). Sin embargo, la actividad de los linfocitos NK está regulada por mecanismos complejos que implican señales tanto estimulantes como inhibitoras, y un equilibrio entre los receptores activadores e inhibidores desempeña una función en el reconocimiento y la destrucción de tumores por los linfocitos NK y, por lo tanto, en su eficacia terapéutica. Los receptores de activación de linfocitos citolíticos (KAR) unidos a la membrana trabajan junto con los receptores similares a inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR), que comprenden receptores tanto inhibidores como activadores que reconocen variantes alotípicas de los alelos de HLA de clase I como ligandos de KIR (KIRL), para regular la función de los linfocitos NK (Lanier, 2005; Pegram *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2013). Se ha postulado que el patrón de ligandos activadores/inhibidores encontrados en un tumor puede ser un elemento clave en la predicción de su respuesta a la terapia con linfocitos NK.

Un aumento en el estado de activación de los linfocitos NK, una disminución de las señales supresoras (por ejemplo, usando MHC de clase I alterado o emparejado erróneamente), o ambos, debería dar como resultado una mayor citotoxicidad de los linfocitos NK. Por otra parte, la magnitud de la citotoxicidad de los linfocitos NK es directamente proporcional a la relación entre el número de linfocitos NK y las células diana (es decir, relación efector/diana o E:T, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, en el contexto de la terapia con linfocitos NK, se prevé que la infusión de grandes cantidades de los linfocitos NK alógenos y preactivados alcancen el máximo efecto antineoplásico. Con este fin, se han desarrollado métodos para activar y expandir específicamente los linfocitos NK humanos de la sangre periférica (véase, por ejemplo, Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009; Somanchi y Lee, 2016). Estos grupos han publicado que la estirpe celular de leucemia K562 modificada genéticamente para expresar interleucina (IL)-15 unida a membrana y el ligando 4.1-BB (K562-mb15-4.1BBL) activa específicamente los linfocitos NK humanos y los impulsa hacia el ciclo celular, conduciendo a linfocitos NK altamente citotóxicos. Además, el método para estimular las células K562-mb15-4.1BBL en condiciones de grado clínico a gran escala se estableció usando directrices clínicas GMP, generando un gran número de linfocitos NKAE altamente citotóxicos. Adicionalmente, los datos sugieren que los linfocitos NK de donantes haploidénticos pueden ejercer actividad antitumoral en pacientes con tumores sólidos sometidos a un trasplante alógeno de células madre hematopoyéticas, basado parcialmente en un efecto de aloinjerto frente a tumor asociado al emparejamiento erróneo entre donante y receptor KIR-HLA (Pende *et al.*, 2009; Moretta *et al.*, 2011). En consecuencia, el uso de linfocitos NKAE se está explorando activamente en ensayos clínicos en pacientes con neoplasias malignas hemáticas y tumores sólidos (véase, por ejemplo, el sitio web de ensayos clínicos, https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=activated+and+expanded+NK+cells&con_d=cancer). Estos estudios tienen como objetivo demostrar el potencial de NKAE como terapia segura y eficaz para el tratamiento de diversos tipos de tumores.

Ishikawa *et al.* (2018) describe ensayos clínicos de fase I de transferencia adoptiva de linfocitos citolíticos naturales expandidos en combinación con un anticuerpo IgG1 para tratar pacientes con cáncer gástrico o colorrectal. El tratamiento consistió en quimioterapia a base de trastuzumab o cetuximab, además de terapia adoptiva con linfocitos NK.

La invención desvelada se refiere a estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* que demuestran la sinergia entre la terapia con linfocitos NKAE y el tratamiento con un Ab anti-CXCR4 para prevenir la migración, la invasión, el implante y la metástasis de células tumorales. La capacidad de esta terapia combinada para inhibir la migración y la invasión de células tumorales CXCR4⁺ se analizó *in vitro*. Se usó un modelo ortotópico de rabdomiosarcoma alveolar en ratones inmunodeficientes para evaluar el efecto sinérgico antitumoral y antimetastásico *in vivo*. Adicionalmente, la expresión de CXCR4 se analizó en tumores de pacientes pediátricos con rabdomiosarcoma. Los datos presentados en el presente documento sugieren que esta inmunoterapia de combinación es eficaz para tratar diversos cánceres y

prevenir la metástasis.

Sumario de la invención

5 La presente divulgación proporciona una combinación de cantidades terapéuticamente eficaces de: (a) una población aislada de linfocitos NK; y (b) un Ab aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CXCR4 expresado en la superficie de una célula cancerosa para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece un cáncer que comprende administrar al sujeto la población aislada de linfocitos NK y el Ab aislado o la porción de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones preferidas, la población de linfocitos NK comprende
10 linfocitos NK activados y expandidos (NKAE). En otras realizaciones preferidas, el Ab o una porción de unión a antígeno del mismo altera la interacción entre CXCR4 y la quimiocina 12 con motivo C-X-C (CXCL12) e inhibe la señalización de CXCR4/CXCL12. En realizaciones preferidas adicionales, el Ab es ulocuplumab, que comprende regiones V_H y V_L que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID NO: 33 y 37, respectivamente.

15 En determinadas realizaciones de los métodos desvelados, el cáncer es un tumor sólido, incluyendo un tumor pediátrico tal como un rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma o sarcoma de Ewing. En otras realizaciones, el cáncer es una neoplasia hemática.

La presente divulgación proporciona un kit para tratar a un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo el kit: (a) una o más dosificaciones que varían de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg de un Ab o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CXCR4 expresado en la superficie de una célula cancerosa; (b) una o más dosificaciones que varían de 10^6 a 10^{14} de una población de linfocitos NKAE; y (c) instrucciones para usar el Ab o porción del mismo y los linfocitos NKAE en cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.
20

25 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de los ejemplos.

Breve descripción de las figuras

30 La Figura 1 muestra un análisis de la expresión de CXCR4 en seis estirpes celulares de sarcoma (RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63 y 143B) mediante (A) citometría de flujo y (B) reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR). La estirpe celular de rhabdomyosarcoma alveolar RH30 mostró la mayor expresión de CXCR4.

35 La Figura 2 muestra la capacidad de migración e invasión de las diferentes estirpes celulares de sarcoma (RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63 y 143B) hacia (A) suero bovino fetal (FBA) o (B) CXCL12 (100 ng/ml). La estirpe celular RH30 mostró los índices de migración e invasión más altos hacia CXCL12 (Figura 2B). La capacidad de migración se sometió a ensayo usando ensayos Transwell de membranas de poro de 8 μ m y la capacidad de invasión se midió en las mismas condiciones usando membranas Transwell recubiertas con Matrigel.

40 La Figura 3 muestra la citotoxicidad y la inhibición de la migración e invasión por NKAE y la terapia anti-CXCR4, individualmente o en combinación, en células de rhabdomyosarcoma (RH30) *in vitro*. A, Los linfocitos NKAE mostraron una alta citotoxicidad contra las células RH30. La lisis específica en ausencia de Ab, con ulocuplumab (MDX1338; 100 μ g/ml) o mAAb de control IgG4 (100 μ g/ml) se determinó en las relaciones efector:diana (E:T) de NKAE:RH30 indicadas. B-C, El ulocuplumab (MDX1338) y los linfocitos NKAE redujeron eficientemente la migración y la invasión de las células RH30 hacia CXCL12, pero sólo la combinación de ambos agentes las anuló totalmente. La migración de las células RH30 hacia un gradiente de quimiocina CXCL12 recombinante humana se analizó usando placas Transwell. La concentración de Ab fue de 100 μ g/ml y la relación E:T de NKAE:RH30 fue de 5:1 (B). La capacidad de invasión se midió en las mismas condiciones usando membranas Transwell recubiertas con Matrigel (C).
45

50 La Figura 4 muestra los efectos de los linfocitos NKAE y la terapia anti-CXCR4, individualmente o en combinación, sobre el crecimiento de implantes tumorales de rhabdomyosarcoma RH30 GFP⁺ Luc⁺ en la región abdominal de ratones NSG inmunodeficientes. A, Crecimiento de implantes tumorales de RH30. Se establecieron cinco brazos de tratamiento: sin tratar; IgG4; ulocuplumab (MDX1338); linfocitos NKAE; una combinación de linfocitos NKAE y ulocuplumab. Los ratones recibieron 6 dosis de mAAb (15 mg/kg, dos veces por semana) y 3 dosis de NKAE (5×10^6 células, una vez a la semana). Los tumores luminiscentes se controlaron durante 35 días. B, Cuantificación de la presencia de células tumorales medida mediante la luminiscencia de células RH30 GFP⁺ Luc⁺ implantadas en los ratones tratados. El tratamiento con ulocuplumab por sí solo inhibió moderadamente el crecimiento de los implantes tumorales de RH30, mientras que el tratamiento con NKAE lo impidió totalmente.
55

60 La Figura 5 muestra los efectos de los linfocitos NKAE y el ulocuplumab, individualmente o en combinación, sobre la formación de micrometástasis pulmonares a partir de tumores RH30 en ratones. A, Expresión relativa de CXCR4 humano en lesiones metastásicas pulmonares de RH30 en ratones medida mediante qRT-PCR usando una sonda específica de CXCR4 humano. Los valores indicados son con respecto a la expresión del gen indicado por un sedimento de 10^6 células RH30. El ulocuplumab(MDX1338) redujo la incidencia de micrometástasis pulmonares de RH30, mientras que la combinación de ulocuplumab y NKAE la eliminó por completo. B, Expresión relativa de GUS humano en lesiones metastásicas pulmonares de RH30 en ratones medida mediante qRT-PCR. Se requiere la combinación de la terapia con linfocitos NKAE y el tratamiento con ulocuplumab (MDX1338) para suprimir
65

totalmente la micrometástasis pulmonar de RH30 *in vivo*.

La Figura 6 muestra la confirmación de la inhibición de las micrometástasis del rhabdomyosarcoma RH30 mediante métodos histológicos. Las micrometástasis pulmonares en pulmones de ratones sin tratar se identificaron mediante tinción con hematoxilina y eosina (a), hibridación *in situ* de la secuencia A/u (b) y tinción de mAb específico de CXCR4 (c). Las flechas identifican las micrometástasis detectadas. Se requiere la combinación de la terapia con linfocitos NKA-E y el tratamiento con ulocuplumab para suprimir totalmente la micrometástasis pulmonar de RH30 *in vivo*.

La Figura 7 muestra el nivel de expresión de CXCR4 en los tumores de pacientes con rhabdomyosarcoma A. Tinciones representativas correspondientes a muestras con expresión citoplásmica de CXCR4 negativa (a), media (b) y alta (c). También se muestra una muestra de ensayo con tinción nuclear alta de CXCR4 (d). B, Puntuación de expresión de CXCR4 de las muestras de ensayo en el momento del diagnóstico. C, Muestras de ensayo de diagnóstico frente a post-quimioterapia y recaída. Se muestra la mediana \pm DE. Se aplicó el ensayo no paramétrico para muestras independientes de Mann-Whitney.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una combinación de inmunoterapia con linfocitos NKA-E y un Ab anti-CXCR4 para su uso en métodos para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar la combinación al sujeto.

20 Términos

Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente divulgación, en primer lugar, se definen determinados términos. Como se usa en la presente solicitud, excepto que se indique expresamente otra cosa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se expone a continuación. A lo largo de la solicitud se exponen otras definiciones adicionales.

"Administrar" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de suministro conocidos por los expertos en la materia. Una vía preferida para la administración de un Ab terapéutico tal como un Ab anti-CXCR4 es la administración intravenosa o subcutánea. Otras vías de administración incluyen la intramuscular, la intraperitoneal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica. Una vía preferida para la administración de linfocitos NKA-E es la administración intravenosa. Otras vías de administración incluyen la inyección intraarterial, intrafemoral, intraperitoneal o intratecal, intratumoral o inyección en una cavidad de resección tumoral. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Un "anticuerpo" (Ab) incluirá, sin limitación, una glucoproteína inmunoglobulina (Ig) que se une específicamente a un antígeno y comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de la misma. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada de un Ab IgG comprende tres dominios constantes, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera de un Ab IgG comprende un dominio constante, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los Ab pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Una inmunoglobulina puede derivar de cualquiera de los isotipos habitualmente conocidos, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgE e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, las IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. "Isotipo" se refiere a la clase o subclase de Ab (por ejemplo, IgM, IgG1 o IgG4) que está codificada por los genes de la región constante de cadena pesada. El término "anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, Ab tanto de origen natural como de origen no natural; Ab monoclonales y policlonales; Ab quiméricos y humanizados; Ab humanos y no humanos; Ab totalmente sintéticos; y An monocatenarios. Un Ab no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre. Cuando no se indique expresamente, y a menos que el contexto indique otra cosa, el término "anticuerpo" también incluye un fragmento de unión a antígeno o una porción de unión a antígeno de cualquiera de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente e incluye un fragmento o porción monovalente y uno divalente y un Ab monocatenario.

Un Ab "aislado" se refiere a un Ab que está sustancialmente exento otros Ab que tienen diferentes especificidades

antigénicas (por ejemplo, un Ab aislado que se une específicamente a CXCR4 está sustancialmente exento de Ab que se unen específicamente a antígenos distintos de CXCR4). Un Ab aislado que se une específicamente a, por ejemplo, CXCR4 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de CXCR4 de otras especies. Por otra parte, un Ab "aislado" también puede referirse a un Ab que está purificado para estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a una preparación de origen no natural de moléculas de Ab de composición molecular única, es decir, moléculas de Ab cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas, que presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Un mAb es un ejemplo de un Ab aislado. Los mAb se pueden producir mediante la técnica del hibridoma, recombinante, transgénica u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Un anticuerpo "quimérico" se refiere a un Ab en el que las regiones variables derivan de una especie y las regiones constantes derivan de otra especie, tal como un Ab en el que las regiones variables derivan de un Ab de ratón y las regiones constantes derivan de un Ab humano.

Un mAb "humano" (HuMAb) se refiere a un mAb que tiene regiones variables en las que tanto las regiones marco conservadas como las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Además, si el Ab contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana. Los Ab humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término Ab "humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir Ab en los que las secuencias de las CDR derivadas de la estirpe germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Las expresiones Ab "humanos" y Ab "totalmente humanos" se usan como sinónimos.

Un mAb "humanizado" se refiere a un mAb en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR de un mAb no humano se reemplazan por aminoácidos correspondientes derivados de inmunoglobulinas humanas. En una realización de una forma humanizada de un Ab, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR se han reemplazado por aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR permanecen sin cambios. Pequeñas adiciones, supresiones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no anulen la capacidad del Ab para unirse a un antígeno particular. Un Ab "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del Ab original.

Un Ab "anti-antígeno" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. Por ejemplo, un Ab anti-CXCR4 es un Ab que se une específicamente a CXCR4.

Una "porción de unión a antígeno" de un Ab (también llamada "fragmento de unión a antígeno") se refiere a uno o más fragmentos de un Ab que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno al que se une el Ab completo.

Un "cáncer" se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anómalas en el cuerpo. La división y el crecimiento celular no regulados dan como resultado la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden hacer metástasis en partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

"Receptor 4 de quimiocina C-X-C" (CXCR4; conocido también en la técnica como, por ejemplo, LESTR, Fusina o CD184) se refiere a un receptor acoplado a proteína G 7-transmembrana expresado en leucocitos, plaquetas y otras células no hematopoyéticas que componen el microambiente estromático del tumor. También se sobreexpresa en la mayoría de los cánceres humanos y en Treg y MDSC. CXCR4 se une a un único ligando, CXCL12. El término "CXCR4", como se usa en el presente documento, incluye CXCR4 humano (hCXCR4), variantes, isoformas y homólogos de especies de hCXCR4, y análogos que tienen al menos un epítipo común con hCXCR4. La secuencia completa de aminoácidos de hCXCR4 se puede encontrar en GENBANK® No. de acceso CAA12166 y se expone en SEQ ID NO: 43.

El término "inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado por o en riesgo de contraer o padecer una reaparición de, una enfermedad mediante un método que comprende inducir, potenciar, suprimir o modificar de otro modo una respuesta inmunitaria. "Tratamiento" o "terapia" de un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso realizado sobre, incluyendo la administración de un agente activo a, el sujeto con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir la aparición, la progresión, el desarrollo, la gravedad o la reaparición de un síntoma, complicación o afección, o indicios bioquímicos asociados a una enfermedad.

Un "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye, pero sin limitación, vertebrados, tales como primates no humanos, ovejas, perros y roedores tales como ratones, ratas y cobayas. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico es cualquier cantidad del fármaco o agente que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, protege a un sujeto contra la aparición de una enfermedad o promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y la duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención o reducción del deterioro o la discapacidad debidos a la enfermedad. Además, los términos "eficaz" y "eficacia", con respecto a un tratamiento, incluyen tanto la eficacia farmacológica como la seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco para promover la regresión de la enfermedad, por ejemplo, la regresión del cáncer, en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere a un nivel aceptable de toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órgano y/o de organismo (efectos adversos) resultado de la administración del fármaco. La eficacia de un agente terapéutico se puede evaluar usando una diversidad de métodos conocidos por el profesional experto, tal como sometiendo a ensayo la actividad del agente en ensayos *in vitro*, en sistemas de modelos animales predictivos de eficacia en seres humanos, o en sujetos humanos durante ensayos clínicos.

A modo de ejemplo para el tratamiento de tumores, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antineoplásico preferentemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente el 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente el 60 %, y todavía más preferentemente en al menos aproximadamente el 80 % con respecto a los sujetos sin tratar. En otras realizaciones preferidas de la invención, puede observarse regresión tumoral y continuar durante un período de al menos aproximadamente 20 días, más preferentemente, al menos aproximadamente 40 días o incluso más preferentemente, al menos aproximadamente 60 días. A pesar de estas mediciones en última instancia de la eficacia terapéutica, la evaluación de los fármacos inmunoterápicos también debe tener en cuenta los patrones de respuesta "relacionados con el sistema inmunitario".

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco incluye una cantidad profilácticamente eficaz, que es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad (por ejemplo, un sujeto que padece una afección premaligna y que corre riesgo de desarrollar un cáncer) o de padecer una reaparición de la enfermedad, inhibe el desarrollo o la reaparición de la enfermedad (por ejemplo, un cáncer). En realizaciones preferidas, la cantidad profilácticamente eficaz previene el desarrollo o la reaparición del cáncer por completo. "Inhibir" el desarrollo o la reaparición de una enfermedad significa disminuir la probabilidad de desarrollo o reaparición de la enfermedad o prevenir el desarrollo o la reaparición de la enfermedad por completo.

El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse que significa una u otra, ambas o cualquier combinación de las alternativas. Como se usan en el presente documento, debe entenderse que los artículos indefinidos "un" o "uno/a" se refieren a "uno o más" de cualquier componente citado o enumerado.

El término "aproximadamente" se refiere a un valor numérico, composición o característica que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor, composición o característica particular determinado por un experto en la materia, lo que dependerá en parte de cómo se mida o determine el valor, composición o característica, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o dentro de más de 1 desviación típica según la práctica en la técnica. Como alternativa, puede significar un intervalo de más o menos el 20 %, más por lo general un intervalo de más o menos el 10 %. Cuando se proporcionan valores, composiciones o características particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique otra cosa, se debe suponer que el significado de "aproximadamente" está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor, composición o característica particular. En las frecuencias de dosificación en las pautas de administración de fármacos, las expresiones "una vez aproximadamente cada semana", "una vez aproximadamente cada dos semanas", o cualesquier otras expresiones de intervalos de dosificación similares, como se usan en el presente documento, significan números aproximados. Por ejemplo, "una vez aproximadamente cada semana" puede incluir cada 7 días \pm un día, es decir, de cada 6 días a cada 8 días. "Una vez aproximadamente cada 2 semanas" puede incluir cada 14 días \pm 3 días, es decir, de cada 11 días a cada 17 días. Se aplican aproximaciones similares, por ejemplo, a una vez aproximadamente cada 3 semanas, una vez aproximadamente cada 4 semanas o una vez aproximadamente cada mes.

La expresión "sustancialmente igual" o "esencialmente igual" se refiere a un grado suficientemente alto de similitud entre dos o más valores numéricos, composiciones o características de manera que un experto en la materia consideraría la diferencia entre estos valores, composiciones o características de poca o ninguna significación biológica y/o estadística dentro del contexto de la propiedad que se está midiendo. La diferencia entre los valores numéricos que se están midiendo puede ser, por ejemplo, inferior a aproximadamente el 30 %, preferentemente inferior a aproximadamente el 20 % y, más preferentemente, inferior a aproximadamente el 10 %.

Como se describe en el presente documento, cualquier intervalo de concentraciones, intervalo de porcentajes, intervalo de relaciones o intervalo de números enteros se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique otra cosa.

Se describen diversos aspectos de la invención con más detalle en las siguientes subsecciones.

Usos terapéuticos

5 Los sarcomas, incluyendo principalmente el sarcoma de Ewing, el osteosarcoma y los sarcomas de tejidos blandos, son un grupo de tumores relativamente raros de origen mesenquimático (Stiller *et al.*, 2013). A pesar de su baja incidencia entre las neoplasias malignas humanas y los avances en la quimioterapia adyuvante y la resección quirúrgica amplia, el pronóstico sigue siendo malo, principalmente debido a la alta propensión a metástasis pulmonares, que es la principal causa de mortalidad en pacientes con sarcomas.

10 Se ha demostrado que las quimiocinas y su interacción con sus correspondientes receptores desempeñan una función fundamental en los mecanismos de desarrollo del cáncer y la aparición de metástasis (Vela *et al.*, 2015). Los niveles de expresión de quimiocinas y sus receptores están alterados en las células malignas. Este es el caso de CXCR4, el receptor de quimiocinas que se sobreexpresa con mayor frecuencia en las células tumorales. La interacción de CXCR4 con su ligando, CXCL12, activa una cascada de señalización celular que promueve la supervivencia, la proliferación, la adhesión y la migración de las células tumorales que lo expresan. Todo esto puede provocar la recaída del tumor primario, y un aumento de su capacidad para generar metástasis a distancia en órganos en los que se secreta el ligando, especialmente la médula ósea y los pulmones (Chatterjee *et al.*, 2014; Duda *et al.*, 2011).

20 La usurpación de las vías de señalización de CXCL12/CXCR4 por parte de las células tumorales para la metástasis y la protección contra la apoptosis identificó hace mucho tiempo el bloqueo de este eje como una oportunidad novedosa para la terapia contra el cáncer. Un informe pionero de Müller *et al.* (2001) demostró la relevancia *in vivo* de CXCR4 como diana para la terapia contra el cáncer, vinculando la expresión de CXCR4 en carcinomas de mama con su capacidad para generar metástasis regionales en los ganglios linfáticos y los pulmones. Estos datos fueron respaldados por experimentos en los que se usó un mAb anti-CXCR4 humano murino neutralizante, Clon 44717.111, condujo a una disminución significativa en las metástasis en ganglios linfáticos pulmonares, inguinales y axilares. Posteriormente, se obtuvieron resultados similares tratando xenoinjertos de un linfoma no Hodgkin humano (Bertolini *et al.*, 2002) y de una leucemia mieloide aguda humana primaria (Tavor *et al.*, 2004) con otro Ab anti-CXCR4 humano murino (Clon 12G5). En ambos modelos, se publicó una reducción significativa en la progresión tumoral. En xenoinjertos de cáncer de endometrio, el tratamiento con mAb 12G5 condujo a una inhibición completa de las metástasis espontáneas en el hígado y el pulmón, y a una disminución de 28 veces en el índice metastásico en el peritoneo (Gelmini *et al.*, 2009). De manera interesante, en el modelo de xenoinjerto de osteosarcoma humano intratibial, el mAb 12G5 redujo la diseminación metastásica al pulmón (Brennecke *et al.*, 2014).

35 Se han usado en ensayos clínicos linfocitos NK transferidos adoptivamente, principalmente linfocitos NK en reposo (Rubnitz *et al.*, 2010; Curti *et al.*, 2011) o linfocitos NK cocultivados con IL-2 (Bachanova *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2013; Molinero *et al.*, 2005). El uso de linfocitos NK activados y expandidos cocultivados con células presentadoras de antígenos de origen humano es una alternativa emergente (Szmania *et al.*, 2015; Leivas *et al.*, 2016; Ishikawa *et al.*, 2004; Vela *et al.*, 2018). Los resultados de estos ensayos muestran que los NKAE tanto autólogos como haploidénticos son una terapia segura sin efectos adversos graves y es un enfoque factible para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

45 Los datos presentados en el presente documento, demuestran que el ulocuplumab, un mAb humano que bloquea el eje CXCR4/CXCL12, reduce eficientemente el índice de migración e invasión de las células RH30 de rhabdomyosarcoma metastásico en experimentos *in vitro*, pero requiere la combinación de ulocuplumab con linfocitos NKAE para anular por completo la migración y la invasión. Análogamente, en experimentos *in vivo*, fue necesaria la combinación de la terapia con ulocuplumab y NKAE para eliminar no sólo el crecimiento de los tumores RH30 implantados, sino también su capacidad de diseminación, suprimiendo la formación de micrometástasis pulmonares. En consecuencia, esta divulgación proporciona una combinación de cantidades terapéuticamente eficaces de: (a) una población aislada de linfocitos NK, preferentemente, linfocitos NKAE; y (b) un Ab aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CXCR4 expresado en la superficie de una célula cancerosa para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece un cáncer que comprende administrar al sujeto la población aislada de linfocitos NK y el Ab aislado o una porción de unión a antígeno del mismo. En realizaciones preferidas de cualquiera de los presentes usos médicos, el sujeto es un paciente humano.

55 Como se muestra en el Ejemplo 3, un Ab anti-CXCR4 (ulocuplumab) y la terapia con linfocitos NKAE, administrados como monoterapia, redujeron cada uno potentemente tanto la migración de las células de rhabdomyosarcoma alveolar RH30 hacia CXCL12 *in vitro* (Figura 3B) como la capacidad de invasión de estas células *in vitro* (Figura 3C). En particular, la combinación de un anticuerpo anti-CXCR4 y la terapia con células NKAE presentó un nivel de inhibición de la migración y la invasión de las células RH30 incluso mayor, es decir, el anticuerpo anti-CXCR4 interactuó sinérgicamente con la terapia con linfocitos NKAE para anular totalmente tanto la migración como la invasión (Figuras 3B y C). Una combinación de dos terapias se considera sinérgica si el efecto antitumoral de la combinación es mayor que el efecto observado con la monoterapia usando el tratamiento más eficaz o mayor que la suma del nivel de inhibición que presenta cada tratamiento individualmente. Se ha demostrado que el Ab anti-CXCR4, ulocuplumab, inhibe directamente el crecimiento y la proliferación e induce la apoptosis de células cancerosas (documento WO 2008/060367; documento WO 2013/071068; Kuhne *et al.*, 2013) y estas propiedades inhibitorias de tumores pueden

contribuir a la eficacia de la terapia de combinación desvelada en el presente documento.

Se demostró un efecto sinérgico similar entre el anticuerpo anti-CXCR4 y la terapia con linfocitos NKAE *in vivo* (Ejemplo 4). La actividad antitumoral de un Ab anti-CXCR4 y la terapia con linfocitos NKAE, administrados como monoterapia o en combinación, se midió en un modelo de ratón de rhabdomyosarcoma alveolar RH30. El ulocuplumab presentó un efecto inhibitorio moderado sobre el crecimiento tumoral, mientras que la terapia con linfocitos NKAE inhibió totalmente el crecimiento tumoral en este modelo de tumor en ratón (Figura 4). Sin embargo, el análisis por qRT-PCR (Figura 5) y la tinción inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* (Figura 6) revelaron micrometástasis pulmonar de RH30 en los ratones tratados con NKAE. La terapia con NKAE tuvo solamente un efecto muy modesto sobre la metástasis pulmonar, mientras que el ulocuplumab tuvo un efecto más pronunciado (Figura 5), pero la combinación de ambas terapias presentó un fuerte efecto sinérgico en la metástasis pulmonar eliminándola totalmente (Figuras 5 y 6).

Población de linfocitos NK

Se han propuesto diversas estrategias terapéuticas y de vacuna basadas en una modulación de la actividad de los linfocitos NK. Sin embargo, la actividad de los linfocitos NK está regulada por mecanismos complejos que implican señales tanto estimuladoras como inhibitorias. Un conjunto importante de receptores reguladores es la familia de receptores similares a inmunoglobulinas de linfocitos citolíticos (KIR) restringidos por HLA de clase I que comprende miembros de la familia tanto inhibidores como activadores que reconocen variantes alotípicas de los alelos HLA de clase I como ligandos de KIR (KIRL). Los linfocitos NK de un solo individuo generalmente expresan diferentes combinaciones de KIR, proporcionando un repertorio de linfocitos NK con diferentes especificidades para las moléculas HLA de clase I.

Los receptores de activación de linfocitos citolíticos (KAR) unidos a la membrana trabajan junto con los KIR para regular la función de los linfocitos NK (Lanier, 2005). Inicialmente se pensó que sólo había un KAR y un KIR (modelo de dos receptores), pero durante la última década, se han descubierto múltiples KAR y KIR diferentes (modelo de señales opuestas), tales como los receptores activadores NKp46 y NKG2D y los receptores inhibidores KIR2DL (véase la Tabla 1). Muchos cánceres humanos expresan ligandos de NKG2D (NKG2DL) (Nausch y Cerwenka, 2008; Pérez-Martínez *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013). De hecho, recientemente se ha demostrado que el efecto antitumoral mediado por la interacción NKG2D/NKG2DL se dirige principalmente a células iniciadoras de tumores o células madre tumorales, tanto en modelos de mieloma múltiple como de sarcoma (Fernández *et al.*, 2015). Se ha postulado que el patrón de ligandos activadores/inhibidores encontrados en un tumor puede ser un elemento clave en la predicción de su respuesta a la terapia con linfocitos NK.

Tabla 1. Sumario de receptores activadores (KAR) e inhibidores (KIR) en linfocitos NK

Receptor	Función	Ligandos
KIR (CD158)	Activador o Inhibidor	Moléculas de MHC de clase I
NKG2D (CD314)	Activador	MICA, MICB, ULBP1-6
DNAM1 (CD226)	Activador	PVRL2 (CD112), PVR (CD155)
NKp46 (CD335)	Activador	Heparán sulfato, hemaglutinina, etc.
NKp44 (CD336)	Activador	Heparán sulfato, PCNC, etc.
NKp30 (CD337)	Activador	B7-H6, etc.
PD-1 (CD279)	Inhibidor	PD-L1, PD-L2
4-1BB (CD137)	Activador	4-1BBL

Los linfocitos NK pueden destruir células leucémicas y se han administrado en el contexto de un trasplante de células madre hematopoyéticas o después de una terapia inmunosupresora no mieloablativa para potenciar el efecto de la quimioterapia en pacientes con leucemia aguda, obteniendo resultados alentadores (Hsu *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Rubnitz *et al.*, 2010). En el estudio de Miller *et al.*, 5 de 19 pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) de mal pronóstico lograron una remisión completa después de la terapia con linfocitos NK haploidénticos. Los resultados fueron incluso mejores en el estudio de Rubnitz *et al.* (2010), que publicaron una remisión del 100 % en 10 pacientes con LMA de riesgo intermedio y bajo.

Los linfocitos NK también pueden lisar células malignas no hematopoyéticas, como lo demuestran los informes que indican citotoxicidad de los linfocitos NK contra estirpes celulares de sarcoma de Ewing, neuroblastoma, osteosarcoma y carcinoma hepatocelular *in vitro* e *in vivo* (Fernández *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2010; Verhoeven *et al.*, 2008; Pérez-Martínez *et al.*, 2015b; Kamiya *et al.*, 2016). Adicionalmente, los datos clínicos sugieren que los linfocitos NK de donantes haploidénticos pueden ejercer actividad antitumoral en niños con tumores sólidos sometidos a un trasplante alógeno de células madre hematopoyéticas basándose parcialmente en un efecto de aloinjerto frente a tumor asociado al emparejamiento erróneo donante-receptor KIR-HLA (Pérez-Martínez *et al.*, 2009; Pérez-Martínez *et al.*, 2015a).

Los presentes métodos combinan la citotoxicidad demostrada de los linfocitos NK contra tumores con el bloqueo de la señalización CXCR4/CXCL12 mediante un Ab anti-CXCR4. En determinadas realizaciones preferidas de los usos terapéuticos desvelados en el presente documento, la población de linfocitos NK comprende linfocitos NKAE. La IL-2 y otras citocinas, incluyendo IL-12, IL-15 y/o IL-21 pueden inducir respuestas proliferativas en linfocitos NK humanos,

pero sólo una pequeña fracción mantiene un crecimiento continuo (London *et al.*, 1986; Lanier *et al.*, 1988). Se ha demostrado que las expansiones sostenidas de linfocitos NK requieren señales adicionales, tales como la presencia de células β -linfoblastoides (London *et al.*, 1986; Rabinowich *et al.*, 1991; Igarashi *et al.*, 2004). Se han desarrollado métodos que permiten la activación y la expansión específicas de linfocitos NK humanas a partir de sangre periférica, por ejemplo, métodos basados en el uso de células K562 modificadas genéticamente como alimentador de células mononucleares periféricas de donantes sanos permitiendo la expansión y la activación de la población de linfocitos NK (Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009; Somanchi y Lee, 2016).

En determinadas realizaciones de la invención desvelada, los linfocitos NKAE se producen mediante el cocultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos con (i) células β -linfoblastoides irradiadas modificadas para expresar una forma unida a membrana de una citocina activadora tal como la interleucina-15 (IL-15) o la interleucina-21 (IL-21), e (ii) interleucina-2 (IL-2). En determinadas realizaciones preferidas, las células β -linfoblastoides son células K562-mb15-41BBL (Fujisaki *et al.*, 2009). La estirpe celular K562-mb15-41BBL carece de ligandos de MHC-I para los receptores de los linfocitos NK inhibidores KIR y comprende células K562 modificadas para expresar una forma unida a membrana de la citocina activadora de NK IL-15 y el ligando activador CD137 para el receptor 4-1BB en los linfocitos NK. En los experimentos descritos en el presente documento (véanse los Ejemplos 3 y 4), se obtuvieron linfocitos NKAE cocultivando PBMC de donantes sanos con células K562-mb15-41BBL (Fujisaki *et al.*, 2009) e IL-2 (véase el Ejemplo 3). En otras realizaciones preferidas, las células β -linfoblastoides utilizadas para preparar linfocitos NKAE son células K562 mb.IL21 (Somanchi y Lee, 2016), que comprenden células K562 modificadas para expresar una forma unida a membrana de IL-21.

Ab anti-CXCR4 adecuados para su uso en los métodos desvelados

La presente invención proporciona un enfoque inmunoterápico novedoso para tratar el cáncer, incluyendo el cáncer metastásico, combinando la terapia anti-CXCR4 con la citotoxicidad demostrada de los linfocitos NK contra los tumores *in vitro* y *in vivo*. Este uso de terapia de combinación emplea un Ab anti-CXCR4 para bloquear la señalización de CXCR4/CXCL12, alterando de este modo las interacciones tumor-estroma, sensibilizando las células del sarcoma a la citotoxicidad de los linfocitos NK y reduciendo el crecimiento tumoral y la carga metastásica.

CXCR4 se sobreexpresa en más de 23 cánceres humanos y su sobreexpresión contribuye al crecimiento tumoral, la invasión, la angiogénesis, la metástasis, la recaída y la resistencia terapéutica. Los ejemplos no limitantes de tipos de cáncer asociados a la expresión de CXCR4 o la vía CXCR4/CXCL12 incluyen tumores sólidos tales como el cáncer de mama (Dewan *et al.*, 2006), de ovario (Kajiyama *et al.*, 2008), de próstata (Hirata *et al.*, 2007; Miki *et al.*, 2007), de pulmón (Cavallaro, 2013; Gangadhar *et al.*, 2010), de páncreas (Billadeau *et al.*, 2006), de riñón (Jones *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2006), bucal (Ishikawa *et al.*, 2006; Onoue *et al.*, 2006), esofágico (Wu *et al.*, 2014), gástrico (Han *et al.*, 2014), colorrectal (Lv *et al.*, 2014), de hígado (Schimanski *et al.*, 2006), de cerebro (Bian *et al.*, 2007) y de tiroides (De Falco) *et al.*, 2007), melanoma (Scala *et al.*, 2005), rhabdomyosarcoma (Libura *et al.*, 2002) y osteosarcoma (Laverdiere *et al.*, 2005), así como neoplasias hemáticas tales como la leucemia linfoblástica aguda (Crazzolara *et al.*, 2001), la leucemia mieloide aguda (Kalinkovich *et al.*, 2006), el mieloma múltiple (Alsayed) *et al.*, 2007; Azab *et al.*, 2009) y la leucemia mieloide crónica (Jin *et al.*, 2008).

La interacción entre CXCR4 y CXCL12 es esencial para migrar de forma dirigida y mantener las células madre hematopoyéticas dentro del microambiente de la MO (Mohle *et al.*, 1998). Se ha estudiado ampliamente la importancia pronóstica de CXCR4 en pacientes con sarcomas de huesos y tejidos blandos. En determinadas situaciones se ha establecido una correlación inversa entre la expresión de CXCR4 y el pronóstico o la supervivencia del paciente y, en estudios clínicos, se ha asociado CXCR4 a una mayor propensión a metástasis y una menor supervivencia. En un metaanálisis reciente, que incluye 12 estudios con 997 pacientes con sarcoma, se descubrió que la expresión de CXCR4 se asociaba significativamente a una supervivencia global escasa (RRI 2,37; IC del 95 %: 1,86-3,01; $P < 0,001$). En cuanto a las características clínico-patológicas, la expresión de CXCR4 se asoció significativamente a una mayor tasa de metástasis (RP 6,97; IC del 95 %: 2,28-21,31; $P = 0,001$) y estadio tumoral más alto (RP 7,55; IC del 95 %: 1,25-45,47; $P = 0,027$) (Li *et al.*, 2015)). En la cohorte corta de pacientes pediátricos con rhabdomyosarcoma descrita en el Ejemplo 5, existe una ligera correlación entre una mayor expresión de CXCR4 en el momento del diagnóstico y la recaída y el desenlace fatal. Las células iniciadoras de tumores (TIC) son una subpoblación de células tumorales quimiorresistentes que se ha demostrado que provocan reaparición y metástasis tumorales, y la regulación positiva de CXCR4 es una de las características distintivas de estas células (Duda *et al.*, 2011). Se observó consistentemente que los tumores que aún crecen después de la quimioterapia y los que aparecen después de un enfoque combinado quirúrgico y quimioterápico son los que expresan claramente los niveles más altos de CXCR4 (Figura 7C). Por lo tanto, dirigirse a las TIC y eliminarlas son prioridades para el desarrollo de nuevos paradigmas terapéuticos.

El Ejemplo 1 muestra que, entre seis estirpes celulares de sarcoma diferentes sometidas a ensayo, la estirpe celular de rhabdomyosarcoma alveolar RH30 mostró el nivel más alto de expresión de CXCR4 (Figura 1), simultáneamente con el mayor índice de migración e invasión hacia CXCL12 (Figura 2). La metástasis se produce en el 20-55 % de los pacientes con sarcoma y, como otros cánceres (Chaffer y Weinberg, 2011; Seyfried y Huysentruyt, 2013), sigue siendo la principal causa de muerte. Aunque la eficacia de la combinación de NKAE más anti-CXCR4 se ha demostrado en el presente documento con una estirpe celular de rhabdomyosarcoma, un experto en la materia reconocería fácilmente

que los presentes usos médicos para tratar el cáncer son aplicables a cualquier cáncer que sobreexpresa CXCR4.

Los Ab anti-CXCR4 adecuados para su uso en los métodos desvelados son Ab o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a CXCR4 con alta especificidad y afinidad. En determinadas realizaciones preferidas, el Ab o porción de unión a antígeno del mismo es un mAb o una porción de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, el Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo es un Ab quimérico, preferentemente un Ab humanizado o, más preferentemente, un Ab humano o una porción del mismo. Dichos mAb quiméricos, humanizados o humanos pueden prepararse y aislarse mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2008/060367. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano y el Ab o fragmento del mismo se une a un receptor CXCR4 humano. En realizaciones preferidas adicionales, el Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo bloquea la unión de CXCR4 y CXCL12 e inhibe la actividad de CXCR4, es decir, el Ab o porción de unión a antígeno del mismo altera la interacción entre CXCR4 y CXCL12 e inhibe la señalización de CXCR4/CXCL12. En otras realizaciones determinadas, el Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo induce la apoptosis *y/o* inhibe el crecimiento de células tumorales CXCR4⁺ *in vivo* (como se describe en el documento WO 2013/071068).

Los mAb anti-CXCR4 que se unen específicamente a CXCR4 con alta afinidad, específicamente los mAb F7GL (ulocuplumab; también designado anteriormente BMS-936564 y MDX-1338), F7, F9, F9GL, D1, D1GL, E2 y E2GL, se han ejemplificado y descrito en detalle en el documento WO 2008/060367. También se describen métodos de uso de estos Ab para tratar neoplasias malignas hemáticas, por ejemplo, en los documentos WO 2008/060367, WO 2013/071068 y WO 2015/069874. Otros mAb anti-CXCR4, que son adecuados para su uso en los presentes métodos terapéuticos en combinación con linfocitos NKAE, se han descrito en, por ejemplo, los documentos WO 2008/142303, WO 2010/037831, WO 2009/140124, WO 2013/013025 y la Publicación de los EE.UU. N.º 2015/0037328.

Los Ab anti-CXCR4 adecuados para su uso en los presentes métodos presentan preferentemente una o más de las siguientes características que son deseables para aplicaciones terapéuticas: (a) unión con alta afinidad a CXCR4 humano expresado en una superficie celular; (b) inhibición de la unión de SDF-1 a CXCR4; (c) inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 en células que expresan CXCR4; (d) inhibición de la migración inducida por SDF-1 de células que expresan CXCR4; (e) inhibición de la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical humana; (f) inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4; (g) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *in vitro*; (h) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *y/o* inducción de la apoptosis de células tumorales CXCR4⁺ *in vivo*; (i) inhibición de las metástasis de células tumorales CXCR4⁺; y (j) aumento del tiempo de supervivencia de un sujeto portador de tumor CXCR4⁺.

Se ha demostrado que los mAb anti-CXCR4 desvelados en el documento WO 2008/060367, que son adecuados para su uso en los presentes métodos, presentan una o más de las siguientes características: (a) unión a CXCR4 humano en una superficie de una célula con una CE₅₀ de menos de aproximadamente 100 nM (por ejemplo, aproximadamente 20-80 nM); (b) inhibición de la unión de CXCL12 a CXCR4 con una CE₅₀ igual o inferior a aproximadamente 30 nM (por ejemplo, aproximadamente 1-30 nM); (c) inhibición del flujo de calcio inducido por CXCL12 en células que expresan CXCR4 con una CE₅₀ igual o inferior a aproximadamente 1 nM (por ejemplo, aproximadamente 0,1-1,0 nM); (d) inhibición de la migración inducida por CXCL12 de células que expresan CXCR4 con una CE₅₀ igual o inferior a aproximadamente 20 nM (por ejemplo, aproximadamente 10-20 nM); (e) inhibición de la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical humana; (f) inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4; (g) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *in vitro*; (h) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *y/o* inducción de la apoptosis de células tumorales CXCR4⁺ *in vivo*; (i) inhibición de las metástasis de células tumorales CXCR4⁺; y (j) aumento del tiempo de supervivencia de un sujeto portador de tumor CXCR4⁺.

Los Ab anti-CXCR4 utilizables en los métodos de la presente invención incluyen mAb que se unen específicamente a CXCR4 humano expresado en una superficie celular con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de 1×10^{-8} M o menos según se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), preferentemente con una K_D de 5×10^{-9} M o menos, y presentan al menos cinco, y preferentemente todas, las demás características anteriores.

Por ejemplo, un Ab anti-CXCR4 adecuado para su uso en los métodos de tratamiento descritos (a) se une a CXCR4 humano con una K_D de aproximadamente 5×10^{-9} a 1×10^{-10} M, según se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore); (b) inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4 con una CE₅₀ de menos de aproximadamente 10 nM (por ejemplo, aproximadamente 1-10 nM); (c) induce la apoptosis en células que expresan CXCR4; (d) inhibe la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *in vitro*; (e) inhibe la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *y/o* induce la apoptosis de células tumorales CXCR4⁺ *in vivo*; y (f) inhibe las metástasis de células tumorales CXCR4⁺.

En consecuencia, esta divulgación proporciona una combinación de cantidades terapéuticamente eficaces de: (a) una población aislada de linfocitos NKAE; y (b) un Ab aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que: (i) se une específicamente a CXCR4 expresado en la superficie de una célula cancerosa con alta afinidad, por ejemplo, con una K_D de aproximadamente 5×10^{-9} M o menos, (ii) inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4, por ejemplo, con una CE₅₀ de menos de aproximadamente 10 nM e (iii) inhibe la señalización de CXCR4/CXCL12, por ejemplo, inhibe la migración inducida por CXCL12 de células que expresan CXCR4, por ejemplo, con una CE₅₀ igual o inferior a aproximadamente 20 nM para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece un cáncer. En determinadas realizaciones, el Ab

o una porción de unión a antígeno del mismo también induce la apoptosis en células que expresan CXCR4.

En determinados aspectos, los Ab anti-CXCR4 desvelados en el presente documento para su uso terapéutico comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de F7, F9, D1 o E2, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEQ ID NO: 1-4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEQ ID NO: 5-8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_H de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEQ ID NO: 9-12, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_k de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEQ ID NO: 13-16, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V_k de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEQ ID NO: 17-20, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V_k de F7, F9, D1 y E2 se muestran en SEQ ID NO: 21-24, respectivamente. Las variantes "GL" retromutadas de la estirpe germinal, es decir, F7GL, F9GL, D1GL y E2GL, tienen las mismas CDR que F7, F9, D1 y E2, respectivamente. Las regiones CDR identificadas a lo largo de la presente divulgación se delinearón usando el sistema de Kabat (Kabat *et al.*, 1991).

En otros determinados aspectos, los Ab anti-CXCR4 desvelados en el presente documento para su uso terapéutico comprenden:

- (a) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 25 o 33, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 29 o 37;
- (b) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 26 o 34, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 30 o 38;
- (c) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27 o 35, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 31 o 39; o
- (d) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 28 o 36, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 32 o 40.

En otras realizaciones preferidas, los Ab anti-CXCR4 de la presente divulgación comprenden:

- (a) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 17 o modificaciones conservadoras de la misma; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 21 o modificaciones conservadoras de la misma;
- (b) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 6 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 10; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 14 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 18 o modificaciones conservadoras de la misma; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 22 o modificaciones conservadoras de la misma;
- (c) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15 o modificaciones conservadoras de la misma; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 19 o modificaciones conservadoras de la misma; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 23 o modificaciones conservadoras de la misma; o
- (d) una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que

unidos consecutivamente que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 30 o 38;

(c) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 27 o 35 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 31 o 39; o

5 (c) una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 28 o 36 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 32 o 40.

10 En determinadas realizaciones de los métodos desvelados, el Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada que es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano. En realizaciones adicionales, el Ab o porción de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada (por ejemplo, IgG1 o IgG3 humana) que posee funciones efectoras que incluyen ADCC, ADCP y/o CDC, por ejemplo es de un isotipo IgG3 humano o, preferentemente, IgG1 humano, o comprende una mutación (por ejemplo, E333A o E333S; Idusogie *et al.*, 2001) que aumenta las funciones efectoras y media en el agotamiento de los linfocitos T reguladores (Treg) inmunosupresores y las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). Se sabe que estas células inmunosupresoras sobreexpresan CXCR4 (documento WO 2016/201425), y el agotamiento de Treg y/o MDSC mediado por anti-CXCR4 puede contribuir a la potenciación de un efecto antitumoral.

20 En otras realizaciones determinadas, el Ab anti-CXCR4 comprende una región constante de cadena pesada (por ejemplo, IgG2 o, preferentemente, IgG4 humana) que no posee funciones efectoras. En realizaciones adicionales, la región constante de cadena pesada de IgG4 del Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo contiene una mutación S228P (numerada usando el sistema de Kabat, Kabat *et al.*, 1991), que reemplaza un resto de serina en la región bisagra por el resto de prolina que normalmente se encuentra en la posición correspondiente en los Ab de isotipo IgG1. Esta mutación, que está presente en ulocuplumab, evita el intercambio de brazos Fab con Ab IgG4 endógenos, conservando al mismo tiempo la baja afinidad por receptores de Fc activadores asociada a anticuerpos IgG4 de tipo silvestre.

25 En otras realizaciones, el Ab comprende una región constante de cadena ligera que es una región constante kappa o lambda humana.

30 Un Ab anti-CXCR4 adecuado para su uso en los métodos desvelados en el presente documento es el ulocuplumab. El ulocuplumab se ha evaluado en dos ensayos clínicos de fase 1 en sujetos con diversas neoplasias malignas hemáticas, incluyendo leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiple (MM), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma folicular (LF) y linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL) con un perfil seguro y tolerable. Se han presentado datos de eficacia de las cohortes de LMA y MM y muestran resultados alentadores para la adición de ulocuplumab al tratamiento convencional (Becker *et al.*, 2014; Ghobrial *et al.*, 2014), y ensayos clínicos de fase 1/2 en LMA y macroglobulinemia de Waldenström con CXCR4 mutado (véanse los pacientes en curso, véanse NCT02305563 y NCT03225716 en el sitio web de ensayos clínicos, <http://www.clinicaltrials.gov>). En determinadas realizaciones, se usa una variante de IgG1 humana del ulocuplumab.

40 Otros Ab anti-CXCR4 adecuados incluyen, por ejemplo, los Ab designados c414H5 y c515H7 (documento WO 2010/037831), los Ab designados Anticuerpo I, Anticuerpo II, Anticuerpo III, Anticuerpo IV y Anticuerpo V (patente de los EE.UU. N.º 7.892.546), el Ab designado 6C7 (documento WO 2013/013025) y Ab 3G10 humanizados, por ejemplo, los Ab designados h3G1 0.A57.A58, h3G10.1.91.A58A y h3G10.1.91.A58B (Publicación de los EE.UU. n.º 2015/0037328).

50 Los Ab anti-CXCR4 utilizables en los métodos de la invención desvelada también incluyen porciones de unión a antígeno de los Ab anteriores. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión a antígeno de un Ab puede realizarse mediante fragmentos de un Ab de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en la expresión "porción de unión a antígeno" de un Ab incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; y (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un Ab.

55 Estos fragmentos, obtenidos inicialmente mediante proteólisis con enzimas tales como papaína y pepsina, posteriormente se han modificado por ingeniería genética en fragmentos de unión a antígeno monovalentes y multivalentes. Por ejemplo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , estén codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un péptido enlazador sintético que les permite formarse como una única cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como fragmentos variables monocatenarios (scFv). Los scFv divalentes o bivalentes (di-scFv o bi-scFv) se pueden modificar uniendo dos scFv dentro de una única cadena peptídica conocida como scFv en tándem que contiene dos regiones V_H y dos V_L . También se pueden crear dímeros de ScFv y multímeros superiores usando péptidos enlazadores de menos de 10 aminoácidos que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen entre sí, lo que obliga a los scFv a dimerizarse y producir diacuerpos o formar otros multímeros. Se ha demostrado que los diacuerpos se unen a su antígeno afín con mucha mayor afinidad que los scFv correspondientes, tienen constantes de disociación hasta 40 veces más bajas que los valores de K_D para los scFv.

Los enlazadores muy cortos (≤ 3 aminoácidos) conducen a la formación de tricuerpos trivalentes o tetracuerpos tetravalentes que presentan afinidades incluso mayores por sus antígenos que los diacuerpos. Otras variantes incluyen minicuerpos, que son dímeros scFv- C_{H3} y fragmentos scFv-Fc más grandes (dímeros scFv- C_{H2} - C_{H3}), e incluso una CDR aislada puede presentar una función de unión a antígeno.

5 En consecuencia, en determinadas realizaciones, el fragmento de Ab se selecciona de un Fab, F(ab')₂, fragmento Fd y Fv, un Ab de dominio único (sdAb), un fragmento variable monocatenario (scFv), un scFv divalente (di-scFv) y un scFv bivalente (bi-scFv), un diacuerpo, un minicuerpo y una CDR aislada. En determinadas realizaciones preferidas, el fragmento de Ab se selecciona de un Fab, F(ab')₂, fragmento Fd y Fv y un fragmento variable monocatenario (scFv).
10 Estos fragmentos de Ab se modifican usando técnicas recombinantes convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los Ab intactos. Todos los fragmentos proteolíticos y modificados anteriores de los Ab y variantes relacionadas (véase Hollinger y Hudson, 2005; Olafsen y Wu, 2010, para más detalles) tienen por objeto estar incluidos dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un Ab.

15 *Ab de competencia cruzada*

Los Ab anti-CXCR4 adicionales utilizables en los métodos desvelados incluyen Ab que se unen específicamente a CXCR4 humano y compiten de forma cruzada por la unión a CXCR4 humano con un Ab de referencia, por ejemplo, ulocuplumab (F7GL) o cualquiera de los Ab designados F7, F9, D1 y E2 (véase, por ejemplo, documento WO 2008/060367; documento WO 2013/071068). La capacidad de un par de Ab para "competir de forma cruzada" por la unión a un antígeno indica que un primer Ab se une sustancialmente a la misma región epitópica del antígeno que, y reduce la unión de, un segundo Ab a esa región epitópica particular y, por el contrario, el segundo Ab se une sustancialmente a la misma región epitópica del antígeno que, y reduce la unión de, el primer Ab a esa región epitópica.
20 Por lo tanto, la capacidad de un Ab de ensayo para inhibir de forma competitiva la unión de, por ejemplo, ulocuplumab a CXCR4 humano, demuestra que el Ab de ensayo se une sustancialmente a la misma región epitópica de CXCR4 humano que el ulocuplumab. En consecuencia, los Ab anti-CXCR4 utilizables en los métodos desvelados incluyen Ab que se unen específicamente a sustancialmente la misma región epitópica del antígeno que un Ab de referencia, por ejemplo, ulocuplumab.

30 Se considera que un primer Ab se une a "sustancialmente el mismo epítipo" o "sustancialmente el mismo determinante" que un segundo Ab si el primer Ab reduce la unión del segundo Ab a un antígeno en al menos aproximadamente el 40 %. Preferentemente, el primer Ab reduce la unión del segundo Ab al antígeno en más de aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60 % o al menos aproximadamente el 70 %). En realizaciones más preferidas, el primer Ab reduce la unión del segundo Ab al antígeno en más de aproximadamente el 70 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 100 %). El orden de los Ab primero y segundo puede invertirse, es decir, el "segundo" Ab puede unirse en primer lugar a la superficie y el "primero" se pone después en contacto con la superficie en presencia del "segundo" Ab. Se considera que los Ab "compiten de forma cruzada" si se observa una reducción competitiva en la unión al antígeno,
35 independientemente del orden en que se añadan los Ab al antígeno.

Se espera que los Ab con competencia cruzada tengan propiedades funcionales similares en virtud de su unión a sustancialmente la misma región epitópica de un antígeno tal como un receptor CXCR4. Cuanto mayor sea el grado de competencia cruzada, más similares serán las propiedades funcionales. Por ejemplo, se espera que dos Ab que compiten de forma cruzada tengan esencialmente las mismas propiedades funcionales si cada uno de ellos inhibe la unión del otro a un epítipo en al menos aproximadamente un 80 %. Se espera que esta similitud en la función sea incluso más próxima si el Ab que compite de forma cruzada muestra afinidades similares por la unión al epítipo, medidas mediante la constante de disociación (K_D).
45

50 Los Ab anti-antígeno que compiten de forma cruzada se pueden identificar fácilmente basándose en su capacidad para competir de manera detectable en ensayos de unión a antígeno convencionales, incluyendo el análisis por resonancia de plasmón superficial (BIAcore®), ensayos ELISA o citometría de flujo, usando moléculas de antígeno recombinantes o moléculas de antígeno expresadas en la superficie celular. A modo de ejemplo, un ensayo de competencia simple para identificar si un Ab de ensayo compite con ulocuplumab por la unión a CXCR4 humano puede implicar: (1) medir la unión de ulocuplumab, aplicado a concentración de saturación, a un chip BIAcore (u otro medio adecuado para el análisis por resonancia de plasmón superficial) sobre el que se inmoviliza CXCR4 humano, y (2) medir la unión de ulocuplumab a un chip BIAcore recubierto con CXCR4 humano (u otro medio adecuado) al que se le ha unido anteriormente el Ab de ensayo. Se compara la unión de ulocuplumab a la superficie recubierta con CXCR4 en presencia y ausencia del Ab de ensayo. Una reducción significativa (por ejemplo, más de aproximadamente el 40 %) en la unión de ulocuplumab en presencia del Ab de ensayo indica que ambos Ab reconocen sustancialmente el mismo epítipo de manera que compiten por la unión a la diana CXCR4. El porcentaje al que la unión de un primer Ab a un antígeno es inhibida por un segundo Ab puede calcularse como: $[1 - (\text{unión detectada del primer Ab en presencia del segundo Ab}) / (\text{unión detectada del primer Ab en ausencia del segundo Ab})] \times 100$. Para determinar si los Ab compiten de forma cruzada, se repite el ensayo de unión competitiva excepto por que se mide la unión del Ab de ensayo al chip recubierto con CXCR4 en presencia de ulocuplumab.
55
60
65

En un aspecto, los Ab anti-CXCR4 para su uso en los métodos de la presente divulgación compiten de forma cruzada por la unión a CXCR4 con cualquiera de mAb F7GL (ulocuplumab; que tiene secuencias de V_H y V_L secuencias como se muestran en SEQ ID NO: 33 y 37, respectivamente), F7, que tiene secuencias de V_H y V_L secuencias como se muestran en SEQ ID NO: 25 y 29, respectivamente), mAb 79GL (que tiene secuencias de V_H y V_L secuencias como se muestran en SEQ ID NO: 34 y 38, respectivamente), mAb F9 (que tiene secuencias de V_H y V_L secuencias como se muestran en SEQ ID NO: 26 y 30, respectivamente), mAb D1GL (que tiene secuencias de V_H y V_L secuencias como se muestran en SEQ ID NO: 35 y 39, respectivamente), mAb D1 (que tiene secuencias de V_H y V_L secuencias como se muestran en SEQ ID NO: 27 y 31, respectivamente), mAb E2GL (que tiene secuencias de V_H y V_L como se muestran en SEQ ID NO: 36 y 40, respectivamente) y mAb E2 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestran en SEQ ID NO: 28 y 32, respectivamente). Los Ab que compiten de forma cruzada por la unión a CXCR4 se unen a la misma región epitópica (es decir, el mismo epítopo o uno superpuesto) en CXCR4.

En determinadas realizaciones, el mAb anti-CXCR4 de competencia cruzada comprende una región V_H que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen una secuencia derivada de una secuencia de estirpe germinal 3-48 de V_H humana como se expone en SEQ ID NO: 41 y/o una región V_L que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen una secuencia derivada de una secuencia de estirpe germinal L15 de V_K humana como se expone en SEQ ID NO: 42.

Espectro amplio de cánceres susceptibles de tratamiento mediante los usos desvelados

La inmunooncología, que se basa en el uso de la flexibilidad del sistema inmunitario para atacar y destruir las células cancerosas, es aplicable al tratamiento de una gama muy amplia de cánceres (véase, por ejemplo, Guillerey *et al.*, 2016; Lowry y Zehring, 2017; Callahan *et al.*, 2016; Kamta *et al.*, 2017; Farkona *et al.*, 2016). En consecuencia, los usos médicos desvelados que emplean la administración de linfocitos NK, preferentemente, linfocitos NKA, combinada con el bloqueo de la vía de señalización de CXCR4/CXCL12 es aplicable al tratamiento de una amplia diversidad de tumores sólidos y líquidos.

En determinadas realizaciones, los usos de terapia de combinación desvelados pueden usarse para tratar un cáncer que es un tumor sólido. En determinadas realizaciones preferidas, el tumor sólido es un tumor pediátrico. En realizaciones adicionales, el tumor pediátrico es un rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma o sarcoma de Ewing. A pesar del tratamiento agresivo, casi la mitad de los niños con dichos tumores tienen una enfermedad progresiva. El pronóstico es particularmente malo para aquellos pacientes con enfermedad metastásica, al menos dos tercios de los cuales tienen progresión de la enfermedad. Los resultados después de la reaparición generalmente son desalentadores. Para pacientes con sarcoma de Ewing recurrente, por ejemplo, la probabilidad de supervivencia a largo plazo es actualmente inferior al 20 % e inferior al 10 % si la recaída se produce en 2 años (Leavey *et al.*, 2008). Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos enfoques terapéuticos que eviten los mecanismos celulares de resistencia a los fármacos, en particular para pacientes con características de alto riesgo, tales como enfermedad metastásica o recurrente.

En otras realizaciones, el tumor sólido es un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), CPNM escamoso, CPNM no escamoso, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer pancreático, adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, cáncer de útero (de endometrio), carcinoma del endometrio, sarcoma uterino, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de la uretra, cáncer del uréter, cáncer de próstata, cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (CPRCm), cáncer de testículos, cáncer de pene, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo (CMTN), cáncer de mama masculino, tumor de células germinales, sarcoma, cáncer de piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de Merkel, cáncer de hueso, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), cáncer de tiroides, cáncer bucal, cáncer de boca, cáncer de glándulas salivales, cáncer de garganta, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer de vesícula biliar y conducto biliar, cáncer colorrectal, carcinoma de colon, cáncer de recto, cáncer de ano, cáncer de hígado, hepatoma, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer del sistema endocrino, tumores de la glándula del timo, timoma, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, mesotelioma, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, cáncer de cerebro, glioma, glioma del tronco encefálico, glioblastoma, glioblastoma multiforme (GBM), neuroblastoma, adenoma hipofisario, cáncer epidermoide, tumores sólidos de la infancia, sarcoma pediátrico, cáncer metastásico, cáncer de origen primario desconocido, cánceres inducidos por el entorno, cánceres relacionados con virus, cánceres relacionados con el SIDA, sarcoma de Kaposi, cánceres de origen vírico, tumores sólidos avanzados, refractarios y/o recurrentes, y cualquier combinación de los tumores sólidos anteriores. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer refractario y/o cáncer recurrente avanzado, inoperable y metastásico.

En otras realizaciones determinadas, los presentes usos de terapia de combinación pueden usarse para tratar un cáncer que es una neoplasia maligna hemática. Las neoplasias malignas hemáticas incluyen tumores líquidos derivados de cualquiera de los dos linajes principales de células sanguíneas, es decir, la estirpe celular mieloide (que produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos) o la estirpe celular linfocítica (que produce

linfocitos B, T, NK y células plasmáticas), que incluyen todos los tipos de leucemias, linfomas y mielomas. Las neoplasias malignas hemáticas que pueden tratarse usando los presentes usos de terapia de combinación incluyen, por ejemplo, cánceres seleccionados de leucemia linfoblástica aguda (LLA), LMA, LLC, leucemia mielógena crónica (LMC), linfoma de Hodgkin (LH), linfomas no Hodgkin (LNH), MM, mieloma latente, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI), neoplasias malignas hemáticas avanzadas, metastásicas, refractarias y/o recurrentes, y cualesquier combinaciones de dichas neoplasias malignas hemáticas.

En otras realizaciones, la neoplasia maligna hemática es un cáncer seleccionado de leucemias agudas, crónicas, linfocíticas (linfoblásticas) y/o mielógenas, tales como LLA, LMA, LLC y LMC; linfomas, tales como LH, LNH, de los cuales aproximadamente el 85 % son linfomas de linfocitos B, incluyendo LDLBG, LF, LLC/linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), linfoma de células del manto, linfomas de linfocitos B de la zona marginal (linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), linfoma de linfocitos B de la zona marginal extranodal y linfoma de linfocitos B de la zona marginal esplénica), linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocitoide (LLP; también conocido como macroglobulinemia de Waldenström (MW), linfoma de células pilosas y linfoma primario del sistema nervioso central (SNC), LNH que son linfomas de linfocitos T, incluyendo linfoma/leucemia linfoblástica de linfocitos T precursores, linfoma/leucemia linfoblástica T (LL-T/LLA-T), linfomas periféricos de linfocitos T, tales como el linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT, es decir, micosis fungoide, síndrome de Sézary y otros), linfoma/leucemia de linfocitos T en adultos, linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T, linfoma extranodal de linfocitos citolíticos/T de tipo nasal, linfoma de linfocitos T intestinal asociado a enteropatía (LTAE), linfoma anaplásico de células grandes (LACG) y linfoma periférico de linfocitos T inespecífico, linfoma mielóide agudo, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma monocitoide de linfocitos B, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de linfocitos T, linfoma mediastínico primario de linfocitos B, trastorno linfoproliferativo después del trasplante, linfoma histiocítico verdadero, linfoma de efusión primaria, linfoma histiocítico difuso (LHD), linfoma inmunoblástico de células grandes o linfoma linfoblástico de precursores de linfocitos B; mielomas, tales como mieloma múltiple, mieloma latente (también denominado mieloma indolente), gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI), plasmocitoma solitario, mieloma de IgG, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor y amiloidosis; y cualesquier combinaciones de dichas neoplasias malignas hemáticas. Los presentes usos médicos también son aplicables al tratamiento de neoplasias malignas hemáticas avanzadas, metastásicas, refractarias y/o recurrentes.

30 *Composiciones farmacéuticas y pautas posológicas*

Los Ab y linfocitos NK utilizados en los métodos desvelados en el presente documento pueden constituirse en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene un Ab o una población de linfocitos NKAE y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, un "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador para una composición que contiene un Ab es adecuado para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

40 Una opción para la inyección subcutánea se basa en la tecnología de administración de fármacos ENHANZE® de Halozyne Therapeutics, que implica una coformulación de un Ab con la enzima hialuronidasa humana recombinante (rHuPH20) que elimina las limitaciones tradicionales sobre el volumen de productos biológicos y fármacos que pueden suministrarse por vía subcutánea debido a la matriz extracelular (Patente de los EE.UU. N.º 7.767.429).

45 Preferentemente, el portador para una composición que contiene linfocitos NK es adecuado para la inyección intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intrafemoral, intratecal o intratumoral, o la inyección en una cavidad de resección tumoral.

50 Una composición farmacéutica de la invención puede incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables, antioxidantes, vehículos acuosos y no acuosos, y/o adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes.

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica máxima y/o efectos adversos mínimos. La dosificación para la administración de un Ab anti-CXCR4 puede variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 15 mg/kg, del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,1, 0,3, 1, 2, 3, 5, 10, 15 o 20 mg/kg de peso corporal, y más preferentemente, aproximadamente 1, 3, 5, 10 o 15 mg/kg de peso corporal. Como alternativa, puede administrarse una dosis fija o plana, por ejemplo, de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg de Ab, en lugar de una dosis basada en el peso corporal. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de aproximadamente 200, aproximadamente 400, aproximadamente 800, aproximadamente 1600 o aproximadamente 2000 mg y, preferentemente, aproximadamente 400, aproximadamente 800, aproximadamente 1600. Los linfocitos NKAE se pueden administrar al paciente en una dosis basada en números absolutos de células que varían de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{14} células. Por ejemplo, las células pueden administrarse al sujeto en dosis de aproximadamente 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 5×10^{12} , 1×10^{13} , 5×10^{13} , o 1×10^{14} células. En realizaciones preferidas, los linfocitos NKAE se administran al sujeto en dosis de aproximadamente 1×10^7 a 5×10^{10} células,

preferentemente 1×10^8 a 5×10^9 células, más preferentemente aproximadamente 5×10^8 células. En otras realizaciones, los linfocitos NKAE se administran al sujeto en dosis de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^8 células/kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 1×10^6 a 5×10^7 células/kg, más preferentemente aproximadamente $7,5 \times 10^6$ células/kg. Los linfocitos NKAE se pueden administrar varias veces al paciente. Por ejemplo, el paciente puede recibir de una a cuatro infusiones, normalmente dos o tres infusiones. Estas infusiones generalmente se separan al menos una semana.

La pauta posológica para un Ab normalmente se diseña para conseguir exposiciones que den como resultado la ocupación sostenida del receptor (RO, por sus siglas en inglés) basándose en las propiedades farmacocinéticas típicas del Ab. Una pauta de tratamiento de ejemplo implica la administración del Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo dos veces aproximadamente cada semana, una vez aproximadamente cada semana, una vez aproximadamente cada 2 semanas, una vez aproximadamente cada 3 semanas, una vez aproximadamente cada 4 semanas o una vez aproximadamente cada mes. En determinadas realizaciones preferidas, el Ab anti-CXCR se administra al sujeto aproximadamente semanalmente. En otras realizaciones, el Ab se administra una vez aproximadamente cada 2 semanas o una vez aproximadamente cada 3 semanas. En determinadas realizaciones preferidas, los linfocitos NK se administran aproximadamente semanalmente al paciente. En otras realizaciones, los linfocitos NK se administran al paciente dos veces aproximadamente cada semana o una vez aproximadamente cada 2 semanas. La dosificación y la pauta pueden cambiar durante el curso del tratamiento.

En determinadas realizaciones de los métodos desvelados en el presente documento, el Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo se administra al paciente mediante administración intravenosa o subcutánea. En realizaciones adicionales, los linfocitos NK y el Ab o porción de unión a antígeno del mismo se administran secuencialmente al sujeto. Administración "secuencial" significa que uno de entre los linfocitos NK y el Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo se administra antes que el otro. Puede administrarse en primer lugar cualquiera de los dos agentes terapéuticos; es decir, en determinadas realizaciones, los linfocitos NK se administran antes que el Ab o porción de unión a antígeno del mismo, mientras que, en otras realizaciones, el Ab anti-CXCR4 o porción de unión a antígeno del mismo se administra antes que los linfocitos NK. Normalmente, el Ab se administra mediante infusión intravenosa durante un período de aproximadamente 60 minutos.

En determinadas realizaciones, los linfocitos NK y el Ab o porción de unión a antígeno del mismo se administran simultáneamente en composiciones separadas, mientras que, en otras realizaciones, los linfocitos NK y el Ab o porción de unión a antígeno del mismo se mezclan en una única composición y se administran simultáneamente.

En determinadas realizaciones de cualquiera de los usos terapéuticos desvelados en el presente documento, la administración de la combinación de los linfocitos NK y el Ab o porción de unión a antígeno del mismo continúa mientras se observe un beneficio clínico o hasta que se produzca una toxicidad intratable o una progresión de la enfermedad.

Usos médicos de la combinación de linfocitos NK y Ab anti-CXCR4

La presente divulgación también proporciona una población de linfocitos NK, preferentemente linfocitos NKAE, y un Ab anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo para su uso en combinación en el tratamiento de un sujeto que padece cáncer. Estos agentes terapéuticos se pueden usar en terapia de combinación de toda la gama de cánceres desvelados en el presente documento. En determinadas realizaciones preferidas, el cáncer es un tumor pediátrico, por ejemplo, un rhabdomioma, osteosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma o sarcoma de Ewing.

Un aspecto de la invención desvelada es el uso combinado de una población de linfocitos NK, preferentemente linfocitos NKAE, y un Ab anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo para la preparación de un medicamento para tratar a un sujeto que padece un cáncer. Los usos de cualquiera de dichos linfocitos NKAE y Ab anti-CXCR4 en combinación para la preparación de medicamentos son ampliamente aplicables a toda la gama de cánceres desvelados en el presente documento. En determinadas realizaciones preferidas de estos usos, el cáncer es un tumor pediátrico, por ejemplo, un rhabdomioma, osteosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma o sarcoma de Ewing.

La presente divulgación también proporciona usos médicos de una población de linfocitos NKAE en combinación con un Ab anti-CXCR4 correspondiente a todas las realizaciones de los métodos de tratamiento que emplean esta combinación de agentes terapéuticos descritos en el presente documento.

Kits

También dentro del alcance de la presente invención hay kits que comprenden una población de linfocitos NK, preferentemente linfocitos NKAE, y un Ab anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo para su uso terapéutico. Los kits normalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit y las instrucciones de uso. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit. En consecuencia, la presente divulgación proporciona un kit para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo el kit: (a) una o más dosificaciones que varían de

aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg de un Ab o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CXCR4 expresado en la superficie de una célula cancerosa; (b) una o más dosificaciones que varían de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{14} de una población de linfocitos NK, preferentemente, linfocitos NKAE; y (c) instrucciones para usar el Ab o porción del mismo y los linfocitos NK en cualquiera de los usos de terapia de combinación desvelados en el presente documento. En determinadas realizaciones, los Ab pueden cocondicionarse en forma farmacéutica unitaria. En determinadas realizaciones preferidas para su uso en el tratamiento de pacientes humanos, el kit comprende uno cualquiera de los Ab anti-CXCR4 humano desvelados en el presente documento, por ejemplo, ulocuplumab o un Ab que compite con ulocuplumab por la unión a CXCR4 humano.

10 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1

EXPRESIÓN DE CXCR4 POR DIFERENTES ESTIRPES CELULARES DE SARCOMA

15 La expresión en superficie de CXCR4 se analizó mediante citometría de flujo en cultivos celulares confluentes de diferentes estirpes celulares de sarcoma: dos estirpes celulares de rhabdomyosarcoma (RH30 y CW9019), dos estirpes celulares de sarcoma de Ewing (A4573 y A673) y dos estirpes celulares de osteosarcoma (MG-63 y 143B). Las estirpes celulares 143B (CRL-8303), MG-63 (CRL-1427) y A673 (CRL1598) procedían de la American Type Culture Collection. RH30 (ACC-489) procedía del Leibniz-Institut DSMZ. A4573 y CW9019 fueron obsequios del Dr. Javier Alonso (Instituto de Salud Carlos III) y el Dr. Josep Roma (Instituto de Investigación Vall d'Hebron), respectivamente. Para la tinción, se centrifugaron 2×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en V y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Lonza) que contenía albúmina sérica bovina al 0,5 % (BSA, Lonza), FBS al 1 % y azida sódica al 0,1 % (PBSst). La unión no específica se bloqueó preincubando las células con IgG de rata 40 μ g/ml (Sigma; 20 100 μ l de volumen final, 20 min, 4 °C). Las células se incubaron con mAb anti-CXCR4-APC (BD Pharmingen; clon 12G5) o mAb emparejado por isotipo (30 min, 4 °C). Las muestras se analizaron en un citómetro Navios (Beckman Coulter).

30 Para la qRT-PCR, se obtuvo ARN de cultivo celular usando RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se cuantificó midiendo la absorbancia de los extractos a 260 nm. El nivel de expresión relativo del ARNm que codifica CXCR4 humano se determinó mediante qRT-PCR usando la expresión del gen GUS como control interno. Se sintetizó ADNc a partir de 1 μ g de ARN total con el sistema de síntesis de primera cadena Superscript IV (Invitrogen) y el protocolo del proveedor. El ADNc se amplificó por duplicado con cebadores para CXCR4 humano (Hs00237052_m1, Applied Biosystems) y para GUS humano (Dir: 5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3', Inv: 5'-CCGAGTGAAGATCCCTTTTAA-3'; Sonda: 5'-[6FAM]CCAGCACTCTCGTCCGGTACTGTTCA[TAMRA]-3'; todo de Sigma). La amplificación (50 ciclos; 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min) se controló usando Fast Start TaqMan Probe Master (Roche) marcado con colorante 6-FAM e inactivador no fluorescente en el Roche LightCycler 480. La expresión relativa se analizó usando el método $2^{-\Delta\text{CT}}$, donde $\Delta\text{CT} = (\text{Ct gen de interés} - \text{Ct control interno})$.

40 Como se muestra en la Figura 1A, la mayor proporción de células CXCR4⁺ se encontró en cultivos de células de rhabdomyosarcoma alveolar RH30, donde se detectó expresión de CXCR4 en el $98,6 \pm 0,7$ % de las células.

45 Estos resultados estuvieron de acuerdo con la expresión de ARNm de CXCR4 determinada mediante análisis por qRT-PCR. Los cultivos de RH30 mostraron $1,38 \pm 0,014$ con respecto a la expresión del gen de control GUS (Figura 1B).

EJEMPLO 2

50 MIGRACIÓN E INVASIÓN DE DIFERENTES ESTIRPES CELULARES DE SARCOMA HACIA UN GRADIENTE DE CXCL12

La capacidad de migración de las diferentes estirpes celulares de sarcoma (RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63 y 143B) hacia CXCL12 (100 ng/ml) o suero fetal bovino (FBS, 10 %) se sometió a ensayo en ensayos Transwell (48 h), que se consideran un indicador *in vitro* de potencial metastásico *in vivo*. Las células se incubaron en tampón de inaniación (DMEM-FBS al 1 %) durante 24 h. A continuación, se suspendieron 2×10^5 células en 80 μ l de tampón de migración [DMEM-albúmina sérica humana al 1 % (HSA); Grifols] y se colocan en el compartimento superior de placas Transwell de 96 pocillos (tamaño de poro de 8,0 μ m, Neuroprobe). El compartimento inferior se llenó con 300 μ l de tampón de migración solo (medio sin acondicionar), tampón de migración con CXCL12 100 ng/ml (R&D Systems) o tampón de migración con FBS al 10 %. La capacidad de invasión se midió en las mismas condiciones, con la parte superior de las membranas Transwell recubiertas con 20 μ l de Matrigel (Corning) a 0,2 mg/ml.

65 Después de 48 h de incubación para permitir que las células migrasen/invadiesen a través de la membrana, las células restantes en la cara superior de la membrana se retiraron usando una torunda de algodón, mientras que las células en el lado inferior de la membrana se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. Después de un lavado con PBS, se determinó el número de células migratorias/invasoras usando un microscopio Carl Zeiss Axiovert 200. Se contaron cuatro campos por pocillo a 200x. El índice de migración e invasión se calculó de acuerdo con la siguiente

fórmula: Índice = $100 \times [(n.^{\circ} \text{ de células contadas hacia el medio acondicionado} - n.^{\circ} \text{ de células contadas hacia el medio sin acondicionar}) / (100 - n.^{\circ} \text{ de células contadas hacia el medio sin acondicionar})]$.

Los resultados se muestran en la Figura 2. Las diferentes estirpes celulares de sarcoma mostraron una capacidad de migración e invasión de nivel moderado hacia FBS altamente quimioatrayente (Figura 2A), pero una capacidad de migración e invasión insignificante en las condiciones del ensayo (Figura 2B). Simultáneamente a su nivel relativamente alto de expresión de CXCR4, sólo las células RH30 pudieron migrar e invadir, específicamente, hacia el ligando de CXCR4, CXCL12 (Figura 2B). El índice de migración e invasión de RH30 hacia CXCL12 fue de $35,23 \pm 8,3$ y $104,04 \pm 16,4$, respectivamente.

Se realizaron análisis estadísticos con el software GraphPad 7 Prism. La significación estadística se estableció en $p < 0,05$ según se evaluó mediante el ensayo t de Student para muestras independientes, a menos que se indique otra cosa. Los resultados se muestran como media \pm ETM, a menos que se indique otra cosa.

EJEMPLO 3

LOS LINFOCITOS NKAЕ SON CITOTÓXICOS CONTRA LAS CÉLULAS RH30, Y EL ANTICUERPO ANTI-CXCR4 EN COMBINACIÓN CON LINFOCITOS NKAЕ ANULAN SINÉRGICAMENTE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN E INVASIÓN DE LAS CÉLULAS RH30 *IN VITRO*

Debido a que el ulocuplumab es un mAb IgG4 anti-CXCR4 totalmente humano, no se espera que induzca ADCC (Davies y Sutton, 2015). La actividad citolítica de los linfocitos NKAЕ se midió como el porcentaje de destrucción de células RH30 prerrecubiertas con ulocuplumab, con un mAb de control de isotipo, o sin mAb. Se activaron linfocitos NK de un donante sano y se expandieron con células K562-mb15-41BBL irradiadas (Fujisaki *et al.*, 2009) e IL-2. Brevemente, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos mediante centrifugación sobre un gradiente de densidad (Ficoll-Paque, GE Healthcare) (400 g, 30 min). La estirpe celular K562mb15-41BBL modificada genéticamente, amablemente proporcionado por el Profesor D. Campana (Universidad Nacional de Singapur), se irradió con 100 Gy. Se obtuvieron linfocitos NKAЕ cocultivando PBMC del donante con células K562-mb15-41BBL irradiadas en una relación de 1:1,5 más 100 U/ml de IL-2 durante 14-21 días en medio de crecimiento de células madre (SCGM, Cellgenix) suplementado con suero AB humano al 10 % (Sigma) y 100 UI/ml de IL-2 (Miltenyi). Se añadió medio fresco cada 2-3 días hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml. El porcentaje y el fenotipo de linfocitos NK (CD3⁺, CD56⁺), linfocitos T (CD3⁺, CD56⁻) y linfocitos NKT (CD3⁺, CD56⁺) se controlaron semanalmente mediante citometría de flujo (Navios, Beckman Coulter). Los Ab marcados utilizados en este estudio se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2. Ab marcados utilizados en el estudio.

Especificidad	Clon	Isotipo	Fluorocromo	Fabricante
CD3	UCHT1	mIgG1	PE/Cy7	BioLegend
CD45	J33	mIgG1	FITC	Beckman Coulter
CD56	B159	mIgG1	APC	BD Biosciences
CXCR4	12G5	mIgG2a	APC	BD Biosciences
Control de isotipo	20102	mIgG2a	APC	R&D Systems

Con el fin de estudiar los efectos de diversos tratamientos sobre las células de rhabdomyosarcoma, se generaron células RH30 bioluminiscentes (RH30-GFP-Luc) mediante infección con un lentivirus recombinante que codificaba proteína fluorescente verde (GFP) y luciferasa de luciérnaga (Luc) bajo el promotor EF1a y con un marcador de resistencia a la neomicina (Amsbio). Las células infectadas que expresaban niveles elevados de GFP se aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia, se clonaron, se expandieron y se usaron para ensayos de bioluminiscencia *in vivo*. Las células RH-30-GFP-Luc conservaron la expresión de CXCR4 en la superficie y presentaron una cinética de crecimiento similar a la de las células RH30 precursoras. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS, Gibco), L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml y estreptomina 50 µg/ml (medio completo).

Las células RH30-GFP-Luc se preincubaron (30 min) con las concentraciones de mAb indicadas. Se cocultivaron (4 h) NKAЕ y células diana en una relación de 20:1 o 5:1 en DMEM-FBS al 10 %, después se tiñeron con 7-AAD (10 min, 4 °C) y se analizaron mediante citometría de flujo. La activación de células positivas para 7-AAD dentro de la población de GFP⁺ indicó la proporción de células diana muertas. La muerte específica se calculó como $100 \times [(\% \text{ de células diana muertas en la muestra} - \% \text{ de células diana muertas espontáneas}) / (100 - \% \text{ de células diana muertas espontáneas})]$. Se usaron células diana incubadas sin células efectoras para evaluar la muerte celular espontánea.

Como se observa en la Figura 3A, los linfocitos NKAЕ indujeron una muerte celular específica de $23,0 \pm 1,8$ RH30 en una relación E:T de 20:1, mientras que ulocuplumab y los mAb de control tuvieron poco o ningún efecto sobre la citotoxicidad observada.

Los efectos del ulocuplumab (MDX1338) y los linfocitos NKAЕ, de forma individual y en combinación, también se sometieron a ensayo sobre la migración de células de rhabdomyosarcoma alveolar RH30 hacia un gradiente de CXCL12

recombinante humano y la capacidad de invasión de estas células *in vitro* se sometió a ensayo usando placas Transwell y Matrigel. Para estos experimentos, se mezclaron 10^5 células RH30 con la concentración final indicada de ulocuplumab, mAb IgG4 de control y/o 500.000 linfocitos NKAE (relación efector:diana, E:T = 5:1) en un volumen final de 90 μ l de tampón de migración y el ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente.

5 Tanto el ulocuplumab como los NKAE redujeron eficientemente la migración (Figura 3B) y la invasión (Figura 3C) de células RH30 *in vitro*, pero la combinación de las dos terapias interactuó sinérgicamente para anular totalmente tanto la migración como la invasión (Figuras 3B y 3C). Esta combinación de anticuerpo anti-CXCR4 y terapia con linfocitos NKAE se considera sinérgica ya que el efecto antitumoral observado es mayor que el efecto observado con anticuerpo anti-CXCR4 o terapia con linfocitos NKAE administrados como monoterapia, y mayor que la suma del nivel de inhibición que presenta cada tratamiento individualmente.

EJEMPLO 4

15 EL ANTICUERPO ANTI-CXCR4 POTENCIA LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL *EN VIVO* DE LOS LINFOCITOS NKAE EN EL MODELO DE TUMOR EN RATÓN CON SARCOMA METASTÁSICO

Para evaluar la actividad antitumoral de la terapia con linfocitos NKAE, sola o en combinación con un Ab anti-CXCR4, se generó un modelo *in vivo* de sarcoma metastásico usando células de rhabdomiosarcoma alveolar RH30 CXCR4⁺, que crecen como xenoinjertos peritoneales cuando se implantan en ratones NSG[™] inmunodeficientes. Los ratones NSG[™] (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Vwj}/SzJ, Charles River Laboratories) se mantuvieron en las instalaciones para animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Área de protección animal de la Comunidad de Madrid (PROEX 220/16) y el Comité de ética del CSIC.

25 Se prepararon linfocitos NKAE a partir de PBMC usando células K562-mb 15-41 BBL como se describe en el Ejemplo 3.

Se usaron partículas lentivíricas que expresaban GFP y luciferasa para transducir las células de rhabdomiosarcoma alveolar RH30. Se les inocularon a ratones hembra de seis semanas de edad por vía intravenosa (i.v.) $0,5 \times 10^6$ células RH30-GFP⁺Luc⁺ el Día 0 para generar un modelo *in vivo* de sarcoma metastásico. Se establecieron cinco grupos de tratamiento (5 ratones/grupo): sin tratar; mAb IgG4 de control de isotipo; ulocuplumab anti CXCR4; linfocitos NKAE; combinación de ulocuplumab y NKAE. Se administraron tres dosis de linfocitos NKAE (5×10^6 células cada una, semanalmente) a los ratones los Días 0 (día del implante del tumor), 7 y 14; y se administraron 6 dosis de ulocuplumab (15 mg/kg dos veces por semana) los Días 0, 3, 7, 10, 14 y 18. El tamaño de los tumores en desarrollo determinado mediante señal luminiscente, se midió hasta el Día 35, cuando se sacrificaron los ratones.

Brevemente, se administró D-luciferina (150 mg/kg; Perkin Elmer) por vía intraperitoneal (i.p.) 10 min antes del análisis. Durante la formación de imágenes, los ratones se anestesiaron con isoflurano en una cámara a prueba de luz usando un IVIS-Lumina II (Caliper Lifesciences). El tiempo de exposición fue de 100 s. Se usó Living Image v4.5.2 (Perkin Elmer) para cuantificar los datos y producir imágenes en pseudocolor.

Posteriormente, se detectaron micrometástasis en pulmones, hígado, médula ósea y bazo y se cuantificaron mediante qRT-PCR usando sondas TaqMAN de GUS específico de CXCR4 y humano. Se usó un tercio de los órganos disecados de los ratones para la extracción de ARN total usando el kit RNAeasy Mini kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ARN se cuantificó midiendo la absorbancia de los extractos a 260 nm. Los niveles de expresión relativos del ARNm que codifica CXCR4 humano y GUS humano se determinaron mediante RT-PCR semicuantitativa. La síntesis de ADNc y la amplificación de CXCR4 humano y GUS humano se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. Los valores indicados son con respecto a la expresión de hCXCR4 y hGUS mediante un sedimento de 10^6 células RH30.

También se detectó micrometástasis mediante inmunohistoquímica usando tinción con hematoxilina-eosina y Ab específico de hCXCR4, y mediante hibridación *in situ* por fluorescencia usando Alu-DNA como sonda. Los órganos disecados de los ratones se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4 % (pH 7,4), se lavaron en PBS y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones consecutivas (3 μ m) y se tiñeron con hematoxilina/eosina usando procedimientos convencionales. La presencia de células RH30 en los pulmones se estudió mediante tinción inmune usando un Ab anti-CXCR4 humano (R&D Systems, Clon 44716, dilución 1:50), un sistema de visualización EnVision FLEX+ (ratón, pH alto; Agilent) y contratinción con hematoxilina/eosina. Para la hibridación *in situ*, la recuperación de antígeno se realizó en primer lugar con tampón de pH bajo (RiboCC, Roche) y proteasa III (Roche). Después, los portaobjetos se incubaron con la sonda Alu de control positivo II (Ventana, Roche 05272041001). Se realizaron tres lavados rigurosos y los portaobjetos se incubaron con un intermedio, anti-DNP de conejo. Para la visualización se usó un OmniRabbit (Ventana, Roche) conjugado con peroxidasa de rábano picante. La reacción inmunohistoquímica se desarrolló usando plata como cromógeno (Silver kit, Ventana, Roche) y los núcleos se contratiñeron con hematoxilina de Carazzi. Todas las imágenes se capturaron en un microscopio Carl Zeiss Lab.A1 con una cámara digital AxioCam ERC5S (Carl Zeiss).

El efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de los tumores luminiscentes se muestra en la Figura 4A y

cuantitativamente en la Figura 4B. Como muestra la Figura 4B, el ulocuplumab (MDX1338) solo inhibió moderadamente el crecimiento del implante tumoral de RH30 en comparación con los controles ($992,8 \times 10^3 \pm 416,0 \times 10^3$ en ratones sin tratar frente a $394,7 \times 10^3 \pm 192,1 \times 10^3$ en ratones tratados con MDX1338; $p = 0,035$) mientras que el tratamiento con NKAE fue suficiente para evitarlo totalmente ($p = 0,0003$).

Aunque los tumores primarios peritoneales RH30 se pudieron controlar fácilmente usando el sistema de detección luminiscente, su sensibilidad es insuficiente para determinar la presencia de micrometástasis GFP⁺ Luc⁺ de RH30 en órganos distantes. Por lo tanto, la presencia de células humanas se evaluó mediante qRT-PCR mediante amplificación de ARNm de GUS humano o CXCR4 humano en los pulmones, hígado, bazo y médula ósea de ratones. La expresión de genes humanos se detectó sólo en los pulmones de los ratones, lo que indica la presencia de RH30 en ese órgano (Figura 5). La terapia con NKAE tuvo un efecto mínimo sobre la metástasis pulmonar, mientras que el ulocuplumab administrado como monoterapia tuvo un efecto más pronunciado en la reducción de la incidencia de micrometástasis pulmonar medida mediante la expresión relativa de hCXCR4 (Figura 5A) y hGUS (Figura 5B). Para los niveles de expresión relativos de CXCR4 humano, los ratones sin tratar mostraron $11,4 \times 10^{-3} \pm 4,7 \times 10^{-3}$ frente a $2,0 \times 10^{-3} \pm 0,6 \times 10^{-3}$ de ratones tratados con ulocuplumab (MDX1338). La expresión relativa de GUS humano fue de $14,5 \times 10^{-3} \pm 5,4 \times 10^{-3}$ en ratones sin tratar frente a $2,5 \times 10^{-3} \pm 1,1 \times 10^{-3}$ en ratones tratados con ulocuplumab. Sin embargo, la combinación de ulocuplumab y NKAE condujo a niveles indetectables de los genes CXCR4 humano y GUS humano en los pulmones de los ratones analizados (Figuras 5A y 5B), lo que indica que esta combinación eliminó por completo la metástasis pulmonar. Por lo tanto, la combinación de anticuerpo anti-CXCR4 y terapia con linfocitos NKAE muestra un fuerte efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de rhabdomyosarcomas alveolares RH30 y en la anulación de la metástasis pulmonar.

El análisis inmunohistoquímico y por hibridación *in situ* confirmó adicionalmente estos resultados (Figura 6). Se identificaron micrometástasis pulmonares de sarcoma en los pulmones de ratones sin tratar mediante tinción con hematoxilina y eosina (Figura 6a), hibridación de secuencia *Alu* (Figura 6b) y tinción con Ab específico de CXCR4 (Figura 6c), mientras que los ratones tratados con la combinación de NKAE y ulocuplumab mostraron una ausencia de micrometástasis (Figura 6d).

EJEMPLO 5

LA EXPRESIÓN DE CXCR4 EN MUESTRAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON RABDOMIOSARCOMA ES MAYOR EN MUESTRAS POST-QUIMIOTERAPIA Y POST-RECAÍDA QUE EN MUESTRAS DE DIAGNÓSTICO

La expresión de CXCR4 se evaluó mediante inmunohistoquímica en 23 muestras de rhabdomyosarcoma pediátrico depositadas en el Biobanco del Hospital Universitario La Paz entre 2010 y 2017. La mediana del período de seguimiento fue de 7,9 años (intervalo 0,6-18,4) y la mediana de edad de los pacientes fue de 6,6 años (intervalo 0,2-14,1). 14 muestras de ensayo fueron muestras de diagnóstico, se recogieron 5 muestras de ensayo después del tratamiento quimioterápico y 4 muestras fueron muestras de recaída. Las muestras de células humanas se obtuvieron después del consentimiento informado del paciente de acuerdo con la Declaración de Helsinki. La investigación fue aprobada por el Comité de ética para la investigación clínica del Hospital La Paz (PI-2295). Para la inmunohistoquímica de CXCR4 tumoral, los portaobjetos de tumores incluidos en parafina y fijados en formol se desparafinaron, se hidrataron y se tiñeron usando un mAb anti-CXCR4 humano (dilución 1:10; Clon 44716; R&D Systems) y un sistema de visualización EnVision FLEX+ (ratón, pH alto; Agilent) y se contratiñeron con hematoxilina-eosina.

La especificidad del Ab se confirmó mediante inmunotinción del tejido de las amígdalas. A la proporción de células tumorales CXCR4⁺ se le asignó una puntuación de entre 0 y 5, y a la intensidad de la tinción una puntuación de entre 0 y 3. Estos 2 valores se sumaron para producir la puntuación de tinción final. Dados los estudios recientes que describen la ubicación nuclear de CXCR4 en algunos cánceres (Krook *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015), se evaluaron y ponderaron por igual tanto la tinción citoplasmática como la nuclear. La tinción nuclear de CXCR4 estaba presente en el 15 % de los casos de la serie sometida a ensayo y la tinción citoplasmática en el 68 %.

En las muestras de diagnóstico, no hubo diferencias en la expresión de CXCR4 entre rhabdomyosarcomas embrionarios frente a alveolares ni entre muestras de tumores localizados frente a tumores primarios que ya habían metastatizado (Figura 7A). En cuanto al resultado de esos pacientes, se observó una puntuación de CXCR4 ligeramente más alta en aquellas muestras de pacientes que recayeron posteriormente y también en las de pacientes que finalmente murieron a causa de su enfermedad.

De manera interesante, cuando los inventores compararon las puntuaciones de expresión de CXCR4 de muestras de diagnóstico ($2,8 \pm 2,1$) con muestras post-quimioterapia ($4,4 \pm 0,7$) y muestras de recaída ($6,1 \pm 4,4$), se observó una tendencia fuerte hacia una mayor expresión de CXCR4 en estas últimas muestras (Figura 7B).

Sumario del listado de secuencias

SEQ ID NO:	Descripción
1	Secuencia CDR1 de cadena pesada de F7
2	Secuencia CDR1 de cadena pesada de F9
3	Secuencia CDR1 de cadena pesada de D1
4	Secuencia CDR1 de cadena pesada de E2
5	Secuencia CDR2 de cadena pesada de F7
6	Secuencia CDR2 de cadena pesada de F9
7	Secuencia CDR2 de cadena pesada de D1
8	Secuencia CDR2 de cadena pesada de E2
9	Secuencia CDR3 de cadena pesada de F7
10	Secuencia CDR3 de cadena pesada de F9
11	Secuencia CDR3 de cadena pesada de D1
12	Secuencia CDR3 de cadena pesada de E2
13	Secuencia CDR1 de cadena ligera de F7
14	Secuencia CDR1 de cadena ligera de F9
15	Secuencia CDR1 de cadena ligera de D1
16	Secuencia CDR1 de cadena ligera de E2
17	Secuencia CDR2 de cadena ligera de F7
18	Secuencia CDR2 de cadena ligera de F9
19	Secuencia CDR2 de cadena ligera de D1
20	Secuencia CDR2 de cadena ligera de E2
21	Secuencia CDR3 de cadena ligera de F7
22	Secuencia CDR3 de cadena ligera de F9
23	Secuencia CDR3 de cadena ligera de D1
24	Secuencia CDR3 de cadena ligera de E2
25	Secuencia de aminoácidos de V _H de F7
26	Secuencia de aminoácidos de V _H de F9
27	Secuencia de aminoácidos de V _H de D1
28	Secuencia de aminoácidos de V _H de E2
29	Secuencia de aminoácidos de V _L de F7
30	Secuencia de aminoácidos de V _L de F9
31	Secuencia de aminoácidos de V _L de D1
32	Secuencia de aminoácidos de V _L de E2
33	Secuencia de aminoácidos de V _H de F7GL
34	Secuencia de aminoácidos de V _H de F9GL
35	Secuencia de aminoácidos de V _H de D1GL
36	Secuencia de aminoácidos de V _H de E2GL
37	Secuencia de aminoácidos de V _L de F7GL
38	Secuencia de aminoácidos de V _L de F9GL
39	Secuencia de aminoácidos de V _L de D1GL
40	Secuencia de aminoácidos de V _L de E2GL
41	Secuencia de aminoácidos de estirpe germinal 3-48 de V _H
42	Secuencia de aminoácidos de estirpe germinal L15 de V _K
43	Secuencia de aminoácidos de CXCR4 humano

REFERENCIAS

- 5 Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK *et al.* (2007) *Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. Blood* 109(7): 2708-17.
- 10 Azab AK, Runnels JM, Pitsillides C, Moreau AS, Azab F *et al.* (2009) *CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. Blood* 113(18): 4341-51.
- Bachanova V, Cooley S, Defor TE, Verneris MR, Zhang B *et al.* (2014) *Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. Blood* 123, 3855-3863.
- 15 Balkwill F (2004) *The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. Semin Cancer Biol* 14: 171-9.
- Bertolini 1, Dell'Agnola C, Mancuso P *et al.* (2002) *CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. Blood* 62(11): 3106-12.
- Bian XW, Yang SX, Chen JH *et al.* (2007) *Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. Neurosurgery* 61: 570-8.
- 20 Billadeau DD, Chatterjee S, Bramati P *et al.* (2006) *Characterization of the CXCR4 signaling in pancreatic cancer cells. Int J Gastrointest Cancer* 37: 110-9.
- Becker PS, Foran J, Altman J *et al.* (2014) *Targeting the CXCR4 pathway: Safety, tolerability and clinical activity of*

- BMS-936564 (ulocuplumab), an anti-CXCR4 antibody, in relapsed refractory acute myeloid leukemia. 56.^a Reunión anual de la Sociedad norteamericana de hematología (ASH, por sus siglas en inglés), San Francisco, 6-9 de diciembre de 2014, Presentación oral N.º 386.
- 5 Brennecke P, ArltMJ, Campanile C *et al.* (2014) *CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice.* *Clin Exp Metastasis* 31, 339-49.
- Callahan M, Postow MA, Wolchok JD (2016) *Targeting T cell co-receptors for cancer therapy.* *Immunity* 44(5): 1069-78.
- Cavallaro S (2013) *CXCR4/CXCL12 in non-small-cell lung cancer metastasis to the brain.* *Int J Mol Sci* 14: 1713-27.
- 10 Chaffer CL, Weinberg RA (2011) *A perspective on cancer cell metastasis.* *Science* 331: 1559-64.
- Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S (2014) *The intricate role of CXCR4 in cancer.* *Adv Cancer Res* 124: 31-82.
- Chen DS, Mellman I (2013) *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle.* *Immunity* 39(1): 1-10.
- 15 Cho D, Shook DR, Shimasaki N (2010) *Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors.* *Clin Cancer Res* 16(15): 3901-9.
- Página web de Ensayos clínicos, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=activated+and+expanded+NK+cells&cond=cancer>, consultado por última vez el sábado 9 de marzo de 2019.
- 20 Crazzolara R, Kreczy A, Mann G *et al.* (2001) *High expression of the chemokine receptor CXCR4 predicts extramedullary organ infiltration in childhood acute lymphoblastic leukaemia.* *Br J Haematol* 115: 545-53.
- Davies AM, Sutton BJ (2015) *Human IgG4: A structural perspective.* *Immunological Reviews* 268: 139-159.
- De Falco V, Guarino V, Avilla E *et al.* (2007) *Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer.* *Cancer Res* 67: 11821-9.
- 25 Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y *et al.* (2006) *Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer.* *Biomed Pharmacother* 60: 273-276.
- Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast *et al.* (2013) *A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: No place to hide.* *Eur J Cancer* 49: 219-30.
- Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND *et al.* (2011) *CXCL12 (SDF-1)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: An emerging sensitizer for anticancer therapies?* *Clin Cancer Res* 17: 2074-80.
- 30 Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM *et al.* (2016) *Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?* *BMC Medicine* 14: 73.
- Fernández L, Portugal R, Valentin J *et al.* (2013) *In vitro natural killer cell immunotherapy for medulloblastoma.* *Front Oncol* 3 (Abril): 94.
- Fernández L, Valentin J, Zalacain M (2015) *Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D-NKG2DL dependent manner.* *Cancer Lett* 368(1): 54-63.
- 35 Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N *et al.* (2009) *Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy.* *Cancer Res* 69(9): 4010-7.
- Gangadhar T, Nandi S, Salgia R (2010) *The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer.* *Cancer Biol Ther* 9: 409-16.
- 40 Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F *et al.* (2009) *The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer.* *Clin Exp Metastasis* 26, 261-268.
- Ghobrial I, Perez R, Baz R *et al.* (2014) *Phase Ib study of the novel anti-CXCR4 antibody ulocuplumab (BMS-936564) in combination with lenalidomide plus low-dose dexamethasone, or with bortezomib plus dexamethasone in subjects with relapsed or refractory multiple myeloma.* 56.^a Reunión anual de la Sociedad norteamericana de hematología (ASH, por sus siglas en inglés), San Francisco, 6-9 de diciembre de 2014, Presentación de póster N.º 3483.
- 45 Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ *et al.* (2016) *Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy.* *Nature Immunol* 1025-36.
- Han M, Lv S, Zhang Y *et al.* (2014) *The prognosis and clinicopathology of CXCR4 in gastric cancer patients: a meta-analysis.* *Tumour Biol* 35: 4589-97.
- 50 Hirata H, Hinoda Y, Kikuno N *et al.* (2007) *CXCL12 G801A polymorphism is a risk factor for sporadic prostate cancer susceptibility.* *Clin Cancer Res* 13: 5056-62.
- Hollinger P, Hudson PJ (2005) *Engineered antibody fragments and the rise of single domains.* *Nature Biotech* 23(9): 1126-36.
- 55 Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A *et al.* (2005) *Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes.* *Blood* 105(12): 4878-84.
- Idusogie EE, Wong PY, Presta LG *et al.* (2001) *Engineered antibodies with increased activity to recruit complement.* *J Immunol* 166(4): 2571-5.
- 60 Igarashi T, Wynberg J, Srinivasan R *et al.* (2004) *Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells.* *Blood* 104: 170-7.
- Imai C, Iwamoto S, Campana D (2005) *Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells.* *Blood* 106(1): 376-83.
- Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K *et al.* (2004) *Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma.* *Anticancer Res* 24: 1861-1871.
- 65 Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S *et al.* (2006) *CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral*

- squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 28: 61-66.
- Ishikawa T, Okayama T, Sakamoto N *et al.* (2018) Phase I clinical trial of adoptive tr killer cells in combination with IgG1 antibody in patients with gastric or colorectal cancer. *Int J Cancer* 142: 2599-609.
- Jin L, Tabe Y, Konoplev S *et al.* (2008) CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 7: 48-58.
- Jones J, Marian D, Weich E *et al.* (2007) CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 313: 4051-65.
- Kabat EA, Wu TT, Perry H *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., Publicación NIH N.º 91-3242.
- Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M *et al.* (2008) Involvement of SDF-1 α /CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 122: 91-99.
- Kalinkovich A, Tavor S, Avigdor A *et al.* (2006) Functional CXCR4-expressing microparticles and SDF-1 correlate with circulating acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 66: 11013-20.
- Kamiya T, Chang Y-H, Campana D (2016) Expanded and activated natural killer cells for immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Res* 4(7): 547-81.
- Kamta J, Chaar M, Ande A (2017) Advancing cancer therapy with present and emerging immuno-oncology approaches. *Front Oncol* 18(7): 64.
- Krook MA, Nicholls LA, Scannell CA *et al.* (2014) Stress-induced CXCR4 promotes migration and invasion of ewing sarcoma. *Mol Cancer Res* 12: 953-64.
- Kuhne MR, Mulvey T, Belanger B *et al.* (2013) BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 19: 357-66.
- Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225-74.
- Lanier LL, Buck DW, Rhodes L *et al.* (1988) Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 activation antigen. *J Exp Med* 167: 1572-85.
- Laverdiere C, Hoang BH, Yang R *et al.* (2005) Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 11(7): 2561-7.
- Leavey PJ, Mascarenhas L, Marina N *et al.* (2008) Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma (EWS) at first recurrence following multi-modality therapy: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 51(3): 334-8.
- Lee B, Sharron, M, Montaner LJ *et al.* (1999) Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5215-20.
- Leivas A, Pérez-Martínez A, Blanchard MJ *et al.* (2016) Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. *Oncoimmunology* 5(12): e1250051.
- Lesokhin AM, Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD (2015) On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Sci Transl Med* 7(280): 280sr1.
- Li Y-J, Dai Y-L, Zhang WB *et al.* (2015) Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *Clin Exp Med* 9: 11101-12.
- Libura J, Drukala J, Majka M *et al.* (2002) CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. *Blood* 100: 2597-606.
- London L, Perussia B, Trinchieri G (1986) Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J Immunol* 137: 3845-54.
- Long EO, Kim HS, Liu D *et al.* (2013) Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31: 227-58.
- Lowry LE, Zehring WA (2017) Potentiation of natural killer cells for cancer immunotherapy: a review of literature. *Front Immunol* 8: 1061.
- Lv S, Yang Y, Kwon S *et al.* (2014) The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients: a meta-analysis. *Histopathol* 64: 701-712.
- Miki J, Furusato B, Li H *et al.* (2007) Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res* 67: 3153-61.
- Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A *et al.* (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105(8): 3051-7.
- Mohle R, Failenschmid C, Bautz F *et al.* (1999) Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 13: 1954-9.
- Moretta L, Locatelli F, Pende D *et al.* (2011) Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117(3): 764-71.
- Nausch N, Cerwenka A (2008) NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 27(45): 5944-58.
- Nguyen DX, Bos PD, Massagué J (2009) Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9: 274-84.
- Olafsen T, Wu AM (2010) Antibody vectors for imaging. *Semin NuclMed* 40(3): 167-81.

- Onoue T, Uchida D, Begum NM *et al.* (2006) *Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. Int J Oncol* 29: 1133-8.
- Pan J, Mestas J, Burdick MD *et al.* (2006) *Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. Mol Cancer* 5: 56.
- 5 Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C *et al.* (2015) *CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer Cell* 27(6): 769-79.
- Publicación PCT N.º WO 2008/060367, publicada el 22 de mayo de 2008 por Medarex, Inc.
- Publicación PCT N.º WO 2013/071068, publicada el 16 de mayo de 2013 por Bristol-Myers Squibb.
- Publicación PCT N.º WO 2015069874, publicada el 14 de mayo de 2015 por Bristol-Myers Squibb y Dana-Farber
10 Cancer Institute.
- Publicación PCT N.º WO 2016/201425, publicada el jueves, 15 de diciembre de 2016 por Bristol-Myers Squibb.
- Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ *et al.* (2011) *Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. Immunol Cell Biol* 89(2): 216-24.
- Pende D, Marcenaro S, Falco M *et al.* (2009) *Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. Blood* 113(13): 3119-29.
- 15 Pérez-Martínez A, de Prada Vicente I, Fernández L *et al.* (2012) *Natural killer cells can exert a graft-vs-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric solid tumors. Exp Hematol* 40(11): 882-91.
- Pérez-Martínez A, Fernández L, Valentin J *et al.* (2015a) *A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haploidentical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors. Cytotherapy* 17(11): 1594-603.
- Pérez-Martínez A, Leung W, Muñoz E *et al.* (2009) *KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a graft-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors. Pediatr Blood Cancer* 53(1): 120-4.
- 25 Pérez-Martínez A, Valentin J, Fernández L *et al.* (2015b) *Arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity against neuroblastoma in vitro and in vivo. Cytotherapy* 17(5): 601-12.
- Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H *et al.* (2015) *CXCL12-Producing Vascular Endothelial Niches Control Acute T Cell Leukemia Maintenance. Cancer Cell* 27(6): 755-68.
- Rabinowich H, Sedlmayr P, Herberman RB, Whiteside TL (1991) *Increased proliferation, lytic activity, and purity of human natural killer cells cocultured with mitogen-activated feeder cells. Cell Immunol* 135: 454-70.
- 30 Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S *et al.* (2010) *NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. J Clin Oncol* 28(6): 955-9.
- Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA *et al.* (2005) *Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. Clin Cancer Res* 11: 1835-41.
- 35 Schimanski CC, Bahre R, Gockel I *et al.* (2006) *Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4. Br J Cancer* 95: 210-7.
- Seyfried TN, Huysentruyt LC (2013) *On the origin of cancer metastasis. Crit Rev Oncog* 18(1-2): 43-73.
- Shi J *et al.* (2013) *Acceso Público de NIH* 143: 641-653.
- Somanchi SS, Lee DA (2016) *Ex vivo expansion of human NK cells using K562 engineered to express membrane bound IL21. Methods Mol Biol* 1441: 175-93.
- 40 Stiller CA, Trama A, Serraino D *et al.* (2013) *Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: Report from the RARECARE project. Eur J Cancer* 49: 684-695.
- Szmania S, Lapteva N, Garg T *et al.* (2015) *Fresh ex vivo expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma (MM) patients. J Immunother* 38(1): 24-36.
- 45 Tavor S, Petit I, Porozov S *et al.* (2004) *CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. Cancer Res* 64: 2817-24.
- Patente de los EE.UU. N.º 7.767.429, presentada el 3 de agosto de 2010 por Bookbinder *et al.*
- Vela M, Aris M, Llorente M *et al.* (2015) *Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: Achievements and challenges. Front Immunol* 6: 12.
- 50 Vela M, Corral D, Carrasco P *et al.* (2018) *Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia. Cancer Lett* 422: 107-17.
- Verhoeven DHJ, de Hooge ASK, Mooiman ECK *et al.* (2008) *NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. Mol Immunol* 45(15): 3917-25.
- 55 Vivier E, Raulet DH, Moretta A *et al.* (2011) *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science* 331(6013): 44-9.
- Wu J, Wu X, Liang W *et al.* (2014) *Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 overexpression in patients with esophageal cancer: a meta-analysis. Tumour Biol* 35: 3709-15.
- 60 Zheng Y, Dou Y, Duan L *et al.* (2015) *Using chemo-drugs or irradiation to break immune tolerance and facilitate immunotherapy in solid cancer. Cell Immunol* 294: 54-59.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de cantidades terapéuticamente eficaces de:

- 5 (a) una población aislada de linfocitos citolíticos naturales (NK); y
- (b) un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al Receptor 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) expresado en la superficie de una célula cancerosa

10 para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece un cáncer que comprende administrar al sujeto la combinación de los linfocitos NK y el anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno del mismo.

15 2. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una población aislada de linfocitos citolíticos naturales (NK) para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece un cáncer en combinación con un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al Receptor 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) expresado en la superficie de una célula cancerosa, comprendiendo el método administrar al sujeto la combinación de los linfocitos NK y el anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno del mismo.

20 3. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al Receptor 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4) expresado en la superficie de una célula cancerosa para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece un cáncer en combinación con una población aislada de linfocitos citolíticos naturales (NK), comprendiendo el método administrar al sujeto la combinación de los linfocitos NK y el anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno del mismo.

25 4. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la población de linfocitos NK comprende linfocitos NK activados y expandidos (NKAE).

30 5. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 4, en donde los linfocitos NKAE se producen estimulando los linfocitos NK con IL-2, IL-12, IL-15 y/o IL-21 en combinación con células alimentadoras.

35 6. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 4 o 5, en donde los linfocitos NKAE se producen mediante el cocultivo de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos con (i) células β -linfoblastoides irradiadas modificadas para expresar una forma unida a membrana de interleucina-15 (IL-15) y ligando 41BB, e (ii) interleucina-2 (IL-2).

40 7. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 6, en donde las células β -linfoblastoides modificadas son células K562-mb15-41BBL.

8. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde los linfocitos NK se administran al sujeto por inyección intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o intratecal, o inyección en una cavidad de resección tumoral.

45 9. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde una dosis que varía de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{14} de dichos linfocitos NK se administra al sujeto semanalmente.

50 10. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo.

55 11. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el sujeto es un ser humano y el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un receptor CXCR4 humano.

60 12. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo altera la interacción entre CXCR4 y la quimiocina 12 con motivo C-X-C (CXCL12) e inhibe la señalización de CXCR4/CXCL12.

65 13. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 12, en donde el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo presenta una o más de las siguientes características:

- (a) se une a CXCR4 en una superficie de una célula cancerosa con una K_D de aproximadamente 1×10^{-8} M o

- menos según se determinó mediante resonancia de plasmón superficial (SPR);
 (b) inhibe la unión de CXCL12 a CXCR4 con una CE_{50} de menos de aproximadamente 30 nM;
 (c) inhibe el flujo de calcio inducido por CXCL12 en células que expresan CXCR4 con una CE_{50} de menos de aproximadamente 1 nM;
- 5 (d) inhibe la migración inducida por CXCL12 de células que expresan CXCR4 con una CE_{50} de menos de aproximadamente 20 nM;
 (e) inhibe la formación de tubos capilares por células endoteliales de la vena umbilical humana;
 (f) induce la apoptosis en células que expresan CXCR4;
 (g) inhibe la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ *in vitro*;
- 10 (h) inhibe la proliferación de células tumorales CXCR4⁺ y/o induce la apoptosis de células tumorales CXCR4⁺ *in vivo*;
 (i) inhibe las metástasis de células tumorales CXCR4⁺; y
 (j) aumenta el tiempo de supervivencia de un sujeto portador de tumor CXCR4⁺.
- 15 14. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo anti-CXCR4 o porción del mismo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 29.
- 20 15. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el anticuerpo anti-CXCR4 o porción del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 25 o 33 y una región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 29 o 37.
- 25 16. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo anti-CXCR4 o porción del mismo comprende una CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, una CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, una CDR3 de región variable de cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9, una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13, una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 17 y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 21.
- 30 17. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo:
- 35 (a) compete de forma cruzada con ulocuplumab por la unión a CXCR4 humano;
 (b) se une sustancialmente al mismo epítipo en CXCR4 humano que el ulocuplumab;
 (c) es un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano o una porción del mismo;
 (d) comprende una región constante de cadena pesada que es de un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4 humano;
 (e) es ulocuplumab o una porción de unión a antígeno del mismo; y/o
 (f) es una variante de IgG1 humana de ulocuplumab o una porción de unión a antígeno del mismo.
- 40 18. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el cáncer es un tumor sólido, opcionalmente en donde el tumor sólido es un tumor pediátrico, opcionalmente en el que el tumor pediátrico es un rhabdomioma, osteosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma o sarcoma de Ewing.
- 45 19. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 18, en donde el tumor sólido es un cáncer seleccionado de cáncer de pulmón microcítico (CPM), cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), CPNM escamoso, CPNM no escamoso, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cáncer pancreático, adenocarcinoma ductal pancreático (ADP), cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, cáncer de útero (de endometrio), carcinoma del endometrio, sarcoma uterino, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de la uretra, cáncer del uréter, cáncer de próstata, cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (CPRCm), cáncer de testículos, cáncer de pene, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de mama triple negativo (CMTN), cáncer de mama masculino, tumor de células germinales, sarcoma, cáncer de piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de Merkel, cáncer de hueso, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), cáncer de tiroides, cáncer bucal, cáncer de boca, cáncer de glándulas salivales, cáncer de garganta, cáncer de esófago, cáncer
- 50 55 60 65

gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer del intestino delgado, cáncer de vesícula biliar y conducto biliar, cáncer colorrectal, carcinoma de colon, cáncer de recto, cáncer de ano, cáncer de hígado, hepatoma, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer del sistema endocrino, tumores de la glándula del timo, timoma, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, mesotelioma, carcinoma de la pelvis renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, cáncer de cerebro, glioma, glioma del tronco encefálico, glioblastoma, glioblastoma multiforme (GBM), neuroblastoma, adenoma hipofisario, cáncer epidermoide, tumores sólidos de la infancia, sarcoma pediátrico, cáncer metastásico, cáncer de origen primario desconocido, cánceres inducidos por el entorno, cánceres relacionados con virus, cánceres relacionados con el SIDA, sarcoma de Kaposi, cánceres de origen vírico, tumores sólidos avanzados, refractarios y/o recurrentes, y cualquier combinación de los tumores sólidos anteriores.

20. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en donde el cáncer es una neoplasia maligna hemática.

21. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de la reivindicación 20, en donde la neoplasia maligna hemática se selecciona de leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (LMC), linfoma de Hodgkin (LH), linfomas no Hodgkin (LNH), linfoma de Burkitt, linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), linfoma folicular (LF), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de linfocitos B precursores, linfoma de células del manto, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma linfoblástico de linfocitos T precursores, linfoma sinonasal de linfocitos citolíticos/T, mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (SMD), mieloma latente, gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI), neoplasias malignas hemáticas avanzadas, metastásicas, refractarias y/o recurrentes, y cualquier combinación de las neoplasias malignas hemáticas anteriores.

22. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se administra:

- (a) a una dosis fija de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg una o dos veces aproximadamente cada semana, una vez aproximadamente cada 2 semanas o una vez aproximadamente cada 3 semanas;
- (b) a una dosis fija de aproximadamente 200, aproximadamente 400, aproximadamente 800, aproximadamente 1600 o aproximadamente 2000 mg una vez aproximadamente cada semana o una vez aproximadamente cada 2 semanas; y/o
- (c) al sujeto mediante administración intravenosa o subcutánea.

23. La combinación, población aislada de linfocitos NK, o anticuerpo aislado o una porción de unión a antígeno del mismo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde:

- (a) los linfocitos NK y el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se administran secuencialmente al sujeto;
- (b) los linfocitos NK se administran antes que el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo;
- (c) el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se administra antes que los linfocitos NK;
- (d) los linfocitos NK y el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se administran simultáneamente en composiciones separadas; o
- (e) los linfocitos NK y el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se mezclan en una única composición y se administran simultáneamente.

24. Un kit para su uso en el tratamiento de un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo el kit:

- (a) una o más dosificaciones que varían de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CXCR4 expresado en la superficie de una célula cancerosa;
- (b) una o más dosificaciones que varían de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{14} de una población de linfocitos NKAE; y
- (c) instrucciones para usar el anticuerpo o porción del mismo y los linfocitos NKAE en el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-23.

FIG. 1A

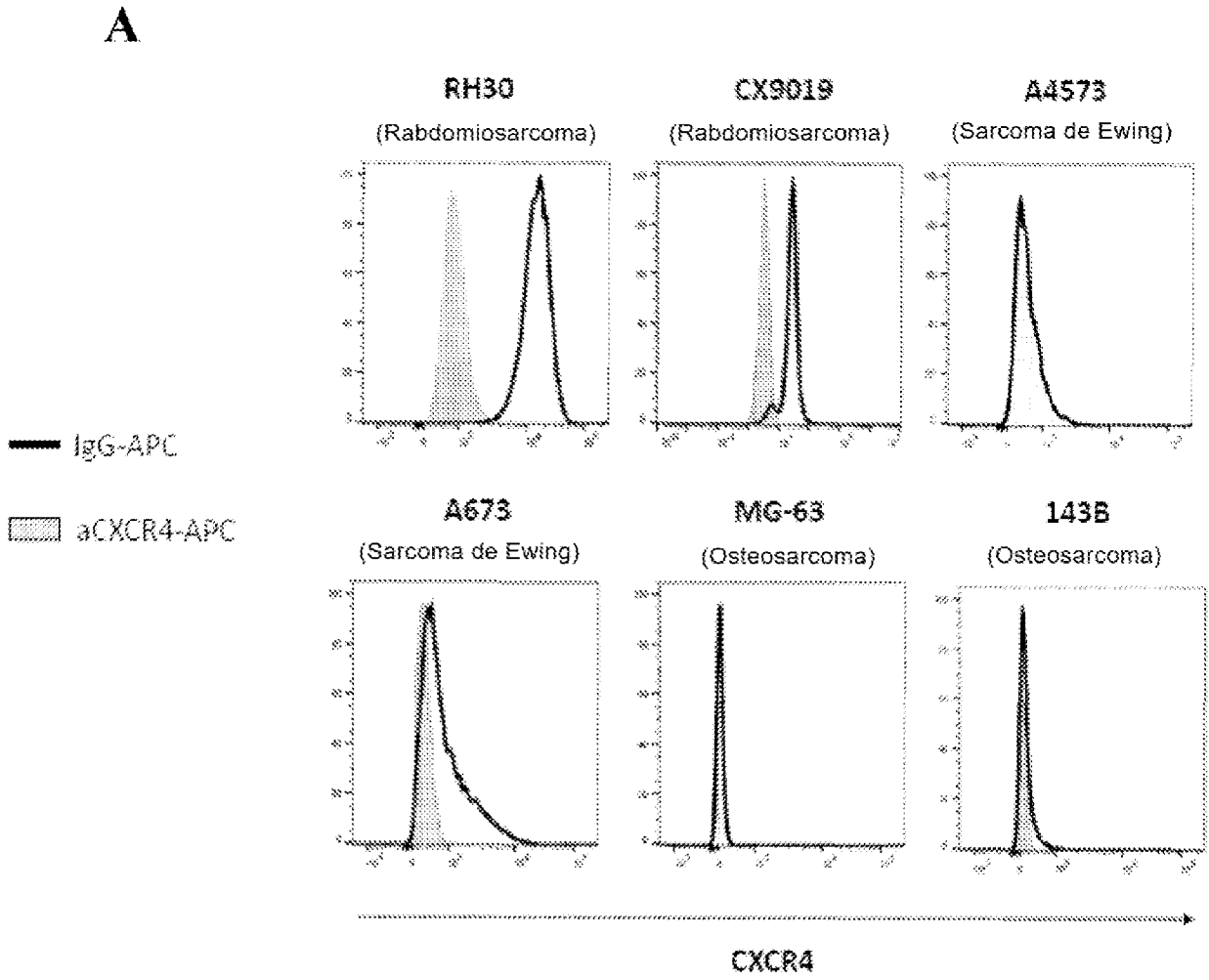


FIG. 1B

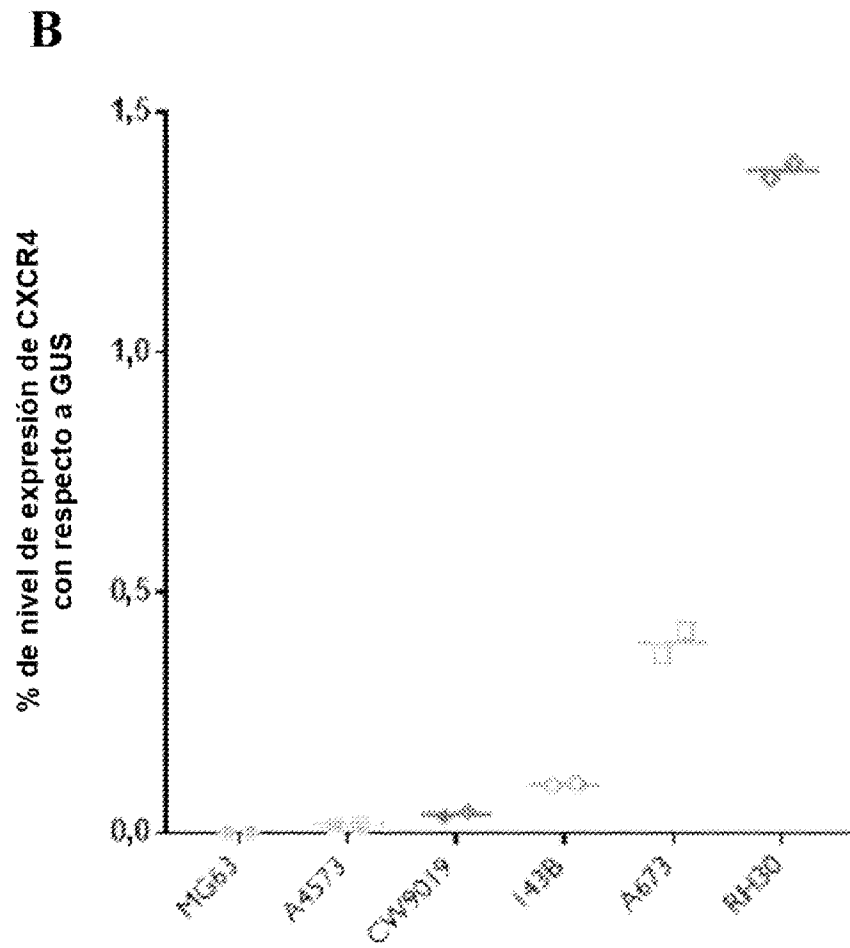


FIG. 2A

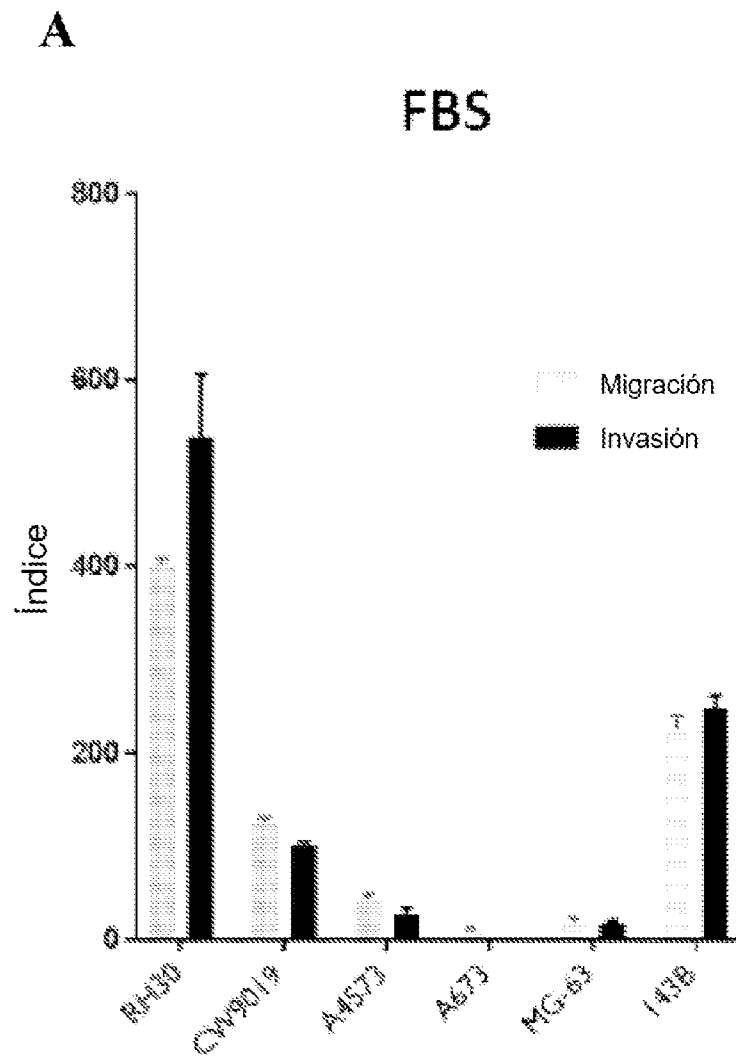


FIG. 2B

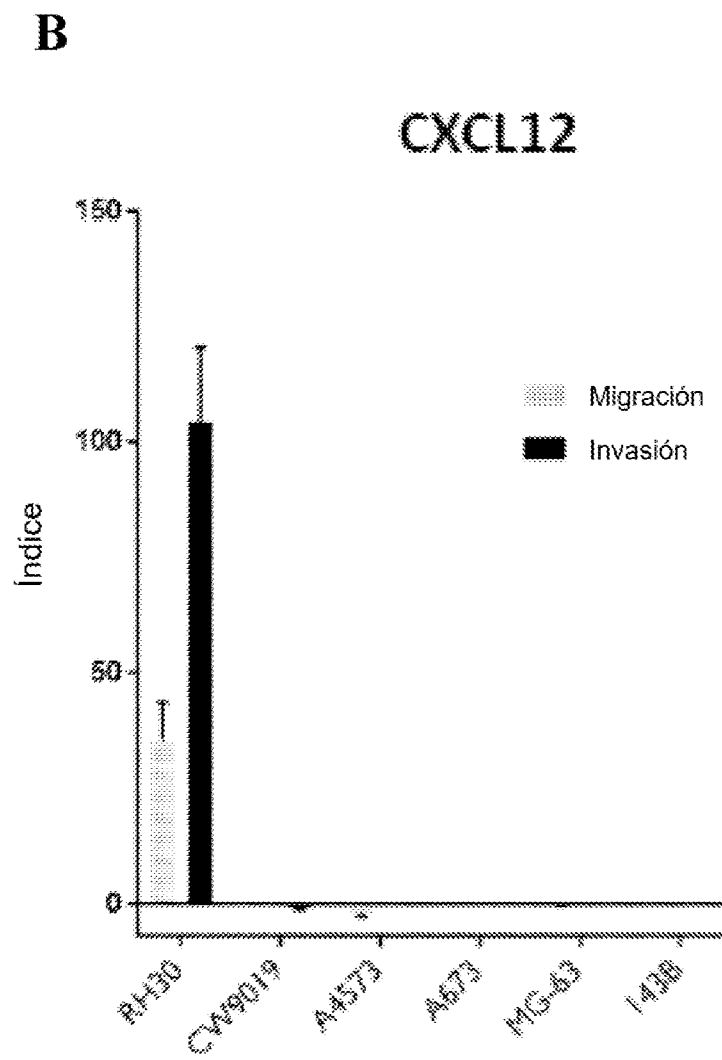


FIG. 3A

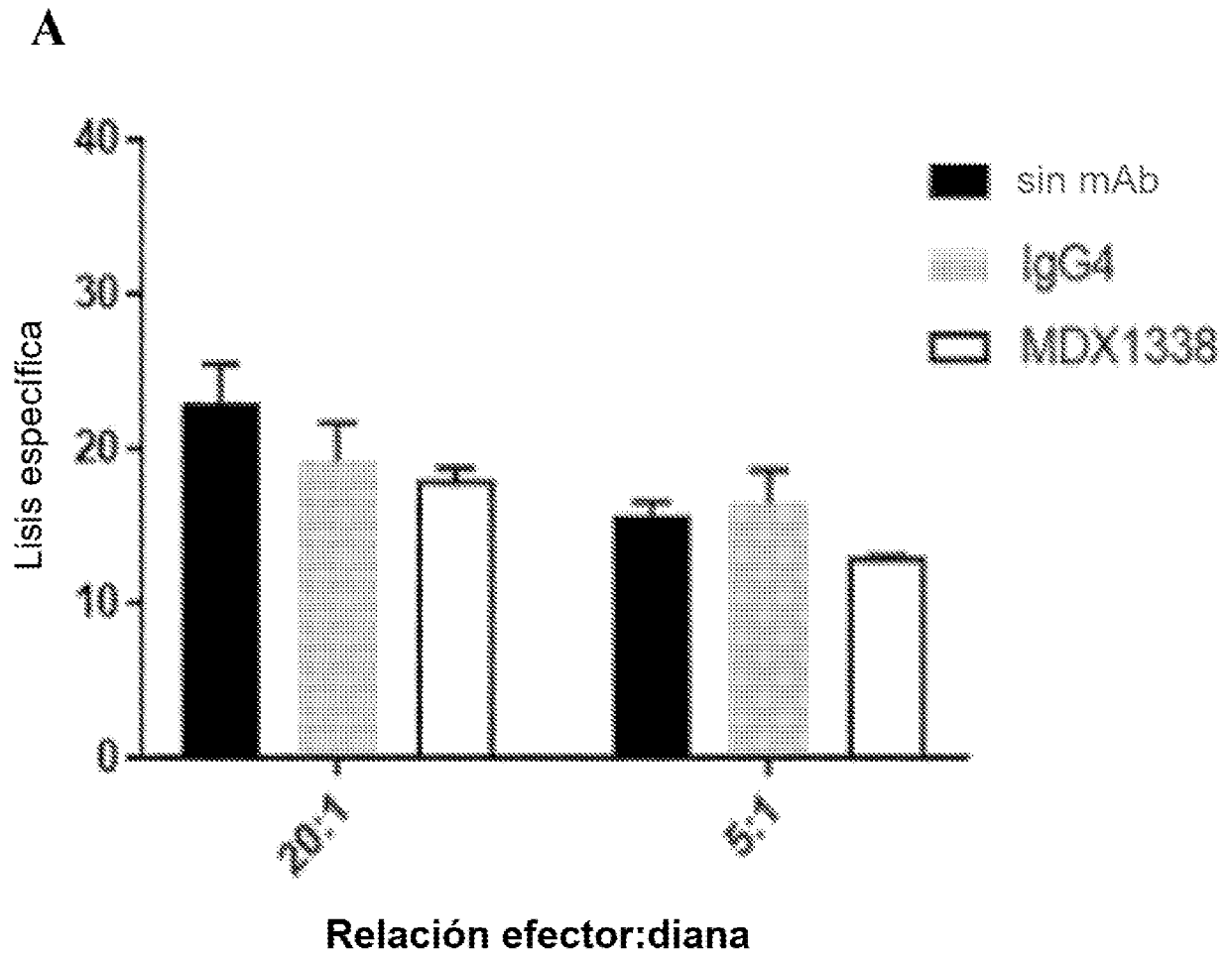


FIG. 3B-C

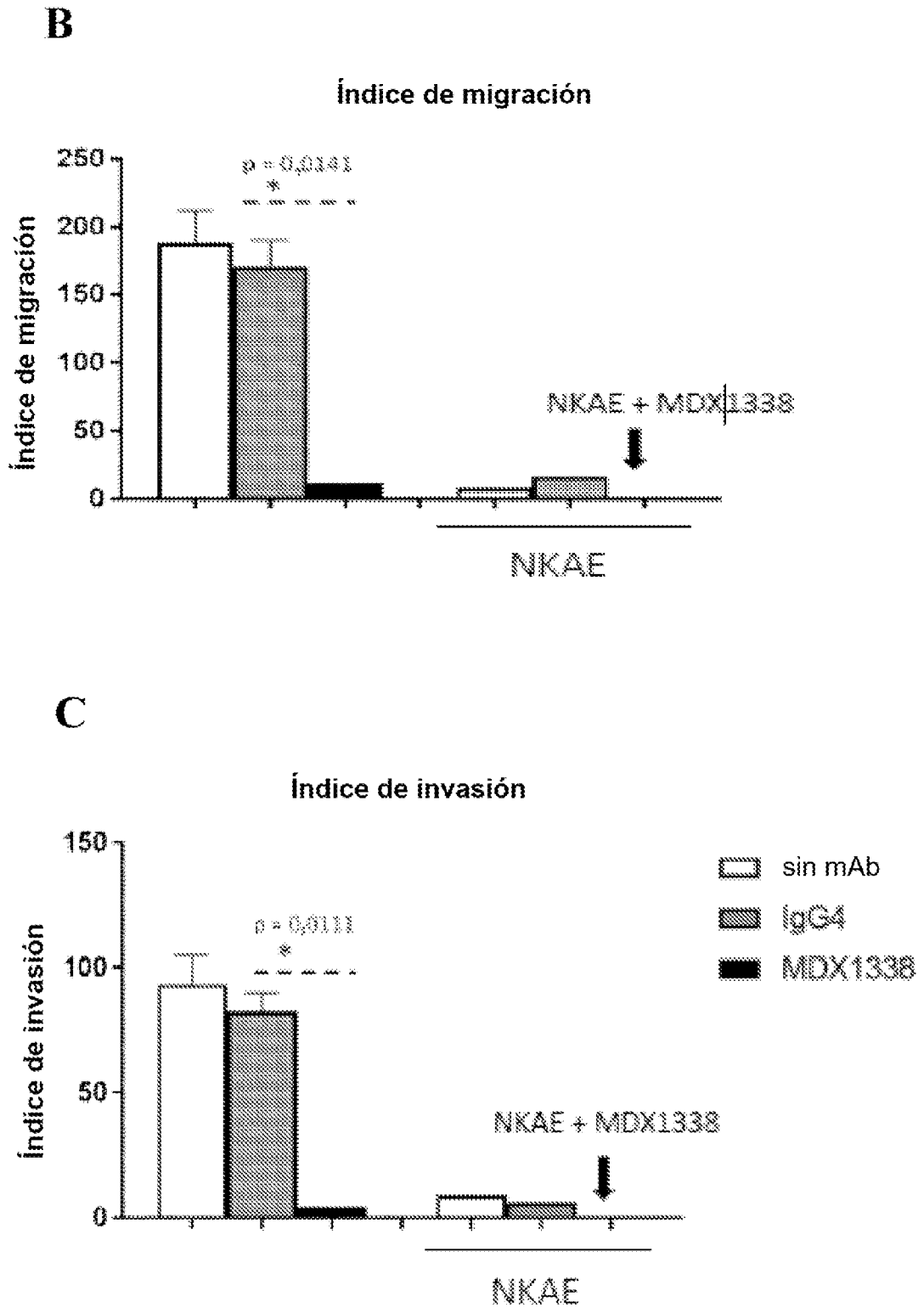
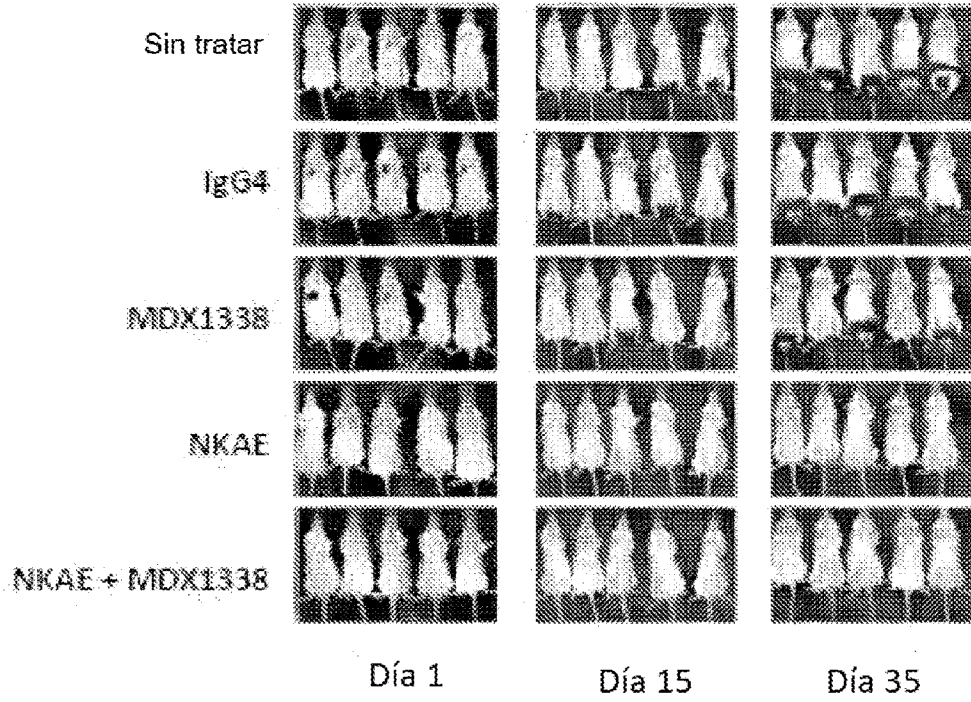


FIG. 4A-B

A



B

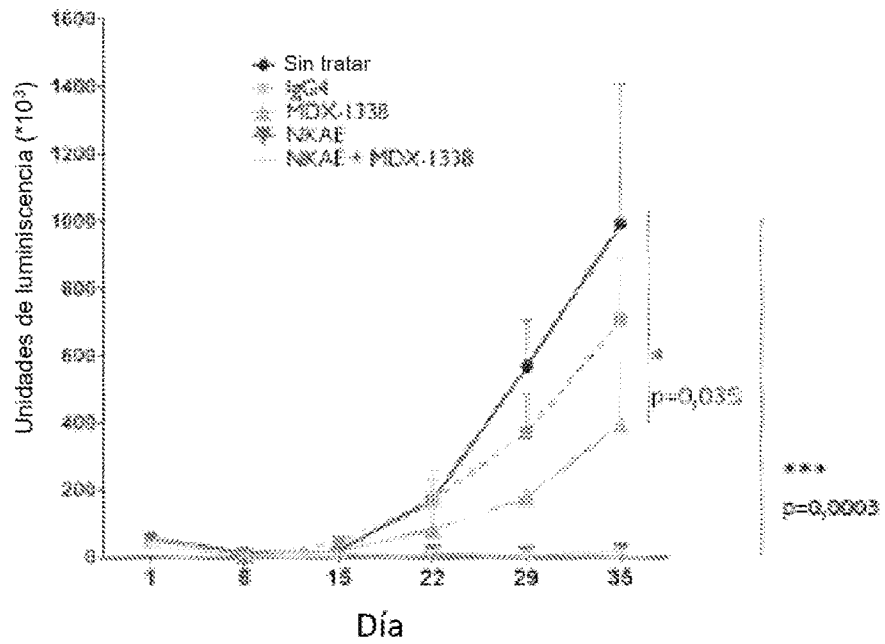


FIG. 5A

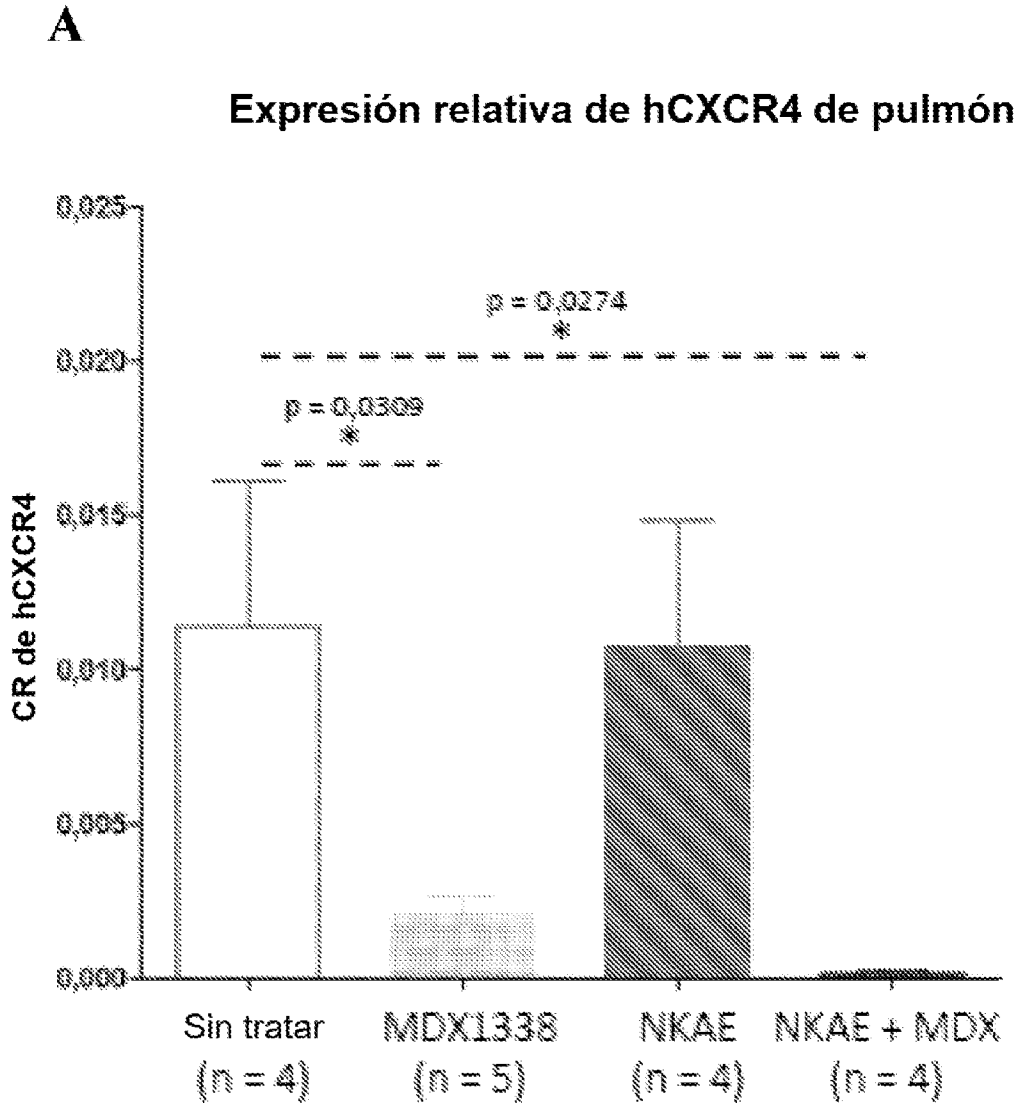


FIG. 5B

B

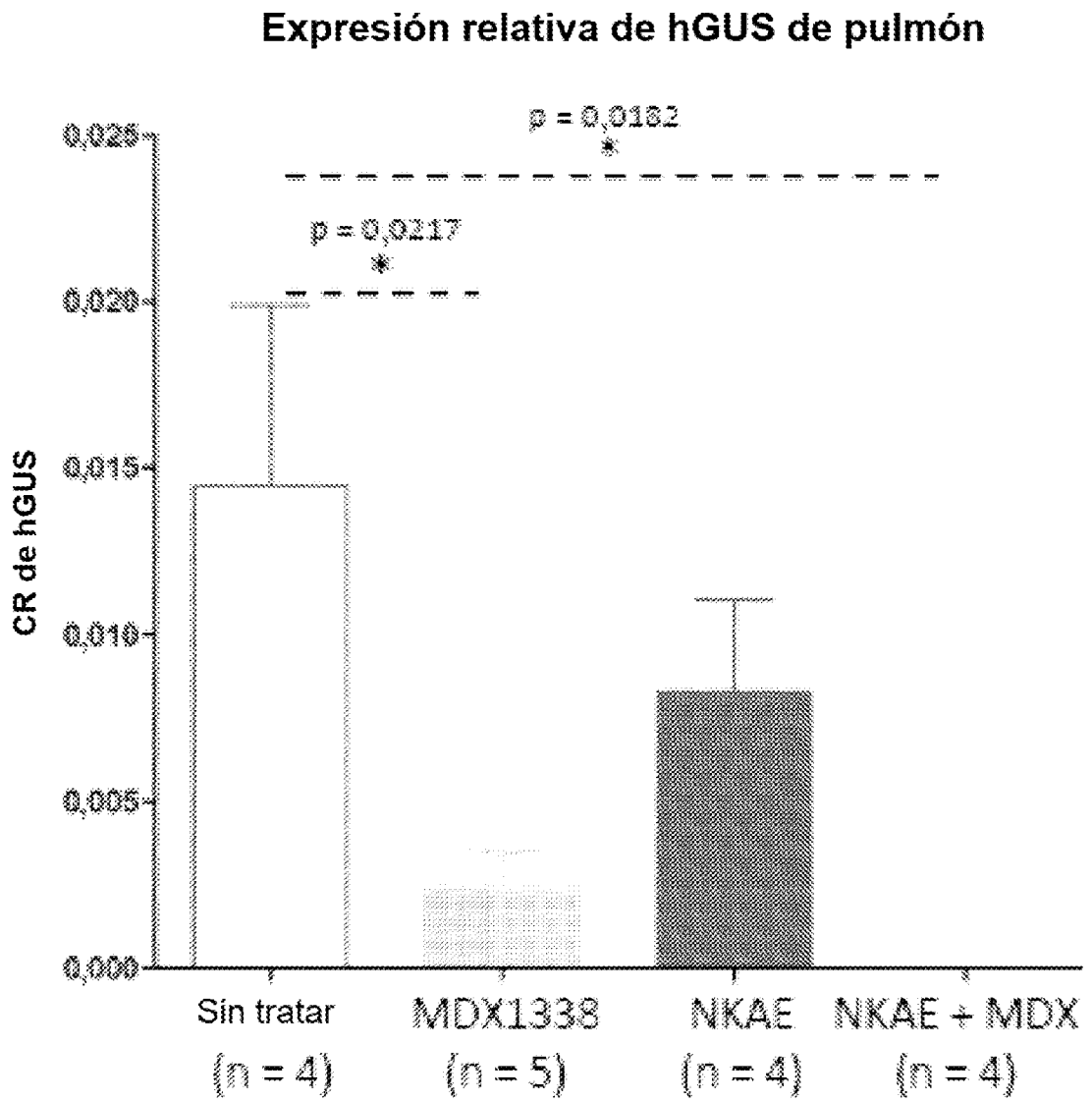


FIG. 6a-d

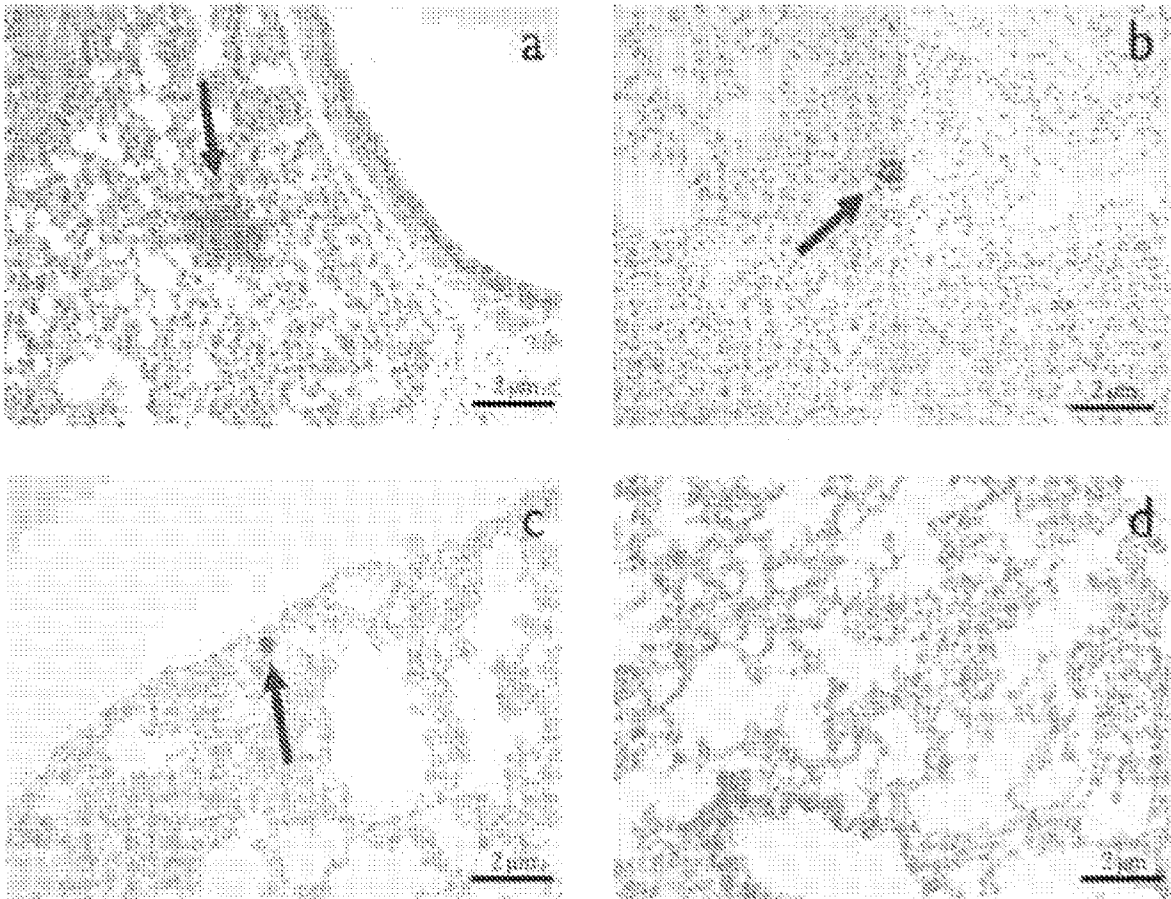


FIG. 7A

A

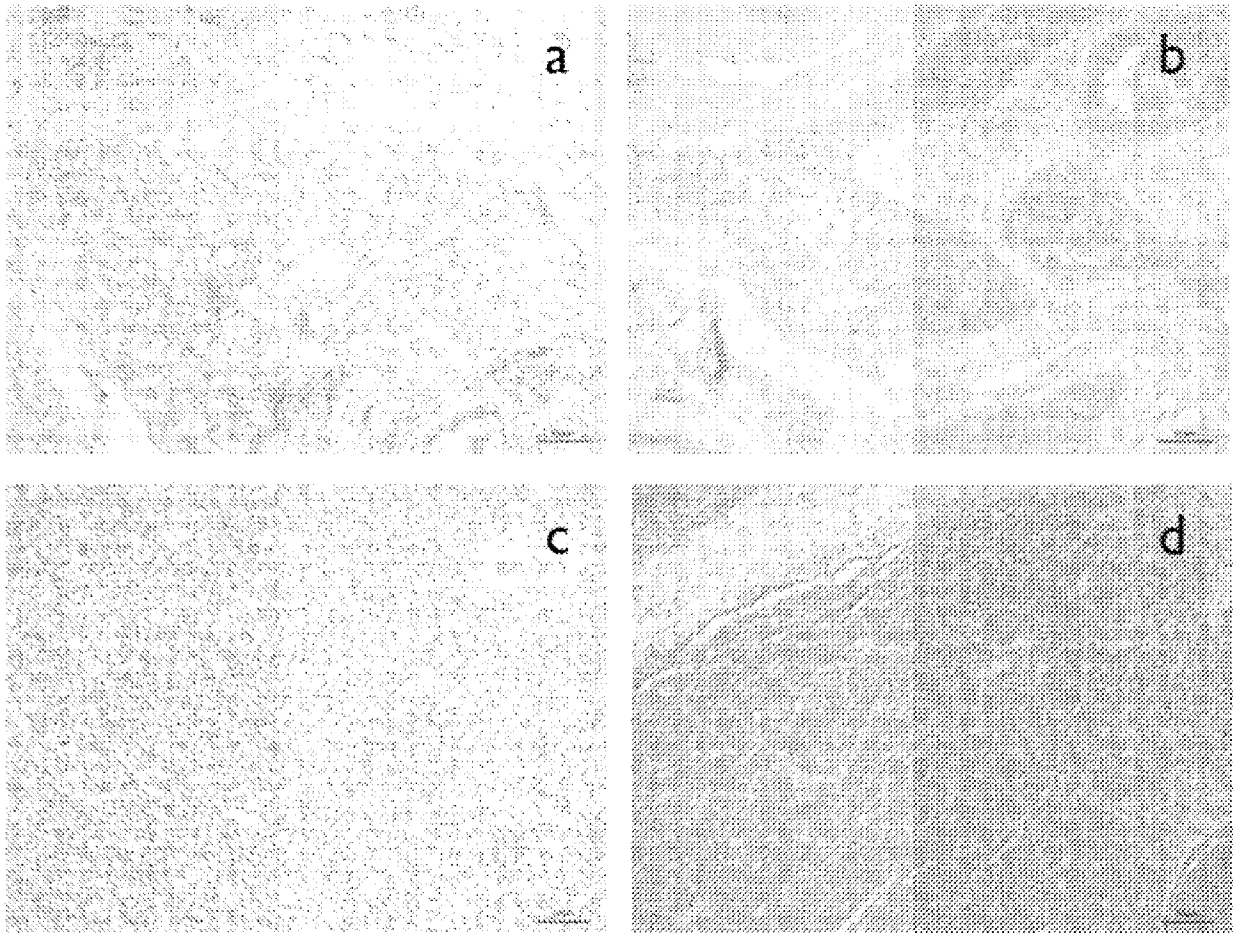


FIG. 7B-C

