

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 079**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2014 PCT/US2014/064320**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15069874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2014 E 14803293 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3066129**

54 Título: **Tratamiento de macroglobulinemia de Waldenström asociada a C1013G/CXCR4 con un anticuerpo anti-CXCR4**

30 Prioridad:

**06.11.2013 US 201361900898 P**

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

**13.02.2020**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (50.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US y  
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GHOBRIAL, IRENE M.;  
ROCCARO, ALDO M.;  
CARDARELLI, JOSEPHINE M. y  
SACCO, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 742 079 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

Tratamiento de macroglobulinemia de Waldenström asociada a C1013G/CXCR4 con un anticuerpo anti-CXCR4

5 A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones entre paréntesis por el nombre del autor y la fecha, o por la Patente N.º o la Publicación N.º Pueden encontrarse citas completas de estas publicaciones al final de la memoria descriptiva que precede inmediatamente a las reivindicaciones. Sin embargo, la cita de una referencia en el presente documento no debe interpretarse como un reconocimiento de que dicha referencia es una técnica anterior a la presente invención.

10

**Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere al uso de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CXCR4 humano en métodos de tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenström asociada a C1013G/CXCR4.

15

**Antecedentes de la invención**

El receptor de quimiocinas C-X-C de tipo 4 (CXCR4) desempeña un papel crucial en afecciones fisiológicas, tales como la linfopoyesis y la mielopoyesis de la médula ósea (MO), durante la embriogénesis. En la vida postnatal, CXCR4 y su ligando modulan el recorrido de las células CD341 a los nichos de la MO, así como el tráfico linfocítico. Se ha demostrado que CXCR4 está mutado en pacientes con una enfermedad autosómica dominante heterocigótica hereditaria caracterizada por una inmunidad que funciona de manera anormal, conocida como verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones y síndrome de mielocatexia (WHIM), debido a la presencia, entre otras, de una mutación activadora del gen CXCR4, representada por la variante C1013G (Balabanian *et al.*, 2005; Balabanian *et al.*, 2008). La evidencia reciente respalda la presencia de anomalías somáticas CXCR4 en la macroglobulinemia de Waldenström (MW; linfoma linfoplasmocítico) (Hunter *et al.*, 2014; Treon *et al.*, 2014). El papel funcional de esta variante en el respaldo de la progresión del linfoma linfoplasmocítico y si es peculiar para la MW o si ocurre en una gammapatía monoclonal de significado indeterminado (GMSI) de IgM en comparación con otras entidades linfoproliferativas de células B no se ha descrito anteriormente.

20

La MW es un trastorno raro de células B con una tasa de incidencia de aproximadamente 3 casos por millón de personas por año en los Estados Unidos. Aproximadamente de 1.000 a 1.500 personas son diagnosticadas con MW cada año en los Estados Unidos. La secuenciación del genoma completo recientemente arrojó luz sobre los mecanismos moleculares que pueden contribuir a la patogenia de esta enfermedad. Específicamente, se ha descrito L265P/MYD88 como una mutación somática prevalente en pacientes con MW (Treon *et al.*, 2012). Los estudios *in vitro* han demostrado que la variante L265P/MYD88 puede conducir a una mayor proliferación de células tumorales (Yang *et al.*, 2013); esto puede explicarse, al menos en parte, por la activación dependiente de MYD88 del factor nuclear kB (NF-κB), una vía de señalización conocida que modula la supervivencia, el crecimiento y la resistencia a la terapia de células B tumorales (Leleu *et al.*, 2008). Estas observaciones también son coherentes con hallazgos previos de que la sobreexpresión del microARN-155 oncogénico en células de MW clonales conduce a la activación de NF-κB en células de MW primaria. De hecho, estudios de pérdida de función de microRNA-155 condujeron a la inhibición de NF-κB y a la reducción del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* (Leleu *et al.*, 2008; Roccaro *et al.*, 2009). Sin embargo, la mutación MYD88 no predijo la progresión o resistencia a la terapia en varios estudios publicados, lo que indica que otras alteraciones genéticas pueden ser críticas para la progresión tumoral y la diseminación a órganos distantes.

25

Entre los linfomas de células B de bajo grado, la MW representa un subtipo linfoplasmocítico caracterizado por infiltración en la MO de células linfoplasmocíticas y secreción de una proteína de inmunoglobulina M (IgM) monoclonal sérica que puede conducir a complicaciones de hiperviscosidad, sangrado y neuropatía periférica (Ghobrial *et al.*, 2003; Vijay y Gertz, 2007). La evidencia de una participación generalizada de la MO en el momento del diagnóstico implica el tráfico celular de células B clonales dentro de la MO. En este contexto, uno de los principales reguladores de la orientación de las células B tumorales a la MO está representado por CXCR4 a través de la interacción con su ligando relacionado el factor derivado del estroma 1 (SDF-1/CXCL12).

30

Un informe preliminar de la secuenciación del genoma completo ha indicado que CXCR4 puede estar mutado en el 29 % (16/55) de los pacientes con MW (Cao *et al.*, 2012). Por tanto, se investigó la presencia y el papel de la variante C1013G/CXCR4 en pacientes con MW y diferentes trastornos linfoproliferativos de células B, con el objetivo de definir el papel funcional *in vivo* de esta variante en la MW, así como la respuesta de pacientes con MW asociada a C1013G/CXCR4 al tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4.

35

Se han descrito anteriormente anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 que presentan eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer en las publicaciones PCT N.º WO 2008/060367 y WO 2013/071068. Un anticuerpo monoclonal completamente humano, ulocuplumab (designado F7 en el documento WO 2008/060367 y también anteriormente designado BMS-936564 o MDX-1338, usándose las cuatro designaciones indistintamente en el presente documento), presentó propiedades antitumorales inesperadamente ventajosas en estudios preclínicos tanto con tumores sólidos como con cánceres hemáticos. Ulocuplumab también se está sometiendo actualmente a estudios clínicos de Fase I

40

45

en pacientes con neoplasias recidivantes/refractarias de células B (NCT01120457; véase el sitio web de ensayos clínicos, <http://www.clinicaltrials.gov>).

### Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 expresado sobre la superficie de una célula de MW para su uso en el tratamiento de macroglobulinemia de Waldenström asociada a *C1013G/CXCR4* en un sujeto. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano y el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se une a un receptor CXCR4 humano expresado sobre una superficie celular, preferentemente un CXCR4 humano que porta la mutación *C1013G*. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o una porción de unión a antígeno del mismo.

15 La presente divulgación también proporciona un método para el tratamiento de un sujeto afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4*, comprendiendo dicho método: (a) seleccionar un sujeto que sea un candidato adecuado para el tratamiento, comprendiendo la selección: (i) proporcionar opcionalmente una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de MW en el sujeto; (ii) realizar un ensayo para determinar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (iii) seleccionar al sujeto como un candidato adecuado basándose en la determinación de que las células de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (b) administrar al sujeto seleccionado una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 expresado sobre la superficie de una célula de MW asociada a *C1013G/CXCR4*.

25 La divulgación proporciona adicionalmente un método para el tratamiento de un sujeto afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4*, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 expresado sobre la superficie de una célula de MW asociada a *C1013G/CXCR4*, habiéndose seleccionado el sujeto sobre la base de que se determina que las células de MW del sujeto portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*.

35 La invención también proporciona un método para seleccionar un paciente con MW para el tratamiento con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 expresado sobre la superficie de una célula de MW, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de MW en el paciente; (b) realizar un ensayo para determinar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (c) seleccionar al paciente para el tratamiento basado en la determinación de que las células de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*.

40 Además, la presente divulgación proporciona un método para determinar una pauta terapéutica que comprende un anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo para tratar la MW asociada a *C1013G/CXCR4* en un sujeto, comprendiendo dicho método: (a) proporcionar una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de MW en el sujeto; (b) realizar un ensayo para determinar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (c) determinar una pauta terapéutica que comprende un anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo basándose en la determinación de que las células de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*. En un aspecto, la divulgación también proporciona una pauta terapéutica para tratar a un paciente afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4*, determinándose dicha pauta mediante el presente método.

50 En determinadas realizaciones del uso médico de la invención y en cualquiera de los métodos anteriores, las células mutadas con *C1013G/CXCR4* en el paciente con MW pueden presentar resistencia a agentes anti-MW utilizados convencionalmente, incluyendo inhibidores de la diana de mamífero de la rapamicina (mTOR), de la tirosina cinasa de Bruton (BTK) y/o de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). En determinados casos preferidos, las células mutadas con *C1013G/CXCR4* son resistentes al inhibidor de BTK, ibrutinib (IMBRUVICA®). En consecuencia, en determinados casos, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo a un sujeto afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4* después de que el sujeto haya fracasado en el tratamiento con un inhibidor de mTOR, BTK y/o PI3K, preferentemente después del fracaso del tratamiento con ibrutinib. En otros casos, el sujeto se trata con una combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de mTOR, BTK o PI3K. En determinados casos preferidos, el sujeto se trata con una combinación del anticuerpo anti-CXCR4, ulocuplumab y una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de BTK, ibrutinib.

65 En determinadas realizaciones del uso médico de la invención y en cualquiera de los métodos anteriores, el anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo puede comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se establece en la SEQ ID NO: 25 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se establece en la SEQ ID NO: 29.

En otros casos, el anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se expone en la SEQ ID NO: 25 y una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se establece en la SEQ ID NO: 29.

En casos adicionales, el anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9, una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO:13, una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17 y una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 21. Preferentemente, el anticuerpo es ulocuplumab.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para su uso en el tratamiento de la MW asociada a *C1013G/CXCR4* en un sujeto, comprendiendo el kit: (a) una dosis de un anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo; e (b) instrucciones para usar el anticuerpo anti-CXCR4 en cualquiera de los métodos anteriores. Los anticuerpos anti-CXCR4 de ejemplo para su uso en el kit incluyen anticuerpos monoclonales humanos F7 (ulocuplumab), F9 y D1, descritos en el documento WO 2008/060367. En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CXCR4 en el kit es ulocuplumab.

Otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos, que no deben considerarse limitantes.

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de la región variable de la cadena pesada (A) del anticuerpo monoclonal humano F7 (ulocuplumab). Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 5) y CDR3 (SEQ ID NO: 9) de cadena pesada se delinean y se indican las derivaciones de la estirpe germinal V, D y J. También se muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 37) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) de la región variable de la cadena ligera (B) de F7. Las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 17) y CDR3 (SEQ ID NO: 21) de cadena ligera se delinean y se indican las derivaciones de la estirpe germinal V y J.

La Figura 2 muestra la identificación de la variante somática *C1013G/CXCR4* en pacientes con MW. Las muestras de MW primaria que albergan la variante *C1013G/CXCR4* presentan una mayor expresión de superficie de CXCR4 en comparación con muestras de MW primaria de tipo silvestre (WT, del inglés *wild-tipe*), como se demuestra por citometría de flujo en células de MW derivadas de MO CD191.

La Figura 3 muestra la eficiencia de la sobreexpresión de CXCR4 en células de MW. Se infectaron células BCMW.1 con LentiORF/CXCR4/GFP (CXCR4<sup>+</sup>) de precisión o con un control de vector vacío/RFP. Los niveles de expresión de CXCR4 humano se evaluaron mediante qRT-PCR, usando el método  $\Delta\Delta Ct$ , con normalización a GAPDH. P indica el valor de P.

La Figura 4 muestra la capacidad potenciada de las células de MW que sobreexpresan CXCR4 para diseminarse *in vivo*. Las células BCMW.1 se infectaron con LentiORF/CXCR4/GFP de precisión (CXCR4<sup>+</sup>) o un vector vacío/RFP (control) y se inyectaron por vía intravenosa en ratones SCID/Bg (n = 5/grupo). Después de 3 semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los órganos. La tinción inmunohistoquímica con hematoxilina-eosina para CD20 humano y CXCR4 humano se realizó en MO de fémur (A), hígado (B) y riñón (C). La cuantificación de la tinción de CD20 y CXCR4 se realizó mostrando un mayor número de células CXCR4/CD20<sup>+</sup> en ratones inyectados con células CXCR4<sup>+</sup> en comparación con los ratones inyectados con células de control. P indica el valor de P. (D) Los ratones se sacrificaron y se recogió suero en la tercera semana y se sometieron a ensayo los niveles de IgM humana mediante ELISA. (E) La detección del nivel de CXCR4 humano se realizó mediante qRT-PCR (método  $\Delta\Delta Ct$ ) en células aisladas *ex vivo* de MO de fémur. Los ratones no inyectados (n = 3) y los ratones inyectados con células de control agrupados (n = 4) se usaron como controles. P indica el valor de P. Las barras indican la desviación típica.

La Figura 5 muestra que la sobreexpresión de CXCR4 en células de MW conduce a una supervivencia reducida y a propiedades de adhesión y crecimiento potenciadas *in vitro*. Las células que sobreexpresan CXCR4 (CXCR4<sup>+</sup>) presentaron una capacidad más agresiva para diseminarse a la MO (A), el hígado (B) y los riñones (C) en comparación con las células infectadas con vectores vacíos relacionadas (Hematoxilina Eosina X10, tinción de anticuerpos X20 y X10, aumentos). La cuantificación de la tinción de CD20 y CXCR4 humanos se muestra en la Figura 4. (D) Curva de Kaplan-Meier que muestra una disminución de la supervivencia en ratones inyectados con células CXCR4<sup>+</sup> frente a ratones inyectados con células con vectores vacíos (n = 7/grupo). P indica el valor de P (ensayo de intervalo logarítmico). (E, F) La sobreexpresión de CXCR4 condujo a una mayor adhesión de las células de MW a las células del estroma mesenquimatoso de la médula ósea primaria (BM-MS) y a una mayor proliferación celular en comparación con las células de MW silenciadas por CXCR4 (CXCR4-K.D.) en las que se

observaron una adhesión reducida a BM-MSC y una proliferación celular reducida. Las barras indican la desviación típica. DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol; NS, no significativo.

La Figura 6 muestra la eficiencia de la inactivación de CXCR4 en células de MW infectadas. Las células BCMW.1 se infectaron con CXCR4-shRNA/GFP (CXCR4 K.D.) o con la sonda aleatorizada/GFP como control. Los niveles de expresión de CXCR4 humano se evaluaron mediante qRT-PCR, usando el método  $\Delta\Delta Ct$ , con normalización a GAPDH. P indica el valor de P.

La Figura 7 muestra el efecto de la pérdida y ganancia de función de CXCR4 sobre las propiedades de adhesión a células MW. Las células BCMW.1 se infectaron de forma estable con LentiORF/CXCR4 (CXCR4<sup>+</sup>) (A) o ARNhc de CXCR4 (CXCR4 K.D.) (B) y las sondas aleatorizadas respectivas. La adhesión se sometió a ensayo usando BSA- (control negativo), poli-D-lisina- (control positivo) y pocillos recubiertos con fibronectina. Las barras indican la desviación típica.

La Figura 8 muestra la eficiencia de la mutagénesis inducida en células de MW infectadas y la falta de afectación cerebral en ratones inyectados con células de MW mutadas con C1013G/CXCR4. Se aislaron ADN genómico (ADNg; A) y ADNc (B) de células BCMW.1 infectadas. Se usaron células infectadas con vector vacío/de control como control (células de control). La detección del alelo C1013G se evaluó usando PCR específica de alelo. P indica el valor de P. Las barras indican la desviación típica. (C) La detección de la mutación C1013G se evaluó usando secuenciación de Sanger. (D) Se inyectaron ratones SCID/Bg por vía intravenosa con células BCMW.1 que albergan la mutación C1013G/CXCR4 o con células de control. (E) La tinción inmunohistoquímica con hematoxilina-eosina (H.E.) para CD20 humano y CXCR4 humano se realizó en el cerebro, mostrando la ausencia de infiltración de células tumorales. (Se proporcionan aumentos 4X).

La Figura 9 muestra el efecto de la mutación CXCR4/C1013G sobre la diseminación y supervivencia de células de MW *in vivo*. Las células de MW que albergan la variante C1013G/CXCR4 presentan cambios a nivel de ARNm, junto con una mayor adhesión celular y proliferación celular. Los ratones SCID/Bg inyectados por vía intravenosa con células de MW que albergan la variante C1013G/CXCR4 presentaron una afectación significativa de (A) MO, (B) ganglios linfáticos, (C) hígado, (D) pulmón y (E) riñones (aumentos X4, X10 y 20X). La cuantificación de la tinción de CD20 y CXCR4 humanos se muestra en la Figura 10. (F) Una curva de Kaplan-Meier muestra una disminución de la supervivencia en ratones inyectados con células C1013G/CXCR4 (gráfico de la izquierda) frente a ratones inyectados con células de vector de control (gráfico de la derecha) (n = 7/grupo). La muerte para ratones inyectados con células de vector de control se observó en los días 37, 48 y 62. P indica el valor de P (ensayo de intervalo logarítmico).

La Figura 10 muestra la cuantificación de la expresión de CD20 y CXCR4 humanos en tejidos recogidos de ratones inyectados con células de MW mutadas con C1013G/CXCR4. Los ratones SCID/Bg se inyectaron por vía intravenosa con células BCMW.1 que albergan la variante C1013G/CXCR4 o células infectadas con vectores vacíos/de control (células de control). Después de 3 semanas, se sacrificaron los ratones y se recogieron los órganos. Se realizó una tinción inmunohistoquímica con hematoxilina-eosina para CD20 humano y CXCR4 humano en MO de fémur, ganglios linfáticos, hígado, pulmón y riñón (Nikon, Melville, NY). Se realizó una cuantificación de la tinción de CD20 y CXCR4 (software NIS Elements, Nikon, Melville, NY). P indica los valores de P. Se usó un ensayo T para analizar el fémur, hígado, riñón y pulmón, y se usó un ensayo Anova para analizar los ganglios linfáticos.

La Figura 11 muestra el efecto de la mutación CXCR4/C1013G sobre la adhesión y proliferación de células de MW *in vivo*. En ratones SCID/Bg inyectados por vía intravenosa con células C1013G/CXCR4-WM, la variante C1013G/CXCR4 aumentó la adhesión (A) y la proliferación (B) de células de MW solas o en el contexto de BM-MSC. (C, D) La variante C1013G/CXCR4 aumentó la adhesión y la proliferación de células de MWCL1 solas o en el contexto de BM-MSC. Se usaron células infectadas con vector vacío/de control como control. Las barras indican la desviación típica. P indica los valores de P.

La Figura 12 muestra que las células mutadas con C1013G/CXCR4 difieren de las células de control a nivel genético. (A) Gráficos de enriquecimiento por análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA, por sus siglas en inglés) de genes de invasividad tumoral, proliferación celular, antiapoptosis y distintivo oncogénico en células mutadas con C1013G/CXCR4 frente a células infectadas con vector de control (células de control). Las curvas trazadas muestran la puntuación de enriquecimiento y reflejan el grado en que cada gen (líneas verticales) está representado en la parte superior o inferior de la lista de genes clasificados. El mapa de calor indica la abundancia relativa (de izquierda a derecha) de los genes enriquecidos específicamente en las células mutadas y en comparación con las células de control. Todos los conjuntos de genes se enriquecieron en células mutadas con C1013G/CXCR4, con una tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés) siempre < 0,25. La puntuación de enriquecimiento normalizada (NES, por sus siglas en inglés) y FDR se muestran por cada conjunto de genes analizado. (C) Gráfico de enriquecimiento por GSEA para los genes regulados positivamente enumerados en la Tabla 3, en células mutadas con C1013G/CXCR4 frente a células infectadas con vector de control (células de control). Los mismos genes se enriquecieron en células mutadas en comparación con las células de control.

La Figura 13 muestra que las células de MW que albergan la variante somática C1013G/CXCR4 presentan resistencia a fármacos. (A) Gráficos de enriquecimiento por GSEA de resistencia a múltiples fármacos y respuesta a genes de distintivo de fármaco en células mutadas con C1013G/CXCR4 y células infectadas con vector de control (células de control), respectivamente. Las curvas trazadas muestran la puntuación de enriquecimiento y reflejan el grado en que cada gen (líneas verticales) está representado en la parte superior o inferior de la lista de genes clasificados. El mapa de calor indica la abundancia relativa (de izquierda a derecha) de los genes enriquecidos específicamente en las células mutadas en comparación con las células de control. Los conjuntos de genes se

consideraron enriquecidos con una FDR siempre  $< 0,25$ . La puntuación de enriquecimiento normalizada (NES, por sus siglas en inglés) y FDR se muestran por cada conjunto de genes analizado. Las estirpes celulares (B-F) *C1013G/CXCR4-WM* (BCMw1; MWCL1) o las células infectadas con vector de control (control) se expusieron a everolimus, ibrutinib, idelalisib, bortezomib y carfilzomib durante 48 h. La citotoxicidad se determinó mediante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

La Figura 14 muestra el efecto de BMS-936564 sobre la migración de células de MW *in vitro*. Se sometieron a ensayo estirpes celulares de MW (BCMw.1; MWCL.1) para determinar sus propiedades migratorias usando un ensayo de migración transpocillo. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de BMS-936564 y se determinó la migración después de 5 h. El ensayo de migración transpocillo se realizó en presencia de BM-MSc de MW primaria (A) o en presencia de SDF-1 $\alpha$  (B). En ambos casos, se observó la inhibición dependiente de BMS-936564 de la migración de células de MW.

La Figura 15 muestra el efecto de BMS-936564 sobre la adhesión y la proliferación de células de MW *in vitro*. (A) Se trataron estirpes celulares de MW con BMS-936564 durante 4 h y posteriormente se sometieron a ensayo para determinar su adhesión a BM-MSc de MW primaria. La evaluación de la adhesión después de 2 h mostró inhibición dependiente de BMS-936564 de la adhesión de células de MW. Se cultivaron estirpes celulares (B, C) de MW (BCMw.1; MWCL.1) con medios de control y con BMS-936564 durante 48 h en presencia o ausencia de MOMSC de MW primaria. La proliferación celular se evaluó usando un ensayo de captación de [ $^3$ H]-timidina. Las barras indican desviaciones típicas. P indica el valor de P. Todos los datos representan la media ( $\pm$  dt) de los experimentos por triplicado. El antagonista de CXCR4, AMD3110 (Sigma-Aldrich, San Louis, MO), se usó como control.

La Figura 16 muestra el efecto de BMS-936564 sobre la señalización de células de MW. Las células BCMw.1 se expusieron a BMS-936564 durante 6 h en presencia o ausencia de BM-MSc de MW primaria. Las células BCMw.1 después se cosecharon y los lisados celulares se sometieron a análisis por transferencia Western usando anticuerpos anti-fosfo(p)-ERK1/2, anti-ERK1/2, anti-p-Akt, anti-Akt, anti-p-Src y anti-Src. Se usaron células BCMw.1 cultivadas en ausencia de BM-MSc de MW como control. Las barras indican la desviación típica.

La Figura 17 muestra que el anticuerpo de control no afectó a la adhesión (A) o la migración (B) de las estirpes celulares de MW *in vitro*.

La Figura 18 muestra el efecto de BMS-936564 sobre proteínas relacionadas con la apoptosis en células de MW. Se expusieron células BCMw.1 a BMS-936564 durante 14 h. Los lisados de células enteras después se cosecharon y se sometieron a análisis por transferencia Western usando anticuerpos anti-caspasa-9, anti-PARP, anti-p- $\beta$  catenina, anti- $\beta$ -catenina, anti-p-GSK3 $\beta$  y anti-tubulina.

La Figura 19 muestra que BMS-936564 se dirige a células mutadas con *C1013G/CXCR4* en células de MW *in vivo*. BMS-936564 (A-E) inhibió la diseminación de células de MW mutadas con *C1013G/CXCR4* *in vivo*. La tinción de CD20 y CXCR4 humanos se redujo significativamente en tejidos explantados de ratones tratados con BMS-936564 en comparación con los ratones tratados con control de isotipo (sin tratar). P indica los valores de P.

La Figura 20 muestra imágenes histoquímicas representativas del efecto de BMS-936564 sobre células mutadas con *C1013G/CXCR4* en células de MW *in vivo*. Los ratones SCID/Bg se inyectaron por vía intravenosa con células BCMw.1 que albergan la variante *C1013G/CXCR4* o células infectadas con vectores vacíos/de control (células de control). Los ratones se trataron con BMS-936564 o con anticuerpo de control (10 mg/kg, por vía intraperitoneal; x3/4/semana; ratones: 5/grupo). Después de 3 semanas, se sacrificaron los ratones y se recogieron los órganos. Se realizó una tinción inmunohistoquímica con hematoxilina-eosina para CD20 y CXCR4 humanos en MO de fémur (A), hígado (B), riñón (C), pulmón (D) y ganglios linfáticos (E) (Nikon, Melville, NY; se muestran aumentos 4X, 10X o 20X).

La Figura 21 muestra que BMS-936564 se refiere a células mutadas con *C1013G/CXCR4* en células de MW en el contexto de la MO. Se sometieron a ensayo células BCMw.1 infectadas con *C1013G/CXCR4* para determinar sus propiedades migratorias usando un ensayo de migración transpocillo. Las células se expusieron a concentraciones crecientes de BMS-936564 y se determinó la migración después de 5 h. El ensayo de migración de transpocillo se realizó en presencia de BM-MSc de MW primaria (A) o SDF-1 $\alpha$  (B). En ambos casos, se observó la inhibición dependiente de BMS-936564 de la migración de células de MW. (C) Se trataron células BCMw.1 infectadas por *C1013G/CXCR4* con BMS-936564/ durante 4 h y posteriormente se sometieron a ensayo para determinar la adhesión a BM-MSc de MW primaria. La evaluación de la adhesión después de 2 h mostró inhibición dependiente de BMS-936564 de la adhesión de células de MW. (D) Se cultivaron células BCMw.1 infectadas con *C1013G/CXCR4* con medios de control y con BMS-936564 durante 48 h en presencia o ausencia de BM-MSc de MW primaria. La proliferación celular se evaluó usando el ensayo de captación de [ $^3$ H]-timidina. Las barras indican desviaciones típicas. P indica el valor de P. Todos los datos representan la media ( $\pm$  dt) de los experimentos por triplicado. Las barras indican la desviación típica.

La Figura 22 muestra el efecto de BMS-936564 sobre proteínas de señal relacionadas con la supervivencia y la apoptosis en células *C1013G/CXCR4-WM*. Se cultivaron células mutadas con *C1013G/CXCR4* en presencia o ausencia de BMS-936564 durante 6 h, mostrando inhibición de fosfo(p)-ERK, ERK, p-Akt, Akt, p-Src. De forma similar, se expusieron células al compuesto durante 14 h y se observó la inducción de vías relacionadas con la apoptosis (p-GSK3 $\beta$ , p- $\beta$ -catenina, PARP y Caspasa-9).

La Figura 23 muestra que BMS-936564 inhibe la localización de MW *in vivo* y potencia sinérgicamente la quimiosensibilidad de la MW al bortezomib *in vivo* e *in vitro*. Se inyectaron células BCMw.1-mCherry+ (A, B) por vía intravenosa en ratones SID/Bg. Se trataron ratones con anticuerpo de control o BMS-936564 (10 mg/kg, por vía intraperitoneal; x3/4/semana); bortezomib (0,5 mg/kg, por vía intraperitoneal x2/semana); o BMS-936564 + bortezomib (las mismas dosis que antes, x2/semana). Se recogieron células de MO al final del estudio y se evaluaron usando un lector de placa de fluorescencia. El control se entiende como el número de células mCherry+

identificadas a partir de la MO de los ratones tratados con anticuerpo de control. Se recogió suero al final del estudio. La secreción de IgM sérica se evaluó usando un kit ELISA de IgM humana. Se expusieron estirpes celulares de MW (C, D) (BWM.1; MWCL.1) a BMS-936564 o a bortezumib, utilizados solos o en una pauta combinatoria, durante 48 h. La toxicidad celular se realizó por MTT. Se evaluó la sinergia mediante el uso del software Calcsyn: isoblograma, se muestran índices de combinación (I.C.) y fracciones afectadas (F.A.) de la combinación de BMS-936564 y bortezumib. Las barras indican la desviación típica.

### Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a métodos de uso de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular para modular la actividad de CXCR4 en, o tratar de otra forma, a pacientes afectados con macroglobulinemia de Waldenström. Estos métodos son particularmente aplicables a pacientes con MW que portan una mutación C1013G activadora en el gen CXCR4. En determinadas realizaciones del uso médico de acuerdo con la invención, el tratamiento comprende administrar el anticuerpo anti-CXCR4 como monoterapia o como parte de una terapia de combinación (por ejemplo, en combinación con un inhibidor de mTOR, BTK y/o PI3K) como primera línea de tratamiento ("frontal"), por ejemplo, el tratamiento inicial o el primer tratamiento. En otras realizaciones, el tratamiento comprende administrar el anticuerpo anti-CXCR4 como una terapia de segunda o tercera línea, por ejemplo, después del tratamiento inicial con la misma o una o más terapias diferentes, incluso después de una recaída y/o cuando el primer tratamiento ha fallado. Por tanto, en determinadas realizaciones, el tratamiento comprende administrar el anticuerpo anti-CXCR4 después del fracaso del tratamiento con otro agente anti-MW, por ejemplo, un inhibidor de mTOR, BTK y/o PI3K.

### Definiciones

Para que la presente divulgación pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar determinados términos. Como se usa en la presente solicitud, excepto que se indique expresamente lo contrario en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado que se establece a continuación. Se establecen definiciones adicionales en toda la solicitud.

"Administrar" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico en un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de entrega conocidos por los expertos en la materia. Las vías de administración preferidas para anticuerpos para el uso de acuerdo con la invención incluyen vías de administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica. La administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Un "anticuerpo" (Ab) incluirá, sin limitación, una inmunoglobulina de glicoproteína 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 la cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$ ) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como  $V_L$ ) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el 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 interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Los anticuerpos normalmente se unen específicamente a su antígeno homólogo con alta afinidad, reflejado por una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  a  $10^{-11}$  M<sup>-1</sup> o menos. Generalmente se considera que cualquier  $K_D$  superior a aproximadamente  $10^{-4}$  M<sup>-1</sup> indica unión inespecífica. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y a antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa que tiene una  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, preferentemente aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, más preferentemente aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, incluso más preferentemente aproximadamente  $5 \times 10^{-10}$  M o menos y mucho más preferentemente entre aproximadamente  $10^{-9}$  M y aproximadamente  $10^{-11}$  M o menos, pero no se unen con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es "sustancialmente idéntico" a un antígeno dado si presenta un alto grado de identidad de secuencia con el antígeno dado, por ejemplo, si presenta al menos el 80 %, al menos el 90 %, preferentemente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 97 % o incluso más preferentemente al menos el 99 % identidad de secuencia con la secuencia del antígeno dado. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a CXCR4 humano también puede tener reactividad cruzada con antígenos CXCR4 de determinadas especies de primates, pero no puede

reaccionar de forma cruzada con antígenos CXCR4 de determinadas especies de roedores o con un antígeno distinto de CXCR4, por ejemplo, un antígeno de PD-1 humano.

5 La inmunoglobulina puede derivar de cualquiera de los isotipos habitualmente conocidos, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. "Isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. "Anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, anticuerpos tanto naturales como no naturales; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos o no humanos; anticuerpos totalmente sintéticos; y anticuerpos monocatenarios. Un anticuerpo no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre.

15 Cuando no se indique expresamente, y a menos que el contexto indique lo contrario, el término "anticuerpo" también incluye una porción de unión a antígeno de cualquiera de las inmunoglobulinas mencionadas anteriormente. Una "porción de unión a antígeno" o un "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno unido por el anticuerpo completo. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un Fab, F(ab')<sub>2</sub> Fd, Fv y un fragmento variable monocatenario (scFv), un scFv divalente o bivalente, un diacuerpo u otro multímero de anticuerpos (por ejemplo, un triacuerpo trivalente o un tetracuerpo tetravalente), un minicuerpo e incluso una CDR aislada, que pueden presentar una función de unión a antígeno. Todos los fragmentos de anticuerpos proteolíticos y modificados por ingeniería genética anteriores y variantes relacionadas (véase Hollinger *et al.*, 2005; Olafsen *et al.*, 2010, para más detalles) se incluyen dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo.

25 La expresión "anticuerpo monoclonal" ("mAb") se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única, es decir, moléculas de anticuerpo cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas y que presentan una especificidad y afinidad de unión únicas para un epítipo particular. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante las técnicas del hibridoma, recombinantes, transgénicas u otras conocidas por los expertos en la materia.

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

45 Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayor parte o la totalidad de los aminoácidos fuera de los dominios CDR de un anticuerpo no humano se reemplazan con los aminoácidos correspondientes derivados de inmunoglobulinas humanas. En una forma humanizada de un anticuerpo, algunos, la mayor parte o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR pueden reemplazarse con aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayor parte o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR no cambian. Se permiten pequeñas adiciones, supresiones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno particular. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

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

55 Un "cáncer" se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anormales en el cuerpo. La división y el crecimiento celulares no regulados dan como resultado la formación de tumores malignos que invaden los tejidos vecinos y también pueden hacer metástasis a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. Los cánceres incluyen tumores sólidos y neoplasias hemáticas.

60 Un tumor sólido es una neoplasia (nuevo crecimiento de células) o lesión (daño de las estructuras anatómicas o alteración de las funciones fisiológicas) formada por un crecimiento anormal de células de tejido corporal distinto de la sangre, la MO o las células linfáticas. Consiste en una masa anormal de células, que pueden provenir de diferentes tipos de tejidos, tales como hígado, colon, mama o pulmón y que inicialmente crece en el órgano de su origen celular. Sin embargo, un tumor sólido puede extenderse a otros órganos a través del crecimiento tumoral metastásico en etapas avanzadas de la enfermedad.

65

Una neoplasia maligna hemática es un tipo de cáncer que afecta a la sangre, la MO, el bazo y/o los ganglios linfáticos, e incluye linfomas, leucemias, mielomas y neoplasias linfoides. Las neoplasias hemáticas pueden derivar de cualquiera de los dos linajes de células sanguíneas principales, es decir, estirpes celulares mieloides y linfoides. La estirpe celular mieloide normalmente produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos, mientras que la estirpe celular linfoide produce células B, linfocitos T, linfocitos NK y células plasmáticas. Los linfomas (por ejemplo, el linfoma de Hodgkin), las leucemias linfocíticas y el mieloma derivan de la estirpe linfoide, mientras que la leucemia mielógena aguda y crónica (LMA, LMC), los síndromes mielodisplásicos y las enfermedades mieloproliferativas son de origen mieloide. La macroglobulinemia de Waldenström (MW) es un ejemplo de un linfoma de células B y se muestra en el presente documento que es susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-CXCR4.

El término "CXCR4" ("receptor de quimiocina C-X-C 4") incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para CXCR4 pueden reaccionar de forma cruzada, en determinados casos, con CXCR4 de especies distintas de la humana. En otras realizaciones, los anticuerpos específicos para CXCR4 humano pueden ser completamente específicos para CXCR4 humano y pueden no presentar especies u otros tipos de reactividad cruzada. La expresión "CXCR4 humano" se refiere a la secuencia humana de CXCR4, tal como la secuencia de aminoácidos completa de CXCR4 humano que tiene el número de acceso de GENBANK® P61073 (SEQ ID NO: 51). El CXCR4 también se conoce en la técnica como, por ejemplo, LESTR, Fusina o CD184. La secuencia de CXCR4 humano puede diferir de CXCR4 humano de la SEQ ID NO: 51 por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y el CXCR4 tiene sustancialmente la misma función biológica que el CXCR4 humano de la SEQ ID NO: 51.

Un "cáncer que expresa CXCR4" o "cáncer CXCR4+" es un cáncer en el que las células malignas que caracterizan este cáncer expresan CXCR4 sobre la superficie celular, preferentemente que expresa un alto nivel de CXCR4. Se desvela en el presente documento que una mutación C1013G en el gen CXCR4, que anteriormente se ha asociado al síndrome WHIM, está presente en el 28 % de los pacientes con MW pero está ausente o presente solo en el 7 % de otros linfomas de células B. La MW asociada a C1013G/CXCR4 se refiere a la MW en la que está presente la mutación C1013G.

Un "sujeto" incluye un ser humano o cualquier animal no humano, tal como un primate no humano (por ejemplo, un mono), perro, conejo, roedor o pollo. En realizaciones preferidas, el sujeto es un paciente con cáncer humano tal como un paciente con MW. Los términos "sujeto", "paciente" e "individuo" se usan indistintamente en el presente documento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico, tal como un anticuerpo anti-CXCR4, es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o la discapacidad debidos a la enfermedad. Una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de un fármaco incluye una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "dosis 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 o de padecer una reaparición de la enfermedad, inhibe el desarrollo o la reaparición de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico para promover la regresión de la enfermedad puede evaluarse usando diversos métodos conocidos por el profesional experto, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas modelo en animales que predicen la eficacia en seres humanos o mediante el ensayo de la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

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 del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órganos y/o de organismo (efectos adversos) resultantes de la administración del fármaco.

"Tratamiento" o "terapia" de un sujeto se refieren a cualquier tipo de intervención o proceso realizado o a la administración de un agente activo al sujeto con el objetivo de revertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir el inicio, la progresión, el desarrollo, la gravedad o la reaparición de un síntoma, complicación, afección o indicio bioquímico asociados a una enfermedad.

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

El término "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" se refiere a un valor o composición que está dentro de un intervalo de error aceptable para el valor o composición particular según se determine por un experto habitual en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o se determina el valor o la composición, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" pueden significar dentro de 1 o dentro de más de 1 desviación típica para la puesta en práctica de la técnica. Como alternativa, "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" pueden significar un intervalo de más o menos el 20 %, más por lo general un intervalo de más o menos el 10 %.

Asimismo, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, los términos pueden significar hasta un orden de magnitud o hasta 5 veces un valor. Cuando se proporcionan valores o composiciones particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique otra cosa, el significado de "aproximadamente", "esencialmente" o "que comprende esencialmente" debería suponerse que está dentro de un intervalo de error aceptable para ese valor o composición particular.

Como se describe en el presente documento, cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación 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 lo contrario.

Diversos aspectos de la divulgación se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

#### *Anticuerpos terapéuticos anti-CXCR4*

La producción de anticuerpos anti-CXCR4 de ejemplo para el uso médico de acuerdo con la invención, incluyendo los anticuerpos monoclonales humanos F7 (ulocuplumab; BMS-936564; MDX-1338), F9, D1 y E2, se describe en detalle en el documento WO 2008/060367. También se describen métodos de uso de estos anticuerpos para tratar neoplasias hemáticas en los documentos WO 2008/060367 y WO 2013/071068. Los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados o, preferentemente, completamente humanos, y se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares. Por ejemplo, los anticuerpos se unen al CXCR4 humano nativo expresado sobre una superficie celular. Preferentemente, un anticuerpo de la presente divulgación se une a CXCR4 con alta afinidad, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos. Los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación presentan preferentemente una o más de las siguientes características que son deseables para aplicaciones terapéuticas:

- (a) unión a CXCR4 humano expresado sobre 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 las células endoteliales de la vena umbilical humana;
- (f) unión a CXCR4 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos;
- (g) inducción de la apoptosis en células que expresan CXCR4;
- (h) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> *in vitro*;
- (i) inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> y/o inducción de la apoptosis de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> *in vivo*;
- (j) inhibición de la metástasis de células tumorales CXCR4<sup>+</sup>; y
- (k) aumento del tiempo de supervivencia de un sujeto que es portador de un tumor CXCR4<sup>+</sup>.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación se unen a CXCR4 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, inducen la apoptosis en células que expresan CXCR4 y presentan al menos cinco de las otras propiedades enumeradas anteriormente. En realizaciones más preferidas, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación presentan todas las propiedades enumeradas anteriormente.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CXCR4 para el uso médico de acuerdo con la invención se une a CXCR4 humano con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a CXCR4 humano con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-8}$  M o menos,  $5 \times 10^{-9}$  M o menos,  $4 \times 10^{-9}$  M o menos,  $3 \times 10^{-9}$  M o menos o  $2 \times 10^{-9}$  M o menos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CXCR4 es ulocuplumab (BMS-936564).

En un aspecto, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación comprenden los CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y de cadena ligera de F7, F9, D1 o E2, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de los CDR1 de  $V_H$  de F7, F9, D1 y E2 se muestran en las SEQ ID NO. 1-4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los CDR2 de  $V_H$  de F7, F9, D1 y E2 se muestran en las SEQ ID NO. 5-8, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los CDR3 de  $V_H$  de F7, F9, D1 y E2 se muestran en las SEQ ID NO. 9-12, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los CDR1 de  $V_k$  de F7, F9, D1 y E2 se muestran en las SEQ ID NO. 13-16, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los CDR2 de  $V_k$  de F7, F9, D1 y E2 se muestran en las SEQ ID NO. 17-20, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los CDR3 de  $V_k$  de F7, F9, D1 y E2 se muestran en las SEQ ID NO. 21-24, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y 6 CDR del anticuerpo monoclonal humano F7 (ulocuplumab) también se muestran en la Figura 1. Las regiones CDR identificadas a lo largo de la presente divulgación se delinearón usando el sistema Kabat (Kabat *et al*, 1991).

En otro aspecto, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación comprenden:

- (a) los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 25 o 41 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena



17 y una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 21.

5 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F7 se muestran en la Figura 1A y en las SEQ ID NO. 33 y 25, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de F7 se muestran en la Figura 1B y en las SEQ ID NO. 37 y 29, respectivamente. El análisis de la secuencia de V<sub>H</sub> de F7 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada que se muestra en la Figura 1A y en las SEQ ID NO: 1, 5 y 9, respectivamente, mientras que las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera se muestran en la Figura 1B y en las SEQ ID NO: 13, 17 y 21, respectivamente.

15 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F9 se muestran en las SEQ ID NO. 34 y 26, respectivamente y para la región variable de la cadena ligera F9 en las SEQ ID NO. 38 y 30, respectivamente. Las secuencias de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada de F9 se muestran en las SEQ ID NO. 2, 6 y 10, respectivamente y las secuencias de CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera de F9 se muestran en las SEQ ID NO. 14, 18 y 22, respectivamente.

20 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de D1 se muestran en las SEQ ID NO: 35 y 27, respectivamente y para la región variable de la cadena ligera D1 en las SEQ ID NO. 39 y 31, respectivamente. Las secuencias de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada de D1 se muestran en las SEQ ID NO. 3, 7 y 11, respectivamente y las secuencias de CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera de F9 se muestran en las SEQ ID NO. 15, 19 y 23, respectivamente.

25 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de E2 se muestran en las SEQ ID NO: 36 y 28, respectivamente y para la región variable de la cadena ligera E2 en las SEQ ID NO. 40 y 32, respectivamente. Las secuencias de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena pesada de E2 se muestran en las SEQ ID NO. 4, 8 y 12, respectivamente y las secuencias de CDR1, CDR2 y CD3 de la cadena ligera de F9 se muestran en las SEQ ID NO. 16, 20 y 24, respectivamente.

30 Adicionalmente, se crearon formas alternativas de F7, F9, D1 y E2, en las que determinados restos de región marco conservada se sustituyeron con un resto de estirpe germinal, y se denominan en el presente documento F7GL, F9GL, D1GL e E2GL. Las secuencias de aminoácidos de V<sub>H</sub> de F7GL, F9GL, D1GL y E2GL se muestran en las SEQ ID NO. 41, 42, 43 y 44, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de V<sub>L</sub> de F7GL, F9GL, D1GL y E2GL se muestran en las SEQ ID NO. 45, 46, 47 y 48, respectivamente.

35 En un aspecto, los anticuerpos anti-CXCR4 para el uso médico de acuerdo con la invención compiten de forma cruzada por unirse a CXCR4 con cualquiera de entre mAb F7 (ulocuplumab; que tiene secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que se muestran en las SEQ ID NO: 25 y 29, respectivamente), mAb F9 (que tiene secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que se muestran en las SEQ ID NO: 26 y 30, respectivamente), mAb D1 (que tiene secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que se muestran en las SEQ ID NO: 27 y 31, respectivamente) y mAb E2 (que tiene secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que se muestran en las SEQ ID NO: 28 y 32, respectivamente). Los anticuerpos que compiten de forma cruzada por la unión a CXCR4 se unen a la misma región epitópica (es decir, el mismo o un epítipo solapante) en CXCR4.

45 En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal anti-CXCR4 de competencia cruzada comprende una región V<sub>H</sub> que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen una secuencia derivada de una secuencia de estirpe germinal V<sub>H</sub> 3-48 humana como se establece en la SEQ ID NO: 49 y/o una región V<sub>L</sub> que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen una secuencia derivada de una secuencia de estirpe germinal V<sub>K</sub> L15 humana como se establece en la SEQ ID NO:50. Los anticuerpos que compiten entre sí pueden identificarse basándose en su capacidad de competir de forma cruzada con ulocuplumab (F7), F9, D1, E2 o cualquier otro anticuerpo anti-CXCR4 de referencia en un ensayo de unión a CXCR4 convencional, por ejemplo, citometría de flujo con células CEM, en la que el anticuerpo de referencia está marcado con FITC y se evalúa la capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión del anticuerpo de referencia marcado con FITC a células CEM.

#### 55 *Composiciones farmacéuticas*

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o una o más porciones de unión a antígeno de los mismos, de la presente divulgación, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos 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 vehículo es adecuado para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Una composición farmacéutica de la divulgación 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 de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o efectos adversos mínimos.

5 Para la administración de un anticuerpo humano anti-CXCR4, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/kg y más preferentemente de 0,1 a 10 mg/kg, del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,1, 0,3, 1, 3, 5 o 10 mg/kg de peso corporal y, más preferentemente, de 0,3, 1,3 o 10 mg/kg de peso corporal. El programa de dosificación normalmente se diseña para conseguir exposiciones que den como resultado una ocupación sostenida del receptor basada en las propiedades farmacocinéticas típicas de un anticuerpo. Una pauta de tratamiento de ejemplo implica la  
10 administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Considerando que un anticuerpo IgG4 tiene normalmente una semivida de 2-3 semanas, una pauta de dosificación preferida para un anticuerpo anti-CXCR4 de la divulgación comprende 0,3-20 mg/kg de peso corporal, preferentemente 1-10 mg/kg de peso corporal, a través de administración intravenosa, administrándose el anticuerpo cada 7 o 14 días en hasta 6 semanas, ciclos de  
15 8 semanas o 12 semanas hasta la respuesta completa o la enfermedad progresiva confirmada.

La dosificación y la programación pueden cambiar durante el curso del tratamiento. Por ejemplo, las pautas de dosificación para un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación incluyen 1, 3 o 10 mg/kg de peso corporal a través de administración intravenosa (IV), administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes programas de  
20 dosificación: (i) cada 7 días en ciclos de hasta 6 semanas; (ii) cada dos semanas durante hasta seis dosificaciones, después cada tres meses; (iii) cada tres semanas; (iv) 1-10 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada 2-3 semanas.

La mutación *C1013G/CXCR4*, que se encuentra en el 28 % de los pacientes con MW, desempeña un papel activador en las células de MW, como lo documenta la proliferación y la diseminación tumorales significativas a los órganos extramedulares, conduciendo a la progresión de la enfermedad y a la disminución de la supervivencia. La administración del anticuerpo anti-CXCR4, BMS-936564, condujo a una reducción significativa del tumor y a la anulación de la diseminación extramedular *in vivo*, en un modelo de MW *C1013G/CXCR4* (véanse los Ejemplos 6 y 7). En determinadas realizaciones del uso médico de acuerdo con la presente invención, el tratamiento se caracteriza porque el paciente afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4* se trata con una pauta terapéutica que comprende administrar un anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo al paciente a una dosis de al menos dos veces, al menos tres veces o al menos cinco veces, la dosis administrada en el tratamiento de un paciente con MW que porta el gen *CXCR4* de tipo silvestre, y/o una frecuencia al menos dos veces, al menos tres veces o al menos cinco veces superior a la frecuencia administrada en el tratamiento de un paciente con MW que porta el gen *CXCR4* de tipo silvestre.  
35

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleada o el éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el momento de la administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, el estado de salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Una composición de la presente divulgación puede administrarse a través de una o más vías de administración usando uno o más de diversos métodos bien conocidos en la técnica. Como apreciarán lo expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.  
40 45

#### 50 *Usos y métodos de la divulgación*

La presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto afectado con MW que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a un receptor CXCR4 y presenta determinadas propiedades funcionales que son deseables para su uso terapéutico.  
55

La presente divulgación también proporciona métodos para tratar a un sujeto afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4* que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CXCR4.

60 Se sabe que CXCR4 se expresa en una amplia diversidad de tipos de células tumorales, que está implicado en metástasis tumorales, la infección por VIH, afecciones inflamatorias y la angiogénesis o neovascularización (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/060367 y el documento WO 2013/071068). En consecuencia, los anticuerpos anti-CXCR4 que se desvelan en el presente documento pueden usarse en diversas situaciones clínicas, pero la presente divulgación se centra en el uso de estos anticuerpos para el tratamiento del cáncer y, en particular, la MW.  
65

#### *Papel de CXCR4 en el cáncer*

La sobreexpresión de CXCR4 también se ha demostrado en aproximadamente el 75 % de los cánceres y en determinadas situaciones se ha establecido una correlación inversa entre la expresión de CXCR4 y el pronóstico o la supervivencia del paciente. Los ejemplos no limitantes de tipos de cáncer asociados a la expresión de CXCR4 o la vía CXCR4/CXCL12 incluyen tumores sólidos como el cáncer de mama (Muller *et al.*, 2001), ovario (Scotton *et al.*, 2001), próstata (Taichman *et al.*, 2002), no microcítico de pulmón (Spano *et al.*, 2004), pancreático (Koshiba *et al.*, 2000), colorrectal (Zeelenberg *et al.*, 2003), de riñón (Schrader *et al.*, 2002) y tiroides (Hwang *et al.*, 2003), carcinoma nasofaríngeo (Wang *et al.*, 2005), melanoma (Scala *et al.*, 2005), carcinoma de células renales (Staller *et al.*, 2003), neuroblastoma (Geminder *et al.*, 2001), glioblastoma (Rempel *et al.*, 2000), 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 (LMA) (Mohle *et al.*, 1998; Rombouts *et al.*, 2004), el mieloma múltiple (MM) (Alsayed *et al.*, 2007; Azab *et al.*, 2009), la leucemia linfocítica crónica (Mohle *et al.*, 1999; Burger *et al.*, 1999), la leucemia mieloide crónica (Jin *et al.*, 2008), la MW (Ngo *et al.*, 2008) y el linfoma no Hodgkin (LNH) (Bertolini *et al.*, 2002; Weng *et al.*, 2003).

Adicionalmente, esta vía está implicada en la estimulación del proceso metastásico en múltiples neoplasias (Murphy, 2001). En estudios clínicos, CXCR4 se ha asociado a una mayor propensión a metástasis y a una disminución de la supervivencia y se ha identificado como un indicador pronóstico de LMA, carcinoma de mama, colorrectal, no microcítico de pulmón, de ovario y pancreático en los que se correlaciona una mayor expresión de CXCR4 con la gravedad de la enfermedad (Spoo *et al.*, 2007; Hiller *et al.*, 2011; Ottaiano *et al.*, 2006; Spano *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2006; Marechal *et al.*, 2009).

Las BM-MSC secretan CXCL12 (SDF-1) y la interacción con CXCR4 es esencial para localizar y mantener las células madre hematopoyéticas dentro del microambiente de la MO (Mohle *et al.*, 1998). Las células leucémicas expresan altos niveles de CXCR4 y la vía desempeña un papel crítico en la migración de células leucémicas hacia la MO que, a su vez, respalda su crecimiento y supervivencia. CXCR4 es esencial para la diseminación metastásica a órganos tales como MO donde se expresa CXCL12. En conjunto, CXCR4 desempeña un papel importante tanto en la localización como en la retención de células madre hematopoyéticas en la MO y un antagonista de CXCR4 moviliza las células madre en el torrente sanguíneo, como se demostró con el antagonista de CXCR4 de molécula pequeña, AMD3100 (plerixafor; Mozobil) que fue aprobado por la FDA para su uso en combinación con el factor estimulante de colonias de granulocitos para trasplantes autólogos en pacientes con LNH y MM (Dar *et al.*, 2011). Se demostró que otro inhibidor de CXCR4, AMD3465, antagoniza la quimiotaxis inducida por CXCL12 y estroma e inhibe la activación inducida por CXCL12 de las vías de señalización de supervivencia en células leucémicas (Zeng *et al.*, 2009). Además, se demostró que AMD3465, solo o en combinación con el factor estimulante de colonias de granulocitos, indujo la movilización de células de LMA y células progenitoras a la circulación y potenció los efectos antileucémicos de la quimioterapia y el sorafenib, dando como resultado una carga de leucemia notablemente reducida y una supervivencia prolongada de los animales (Zeng *et al.*, 2009). Dichos hallazgos sugieren que la interrupción de las interacciones CXCR4/CXCL12 puede usarse para sensibilizar las células leucémicas a la quimioterapia mediante el direccionamiento a su microambiente protector de la MO.

Como se describe en los documentos WO 2008/060367 y WO 2013/071068, se han desarrollado nuevos anticuerpos monoclonales terapéuticos humanos de primera clase dirigidos a CXCR4. Estos anticuerpos monoclonales se unen a células que expresan CXCR4 con baja afinidad nanomolar, bloquean la unión de CXCL12 a células que expresan CXCR4 e inhiben la migración inducida por CXCL12 y el flujo de calcio con valores bajos de CE<sub>50</sub> nanomolar. Debido a que CXCR4 desempeña un papel en múltiples aspectos fundamentales del cáncer, incluyendo la proliferación, la migración/invasión y la angiogénesis, un antagonista tiene medios potencialmente múltiples para intervenir en neoplasias donde se expresa CXCR4. De manera significativa, además de bloquear el flujo de calcio inducido por CXCL12 y la migración, el documento WO 2013/071068 enseña que la inducción de la apoptosis dependiente de anticuerpos de células tumorales que expresan CXCR4 es un mecanismo de acción de estos anticuerpos humanos anti-CXCR4. La apoptosis inducida por anticuerpos dio como resultado una eficacia *in vivo* robusta en múltiples modelos de xenoinjerto de tumor hematopoyético. Por el contrario, antagonistas de CXCR4 de molécula pequeña tales como AMD3100 aumentan la movilización de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> desde la MO y, de este modo, aumentan la quimiosensibilización, pero no destruyen directamente dichas células tumorales, lo que sugiere una mayor eficacia de los anticuerpos anti-CXCR4 en comparación con los antagonistas de CXCR4 de molécula pequeña en la destrucción de las células cancerosas.

#### *Macroglobulinemia de Waldenström*

La MW, también denominada linfoma linfoplasmocítico, es un subtipo indolente (de crecimiento lento) de linfoma no Hodgkin (LNH). La enfermedad se caracteriza por una proliferación clonal incontrolada de linfocitos B terminalmente diferenciados, es decir, glóbulos blancos formados en la MO y los ganglios linfáticos. Una característica única de la enfermedad es que las células B producen cantidades excesivas de una IgM monoclonal, lo que puede dar como resultado un espesamiento de la sangre conocido como hiperviscosidad. Esta proteína IgM puede conducir a muchos síntomas, incluyendo fatiga, pérdida de peso inexplicable, agrandamiento de los ganglios linfáticos o el bazo, insuficiencia renal, amiloidosis sistémica, debilidad y hemorragia inexplicable. La proliferación de células B también interfiere con la producción de glóbulos rojos, dando como resultado anemia.

La MW es una enfermedad rara, con solo aproximadamente 1.500 casos por año en los EE.UU. No existe un tratamiento único aceptado para la MW, pero las pautas terapéuticas que incluyen una combinación de agentes biológicos que estimulan el sistema inmunitario y la quimioterapia han proporcionado resultados prometedores (Treon, 2009). Algunos ejemplos de terapias combinadas utilizadas actualmente en el tratamiento de pacientes con MW incluyen BDR: bortezomib (VELCADE®), dexametasona y rituximab (RITUXAN®) (Treon *et al.*, 2009); RCD: ciclofosfamida (CYTOXAN®; NEOSAR®), dexametasona y rituximab.

(Dimopoulos *et al.*, 2007); R-CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina (ADRIAMYCIN®), vincristina (ONCOVIN®), prednisona y rituximab; CPR: ciclofosfamida, prednisona y rituximab; VR: bortezomib y rituximab; FR: fludarabina (FLUDARA®) y rituximab; y TR: talidomida (THALOMID®) y rituximab. Las tasas de respuesta objetivas son altas (> 80 %) pero las tasas de respuesta completa son bajas (0-15 %). Las terapias en investigación incluyen ibrutinib (IMBRUVICA®), un inhibidor selectivo de la tirosina cinasa de Bruton (BTK); alemtuzumab (CAMPATH®), que se refiere a CD52 sobre la superficie de las células de MW; ofatumumab (ARZERRA®), que se refiere a la molécula CD20 sobre la superficie de las células B, bendamustina (TREANDA®), que ataca el ADN de las células cancerosas e interrumpe el ciclo de división celular; el inhibidor de mTOR, everolimus (AFINITOR®, ZORTRESS®), que inhibe el crecimiento y la división celular; y carfilzomib (KYPROLIS™), un inhibidor selectivo del proteasoma. En los métodos para tratar la MW o la MW asociada a C1013G/CXCR4 que se desvelan en el presente documento, cualquiera de los agentes anteriores, o cualquier combinación de los mismos, puede usarse en combinación con un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación. Como alternativa, el anticuerpo anti-CXCR4 puede usarse después de la progresión del paciente con MW en cualquiera de estas terapias anti-MW que se usan o están en desarrollo, para tratar la MW.

#### *Papel de CXCR4 y la mutación C1013G/CXCR4 en la macroglobulinemia de Waldenström*

Se ha demostrado anteriormente que las células de MW expresan altos niveles de quimiocina y receptores de adhesión, incluyendo CXCR4 y VLA-4, y que CXCR4 es esencial para la migración inducida por CXCL12 y la migración trans-endothelial de células de MW (Ngo *et al.*, 2008). Se demostró que la inactivación de CXCR4 o el inhibidor de CXCR4, AMD3100, inhiben significativamente la migración de células de MW, así como su adhesión a fibronectina, células del estroma y células endoteliales. La disminución de la adhesión de las células de MW a las células del estroma inducida por AMD3100 condujo a una mayor sensibilidad de estas células a la citotoxicidad, es decir, la inhibición de la proliferación, por bortezomib. Se demostró adicionalmente que CXCR4 y VLA-4 interactúan directamente en respuesta a CXCL12. Por tanto, se ha demostrado que el eje CXCR4/CXCL12 interactúa con VLA-4 en la regulación de la migración y la adhesión de células de MW en el microambiente de la MO (Ngo *et al.*, 2008).

El examen de 418 pacientes con trastornos linfoproliferativos de células B como se describe en el presente documento (véase Ejemplo 1; Tabla 1) reveló que el 28 % de los pacientes con linfoma linfoplasmocítico (MW) de bajo grado presentan la variante C1013G/CXCR4. Por tanto, se realizaron estudios para diseccionar la relevancia funcional de la variante C1013G/CXCR4, para evaluar su posible papel en la mediación de la diseminación de células de MW y la progresión de la enfermedad usando modelos *in vivo*, y para identificar nuevos enfoques terapéuticos que pueden dirigirse a las células linfoplasmocíticas mutadas con C1013G/CXCR4. Estos estudios demostraron que CXCR4 desempeña un papel crucial respaldando la localización de células de MW a la MO, así como la diseminación de MW a órganos distantes, como se demuestra *in vivo* mediante el uso de estudios de ganancia de función de CXCR4 (Ejemplo 2). De manera importante, las células de MW que albergan la variante C1013G/CXCR4 ejercen un fenotipo similar en comparación con las células que sobreexpresan CXCR4 (Ejemplo 3), lo que sugiere que la variante C1013G/CXCR4 puede representar una mutación funcionalmente activa. Por otra parte, las células mutadas con C1013G/CXCR4 mostraron diseminación a los ganglios linfáticos, *in vivo*, en comparación con las células de control o las células de MW que sobreexpresan CXCR4 (Ejemplo 3), lo que indica que la variante C1013G/CXCR4 generada fue capaz de recapitular lo que se observó clínicamente en pacientes. En particular, las células mutadas con C1013G/CXCR4 fueron capaces de colonizar tejidos extramedulares, tales como pulmón y riñón *in vivo* (Ejemplo 3), lo que refleja el fenotipo observado en pacientes con MW extramedular, donde la variante se ha detectado en todos los casos de afectación de pulmón y riñón.

La variante C1013G/CXCR4 observada es una de las mutaciones descritas originariamente en el síndrome WHIM. Esta es una enfermedad rara, hereditaria, heterocigótica, autosómica dominante, caracterizada por una inmunidad que funciona de manera anormal. Es provocada por mutaciones de CXCR4, responsables del truncamiento de la conversación carboxi-terminal (cola C) del receptor que perjudica su tráfico intracelular, lo que conduce a una mayor capacidad de respuesta al ligando de quimiocinas y la retención de neutrófilos en la MO (Balabanian *et al.*, 2005; 2008; Hernández *et al.*, 2003; Taniuchi *et al.*, 2005). La evidencia reciente ha documentado la presencia de la mutación C1013G/CXCR4 similar a WHIM en pacientes con MW (Hunter *et al.*, 2014), pero las secuelas funcionales *in vivo* de esta mutación en la MW, y si la variante somática aparece en otros trastornos linfoproliferativos de células B donde CXCR4 media el tráfico y la diseminación de células tumorales, no se han descrito antes del presente estudio. El aumento de la capacidad de las células mutadas con C1013G/CXCR4 para diseminarse *in vivo* que conduce a la progresión de la enfermedad estaba respaldado por el enriquecimiento de genes relacionado con la invasividad celular, la antiapoptosis, la proliferación celular y la oncogénesis (Ejemplo 3). Esto dio lugar a la regulación positiva de las vías pro-supervivencia en células mutadas en comparación con las células de control. Estos efectos se revirtieron cuando

los ratones que albergan MW, inyectados con células mutadas con C1013G/CXCR4 o células control, se trataron con el anticuerpo anti-CXCR4, ulocuplumab, como se describe a continuación.

#### 5 *Sensibilidad alterada de las células de macroglobulinemia de Waldenström que albergan la mutación C1013G/CXCR4 a los agentes anti-MW utilizados convencionalmente*

10 Los fármacos habitualmente utilizados para tratar la MW incluyen agentes tales como rituximab, chlorambucilo (LEUKERAN®), cladribina (LEUSTATIN®), fludarabina, bortezomib, bendamustina, solos y en diversas combinaciones. Las terapias adicionales para tratar la MW refractaria/recidivante incluyen ofatumumab para pacientes alérgicos al rituximab, everolimus, alemtuzumab y quimioterapia de dosis alta con un trasplante autólogo o alogénico de células madre. Se están estudiando varios fármacos y combinaciones de fármacos nuevos en ensayos clínicos para la MW (algunos para la enfermedad refractaria/recidivante), incluyendo carfilzomib, ibrutinib y panobinostat (LBH-589).

15 Ibrutinib, un inhibidor administrado por vía oral de la enzima tirosina cinasa de Bruton, fue aprobado recientemente por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA) para el tratamiento del linfoma de células del manto y la leucemia linfocítica crónica, y en febrero de 2013 recibió la designación de terapia innovadora por la FDA como monoterapia para pacientes con MW. Se ha publicado que el ibrutinib es altamente activo y bien tolerado en pacientes con MW recidivante o refractaria (Treon *et al.*, 2013) y en octubre de 2014 se presentó a la FDA una solicitud de nuevo fármaco complementario (sNDA, por sus siglas en inglés) basándose en datos de un ensayo clínico de Fase 2 (Identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01614821) de ibrutinib en pacientes con MW anteriormente tratados con al menos una pauta sistémica para la MW. Sin embargo, se ha demostrado que la presencia de mutaciones CXCR4 similares a WHIM confiere una disminución de la sensibilidad a la supresión del crecimiento mediada por ibrutinib en células de MW (Cao *et al.*, 2013; Treon *et al.*, 2013), con una tasa de respuesta principal de solo el 30 % en pacientes con mutaciones CXCR4 similares a WHIM frente al 77 % para pacientes con CXCR4 de tipo silvestre (Treon *et al.*, 2013).

30 Además, se ha demostrado en el presente documento (Ejemplo 4) que la variante somática C1013G/CXCR4 se asocia a la resistencia de células de MW a moléculas pequeñas anti-MW utilizadas convencionalmente, incluyendo el inhibidor de BTK, ibrutinib, el inhibidor de mTOR, everolimus y el inhibidor de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), idelalisib (ZYDELIG®), respaldando el papel de esta variante en la mediación de la resistencia a fármacos. Este resultado sugiere que los inhibidores de mTOR, BTK y PI3K pueden no ser eficaces en el tratamiento de pacientes cuyas células de MW albergan la mutación C1013G/CXCR4. Por el contrario, las células de MW mutadas con C1013G/CXCR4 y las células de control sin mutar eran igualmente sensibles a los fármacos inhibidores del proteasoma carfilzomib y bortezomib (Ejemplo 4), sugiriendo de este modo una posible pauta combinatoria de ulocuplumab con inhibidores del proteasoma en pacientes con MW que albergan la variante somática C1013G/CXCR4.

40 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular, se propone que los inhibidores de BTK, PI3K y mTOR no fueron eficaces contra las células mutadas con C1013G/CXCR4 debido a la regulación positiva de genes relacionados con esas vías específicas. Por otra parte, se confirmó que las células CXCR4 mutadas presentaban un enriquecimiento de la RAF así como de la proteína cinasa activada por mitógeno/cinasa proteína cinasa activada por mitógeno y las vías de mTOR, sugiriendo adicionalmente de este modo la presencia de interferencia entre la RAF y las vías de cinasa proteína cinasa activada por mitógeno/ERK/mTOR (Downward, 2003; Lim y Counter, 2005). Por el contrario, los genes apoptóticos relacionados con NF-κB y NP-κB no se modularon diferencialmente en células mutadas con CXCR4 en comparación con las células de control (datos no mostrados). Esto puede explicar, al menos en parte, la presencia de resistencia a inhibidores de BTK, mTOR y PI3K y sensibilidad a inhibidores del proteasoma en células de MW mutadas en comparación con células de tipo silvestre.

#### 50 *Tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenström con un anticuerpo anti-CXCR4*

55 Se demuestra en el presente documento que un anticuerpo anti-CXCR4, BMS-936564, inhibe la migración de las estirpes celulares de MW hacia las células del estroma mesenquimatoso de la médula ósea de la MW primaria (BM-MSc) o el ligando de CXCR4, CXCL12 (véase el Ejemplo 5). Este anticuerpo anti-CXCR4 también inhibe la adhesión de células de MW a BM-MSc de MW e inhibe la proliferación de células de MW en presencia de BM-MSc de MW. Además, también se proporcionan pruebas de que el anticuerpo puede inducir directamente la apoptosis en células de MW (Ejemplo 5). En consecuencia, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto afectado con MW que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor CXCR4 expresado sobre la superficie de una célula, incluyendo una célula de MW. Preferentemente, el anticuerpo utilizado en los presentes métodos es un anticuerpo anti-CXCR4 de la presente divulgación que se une específicamente a un receptor CXCR4 y presenta determinadas propiedades funcionales que son deseables para su uso terapéutico. Dichas propiedades funcionales incluyen la unión de alta afinidad a CXCR4 humano expresado sobre una superficie celular, la inhibición del flujo de calcio inducido por SDF-1 y la migración de células que expresan CXCR4, la inhibición de la proliferación de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> y/o la inducción de la apoptosis de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> *in vivo*, el aumento del tiempo de supervivencia de un sujeto que porta un tumor CXCR4<sup>+</sup>, y/u otras propiedades funcionales que se describen en el presente documento.

La divulgación también proporciona evidencia experimental de que una mutación *C1013G* en el gen *CXCR4* está presente en aproximadamente el 28 % de los pacientes con MW y en aproximadamente el 20 % de los pacientes con GMSI-IgM, pero es rara o está ausente en varios otros tipos de cáncer de células B sometidos a ensayo (véase el Ejemplo 1). Por tanto, entre los trastornos linfoproliferativos de células B, la mutación *C1013G/CXCR4* caracteriza a los pacientes con MW. También se proporcionan datos que muestran que la sobreexpresión de *CXCR4* facilita el crecimiento y diseminación de células de MW *in vivo* (Ejemplo 2). Se demostró que la presencia de la mutación *C1013G/CXCR4* aumenta la adhesión y la proliferación de las células de MW en presencia de BM-MSD de MW primaria, recapitulando los efectos de la sobreexpresión de *CXCR4* en las células de MW (Ejemplo 3). Por tanto, la mutación *C1013G/CXCR4* es una mutación activadora en las células de MW como lo demuestra la proliferación y diseminación tumoral significativa a los órganos extramedulares, conduciendo a la progresión de la enfermedad y a la disminución de la supervivencia.

En particular, se demostró que ulocuplumab se dirige eficazmente a las propiedades de adhesión, migración y proliferación de células de MW mutadas con *CXCR4* en el contexto del microambiente de la MO tanto *in vitro* como *in vivo* (véase el Ejemplo 6). La administración de ulocuplumab condujo a una reducción significativa del tumor y a la anulación de la diseminación extramedular *in vivo* en un modelo de MW *C1013G/CXCR4*. Estos hallazgos demuestran que *CXCR4* es un regulador crítico de la patogenia molecular de MW y es una diana terapéutica importante. El uso de un anticuerpo anti-*CXCR4* para dirigirse satisfactoriamente tanto a células de MW de tipo silvestre como a células de MW mutadas con *C1013G/CXCR4*, como se describe en los Ejemplos 5-7, proporciona una base sólida para traducir estas observaciones en ensayos clínicos para pacientes con MW.

En consecuencia, la divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto afectado con MW, incluyendo la MW asociada a *C1013G/CXCR4*, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor *CXCR4* expresado sobre la superficie de una célula, incluyendo una célula de MW. En los métodos actuales, el sujeto puede ser un paciente con MW humano, preferentemente un paciente humano afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4*. En determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se une a un receptor *CXCR4* humano expresado sobre una superficie celular, tal como un receptor *CXCR4* humano que porta la mutación *C1013G* expresada sobre una superficie celular. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es de un isotipo IgG1, IgG2, G3 o IgG4. En determinadas realizaciones diferentes, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es de un isotipo IgG1. En otras realizaciones, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es de un isotipo IgG4. En realizaciones adicionales, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo. En otras realizaciones más, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o una porción de unión a antígeno del mismo. Preferentemente, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o una porción de unión a antígeno del mismo. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo o el fragmento del mismo es ulocuplumab o un fragmento de unión a *CXCR4* del mismo.

De manera importante, se ha desvelado en el presente documento que las células de MW mutadas con *C1013G/CXCR4* son resistentes a tres clases importantes de fármacos utilizados para tratar neoplasias de células B y que se están sometiendo a ensayo activamente para el tratamiento de la MW, es decir, inhibidores de BTK, ejemplificados por ibrutinib, inhibidores de mTOR, ejemplificados por everolimus, e inhibidores de PI3K, ejemplificados por idelalisib (Ejemplo 4). Por el contrario, se demostró que un anticuerpo anti-*CXCR4* es eficaz para inhibir la proliferación y la migración de células de MW mutadas con *C1013G/CXCR4* y sin mutar. Estos resultados sugieren que los inhibidores de mTOR, BTK y PI3K no serán altamente eficaces en el tratamiento de pacientes cuyas células de MW albergan la mutación *C1013G/CXCR4* y subrayan la utilidad de un anticuerpo anti-*CXCR4* para tratar dichas variantes *C1013G/CXCR4-WM*.

Se ha demostrado que ulocuplumab tiene como diana las células de MW, independientemente de su estado mutacional, inhibiendo la activación de las vías de señalización pro-supervivencia, estimulando las cascadas pro-apoptóticas e inhibiendo la diseminación de células de MW *in vivo* (Ejemplos 5 y 6). En consecuencia, en determinadas realizaciones del uso médico desvelado, un paciente con MW se examina para detectar la presencia de la mutación *C1013G/CXCR4* para identificar de este modo a los pacientes que no son adecuados para el tratamiento con un fármaco inhibidor de BTK, mTOR o PI3K, en el que dichos pacientes son adecuados para el tratamiento con un anticuerpo anti-*CXCR4*. Dichos pacientes con MW pueden no ser buenos candidatos para el tratamiento con un fármaco inhibidor de BTK, mTOR o PI3K y en su lugar pueden ser tratados con un anticuerpo anti-*CXCR4* de la divulgación como monoterapia de primera línea. En determinadas realizaciones preferidas de este uso médico, el anticuerpo anti-*CXCR4* es ulocuplumab. En otras realizaciones, el tratamiento se caracteriza porque el paciente afectado con *C1013G/CXCR4-WM* se trata con una combinación de un anticuerpo anti-*CXCR4*, tal como ulocuplumab y un agente anti-MW tal como ibrutinib, everolimus, idelalisib, carfilzomib y/o bortezomib. En realizaciones adicionales, el tratamiento se caracteriza porque el paciente *C1013G/CXCR4-WM* se trata con un anticuerpo anti-*CXCR4*, solo o en combinación con otro agente anti-MW, como terapia de segunda o tercera línea después de que el paciente ha fracasado en uno o más tratamientos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-*CXCR4* puede administrarse después de que el paciente con MW haya fracasado en el tratamiento de primera línea con ibrutinib o el anticuerpo puede administrarse después de que el paciente haya fracasado tanto en el tratamiento de primera línea con una pauta quimioterápica con

BDR (bortezomib, dexametasona y rituximab) o RCD (ciclofosfamida, dexametasona y rituximab) y tratamiento de segunda línea con ibrutinib.

#### *Anticuerpo anti-CXCR4 para monoterapia en la macroglobulinemia de Waldenström*

5 La exposición de células de MW a BMS-936564 dio como resultado un aumento de la escisión de caspasa-9 y PARP (Ejemplo 5). La neutralización de CXCR4 con BMS-936564 también aumentó los niveles de regulación positiva de fosfo(p)-GSK3- $\beta$  y p- $\beta$ -catenina, conduciendo a la degradación de  $\beta$ -catenina. BMS-936564 aumentó de manera similar la escisión de caspasa-9 y PARP en células de MW asociada a C1013G/CXCR4 y moduló la señalización  
10 GSK3- $\beta$ / $\beta$ -catenina, lo que condujo a una regulación positiva de p-GSK3- $\beta$ /p- $\beta$ -catenina y a la degradación de  $\beta$ -catenina (Ejemplo 6). Estos efectos de BMS-936564 son coherentes con la activación de las vías apoptóticas en células de MW y de MW asociada a C1013G/CXCR4 y reflejan el efecto pro-apoptótico de BMS-936564 demostrado en otras neoplasias de células B (documento WO 2013/071068; Kuhne et al., 2013). En consecuencia, en determinados casos de estos métodos para tratar a un paciente con MW, el anticuerpo anti-CXCR4 o un fragmento  
15 del mismo inducen la apoptosis de una célula que expresa CXCR4 o C1013G/CXCR4.

El efecto apoptótico de los anticuerpos anti-CXCR4 desvelados, una propiedad que no presentan los antagonistas de CXCR4 de molécula pequeña, por ejemplo, AMD3100, indica que estos anticuerpos pueden usarse solos, como monoterapia, para tratar pacientes con cáncer. Estudios previos sobre el efecto de los antagonistas de CXCR4 en modelos tumorales *in vivo* de LMA y MM han sugerido que estos antagonistas son eficaces para potenciar la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia (Azab et al., 2009; Zeng et al., 2009). Además, los datos presentados en el presente documento en el Ejemplo 6 demuestran que ulocuplumab, administrado como monoterapia, inhibió la diseminación de MW en ratones inyectados con células de MW C1013G/CXCR4, evidenciado por una reducción significativa de la infiltración de células CXCR4<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> en fémur, hígado, riñón y pulmón en ratones tratados en comparación con ratones tratados con anticuerpos de control. De forma similar, el Ejemplo 7 muestra que ulocuplumab inhibió la diseminación de células de MW de tipo silvestre *in vivo*. Estos resultados son coherentes con la inhibición significativa del crecimiento tumoral conseguida cuando se administró ulocuplumab como monoterapia en una amplia diversidad de modelos de LMA, LNH y MM (documento WO 2013/071068; Kuhne et al., 2013).

30 En consecuencia, en los presentes métodos de tratamiento para tratar la MW de tipo silvestre o la MW asociada a C1013G/CXCR4, el anticuerpo anti-CXCR4 o un fragmento del mismo puede administrarse como monoterapia. Preferentemente, el anticuerpo o un fragmento del mismo induce la apoptosis de una célula que expresa CXCR4 o C1013G/CXCR4. Por tanto, la presente divulgación también proporciona un método para inducir apoptosis de células de MW que expresan CXCR4 o C1013G/CXCR4 que comprende administrar a un sujeto con MW una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CXCR4 de la divulgación.  
35

#### *Combinación de terapia anti-CXCR4 y antineoplásica para el tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenström*

40 Como se describe en el Ejemplo 7, cada uno de BMS-936564 y bortezomib redujo significativamente las células tumorales dentro de la MO y los niveles de IgM sérica. Sin embargo, BMS-936564 y bortezomib en combinación actuaron sinérgicamente para provocar reducciones aún más significativas en las células tumorales y los niveles de IgM sérica. Estos resultados son coherentes con demostraciones previas de que el eje CXCR4/CXCL12 desempeña un papel importante en la localización y el tráfico de células de MM a la MO y la interrupción de la interacción de las células cancerosas de MM con la MO sensibiliza estas células a los agentes terapéuticos (Alsayed et al., 2007; Azab et al., 2009; Kuhne et al., 2013; documento WO 2013/071068).  
45

En determinadas realizaciones del uso médico desvelado, el anticuerpo anti-CXCR4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une al receptor CXCR4 e inhibe la actividad del receptor. Esto interrumpe la localización y el mantenimiento de las células madre de MW dentro del microambiente de la MO y/o aumenta la movilización de las células de MW desde la MO hacia la periferia y, por tanto, aumenta la sensibilidad de las células cancerosas de MW a uno o más tratamientos antineoplásicos, tales como el tratamiento con radiación o la administración de agentes quimioterápicos.  
50

En consecuencia, en determinadas realizaciones, el tratamiento comprende que los anticuerpos anti-CXCR4 de la divulgación se usen en combinación con otros tratamientos antineoplásicos, tales como cirugía y/o radiación, y/o se coadministran con uno u otros agentes terapéuticos más, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor, que potencian o aumentan el efecto terapéutico de los anticuerpos anti-CXCR4. El anticuerpo puede estar unido al agente (tal como un inmunoconjugado) o puede administrarse por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otros agentes terapéuticos conocidos, incluyendo fármacos quimioterápicos convencionales y anticuerpos que se unen a antígenos asociados a tumores o dianas inmunorreguladores.  
55  
60

Los fármacos antineoplásicos para su uso en estos métodos incluyen, entre otros, bortezomib, carfilzomib, ibrutinib, idelalisib, panobinostat, dexametasona, rituximab, talidomida, ciclofosfamida, lenalidomida, doxorubicina, vincristina, prednisona, fludarabina, clorambucilo, bendamustina, cladribina, alemtuzumab, ofatumumab, everolimus, cisplatino,  
65

sulfato de bleomicina, carmustina, mitoxantrona, etopósido, citarabina, ifosfamida, carboplatino y etopósido. Se demuestra en el presente documento que las células de MW tanto mutadas con C1013G/CXCR4 como sin mutar eran igualmente sensibles a los inhibidores del proteasoma, carfilzomib y bortezomib (Ejemplo 4). Por otra parte, una combinación de ulocuplumab y bortezomib actuó sinérgicamente en la reducción de células tumorales de MW dentro de la MO y en la reducción de los niveles de IgM sérica *in vivo* y en la inducción de toxicidad en células de MW *in vitro* (Ejemplo 7). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren fuertemente que una pauta combinatoria de ulocuplumab con inhibidores del proteasoma, por ejemplo, bortezomib o carfilzomib, es altamente eficaz en el tratamiento de pacientes con MW que albergan CXCR4 de tipo silvestre o la variante somática C1013G/CXCR4. La coadministración de un anticuerpo anti-CXCR4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente divulgación con agentes antineoplásicos proporciona al menos dos agentes anticancerígenos que operan a través de diferentes mecanismos para ejercer un efecto citotóxico en las células tumorales humanas. Además de la posible interacción sinérgica del anticuerpo anti-CXCR4 y el otro o los otros agentes, dicha coadministración puede ayudar a superar problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que los haría no reactivos con el anticuerpo anti-CXCR4.

Por tanto, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación pueden usarse para potenciar el efecto de los quimioterápicos por su capacidad para liberar células malignas del entorno protector de la MO. Como se ha descrito anteriormente, además de movilizar células de MW y aumentar su quimiosensibilización, se ha demostrado que estos anticuerpos tienen el efecto adicional de destruir directamente células de MM por apoptosis y, por tanto, son eficaces en el tratamiento de la MW, incluyendo la MW asociada a C1013G/CXCR4, cuando se administran como monoterapia.

#### *Dosificaciones*

En los métodos que se desvelan para tratar la MW, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo puede comprender una dosis que varía de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo puede comprender una dosis de 0,1, 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10 o 20 mg/kg. Preferentemente, la dosis es de 1, 3 o 10 mg/kg. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo puede administrarse en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes. Preferentemente, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se administra en un programa de dosificación de una vez cada 7 o 14 días. El anticuerpo anti-CXCR4 puede administrarse como monoterapia durante la duración del tratamiento. O el anticuerpo anti-CXCR4 se administra semanalmente, en el ciclo 1 durante las primeras dos semanas como monoterapia y después en combinación con una pauta de quimioterapia que incluye, por ejemplo, bortezomib, dexametasona y rituximab (BDR) o ciclofosfamida, dexametasona y rituximab (RCD). Preferentemente, el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo se administra por vía intravenosa o subcutánea.

Por ejemplo, para el tratamiento de MW con ulocuplumab en combinación con BDR, una pauta de dosificación de ejemplo comprende: (1) ulocuplumab (1, 3 o 10 mg/kg) administrado como una infusión intravenosa de 60 minutos en los días 1, 8, 15, 22 y 29 (ciclo 1) y en los días 1, 8 y 15 (ciclo 2 y ciclos posteriores); (2) bortezomib (1,3 mg/m<sup>2</sup>) administrado como una inyección intravenosa de 3-5 segundos en los días 15, 18, 22 y 25 (ciclo 1) y en los días 1, 4, 8, 11 (ciclo 2 y ciclos posteriores); (3) dexametasona (20 o 40 mg) administrada los días 15, 16, 18, 19, 22, 23, 25 y 26 (ciclo 1) y los días 1, 2, 4, 5, 8, 9, 11 y 12 (Ciclo 2 y ciclos posteriores); y (4) rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>) administrado por infusión intravenosa lenta, por ejemplo, durante 90 minutos, el día 25 (ciclo 1) y el día 11 (ciclo 2 y ciclos posteriores).

Cuando el anticuerpo anti-CXCR4 se usa en terapia de combinación con otros agentes anti-MW, estos agentes se usan normalmente en sus dosis aprobadas o convencionales. Por ejemplo, una pauta de dosificación de ejemplo con ibrutinib comprende la dosificación de 420 mg (tres cápsulas de 140 mg) por vía oral una vez al día hasta una toxicidad inaceptable o la progresión de la enfermedad.

La dosis del anticuerpo anti-CXCR4 puede ser una dosis fija plana que se fija independientemente del peso del paciente. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CXCR4 puede administrarse a una dosis fija de 5, 20, 35, 75, 200, 350, 750 o 1500 mg, independientemente del peso del paciente. Como se usan en el presente documento, las expresiones "dosis fija", "dosis plana" y "dosis fija plana" se usan indistintamente y se refieren a una dosis que se administra a un paciente independientemente del peso o el área de superficie corporal (BSA) del paciente. Por tanto, la dosis fija o plana no se proporciona como una dosis de mg/kg, sino como una cantidad absoluta del agente (por ejemplo, el anticuerpo anti-CXCR4).

#### *Tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenström asociada a C1013G/CXCR4 que comprende una etapa de selección del paciente*

La mutación C1013G/CXCR4 se muestra en el presente documento como una mutación activadora en la MW (Ejemplo 3). A pesar del fenotipo más agresivo de las células mutadas con C1013G/CXCR4 en comparación con las células de MW de tipo silvestre, se descubrió que BMS-936564 es igualmente activo para dirigirse a la adhesión, la migración y las propiedades proliferativas de las células mutadas con CXCR4 (Ejemplo 5). Por tanto, los anticuerpos anti-CXCR4 de la presente divulgación pueden tener una aplicabilidad particular en el tratamiento de la MW asociada a

*C1013G/CXCR4* y la pauta terapéutica puede incluir una etapa para identificar pacientes que portan la mutación *C1013G*. En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4* que comprende (a) seleccionar un sujeto que sea un candidato adecuado para el tratamiento, comprendiendo la selección: (i) proporcionar una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de MW en el sujeto; (ii) evaluar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (iii) seleccionar al sujeto como un candidato adecuado basándose en la determinación de que las células de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (b) administrar al sujeto seleccionado una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor *CXCR4* expresado sobre la superficie de una célula de MW asociada a *C1013G/CXCR4*. En los métodos actuales, el anticuerpo anti-*CXCR4* puede administrarse en combinación con un agente anti-MW, por ejemplo, bortezumib o carfilzomib, que también es eficaz en el tratamiento de pacientes con MW que albergan la variante somática *C1013G/CXCR4*. En cualquiera de los métodos presentes, una muestra tisular de ensayo comprende una muestra de biopsia de tejido tumoral o una muestra de células tumorales encontradas en la periferia.

La presente divulgación también proporciona un método para tratar a un sujeto afectado con MW asociada a *C1013G/CXCR4* que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor *CXCR4* expresado sobre la superficie de una célula de MW asociada a *C1013G/CXCR4*, habiéndose seleccionado el sujeto sobre la base de que se determina que las células de MW del sujeto portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*.

La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para seleccionar un paciente con MW para el tratamiento con un anticuerpo de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor *CXCR4* expresado sobre la superficie de una célula de MW, comprendiendo dicho método: (a) opcionalmente proporcionar una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de MW en el paciente; (b) evaluar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (c) seleccionar al paciente para el tratamiento basado en la determinación de que las células de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para determinar una pauta terapéutica que comprende un anticuerpo anti-*CXCR4* de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo para tratar la MW asociada a *C1013G/CXCR4* en un sujeto, comprendiendo dicho método: (a) opcionalmente proporcionar una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de MW en el sujeto; (b) evaluar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (c) determinar la pauta terapéutica basado en la determinación de que las células de MW portan la mutación *C1013G*.

En los métodos actuales, la mutación *C1013G* puede detectarse mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR), un ensayo de hibridación de ácido nucleico o mediante secuenciación de ADN. El ensayo por PCR puede ser un ensayo por PCR específico de alelo en tiempo real (AS-PCR). La secuenciación del ADN puede ser una secuenciación completa del ADN del genoma.

En cualquiera de los métodos que se desvelan que comprenden la detección de la mutación *C1013G/CXCR4* en una muestra tisular de ensayo, debe entenderse que la etapa que comprende la provisión de una muestra tisular de ensayo de un paciente es una etapa opcional. Es decir, en determinados casos el método incluye esta etapa y en otros casos, esta etapa no está incluida en el método. También debe entenderse que la etapa de "evaluación" para determinar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* puede realizarse mediante un método transformador de ensayo para determinar la presencia de la mutación, por ejemplo, realizando un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como alternativa, no se incluye ninguna etapa transformadora y la presencia de la mutación se evalúa, por ejemplo, revisando un informe de resultados de ensayo de un laboratorio. Las etapas de los métodos hasta, e incluso, evaluar si las células portan la mutación *C1013G/CXCR4* pueden proporcionar un resultado intermedio que puede proporcionarse a un médico u otro profesional médico para su uso en la selección de un candidato adecuado para la terapia y/o la administración de uno o más agentes terapéuticos al paciente. Las etapas que proporcionan el resultado intermedio pueden ser realizadas por un médico o alguien que actúe bajo la dirección de un médico. Como alternativa, estas etapas pueden ser realizados por un laboratorio independiente o por una persona independiente, tal como un técnico de laboratorio.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una pauta terapéutica para tratar a un paciente afectado con la MW asociada a *C1013G/CXCR4*, determinándose dicha pauta mediante el método descrito anteriormente que comprende (a) proporcionar opcionalmente una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de MW en el sujeto; (b) evaluar si las células en la muestra tisular de ensayo de MW portan la mutación *C1013G* en el gen *CXCR4*; y (c) determinar la pauta terapéutica basado en la determinación de que las células de MW portan la mutación *C1013G*. El régimen terapéutico puede comprender administrar el anticuerpo anti-*CXCR4* de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo al paciente a: (a) una dosis de al menos dos veces, al menos tres veces o al menos cinco veces, la dosis administrada en el tratamiento de un paciente con MW que porta el gen *CXCR4* de tipo silvestre; y/o (b) una frecuencia al menos dos veces, al menos tres veces o al menos cinco veces superior a la frecuencia administrada en

el tratamiento de un paciente con MW que porta el gen *CXCR4* de tipo silvestre.

*Anticuerpos anti-CXCR4 preferidos para tratar la macroglobulinemia de Waldenström*

- 5 Los métodos terapéuticos que se desvelan en el presente documento comprenden administrar a un paciente con MW un anticuerpo anti-CXCR4 de la divulgación. Este anticuerpo se une específicamente a CXCR4 de tipo silvestre o la variante C1013G/CXCR4 expresada sobre la superficie de una célula de MW, y presenta determinadas propiedades estructurales y funcionales que son beneficiosas para la eficacia terapéutica. Por ejemplo, una característica estructural deseable es que el anticuerpo comprende las CDR o regiones variables de F7 (ulocuplumab), F9, D1 o E2  
 10 (como se identifica en el documento WO 2008/060367) o compite de forma cruzada con cualquiera de estos anticuerpos para unirse a la misma región epitópica de CXCR4. Las características funcionales deseables incluyen la unión de alta afinidad a CXCR4 humano expresado sobre una superficie celular, inhibiendo la proliferación de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> y/o induciendo la apoptosis de células tumorales CXCR4<sup>+</sup> *in vivo*. En determinadas realizaciones preferidas del uso médico desvelado, el anticuerpo anti-CXCR4 o una porción del mismo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se establece en la SEQ ID NO: 25 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se establece en la SEQ ID NO: 29.
- 15
- 20 En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CXCR4 o una porción del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se expone en la SEQ ID NO: 25 y una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente, cuya secuencia se establece en la SEQ ID NO: 29.
- 25 En aún otras realizaciones preferidas, de acuerdo con una delineación de secuencias de CDR mediante el sistema de Kabat (Kabat *et al.*, 1991; Johnson y Wu, 2000), el anticuerpo anti-CXCR4 o una porción del mismo comprende una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1, una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5, una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9, una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13, una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 17 y una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 21. En realizaciones más preferidas, el anticuerpo o un fragmento del mismo es ulocuplumab o un fragmento de unión a CXCR4 del mismo.
- 30
- 35

Un aspecto de la presente divulgación es el uso de un anticuerpo anti-CXCR4 de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo para la preparación de un fármaco para tratar un sujeto afectado con MW o MW asociada a C1013G/CXCR4. Además, la presente divulgación incluye un anticuerpo anti-CXCR4 de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo para su uso en el tratamiento de un sujeto afectado con MW o MW asociada a C1013G/CXCR4.

40

*Kits terapéuticos*

- 45 También dentro del alcance de la presente divulgación se encuentran kits que comprenden un anticuerpo anti-CXCR4 de fragmento de unión a antígeno o composición del mismo e instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones que comprenden programas de administración para permitir que un médico o paciente administre el anticuerpo o composición del mismo a un paciente con MW. En consecuencia, la presente divulgación proporciona un kit para tratar la MW asociada a C1013G/CXCR4 en un sujeto, el kit comprende (a) una o más dosis de cualquiera de entre un anticuerpo anti-CXCR4 de la divulgación o una porción de unión a antígeno del mismo e (b) instrucciones para usar el anticuerpo anti-CXCR4 o un fragmento del mismo en cualquiera de los métodos terapéuticos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo en el kit puede comprender los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 25, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 29. Preferentemente, el anticuerpo anti-CXCR4 es ulocuplumab. Opcionalmente, el kit incluye múltiples envases de composiciones farmacéuticas de dosis única, cada una de las cuales contiene una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CXCR4 para una administración única de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos terapéuticos adicionales como se describen en el presente documento, tales como un agente quimioterápico o radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales que se dirigen a diferentes antígenos. El anticuerpo anti-CXCR4 puede envasarse conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos en forma de dosificación unitaria.
- 50
- 55
- 60
- 65 También pueden incluirse en los kits instrumentos o dispositivos necesarios para administrar la composición o composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, un kit puede contener una o más jeringuillas. La una o más jeringuillas

pueden cargarse anteriormente con una cantidad del anticuerpo anti-CXCR4. Los kits también suelen incluir una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit, junto con las instrucciones de uso. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que acompañe de otro modo al kit.

- 5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente divulgación de ninguna manera.

#### EJEMPLO 1

#### 10 *Exploración de pacientes con trastornos linfoproliferativos de células B para detectar la mutación C1013/CXCR4*

Se exploraron pacientes con diferentes trastornos linfoproliferativos de células B para detectar la presencia de la variante C1013/CXCR4.

#### 15 *Muestras clínicas*

Se recogieron muestras tumorales de 418 pacientes con diferentes trastornos linfoproliferativos de células B (B-LPD), distribuidos de la siguiente manera: MW (n = 131); GMSI de IgM (n = 40); linfoma difuso de células B grandes (n = 75); linfoma esplénico de la zona marginal (n = 14); linfoma linfocítico crónico de células B (n = 37, incluyendo 16 con componente M); leucemia de células pilosas (n = 35); MM (n = 36, 3 del isotipo IgM); GMSI de IgA/IgG (n = 22); linfoma linfoplasmacítico sin criterios de MW (n = 13); amiloidosis (n = 6); y B-LPD no especificado de otra manera (n = 9). El diagnóstico se realizó de acuerdo con la última clasificación de la OMS de tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides (Campo *et al.*, 2011). También se incluyeron treinta y dos voluntarios sanos en el estudio como controles.

#### 25 *Análisis inmunofenotípico y cuantificación de células clonales en tejidos de diagnóstico*

La evaluación inmunofenotípica se realizó convencionalmente usando paneles de anticuerpos monoclonales descritos anteriormente (Paiva *et al.*, 2013) y siguiendo las recomendaciones generales del grupo EuroFlow para la evaluación inmunofenotípica de neoplasias hemáticas (van Dongen *et al.*, 2012). Estos casos se inmunofenotiparon usando combinaciones de 4 colores que incluían hasta 20 antígenos diferentes además de IgM de superficie (sIgM) e Ig lambda citoplasmática y Kappa (cyIgλ y cyIgκ). El porcentaje de células clonales se contó con el tubo, incluyendo el MoAb sIgMICD25ICD19ICD38. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences [BDB] San José, CA) usando el software FACSDiva (versión 6.1; BDB) y un procedimiento de adquisición de dos etapas para eventos totales y de solo CD19+. El análisis de los datos se realizó con el software Infinicyt (Cytognos; Salamanca, España). Después del análisis inmunofenotípico y la cuantificación de células clonales en tejidos de diagnóstico, la detección de la variante C1013G/CXCR4 se realizó mediante PCR específica de alelo en tiempo real (AS-PCR). También se incluyeron diez casos de MW extramedular en estos estudios. Se obtuvo la aprobación del Instituto de Cáncer Dana-Farber y las Juntas de Revisión Institucional del Hospital Universitario de Salamanca para estos estudios. Se proporcionó el consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

#### *AS-PCR en tiempo real para la identificación de la mutación CXCR4 C1013G*

Se desarrolló un ensayo AS-PCR en tiempo real basado en el uso de dos cebadores inversos que difieren en los dos últimos nucleótidos (en la posición 3') de manera que cada cebador sea específico para el alelo de tipo silvestre o mutado, como se describe (Paiva *et al.*, 2013). Para evitar la amplificación del cebador no apareado (aumentando de este modo la especificidad), se introdujo un desapareamiento de nucleótidos adicional (C > G) junto al nucleótido mutado. La longitud y la posición específicas de los cebadores se calcularon con el software Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Cascade, CO). Los cebadores inversos fueron: 5'-GACTCAGACTCAGTGGAAACAGATG-3' (cebador inverso de tipo silvestre) y 5'-GACTCAGACTCAGTGGAAACAGAAC-3' (cebador mutado inverso). El cebador directo común fue 5'-TTTCTTCCACTGTTGTCTGAACC-3', para generar un producto de PCR de 165 pb. Además, se diseñó una sonda TaqMan® específica usando el software Primer Express® v3.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), que produjo el siguiente indicador, secuencia e inactivador: 6FAM:5'-TATGCTTTCCTTG GAGCCA-3': NFQ-MGB.

Para el desarrollo de AS-PCR en tiempo real, cada experimento requirió dos reacciones de PCR diferentes: una para la detección de la mutación CXCR4 C1013G (con el cebador inverso mutado) y la otra como control de la calidad del ADN (usando el cebador inverso de tipo silvestre). Cada reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, que contenía 300 nM de cada cebador, 200 nM de la sonda, 1x de la mezcla maestra universal de PCR TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y 20 ng de ADN genómico. Los experimentos se realizaron en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus® (Applied Biosystems) y consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 50 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 60 s. Los datos se analizaron con el software StepOne™ v2.1 (Applied Biosystems), que proporciona un valor de CT que se consideró como el ciclo en el que la fluorescencia comienza a distinguirse del fondo.

65

#### *Resultados*

*La variante C1013G/CXCR4 aparece en pacientes con MW*

5 La mutación *C1013G/CXCR4* se detectó en el 28,2 % de los pacientes con MW (37/131) y en el 20 % de los pacientes con GMSI-IgM (8/40). Véase la Tabla 1. Además, la variante se detectó en el 7 % de los pacientes con linfoma esplénico de la zona marginal (1/14) y en el 1,3 % de los pacientes con linfoma difuso de células B grandes (1/75), mientras que estaba ausente en la leucemia linfocítica crónica de células B, la leucemia de células pilosas, MM e GMSI de IgG/IgA (Tabla 1), lo que sugiere un papel potencial de esta variante en el respaldo de la patogenia molecular de MW, así como del estadio precursor de GMSI-IgM. La variante *C1013G/CXCR4* produce un cambio de nucleótido  
10 único C→G en CXCR4, lo que conduce a un codón de parada previsto en lugar de una serina en la posición de aminoácido 338 (S338X). Esto se ha relacionado anteriormente con el truncamiento del dominio C-terminal del CXCR4 (Alapi K *et al.*, 2007), dando como resultado su translocación intracelular alterada.

15 Para probar adicionalmente que la variante observada puede inducir cambios de CXCR4 sobre la superficie de las células de MW, se evaluó la expresión superficial de CXCR4 en células CD191 derivadas de MO del paciente con MW primaria independiente, ya sea portando la variante (n = 3) o no (n = 8) y se descubrió una mayor expresión de superficie en pacientes que albergan la variante *C1013G/CXCR4* en comparación con pacientes de tipo silvestre/CXCR4 (Figura 2). Por otra parte, también se evaluaron 10 pacientes con diagnóstico histológico de MW extramedular confirmado para determinar la presencia de la variante somática: los pacientes con afectación pulmonar  
20 (3/3) y renal (1/1) presentaron *C1013G/CXCR4* mutado, pero esta mutación estaba ausente en el intestino delgado (2/2) y los tejidos blandos (4/4), como se detectó por AS-PCR en el ADN genómico (Tabla 2), lo que indica que esta mutación puede ser más frecuente en pacientes con afectación extramedular.

Tabla 1: Pacientes con macroglobulinemia de Waldenström con mutación somática *C1013G/CXCR4*

Paciente	N.º de pacientes explorados (N = 418)	<i>C1013G/CXCR4</i>	
		Número	%
Macroglobulinemia de Waldenström	131	37	28,2
GMSI de IgM	40	8	20
Linfoma difuso de células grandes	75	1	1,3
Linfoma de zona marginal esplénica	14	1	7
LLC-B (16 con componente monoclonal)	37	0	0
Leucemia de células pilosas	35	0	0
Mieloma múltiple (3 con IgM)	36	0	0
GMSI de IgA/IgG	22	0	0
Linfoma linfoplasmocítico (sin criterios de MW)	13	0	0
Amiloidosis	6	0	0
Trastorno linfoproliferativo crónico de células B, NE	9	0	0
Voluntarios sanos	32	0	0

25 La variante *C1013G/CXCR4* aparece en el 28 % de los pacientes con MW, estando ausente o presente en una minoría de pacientes con trastornos linfoproliferativos de células B.

30 LLC-B, leucemia linfocítica crónica de células B; GMSI, gammapatía monoclonal de significado indeterminado; NE, no especificado de otra manera.

Tabla 2: La variante *C1013G/CXCR4* está presente en los tejidos pulmonares y renales de pacientes con enfermedad MW extramedular

	<i>C1013G/CXCR4</i>	CXCR4 de tipo silvestre
Pulmón (n = 3)	3/3	0
Riñón (n = 1)	1/1	0
Intestino delgado (n = 2)	0	2/2
Tejidos blandos (n = 4)	0	4/4

35 EJEMPLO 2

*Efecto de la sobreexpresión de CXCR4 sobre el crecimiento y la diseminación de células de MW*

40 Con el fin de diseccionar la pertinencia funcional *in vivo* de la variante *C1013G/CXCR4* en el respaldo de la biología de MW, las células de MW que sobreexpresaban CXCR4 (GFP<sup>+</sup>) (CXCR4<sup>+</sup>) fueron las primeras en proporcionar información sobre el papel de CXCR4 en la MW *in vivo*.

*Inmunohistoquímica*

45 Se analizaron tejidos murinos (MO, hígado, riñón, pulmón y ganglios linfáticos) y se cuantificaron para determinar la expresión de CD20 humano y CXCR4 humano. Estos tejidos se fijaron en formol al 10 %, se usó etanol al 70 % como

solución de almacenamiento; y se incluyeron en parafina. Las secciones de parafina se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-CXCR4 humano (Abcam, Cambridge, MA) y anti-CD20 humano (Dako, Carpinteria, CA), usando la plataforma de tinción automatizada Leica Bond III (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL). El anticuerpo secundario se proporcionó como parte del kit de detección de refinado Bond III (Leica Biosystems) y las secciones se incubaron con un sustrato de diaminobencidina (DAB)-peroxidasa proporcionado en el kit de detección de refinado Bond III, se contratiñeron con hematoxilina-eosina, se deshidrataron, se montaron y se fotografiaron digitalmente (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Melville, NY). La cuantificación de la tinción de CD20 y CXCR4 se realizó usando el software NIS Elements (Nikon, Melville, NY).

#### 10 *Inmunofluorescencia tisular*

Se realizó formación de imágenes por inmunofluorescencia tisular para la evaluación de células de MW que sobreexpresan GFP+/CXCR4 o células de MW RFP+/aleatorizadas en fémures, hígado y riñones recogidos de ratones, como se describe (Hsieh *et al.*, 2012). Las células de interés fueron BCMW.1-GFP+ o BCMW.1-RFP+. Se añadió tinción nuclear DAPI a cada portaobjetos. Los portaobjetos se analizaron usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i; objetivo 40X plan fluor 0,75NA). Las células MM.1S-GFP+ se contaron a partir de 4 campos separados por portaobjetos. Se tomaron imágenes usando la cámara Hamamatsu OrcaER y el software NISElement. La imagen J se usó para fusionar los dos canales diferentes.

#### 20 *ELISA*

Los niveles de IgM sérica humana se determinaron usando un ensayo ELISA de IgM humana (ZeptoMetrix, Buffalo, NY), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

#### 25 *Estudios de adhesión, migración y proliferación celular in vitro*

La adhesión de células de MW a BM-MSC de MW primaria se evaluó mediante un ensayo de adhesión *in vitro* usando células de MM marcadas con calceína AM. El grado de fluorescencia se midió usando un espectrofotómetro (485-520), como se ha descrito anteriormente (Roccaro *et al.*, 2010). Se evaluó la adhesión de las células de MW a fibronectina mediante el uso de un ensayo de adhesión a fibronectina *in vitro*, siguiendo las recomendaciones del fabricante (EMD Biosciences, San Diego, CA), como se describe (Roccaro *et al.*, 2013). La migración de estirpes celulares de MW se evaluó con respecto a SDF-1 $\alpha$  o BM-MSC de MW primaria usando placas de migración transpocillo (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA) como se ha descrito anteriormente (Roccaro *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2011; Azab *et al.*, 2012). La proliferación de células de MW se evaluó mediante la evaluación de la síntesis de ADN, medida por [<sup>3</sup>H]-timidina ([<sup>3</sup>H]-TdR; Perkin Elmer, Boston, MA) captación, después de 48 h de cocultivo con BM-MSC primarias como se ha descrito anteriormente (Roccaro *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2011; Azab *et al.*, 2012). La toxicidad celular se evaluó midiendo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Chemicon International, Temecula, CA), como se describe (Roccaro *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2011; Azab *et al.*, 2012).

#### 40 *Estudios de pérdida y ganancia de función*

Se han realizado estudios de ganancia o pérdida de función de CXCR4 usando estirpes celulares de MW (BCMw.1; MWCL1) solas o en el contexto de BM-MSC de MW primarios, como se ha descrito anteriormente (Roccaro *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2011). En resumen, se inactivó CXCR4 en células de MW usando ARN de horquilla corta (ARNhc); clones 171, 649) e infección mediada por lentivirus; Se usó una sonda aleatorizada como control que contenía la secuencia objetivo (clones 171, 649) o control de aleatorización, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Thermo Scientific, Waltham, MA). La eficiencia de la transducción se verificó mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa (qRT-PCR) y mediante la evaluación de la detección de células que expresan GFP usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Melville, NY).

Se obtuvo sobreexpresión de CXCR4 en células de MW usando LentiORF/CXCR4/GFP de precisión (CXCR4<sup>+</sup>) o sonda aleatorizada/RFP utilizada como control (Thermo Scientific). La eficiencia de sobreexpresión se confirmó mediante qRT-PCR y mediante la detección de células que expresan GFP y RFP con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Melville, NY).

#### 55 *Estadística*

Algunos de los métodos estadísticos que se describen también se usan en otros ejemplos. Los valores de P proporcionados para los ensayos *in vitro* se basan en ensayos T (dos colas;  $\alpha$  0,05) o en ANOVA. Se proporcionan valores de P para cada cifra. La sinergia farmacológica se analizó mediante análisis de isoblograma usando el programa de software CalcuSyn (Biosoft, Ferguson, MO), como se describe 25-27. Se obtuvieron curvas de Kaplan-Meier usando GraphPad Prism y el valor de P se calculó basándose en el ensayo de intervalo logarítmico (Roccaro *et al.*, 2010; Sacco *et al.*, 2011; Roccaro *et al.*, 2008).

#### 65 *Resultados*

*Relevancia funcional de CXCR4 en MW in vivo*

Se inyectaron tanto células CXCR4<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> como células de vector vacío/RFP<sup>+</sup> en ratones SCID/Bg. La eficacia de la infección se confirmó mediante qRT-PCR (Figura 3) y formación de imágenes por inmunofluorescencia (datos no mostrados; Roccaro *et al.*, 2014). Se inyectaron tanto células CXCR4<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> como células de vector vacío/RFP<sup>+</sup> en ratones SCID/Bg. Debido a la progresión de la enfermedad, los ratones se sacrificaron después de 3 semanas, lo que demuestra que la sobreexpresión de CXCR4 en células de MW condujo a un fenotipo más agresivo como lo demuestra una afectación significativamente mayor de órganos en ratones inyectados con células CXCR4<sup>+</sup> en comparación con ratones inyectados con células con vector vacío (P < 0,01; Figuras 4A-C).

Los estudios *ex vivo* demostraron que las células de MW CXCR4<sup>+</sup> se diseminaron y proliferaron más rápidamente en la MO y otros órganos, incluyendo el hígado y los riñones (Figura 4; Figuras 5A-C). Estos hallazgos también se confirmaron mediante imágenes de inmunofluorescencia, que muestran una mayor infiltración de GFP<sup>+</sup> en comparación con las células RFP<sup>+</sup>, representativas de CXCR4<sup>+</sup> y células infectadas con vector vacío, respectivamente (datos no mostrados; Roccaro *et al.*, 2014). De manera importante, se observó una supervivencia reducida en ratones que albergan células CXCR4<sup>+</sup> en comparación con los ratones inyectados con células con vector vacío (P = 0,02; Figura 5D). Además, los ratones inyectados con células CXCR4<sup>+</sup> presentaron una mayor secreción de IgM sérica, en comparación con los ratones sin inyectar o inyectados con células con vector vacío (P = 0,02; Figura 4D). La presencia de células CXCR4<sup>+</sup> *ex vivo* también se confirmó realizando qRT-PCR en las células de MO recogidas de los fémures de ratones inyectados con células CXCR4<sup>+</sup> o de ratones inyectados con células con vector vacío (Figura 4E).

Las secuelas *in vitro* debidas a la ganancia de función de CXCR4 en células de MW se delinearon comparando células CXCR4<sup>+</sup> con células con CXCR4 inactivado. La eficacia de la infección se confirmó a nivel de ARNm (Figura 6) y mediante formación de imágenes por inmunofluorescencia (datos no mostrados; Roccaro *et al.*, 2014). Se demostró que la capacidad de las células de MW para adherirse a células estromales de MO de MW primaria (BM-MSC) y para proliferar cuando en el contexto de las BM-MSC se demostró que se potenciaba en las células de MW CXCR4<sup>+</sup> y se inhibía en el caso de las células de MW con CXCR4 inactivado (Figuras 5E, F). De forma similar, la sobreexpresión de CXCR4 condujo a una mayor capacidad de adhesión de las células de MW a fibronectina, a diferencia de las células con CXCR4 silenciado que presentaban una adhesión celular de MW inhibida a fibronectina (Figuras 7A, B). Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que CXCR4 es crucial para facilitar el crecimiento y la diseminación de células de MW *in vivo*.

## EJEMPLO 3

*Efecto de la mutación C1013G/CXCR4 sobre la patogenia de MW*

Se aclaró la cuestión de si la variante C1013G/CXCR4 respalda activamente la patogenia de MW, conduciendo a la progresión de la enfermedad.

*Mutagénesis de C1013G/CXCR4*

Se generó una variante C1013G/CXCR4 en estirpes celulares de MW (BCMW.1; MWCL1) mediante mutagénesis dirigida al sitio usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange XL (Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células infectadas con un vector de control se consideraron controles y se describen en el presente documento como "células de control". Se evaluó la detección de la variante C1013G/CXCR4 en células infectadas con MW realizando una PCR específica de alelo en ADN genómico o ADNc aislado de células infectadas. (Cebador directo:

5'-TTTCTTCCACTGTTGTCTGAACC-3'; Cebador inverso de tipo silvestre:

5'-GACTCAGACTCAGTGAAACAGATG-3'; Cebador inverso mutado:

5'-GACTCAGACTCAGTGAAACAGAAC-3'). Los datos se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

*Estudios de expresión génica*

El perfil de expresión génica se realizó en células BCMW.1 mutadas con C1013G/CXCR4 usando una matriz HG-U133 plus 2 (GSE50683). Se aisló ARN usando un kit RNeasy (Qiagen). Los datos se normalizaron usando el software d-Chip. Los distintivos génicos expresados diferencialmente se analizaron usando el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) como se informó anteriormente (Subramanian *et al.*, 2005). Los conjuntos de genes se descargaron de una fuente disponible públicamente (Broad Institute, Cambridge, MA).

*Resultados*

Se generaron células de MW mutadas con C1013G de forma estable (C1013G/CXCR4-WM) y se usaron células de control de MW infectadas con vector de control como control. La eficiencia de la mutagénesis se confirmó en los niveles de ADN genómico y ADN complementario (ADNc) mediante PCR cuantitativa (qPCR) y qRT-PCR, respectivamente y después se validó mediante secuenciación de ADN de Sanger (Figuras 8A-C).

Posteriormente se examinó el fenotipo *in vivo* inducido por células de MW que albergan la mutación. Los ratones inyectados con células C1013G/CXCR4-WM presentaron una diseminación significativa de células tumorales a órganos distantes y una mayor secreción de IgM sérica (Figura 8D), recapitulando de este modo el efecto observado en ratones inyectados con células de MW que sobreexpresan CXCR4<sup>+</sup>. Además de la afectación ya demostrada del hígado, el riñón y la MO, los ratones inyectados con células C1013G/CXCR4-WM presentaron ganglios linfáticos agrandados y afectación pulmonar. No se observó diseminación al sistema nervioso central. El análisis histopatológico mostró la presencia de células positivas para CXCR4 y CD20 en todos los tejidos examinados, con la excepción del cerebro (Figura 8E; Figuras 9A-E) y la positividad para CXCR4 y CD20 fue mayor en ratones inyectados con células C1013G/CXCR4-WM en comparación con ratones inyectados con células de control (P < 0,05; Figura 10). De manera importante, los ratones inyectados con células C1013G/CXCR4-WM presentaron una supervivencia global disminuida (P = 0,003; Figura 9F).

Las células C1013G/CXCR4-WM (BCMW.1) se caracterizaron adicionalmente *in vitro*, mostrando una mayor adhesión y proliferación celular en presencia de BM-MSK de MW primaria, confirmando de este modo que la variante C1013G/CXCR4 era capaz de reproducir los efectos de la sobreexpresión de CXCR4 en células de MW (Figuras 11A, B). Se validaron hallazgos similares usando una estirpe celular de MW diferente (MWCL1; Figuras 11C, D).

Tabla 3: Regulación positiva de genes en pacientes con C1013G/CXCR4-WM

Gen	Múltiplo de cambio (pacientes con MW C1013G/CXCR4 frente a pacientes <i>no mutados</i> )	Valor de p
ARID1A	2.388	0,02
BLNK	5.598	0,012
BTK	2.291	0,019
CCND1	5.567	0,026
CD79A	2,021	0,049
CTNBL1	1.989	0,046
GSK3B	2.288	0,014
IRAK4	2.413	0,029
IRF3	3.595	0,027
ITPR1	2.824	0,018
MAP3K1	1.809	0,010
MAP3K7	3.004	0,002
MAPK14	1,566	0,039
MAPK1	2.039	0,012
MAPK8	1.628	0,032
NREP	2.359	0,038
OSBPL3	3.178	0,025
PAX5	1.911	0,016
PI3KCB	2.228	0,023
POU2AF1	2.198	0,046
RAF1	1.618	0,023
RELA	1.809	0,036
SMEK1	2.152	0,014

La regulación positiva de genes en pacientes con MW que albergan la mutación C1013G/CXCR4 (n = 10) se compara con pacientes con MW con CXCR4/de tipo silvestre (n = 30).

Para explicar mejor la capacidad de la variante C1013G/CXCR4 para facilitar la diseminación de células de MW *in vivo*, las células mutadas se caracterizaron a nivel de ARNm. Usando GSEA, se demostró que los genes relacionados con la invasividad, proliferación celular, antiapoptosis y oncogenia (Rizki A *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2007), se enriquecieron en células C1013G/CXCR4-WM en comparación con las células de MW infectadas con vector de control, de acuerdo con el fenotipo más agresivo de las células mutadas en comparación con las células de control (Figura 12A). Estas observaciones *in vivo* junto con los cambios observados a nivel de ARNm indican que la variante C1013G/CXCR4-WM actúa como una mutación activadora en células de MW.

Los pacientes con MW se perfilaron a niveles de ARNm usando qRT-PCR y varios genes relacionados con las vías de la proteína cinasa activada por mitógeno, BTK y PI3K, que se sabe que respaldan la biología de la MW (Chng *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2007), se descubrió una regulación positiva significativa en pacientes con MW mutada con C1013G/CXCR4 (n = 10) en comparación con pacientes con MW CXCR4/de tipo silvestre (n = 30) (Tabla 3). De manera importante, esos cambios se enriquecieron igualmente en células BCMW1 mutadas con C1013G/CXCR4 en comparación con las células infectadas con vector de control, lo que confirma adicionalmente que las células BCMW.1 modificadas por ingeniería genética con C1013G/CXCR4 son representativas de lo observado en las células tumorales de MW primaria (Figura 12B).

## EJEMPLO 4

*Resistencia de la variante C1013G/CXCR4-WM a los agentes anti-MW convencionales*

Se investigó la sensibilidad de las células de MW que albergaban la variante *C1013G/CXCR4* a moléculas pequeñas anti-MW utilizadas convencionalmente.

5

*Materiales y métodos**Reactivos*

10 Se adquirieron everolimus, idelalisib, ibrutinib, bortezomib y carfilzomib en Selleck Chemicals (Houston, TX). Los fármacos se disolvieron en dimetilsulfóxido y posteriormente se diluyeron en medio de cultivo celular (suero bovino fetal al 10 %) inmediatamente antes de su uso. La concentración final máxima de dimetilsulfóxido (0,1 %) no afectó a la proliferación celular y no indujo citotoxicidad en las estirpes celulares sometidas a ensayo.

15 Se obtuvieron BMS936564/MDX-1338 y el control del isotipo de IgG4 humana de control en Bristol-Myers Squibb (Redwood City, CA).

*Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes*

20 Se realizó el GSEA como se describe en el Ejemplo 3.

*Resultados*

25 Los estudios de GSEA mostraron que los genes relacionados con la resistencia a los fármacos se enriquecieron en la estirpe celular de MW que albergaba la mutación, mientras que los genes relacionados con la respuesta a fármacos se enriquecieron en las células de control de MW (Figura 13A). Esto provocó una investigación sobre si los agentes anti-MW novedosos pueden alterar su eficacia antitumoral en el contexto de las células de MW mutadas con CXCR4. Se descubrió que las células de MW que albergaban la variante somática *C1013G/CXCR4* presentaban resistencia a BTK así como a inhibidores de PI3K y mTOR (Figuras 12B-D). Estos datos respaldan los datos recientes que indican que los pacientes con MW con CXCR4 mutado similar a WHIM presentaron resistencia a la terapia basada en ibrutinib (Cao *et al.*, 2013; Treon *et al.*, 2013). De manera importante, los inhibidores del proteasoma fueron igualmente eficaces para ejercer toxicidad contra las células de MW mutadas con *C1013G/CXCR4* y las células de control (Figuras 13E-F).

## 35 EJEMPLO 5

*Direccionamiento de células de MW por el anticuerpo anti-CXCR4 BMS-936564*

40 Basándose en la relevancia biológica de CXCR4 para respaldar la progresión de MW, el anticuerpo monoclonal humano anti-CXCR4 BMS-935564 (designado F7 en el documento WO 2008/060367; también conocido como ulocuplumab o MDK-1338) se sometió a ensayo para determinar la actividad en el direccionamiento de las células de MW. Se realizaron ensayos para medir la adhesión, la migración y la proliferación de células de MW como se describe en el Ejemplo 2 y se realizaron estudios de expresión génica como se desvela en el Ejemplo 3.

45 *Inmunotransferencia*

Se obtuvieron lisados proteicos de células de MW mediante homogeneización en condiciones no desnaturizantes en tampón de lisis (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) complementado con NaF 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, PMSF 1 mM (fluoruro de polimetilsulfonilo), leupeptina 5 µg/ml y aprotinina 5 µg/ml. Se sometieron lisados de células enteras a electroforesis en gel de dodecilsulfato poliacrilamida de sodio (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Los anticuerpos utilizados para la inmunotransferencia incluyeron: anticuerpos anti-fosfo(p)-ERK, anti-ERK, anti-p-Akt, anti-Akt, anti-p-Src, anti-Src, anti-caspasa-9, anti-PARP, anti-p-β-catenina, anti-β-catenina, anti-p-GSK3, anti-GAPDH y anti-α-tubulina (Cell Signaling, Danvers, MA).

55

*Resultados*

60 Se demostró que BMS-936564 inhibe la migración de estirpes de células de MW hacia BM-MS-C o SDF-1 de MW (Figuras 14A, B).

De forma similar, se demostró la inhibición dependiente de BMS-936564 de la adhesión de células de MW a BM-MS-C de MW y la inhibición de la proliferación de células de MW en presencia de BM-MS-C de MW (Figuras 15A-C).

65 Para diseccionar el posible papel de BMS-936564 en afectar a la señalización de MW se cultivaron células de MW en ausencia o presencia de BM-MS-C MW primaria, con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-CXCR4. Se observó una inhibición dependiente del fármaco de p-Akt, p-ERK y p-Src en células de MW cultivadas en el contexto

de BM-MS-C, lo que sugiere la capacidad de BMS-936564 para dirigirse a células de MW incluso en el contexto del entorno de la MO (Figura 16).

El control de isotipo no ejerció ningún efecto sobre la adhesión y la migración de células de MW *in vitro* (Figuras 17A, B).

BMS-936564 puede ejercer un efecto pro-apoptótico en tumores malignos de células B (documento WO 2013/071068; Kuhne *et al.*, 2013). Por tanto, las células de MW se expusieron a BMS-936564, lo que dio como resultado un aumento de la escisión de caspasa-9 y PARP (Figura 18).

La interacción entre SDF1/CXCR4 y  $\beta$ -catenina se ha demostrado anteriormente en modelos de tumores sólidos metastásicos (Wang *et al.*, 2011). Además, se sabe que la GSK3 $\beta$  fosforilada facilita la degradación de la  $\beta$ -catenina (Wang *et al.*, 2011; Polakis, 2001). Por tanto, se investigó el efecto de BMS-936564 sobre la  $\beta$ -catenina. Se descubrió que neutralizando CXCR4 con BMS-936564, las células de MW se presentan con un fosfo(p)-GSK3- $\beta$  aumentada y regulación positiva de p- $\beta$ -catenina, conduciendo a la degradación de  $\beta$ -catenina (Figura 19). Estos hallazgos pueden explicar, al menos en parte, los posibles mecanismos de la apoptosis inducida por BMS-936564 en células de MW.

#### EJEMPLO 6

##### *Efecto de BMS-936564 sobre células C1013G/CXCR4-WM in vitro e in vivo*

##### *Estudios in vivo*

Se inyectaron ratones SCID/Bg (n = 5/grupo) con BCMW.1 infectado con LentiORF/CXCR4/GFP de precisión (CXCR4<sup>+</sup>) o con células BCMW.1 infectadas con sonda de vector vacío/RFP (control). Después de tres semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los órganos. Se realizó una tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para CD20 y CXCR4 humanos en órganos explantados. Se realizaron experimentos independientes para evaluar las diferencias en la supervivencia (ratones SCID/Bg, n = 7/grupo). Se realizaron estudios similares usando células mutadas C1013/CXCR4 y células infectadas con vectores de control (células de control). Se realizaron estudios de localización *in vivo* usando células BCMW.1-mCherry<sup>+</sup>: se inyectaron células por vía intravenosa en ratones SID/Bg y se trataron con BMS-936564 o con anticuerpo de control (10 mg/kg, por vía intraperitoneal; 3-4 veces por semana durante 3 semanas). La capacidad de BMS-936564 para modular la localización de MW en MO, bazo y ganglios linfáticos se evaluó *ex vivo* a la tercera semana en tejidos explantados, usando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Melville, NY) (Roccaro *et al.*, 2013).

La actividad de BMS-936564 se sometió a ensayo en ratones SCID/Bg inyectados con células mutadas con C1013G/CXCR4. Los controles de ratones se trataron con anticuerpo de control de isotipo (n = 5 ratones/grupo; BMS-936564 o anticuerpo de control (10 mg/kg, por vía intraperitoneal; 3-4 veces por semana durante 3 semanas).

##### *Resultados*

El efecto de BMS-936564 sobre células de MW mutadas con CXCR4 se examinó *in vivo*. BMS-936564 inhibió la diseminación de MW en ratones inyectados con células de MW C1013G/CXCR4 como se demuestra por la reducción significativa de la infiltración de células CXCR4<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup> en fémur, hígado, riñón y pulmón en ratones tratados en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control (Figuras 19A-E; Figuras 20A-D). De manera importante, la participación de los ganglios linfáticos estaba ausente en los ratones tratados con BMS-936564 (Figura 20E).

Estos hallazgos se confirmaron adicionalmente *in vitro*. Se descubrió que BMS-936564 es igualmente activo para dirigirse a la adhesión, la migración y las propiedades proliferativas de las células mutadas con CXCR4 en el contexto del microambiente de la MO (Figuras 21A-D).

De manera importante, BMS-936564 aumentó la escisión de caspasa-9 y PARP en células de MW mutadas con CXCR4; y también moduló la señalización de GSK3- $\beta$ / $\beta$ -catenina, conduciendo a la regulación positiva de p-GSK3- $\beta$ /p- $\beta$ -catenina y la degradación de  $\beta$ -catenina (Figura 22). Además, BMS-936564 indujo una inhibición dependiente de la dosis de p-ERK, p-Akt y p-Src en células de MW que albergaban la mutación C1013G/CXCR4 (Figura 22).

#### EJEMPLO 7

##### *Efecto de BMS-936564 sobre células de MW de tipo silvestre in vivo*

La actividad anti-MW de BMS-936564 también se sometió a ensayo *in vivo* usando células de MW de tipo silvestre. Se inyectaron células BCMW.1-mCherry<sup>+</sup> por vía intravenosa en ratones SCID/Bg y los ratones tratados con BMS-936564 o anticuerpo de control. Las imágenes de inmunofluorescencia de la MO, el bazo y los ganglios linfáticos recogidos demostraron la capacidad de BMS-936564 para inhibir la diseminación de células de MW *ex vivo* (datos no mostrados; Roccaro *et al.*, 2014).

Como se cree que la inhibición de CXCR4 induce la movilización de células madre y células tumorales, se planteó la hipótesis de que BMS-936564 también puede inducir la movilización de células de MW que conducen a una mayor quimiosensibilidad a los agentes anti-MW. En consecuencia, el efecto de BMS-936564 en la modulación de la progresión tumoral y la diseminación de células de MW a nichos distantes de la MO *in vivo* se evaluó como monoterapia o en combinación con bortezomib. (El bortezomib se obtuvo de Hospital Pharmacy, se diluyó en DMSO y se almacenó a -20 °C hasta su uso, después se diluyó en medio de cultivo inmediatamente antes de su uso. La concentración final máxima de DMSO (<0,1 %) no afectó a la proliferación celular y no indujo citotoxicidad en las estirpes celulares sometidas a ensayo (datos no mostrados).

Los ratones tratados con BMS-936564 presentaron una reducción significativa de las células tumorales dentro de la MO, con efectos similares observados en los ratones tratados con bortezomib y con una inhibición más significativa en los ratones tratados con una combinación de BMS-936564 y bortezomib ( $P < 0,05$ ; Figura 23A). De forma similar, los niveles de IgM sérica se redujeron significativamente cuando los ratones se trataron con BMS-936564 o bortezomib, pero se redujeron incluso más significativamente en los ratones expuestos tanto a BMS-936564 como a bortezomib ( $P < 0,05$ ; Figura 23B). Un examen más detallado de los efectos combinados de BMS-936564 y bortezomib para inducir toxicidad en células de MW confirmó una interacción sinérgica *in vitro* (Figuras 23C, D).

#### REFERENCIAS

Alapi K et al. (2007) *Recurrent CXCR4 sequence variation in a girl with WHIM syndrome. Eur J Haematol.* 78(1): 86-8.

Alsayed Y et al. (2007) *Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. Blood* 109(7): 2708-17.

Azab AK 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: 4341-51.

Azab F et al. (2012) *Eph-B2/ephrin-B2 interaction plays a major role in the adhesion and proliferation of Waldenström's macroglobulinemia. Clin Cancer Res* 18(1):91-104.

Balabanian K. et al. (2005) *WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. Blood* 105: 2449-57.

Balabanian K et al. (2008) *Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. J Clinical Invest* 118: 1074-84.

Bertolini F et al. (2002) *CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res* 62(11): 3106-12.

Burger JA et al. (1999) *Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. Blood* 94: 3658-67.

Campo E et al. (2011) *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood* 117: 5019-32.

Cao Y et al. (2012) *Whole genome sequencing identifies recurring somatic mutations in the C-terminal domain of CXCR4, including a gain of function mutation in Waldenström's macroglobulinemia. Blood* 120: Resumen.

Cao Y et al. (2013) *Somatic activating mutations in CXCR4 are common in patients with Waldenström's macroglobulinemia, and their expression in WM cells promotes resistance to ibrutinib. [resumen]. Blood* 122(21): Resumen 4424.

Chng WJ et al. (2008) *Gene-expression profiling of Waldenström macroglobulinemia reveals a phenotype more similar to chronic lymphocytic leukemia than multiple myeloma. Blood* 108(8):2755-63.

Crazzolara R 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.

Dar A et al. (2011) *Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells. Leukemia* 25(8): 1286-96.

Dimopoulos MA et al. (2007) *Primary treatment of Waldenström macroglobulinemia with dexamethasone, rituximab, and cyclophosphamide. J Clin Oncol* 25(22): 3344-9.

- Downward J (2003) *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer* 3(1):11-22.
- Geminder et al. (2001) *A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. J Immunol* 167: 4747-57.
- 5 Ghobrial IM et al. (2003) *Waldenström macroglobulinaemia. Lancet Oncol* 4: 679-85.
- Gutierrez NC et al. (2007) *Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenström's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. Leukemia* 21(3):541-49.
- 10 Hernandez PA et al. (2003) *Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. Nature Genetics* 34: 70-4.
- Hiller DJ et al. (2011) *Chemokine receptor CXCR4 level in primary tumors independently predicts outcome for patients with locally advanced breast cancer. Surgery* 150(3): 459-65.
- Hollinger et al. (2005) *Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotech* 23(9): 1126-36.
- 20 Hsieh AC et al. (2012) *The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. Nature* 485: 55-61.
- Hunter Z et al. (2014) *The genomic landscape of Waldenström macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. Blood* 123(11):1637-46.
- 25 Hwang JH et al. (2003) *CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. J Clin Endocrinol Metab* 88:408-16.
- 30 Jiang YP et al. (2006) *Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. Gynecol Oncol* 103(1): 226-33.
- Jin L 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.
- 35 Johnson J and Wu TT (2000) *Kabat Database and its applications: 30 years after the first variability plot. Nucl Acids Res* 28(1): 214-8.
- 40 Kabat EA et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento Sanidad y Servicios sociales de los EE.UU., Publicación de la NIH N.º 91-3242.
- Koshiba T et al. (2000) *Clin Cancer Res* 6: 3530-5.
- 45 Kuhne MR 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.
- Laverdiere C et al. (2005) *Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. Clin Cancer Res* 11: 2561-7.
- 50 Leleu X et al. (2008) *Targeting NF-κB in Waldenström's macroglobulinemia. Blood* 111(10):5068-77.
- Libura J et al. (2002) *CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion. Blood* 100: 2597-606.
- 55 Lim KH y Counter CM (2005) *Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. Cancer Cell* 8(5):381-92.
- Marechal R et al. (2009) *High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. Brit J Cancer* 100(9): 1444-51.
- 60 Mohle R et al. (1998) *The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. Blood* 91(12): 4523-30.
- 65 Mohle R 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.
- Muller A et al. (2001) *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature* 410: 50-6.
- 5 Murphy PM (2001) *Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. New Engl J Med* 345(11): 833-5.
- Ngo HT et al. (2008) *SDF-1/CXCR4 and VLA-4 interaction regulates homing in Waldenström macroglobulinemia. Blood* 112: 150-8.
- 10 Olafsen et al. (2010) *Antibody vectors for imaging. Semin Nucl Med* 40(3): 167-81.
- Ottiano A et al. (2006) *Overexpression of both CXC chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage M-III colorectal cancer patients. Clin Cancer Res* 12(9): 2795-803.
- 15 Paiva B et al. (2013) *Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. Leukemia* 28(1):166-73.
- Publicación PCT N.º WO 2008/060367, publicada el 22 de mayo de 2008 por Medarex, Inc.
- 20 Publicación PCT N.º WO 2013/071068, publicada el 16 de mayo de 2013 por Bristol-Myers Squibb Co.
- Polakis P (2001) *More than one way to skin a catenin. Cell* 105: 563-6.
- 25 Rempel SA et al. (2000) *Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. Clin Cancer Res* 6: 102-11.
- Rizki A et al. (2008) *A human breast cell model of preinvasive to invasive transition. Cancer Res* 68: 1378-87.
- 30 Roccaro AM et al. (2008) *Dual targeting of the proteasome regulates survival and homing in Waldenström macroglobulinemia. Blood* 111: 4752-63.
- Roccaro AM et al. *microRNA expression in the biology, prognosis, and therapy of Waldenström macroglobulinemia. Blood* 113(18):4391-402.
- 35 Roccaro AM et al. (2010) *Dual targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway as an antitumor strategy in Waldenström macroglobulinemia. Blood* 115: 559-69.
- Roccaro AM et al. (2013) *BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. J Clin Invest* 123: 1542-55.
- 40 Roccaro AM et al. (2014) *C1013G/CXCR4 acts as a driver mutation of tumor progression and modulator of drug resistance in lymphoplasmacytic lymphoma. Blood* 123(26):4120-31.
- 45 Rombouts EJC et al. (2004) *Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. Blood* 104: 550-7.
- Sacco A et al. (2011) *Carfilzomib-dependent selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome leads to antitumor activity in Waldenström's Macroglobulinemia. Clin Cancer Res* 17: 1753-64.
- 50 Scala S et al. (2005) *Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. Clin Cancer Res* 11: 1835-41.
- Schrader AJ et al. (2002) *CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. Br J Cancer* 86: 1250-6.
- 55 Scotton C et al. (2001) *Analysis of CC chemokine and chemokine receptor expression in solid ovarian tumours. Br J Cancer* 85: 891-7.
- Spano JP et al. (2004) *Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: patrón de expresión y correlación con el resultado. Ann Oncol* 15: 613-7.
- 60 Spoo AC et al. (2007) *CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. Blood* 109(2): 786-91.
- Staller P et al. (2003) *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature* 425: 307-11.
- 65

- Subramanian A et al. (2005) *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genomewide expression profiles. Proc Natl Acad Sci USA* 102:15545-50.
- 5 Taichman RS et al. (2002) *Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. Cancer Res* 62: 1832-7.
- Taniuchi S et al. (2005) *The role of a mutation of the CXCR4 gene in WHIM syndrome. Haematologica* 90: 1271-2.  
Treon SP (2009) *How I treat Waldenström macroglobulinemia. Blood* 114(12): 2375-85.
- 10 Treon SP et al. (2009) *Primary therapy of Waldenström macroglobulinemia with bortezomib, dexamethasone, and rituximab: WMCTG clinical trial 05-180. J Clin Oncol* 27(23): 3830-5.
- Treon SP et al. (2012) *MYD88/L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. N Engl J Med* 367(9):826-33.
- 15 Treon SP et al. (2013) *A prospective multicenter study of the bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in patients with relapsed or refractory Waldenström's macroglobulinemia [resumen]. Blood* 122(21): Resumen 251.
- 20 Treon SP et al. (2014) *Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström's macroglobulinemia Blood.* 123(18):2791-6.
- van Dongen JJ et al. (2012) *EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia* 26: 1908-75.
- 25 Vijay A y Gertz MA (2007) *Waldenström macroglobulinemia. Blood* 109: 5096-113.
- Wang N et al. (2005) *Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome. J Transl Med* 3: 26-33.
- 30 Wang L et al. (2011) *Influence of CXCR4/SDF-1 axis on E-cadherin/beta-catenin complex expression in HT29 colon cancer cells. World J Gastroenterol* 17: 625-32.
- Wang W et al. (2007) *Coordinated regulation of pathways for enhanced cell motility and chemotaxis is conserved in rat and mouse mammary tumors. Cancer Res* 67: 3505-11.
- 35 Weng AP et al. (2003) *CXCR4/CD184 immunoreactivity in T-cell non-Hodgkin lymphomas with an overall Th1-Th2+ immunophenotype. Am J Clin Pathol* 119: 424-30.
- 40 Yang G et al. (2013) *A mutation in MYD88 (L265P) supports the survival of lymphoplasmacytic cells by activation of Bruton tyrosine kinase in Waldenström's macroglobulinemia. Blood* 122(7):1222-32.
- Zeelenberg IS et al. (2003) *The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. Cancer Res* 63: 3833-9.
- 45 Zeng Z et al. (2009) *Targeting the leukemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. Blood* 113(24): 6215-24.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un receptor de quimiocina C-X-C de tipo 4 (CXCR4) expresado sobre la superficie de una célula de macroglobulinemia de Waldenström para su uso en el tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenström asociada a C1013G/CXCR4 en un sujeto.
- 10 2. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende administrar el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo como monoterapia.
- 15 3. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende adicionalmente administrar al menos un agente antineoplásico en combinación con el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo.
- 20 4. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el al menos un agente antineoplásico es rituximab, bortezomib, carfilzomib, ibrutinib, idelalisib, panobinostat, talidomida, lenalidomida, clorambucilo, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, fludarabina, bendamustina, dexametasona, cladribina, alemtuzumab, ofatumumab, everolimus, cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, mitoxantrona, etopósido, citarabina, ifosfamida, carboplatino y/o etopósido.
- 25 5. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el tratamiento comprende administrar el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo después del fracaso de un tratamiento previo para la macroglobulinemia de Waldenström, opcionalmente en donde el tratamiento previo es con un agente seleccionado entre una diana de mamífero de un inhibidor de rapamicina (mTOR), un inhibidor de la tirosina cinasa (BTK) de Bruton y un inhibidor de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K).
- 30 6. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el tratamiento comprende administrar una dosis de 0,1, 0,3, 0,5, 1, 3, 5, 10 o 20 mg/kg de peso corporal del anticuerpo o de la porción de unión a antígeno del mismo en un programa de dosificación de una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes.
- 35 7. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el tratamiento comprende:
- (a) seleccionar un sujeto que sea un candidato adecuado para el tratamiento, comprendiendo la selección:
- 40 (i) evaluar si las células en una muestra tisular de ensayo obtenida de tejido de macroglobulinemia de Waldenström en el sujeto portan una mutación C1013G en el gen CXCR4; y
- (ii) seleccionar el sujeto como un candidato adecuado basándose en la determinación de que las células de macroglobulinemia de Waldenström portan la mutación C1013G en el gen CXCR4; y
- 45 (b) administrar al sujeto seleccionado una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o de la porción de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a un receptor CXCR4 expresado sobre la superficie de una célula de macroglobulinemia de Waldenström asociada a C1013G/CXCR4.
- 50 8. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el sujeto se selecciona basándose en que se determina que las células de macroglobulinemia de Waldenström del sujeto portan la mutación C1013G en el gen CXCR4.
- 55 9. Un método para seleccionar un paciente de macroglobulinemia de Waldenström para el tratamiento con un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se unen específicamente a un receptor CXCR4 expresado sobre la superficie de una célula de macroglobulinemia de Waldenström, comprendiendo dicho método:
- (a) evaluar si las células en una muestra tisular de ensayo obtenida del tejido de macroglobulinemia de Waldenström en el paciente porta una mutación C1013G en el gen CXCR4; y
- 60 (b) seleccionar al paciente para el tratamiento basándose en la determinación de que las células de macroglobulinemia de Waldenström portan la mutación C1013G en el gen CXCR4.
10. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo o la porción del mismo comprenden los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
 Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln  
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser,

y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly  
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys.

5

11. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo o la porción del mismo comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia:

10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
 Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln  
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser,

y una región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia:

15

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly  
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys.

12. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo o la porción del mismo comprende un CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos de forma consecutiva que tienen la secuencia Ser Tyr Ser Met Asn, un CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys, un CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val, un CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala, un CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser, y un CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende aminoácidos unidos consecutivamente que tienen la secuencia Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr.

13. Un kit para su uso en el tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenström asociada a C1013G/CXCR4 en un sujeto, comprendiendo el kit:

- (a) una o más dosis de un anticuerpo anti-CXCR4 o una porción de unión a antígeno del mismo; e
- (b) instrucciones para usar el anticuerpo anti-CXCR4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y 10-12.

14. El kit para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
 Leu Ser Cys Ala Ala Ala Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln  
 Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Arg Thr Ile Tyr  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu  
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 Asp Tyr Gly Gly Gln Pro Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln  
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser,

y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 en una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos:

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr  
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro  
 Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly  
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys.

ES 2 742 079 T3

FIG. 1A

BMS-936564 de Fab de Anti-CXCR4/F7/MDX-1338 VH

Segmento V: 3-48  
 Segmento D: 4-23  
 Segmento J: JH6b

```

      Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
1 CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                     CDR1
                                     ~~~~~~
      R L S C A A A G F T F S S Y S M N W
55 AGA CTC TCC TGT GCA GCC GCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG

                                     CDR2
                                     ~~~~~~
      V R Q A P G K G L E W V S Y I S S R
109 GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT AGA

      CDR2
      ~~~~~~
      S R T I Y Y A D S V K G R F T I S R
163 AGT AGA ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

      D N A K N S L Y L Q M N S L R D E D
217 GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GAC GAG GAC

                                     CDR3
                                     ~~~~~~
      T A V Y Y C A R D Y G G Q P P Y Y Y
271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT TAC GGT GGT CAA CCC CCT TAC TAC TAC

      CDR3
      ~~~~~~
      Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
325 TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

FIG. 1B

BMS-936564 de Fab de Anti-CXCR4/F7/MDX-1338 VK

Segmento V: L15  
Segmento J: JK1

```

    A I R M T Q S P S S L S A S V G D R
1  GCC ATC CGG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                ~~~~~
    V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                ~~~~~
    Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

    CDR2
    ~~~~~
    Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                ~~~~~
    L T I S S L Q P E D F V T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GTA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

    CDR3
    ~~~~~
    Y N S Y P R T F G Q G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA

```

FIG. 2

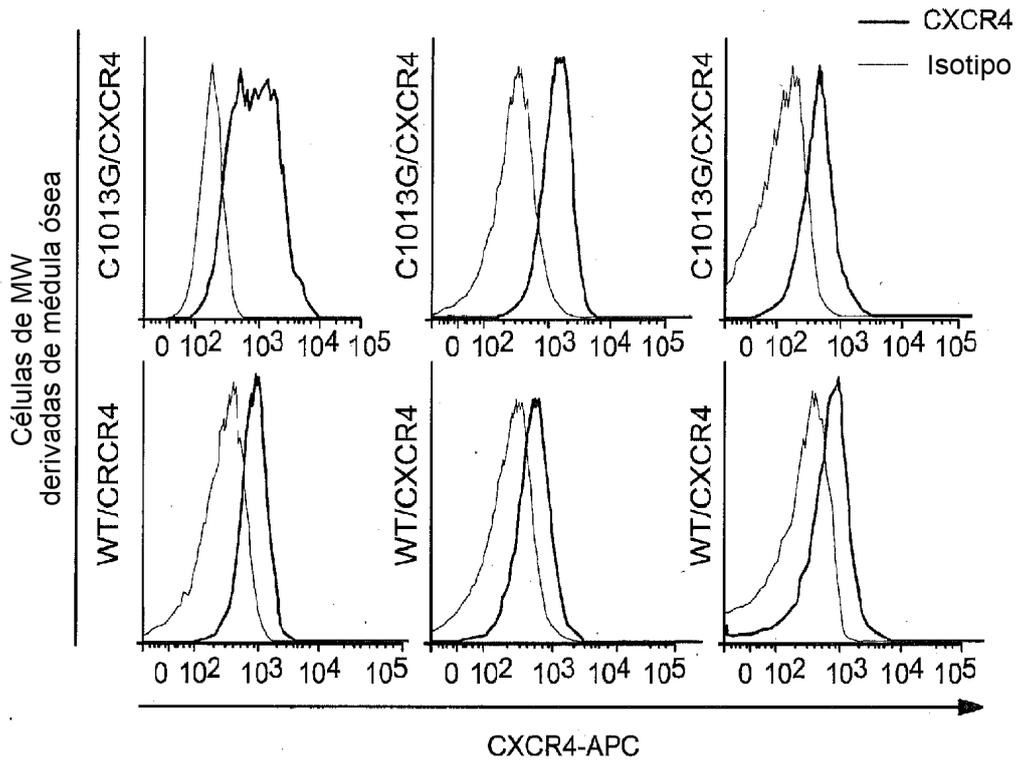
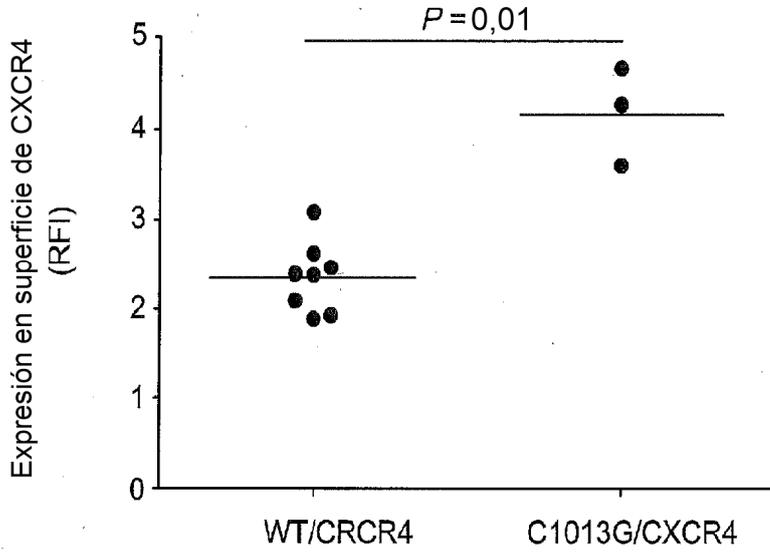


FIG. 3

P 0,04

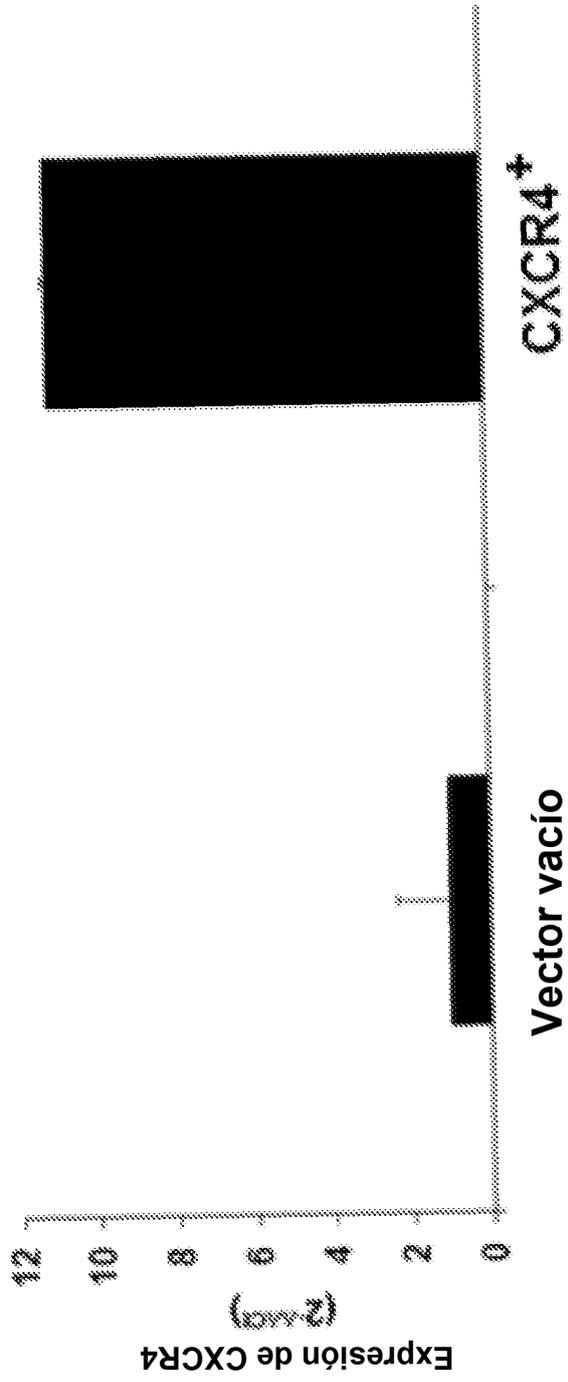


FIG. 4A

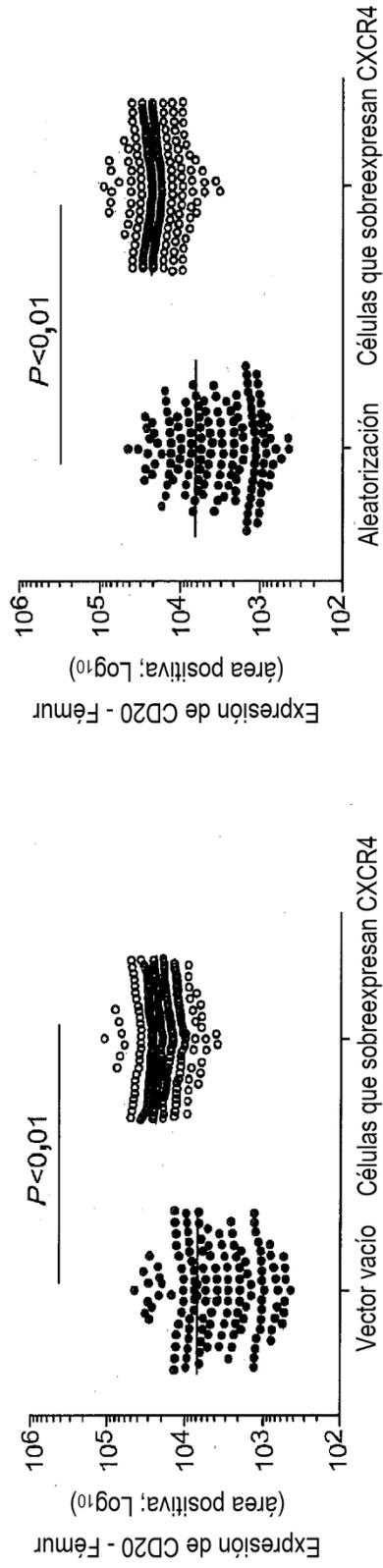


FIG. 4B

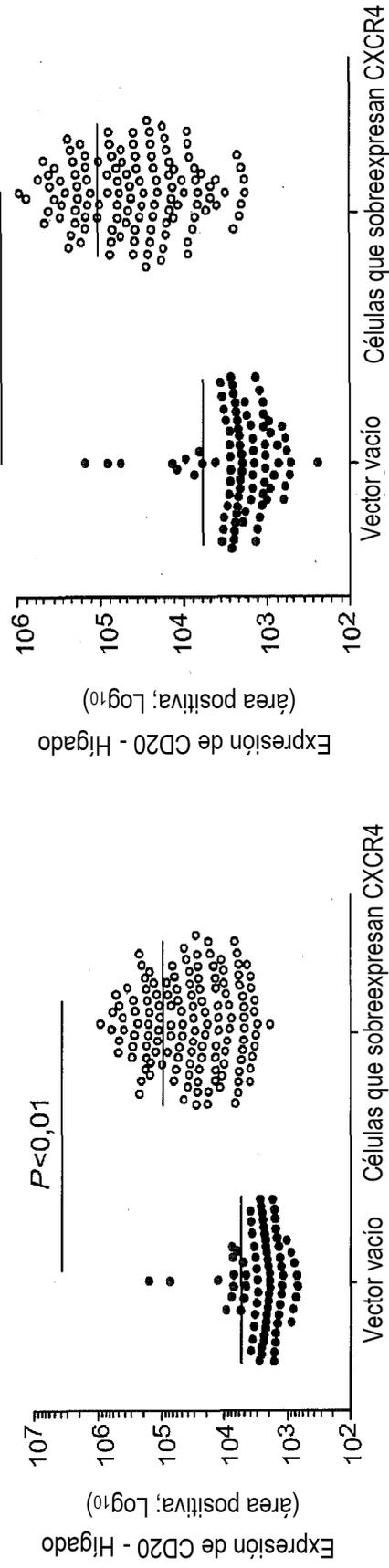


FIG. 4C

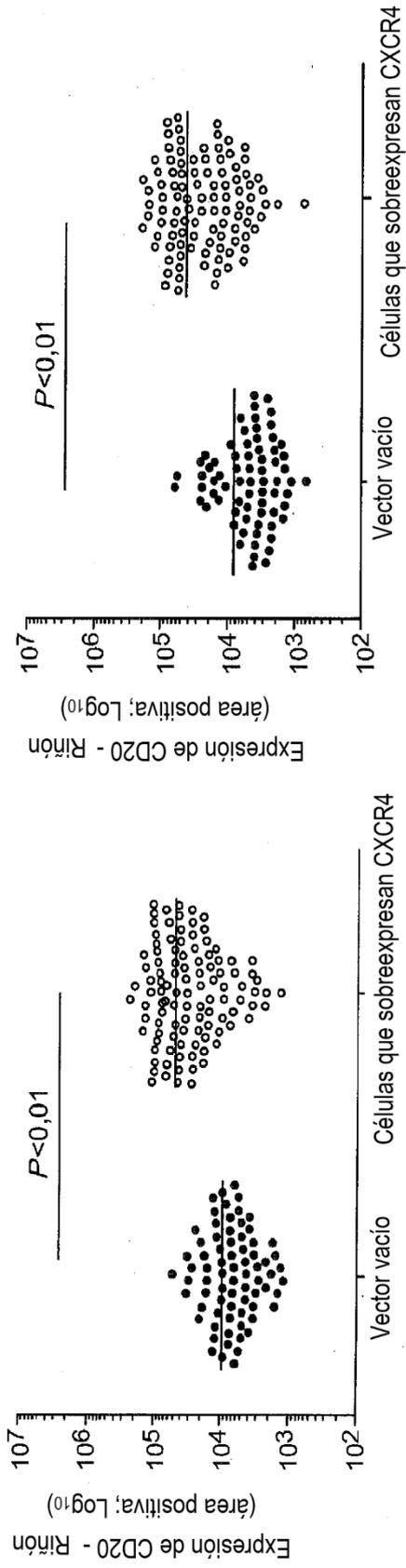


FIG. 4D

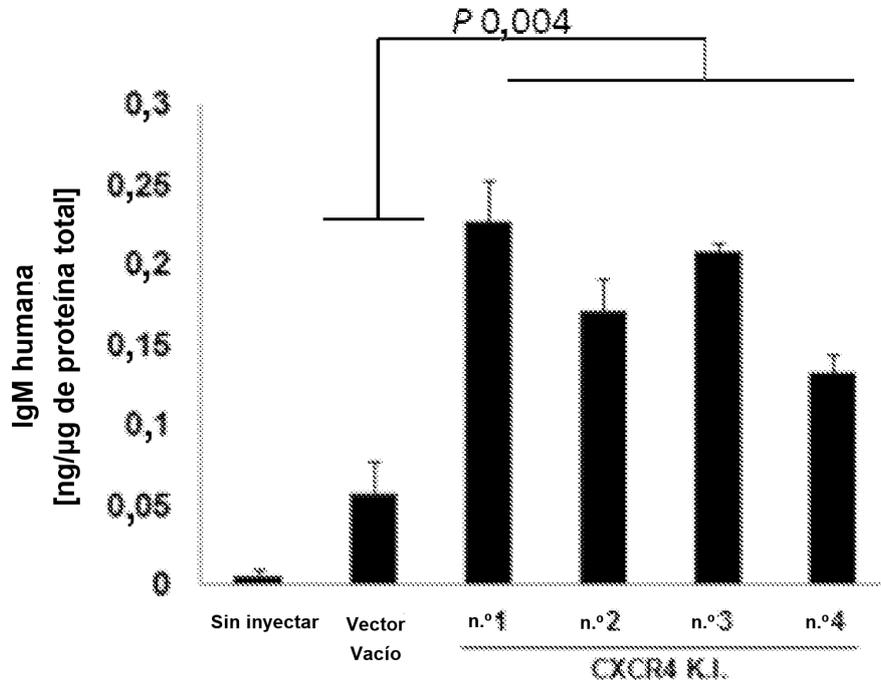


FIG. 4E

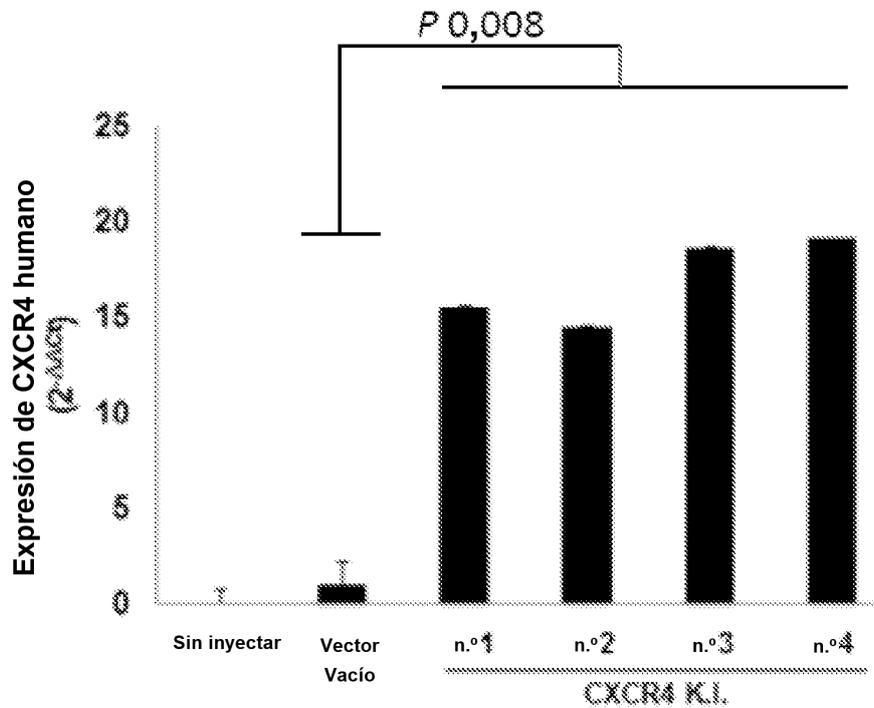


FIG. 5A-C

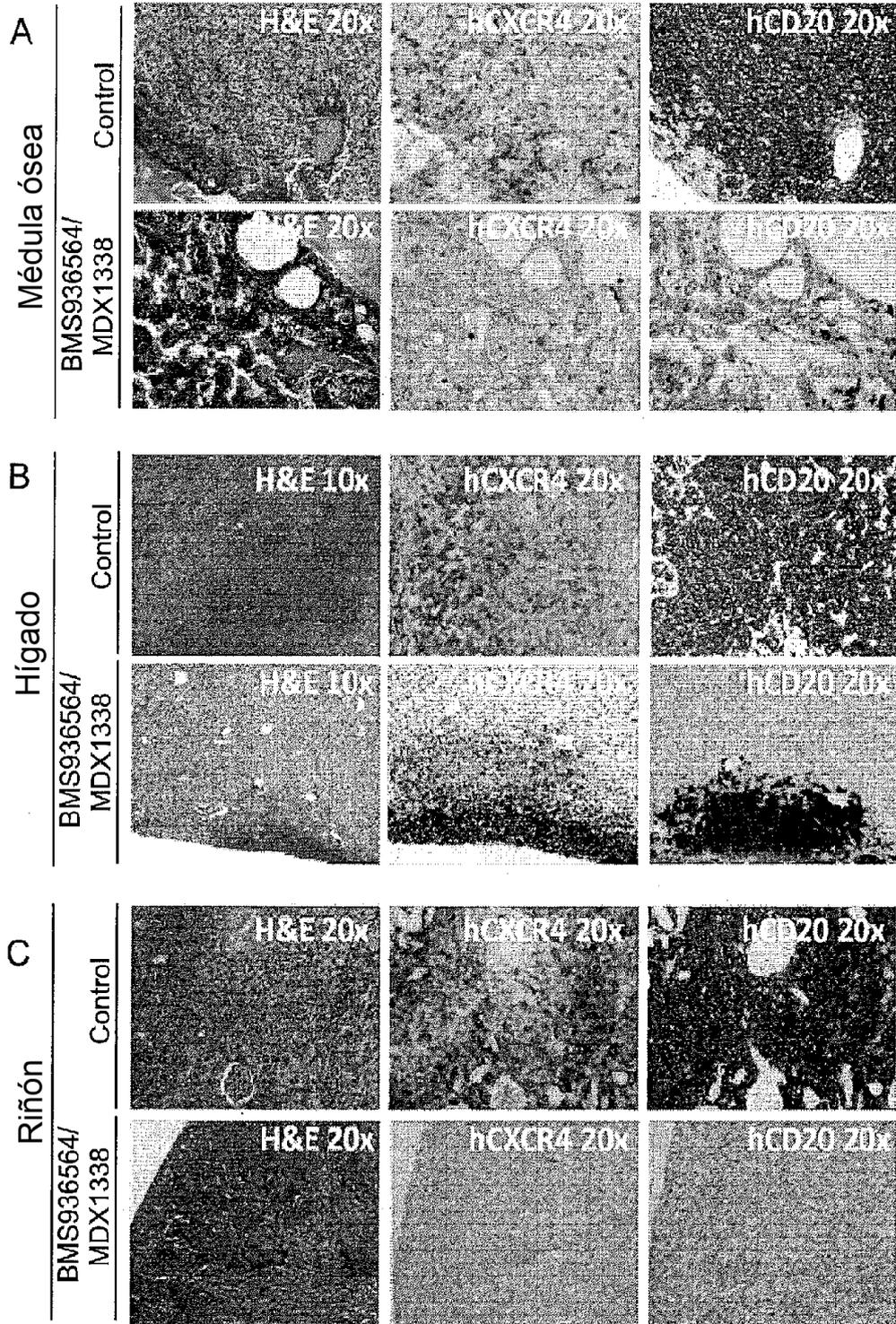


FIG. 5D

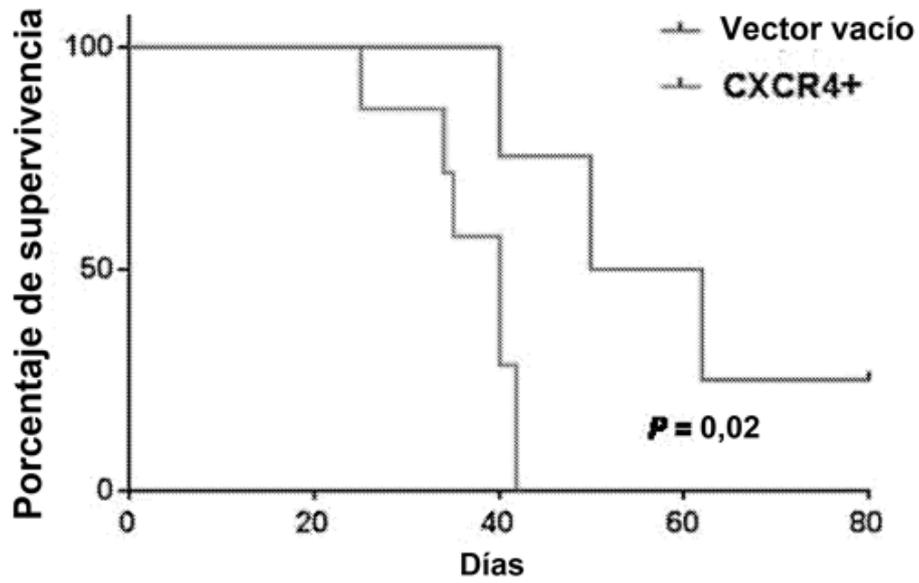


FIG. 5E

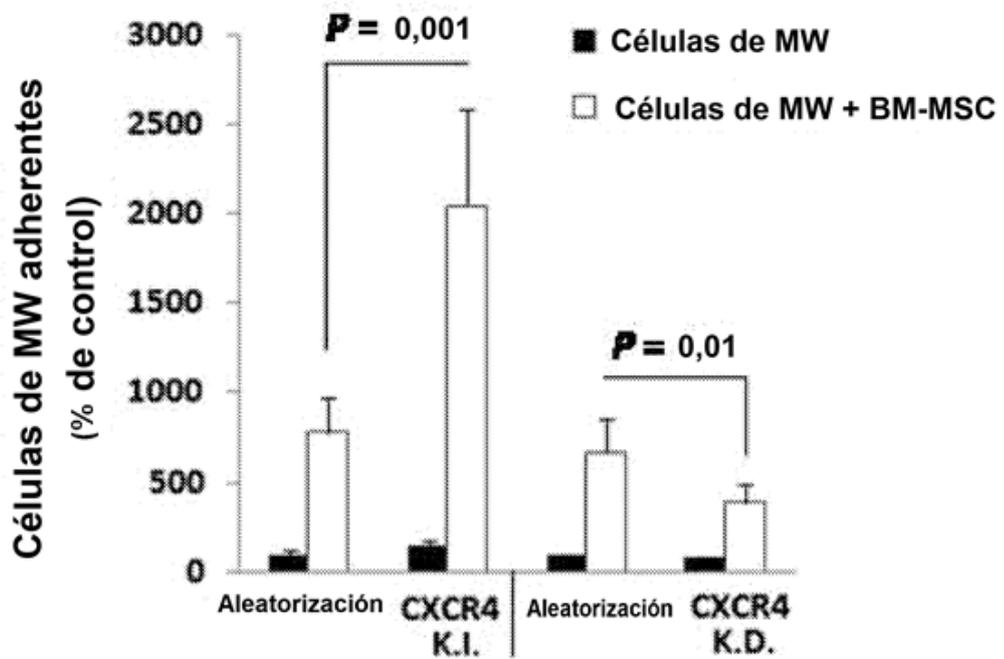


FIG. 5F

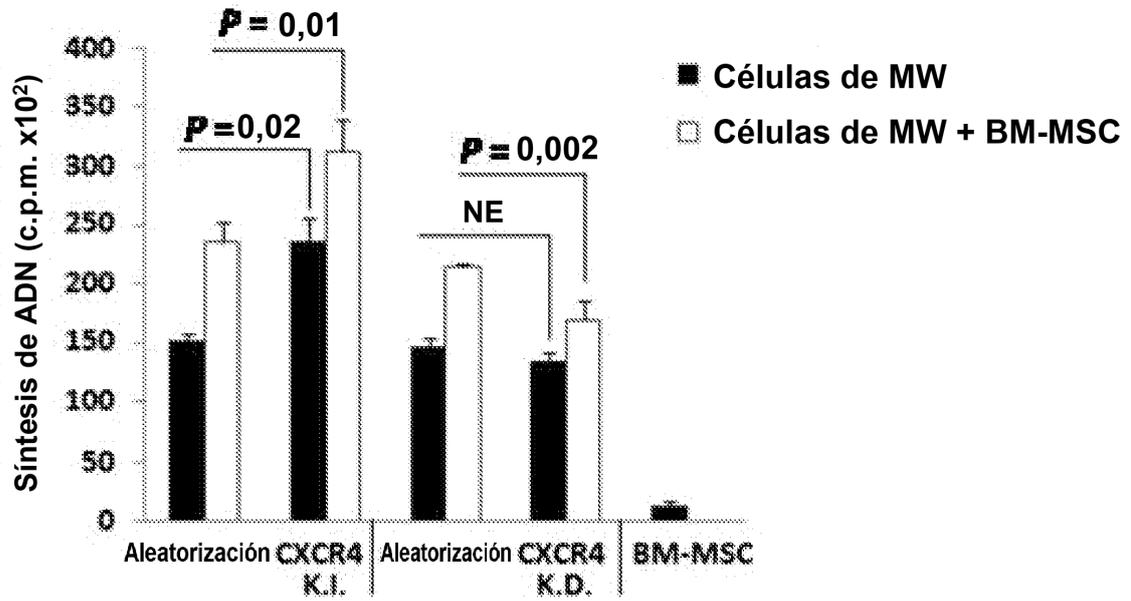
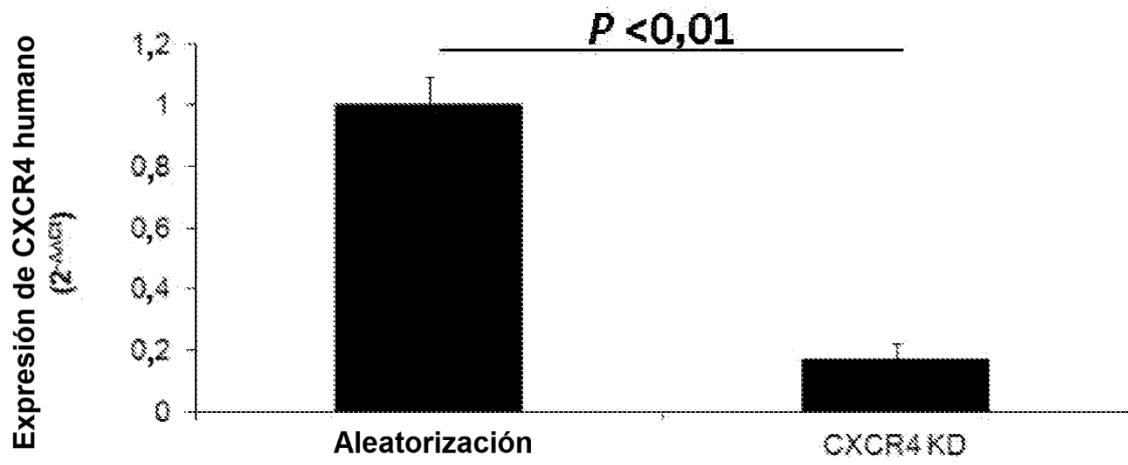


FIG. 6



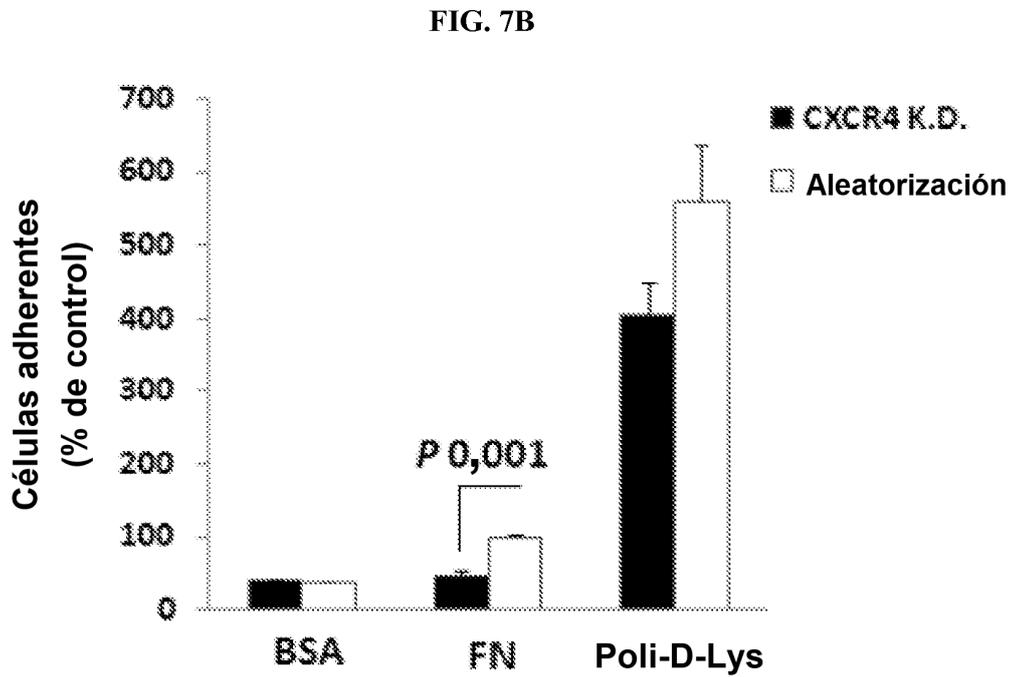
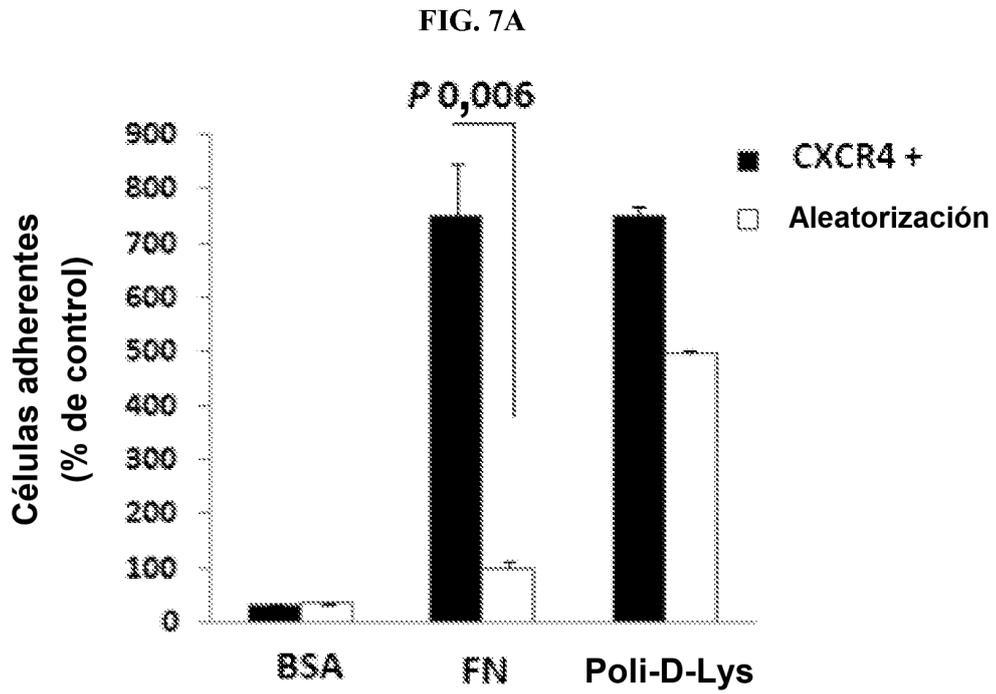


FIG. 8A

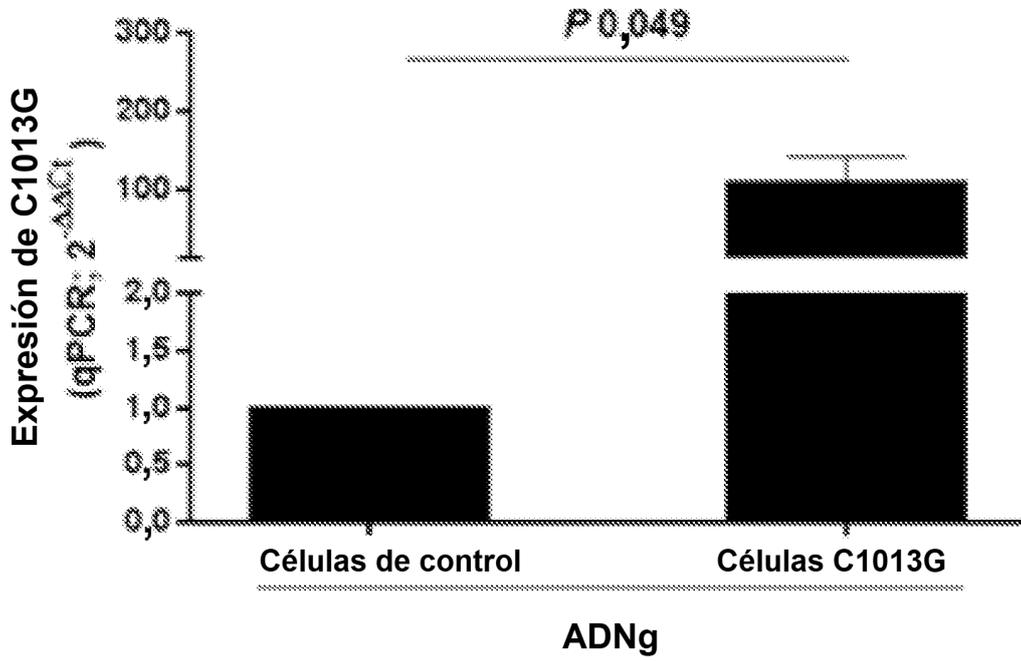
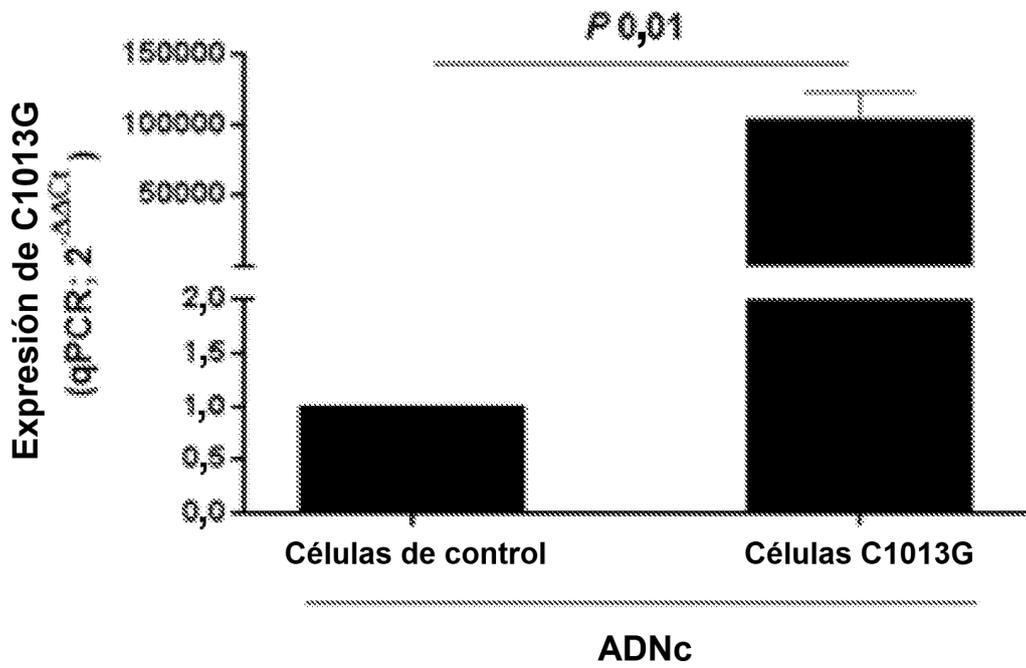
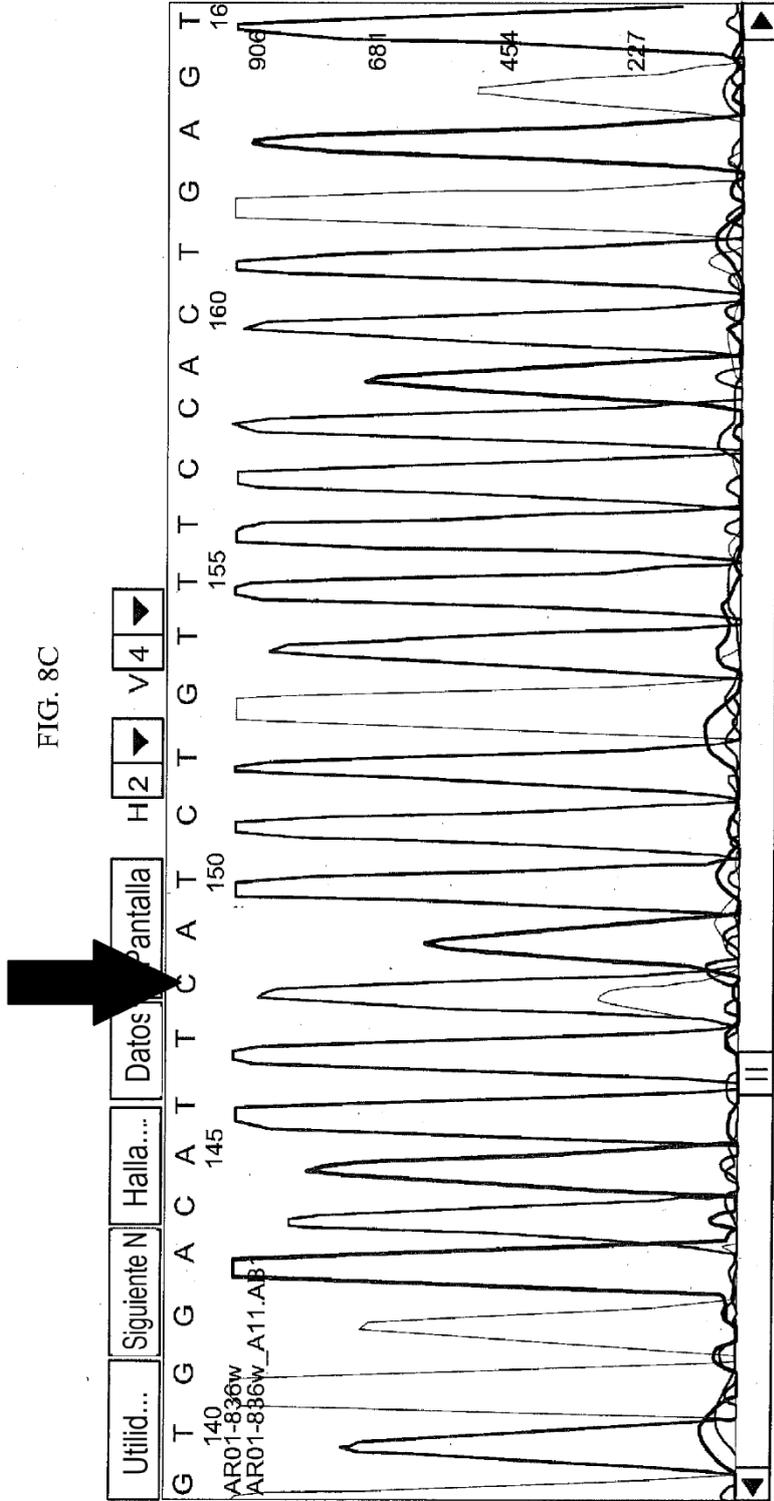
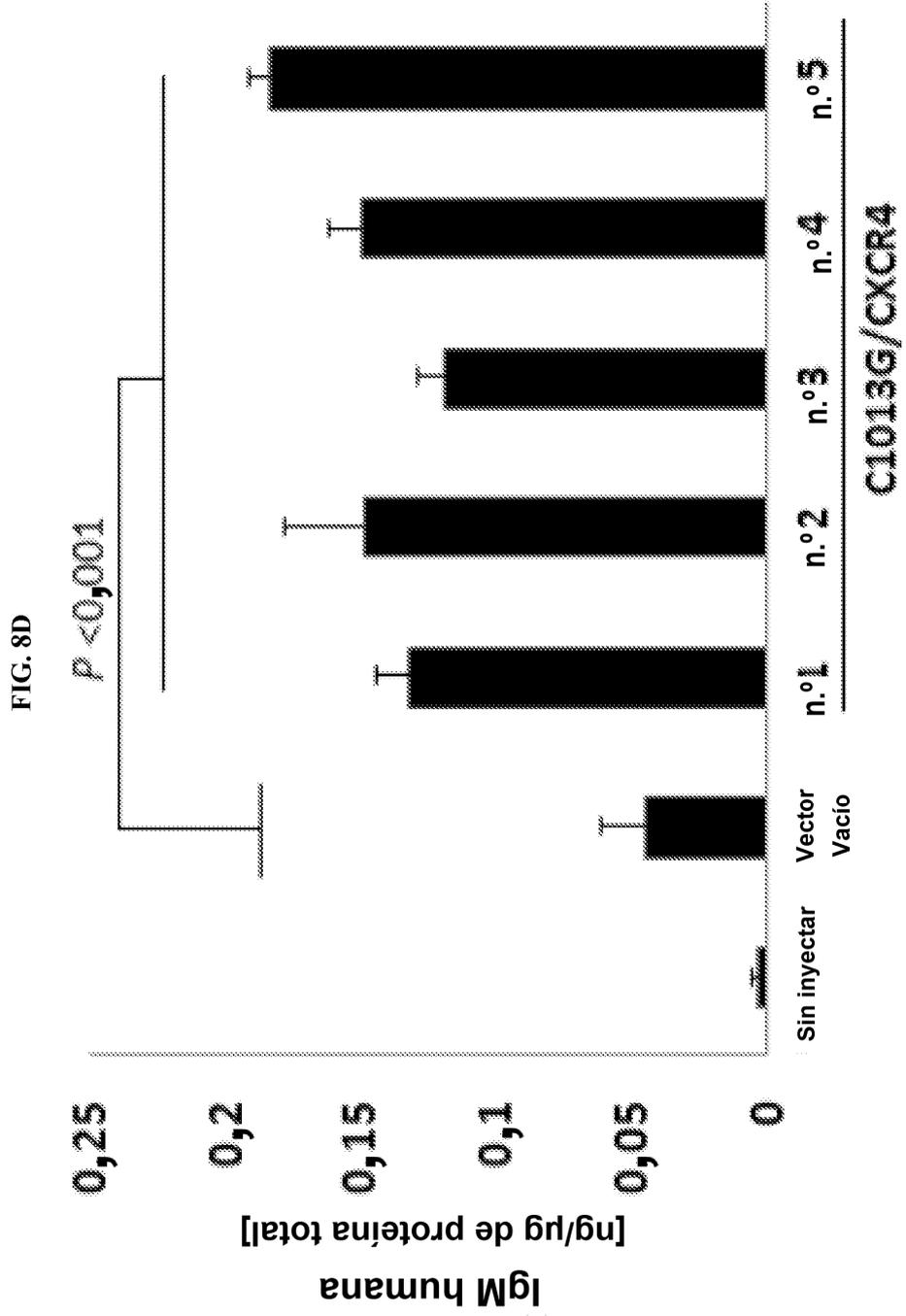


FIG. 8B







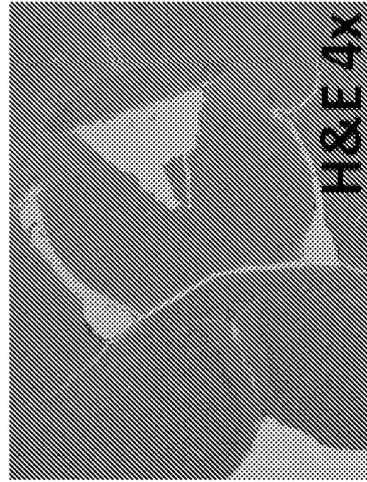
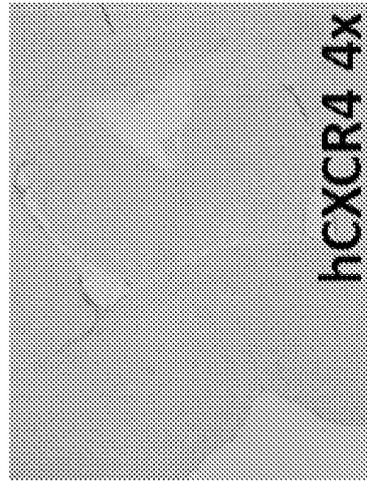
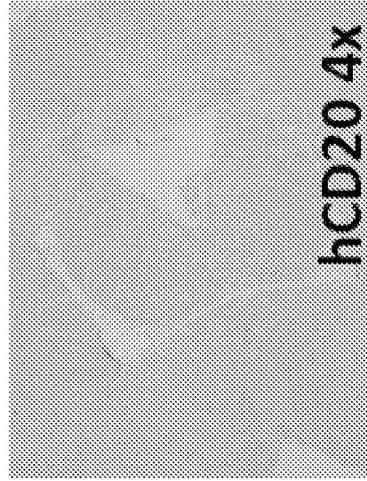


FIG. 8E

MÉDULA ÓSEA  
(C1013G/CXCR4)

FIG. 9A-E

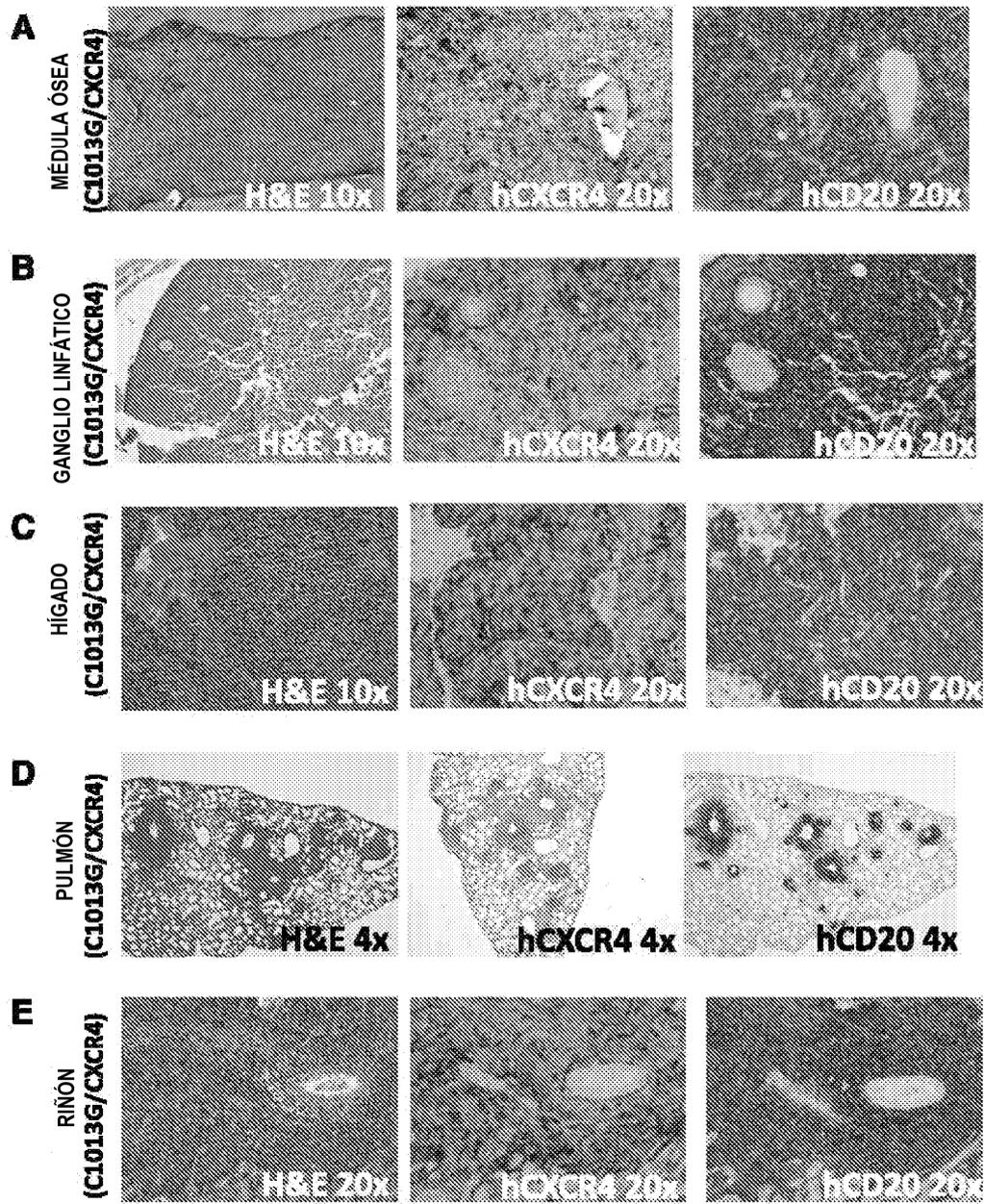


FIG. 9F

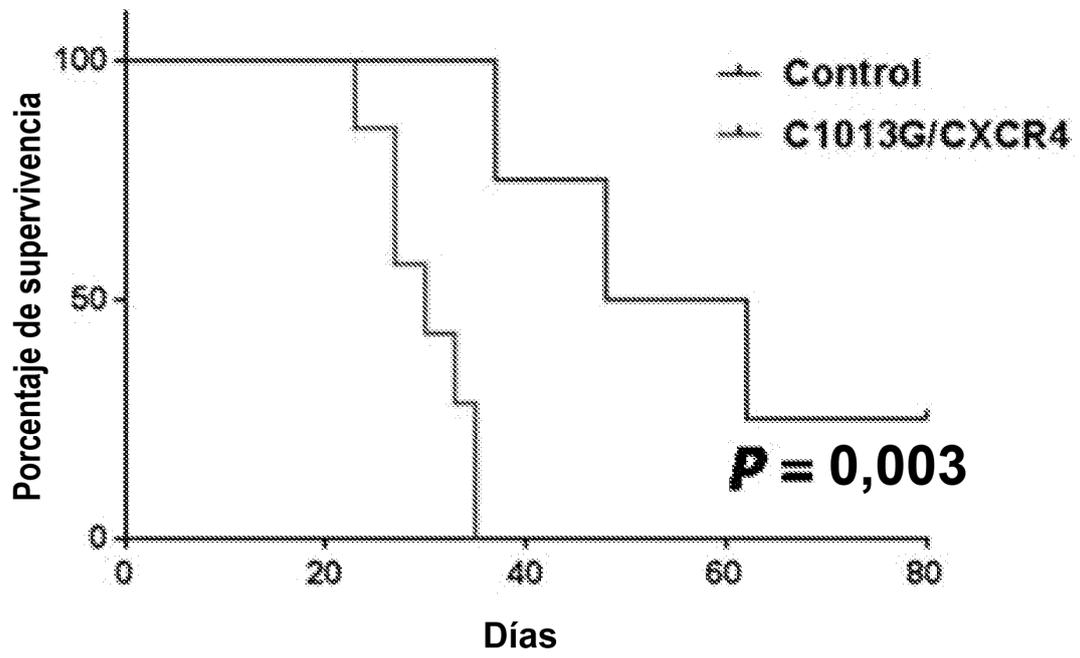


FIG. 10

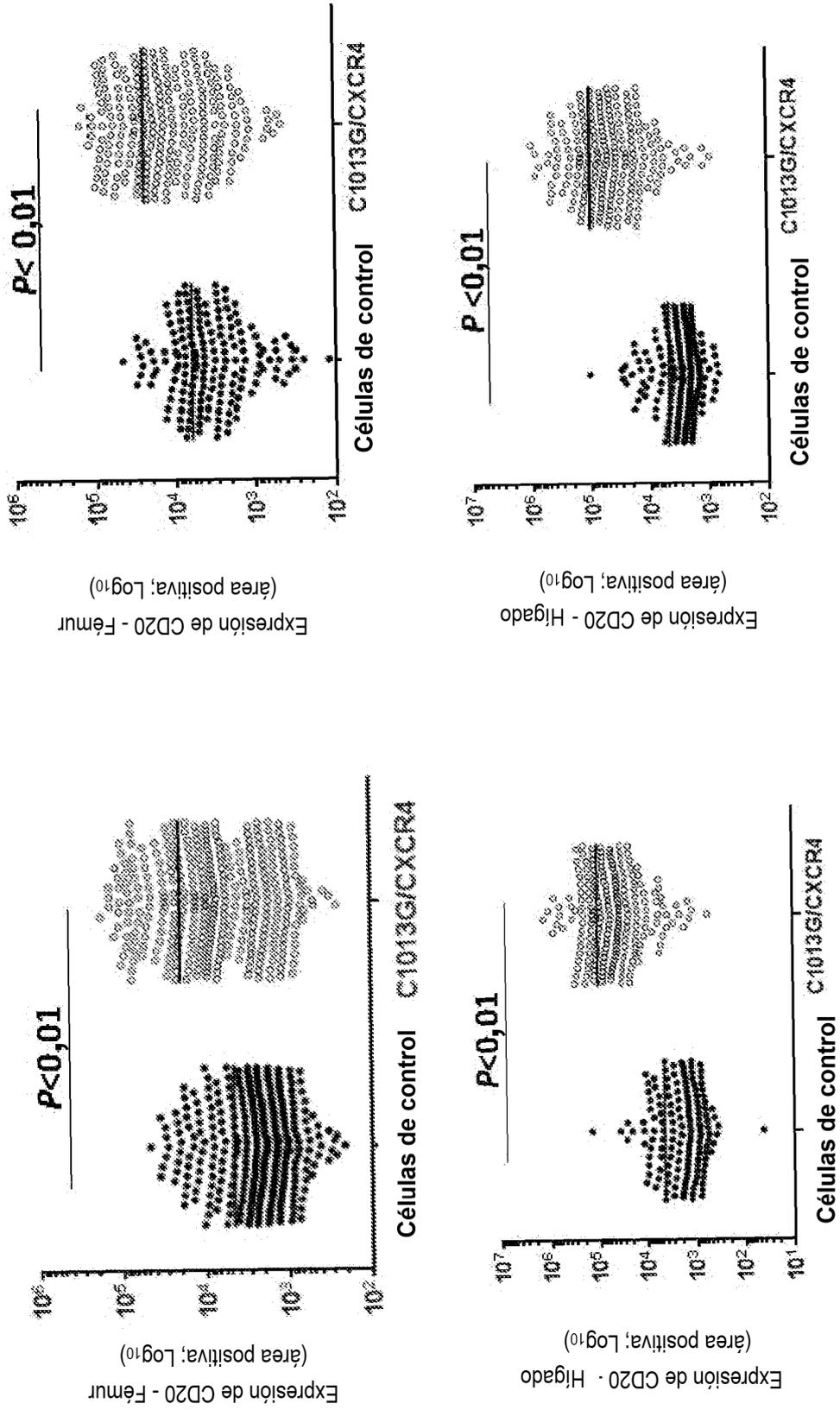


FIG. 10 (continuación)

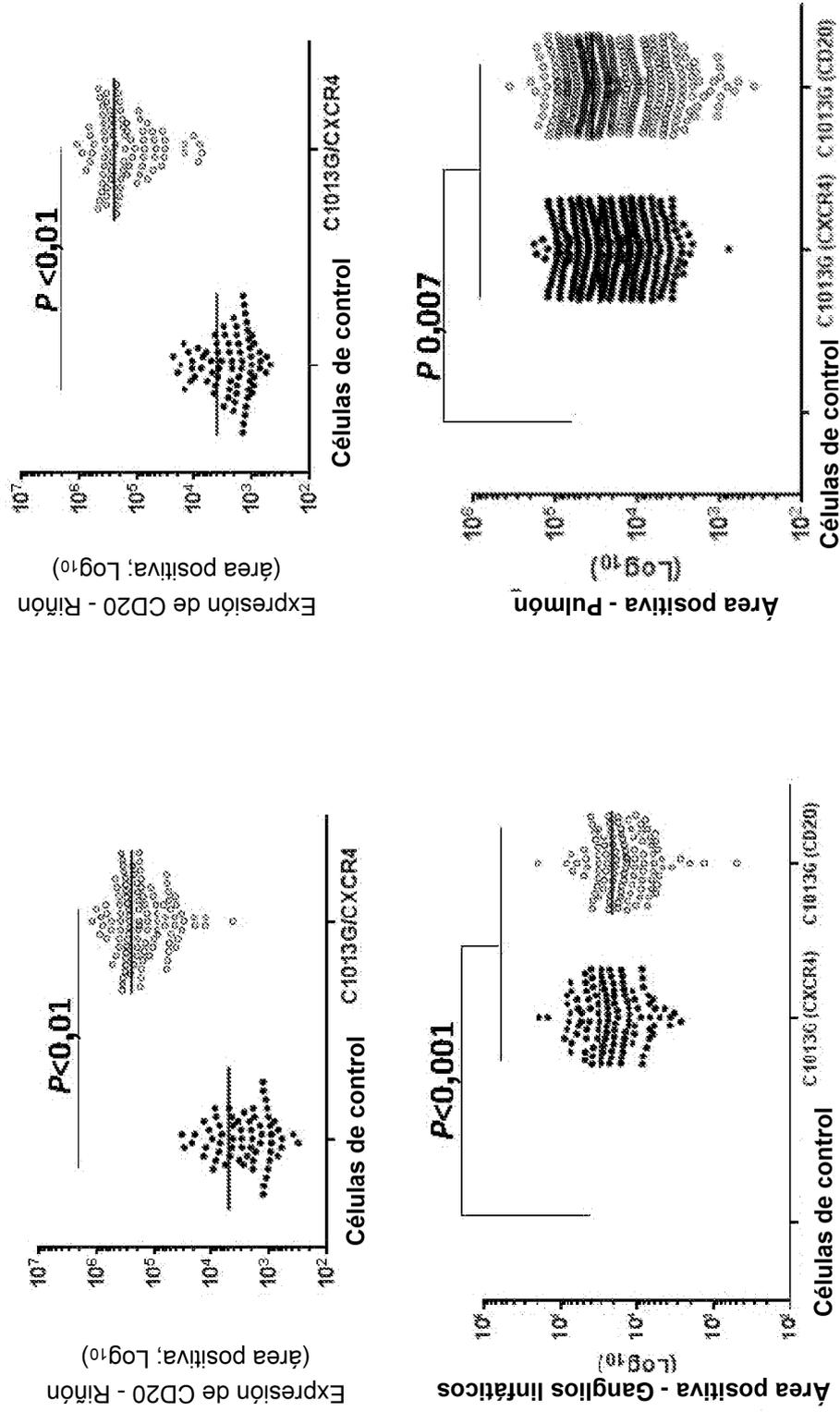


FIG. 11A

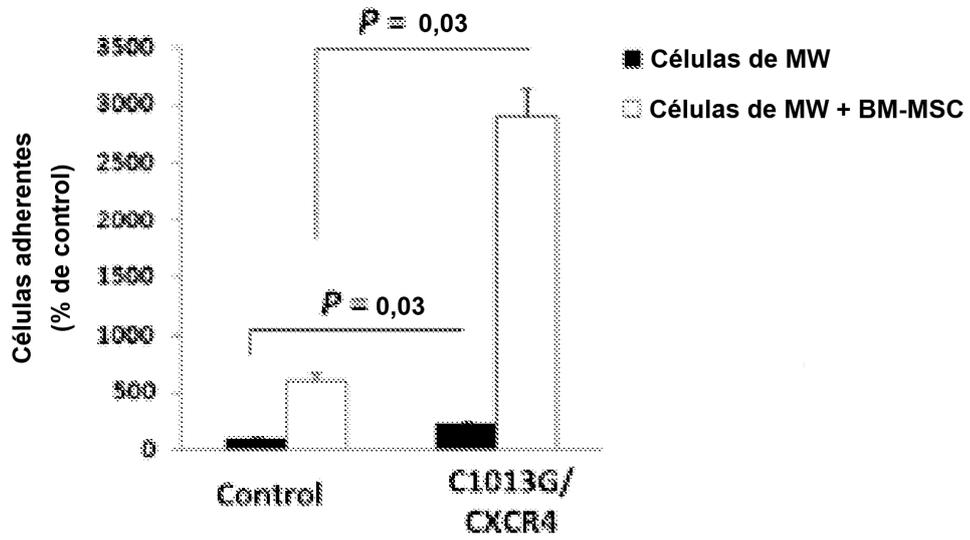


FIG. 11B

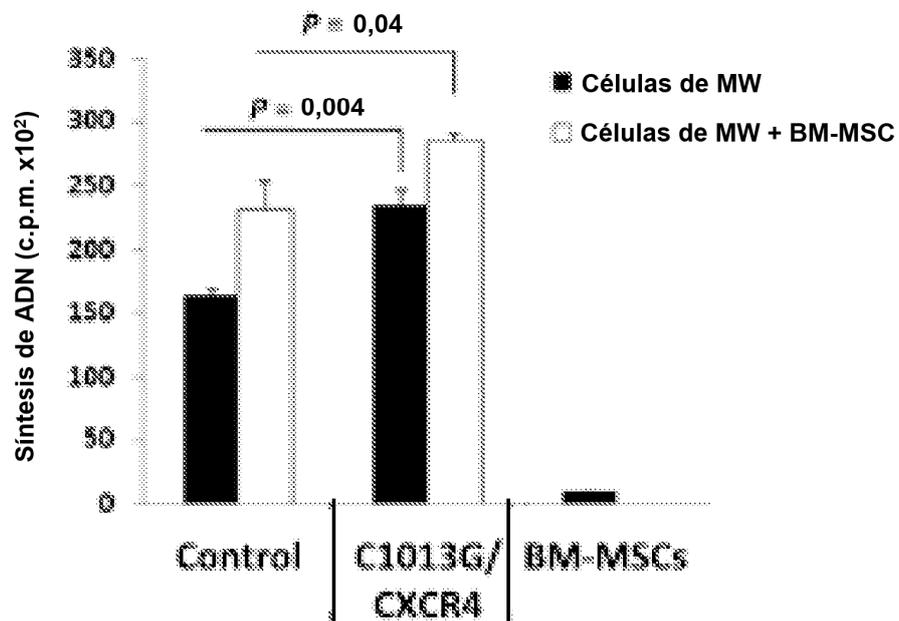


FIG. 11C

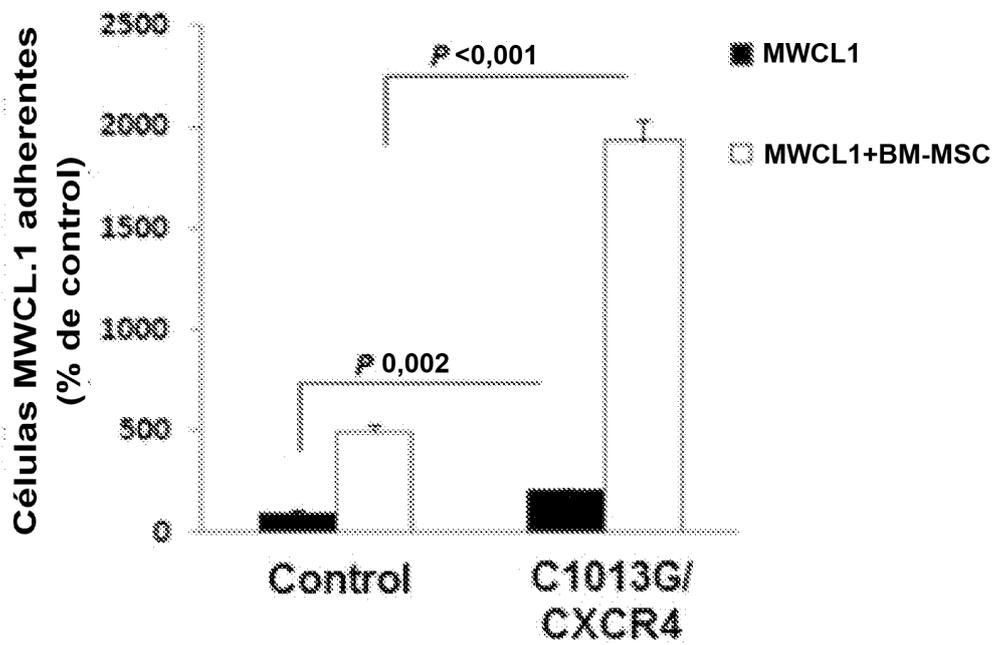


FIG. 11D

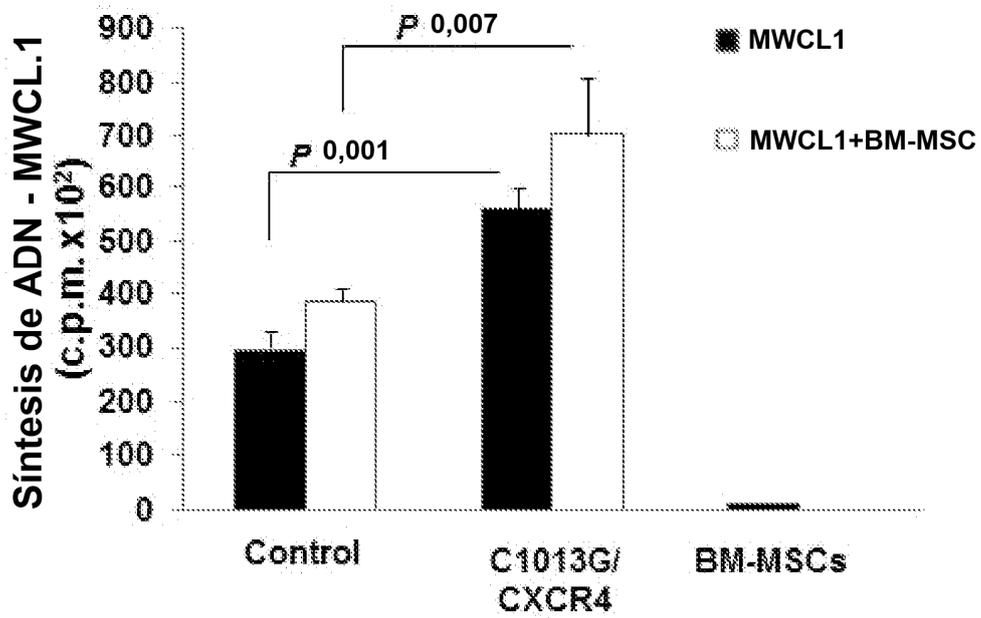


FIG. 12A

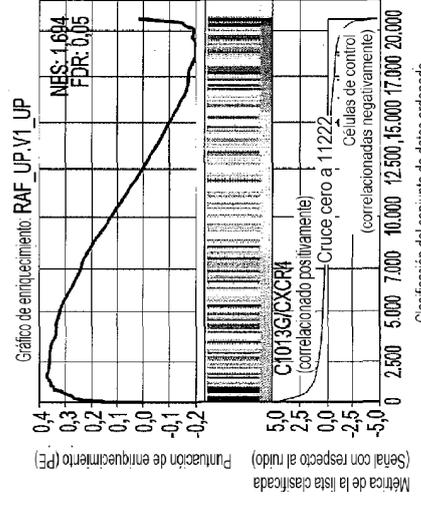
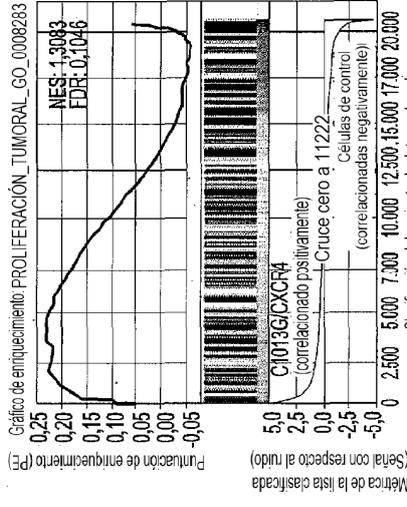
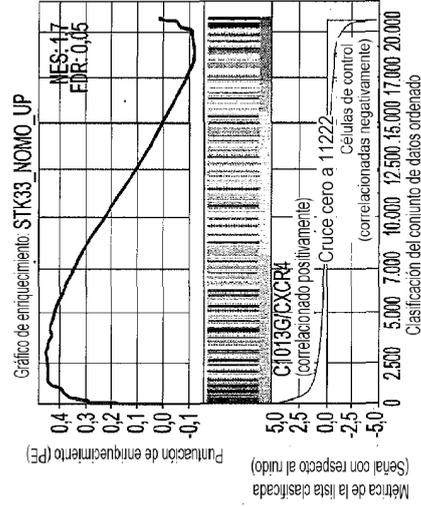
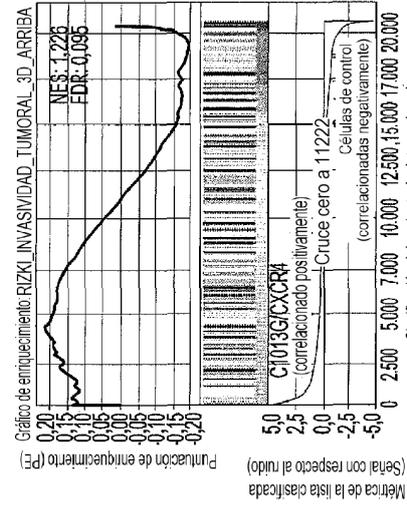
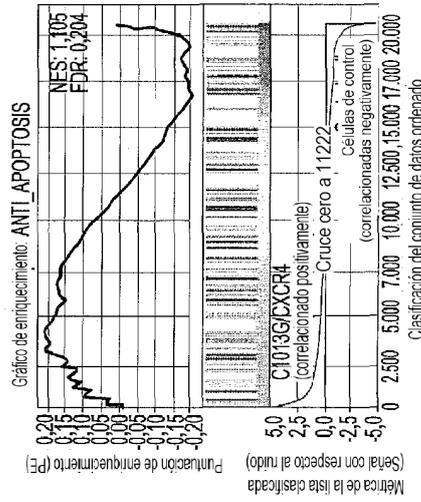
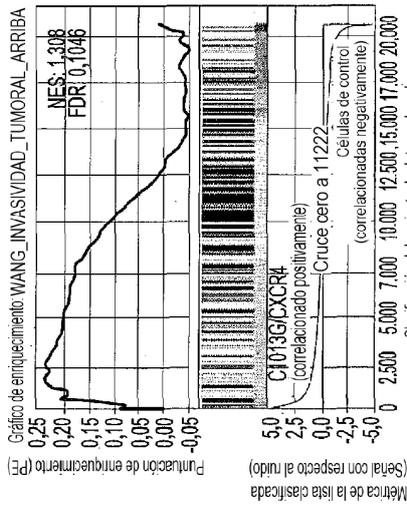
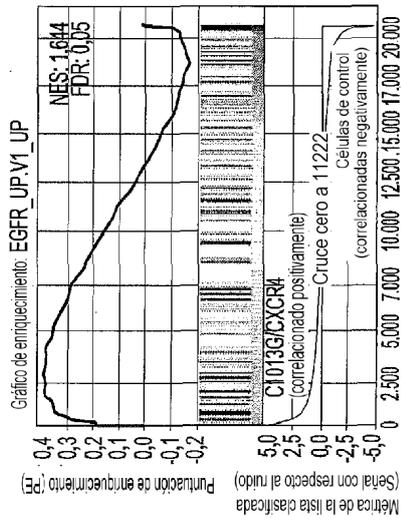
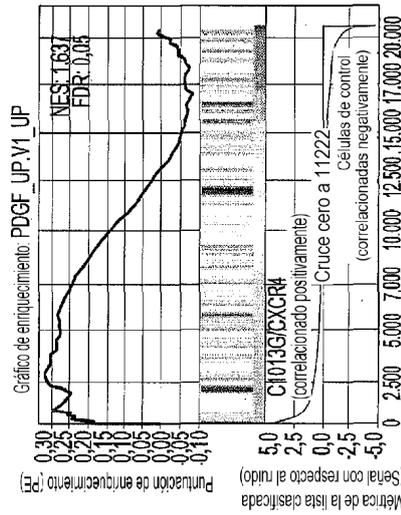


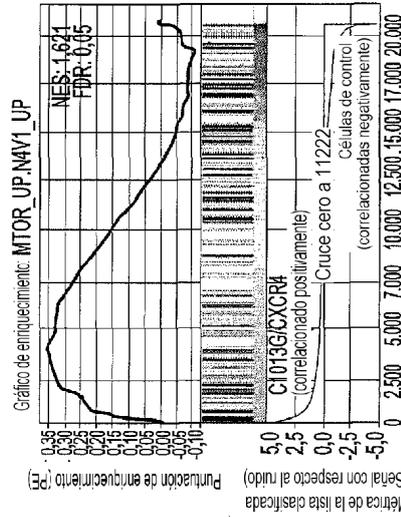
FIG. 12A (continuación)



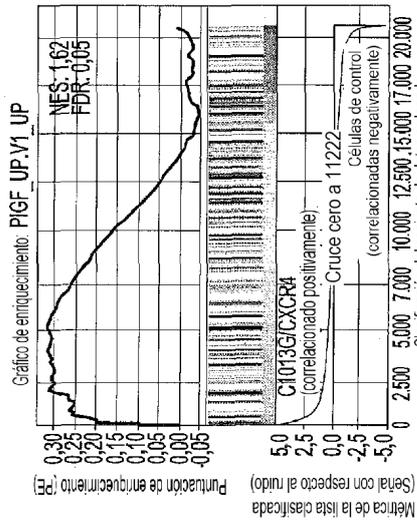
-Perfil de enriquecimiento -Máximos P-puntuaciones métricas de la clasificación



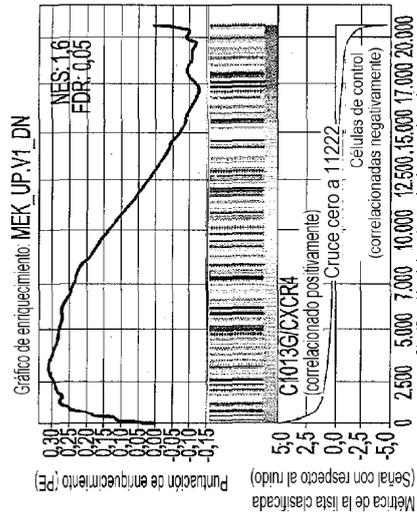
-Perfil de enriquecimiento -Máximos P-puntuaciones métricas de la clasificación



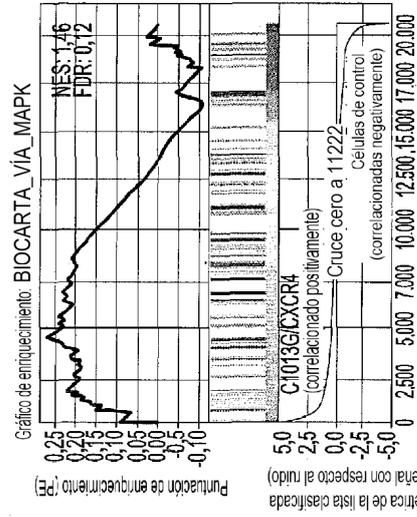
-Perfil de enriquecimiento -Máximos P-puntuaciones métricas de la clasificación



-Perfil de enriquecimiento -Máximos P-puntuaciones métricas de la clasificación



-Perfil de enriquecimiento -Máximos P-puntuaciones métricas de la clasificación



-Perfil de enriquecimiento -Máximos P-puntuaciones métricas de la clasificación

FIG. 12B

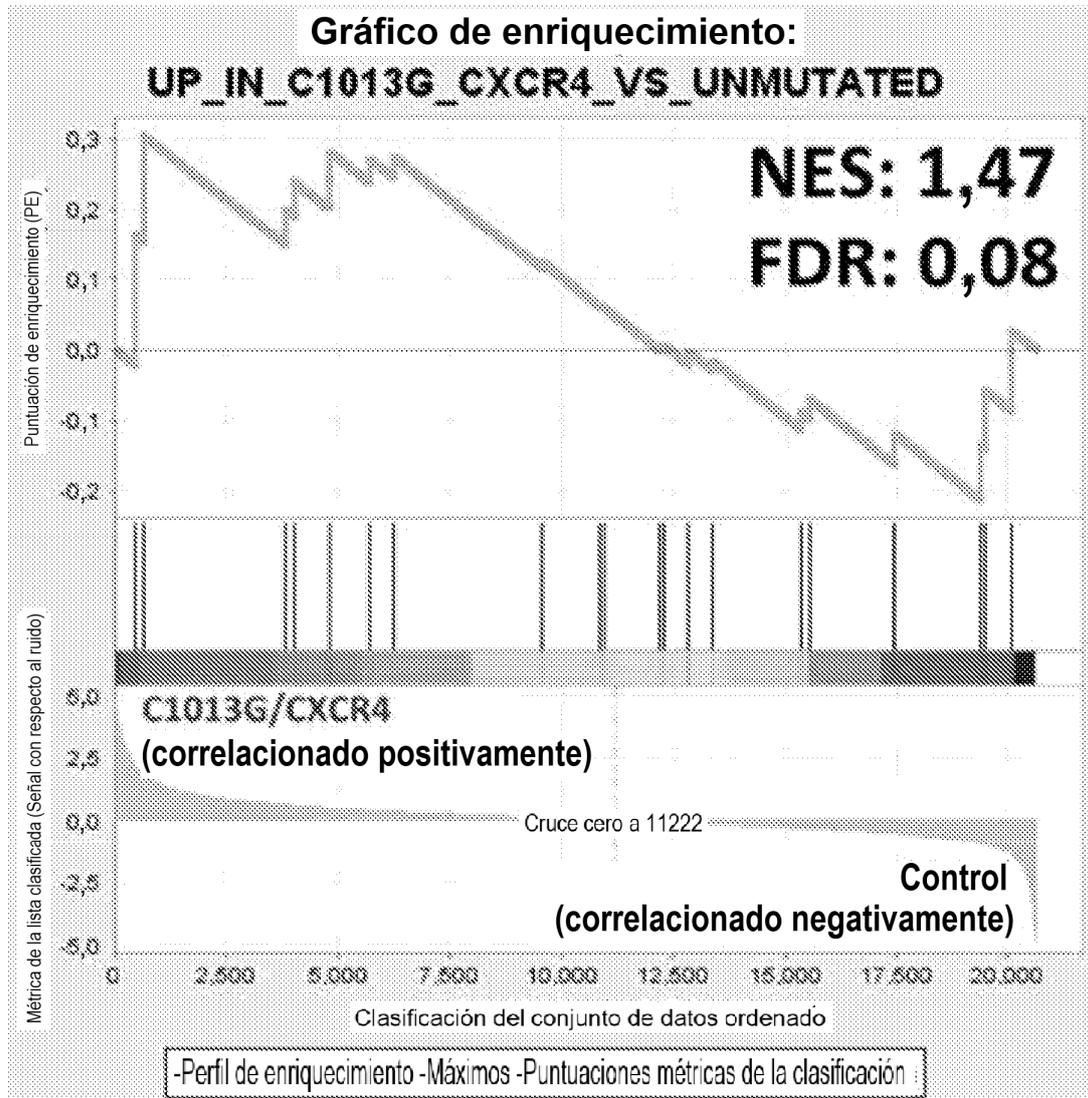


FIG. 13A

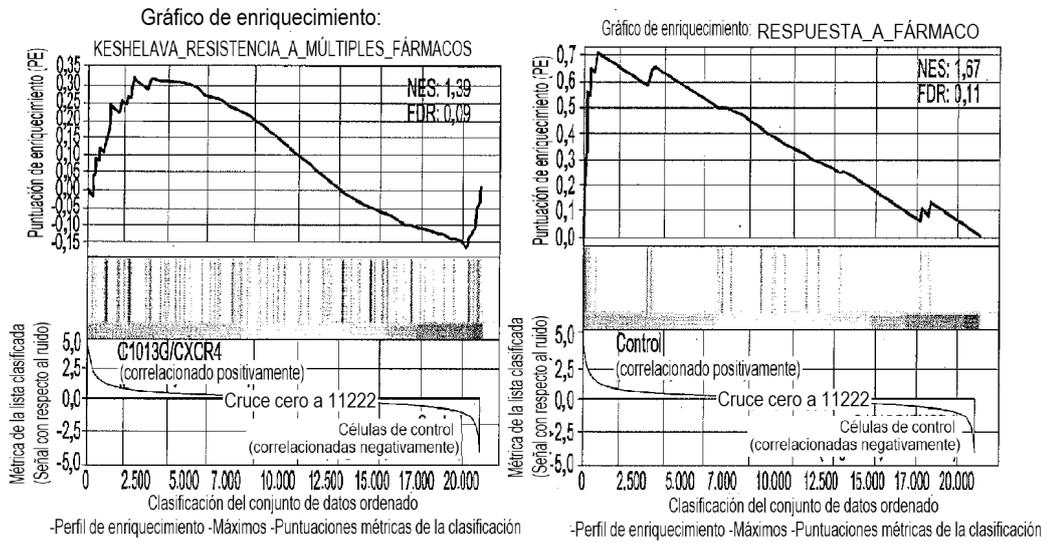


FIG. 13B

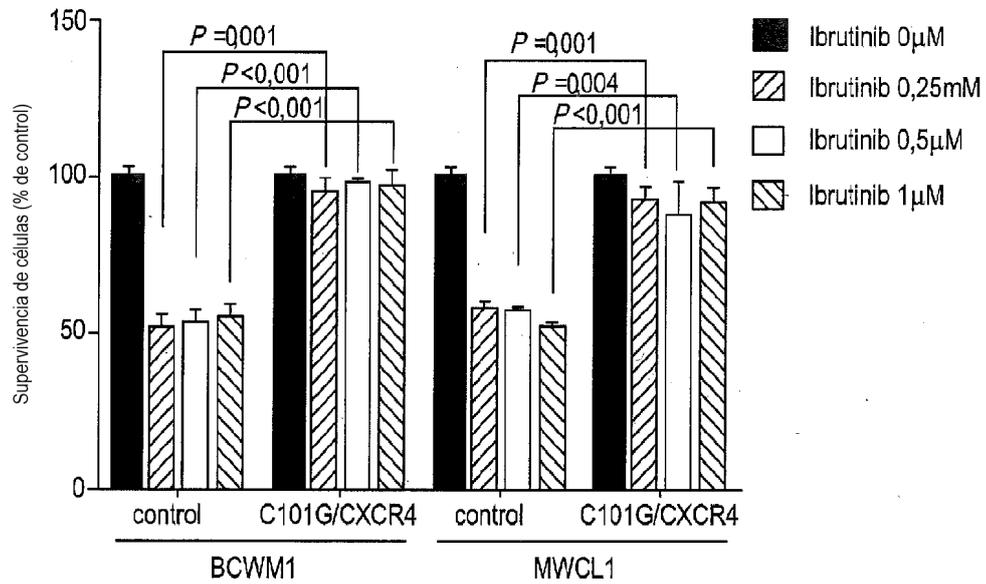


FIG. 13C

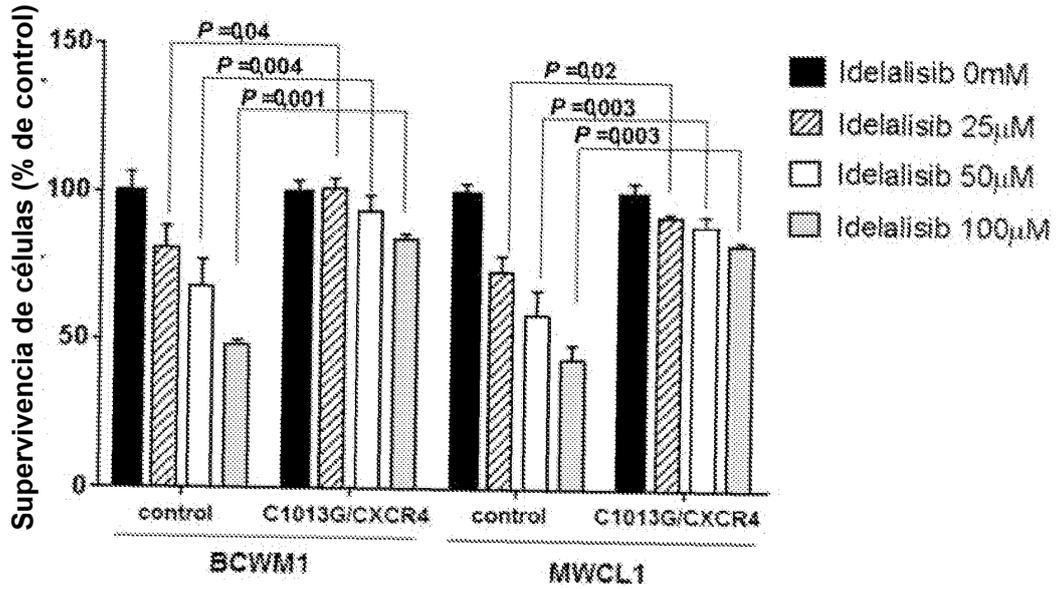


FIG. 13D

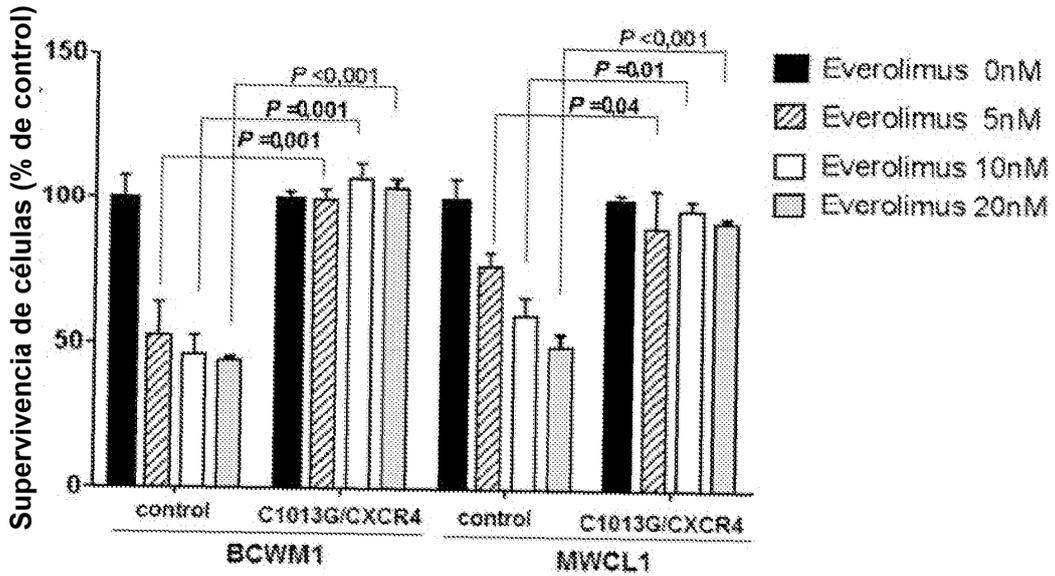


FIG. 13E

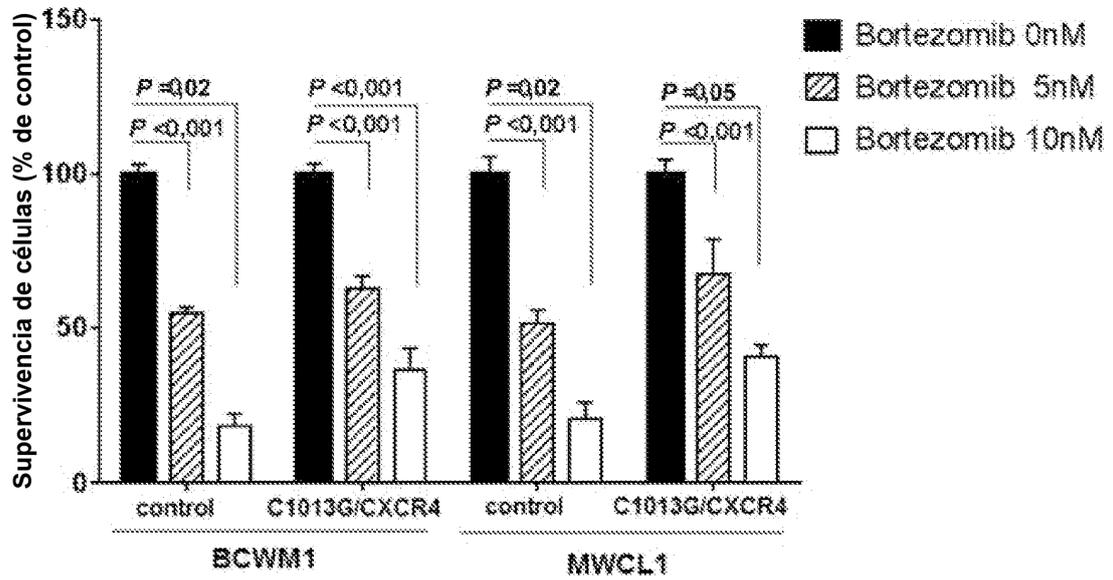


FIG. 13F

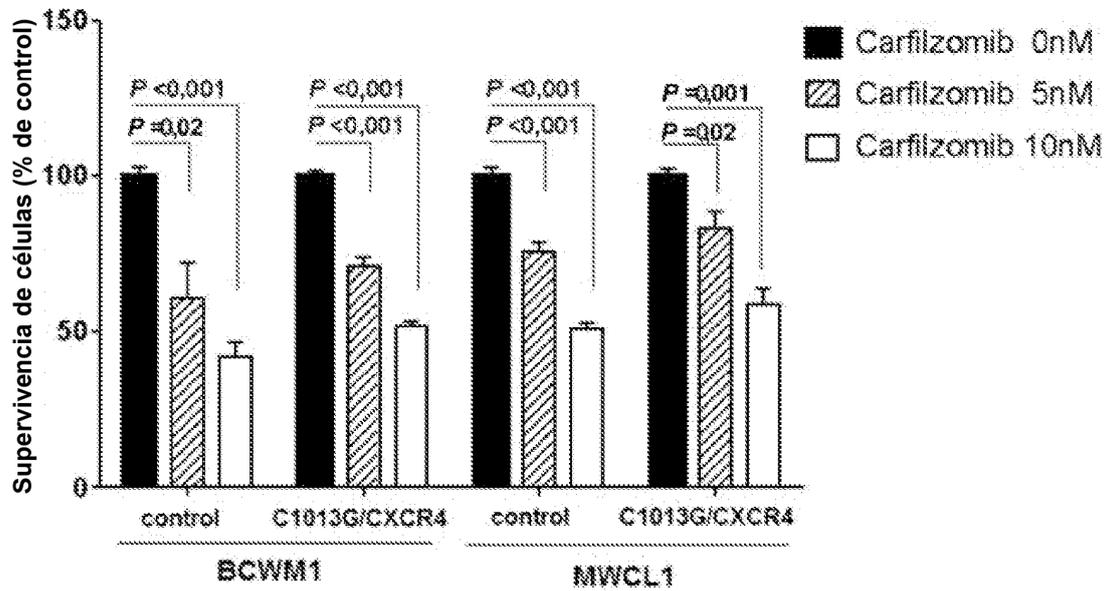


FIG. 14A

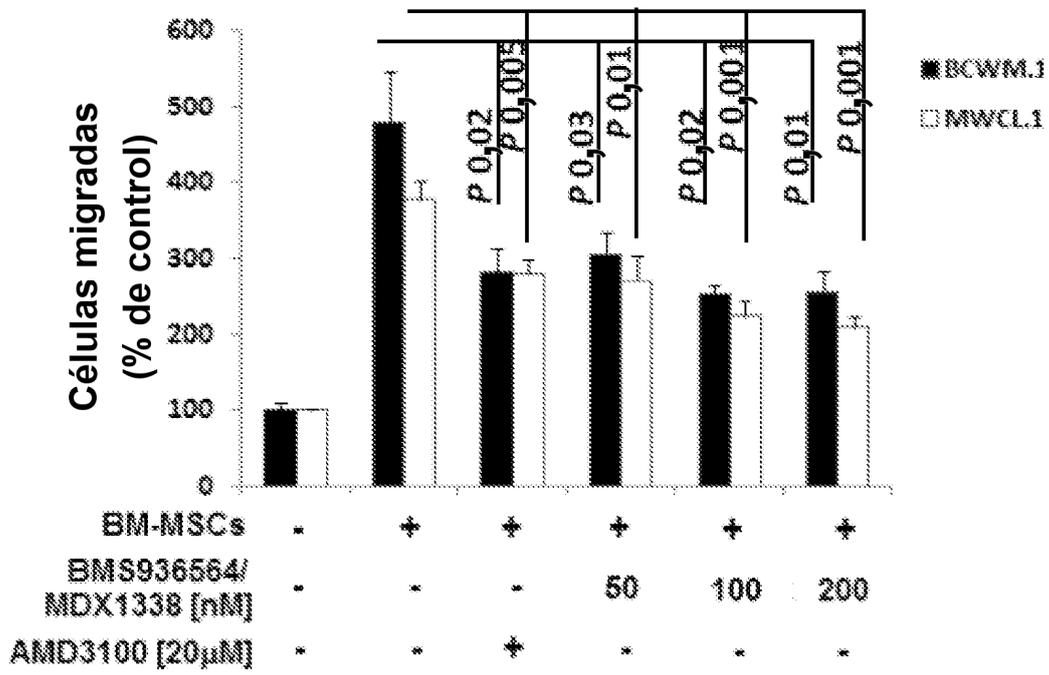


FIG. 14B

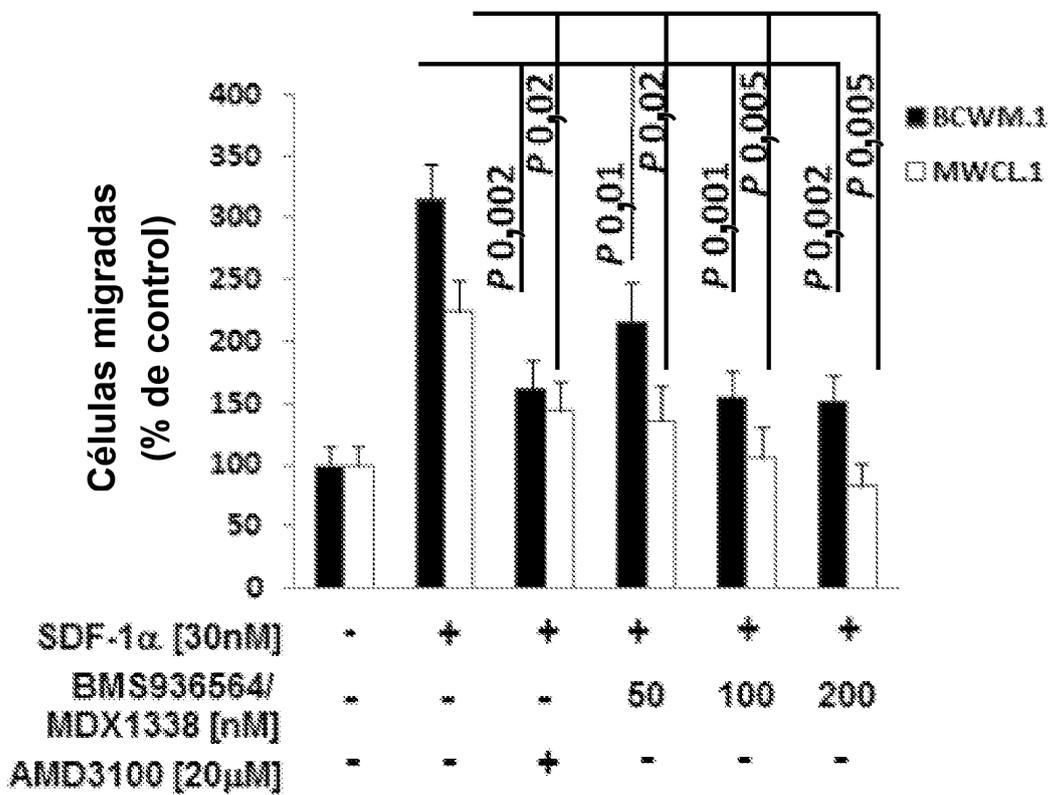


FIG. 15A

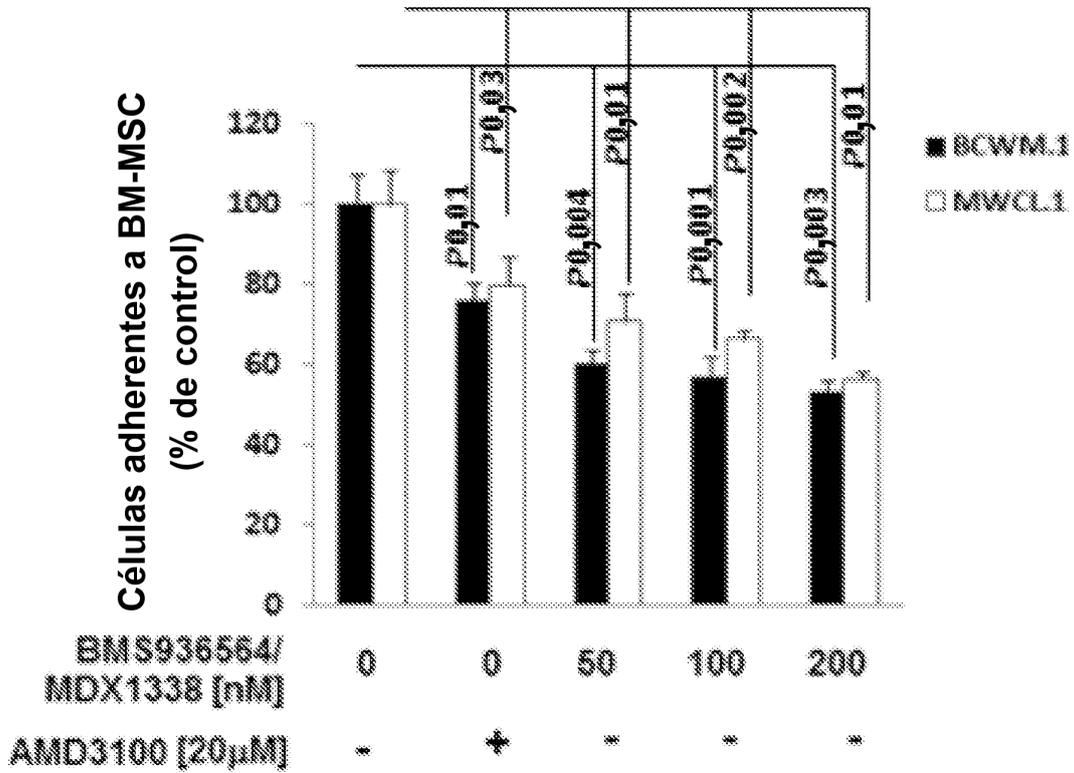


FIG. 15B

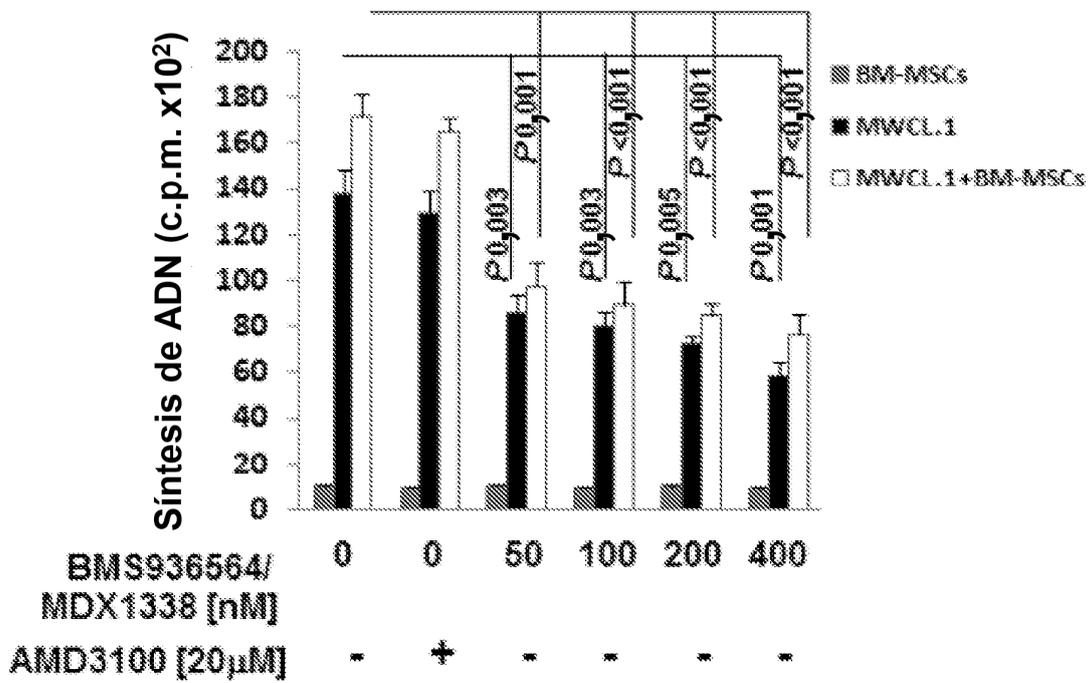


FIG. 15C

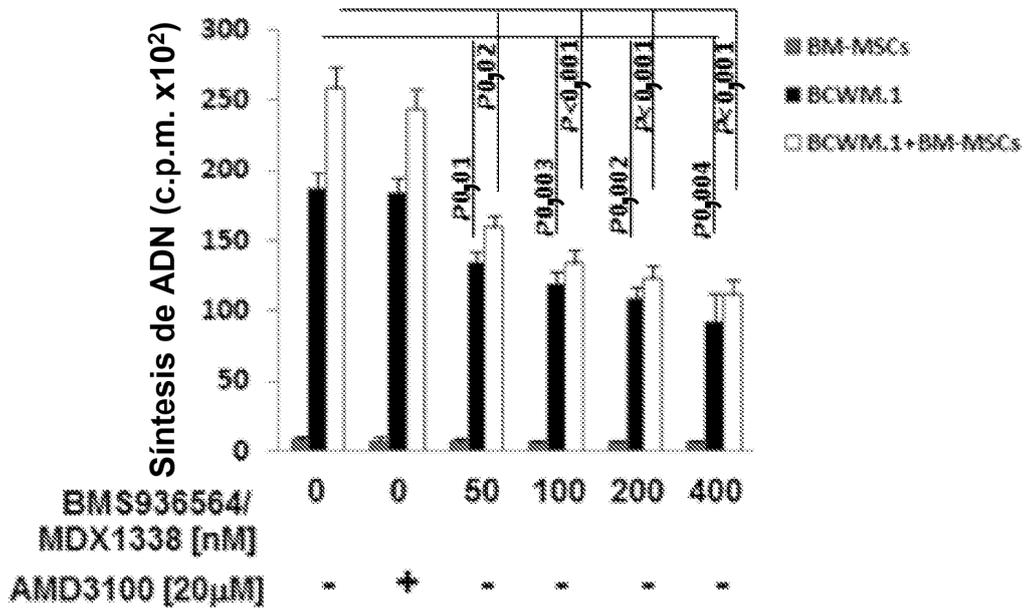


FIG. 16

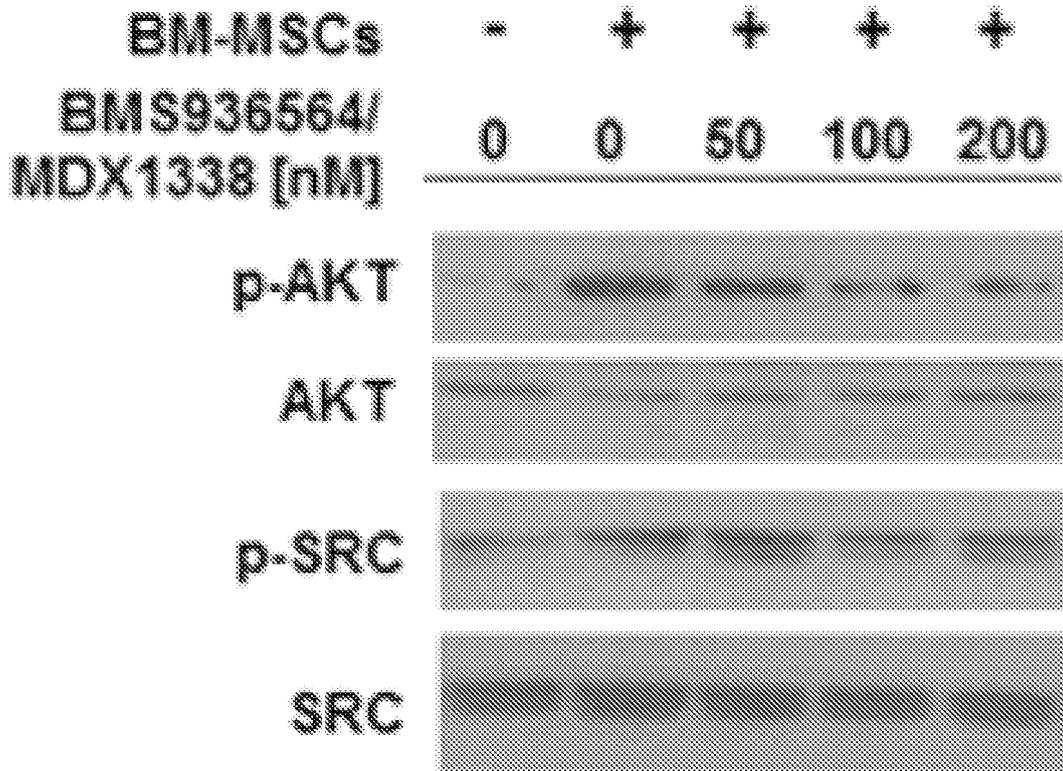


FIG. 17A

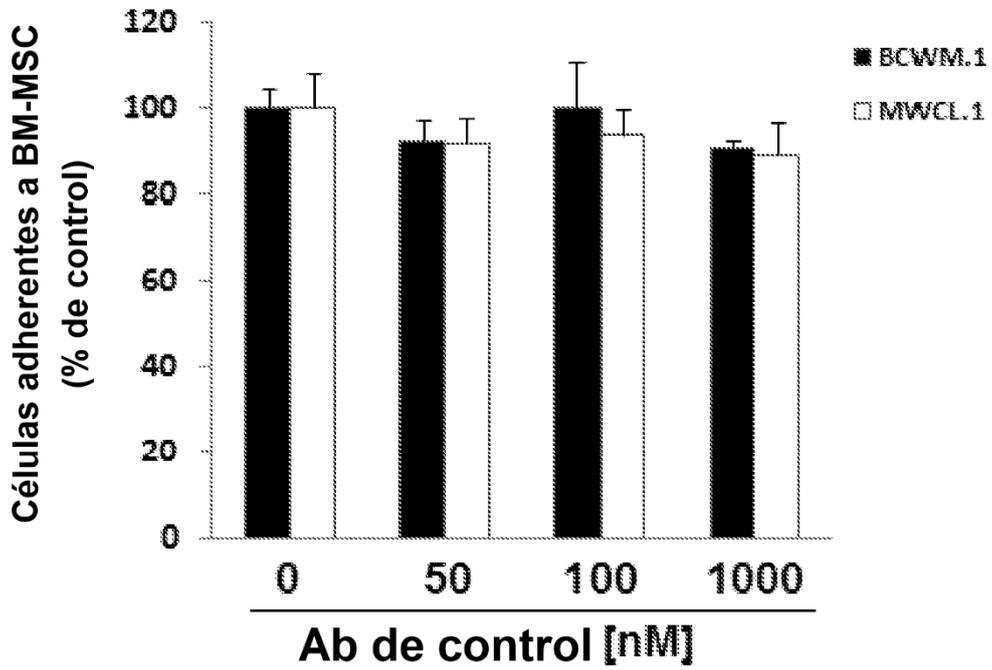


FIG. 17B

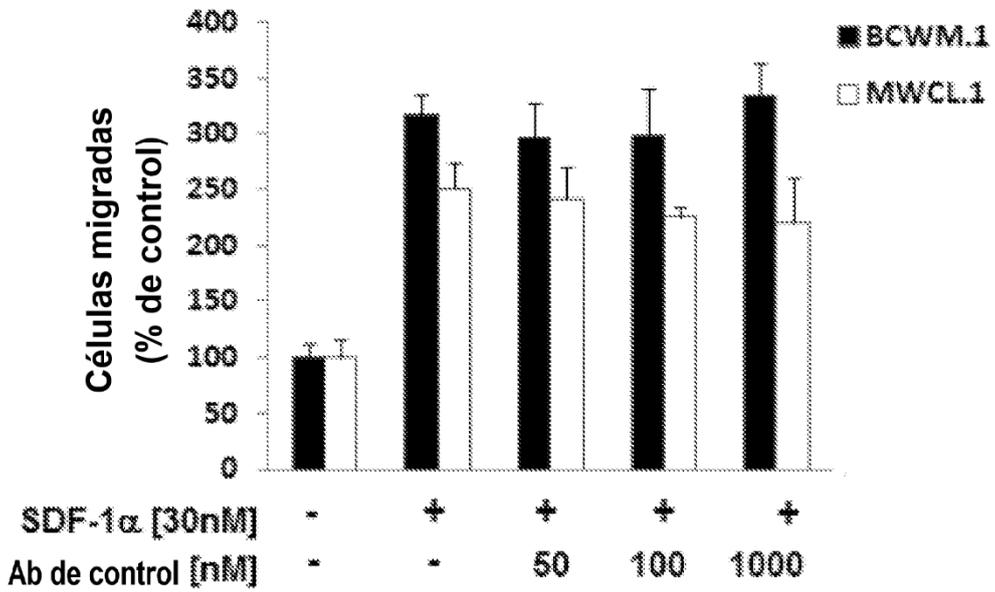


FIG. 18

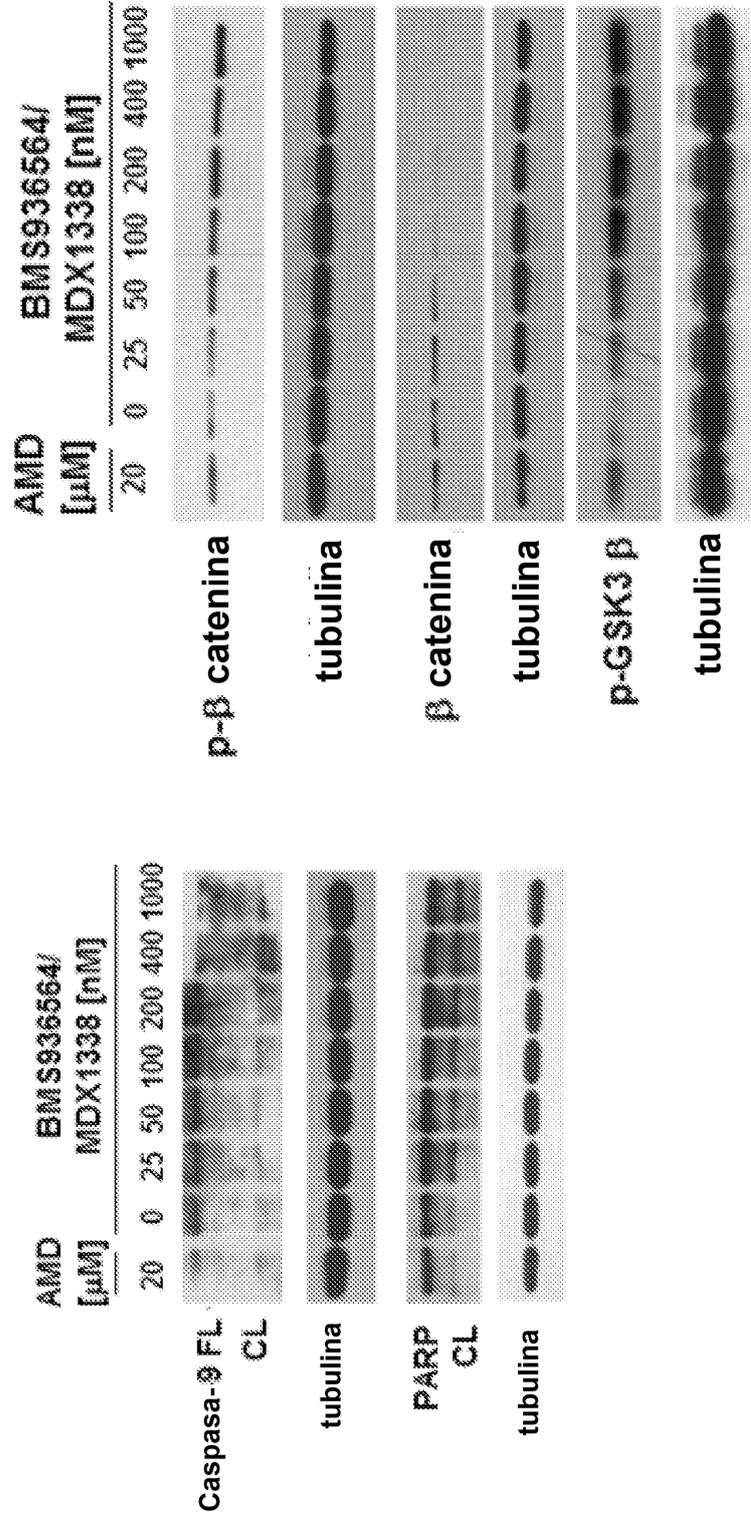


FIG. 19A

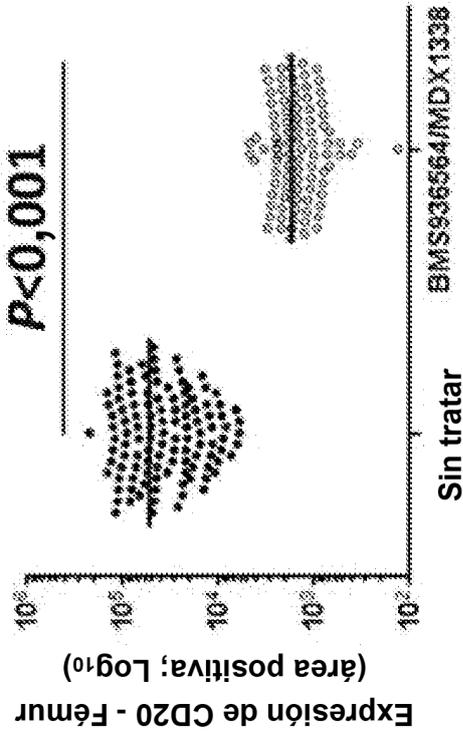
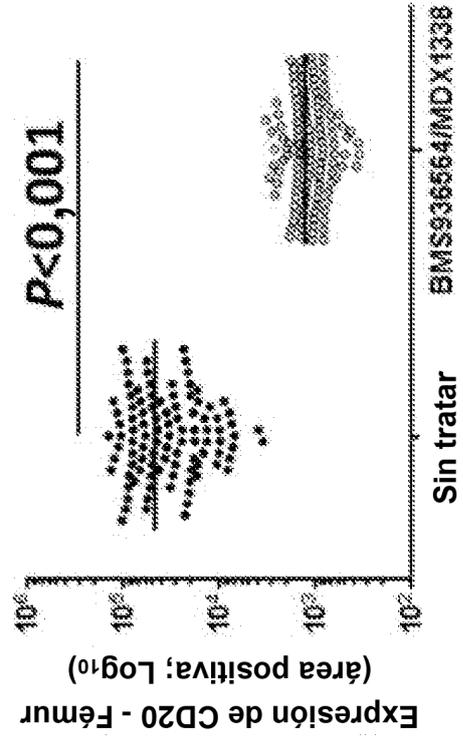


FIG. 19B

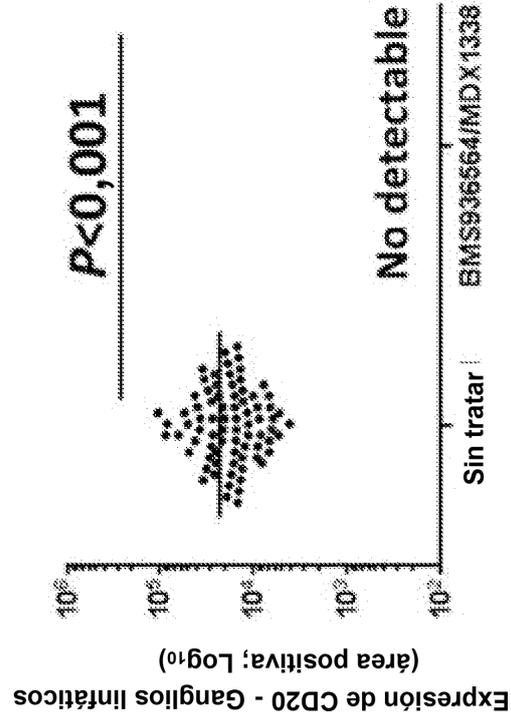
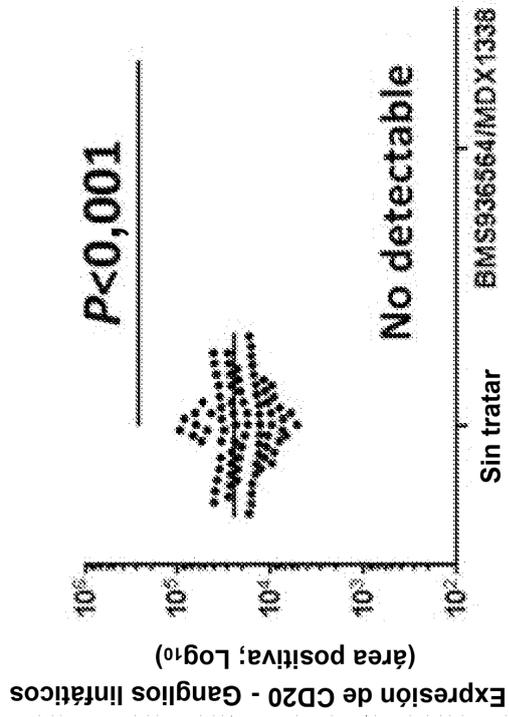


FIG. 19C

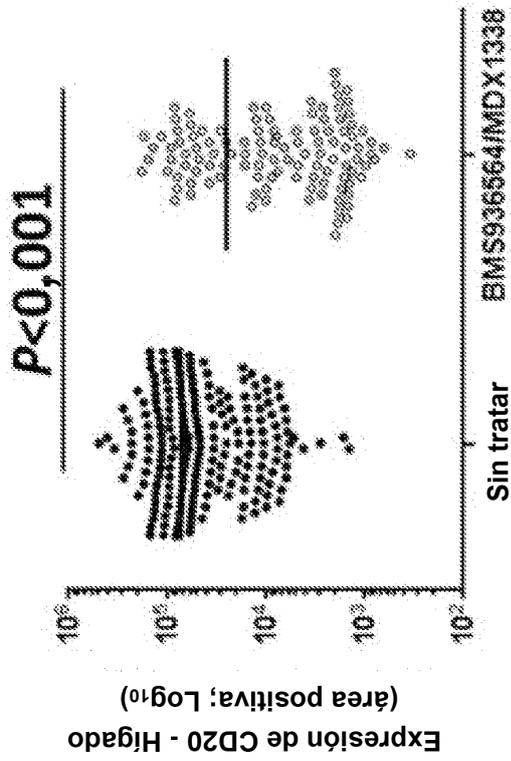
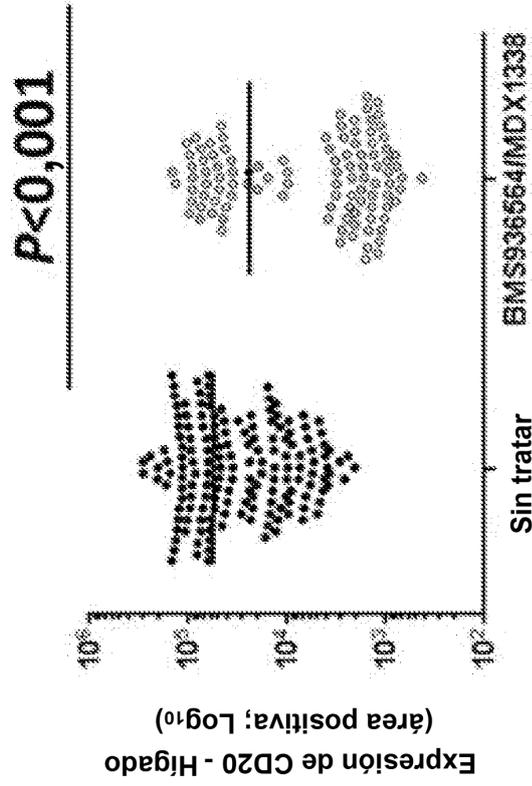


FIG. 19D

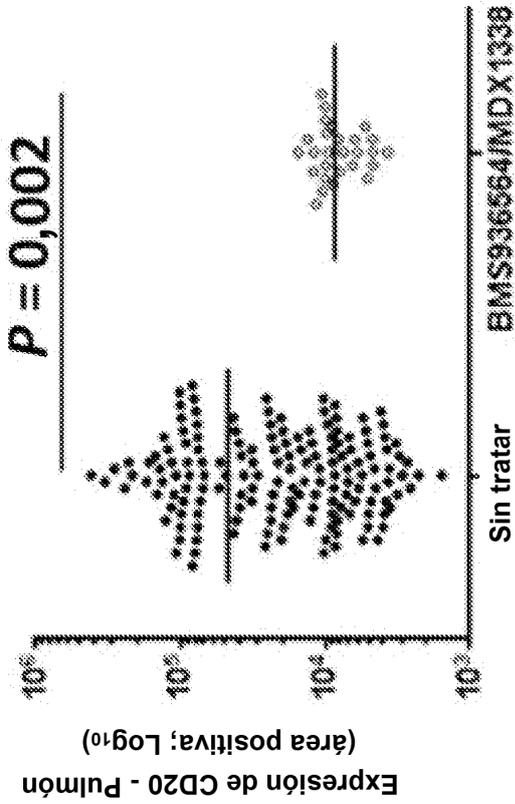
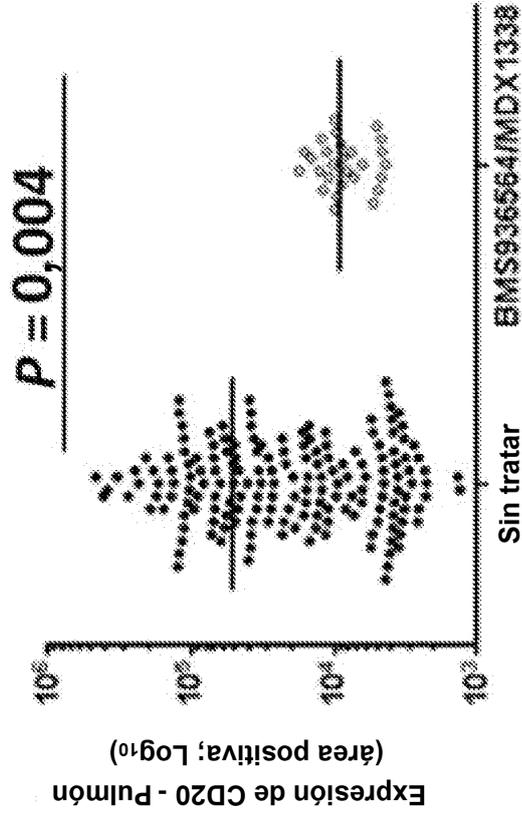


FIG. 19E

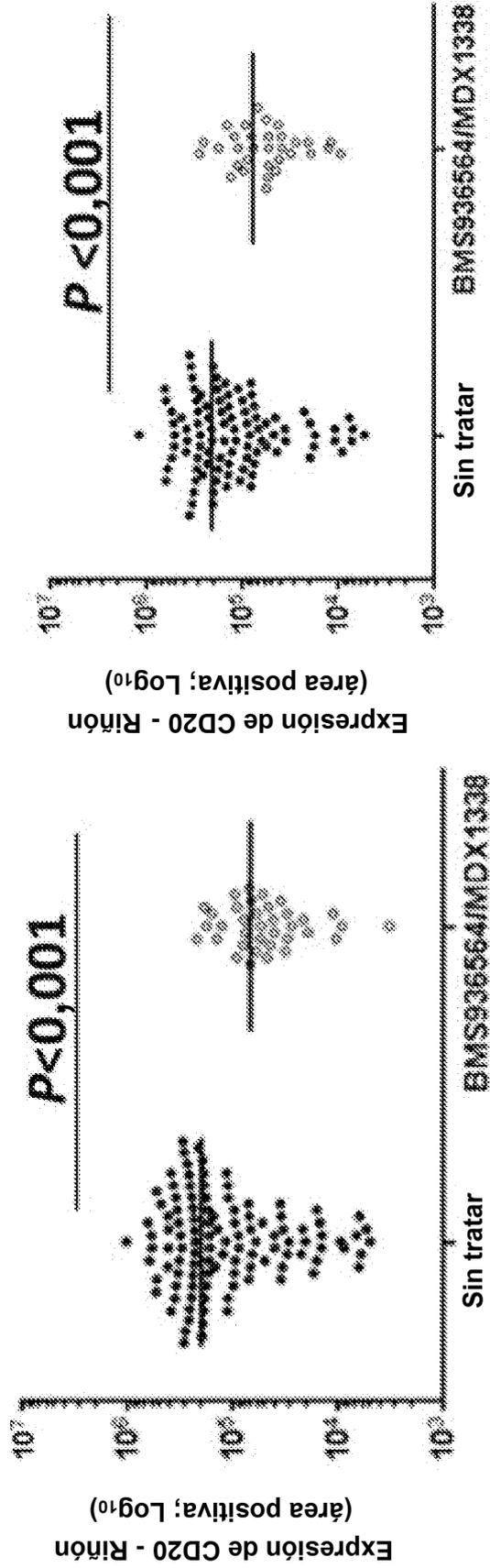


FIG. 20A

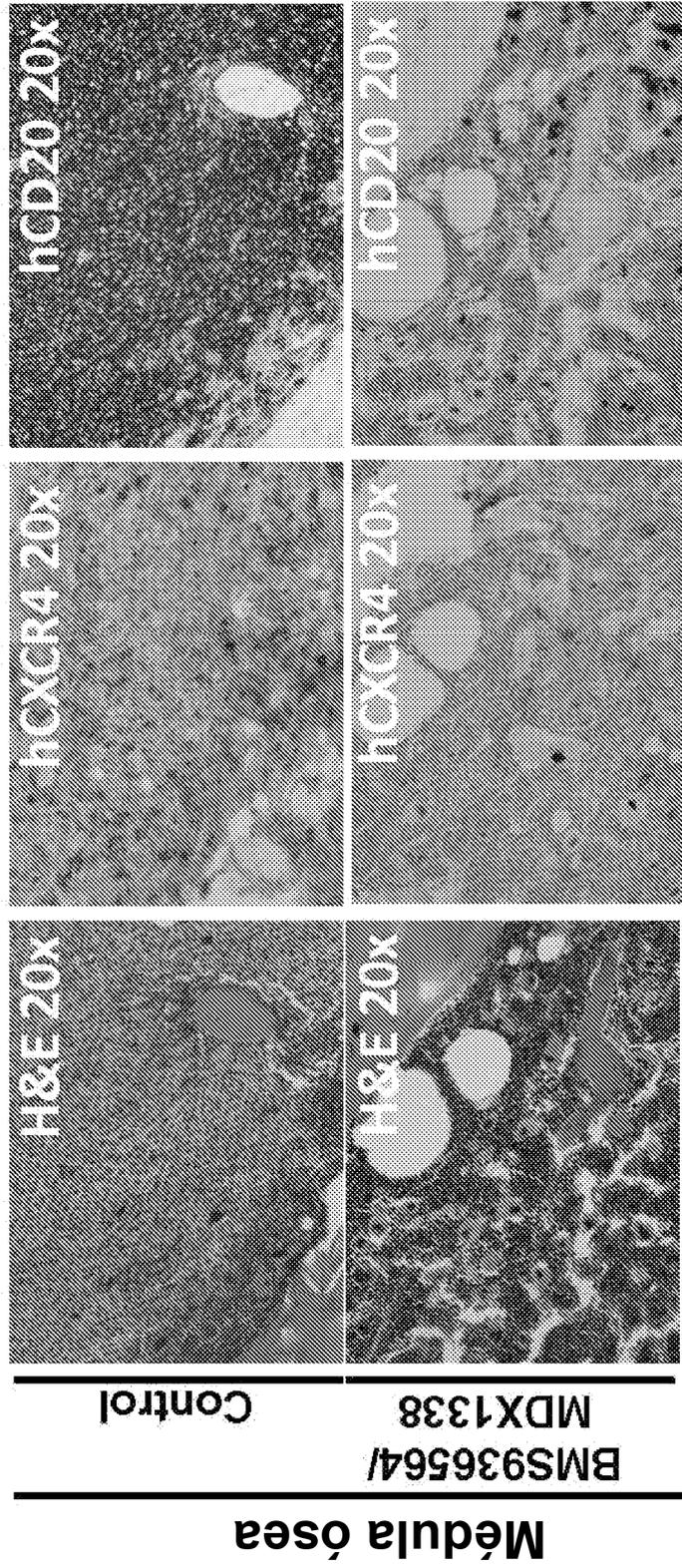


FIG. 20B

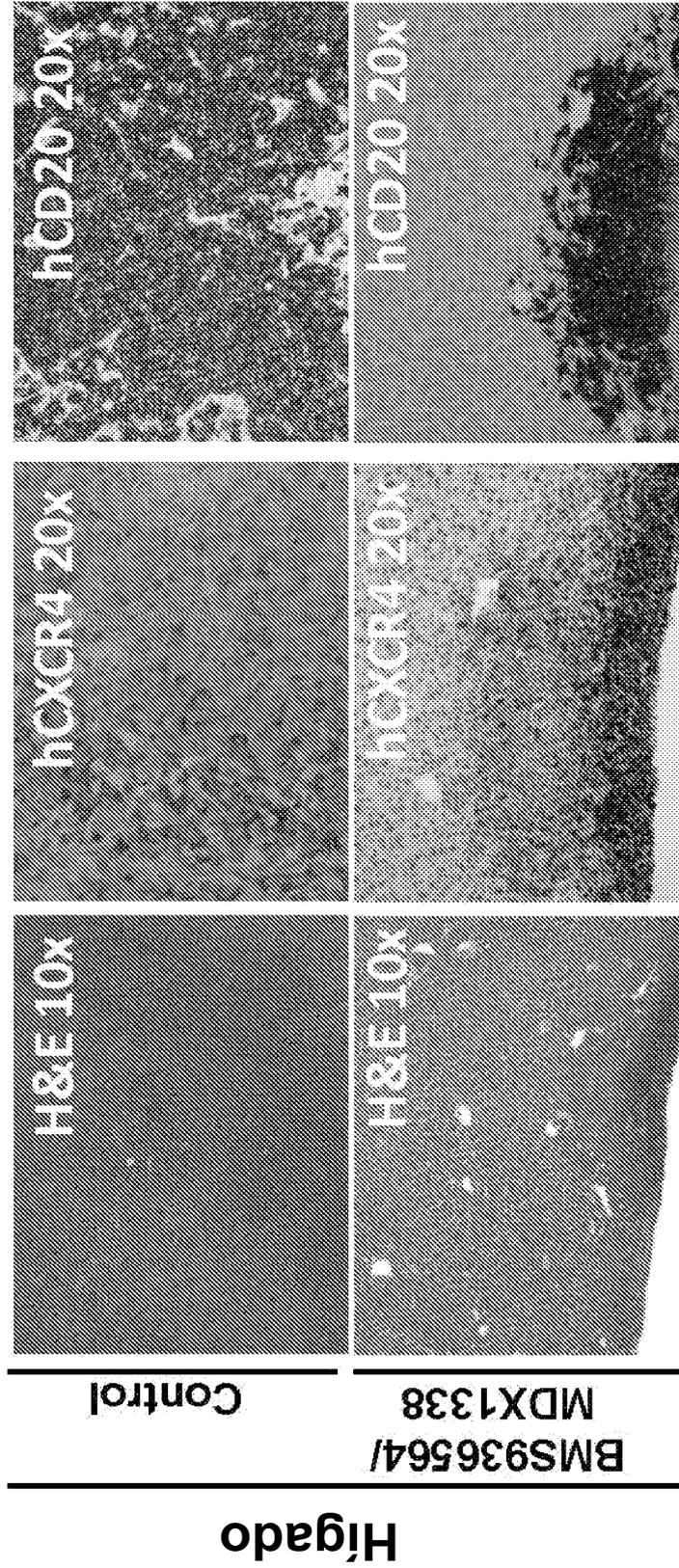


FIG. 20C

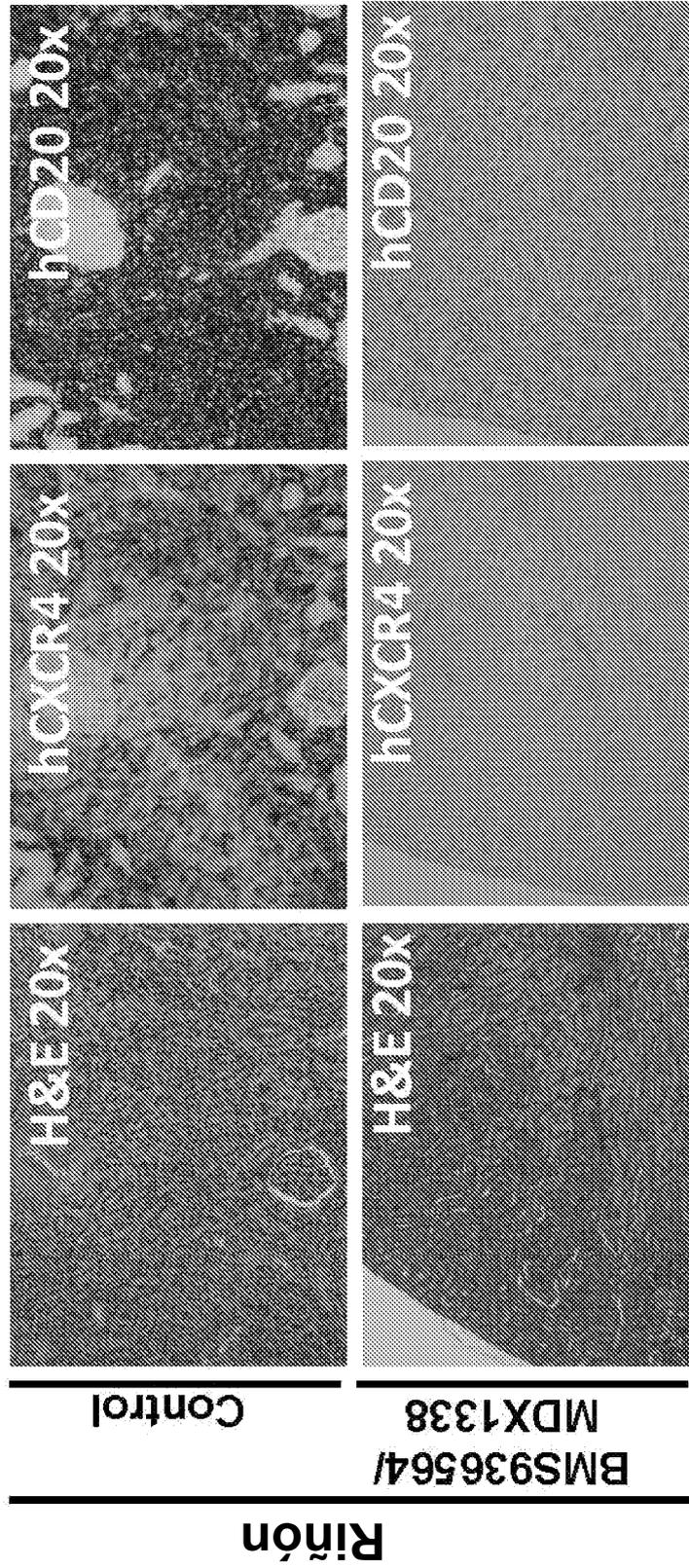


FIG. 20D

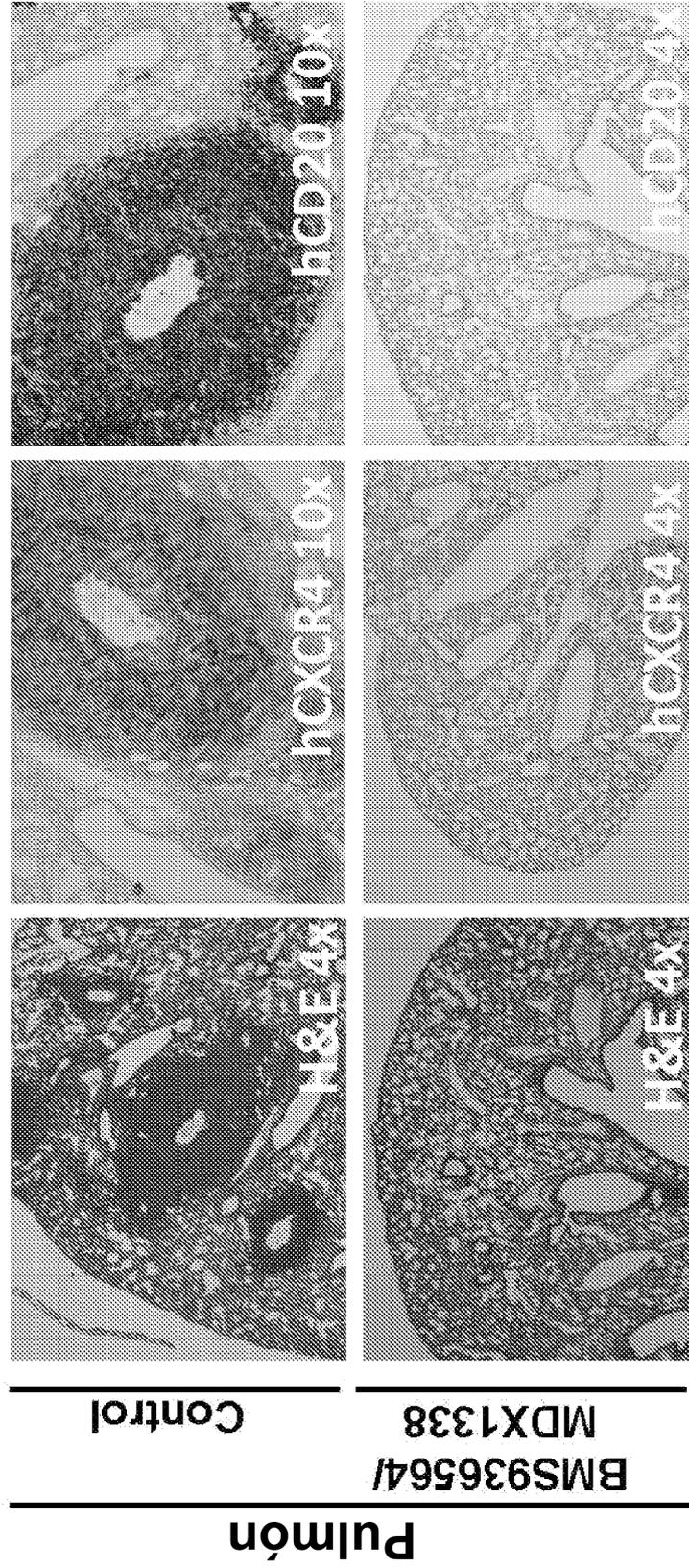


FIG. 20E

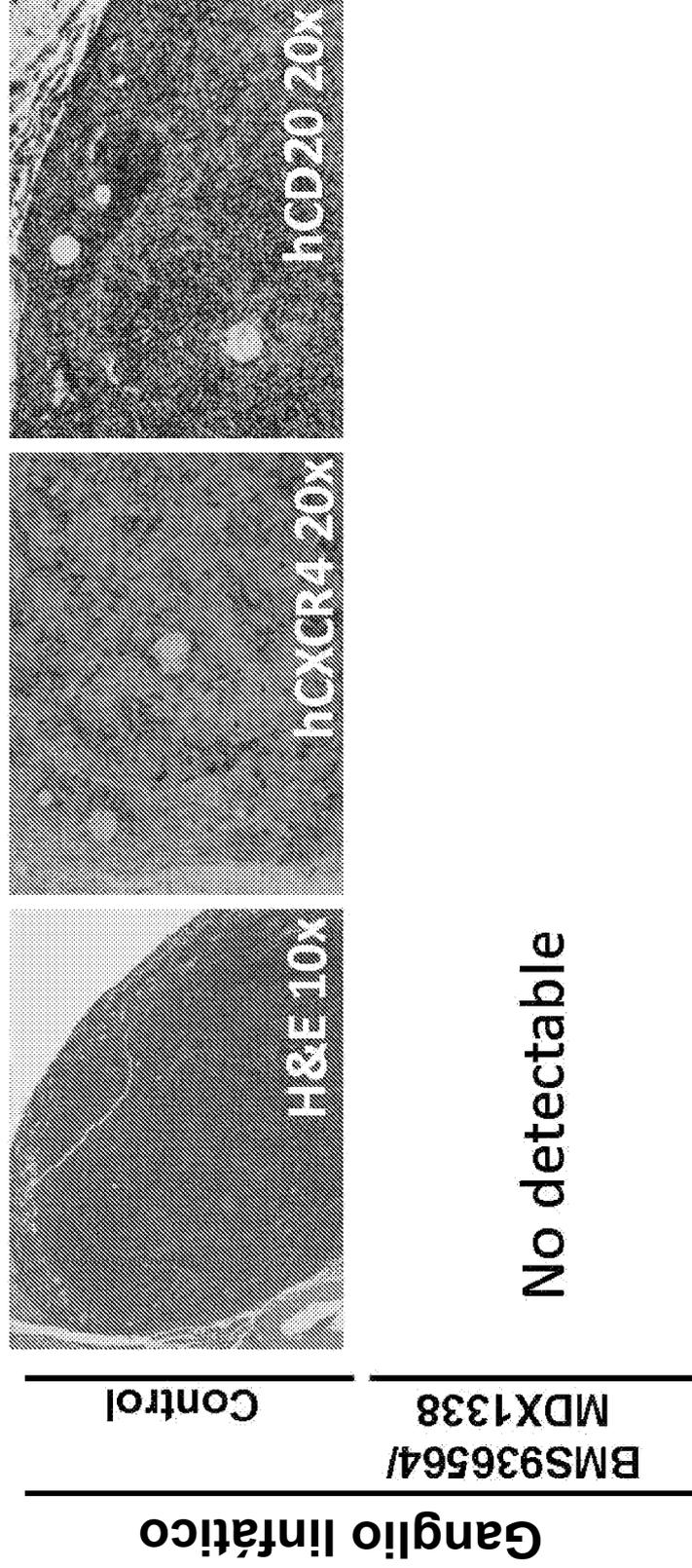


FIG. 21A

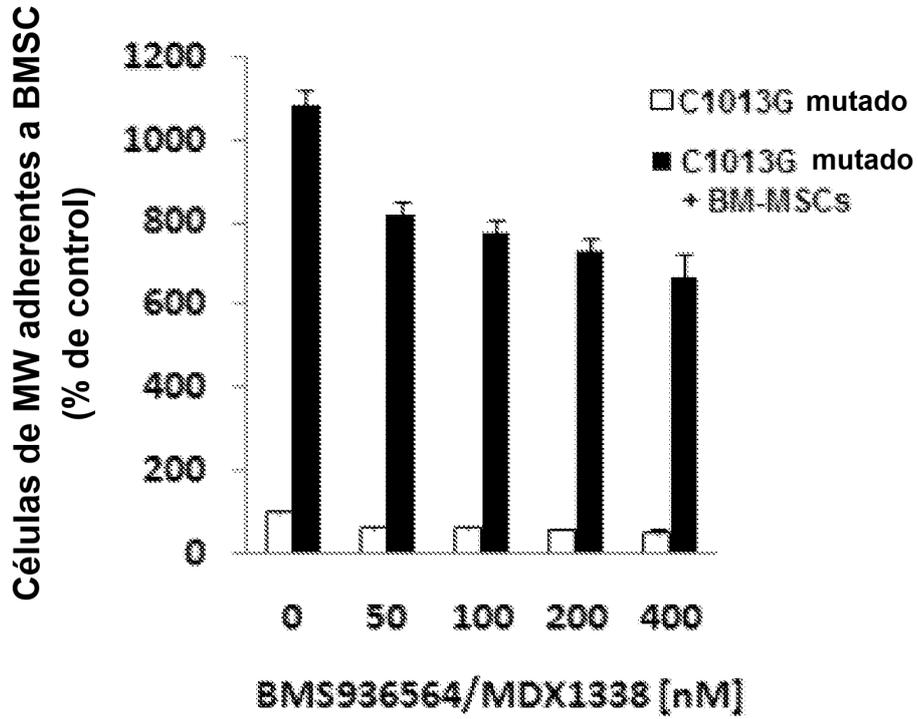


FIG. 21B

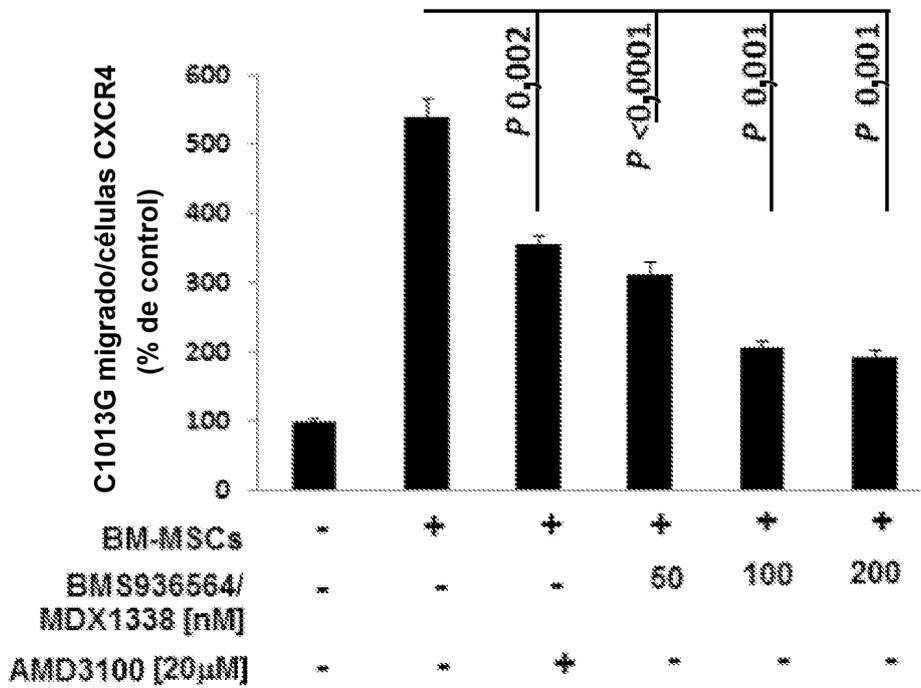


FIG. 21C

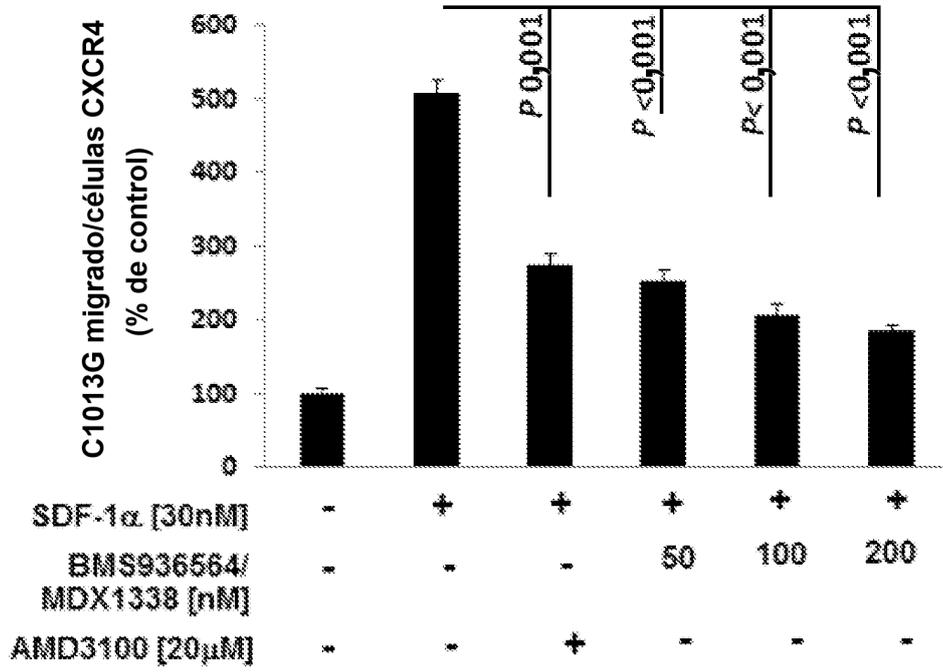


FIG. 21D

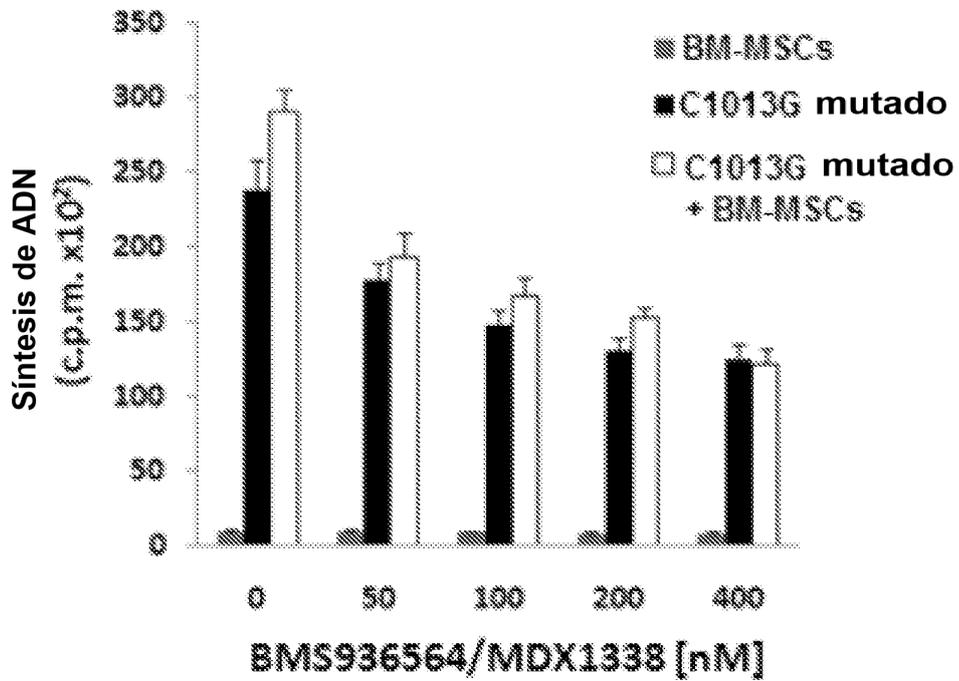


FIG. 22

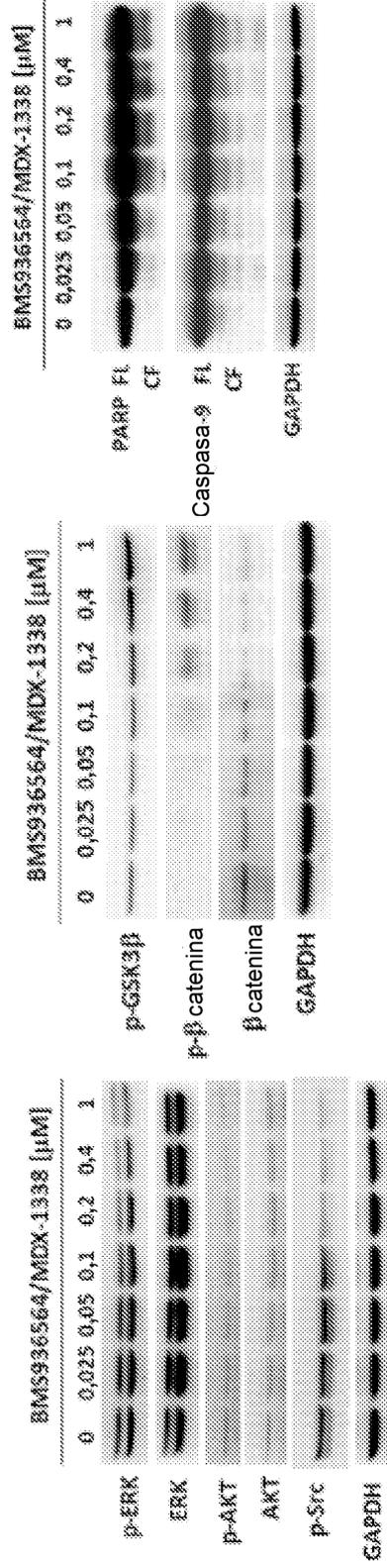


FIG. 23A

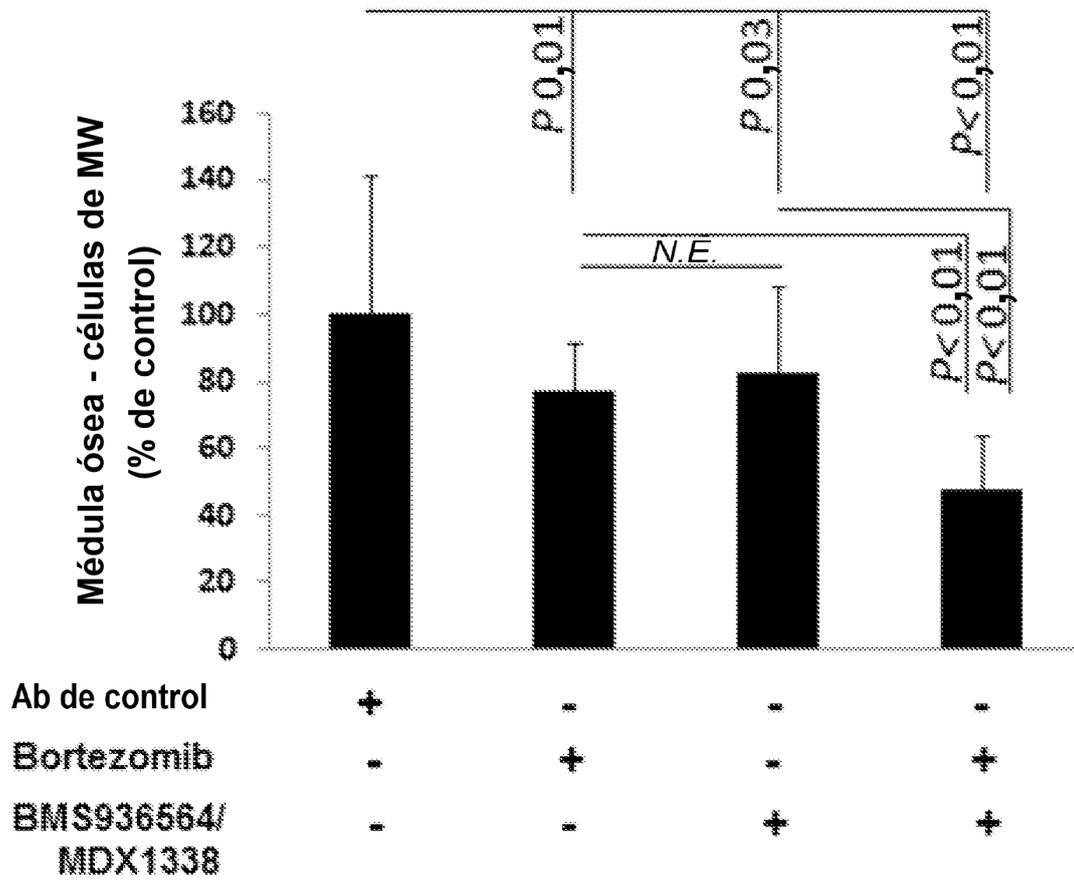


FIG. 23B

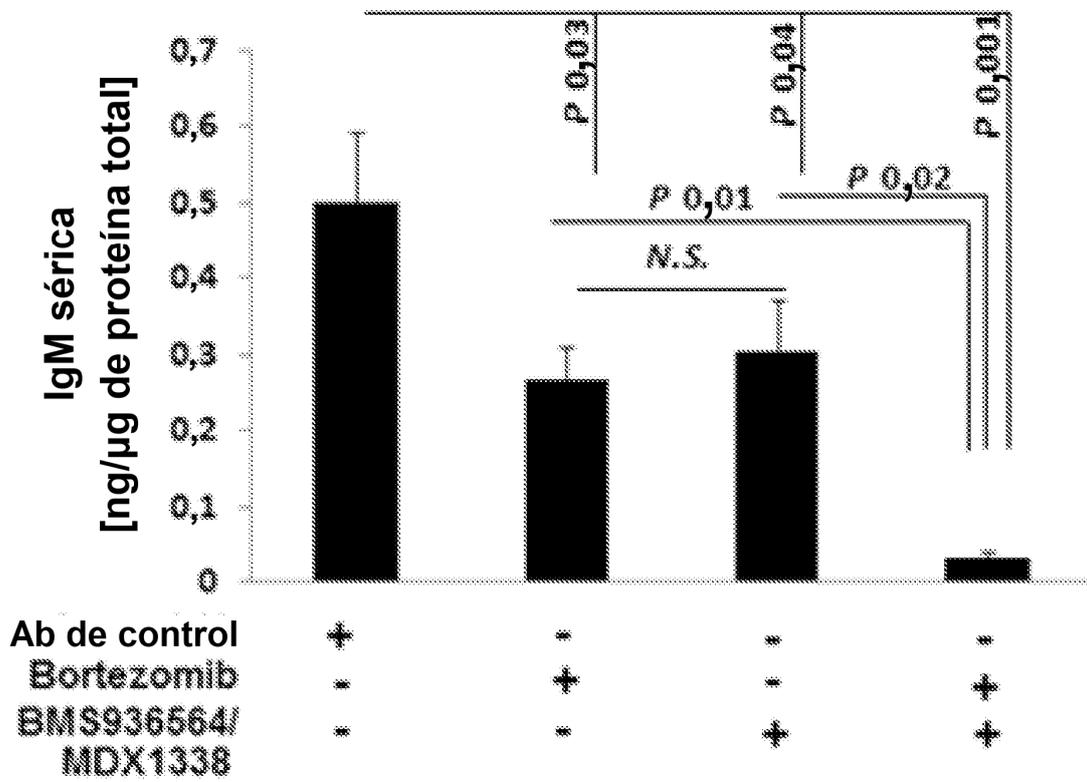


FIG. 23C

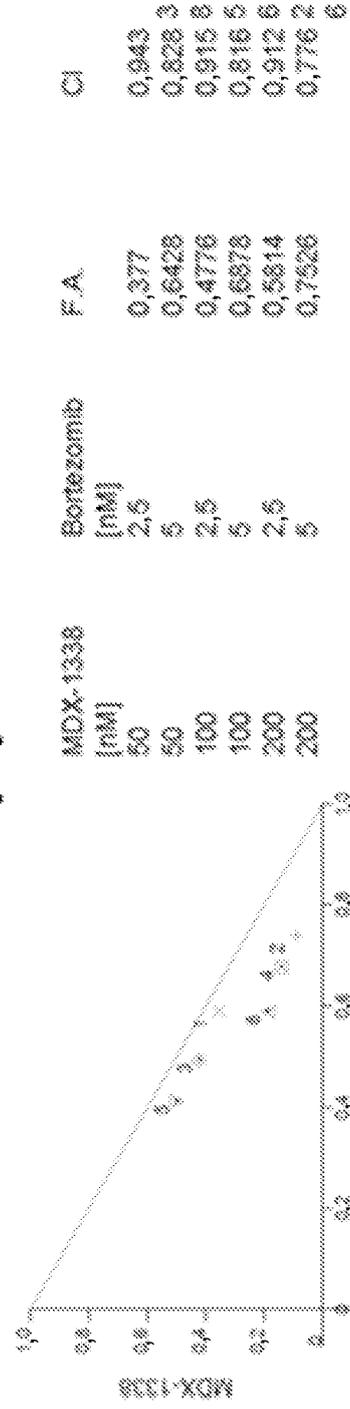
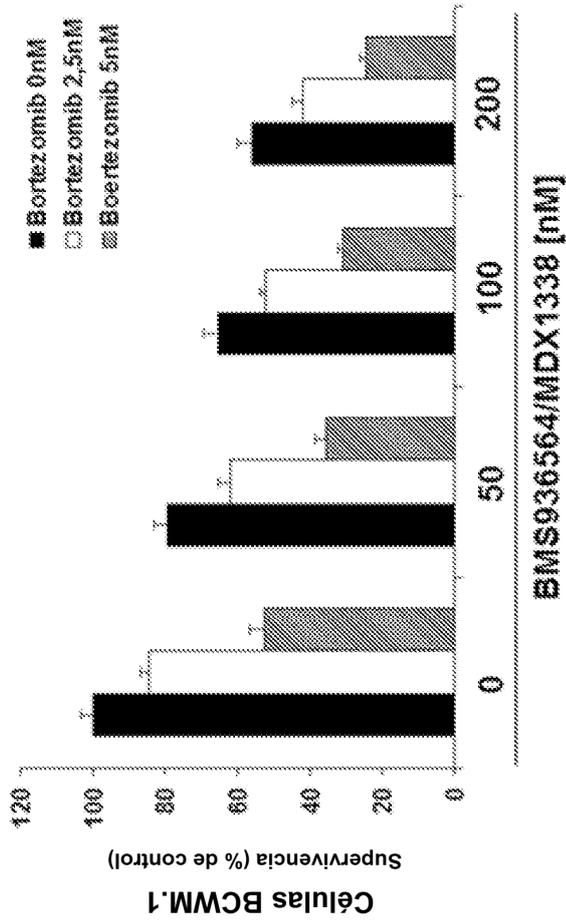


FIG. 23D

