

Anticuerpo anti-CXCR4 combinado con células asesinas naturales activadas y expandidas para la inmunoterapia con sarcoma

 Maria Vela^{1*},  David Bueno^{2†},  Pablo González-Navarro^{1†},  Ariadna Brito¹,  Lucía Fernández³,  Adela Escudero⁴,  Jaime Valentín¹,  Carmen Mestre-Durán¹,  Marina Arranz-Álvarez⁵,  Rebeca Pérez de Diego^{6,7,8},  Marta Mendiola^{9,10},  José Juan Pozo-Kreilinger^{9,11} y  Antonio Pérez-Martínez^{2,12*†}

- ¹ Investigación traslacional en oncología pediátrica, trasplante hematopoyético y terapia celular, Instituto de Investigación en Salud del Hospital La Paz (IdiPAZ), Madrid, España.
- ² Departamento de Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.
- ³ Unidad de Investigación Clínica de Malignidades Hematológicas H12O-CNIO, Centro Nacional de Investigación del Cáncer (CNIO), Madrid, España.
- ⁴ Unidad de Oncología Pediátrica Molecular, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.
- ⁵ Biobanco del Hospital La Paz Instituto de Investigación en Salud (IdiPAZ), Madrid, España
- ⁶ Laboratorio de Inmunogenética de Enfermedades Humanas, Instituto de Investigación en Salud del Hospital La Paz (IdiPAZ), Madrid, España.
- ⁷ Grupo de Inmunidad Innata, Instituto de Investigación en Salud del Hospital La Paz (IdiPAZ), Madrid, España.
- ⁸ CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Madrid, España
- ⁹ Patología Molecular y Objetivos Terapéuticos, Instituto de Investigación en Salud del Hospital La Paz (IdiPAZ), Madrid, España.
- ¹⁰ Sección de Patología Molecular, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

- ¹¹ Servicio de Patología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.
- ¹² Departamento de Pediatría, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, España.

El sarcoma es una de las formas más graves de cáncer pediátrico y las terapias actuales -quimioterapia y cirugía- no logran erradicar la enfermedad en la mitad de los pacientes. Los estudios preclínicos que combinan nuevos enfoques terapéuticos pueden ser útiles para diseñar mejores terapias. Por un lado, se sabe que la expresión de CXCR4 está implicada en la progresión del rhabdomyosarcoma, por lo que analizamos las recaídas y los tumores de rhabdomyosarcoma resistentes a la quimioterapia de pacientes pediátricos y descubrimos que tenían niveles particularmente altos de expresión de CXCR4. Además, en los ensayos *in vitro*, el anticuerpo de bloqueo anti-CXCR4 (MDX1338) redujo de manera eficiente la migración y la invasión de las células de rhabdomyosarcoma alveolar RH30. Por otro lado, la terapia con células asesinas naturales activadas y expandidas (NKAE) mostró una alta citotoxicidad contra las células de sarcoma *in vitro* e inhibió completamente la implantación del tumor RH30 *in vivo*. Solo la combinación de los tratamientos MDX1338 y NKAE suprimió completamente la metástasis en ratones. En este estudio, proponemos un nuevo enfoque terapéutico basado en el anticuerpo de bloqueo anti-CXCR4 en combinación con la terapia con células NKAE para prevenir la implantación de tumores de rhabdomyosarcoma y metástasis pulmonares. Estos resultados proporcionan la primera evidencia de la eficacia de esta inmunoterapia combinada para prevenir la diseminación de la enfermedad de sarcoma.

Introducción

Los sarcomas afectan principalmente a niños y adultos jóvenes. Casi la mitad de los niños con tumores sólidos, como el rhabdomyosarcoma, el osteosarcoma y el sarcoma de Ewing, tienen una enfermedad progresiva a pesar del tratamiento agresivo. El pronóstico es particularmente malo para los pacientes con enfermedad metastásica, en al menos dos tercios de los cuales la enfermedad progresa ([1](#) -

3). Por lo tanto, se requieren urgentemente nuevos enfoques terapéuticos que pasen por alto los mecanismos celulares de resistencia a los medicamentos, particularmente para pacientes con características de alto riesgo.

Las quimiocinas que interactúan con los receptores de quimiocinas expresados por metástasis de las células tumorales juegan un papel crucial en la dirección de las células migratorias hacia órganos secundarios. Esto está bien documentado para la quimiocina CXCL12 y el receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4). Müller y col. descubrió un eje de referencia CXCL12-CXCR4 en metástasis de cáncer y demostró la migración preferencial de células de cáncer de mama que expresan CXCR4 hacia extractos de proteínas del pulmón, que tiene altos niveles de expresión de CXCL12 (4).

La unión de CXCL12 a CXCR4 estimula el flujo de calcio intracelular, activa las vías de señalización de AKT y ERK, y regula al alza la formación de adherencias focales, aumentando en última instancia la migración a lo largo de gradientes de quimiocinas secretadas y expresadas localmente (5). También conduce a la transcripción de genes que promueven la supervivencia y proliferación celular. CXCR4 se encuentra en varios tejidos y se expresa predominantemente en células hematopoyéticas, incluidas las células B y T, monocitos, macrófagos, células asesinas naturales (NK) y dendríticas, y en células progenitoras de médula ósea CD34 + (6). CXCR4 también se expresa débilmente en células endoteliales y epiteliales, astrocitos y neuronas (7 , 8).

Khune y col. (Bristol-Myers Squibb) desarrolló recientemente un anticuerpo monoclonal completamente humano (mAb), MDX1338 / ulocuplumab, específico para CXCR4 humano (9). MDX1338 es un mAb de alta afinidad que bloquea la unión de CXCL12 a CXCR4, inhibiendo así la proliferación y migración celular promovida por esta unión. Se ha demostrado que el tratamiento con MDX1338 induce apoptosis *in vitro* y actividad antitumoral *in vivo* en cánceres

hematológicos. MDX1338 es un mAb isotipo IgG4. Por lo tanto, no media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Su efecto proapoptótico está asociado con la producción de especies reactivas de oxígeno y no requiere activación de caspasa, como se describe en un modelo de leucemia linfocítica crónica ([10](#)).

Se sabe que las células inmunes reconocen y matan las células tumorales, lo que sugiere que podrían usarse en el tratamiento contra el cáncer. Las células NK matan las células madre cancerosas y las células genotóxicamente alteradas con un alto grado de precisión, pero son tolerantes con las células sanas. Estas propiedades sugieren que podrían ser buenos efectores terapéuticos para todas las formas de cáncer, incluidas las metástasis ([11](#)). Fujisaki y col. ([12](#)) e Imai e Iwamoto ([13](#)) informaron que la línea celular de leucemia K562 modificada genéticamente para expresar ligando de interleucina (IL) - 15 y 4.1-BB unida a membrana (K562-mb15-41BBL) activa específicamente las células NK humanas, conduciéndolas al ciclo celular para generar NK altamente citotóxicas. Además, el método de estimulación K562-mb15-41BBL ya se ha ampliado a condiciones de grado clínico a gran escala de acuerdo con las pautas de buenas prácticas de fabricación clínica, para la producción de grandes cantidades de células NKAE altamente citotóxicas y ensayos clínicos aprobados por la FDA ya están en marcha en pacientes con cánceres hematológicos y tumores sólidos infantiles.

Nuestro equipo ha liderado cinco ensayos clínicos con inmunoterapia con células NK adoptivas en pacientes con tumores sólidos refractarios pediátricos (NCT01337544), leucemia / linfoma agudo recidivante o refractario (NCT01944982 y NCT02074657), leucemia mieloide aguda (NCT02763475) o mieloma múltiple (NCT02481934). Nuestros resultados muestran que es una terapia prometedora y viable ([14](#) - [16 de](#)). En base a nuestra experiencia con la terapia con células NKAE, planteamos la hipótesis de que el mAb MDX1338 antimetastásico y la

terapia con células NK citotóxicas tendrían efectos complementarios, aumentando así la eficacia de la estrategia terapéutica.

Analizamos la expresión de CXCR4 en muestras tumorales de pacientes con rhabdomioma pediátrico. Presentamos datos preclínicos que muestran la capacidad de la terapia con células NKAE para matar células de sarcoma y del mAb MDX1338 para inhibir la migración e invasión de células de sarcoma CXCR4 *in vitro*. También utilizamos un modelo ortotópico de rhabdomioma alveolar para evaluar los efectos antitumorales y antimetastásicos complementarios de la inmunoterapia combinada NKAE + MDX1338 *in vivo*.

Materiales y métodos

Determinación de la expresión de CXCR4 en muestras de pacientes por inmunohistoquímica

Se obtuvieron muestras humanas después del consentimiento informado del paciente de acuerdo con la Declaración de Helsinki. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital de La Paz (PI-2295).

Para la inmunohistoquímica tumoral CXCR4, los portaobjetos tumorales fijados con formalina e incluidos en parafina se desparafinaron, hidrataron, tiñeron con mAb CXCR4 humano (dilución 1:10; clon 44716; sistemas de I + D), sistema de visualización EnVision FLEX + (ratón, pH alto, Agilent) y hematoxilina contrateñida. La especificidad del anticuerpo se confirmó por inmunotinción de tejido amigdalario. Al porcentaje de células tumorales CXCR4⁺ se le asignó una puntuación entre 0 y 5, y la intensidad de tinción una puntuación entre 0 y 3. Se agregaron estos 2 valores. Tanto la tinción citoplasmática como la nuclear fueron evaluadas e igualmente ponderadas para producir la puntuación final de tinción.

Cultivo de células

Las líneas celulares 143B (CRL-8303), MG-63 (CRL-1427) y A673 (CRL1598) eran de la American Type Culture Collection. RH30 (ACC-

489) era del Leibniz-Institut DSMZ. A4573 y CW9019 fueron amables obsequios del Dr. Javier Alonso (Instituto de Salud Carlos III) y el Dr. Josep Roma (Instituto de Investigación Vall d'Hebron), respectivamente.

Las células bioluminiscentes RH30 (RH30-GFP-Luc) se generaron por infección con un lentivirus recombinante que codifica proteína fluorescente verde (GFP) y luciferasa de luciérnaga (Luc) bajo el promotor EF1a y con marcador de neomicina (Amsbio). Las células infectadas que expresan altos niveles de GFP se aislaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia, se clonaron, expandieron y se usaron para ensayos de bioluminiscencia *in vivo*. La cinética del crecimiento celular RH30-GFP-Luc fue similar a la de las células RH30 parentales y retuvieron la expresión de CXCR4 en la superficie.

Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (FBS, Gibco), L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U / ml y estreptomina 50 µg / ml (medio completo)

Activación y expansión de células NK

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos se aislaron por centrifugación sobre un gradiente de densidad (Ficoll-Paque, GE Healthcare) (400 g, 30 min).

La línea celular K562-mbIL15-41BBL genéticamente modificada, amablemente proporcionada por el profesor D. Campana (Universidad Nacional de Singapur) fue irradiada con 100 Gy.

Las células NKAE se obtuvieron cocultivando las PBMC del donante con células K562-mb15-41BBL irradiadas en una proporción 1: 1,5 más 100 U / ml de IL-2 (Miltenyi) durante 14-21 días en medio de crecimiento de células madre (SCGM, Cellgenix) suplementado con 10% de suero humano AB (Sigma). Se añadió medio fresco cada 2-3 días a una concentración final de 1×10^6 células / ml. El porcentaje y el

fenotipo de las células NK (CD3⁻, CD56⁺), las células T (CD3⁺, CD56⁻) y las células NKT (CD3⁺, CD56⁺) se controlaron semanalmente mediante citometría de flujo (Navios, Beckman Coulter) ([Figura 1 complementaria](#)). En la [tabla complementaria 1](#) se proporciona una lista de anticuerpos marcados utilizados en este estudio .

Determinación de la expresión de CXCR4 en líneas celulares de sarcoma mediante citometría de flujo y qRT-PCR

Para la tinción, se centrifugaron 2×10^5 células / pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en V y se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Lonza) que contenía albúmina de suero bovino al 0,5% (Lonza), FBS al 1% y azida de sodio al 0,1% . La unión no específica se bloqueó preincubando las células con 40 µg / ml de IgG de rata (Sigma; 100 µl de volumen final, 20 min, 4 ° C). Las células se incubaron con mAb anti CXCR4-APC (BD Pharmingen; clon 12G5) o mAb con isotipo compatible (30 min, 4 ° C). Las muestras se analizaron en un citómetro Navios (Beckman Coulter).

Para qRT-PCR, se obtuvo ARN de cultivo celular usando RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El nivel de expresión relativa de ARNm que codifica CXCR4 humano se determinó por RT-PCR cuantitativa usando la expresión del gen GUS como control interno. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total con el sistema de síntesis de primera hebra Superscript IV (Invitrogen). El ADNc se amplificó por duplicado con cebadores para CXCR4 humano (Hs00237052_m1, Applied Biosystems) y para GUS humano (Fw: 5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT – 3', Rv: 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA – 3'; CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA [TAMRA] –3'; todo de Sigma). La amplificación (1 ciclo: 50 ° C durante 2 min, 95 ° C durante 10 min; 50 ciclos: 95 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 1 min) se monitorizó utilizando el Roche LightCycler 480. La expresión relativa

se analizó utilizando el método $2^{-\Delta CT}$, donde $\Delta CT = (\text{gen Ct de interés} - \text{control interno Ct})$.

Ensayos de citotoxicidad mediada por células

Las células diana NKAE y RH30-GFP-Luc se cultivaron conjuntamente (4 h) a las proporciones indicadas en DMEM-FBS al 10%, luego se tiñeron con 7-AAD (10 min, 4 ° C) y se analizaron por citometría de flujo. La activación de las células 7-AAD⁺ dentro de la población GFP⁺ indicó la proporción de células objetivo muertas. La destrucción específica se calculó como $100 \times [(\% \text{ de células objetivo muertas en la muestra} - \% \text{ de células objetivo espontáneas muertas}) / (100 - \% \text{ de células objetivo espontáneas muertas})]$. Las células objetivo incubadas sin células efectoras se usaron para evaluar la muerte celular espontánea. En la [Figura 2 complementaria](#), las células RH30-GFP-Luc se incubaron previamente con MDX1338 o mAb de control de isotipo IgG4 (30 min, 100 µg / ml) antes del ensayo.

Ensayos de migración celular e invasión

Las células se incubaron en tampón muerto de hambre (DMEM-1% FBS) durante 24 h. A continuación, se suspendieron 2×10^5 células en 80 µl de tampón de migración (DMEM-1% albúmina de suero humano, Grifols) y se colocaron en el compartimento superior de placas de pocillos de 96 pocillos (tamaño de poro de 8,0 µm, Neuroprobe). El compartimento inferior se llenó con 300 µl de: tampón de migración solo (medio no acondicionado), tampón de migración con 100 ng / ml de CXCL12 (sistemas de I + D) o tampón de migración con 10% de FBS. En los ensayos de invasión, el compartimento superior de la membrana se revistió con 20 µl de Matrigel (Corning) a 0,2 mg / ml.

Después de 48 h de incubación para permitir que las células migren / invadan a través de la membrana, las células que quedan en la cara superior de la membrana se eliminaron con un hisopo de algodón, mientras que las células en el lado inferior de la membrana se fijaron con metanol y se tiñeron con cristal violeta. Después de lavar con PBS, se determinó el número de células migratorias / invasoras usando un

microscopio Carl Zeiss Axiovert 200. Se contaron cuatro campos por pozo a 200x.

Para los experimentos de neutralización de migración / invasión, se mezclaron 10^5 células RH30 con la concentración final indicada de mAb anti CXCR4 MDX1338 o mAb IgG4 de control en un volumen final de 90 μ l de tampón de migración y se procedió como se indicó anteriormente. En la [Figura complementaria 2](#), también se agregaron 500,000 células NKAE (relación efector: objetivo, E: T = 5: 1) en el pozo superior.

Ensayos de xenoinjerto

Los ratones NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} / SzJ, Charles River Laboratories) se mantuvieron en las instalaciones para animales del Instituto de Investigación Biomédica Alberto Sols. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid (PROEX 220/16) y el Comité de Ética del CSIC.

Para el *in vivo* modelo de metástasis, se inocularon 6 semanas de ratones hembra de edad por vía intravenosa (iv) con $0,5 \times 10^6$ células RH30-GFP-Luc en día se establecieron 0. Cinco grupos de tratamiento (5 ratones / grupo): no tratado; control de isotipo IgG4 mAb; mAb anti CXCR4 MDX1338; Células NKAE; y células MDX1338 + NKAE. Los anticuerpos se inocularon por vía intraperitoneal (ip), 15 mg / kg, dos veces por semana durante 3 semanas. Células NKAE se administraron iv, 5×10^6 células / ratón, una vez a la semana durante tres semanas.

Los tumores luminiscentes se monitorizaron semanalmente durante 35 días. Brevemente, se administró D-luciferina (150 mg / kg; Perkin Elmer) ip 10 minutos antes del análisis. Durante las imágenes, los ratones fueron anestesiados con isoflurano en una cámara a prueba de luz usando un IVIS-Lumina II (Caliper Lifesciences). El tiempo de exposición fue de 180 s. Se usó Living Image v4.5.2 (Perkin Elmer) para cuantificar los datos y producir imágenes de pseudocolor.

Histología e identificación de micrometástasis pulmonares en ratones

Los ratones disecados órganos se fijaron durante la noche en paraformaldehído al 4% (pH 7,4), se lavaron en PBS, se incluyeron en parafina y se cortaron (3 μ m).

La presencia de células RH30 en los pulmones se estudió mediante tinción inmune utilizando anticuerpo anti-CXCR4 humano (I + D, clon 44716, dilución 1:50), sistema de visualización EnVision FLEX + (ratón, pH alto; Agilent) y hematoxilina / eosina contrateñida.

Para la hibridación *in situ*, la recuperación de antígeno se realizó primero con tampón de pH bajo (RiboCC, Roche) y proteasa III (Roche). Los portaobjetos se incubaron con la sonda de control positivo Alu II (Ventana, Roche 05272041001). Se realizaron tres lavados rigurosos y los portaobjetos se incubaron con suero anti-DNP de conejo. Para la visualización, se utilizó el sistema OmniRabbit conjugado con peroxidasa de rábano picante (Ventana, Roche). La reacción inmunohistoquímica se desarrolló utilizando plata como cromógeno (kit Silver, Ventana, Roche) y los núcleos se contratiñeron con hematoxilina de Carazzi.

Todas las imágenes fueron capturadas en un microscopio Carl Zeiss Lab.A1 con una cámara digital AxioCam ERC5S (Carl Zeiss).

qRT-PCR y cuantificación de micrometástasis pulmonares en ratones

Un tercio de los órganos disecados de los ratones se usaron para la extracción total de ARN utilizando el kit RNAeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de expresión relativos de ARNm que codifica CXCR4 humano y GUS humano se determinaron por RT-PCR semicuantitativa con sedimento de células RH30 como control del 100% de células humanas. La síntesis de ADNc y la amplificación de CXCR4 humano y GUS humano se realizó como se indicó anteriormente.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 7. La significación estadística se estableció en $p < 0.05$ según lo evaluado por la prueba *t de Student* o ANOVA no apareados. Los resultados se muestran como media \pm SEM, a menos que se indique lo contrario.

Resultados

CXCR4 se expresa más fuertemente en muestras recurrentes de pacientes con rhabdomioma pediátrico que en muestras diagnósticas

Se requieren urgentemente nuevas opciones de tratamiento para pacientes cuyos tumores no responden a la quimioterapia y para las recaídas después de la cirugía. Investigamos el papel potencial de CXCR4 en la resistencia a la quimioterapia y la recaída, mediante análisis inmunohistoquímicos para evaluar la expresión de CXCR4 en muestras de tumores de rhabdomioma. Las características de los pacientes se enumeran en la [tabla complementaria 2](#). Analizamos 26 muestras de rhabdomioma pediátrico archivadas en el biobanco del Hospital Universitario de La Paz de 2010 a 2017. Estas muestras fueron tomadas de pacientes con una edad promedio de 6.6 años (rango: 0.2–14.1) y una mediana de seguimiento de 7.9 años (rango: 0.6-18.4). Diecisiete de las muestras se obtuvieron en el momento del diagnóstico, cinco son muestras refractarias recogidas después de la quimioterapia y cuatro muestras correspondieron a recaídas. Como estudios recientes han informado que CXCR4 se expresa en el núcleo en algunos tipos de cáncer ([17](#) , [18](#)), realizamos tinción citoplasmática y nuclear, con igual ponderación en los dos compartimentos durante el análisis. La tinción citoplasmática para CXCR4 se observó en el 68% de las muestras de nuestra serie y la tinción nuclear en el 15% ([Figura 1A](#))

FIGURA 1

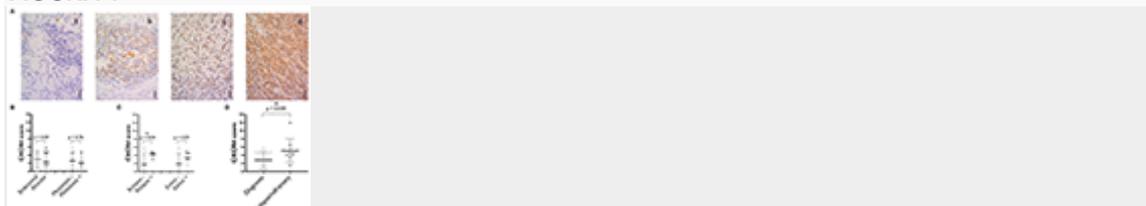


Figura 1 . Expresión de CXCR4 en los tumores de pacientes con rhabdomyosarcoma. **(A)** Tinción representativa correspondiente a muestras con niveles negativos (a), medios (b) y altos (c) de expresión citoplasmática de CXCR4. También se muestra una muestra con un alto nivel de tinción nuclear CXCR4 (d). Barra de escala = 10 μ m. $N = 26$. **(B)** Gráfico de puntuación de expresión de CXCR4 para tumores primarios en el diagnóstico donde se comparan los rhabdomyosarcomas alveolar versus embrionarios y donde se comparan los rhabdomyosarcomas localizados versus los ya metastatizados. **(C)** Tumores primarios en el diagnóstico CXCR4 expresión versus resultado (recaída de la enfermedad o muerte del paciente). **(RE)** Comparación de la expresión de CXCR4 entre muestras obtenidas en el diagnóstico y después de la quimioterapia (refractaria) y durante la recaída. Los valores mostrados son la mediana \pm DE. Se realizaron pruebas t de Student sin emparejar . * $p < 0,05$.

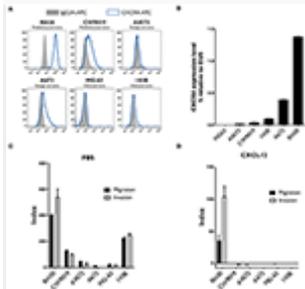
Para las muestras de diagnóstico, no se observó diferencia en la expresión de CXCR4 entre rhabdomyosarcomas embrionarios y alveolares o entre especímenes de tumores localizados y aquellos de tumores primarios que ya habían hecho metástasis ([Figura 1B](#)). Se observó una relación entre la puntuación CXCR4 y el resultado del paciente, obteniéndose una puntuación mediana CXCR4 más alta para las muestras de pacientes que posteriormente sufrieron recaídas o murieron por la enfermedad ([Figura 1C](#)).

Además, una comparación de la puntuación de expresión de CXCR4 entre las muestras de diagnóstico (2.8 ± 2.1) y las recaídas / refractarias (5.1 ± 2.9) reveló una tendencia significativa hacia niveles más altos de expresión de CXCR4 en las muestras de recaída que en las muestras de diagnóstico ([Figura 1D](#)).

La línea celular de rhabdomyosarcoma alveolar RH30 tenía los niveles más altos de expresión de CXCR4, concomitante con las tasas más altas de migración e invasión hacia CXCL12

Analizamos la expresión superficial de CXCR4 en cultivos confluentes de varias líneas celulares de sarcoma: RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63 y 143B. La proporción de células CXCR4⁺ fue más alta en cultivos de células RH30, en los que se detectó la expresión de CXCR4 en $98,6 \pm 0,7\%$ de las células ([Figura 2A](#)). Estos resultados fueron consistentes con el análisis de los niveles de ARNm de CXCR4 por análisis RT-qPCR. Los cultivos RH30 mostraron niveles de CXCR4 $1,38 \pm 0,01$ veces mayores que los de una expresión génica de control (beta-glucuronidasa, GUS) ([Figura 2B](#)).

FIGURA 2



La Figura 2 . Análisis de la expresión de CXCR4 y de la capacidad de migración e invasión de diferentes líneas celulares de sarcoma. **(A, B)** La expresión de CXCR4 fue más fuerte en la línea celular de rhabdomiosarcoma alveolar RH30. La expresión de CXCR4 por dos líneas celulares de rhabdomiosarcoma (RH30 y CW9019), dos líneas celulares de sarcoma de Ewing (A4573 y A673) y dos líneas celulares de osteosarcoma (MG-63 y 143B) se analizaron por citometría de flujo **(A)** y por RT-qPCR **(B)** $N = 3$. **(C, D)** Las células RH30 migran e invaden a lo largo de un gradiente hacia la quimiocina CXCL12, ligando específico de CXCR4. Su capacidad de migrar hacia FBS **(C)** o CXCL12 **(D)** se evaluó en ensayos Transwell, con membranas con poros de $8 \mu\text{m}$. La capacidad de invasión se midió en las mismas condiciones, con membranas Transwell recubiertas con Matrigel. Cada condición se realizó en pozos duplicados. Resultados representativos de un experimento de cada tres realizados.

Evaluamos la capacidad de migración e invasión de las líneas celulares de sarcoma en los ensayos Transwell, que se considera que

proporcionan una indicación *in vitro* del potencial metastásico *in vivo*. Varias líneas celulares de sarcoma migraron hacia FBS quimioatrayente y mostraron capacidad de invasión ([Figura 2C](#)), pero solo la línea celular RH30 migró e invadió específicamente hacia el ligando CXCR4, CXCL12 ([Figura 2D](#)). Los índices de migración e invasión de RH30 hacia CXCL12 fueron 35.2 ± 8.3 y 104.0 ± 16.4 , respectivamente.

Las células NKAE fueron altamente citotóxicas para las células RH30, y MDX1338 redujo eficientemente la migración e invasión de células RH30 hacia CXCL12

Las células NK juegan un papel importante en el control natural de las células tumorales. Al cocultivar estas células con la línea celular genéticamente modificada K562-mb15-41BBL, se pueden obtener grandes cantidades de células NK activadas (células NKAE) de donantes sanos. Medimos los efectos citolíticos de las células NKAE en las células de sarcoma RH30. Las células NKAE indujeron $21,9 \pm 0,4\%$ de lisis específica de células RH30, en una relación efector: célula objetivo (E: T) de 20: 1 ([Figura 3A](#)). Como se esperaba, MDX1338 no tuvo un efecto significativo sobre la citotoxicidad observada ([Figura complementaria 2A](#)). MDX1338 es un mAb anti-CXCR4 IgG4 completamente humano ([9](#) , [10](#)) y, por lo tanto, no se espera que induzca ADCC ([19](#)).

FIGURA 3

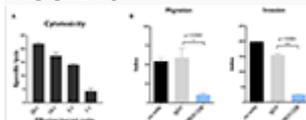


Figura 3. La citotoxicidad mediada por NKAE *in vitro* y la inhibición mediada por MDX1338 de la capacidad de migración e invasión de las células de rhabdomyosarcoma. **(A)** Las células NKAE eran altamente citotóxicas para las células RH30. La lisis específica se determinó a las relaciones NKAE: RH30 E: T indicadas. **(B)** MDX1338 disminuyó eficientemente la migración e invasión de células RH30 hacia CXCL12. La migración de células RH30 se evaluó con placas

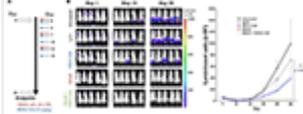
Transwell. La capacidad de invasión se midió en las mismas condiciones, con membranas Transwell recubiertas con Matrigel. Cada condición se realizó por duplicado. Un experimento representativo es mostrado. $N = 3$. Prueba ANOVA unidireccional. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

El efecto de MDX1338 en el eje CXCR4 / CXCL12 se evaluó en células RH30, en ensayos de migración e invasión *in vitro*. MDX1338 disminuyó significativamente la migración de células RH30 hacia CXCL12 y su capacidad de invasión: 54.4 ± 4.4 vs. 10.5 ± 2.0 para la migración y 199.1 ± 2.9 vs. 25.6 ± 1.9 para la invasión ([Figura 3B](#)). La combinación de las células MDX1338 y NKAE abolió totalmente la capacidad de migración e invasión de estas células ([Figura complementaria 2B](#)).

El tratamiento con células NKAE inhibió completamente la implantación de células tumorales RH30 *in vivo*

Evaluamos el potencial antitumoral de las terapias celulares MDX1338 y NKAE, generando un modelo *in vivo* de sarcoma metastásico, utilizando células CXCR4 + RH30, que crecen como xenoinjertos peritoneales cuando se implantan en ratones NSG inmunodeficientes. Los ratones se inocularon por vía intravenosa con células RH30-GFP-Luc (día 0). Luego recibieron uno de los siguientes tratamientos: MDX1338 mAb, control de isotipo IgG4 mAb, células NKAE o tratamiento combinado de células MDX1338-NKAE ([Figura 4A](#)). El tamaño de los tumores en desarrollo se evaluó midiendo la señal luminiscente, hasta el día 36, cuando se mató a los ratones. La terapia con células NKAE sola fue suficiente para prevenir la implantación intraperitoneal de tumores RH30 por completo ([Figura 4B](#)) Los ratones tratados con mAb MDX1338 solo desarrollaron tumores intraperitoneales ligeramente más pequeños que los de los ratones control, mientras que un mAb IgG4 control no tuvo un efecto significativo.

FIGURA 4



La Figura 4 . Inhibición de la implantación tumoral *in vivo* por células NKAE. **(A)** Programa de administración para el anticuerpo y las células NKAE en ratones NSG con células tumorales RH30 GFP + Luc + inyectadas por vía intravenosa. Se establecieron cinco brazos de tratamiento: sin tratamiento; IgG4; MDX1338; NKAE; MDX1338 + NKAE (5 ratones / grupo). Prueba ANOVA de dos vías. Los ratones recibieron tres dosis de NKAE y seis dosis de mAb. Los tumores luminiscentes se monitorizaron durante 35 días. **(B)** El tratamiento con NKAE evitó por completo la implantación peritoneal de tumores RH30 en ratones. *** $p < 0,0001$.

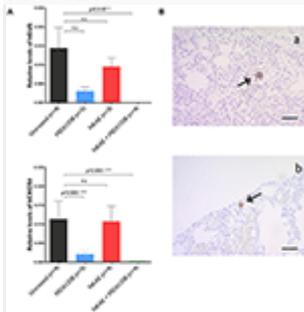
El tratamiento con células MDK1338 + NKAE eliminó las micrometástasis pulmonares de rabadomiosarcoma en un modelo *in vivo*

Los tumores peritoneales primarios RH30 fueron fáciles de monitorear con el sistema de detección luminiscente, pero la sensibilidad de este enfoque fue demasiado baja para determinar si las micrometástasis RH30 GFP + Luc + estaban presentes en los órganos distales. Por lo tanto, utilizamos RT-qPCR para evaluar la presencia de células humanas mediante la amplificación de ADNc de GX humano y CXCR4 humano de los pulmones, el hígado, el bazo y la médula ósea de los ratones. La expresión del gen humano se detectó solo en los pulmones, lo que indica la presencia de células RH30 en este órgano.

El tratamiento con células NKAE solo fue insuficiente para prevenir las micrometastasis pulmonares RH30. El nivel relativo de expresión para GUS humano fue $14.5 \times 10^{-3} \pm 5.4 \times 10^{-3}$ en ratones no tratados y $8.3 \times 10^{-3} \pm 2.7 \times 10^{-3}$ en ratones tratados con NKAE. Para CXCR4 humano, los niveles de expresión relativos fueron $11.4 \times 10^{-3} \pm 4.7 \times 10^{-3}$ en ratones no tratados y $10.7 \times 10^{-3} \pm 4.1 \times 10^{-3}$ en ratones tratados con NKAE. El tratamiento con MDX1338 solo disminuyó

significativamente la formación de micrometástasis, pero solo la combinación de tratamientos con MDX1338 y NKAE condujo a niveles indetectables de la expresión del gen GUS humano y CXCR4 en los pulmones de ratón analizados ([Figura 5A](#)) Hemos realizado una RT-PCR para confirmar que las células humanas presentes en los pulmones de los ratones eran células RH30. Las células RH30 tienen una translocación cromosómica $t_{(2,13)}$ que da como resultado la proteína de fusión PAX3-FOXO1 ([20](#)). Detectamos la transcripción específica del gen quimérico PAX3-FOXO1 ([21](#)), en ratones no tratados, tratados con IgG4, MDX1338 y NKAE, mientras que no pudimos detectarlo en los pulmones de ratones tratados con NKAE + MDX1338 ([Figura complementaria 3](#)).

FIGURA 5



La Figura 5 . Abolición de la formación de micrometástasis pulmonares de rhabdomyosarcoma por MDX1338. **(A)** Los ratones tratados con NKAE desarrollan micrometástasis RH30 en el pulmón, pero esto se evita por completo mediante la combinación de MDX1338 y NKAE. Las micrometástasis se detectaron y cuantificaron mediante RT-qPCR con una sonda específica de GX humana o CXCR4 humana. Cada muestra se analizó por duplicado, se analizaron 5 ratones por grupo. Prueba ANOVA de dos vías. **(B)** La presencia de micrometástasis de rhabdomyosarcoma se confirmó por métodos histológicos. Las micrometastasis pulmonares en ratones no tratados se identificaron mediante hibridación de secuencia Alu (a) y tinción de mAb específica de CXCR4 (b). Barra de escala = 20 μm . * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Para una confirmación adicional de la presencia de micrometástasis RH30, las muestras de pulmón se tiñeron con una sonda de secuencia Alu o el mAb CXCR4 antihumano. Se encontraron agregados de células humanas en los pulmones de ratones no tratados para ambos procedimientos de tinción ([Figura 5B](#)).

Discusión

Los sarcomas, como el sarcoma de Ewing, el osteosarcoma y los sarcomas de tejidos blandos como los rhabdomyosarcomas, forman un grupo de tumores relativamente raros derivados del mesénquima ([22](#)). Representan solo un pequeño porcentaje de cánceres humanos en general, pero son el segundo tumor sólido más frecuente en los niños. A pesar de los avances en la quimioterapia adyuvante y la resección quirúrgica amplia, el pronóstico sigue siendo pobre, principalmente debido a la alta frecuencia de metástasis pulmonares, la principal causa de muerte en estos pacientes.

Se ha demostrado que las quimiocinas y su interacción con sus receptores desempeñan un papel fundamental en los mecanismos de desarrollo de cáncer y metástasis ([23](#)). Los niveles de expresión de las quimiocinas y sus receptores están alterados en las células malignas. Esto se ha demostrado para CXCR4, el receptor de quimiocinas sobreexpresado con mayor frecuencia en las células tumorales. La interacción de CXCR4 con su ligando, CXCL12, activa una cascada de señalización celular que promueve la supervivencia, proliferación, adhesión y migración de las células tumorales que expresan CXCR4. Esto puede conducir a una recaída del tumor primario y aumenta la probabilidad de metástasis a distancia en los órganos en los que se secreta el ligando, como la médula ósea y los pulmones en particular ([5](#) , [24](#)).

La expresión aberrante de CXCR4 se ha observado en más de 23 cánceres humanos. La importancia pronóstica de CXCR4 se ha estudiado en detalle en pacientes con sarcomas de huesos y tejidos blandos ([25](#) - [30](#)). En un metaanálisis reciente de 12 estudios que

incluyeron un total de 997 pacientes con sarcoma, se encontró que la expresión de CXCR4 se asociaba significativamente con una supervivencia general deficiente, tasas más altas de metástasis y un estadio tumoral más alto ([18](#)). En nuestra cohorte de pacientes de rhabdomyosarcoma pediátrico, encontramos una correlación entre los niveles más altos de expresión de CXCR4 en el momento del diagnóstico y la recaída. Las células iniciadoras de tumores (TIC) son una subpoblación de células tumorales quimiorresistentes que se ha demostrado que causan recurrencia tumoral y metástasis. Una de las características de estas células es una regulación positiva de CXCR4 ([24](#)). De acuerdo con este hallazgo, observamos que los tumores que continuaron creciendo después de la quimioterapia o que recayeron después de la cirugía y la quimioterapia fueron aquellos con los niveles más altos de CXCR4 ([Figura 1C](#)). La eliminación de las TIC es, por lo tanto, una prioridad en el desarrollo de nuevos modos de tratamiento. Estas células son el objetivo de nuestro tratamiento combinado anti-CXCR4 mAb y NKAE.

El secuestro de las vías de señalización CXCL12 / CXCR4 por las células tumorales con el propósito de metástasis y protección contra la apoptosis identificó rápidamente el bloqueo de este eje como un posible objetivo de tratamiento para el cáncer. Un estudio pionero de Müller et al. ([4](#)) demostraron la relevancia *in vivo* de CXCR4 como objetivo para la terapia contra el cáncer, vinculando la expresión de CXCR4 en carcinomas de mama con su capacidad para generar metástasis regionales de ganglios linfáticos y pulmones. Estos datos fueron respaldados por experimentos en los que un anticuerpo neutralizador CXCR4 humano (mAb murino, clon 44717.111) disminuyó significativamente la frecuencia de metástasis pulmonares, inguinales y de ganglios linfáticos axilares. Posteriormente se obtuvieron resultados similares con otro anticuerpo murino anti-CXCR4 humano (clon 12G5) ([31- 33](#)). En un modelo de xenoinjerto de osteosarcoma intratibial humano, el mAb 12G5 redujo la diseminación

metastásica al pulmón ([34](#)). Curiosamente, en un modelo de xenoinjerto de rhabdomyosarcoma, un tercer mAb anti CXCR4 murino (clon CF172) mostró cierta resistencia a la metástasis de los ganglios linfáticos, mientras que tuvo poco efecto sobre el volumen del tumor primario ([35](#)). De acuerdo con estos hallazgos anteriores, nuestros resultados para MDX1338, un mAb completamente humano que bloquea el eje CXCR4 / CXCL12, muestran que este mAb puede disminuir de manera eficiente los índices de migración e invasión de las células de rhabdomyosarcoma RH30 metastásico *in vitro* . Del mismo modo, *in vivo*, la combinación de los tratamientos MDX1338 y NKA-E no solo abolió la implantación del tumor RH30, sino también su capacidad de diseminación, evitando así la formación de micrometástasis pulmonares.

En condiciones fisiológicas no patológicas, CXCL12 y CXCR4 son importantes para el desarrollo del sistema nervioso central, el corazón y el sistema inmune ([36](#) , [37](#)). Por lo tanto, será esencial monitorear los posibles efectos adversos con mucho cuidado en cualquier enfoque terapéutico que implique un bloqueo de este eje. Plerixafor, un antagonista de molécula pequeña de CXCR4, se usa ampliamente para movilizar células madre hematopoyéticas para el trasplante autólogo en el linfoma no Hodgkin y el mieloma múltiple ([38](#)). No se han informado efectos adversos graves relacionados con el bloqueo de CXCL12 / CXCR4 tras la administración de plerixafor en pacientes. MDX1338 ya se ha probado en ensayos clínicos de fase I y II para el tratamiento de la macroglobulinemia de Waldenström, leucemia, tumores sólidos, leucemia mielógena aguda, leucemia difusa de células B grandes, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular y mieloma múltiple. Su efecto antitumoral está mediado por una movilización de células de mieloma de la médula ósea o por la inducción directa de apoptosis, en lugar de a través de la citotoxicidad celular, porque es un anticuerpo de isotipo IgG4

([9](#) , [10](#) , [39](#)). Tampoco se han informado efectos adversos graves debido al bloqueo de CXCL12 / CXCR4 por MDX1338 en estos ensayos.

En este estudio, proponemos una nueva inmunoterapia para el tratamiento de los sarcomas. Este tratamiento combina la capacidad de las células NK para eliminar las células tumorales sin sensibilización previa con el tratamiento anti-CXCR4 para disminuir la incidencia de metástasis. Anteriormente demostramos que las células de osteosarcoma son susceptibles a la lisis de NKAE tanto *in vivo* como *in vitro* , y que esta actividad citolítica depende de las interacciones entre el receptor NKG2D y sus ligandos ([40](#).) Las células NKAE se dirigieron a las células de sarcoma, incluido el compartimento de las TIC. Por lo tanto, decidimos probar los efectos potencialmente aditivos de la terapia celular MDX1338 y NKAE para el tratamiento del rhabdomyosarcoma. Mostramos aquí que una combinación de células NKAE y MDX1338 inhibe eficazmente la invasión de células de rhabdomyosarcoma, implantación tumoral y metástasis.

Como se mencionó, NK expresa constitutivamente CXCR4 y también lo hacen las células NKAE ([41](#)). Por lo tanto, el efecto de anti CXCR4 sobre NKAE debe tenerse en cuenta en la terapia combinada propuesta. En ratones, la administración del antagonista de CXCR4, AMD-3100 / plerixafor a ratones C57BL / 6 indujo una fuerte reducción de las células NK en la médula ósea y aumentó su número en sangre y bazo ([42](#)). Estos resultados son transponibles a nuestro modelo, ya que los genes CXCR4 y CXCL12 se conservan notablemente en diversas especies. El CXCL12 humano y murino difiere en un aminoácido y es reactivo cruzado ([43](#)). De manera similar, en un modelo de macaco rhesus, el tratamiento con AMD-3100 condujo a la movilización de NK, junto con subpoblaciones de células B y T en la sangre periférica ([44](#)) En nuestro modelo, planteamos la hipótesis de que MDX1338 bloquea no solo la migración metastásica de células de sarcoma CXCR4 + a los pulmones, sino que también bloquea las células terapéuticas NKAE que se dirigen a la médula ósea y favorece su

permanencia en el torrente sanguíneo, donde es más probable que encuentren y maten células neoplásicas metastásicas.

Se han publicado ensayos clínicos de la transferencia adoptiva de células NK. Estos ensayos hicieron uso de células NK en reposo ([45](#) , [46](#)) o células NK cultivadas con IL-2 ([47](#) - [49](#)). El uso de células NK activadas y expandidas cocultivadas con células presentadoras de antígeno derivadas de humanos, como se propone aquí, es una alternativa emergente ([14](#) , [15](#) , [50](#) , [51](#)). Nuestros resultados y los de otros indican que las terapias con células NKAE autólogas y haploidénticas son seguras, sin efectos adversos graves y factibles para su uso en el tratamiento de varios tipos de cáncer.

Los resultados presentados aquí demuestran que el tratamiento combinado con el mAb anti-CXCR4 MDX1338 y la terapia con células NKAE evita que las células de rhabdomyosarcoma migren, invadan, se implanten tumores y se formen metástasis pulmonares. Apoyan el establecimiento de un ensayo clínico para evaluar este esquema pionero de tratamiento combinado. Estudios anteriores han indicado que ambos tratamientos son bien tolerados, al menos cuando se usan por separado, por lo que la traducción de este enfoque a la práctica clínica debería ser sencilla. Este es un punto importante dada la urgente necesidad de nuevas estrategias para mejorar la eficacia del tratamiento en pacientes con sarcoma con enfermedad metastásica.

Disponibilidad de datos

Todos los conjuntos de datos generados para este estudio se incluyen en el manuscrito y / o en los [archivos complementarios](#) .

Declaración de Ética

Se obtuvieron muestras humanas después del consentimiento informado del paciente de acuerdo con la Declaración de Helsinki. La investigación fue aprobada por el Comité de Ética del Hospital de La Paz (PI-2295). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Área

de Protección Animal de la Comunidad de Madrid (PROEX 220/16) y el Comité de Ética del CSIC.

Contribuciones de autor

MV y AP-M: concepción, diseño y redacción, revisión y / o revisión del manuscrito. MV, PG-N, LF, AE, JP-K y MM: desarrollo de metodología. MV, DB, PG-N, AB, JV, CM-D, MA-Á: adquisición de datos (animales provistos, pacientes adquiridos y manejados, instalaciones provistas, etc.). MV, DB, PG-N, AB, RP, MM, JP-K y AP-M: análisis e interpretación de datos (p. Ej., Análisis estadístico, bioestadística, análisis computacional). MV, PG-N, AB y CM-D: soporte administrativo, técnico o material (es decir, informar u organizar datos, construir bases de datos). AP-M: supervisión del estudio.

Fondos

Este trabajo fue apoyado en parte por el Servicio Nacional de Salud de España, el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), la subvención FONDOS FEDER (FIS) PI15 / 00973; Asociación Española Contra el Cáncer a AP-M; Subvención de la Fundación CRIS para vencer al cáncer a JV, LF y AE; y las asociaciones de apoyo a pacientes Fundación Mari Paz Jiménez Casado y La Sonrisa de Álex a MV y el proyecto de investigación.

Declaracion de conflicto de interes

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de relaciones comerciales o financieras que pudieran interpretarse como un posible conflicto de intereses.

Expresiones de gratitud

Los autores agradecen a la Unidad Central de Histopatología del Centro Nacional de Investigación del Cáncer (CNIO) y a Raquel Marcos de la Unidad de Histopatología del Hospital Universitario de La Paz (HULP) por su valioso apoyo técnico. Esta investigación se realizó

utilizando el recurso IdiPAZ Biobank Resource, que también agradecemos por su excelente apoyo.

Material suplementario

El material complementario para este artículo se puede encontrar en línea

en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01814/full#supplementary-material>

Referencias

1. Oberlin O, Rey A, Lyden E, Bisogno G, Stevens MCG, Meyer WH, et al. Factores pronósticos en rhabdomyosarcomas metastásicos: resultados de un análisis agrupado de grupos cooperativos europeos y de Estados Unidos. *J Clin Oncol* . (2008) 26: 2384–9. doi: 10.1200 / JCO.2007.14.7207

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

2. Heare T, Hensley MA, Dell'Orfano S. Tumores óseos: osteosarcoma y sarcoma de Ewing. *Curr Opin Pediatr* . (2009) 21: 365–72. doi: 10.1097 / MOP.ob013e32832b1111

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

3. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, et al. Resultados a largo plazo para niños con neuroblastoma de alto riesgo tratados en un ensayo aleatorizado de terapia mieloablativa seguido de ácido 13-cis-retinoico: un estudio grupal de oncología infantil. *J Clin Oncol* . (2009) 27: 1007–13. doi: 10.1200 / JCO.2007.13.8925

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

4. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Implicación de los receptores de quimiocinas en la metástasis

del cáncer de mama. *Naturaleza* . (2001) 410: 50–6. doi: 10.1038 / 35065016

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

5. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. El intrincado papel de CXCR4 en el cáncer. *Adv Cancer Res* . (2014) 124: 31-82. doi: 10.1016 / B978-0-12-411638-2.00002-1

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

6. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. Cuantificación de los niveles de CD4, CCR5 y CXCR4 en subconjuntos de linfocitos, células dendríticas y macrófagos derivados de monocitos condicionados diferencialmente. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* . (1999) 96: 5215-20. doi: 10.1073 / pnas.96.9.5215

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

7. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, et al. Asociación independiente de CD4 entre gp120 de VIH-1 y CXCR4: los receptores de quimiocinas funcionales se expresan en neuronas humanas. *Curr Biol* . (1997) 7: 112-21. doi: 10.1016 / S0960-9822 (06) 00055-8

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

8. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Receptores de quimiocinas en células endoteliales humanas. *J Biol Chem* . (1998) 273: 4282–7. doi: 10.1074 / jbc.273.7.4282

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

9. Kuhne MR, Mulvey T, Belanger B, Chen S, Pan C, Chong C, et al. BMS-936564 / MDX-1338: un anticuerpo anti-CXCR4 completamente humano induce apoptosis *in vitro* y muestra actividad antitumoral *in vivo* en neoplasias hematológicas. *Clin Cancer Res* . (2013) 19: 357–66. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-12-2333
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
10. Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Amaya-Chanaga CI, Choi MY, Melo-Cardenas J, et al. Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): un anticuerpo anti-CXCR4 completamente humano induce la muerte celular en la leucemia linfocítica crónica mediada por una vía reactiva dependiente de especies de oxígeno. *Oncotarget* . (2016) 7: 2809–22. doi: 10.18632 / oncotarget.6465
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
11. Vivier E, Raulet D, Moretta A, Caligiuri M. ¿Inmunidad innata o adaptativa? El ejemplo de las células asesinas naturales. *Ciencia* . (2011) 331: 44–9. doi: 10.1126 / science.1198687
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
12. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Eldridge P, et al. Expansión de células asesinas naturales humanas altamente citotóxicas para la terapia con células cancerosas. *Cáncer Res* . (2010) 69: 4010–7. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-08-3712
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

13. Imai C, Iwamoto S. CD. La modificación genética de las células asesinas naturales primarias supera las señales inhibitorias e induce la destrucción específica de las células leucémicas. *Leucemia* . (2005) 106: 376–83. doi: 10.1182 / sangre-2004-12-4797
[CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
14. Vela M, Corral D, Carrasco P, Fernández L, Valentín J, González B, et al. La IL-15 / 41BBL haploidéntica activó y expandió la terapia de infusión de células asesinas naturales después de la quimioterapia de rescate en niños con leucemia recidivante y refractaria. *Cáncer Lett* . (2018) 422: 107-17. doi: 10.1016 / j.canlet.2018.02.033
[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
15. Leivas A, Pérez-Martínez A, Blanchard MJ, Martín-Clavero E, Fernández L, Lahuerta JJ, et al. Novedosa estrategia de tratamiento con células asesinas naturales activadas y expandidas autólogas más fármacos antimieloma para el mieloma múltiple. *Oncoimmunology* . (2016) 5: e1250051. doi: 10.1080 / 2162402X.2016.1250051
[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
16. Pérez-Martínez A, Fernández L, Valentín J, Martínez-Romera I, Corral MD, Ramírez M, et al. Un ensayo de fase I / II de la infusión de células asesinas naturales estimuladas con interleucina-15 después del trasplante de células madre haploidénticas para tumores sólidos refractarios pediátricos. *Cytotherapy* . (2015) 17: 1594–603. doi: 10.1016 / j.jcyt.2015.07.011

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

17. Krook MA, Nicholls LA, Scannell CA, Chugh R, Thomas DG, Lawlor ER. El CXCR4 inducido por el estrés promueve la migración y la invasión del sarcoma de Ewing. *Mol Cancer Res* . (2014) 12: 953–64. doi: 10.1158 / 1541-7786.MCR-13-0668

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

18. Li YJ, Dai YL, Zhang WB, Li SJ, Tu CQ. Importancia clinicopatológica y pronóstica del receptor de quimiocinas CXCR4 en pacientes con sarcoma de huesos y tejidos blandos: un metanálisis. *Clin Exp Med* . (2015) 9: 11101–12. doi: 10.1007 / s10238-015-0405-y

[CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

19. Davies AM, Sutton BJ. IgG4 humana: una perspectiva estructural. *Rev Immunol* . (2015) 268: 139–59. doi: 10.1111 / imr.12349

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

20. Hinson ARP, Jones R, Crose LES, Belyea BC, Barr FG, Linardic CM. Líneas celulares de rbdomiosarcoma humano para la investigación del rbdomiosarcoma: utilidad y dificultades. *Frente Oncol* . (2013) 3: 1–12. doi: 10.3389 / fonc.2013.00183

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Full Text](#)

21. Jin L, Majerus J, Oliveira A, Inwards CY, Nascimento AG, Burgart LJ, et al. Detección de transcripciones de genes de fusión en secciones de tejido de sarcomas de tejidos blandos congelados frescos y fijados con formalina e incorporados en parafina después de la microdissección de captura con láser y RT-

PCR. *Diagnóstico Mol Pathol* . (2003) 12: 224–30. doi: 10.1097 / 00019606-200312000-00006

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

22. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirlaque MD, et al. Epidemiología descriptiva de sarcomas en Europa: informe del proyecto RARECARE. *Eur J Cancer* . (2013) 49: 684–95. doi: 10.1016 / j.ejca.2012.09.011

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

23. Vela M, Aris M, Llorente M, García-Sanz JA, Kremer L. Anticuerpos específicos del receptor de quimiocina en inmunoterapia contra el cáncer: logros y desafíos. *Frente Immunol* . (2015) 6:12. doi: 10.3389 / fimmu.2015.00012

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

24. Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. Inhibición de la vía CXCL12 (SDF1 α) -CXCR4 / CXCR7: ¿un sensibilizador emergente para las terapias contra el cáncer? *Clin Cancer Res* . (2011) 17: 2074–80. doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-10-2636

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

25. Ren Z, Liang S, Yang J, Han X, Shan L, Wang B, et al. La coexpresión de CXCR4 y MMP9 predice metástasis pulmonares y mal pronóstico en el osteosarcoma resecado. *Tumor Biol* . (2016) 37: 5089–96. doi: 10.1007 / s13277-015-4352-8

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

26. Lu Y, Guan GF, Chen J, Hu B, Sun C, Ma Q, et al. La expresión aberrante de CXCR4 y β -catenina en el osteosarcoma se correlaciona con la supervivencia del paciente. *Oncol Lett* . (2015) 10: 2123–9. doi: 10.3892 / ol.2015.3535
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
27. Guan G, Zhang Y, Lu Y, Liu L, Shi D, Wen Y, et al. La vía HIF-1 α / CXCR4 apoya la metástasis inducida por hipoxia de las células de osteosarcoma humano. *Cáncer Lett* . (2015) 357: 254–64. doi: 10.1016 / j.canlet.2014.11.034
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
28. Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, et al. Estrecha correlación entre la expresión de CXCR4 y VEGF y la expresión frecuente de CXCR7 en rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol* . (2014) 45: 1900–9. doi: 10.1016 / j.humpath.2014.05.012
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
29. Guo M, Cai C, Zhao G, Qiu X, Zhao H, Ma Q, et al. La hipoxia promueve la migración e induce la expresión de CXCR4 a través de la activación de HIF-1 α en el osteosarcoma humano. *PLoS ONE* . (2014) 9: e90518. doi: 10.1371 / journal.pone.0090518
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
30. Oda Y, Tateishi N, Matono H, Matsuura S, Yamamoto H, Tamiya S, et al. La expresión del receptor de quimiocina CXCR4 se correlaciona con la expresión de VEGF y la escasa supervivencia en el sarcoma de tejidos blandos. *Int J Cancer*. (2009) 124: 1852-189. doi: 10.1002 / ijc.24128

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

31. Bertolini F, Agnola CD, Mancuso P, Bertolini F, Agnola CD, Mancuso P, et al. Neutralización de CXCR4, un nuevo enfoque terapéutico para el linfoma no hodgkin. *Cáncer Res* . (2002) 62: 3106-12. <http://cancerres.aacrjournals.org/>

[Resumen de PubMed](#) | [Google Académico](#)

32. Tavor S, Petit I, Porozov S, Avigdor A, Dar A, Leider-Trejo L, et al. CXCR4 regula la migración y el desarrollo de células madre de leucemia mielógena aguda humana en ratones NOD / SCID trasplantados. *Cáncer Res* . (2004) 64: 2817–24. doi: 10.1158 / 0008-5472.CAN-03-3693

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

33. Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F, Beltrami C, Pieralli A, Andersson KL, et al. El eje CXCR4 / CXCL12 en el cáncer de endometrio. *Clin Exp Metástasis* . (2009) 26: 261–8. doi: 10.1007 / s10585-009-9240-4

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

34. Brennecke P, Arlt MJE, Campanile C, Husmann K, Gvozdenovic A, Apuzzo T, et al. El tratamiento con anticuerpos CXCR4 suprime la diseminación metastásica al pulmón de los xenoinjertos de osteosarcoma humano intratibial en ratones. *Clin Exp Metástasis* . (2014) 31: 339-49. doi: 10.1007 / s10585-013-9632-3

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

35. Kashima K, Watanabe M, Sato Y, Hata J, Ishii N, Aoki Y. Inhibición de metástasis de rbdomiosarcoma por un nuevo

anticuerpo neutralizante contra el receptor de quimiocina CXCL4. *Cancer Sci* . (2014) 105: 1343–50. doi: 10.1111 / cas.12490

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

36. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa SI, Kitamura Y, et al. Defectos de linfopoyesis de células B y mielopoyesis de médula ósea en ratones que carecen de la quimiocina CXCL12 / SDF-1. *Naturaleza* . (1996) 382: 635–8. doi: 10.1038 / 382635a0

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

37. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Alteración de la linfopoyesis B, mielopoyesis y migración descarrilada de la neurona cerebelosa en ratones con deficiencia de CXCR4 y SDF-1. *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* . (1998) 95: 9448–53. doi: 10.1073 / pnas.95.16.9448

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

38. Steinberg M, Silva M. Plerixafor: un antagonista del receptor 4 de quimiocina para la movilización de células madre hematopoyéticas para trasplante después de altas dosis de quimioterapia para el linfoma no hodgkin o el mieloma múltiple. *Clin Ther* . (2010) 32: 821–43. doi: 10.1016 / j.clinthera.2010.05.007

[CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

39. Amaya-Chanaga CI, Jones H, AlMahasnah EA, Choi MY, Kuhne MR, Cohen L, et al. BMS-936564 (Anticuerpo anti-CXCR4) induce la movilización celular de leucemia específica y respuestas clínicas objetivas en pacientes con CLL tratados en un ensayo

clínico de fase I. *La sangre* . (2013) 122:
4190. <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/4190>

[Google Académico](#)

40. Fernández L, Valentín J, Zalacain M, Leung W, Patiño-García A, Pérez-Martínez A. Las células asesinas naturales activadas y expandidas se dirigen a las células iniciadoras de tumores de osteosarcoma de una manera dependiente de NKG2D-NKG2DL. *Cáncer Lett* . (2015) 368: 54–63. doi: 10.1016 / j.canlet.2015.07.042

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

41. Bernardini G, Antonangeli F, Bonanni V, Santoni A. Desregulación de los ejes de quimiocinas / receptores de quimiocinas y localización de tejido de células NK durante enfermedades. *Frente Immunol* . (2016) 7: 1–9. doi: 10.3389 / fimmu.2016.00402

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

42. Bernardini G, Sciume G, Bosisio D, Morrone S, Sozzani S, Santoni A. CCL3 y CXCL12 regulan el tráfico de subconjuntos de células NK de médula ósea de ratón. *La sangre* . (2008) 111: 3626–34. doi: 10.1182 / sangre-2007-08-106203

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

43. Lapidot T. Mecanismo de migración de células madre humanas y repoblación de ratones NOD / SCID y B2mnull NOD / SCID. El papel de las interacciones SDF-1 / CXCR4. *Ann NY Acad Sci* . (2001) 938: 83–95. doi: 10.1111 / j.1749-6632.2001.tb03577.x

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

44. Kean LS, Sen S, Onabajo O, Singh K, Robertson J, Stempora L, et al. Movilización significativa de células T convencionales y reguladoras con AMD3100. *La sangre* . (2011) 118: 6580-90. doi: 10.1182 / blood-2011-06-359331

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

45. Curti A, Ruggeri L, Addio AD, Bontadini A, Dan E, Rosa M, et al. Transferencia exitosa de células asesinas naturales aloreactivas haploidénticas que no coinciden con el ligando KIR después de la infusión en pacientes ancianos con leucemia mieloide aguda de alto riesgo. *La sangre* . (2011) 118: 3273–9. doi: 10.1182 / blood-2011-01-329508

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

46. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: un estudio piloto para determinar la seguridad y la viabilidad del trasplante de células asesinas naturales haploidénticas en la leucemia mieloide aguda infantil. *J Clin Oncol* . (2010) 28: 955–9. doi: 10.1200 / JCO.2009.24.4590

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

47. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Transferencia adoptiva exitosa y expansión *in vivo* de células NK haploidénticas humanas en pacientes con cáncer. *La sangre* . (2005) 105: 3051–7. doi: 10.1182 / blood-2004-07-2974

[Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

48. Shi J, Tricot G, Szmania S, Rosen N, Garg TK, Malaviarachchi PA, et al. Infusión de células NK desacoplantes del ligando del receptor similar a la inmunoglobulina haplo-idéntica para el mieloma recidivante en el contexto del trasplante de células madre autólogas. *Fr. J Haematol* . (2008) 143: 641–53. doi: 10.1111 / j.1365-2141.2008.07340.x
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
49. Bachanova V, Cooley S, Defor TE, Verneris MR, Zhang B, McKenna DH, et al. El aclaramiento de la leucemia mieloide aguda por las células asesinas naturales haploidénticas se mejora utilizando la proteína de fusión de toxina diftérica IL-2. *La sangre* . (2014) 123: 3855-63. doi: 10.1182 / sangre-2013-10-532531
- [Resumen de PubMed](#) | [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)
50. Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, Harada H, Takano S, Nose T, et al. Terapia autóloga de células asesinas naturales para el glioma maligno recurrente humano. *Anticancer Res* . (2004) 24: 1861-1871. <http://ar.iiarjournals.org/content/24/3B/1861.long>
- [Resumen de PubMed](#) | [Google Académico](#)
51. Szmania S, Garg TK, Lapteva N, Lingo JD, Greenway AD, Stone K, et al. Las células asesinas naturales expandidas *ex vivo* demuestran una proliferación robusta *in vivo* en pacientes con mieloma múltiple recidivante (MM) de alto riesgo. *La sangre* . (2012) 120: 24–36. doi: 10.1097 / CJI.0000000000000059
- [CrossRef Texto completo](#) | [Google Académico](#)

Palabras clave: sarcoma, metástasis, receptor 4 de quimiocina CXC (CXCR4), anticuerpo terapéutico, células asesinas naturales activadas y expandidas (NKAE), inmunoterapia

Cita: Vela M, Bueno D, González-Navarro P, Brito A, Fernández L, Escudero A, Valentín J, Mestre-Durán C, Arranz-Álvarez M, Pérez de Diego R, Mendiola M, Pozo-Kreilinger JJ y Pérez- Martínez A (2019) Anticuerpo anti-CXCR4 combinado con células asesinas naturales activadas y expandidas para la inmunoterapia con sarcoma. *Front. Immunol* 10: 1814. doi: 10.3389 / fimmu.2019.01814

Recibido: 25 de abril de 2019; **Aceptado:** 18 de julio de 2019;

Publicado: 2 de agosto de 2019.

Editado por:

Rayne Rouce , Baylor College of Medicine, Estados Unidos

Revisado por:

Michael R. Verneris , Universidad de Colorado Denver, Estados Unidos

Pooja Arora , Pfizer, Estados Unidos

Copyright © 2019 Vela, Bueno, González-Navarro, Brito, Fernández, Escudero, Valentín, Mestre-Durán, Arranz-Álvarez, Pérez de Diego, Mendiola, Pozo-Kreilinger y Pérez-Martínez. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de **Creative Commons Attribution License (CC BY)** . El uso, distribución o reproducción en otros foros está permitido, siempre que se acrediten al autor original y al propietario del copyright y que se cite la publicación original en esta revista, de acuerdo con la práctica académica aceptada. No se permite el uso, distribución o reproducción que no cumpla con estos términos.

* **Correspondencia:** Maria Vela, aperezmartinez@salud.madrid.org ; Antonio Pérez-Martínez, antonio.perez@uam.es

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Front. Immunol., 02 August 2019 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01814>

Anti-CXCR4 Antibody Combined With Activated and Expanded Natural Killer Cells for Sarcoma Immunotherapy

 **Maria Vela**^{1*},  **David Bueno**^{2†},  **Pablo González-Navarro**^{1†}, 
Ariadna Brito¹,  **Lucía Fernández**³,  **Adela Escudero**⁴,  **Jaime**

Valentín¹,  **Carmen Mestre-Durán**¹,  **Marina Arranz-Álvarez**⁵, 
Rebeca Pérez de Diego^{6,7,8},  **Marta Mendiola**^{9,10},  **José Juan Pozo-Kreilinger**^{9,11} and  **Antonio Pérez-Martínez**^{2,12*}

- ¹Translational Research in Pediatric Oncology, Hematopoietic Transplantation and Cell Therapy, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), Madrid, Spain
- ²Pediatric Hemato-Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain
- ³H12O-CNIO Hematological Malignancies Clinical Research Unit, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain
- ⁴Molecular Pediatric Oncology Unit, Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), La Paz University Hospital, Madrid, Spain
- ⁵Biobank of Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), Madrid, Spain
- ⁶Laboratory of Immunogenetics of Human Diseases, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), Madrid, Spain
- ⁷Innate Immunity Group, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), Madrid, Spain
- ⁸CIBER of Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain
- ⁹Molecular Pathology and Therapeutic Targets, Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPAZ), Madrid, Spain
- ¹⁰Molecular Pathology Section, Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), La Paz University Hospital, Madrid, Spain
- ¹¹Pathology Service, La Paz University Hospital, Madrid, Spain
- ¹²Department of Pediatric, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Madrid, Spain

Sarcoma is one of the most severe forms of pediatric cancer and current therapies -chemotherapy and surgery- fail to eradicate the disease in half of patients. Preclinical studies combining new therapeutic approaches can be useful to design better therapies. On one hand, it is known that CXCR4 expression is implicated in rhabdomyosarcoma progression, so we analyzed relapses and chemotherapy-resistant rhabdomyosarcoma tumors from pediatric patients and found that they had particularly high levels of CXCR4 expression. Moreover, in assays *in vitro*, anti-CXCR4 blocking antibody (MDX1338) efficiently reduced migration and invasion of alveolar rhabdomyosarcoma RH30 cells. On the other hand, activated and expanded natural killer (NKAE) cell therapy showed high cytotoxicity against sarcoma cells *in vitro* and completely inhibited RH30 tumor implantation *in vivo*. Only the combination of MDX1338 and NKAE treatments completely suppressed metastasis in mice. In this study, we propose a novel

therapeutic approach based on anti-CXCR4 blocking antibody in combination with NKAE cell therapy to prevent rhabdomyosarcoma tumor implantation and lung metastasis. These results provide the first evidence for the efficacy of this combined immunotherapy for preventing sarcoma disease dissemination.

Introduction

Sarcomas principally affect children and young adults. Almost half the children with solid tumors, such as rhabdomyosarcoma, osteosarcoma and Ewing sarcoma, have progressive disease despite aggressive treatment. The prognosis is particularly poor for patients with metastatic disease, in at least two thirds of whom the disease progresses (1–3). New therapeutic approaches bypassing the cellular mechanisms of drug resistance are therefore urgently required, particularly for patients with high-risk features.

Chemokines interacting with the chemokine receptors expressed by metastasizing tumor cells play a crucial role in directing the migrating cells to secondary organs. This is well documented for the chemokine CXCL12 and CXC chemokine receptor 4 (CXCR4). Müller et al. discovered a CXCL12–CXCR4 homing axis in cancer metastasis and demonstrated the preferential migration of CXCR4-expressing breast cancer cells toward protein extracts from the lung, which has high levels of CXCL12 expression (4).

CXCL12 binding to CXCR4 stimulates intracellular calcium flux, activates the AKT and ERK signaling pathways, and upregulates the formation of focal adhesions, ultimately increasing migration along gradients of locally expressed and secreted chemokines (5). It also leads to the transcription of genes promoting cell survival and proliferation. CXCR4 is found in various tissues and is predominantly expressed on hematopoietic cells, including B and T cells, monocytes, macrophages, natural killer (NK) and dendritic cells, and on CD34⁺ bone marrow progenitor cells (6). CXCR4 is also weakly

expressed on endothelial and epithelial cells, astrocytes and neurons (7, 8).

Khune et al. (Bristol-Myers Squibb) recently developed a fully human monoclonal antibody (mAb), MDX1338/ulocuplumab, specific for human CXCR4 (9). MDX1338 is a high-affinity mAb that blocks CXCL12 binding to CXCR4, thereby inhibiting the cell proliferation and migration promoted by this binding. MDX1338 treatment has been shown to induce apoptosis *in vitro* and anti-tumor activity *in vivo* in hematologic cancers. MDX1338 is an IgG4 isotype mAb. It does not, therefore, mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Its pro-apoptotic effect is associated with the production of reactive oxygen species and does not require caspase activation, as described in a chronic lymphocytic leukemia model (10).

Immune cells are known to recognize and kill tumor cells, suggesting that they could be used in anticancer treatment. NK cells kill cancer stem cells and genotoxically altered cells with a high degree of precision but are tolerant to healthy cells. These properties suggest that they might make good therapeutic effectors for all cancer forms, including metastases (11). Fujisaki et al. (12) and Imai and Iwamoto (13) reported that the K562 leukemia cell line genetically modified to express membrane-bound interleukin (IL)-15 and 4.1-BB ligand (K562-mb15-41BBL) specifically activates human NK cells, driving them into the cell cycle to generate highly cytotoxic NK cells. Furthermore, the K562-mb15-41BBL stimulation method has already been scaled up to large-scale clinical-grade conditions in accordance with good clinical manufacturing practice guidelines, for the production of large numbers of highly cytotoxic NKAE cells, and FDA-approved clinical trials are already underway in patients with hematologic cancers and childhood solid tumors.

Our team has led five clinical trials using adoptive NK cell immunotherapy in patients with pediatric refractory solid tumors (NCT01337544), relapsed or refractory acute leukemia/lymphoma

(NCT01944982 and NCT02074657), acute myeloid leukemia (NCT02763475) or multiple myeloma (NCT02481934). Our results show it is a promising and feasible therapy ([14–16](#)). Based on our experience with NKAE cell therapy, we hypothesized that the anti-metastatic MDX1338 mAb and cytotoxic NK cell therapy would have complementary effects, thereby increasing the efficacy of the therapeutic strategy.

We analyzed CXCR4 expression in tumor samples from pediatric rhabdomyosarcoma patients. We present preclinical data showing the ability of NKAE cell therapy to kill sarcoma cells and of MDX1338 mAb to inhibit the migration and invasion of CXCR4⁺ sarcoma cells *in vitro*. We also used an orthotopic model of alveolar rhabdomyosarcoma to evaluate the complementary antitumoral and antimetastatic effects of combined NKAE + MDX1338 immunotherapy *in vivo*.

Materials and Methods

Determination of CXCR4 Expression on Patients' Samples by Immunohistochemistry

Human samples were obtained after informed patient consent in accordance with the Helsinki Declaration. Research was approved by the La Paz Hospital Ethics Committee (PI-2295).

For tumor CXCR4 immunohistochemistry, formalin-fixed, paraffin-embedded tumor slides were deparaffinized, hydrated, stained using anti human CXCR4 mAb (dilution 1:10; clone 44716; R&D systems), visualization system EnVision FLEX+ (mouse, high pH, Agilent) and hematoxylin counterstained. Specificity of the antibody was confirmed by immunostaining of tonsil tissue. The percentage of CXCR4⁺ tumor cells was assigned a score between 0 and 5, and the staining intensity a score between 0 and 3. These 2 values were added. Both cytoplasmic and nuclear staining were assessed and equally weighted to produce the final staining score.

Cell Culture

143B (CRL-8303), MG-63 (CRL-1427) and A673 (CRL1598) cell lines were from the American Type Culture Collection. RH30 (ACC-489) was from the Leibniz-Institut DSMZ. A4573 and CW9019 were kind gifts from Dr. Javier Alonso (Institute of Health Carlos III) and Dr. Josep Roma (Vall d'Hebron Research Institute), respectively.

Bioluminescent RH30 cells (RH30-GFP-Luc) were generated by infection with a recombinant lentivirus encoding green fluorescent protein (GFP) and firefly luciferase (Luc) under EF1a promoter and with Neomycin marker (Amsbio). Infected cells expressing high GFP levels were isolated by fluorescence activated cell sorting, cloned, expanded, and used for *in vivo* bioluminescence assays. RH30-GFP-Luc cell growth kinetics was similar to parental RH30 cells and they retained surface CXCR4 expression.

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco), 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 µg/ml streptomycin (complete medium).

NK Cells Activation and Expansion

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by centrifugation over a density gradient (Ficoll-Paque, GE Healthcare) (400 g, 30 min).

The genetically modified K562-mbIL15-41BBL cell line, kindly provided by Professor D. Campana (National University of Singapore) was irradiated with 100 Gy.

NKAE cells were obtained by co-culturing donor's PBMCs with irradiated K562-mb15-41BBL cells in a 1:1.5 ratio plus 100 U/ml of IL-2 (Miltenyi) over 14–21 days in stem cell growth medium (SCGM, Cellgenix) supplemented with 10% human AB serum (Sigma). Fresh medium was added every 2–3 days to a final concentration of 1×10^6 cells/ml. Percentage and phenotype of NK cells (CD3⁻, CD56⁺), T cells (CD3⁺, CD56⁻) and NKT cells (CD3⁺, CD56⁺) was weekly

monitored by flow cytometry (Navios, Beckman Coulter) ([Supplementary Figure 1](#)). A list of labeled antibodies used in this study is provided in [Supplementary Table 1](#).

Determination of CXCR4 Expression on Sarcoma Cell Lines by Flow Cytometry and qRT-PCR

For staining, 2×10^5 cells/well were centrifuged in V-bottom 96-well plates and washed with phosphate-buffered saline (PBS, Lonza) containing 0.5% bovine serum albumin (Lonza), 1% FBS and 0.1% sodium azide. Non-specific binding was blocked by pre-incubating the cells with 40 μ g/ml rat IgG (Sigma; 100 μ l final volume, 20 min, 4°C). Cells were incubated with anti CXCR4-APC mAb (BD Pharmingen; clone 12G5) or isotype matched mAb (30 min, 4°C). Samples were analyzed on a Navios cytometer (Beckman Coulter).

For qRT-PCR, cell culture RNA was obtained using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The relative expression level of mRNA encoding human CXCR4 was determined by quantitative RT-PCR using GUS gene expression as internal control. cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA with the Superscript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen). The cDNA was amplified in duplicate with primers for human CXCR4 (Hs00237052_m1, Applied Biosystems) and for human GUS (Fw: 5'-GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT-3', Rv: 5'-CCGAGTGAAGATCCCCTTTTAA-3'; Probe: 5'-[6FAM]CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA[TAMRA]-3'; all from Sigma). Amplification (1 cycle: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min; 50 cycles: 95°C for 15 s, 60°C for 1 min) was monitored using the Roche LightCycler 480. Relative expression was analyzed using $2^{-\Delta CT}$ method, where $\Delta CT = (Ct \text{ gene of interest} - Ct \text{ internal control})$.

Cell-Mediated Cytotoxicity Assays

NKAE and RH30-GFP-Luc target cells were co-cultured (4 h) at indicated ratios in DMEM- 10% FBS, then stained with 7-AAD (10 min, 4°C) and analyzed by flow cytometry. Gating on 7-AAD⁺ cells within the

GFP⁺ population indicated the proportion of dead target cells. Specific killing was calculated as $100 \times [(\% \text{ dead target cells in sample} - \% \text{ spontaneous dead target cells}) / (100 - \% \text{ spontaneous dead target cells})]$. Target cells incubated without effector cells were used to assess spontaneous cell death. In [Supplementary Figure 2](#), RH30-GFP-Luc cells were pre-incubated with MDX1338 or isotype IgG4 control mAb (30 min, 100 µg/ml) prior to the assay.

Cell Migration and Invasion Assays

Cells were incubated in starving buffer (DMEM-1% FBS) for 24 h. Next, 2×10^5 cells were suspended in 80 µl of migration buffer (DMEM-1% human serum albumin, Grifols) and placed in the upper compartment of 96-well transwell plates (8.0 µm pore size, Neuroprobe). The lower compartment was filled with 300 µl of: migration buffer alone (unconditioned medium), migration buffer with 100 ng/ml CXCL12 (R&D systems) or migration buffer with 10% FBS. In invasion assays, the upper compartment of the membrane was coated with 20 µl of 0.2 mg/ml Matrigel (Corning).

After 48 h of incubation to allow cells to migrate/invade through the membrane, the cells remaining on the upper face of the membrane were removed using a cotton wool swab, while the cells on the lower side of the membrane were fixed with methanol and stained with crystal violet. After washing with PBS, the number of migrating/invading cells was determined using a Carl Zeiss Axiovert 200 microscope. Four fields per well were counted at 200x.

For migration/invasion neutralization experiments, 10^5 RH30 cells were mixed with the indicated final concentration of anti CXCR4 MDX1338 mAb or control IgG4 mAb in a final volume of 90 µl of migration buffer and proceeded as above indicated. In [Supplementary Figure 2](#), 500,000 NKAE cells (effector:target ratio, E:T = 5:1) were also added in the upper well.

Xenograft Assays

NSG mice (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, Charles River Laboratories) were maintained in the Alberto Sols Biomedical Research Institute animal facility. All procedures were approved by Comunidad de Madrid Animal Protection Area (PROEX 220/16) and CSIC Ethics Committee.

For the *in vivo* metastasis model, 6 weeks of age female mice were inoculated intravenously (i.v.) with 0.5×10^6 RH30-GFP-Luc cells on day 0. Five treatment groups were established (5 mice/group): untreated; isotype control IgG4 mAb; anti CXCR4 MDX1338 mAb; NKAЕ cells; and MDX1338 + NKAЕ cells. Antibodies were inoculated intraperitoneally (i.p.), 15 mg/kg, twice a week for 3 weeks. NKAЕ cells were administered i.v., 5×10^6 cells/mouse, once a week for three weeks.

Luminescent tumors were monitored weekly for 35 days. Briefly, D-luciferin (150 mg/kg; Perkin Elmer) was administered i.p. 10 min before analysis. During imaging, mice were anesthetized with isoflurane in a lightproof chamber using a IVIS-Lumina II (Caliper Lifesciences). Exposure time was 180 s. Living Image v4.5.2 (Perkin Elmer) was used to quantify the data and produce pseudocolor images.

Histology and Identification of Lung Micrometastases in Mice

Mice dissected organs were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (pH 7.4), washed in PBS, paraffin-embedded and cut (3 μ m).

The presence of RH30 cells in the lungs was studied by immune staining using anti-human CXCR4 antibody (R&D, clone 44716, dilution 1:50), visualization system EnVision FLEX+ (mouse, high pH; Agilent) and hematoxilin/eosin counterstained.

For *in situ* hybridization, antigen retrieval was first performed with low pH buffer (RiboCC, Roche) and protease III (Roche). Slides were then incubated with the Alu positive control probe II (Ventana, Roche 05272041001). Three stringency washes were performed and slides were incubated with rabbit anti-DNP anti serum. For visualization,

OmniRabbit system conjugated with horseradish peroxidase was used (Ventana, Roche). Immunohistochemical reaction was developed using silver as chromogen (Silver kit, Ventana, Roche) and nuclei were counterstained with Carazzi's hematoxylin.

All images were captured on a Carl Zeiss Lab.A1 microscope with an AxioCam ERC5S digital camera (Carl Zeiss).

qRT-PCR and Quantification of Lung Micrometastases in Mice

One third of mice dissected organs were used for total RNA extraction using RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The relative expression levels of mRNA encoding human CXCR4 and human GUS were determined by semi-quantitative RT-PCR with RH30 cells pellet as control of 100% human cells. cDNA synthesis and human CXCR4 and human GUS amplification was performed as above indicated.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7 software. Statistical significance was established at $p < 0.05$ as evaluated by unpaired Student's *t*-test or ANOVA test. Results are shown as mean \pm SEM, unless otherwise indicated.

Results

CXCR4 Is More Strongly Expressed on Relapsed Samples From Pediatric Rhabdomyosarcoma Patients Than in Diagnostic Samples

New treatment options are urgently required for patients whose tumors do not respond to chemotherapy and for relapses after surgery. We investigated the potential role of CXCR4 in chemotherapy resistance and relapse, by performing immunohistochemical analyses to evaluate CXCR4 expression in rhabdomyosarcoma tumor samples. Patients' characteristics are listed in [Supplementary Table 2](#). We analyzed 26 pediatric rhabdomyosarcoma specimens archived in the biobank of La Paz University Hospital from 2010 to 2017. These

specimens were taken from patients with a median age of 6.6 years (range: 0.2–14.1) and a median follow-up of 7.9 years (range: 0.6–18.4). Seventeen of the specimens were obtained at diagnosis, five are refractory samples collected after chemotherapy and four specimens corresponded to relapses. As recent studies have reported CXCR4 to be expressed in the nucleus in some cancers (17, 18), we performed both cytoplasmic and nuclear staining, with equal weighting given to the two compartments during the analysis. Cytoplasmic staining for CXCR4 was observed on 68% of the specimens in our series and nuclear staining was observed in 15% (Figure 1A).

FIGURE 1

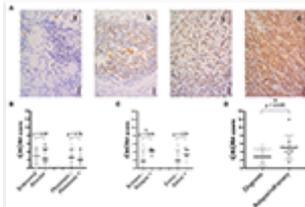


Figure 1. CXCR4 expression on the tumors of rhabdomyosarcoma patients. **(A)** Representative staining corresponding to samples with negative (a), medium (b) and high (c) levels of cytoplasmic CXCR4 expression. A specimen with a high level of nuclear CXCR4 staining is also shown (d). Scale bar = 10 μ m. $N = 26$. **(B)** CXCR4 expression score plot for primary tumors at diagnosis where alveolar vs. embryonal rhabdomyosarcomas are compared and where localized vs. already metastasized rhabdomyosarcomas are compared. **(C)** Primary tumors at diagnosis CXCR4 expression vs. outcome (disease relapse or patient's death). **(D)** Comparison of CXCR4 expression between specimens obtained at diagnosis and after chemotherapy (refractory) and during relapse. The values shown are the median \pm SD. Unpaired Student's t -tests were performed. $*p < 0.05$.

For diagnostic samples, no difference in CXCR4 expression was observed between embryonal and alveolar rhabdomyosarcomas or between specimens from localized tumors and those from primary tumors that already had metastasized (Figure 1B). A relationship was observed between CXCR4 score and patient outcome, with higher

CXCR4 median score obtained for specimens from patients subsequently suffering from relapses or dying from the disease ([Figure 1C](#)).

Moreover, a comparison of CXCR4 expression score between diagnostic (2.8 ± 2.1) and relapsed/refractory (5.1 ± 2.9) specimens revealed a significant trend toward higher levels of CXCR4 expression in relapse samples than in diagnostic samples ([Figure 1D](#)).

The RH30 Alveolar Rhabdomyosarcoma Cell Line Had the Highest Levels of CXCR4 Expression, Concomitant With Highest Migration and Invasion Rates Toward CXCL12

We analyzed the surface expression of CXCR4 on confluent cultures of various sarcoma cell lines: RH30, CW9019, A4573, A673, MG-63, and 143B. The proportion of CXCR4⁺ cells was highest in RH30 cell cultures, in which CXCR4 expression was detected on $98.6 \pm 0.7\%$ of the cells ([Figure 2A](#)). These results were consistent with the analysis of CXCR4 mRNA levels by RT-qPCR analysis. RH30 cultures displayed 1.38 ± 0.01 times higher levels of CXCR4 than of a control gene expression (beta-glucuronidase, GUS) ([Figure 2B](#)).

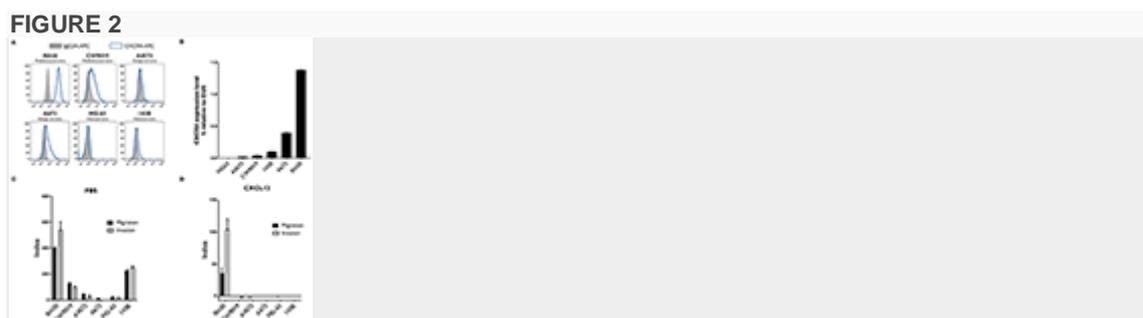


Figure 2. Analysis of CXCR4 expression, and of the migration and invasion capacity of different sarcoma cell lines. **(A,B)** CXCR4 expression was strongest in the RH30 alveolar rhabdomyosarcoma cell line. CXCR4 expression by two rhabdomyosarcoma cell lines (RH30 and CW9019), two Ewing's sarcoma cell lines (A4573 and A673) and two osteosarcoma cell lines (MG-63 and 143B) was analyzed by flow cytometry **(A)** and by RT-qPCR **(B)**. $N = 3$. **(C,D)** RH30 cells migrate and invade along a gradient toward CXCL12 chemokine, CXCR4

specific ligand. Their ability to migrate toward FBS (C) or CXCL12 (D) was assessed in Transwell assays, with membranes with 8 μm pores. Invasion capacity was measured under the same conditions, with Matrigel-coated Transwell membranes. Each condition was performed in duplicated wells. Representative results of one experiment out of three performed.

We evaluated the migration and invasion capacity of sarcoma cell lines in Transwell assays, which are considered to provide an *in vitro* indication of metastatic potential *in vivo*. Several sarcoma cell lines migrated toward chemoattractant FBS and displayed invasion capacity (Figure 2C), but only the RH30 cell line migrated and invaded specifically toward the CXCR4 ligand, CXCL12 (Figure 2D). The indices of RH30 migration and invasion toward CXCL12 were 35.2 ± 8.3 and 104.0 ± 16.4 , respectively.

NKAE Cells Were Highly Cytotoxic to RH30 Cells, and MDX1338 Efficiently Reduced RH30 Cell Migration and Invasion Toward CXCL12

NK cells play an important role in the natural control of tumor cells. By co-culturing these cells with the genetically modified cell line K562-mb15-41BBL, large numbers of activated NK cells (NKAE cells) can be obtained from healthy donors. We measured the cytolytic effects of NKAE cells on RH30 sarcoma cells. NKAE cells induced $21.9 \pm 0.4\%$ specific lysis of RH30 cells, at an effector:target cell (E:T) ratio of 20:1 (Figure 3A). As expected, MDX1338 had no significant effect on the observed cytotoxicity (Supplementary Figure 2A). MDX1338 is a fully human IgG4 anti-CXCR4 mAb (9, 10), and would not, therefore, be expected to induce ADCC (19).

FIGURE 3

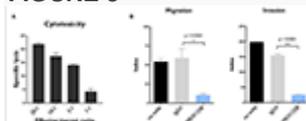


Figure 3. *In vitro* NKAE-mediated cytotoxicity and MDX1338-mediated inhibition of the migration and invasion capacity of

rhabdomyosarcoma cells. **(A)** NKAE cells were highly cytotoxic to RH30 cells. Specific lysis was determined at the indicated NKAE:RH30 E:T ratios. **(B)** MDX1338 efficiently decreased the migration and invasion of RH30 cells toward CXCL12. RH30 cell migration was assessed with Transwell plates. Invasion capacity was measured under the same conditions, with Matrigel-coated Transwell membranes. Every condition was performed in duplicates. One representative experiment is shown. $N = 3$. One-way ANOVA test. $*p < 0.05$, $***p < 0.0001$.

The effect of MDX1338 on the CXCR4/CXCL12 axis was assessed in RH30 cells, in migration, and invasion assays *in vitro*. MDX1338 significantly decreased the migration of RH30 cells toward CXCL12 and their invasion capacity: 54.4 ± 4.4 vs. 10.5 ± 2.0 for migration and 199.1 ± 2.9 vs. 25.6 ± 1.9 for invasion ([Figure 3B](#)). The combination of MDX1338 and NKAE cells totally abolished the migration and invasion capacities of these cells ([Supplementary Figure 2B](#)).

NKAE Cell Treatment Completely Inhibited the Implantation of RH30 Tumor Cells *in vivo*

We assessed the antitumor potential of MDX1338 and NKAE cell therapies, by generating an *in vivo* model of metastatic sarcoma, using CXCR4⁺ RH30 cells, which grow as peritoneal xenografts when implanted in immunodeficient NSG mice. Mice were inoculated intravenously with RH30-GFP-Luc cells (day 0). They then received one of the following treatments: MDX1338 mAb, isotype control IgG4 mAb, NKAE cells or combined MDX1338-NKAE cells treatment ([Figure 4A](#)). The size of the developing tumors was assessed by measuring the luminescent signal, until day 36, when the mice were killed. NKAE cell therapy alone was sufficient to prevent the intraperitoneal implantation of RH30 tumors entirely ([Figure 4B](#)). Mice treated with MDX1338 mAb alone developed intraperitoneal tumors slightly smaller than those of the control mice, whereas a control IgG4 mAb had no significant effect.

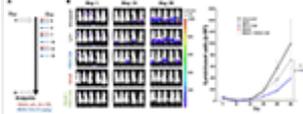
FIGURE 4

Figure 4. Inhibition of tumor implantation *in vivo* by NKAЕ cells. **(A)** Administration schedule for the antibody and NKAЕ cells in NSG mice bearing RH30 GFP⁺ Luc⁺ tumor cells injected intravenously. Five treatment arms were established: untreated; IgG4; MDX1338; NKAЕ; MDX1338+NKAЕ (5 mice/group). Two-way ANOVA test. Mice received three doses of NKAЕ and six doses of mAb. Luminescent tumors were monitored for 35 days. **(B)** The NKAЕ treatment completely prevented the peritoneal implantation of RH30 tumors in mice. *** $p < 0.0001$.

Rhabdomyosarcoma Lung Micrometastases Were Abolished by MDX1338 + NKAЕ Cell Treatment in an *in vivo* Model

The primary peritoneal RH30 tumors were easy to monitor with the luminescent detection system, but the sensitivity of this approach was too low to determine whether RH30 GFP⁺ Luc⁺ micrometastases were present in distal organs. We therefore used RT-qPCR to assess the presence of human cells by amplifying both human GUS and human CXCR4 cDNAs from the lungs, liver, spleen and bone marrow of the mice. Human gene expression was detected only in the lungs, indicating the presence of RH30 cells in this organ.

NKAЕ cell treatment alone was insufficient to prevent RH30 lung micrometastases. The relative level of expression for human GUS was $14.5 \times 10^{-3} \pm 5.4 \times 10^{-3}$ in untreated mice and $8.3 \times 10^{-3} \pm 2.7 \times 10^{-3}$ in NKAЕ-treated mice. For human CXCR4, relative expression levels were $11.4 \times 10^{-3} \pm 4.7 \times 10^{-3}$ in untreated mice and $10.7 \times 10^{-3} \pm 4.1 \times 10^{-3}$ in NKAЕ-treated mice. MDX1338 treatment alone significantly decreased the formation of micrometastases, but only the combination of MDX1338 and NKAЕ treatments led to undetectable levels of both human GUS and CXCR4 gene expression in the mouse lungs analyzed ([Figure 5A](#)). We have performed a RT-PCR to confirm that the human

cells present in the mice lungs were RH30 cells. RH30 cells have $t_{(2,13)}$ chromosomal translocation resulting in PAX3-FOXO1 fusion protein (20). We detected specific chimeric gene transcript PAX3-FOXO1 (21), in untreated, IgG4-, MDX1338- and NKAE-treated mice, whereas we could not detect it in NKAE+MDX1338-treated mice lungs (Supplementary Figure 3).

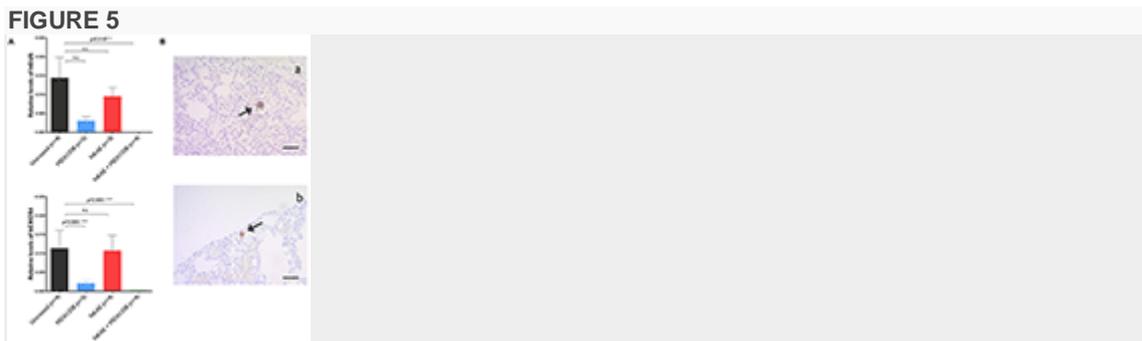


Figure 5. Abolition of the formation of lung micrometastases of rhabdomyosarcoma by MDX1338. **(A)** NKAE-treated mice develop RH30 micrometastases in the lung, but this is entirely prevented by the combination of MDX1338 and NKAE. Micrometastases were detected and quantified by RT-qPCR with a human GUS- or human CXCR4-specific probe. Each sample was analyzed in duplicates, 5 mice per group were analyzed. Two-way ANOVA test. **(B)** The presence of rhabdomyosarcoma micrometastases was confirmed by histological methods. Lung micrometastases in untreated mice were identified by Alu sequence hybridization (a) and CXCR4-specific mAb staining (b). Scale bar = 20 μm. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

For further confirmation of the presence of RH30 micrometastases, lung samples were stained with an Alu sequence probe or the anti-human CXCR4 mAb. Human cell aggregates were found in the lungs of untreated mice for both staining procedures (Figure 5B).

Discussion

Sarcomas, such as Ewing's sarcoma, osteosarcoma, and soft tissue sarcomas like rhabdomyosarcomas, form a group of relatively rare mesenchyme-derived tumors (22). They account for only a small percentage of human cancers overall, but are the second most

prevalent solid tumor in children. Despite advances in adjuvant chemotherapy and surgical wide resection, prognosis remains poor, mostly due to the high frequency of lung metastasis, the leading cause of death in these patients.

Chemokines and their interaction with their receptors have been shown to play a fundamental role in the mechanisms of cancer development and metastasis (23). The expression levels of chemokines and their receptors are altered in malignant cells. This has been shown for CXCR4, the chemokine receptor most frequently overexpressed in tumor cells. The interaction of CXCR4 with its ligand, CXCL12, activates a cascade of cellular signaling promoting the survival, proliferation, adhesion, and migration of the CXCR4-expressing tumor cells. This may lead to a relapse of the primary tumor, and it increases the likelihood of distant metastases in organs in which the ligand is secreted, such as the bone marrow and lungs in particular (5, 24).

Aberrant CXCR4 expression has been observed in more than 23 human cancers. The prognostic significance of CXCR4 has been studied in detail in patients with bone and soft tissue sarcomas (25–30). In a recent meta-analysis of 12 studies including a total of 997 sarcoma patients, CXCR4 expression was found to be significantly associated with poor overall survival, higher rates of metastasis and higher tumor stage (18). In our cohort of pediatric rhabdomyosarcoma patients, we found a correlation between higher levels of CXCR4 expression at diagnosis and relapse. Tumor-initiating cells (TICs) are a subpopulation of chemoresistant tumor cells that have been shown to cause tumor recurrence and metastasis. One of the hallmarks of these cells is an upregulation of CXCR4 (24). Consistent with this finding, we observed that the tumors that continued to grow after chemotherapy or that relapsed after surgery and chemotherapy were those with the highest CXCR4 levels (Figure 1C). The elimination of TICs is therefore a priority in the development of new modes of treatments. These cells are the target of our combined anti-CXCR4 mAb and NKAE treatment.

The hijacking of the CXCL12/CXCR4 signaling pathways by tumor cells for the purposes of metastasis and protection from apoptosis rapidly identified the blockade of this axis as a potential treatment target for cancer. A pioneering study by Müller et al. (4) demonstrated the *in vivo* relevance of CXCR4 as a target for cancer therapy, linking the expression of CXCR4 in breast carcinomas with their ability to generate regional lymph node and lung metastases. These data were supported by experiments in which a neutralizing anti-human CXCR4 antibody (murine mAb, clone 44717.111) significantly decreased the frequency of lung, inguinal and axillary lymph node metastases. Similar results were subsequently obtained with another murine anti-human CXCR4 antibody (clone 12G5) (31–33). In a human intratibial osteosarcoma xenograft model, the 12G5 mAb reduced metastatic spread to the lung (34). Interestingly, in a rhabdomyosarcoma xenograft model, a third murine anti CXCR4 mAb (clone CF172) showed some resistance to lymph node metastasis while had little effect on the primary tumor volume (35). Consistent with these previous findings, our results for MDX1338, a fully human mAb blocking the CXCR4/CXCL12 axis, show that this mAb can efficiently decrease the migration and invasion indices of metastatic RH30 rhabdomyosarcoma cells *in vitro*. Similarly, *in vivo*, the combination of MDX1338 and NKA-E treatments not only abolished implantation of the RH30 tumor, but also its ability to disseminate, thereby preventing the formation of lung micrometastases.

In physiological non-pathological conditions, CXCL12, and CXCR4 are important for the development of the central nervous system, the heart and the immune system (36, 37). It will therefore be essential to monitor potential adverse effects very carefully in any therapeutic approach involving a blockade of this axis. Plerixafor, a small-molecule antagonist of CXCR4, is widely used to mobilize hematopoietic stem cells for autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma (38). No serious adverse effects related to

CXCL12/CXCR4 blockade have been reported following the administration of plerixafor in patients. MDX1338 has already been tested in phase I and II clinical trials for the treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia, leukemia, solid tumors, acute myelogenous leukemia, diffuse large B-cell leukemia, chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma, and multiple myeloma. Its antitumor effect is mediated by a mobilization of myeloma cells from the bone marrow or by the direct induction of apoptosis, rather than through cellular cytotoxicity, because it is an IgG4 isotype antibody (9, 10, 39). No serious adverse effects due to CXCL12/CXCR4 blockade by MDX1338 have been reported in these trials, either.

In this study, we propose a novel immunotherapy for the treatment of sarcomas. This treatment combines the ability of NK cells to eliminate tumor cells without prior sensitization with anti-CXCR4 treatment to decrease the incidence of metastasis. We previously showed that osteosarcoma cells are susceptible to NKAE lysis both *in vivo* and *in vitro*, and that this cytolytic activity is dependent on interactions between the NKG2D receptor and its ligands (40). The NKAE cells targeted sarcoma cells, including the TICs compartment. We therefore decided to test the potentially additive effects of MDX1338 and NKAE cell therapy for the treatment of rhabdomyosarcoma. We show here that a combination of NKAE cells and MDX1338 efficiently inhibits rhabdomyosarcoma cell invasion, tumor implantation and metastasis.

As mentioned, NK constitutively express CXCR4 and so do NKAE cells (41). The effect of anti CXCR4 on NKAE should, therefore, be taken into account in the proposed combined therapy. In mice, the administration of the CXCR4 antagonist, AMD-3100/plerixafor to C57BL/6 mice induced strong reduction of NK cells in the bone marrow and increased their number in blood and spleen (42). These results are transposable to our model, since the CXCR4 and CXCL12 genes are remarkably conserved across diverse species. The human and murine CXCL12 differs by one amino acid and is cross reactive (43).

Similarly, in a rhesus macaque model, AMD-3100 treatment led to mobilization of NK, together with B and T cell subpopulations into the peripheral blood (44). In our model, we hypothesize that MDX1338 blocks not only metastatic CXCR4⁺ sarcoma cells migration to the lungs, but also blocks therapeutic NKAIE cells homing to the bone marrow and favors their permanence in the blood stream, where they are more likely to find and kill metastatic neoplastic cells.

Clinical trials of the adoptive transfer of NK cells have been published. These trials made use of resting NK cells (45, 46) or NK cells cultured with IL-2 (47–49). The use of activated and expanded NK cells cocultured with human-derived antigen-presenting cells, as proposed here, is an emerging alternative (14, 15, 50, 51). Our and others' results indicate that both autologous and haploidentical NKAIE cell therapies are safe, with no serious adverse effects, and feasible for use in the treatment of various types of cancer.

The results presented here demonstrate that combined treatment with the anti-CXCR4 mAb MDX1338 and NKAIE cell therapy prevents rhabdomyosarcoma cells from migrating, invading, tumor implantation and the formation of lung metastases. They support the establishment of a clinical trial to evaluate this pioneering combined treatment scheme. Previous studies have indicated that both these treatments are well tolerated, at least when used separately, so the translation of this approach into clinical practice should be straightforward. This is an important point given the urgent need for new strategies to improve treatment efficacy in sarcoma patients with metastatic disease.

Data Availability

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the [Supplementary Files](#).

Ethics Statement

Human samples were obtained after informed patient consent in accordance with the Helsinki Declaration. Research was approved by the La Paz Hospital Ethics Committee (PI-2295). All procedures were approved by Comunidad de Madrid Animal Protection Area (PROEX 220/16) and CSIC Ethics Committee.

Author Contributions

MV and AP-M: conception, design, and writing, review, and/or revision of the manuscript. MV, PG-N, LF, AE, JP-K, and MM: development of methodology. MV, DB, PG-N, AB, JV, CM-D, MA-Á: acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.). MV, DB, PG-N, AB, RP, MM, JP-K, and AP-M: analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis). MV, PG-N, AB, and CM-D: administrative, technical or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases). AP-M: study supervision.

Funding

This work was supported in part by the National Health Service of Spain, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), FONDOS FEDER grant (FIS) PI15/00973; Asociación Española Contra el Cáncer to AP-M; CRIS Foundation to Beat Cancer grant to JV, LF, and AE; and Patients' Support Associations Fundación Mari Paz Jiménez Casado and La Sonrisa de Álex to MV and the research project.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Spanish National Cancer Research Centre (CNIO) Histopathology Core Unit, and Raquel Marcos from the La Paz University Hospital (HULP) Histopathology Unit for valuable technical

support. This research has been conducted using the IdiPAZ Biobank Resource, which we also thank for their excellent support.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01814/full#supplementary-material>

References

1. Oberlin O, Rey A, Lyden E, Bisogno G, Stevens MCG, Meyer WH, et al. Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European Cooperative Groups. *J Clin Oncol.* (2008) 26:2384–9. doi: 10.1200/JCO.2007.14.7207
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
2. Heare T, Hensley MA, Dell'Orfano S. Bone tumors: osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Curr Opin Pediatr.* (2009) 21:365–72. doi: 10.1097/MOP.0b013e32832b1111
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
3. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol.* (2009) 27:1007–13. doi: 10.1200/JCO.2007.13.8925
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
4. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* (2001) 410:50–6. doi: 10.1038/35065016
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

5. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* (2014) 124:31–82. doi: 10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
6. Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1999) 96:5215–20. doi: 10.1073/pnas.96.9.5215
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
7. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, et al. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: Functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol.* (1997) 7:112–21. doi: 10.1016/S0960-9822(06)00055-8
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
8. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. *J Biol Chem.* (1998) 273:4282–7. doi: 10.1074/jbc.273.7.4282
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
9. Kuhne MR, Mulvey T, Belanger B, Chen S, Pan C, Chong C, et al. 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.* (2013) 19:357–66. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2333
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
10. Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Amaya-Chanaga CI, Choi MY, Melo-Cardenas J, et al. Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic

lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget*. (2016) 7:2809–22. doi: 10.18632/oncotarget.6465

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

11. Vivier E, Raulet D, Moretta A, Caligiuri M. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*. (2011) 331:44–9. doi: 10.1126/science.1198687

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

12. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Eldridge P, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*. (2010) 69:4010–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3712

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

13. Imai C, Iwamoto S. CD. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Leukemia*. (2005) 106:376–83. doi: 10.1182/blood-2004-12-4797

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

14. Vela M, Corral D, Carrasco P, Fernández L, Valentín J, González B, et al. Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia. *Cancer Lett*. (2018) 422:107–17. doi: 10.1016/j.canlet.2018.02.033

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

15. Leivas A, Perez-Martinez A, Blanchard MJ, Martín-Clavero E, Fernández L, Lahuerta JJ, et al. Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. *Oncoimmunology*. (2016) 5:e1250051. doi: 10.1080/2162402X.2016.1250051

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

16. Pérez-Martínez A, Fernández L, Valentín J, Martínez-Romera I, Corral MD, Ramírez M, et al. A phase I/II trial of interleukin-15-stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors. *Cytotherapy*. (2015) 17:1594–603. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.07.011

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

17. Krook MA, Nicholls LA, Scannell CA, Chugh R, Thomas DG, Lawlor ER. Stress-induced CXCR4 promotes migration and invasion of ewing sarcoma. *Mol Cancer Res*. (2014) 12:953–64. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0668

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

18. Li Y-J, Dai Y-L, Zhang W-B, Li S-J, Tu C-Q. Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *Clin Exp Med*. (2015) 9:11101–12. doi: 10.1007/s10238-015-0405-y

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

19. Davies AM, Sutton BJ. Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev*. (2015) 268:139–59. doi: 10.1111/imr.12349

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

20. Hinson ARP, Jones R, Crose LES, Belyea BC, Barr FG, Linardic CM. Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol*. (2013) 3:1–12. doi: 10.3389/fonc.2013.00183

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#)

21. Jin L, Majerus J, Oliveira A, Inwards CY, Nascimento AG, Burgart LJ, et al. Detection of fusion gene transcripts in fresh-frozen and

formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of soft-tissue sarcomas after laser capture microdissection and RT-PCR. *Diagnostic Mol Pathol.* (2003) 12:224–30. doi: 10.1097/00019606-200312000-00006

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

22. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirilaque MD, et al. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. *Eur J Cancer.* (2013) 49:684–95. doi: 10.1016/j.ejca.2012.09.011

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

23. Vela M, Aris M, Llorente M, Garcia-Sanz JA, Kremer L. Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges. *Front Immunol.* (2015) 6:12. doi: 10.3389/fimmu.2015.00012

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

24. Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. CXCL12 (SDF1 α)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin Cancer Res.* (2011) 17:2074–80. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2636

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

25. Ren Z, Liang S, Yang J, Han X, Shan L, Wang B, et al. Coexpression of CXCR4 and MMP9 predicts lung metastasis and poor prognosis in resected osteosarcoma. *Tumor Biol.* (2016) 37:5089–96. doi: 10.1007/s13277-015-4352-8

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

26. Lu Y, Guan GF, Chen J, Hu B, Sun C, Ma Q, et al. Aberrant CXCR4 and β -catenin expression in osteosarcoma correlates with patient survival. *Oncol Lett.* (2015) 10:2123–9. doi: 10.3892/ol.2015.3535

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

27. Guan G, Zhang Y, Lu Y, Liu L, Shi D, Wen Y, et al. The HIF-1 α /CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells. *Cancer Lett.* (2015) 357:254–64. doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.034

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

28. Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, et al. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol.* (2014) 45:1900–9. doi: 10.1016/j.humpath.2014.05.012

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

29. Guo M, Cai C, Zhao G, Qiu X, Zhao H, Ma Q, et al. Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1 α activation in human osteosarcoma. *PLoS ONE.* (2014) 9:e90518. doi: 10.1371/journal.pone.0090518

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

30. Oda Y, Tateishi N, Matono H, Matsuura S, Yamamaoto H, Tamiya S, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression is correlated with VEGF expression and poor survival in soft-tissue sarcoma. *Int J Cancer.* (2009) 124:1852–9. doi: 10.1002/ijc.24128

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

31. Bertolini F, Agnola CD, Mancuso P, Bertolini F, Agnola CD, Mancuso P, et al. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* (2002) 62:3106–12. <http://cancerres.aacrjournals.org/>

[PubMed Abstract](#) | [Google Scholar](#)

32. Tavor S, Petit I, Porozov S, Avigdor A, Dar A, Leider-Trejo L, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res.* (2004) 64:2817–24. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3693
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
33. Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F, Beltrami C, Pieralli A, Andersson KL, et al. The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. *Clin Exp Metastasis.* (2009) 26:261–8. doi: 10.1007/s10585-009-9240-4
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
34. Brennecke P, Arlt MJE, Campanile C, Husmann K, Gvozdenovic A, Apuzzo T, et al. CXCR4 antibody treatment suppresses metastatic spread to the lung of intratibial human osteosarcoma xenografts in mice. *Clin Exp Metastasis.* (2014) 31:339–49. doi: 10.1007/s10585-013-9632-3
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
35. Kashima K, Watanabe M, Sato Y, Hata J, Ishii N, Aoki Y. Inhibition of metastasis of rhabdomyosarcoma by a novel neutralizing antibody to CXC chemokine receptor-4. *Cancer Sci.* (2014) 105:1343–50. doi: 10.1111/cas.12490
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
36. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa SI, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* (1996) 382:635–8. doi: 10.1038/382635a0
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
37. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed

cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1998) 95:9448–53. doi: 10.1073/pnas.95.16.9448

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

38. Steinberg M, Silva M. Plerixafor: a chemokine receptor-4 antagonist for mobilization of hematopoietic stem cells for transplantation after high-dose chemotherapy for non-hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Clin Ther*. (2010) 32:821–43. doi: 10.1016/j.clinthera.2010.05.007

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

39. Amaya-Chanaga CI, Jones H, AlMahasnah EA, Choi MY, Kuhne MR, Cohen L, et al. BMS-936564 (Anti-CXCR4 Antibody) induces specific leukemia cell mobilization and objective clinical responses in CLL patients treated under a phase I clinical trial. *Blood*. (2013) 122:4190. <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/4190>

[Google Scholar](#)

40. Fernández L, Valentín J, Zalacain M, Leung W, Patiño-García A, Pérez-Martínez A. Activated and expanded natural killer cells target osteosarcoma tumor initiating cells in an NKG2D–NKG2DL dependent manner. *Cancer Lett*. (2015) 368:54–63. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.042

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

41. Bernardini G, Antonangeli F, Bonanni V, Santoni A. Dysregulation of chemokine/chemokine receptor axes and NK cell tissue localization during diseases. *Front Immunol*. (2016) 7:1–9. doi: 10.3389/fimmu.2016.00402

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

42. Bernardini G, Sciume G, Bosisio D, Morrone S, Sozzani S, Santoni A. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood*. (2008) 111:3626–34. doi: 10.1182/blood-2007-08-106203
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
43. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci*. (2001) 938:83–95. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03577.x
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
44. Kean LS, Sen S, Onabajo O, Singh K, Robertson J, Stempora L, et al. Significant mobilization of both conventional and regulatory T cells with AMD3100. *Blood*. (2011) 118:6580–90. doi: 10.1182/blood-2011-06-359331
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
45. Curti A, Ruggeri L, Addio AD, Bontadini A, Dan E, Rosa M, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood*. (2011) 118:3273–9. doi: 10.1182/blood-2011-01-329508
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
46. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, et al. NKAML: A pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. (2010) 28:955–9. doi: 10.1200/JCO.2009.24.4590
- [PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
47. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and *in*

in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. (2005) 105:3051–7. doi: 10.1182/blood-2004-07-2974

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

48. Shi J, Tricot G, Szmania S, Rosen N, Garg TK, Malaviarachchi PA, et al. Infusion of haplo-identical killer immunoglobulin-like receptor ligand mismatched NK cells for relapsed myeloma in the setting of autologous stem cell transplantation. *Br J Haematol*. (2008) 143:641–53. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07340.x

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

49. Bachanova V, Cooley S, Defor TE, Verneris MR, Zhang B, McKenna DH, et al. Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood*. (2014) 123:3855–63. doi: 10.1182/blood-2013-10-532531

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

50. Ishikawa E, Tsuboi K, Saijo K, Harada H, Takano S, Nose T, et al. Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res*. (2004) 24:1861–71. <http://ar.iijournals.org/content/24/3B/1861.long>

[PubMed Abstract](#) | [Google Scholar](#)

51. Szmania S, Garg TK, Lapteva N, Lingo JD, Greenway A D, Stone K, et al. Fresh *ex vivo* expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation *in vivo* in high-risk relapsed multiple myeloma (MM) patients. *Blood*. (2012) 120:24–36. doi: 10.1097/CJI.0000000000000059

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Keywords: sarcoma, metastasis, chemokine C-X-C receptor 4 (CXCR4), therapeutic antibody, activated and expanded natural killer (NKAE) cells, immunotherapy

Citation: Vela M, Bueno D, González-Navarro P, Brito A, Fernández L, Escudero A, Valentín J, Mestre-Durán C, Arranz-Álvarez M, Pérez de Diego R, Mendiola M, Pozo-Kreilinger JJ and Pérez-Martínez A (2019) Anti-CXCR4 Antibody Combined With Activated and Expanded Natural Killer Cells for Sarcoma Immunotherapy. *Front. Immunol.* 10:1814. doi: 10.3389/fimmu.2019.01814

Received: 25 April 2019; **Accepted:** 18 July 2019;

Published: 02 August 2019.

Edited by:

Rayne Rouce, Baylor College of Medicine, United States

Reviewed by:

Michael R. Verneris, University of Colorado Denver, United States

Pooja Arora, Pfizer, United States

Copyright © 2019 Vela, Bueno, González-Navarro, Brito, Fernández, Escudero, Valentín, Mestre-Durán, Arranz-Álvarez, Pérez de Diego, Mendiola, Pozo-Kreilinger and Pérez-Martínez. This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

***Correspondence:** Maria Vela, **aperezmartinez@salud.madrid.org**; Antonio Pérez-Martínez, **antonio.perez@uam.es**