

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 360**

51 Int. Cl.:

A61K 35/17	(2015.01)
A61P 35/02	(2006.01)
A61P 35/04	(2006.01)
C12N 5/0783	(2010.01)
C12Q 1/68	(2008.01)
C12Q 1/6827	(2008.01)
C07K 14/705	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2019 PCT/US2019/032318**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2019 WO19222293**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2019 E 19803497 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024 EP 3793573**

54 Título: **Subconjuntos de células citolíticas naturales humanas con respuestas inmunitarias mejoradas dirigidas por anticuerpos**

30 Prioridad:

14.05.2018 US 201862671358 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2024

73 Titular/es:

**INDAPTA THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
5000 Gulf Freeway Bldg 5, R. 142
Houston, Texas 77023, US**

72 Inventor/es:

**DIPIERRO, GUY y
DOS SANTOS, GARY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 993 360 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Subconjuntos de células citolíticas naturales humanas con respuestas inmunitarias mejoradas dirigidas por anticuerpos

5

Referencia a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad respecto de la solicitud provisional de los EE. UU. N.º 62/671.358, presentada el 14 de mayo de 2018, titulada "Subconjuntos de células citolíticas naturales humanas con respuestas inmunitarias mejoradas dirigidas por anticuerpos".

10

Incorporación por referencia del listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado 776032000340SeqList.txt, creado el 14 de mayo de 2019, que tiene un tamaño de 7,04 kilobytes.

15

Campo

La presente divulgación proporciona composiciones que contienen subconjuntos especializados de células citolíticas naturales (NK) con respuestas inmunitarias mejoradas dirigidas por anticuerpos. Las composiciones son útiles para tratar enfermedades y afecciones tales como cáncer, incluso en combinación con un anticuerpo capaz de unirse a tejidos o células asociados a la enfermedad, tales como células tumorales o células infectadas.

20

Antecedentes

25

La terapia a base de anticuerpos se ha utilizado con frecuencia para tratar el cáncer y otras indicaciones de enfermedades. Las respuestas a la terapia con anticuerpos se han centrado normalmente en los efectos inhibidores directos de estos anticuerpos sobre las células tumorales (por ejemplo, la inhibición de los receptores del factor de crecimiento y la consiguiente inducción de la apoptosis), pero los efectos *in vivo* de estos anticuerpos pueden ser más complejos e implicar al sistema inmunitario del huésped. Las células citolíticas naturales (NK) son células efectoras inmunitarias que participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos cuando el receptor Fc (CD16; FcγRIII) se une a la porción Fc de los anticuerpos unidos a una célula portadora de antígeno. Se necesitan mejores terapias para mejorar las respuestas al tratamiento con anticuerpos. Se proporcionan en el presente documento realizaciones que satisfacen tales necesidades.

30

35

Sumario

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

40

En el presente documento se proporcionan subconjuntos especializados de células NK que muestran respuestas inmunitarias mejoradas dirigidas por anticuerpos. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones enriquecidas para los subconjuntos de células NK. En algunas realizaciones, las composiciones pueden administrarse a un sujeto para tratar una enfermedad o afección en combinación con un anticuerpo u otra proteína Fc, tal como un anticuerpo o proteína Fc para tratar la enfermedad o afección o que se une o reconoce un antígeno o proteína asociada a la enfermedad o afección. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados consiguen una respuesta mejorada en comparación con los métodos en los que se administran células NK convencionales o en comparación con los métodos en los que se administra el anticuerpo o Fc solo. En algunas realizaciones, el aumento de la respuesta se debe a una mayor afinidad del fragmento Fc de los anticuerpos IgG por parte de las células NK especializadas, lo que puede dar lugar a una mayor citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y, por tanto, a una mayor destrucción de las células diana del anticuerpo o la proteína, por ejemplo, células tumorales. En algunas realizaciones, las células NK especializadas son positivas en superficie para CD16 con el polimorfismo 158V+ y/o son deficientes en la expresión de la cadena FcRγ.

45

50

En el presente documento se proporciona una composición que comprende un subconjunto citolíticas naturales (NK) de superficie positivas para CD16 158V+, en donde al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % de las células de la composición comprenden el subconjunto de células NK CD16 158V+. En algunas realizaciones, el subconjunto de células NK CD16 158V+ no expresa la cadena FcRγ (CD16 158V+/g-), es positivo en la superficie para un KIR y/o es negativa en la superficie o bajo para Nkp30 y/o Nkp46.

55

60

En el presente documento se proporciona una composición que comprende un subconjunto de células citolíticas naturales (NK) de superficie positiva para CD16 158V+ y deficiente en la expresión de la cadena FcRγ (g-) (CD16 158V+/g-), en donde al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % de las células de la composición comprenden el subconjunto de células NK CD16 158V+/g-.

65

ES 2 993 360 T3

En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, CD16 158V+ es un receptor de superficie que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:11 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:11 y comprende el polimorfismo 158V+.

5 En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el subconjunto de células NK de la composición es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el subconjunto de células NK de la composición es negativo o bajo para la expresión en superficie de Nkp30 y/o Nkp46. En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el subconjunto de células NK de la
10 composición es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3 y es negativo o bajo para la expresión en superficie de Nkp30 y/o Nkp46.

En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, el subconjunto de células NK de la composición es positivo en superficie para NKG2C.

15 En algunas de cualquiera de las realizaciones proporcionadas, la composición comprende células en las que el subconjunto de células NK está presente de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células, de o desde aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células o de o desde aproximadamente 10^9
20 a aproximadamente 10^{10} células. En algunas realizaciones, el volumen de la composición es de al menos o al menos aproximadamente 10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml o 500 ml y/o la composición comprende una concentración del subconjunto de células NK que está entre 1×10^5 y 1×10^8 células/ml.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la composición contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición contiene un crioprotector.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el subconjunto de células NK presente en la composición incluye células NK primarias obtenidas de un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

30 En el presente documento se proporciona un método para enriquecer las células NK, comprendiendo el método: (a) aislar células NK o un subconjunto de las mismas de un sujeto identificado como poseedor del genotipo de células NK CD16 158V+; y (b) cultivar las células NK aisladas o un subconjunto de las mismas en condiciones para expandir las células, enriqueciendo así las células NK o el subconjunto de las mismas del sujeto. En algunas realizaciones, antes de la etapa (a), el método incluye el cribado o la identificación de sujetos para detectar la presencia del genotipo de
35 células NK CD16 158V+.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células NK o un subconjunto de las mismas se aíslan de una población de células que comprende linfocitos. En algunas realizaciones, la población de células comprende una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), un producto de aféresis o un producto de leucaféresis.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el método incluye aislar un subconjunto de células NK del sujeto, en el que el subconjunto de células NK comprende o está enriquecido por células que no expresan la cadena FcR γ (CD16 158V+/g-). En algunas realizaciones, el subconjunto de células NK es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3. En algunas realizaciones, el subconjunto de células NK tiene una expresión en superficie negativa o baja de Nkp30 y/o Nkp46. En algunas realizaciones, el subconjunto de células NK es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3 y es negativo o bajo para la expresión en superficie de Nkp30 y/o Nkp46. En algunas realizaciones, las células NK o un subconjunto de las mismas es positivo en superficie para NKG2C.

50 En algunas de dichas realizaciones, el método comprende la administración de IL-12, IL-15, IL-18, IL-2 y/o CCL5 al sujeto antes de aislar las células NK o un subconjunto de las mismas.

En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células se cultivan en presencia de células alimentadoras o en presencia de una o más citocinas, opcionalmente IL-2, IL-15 y/o IL-7. En algunas realizaciones, las células NK se cultivan durante un periodo de tiempo para lograr una expansión de las células de al menos 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o más en comparación con el número de células NK aisladas antes del cultivo. En algunas realizaciones, las células NK aisladas se cultivan durante de 7 a 28 días, opcionalmente aproximadamente o al menos aproximadamente 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días o 21 días. En algunas realizaciones, las células aisladas se cultivan para conseguir una cantidad terapéuticamente eficaz de las células NK o de un subconjunto de las mismas. En algunas realizaciones, las células aisladas se cultivan para conseguir un número de células NK enriquecidas o subconjunto de las mismas de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células, de o desde aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células o de o desde aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células.

65 En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el método comprende además la tipificación HLA de las células

aisladas o enriquecidas. En algunas realizaciones, el método comprende además la crioconservación de las células y/o la formulación de las células en presencia de un crioprotector. En algunas realizaciones, las células enriquecidas resultantes se administran a un sujeto para tratar una enfermedad o trastorno. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto está sano.

5 También se proporciona una composición que contiene células NK enriquecidas o un subconjunto de las mismas producidas por cualquiera de los métodos anteriores. En algunas realizaciones, la composición contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición contiene un crioprotector.

10 En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la composición es estéril.

En el presente documento se proporciona un kit que contiene una composición de cualquiera de las realizaciones anteriores y un agente adicional para el tratamiento de una enfermedad. En algunas realizaciones, el kit contiene además instrucciones para administrar la composición y el agente adicional para tratar una enfermedad o afección.

15 En el presente documento se proporciona un kit que contiene la composición de cualquiera de las realizaciones proporcionadas e instrucciones para administrar la composición en una terapia de combinación con un agente adicional para el tratamiento de una enfermedad.

20 En algunas de dichas realizaciones, el agente adicional es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo reconoce o se une específicamente a un antígeno asociado al tumor. En algunas realizaciones, el anticuerpo reconoce o se une a CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD74, CD140, EpCAM, CEA, gpA33, mesotelina, α -fetoproteína, mucina, PDGFR-alfa, TAG-72, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, receptor quinasa del factor de dispersión, un gangliósido, citoqueratina, receptores de Frizzled, VEGF, VEGFR, integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, EGFR, EGFL7, ERBB2(HER2), ERBB3, fibronectina, HGF, HER3, LOXL2, MET, IGF1R, IGLF2, EPHA3, FR-alfa, fosfatidilserina, Syndecan 1, SLAMF7(CD319), TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, vimentina o tenascina. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa y/o comprende un dominio Fc.

30 En el presente documento se proporciona un método para tratar una enfermedad o afección mediante la administración de la composición de cualquiera de las realizaciones anteriores a un individuo o sujeto que la necesite. En algunas realizaciones, el método incluye la administración al individuo de o desde aproximadamente 1×10^5 a 1×10^{10} células/m² o la administración de o desde aproximadamente 1×10^6 a 1×10^{10} células NK/kg.

35 En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el método incluye además la administración de un agente adicional. En algunas realizaciones, el agente adicional es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo reconoce un antígeno asociado al tumor. En algunas realizaciones, el anticuerpo reconoce o se une específicamente a CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD74, CD140, EpCAM, CEA, gpA33, mesotelina, α -fetoproteína, mucina, PDGFR-alfa, TAG-72, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, receptor quinasa del factor de dispersión, un gangliósido, citoqueratina, receptores de Frizzled, VEGF, VEGFR, integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, EGFR, EGFL7, ERBB2(HER2), ERBB3, fibronectina, HGF, HER3, LOXL2, MET, IGF1R, IGLF2, EPHA3, FR-alfa, fosfatidilserina, Syndecan 1, SLAMF7(CD319), TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, vimentina o tenascina. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio Fc y/o es un anticuerpo de longitud completa.

45 En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el agente adicional y la composición se administran secuencialmente. En algunas realizaciones, el agente adicional se administra antes de la administración de la composición. En algunas realizaciones, el agente adicional y la composición se administran simultáneamente.

50 En algunas de cualquiera de estas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en una afección inflamatoria, una infección y cáncer. En algunas realizaciones, la infección es una infección vírica o una infección bacteriana. En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia o linfoma. En algunas realizaciones, el cáncer comprende un tumor sólido.

55 En algunas de cualquiera de estas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células NK administradas en la composición son autólogas del sujeto. En algunas de cualquiera de estas realizaciones, las células NK administradas en la composición son alogénicas para el individuo. En algunas realizaciones, las células se administran a un sujeto del mismo tipo de HLA. En algunas realizaciones, las células de un donante con HLA compatible se administran a un sujeto.

60 En algunas realizaciones, el método incluye descongelar las células antes de administrarlas a un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 muestra la actividad CCDA de las células NK g-NK convencionales y g-NK 158V contra SW-480/cetuximab, SKOV3/cetuximab, SKOV3/trastuzumab, MM.1S/daratumumab, y MM.1S/elotuzumab en una proporción E:T de 5:1.

Los valores son la media \pm error típico.

Descripción detallada

5 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se proporcionan composiciones que contienen subconjuntos de células citolíticas naturales (NK) humanas con respuestas inmunitarias mejoradas dirigidas por anticuerpos, incluyendo composiciones enriquecidas para dichos subconjuntos. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas contienen o están enriquecidas para células NK que presentan polimorfismos genéticos específicos del gen CD16 (Fc γ RIII) en la posición aminoacídica 158, en donde se ha sustituido una valina (V) por una fenilalanina (F) (denominada 158V+). En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas contienen o están enriquecidas para 158V+ y para células NK deficientes en Fc γ R (denominadas g-NK), proporcionando así una composición que contiene o está enriquecida en células NK CD16 158V+/g-. También se proporcionan métodos para administrar las composiciones proporcionadas a un sujeto en combinación con un anticuerpo para tratar una enfermedad o afección.

En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas comprenden células NK humanas en las que más o más de aproximadamente el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o más de las células NK de la composición o del total de células de la composición son células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-.

Las células citolíticas naturales (NK) son linfocitos innatos importantes para participar en la inmunidad antiviral y anticancerosa a través de la secreción de citocinas y quimiocinas, y de la liberación de gránulos citotóxicos (Vivier *et al.* Science 331(6013):44-49 (2011); Caligiuri, Blood 112(3):461-469 (2008); Roda *et al.*, Cancer Res. 66(1):517-526 (2006)). Las células NK son células efectoras que comprenden la tercera población más grande de linfocitos y son importantes para la inmunovigilancia del huésped frente a células tumorales e infectadas por patógenos. No obstante, a diferencia de los linfocitos T y B, se cree que las células NK sólo tienen una capacidad limitada de reconocimiento de dianas mediante receptores de activación codificados en la línea germinal (Bottino *et al.*, Curr Top Microbiol Immunol. 298:175-182 (2006); Stewart *et al.*, Curr Top Microbiol Immunol. 298:1-21 (2006)).

La activación de las células NK puede producirse mediante la unión directa de los receptores de las células NK a los ligandos de la célula diana, como se observa con la eliminación directa de células tumorales, o a través de la reticulación del receptor Fc (CD16; también conocido como CD16a o Fc γ RIIIa) al unirse a la porción Fc de anticuerpos unidos a una célula portadora de antígeno. Tras la activación, las células NK producen citocinas y quimiocinas en abundancia y, al mismo tiempo, presentan una potente actividad citolítica. Las células NK son capaces de destruir células tumorales a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En algunos casos, la CCDA se desencadena cuando los receptores de la superficie de las células NK (tal como el CD16) reconocen anticuerpos IgG1 o IgG3 unidos a la superficie de una célula. Esto desencadena la liberación de gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzimas, provocando la muerte de las células diana. Dado que las células NK expresan el receptor Fc activador CD16, que reconoce las células diana recubiertas de IgG, se amplía el reconocimiento de la diana (Ravetch y Bolland, Annu Rev Immunol. 19:275-290 (2001); Lanier Nat. Immunol. 9(5):495-502 (2008); Bryceson y Long, Curr Opin Immunol. 20(3):344-352 (2008)). La CCDA y la producción de citocinas/quimiocinas dependiente de anticuerpos están mediadas principalmente por las células NK.

Además del CD16 expresado en las células NK que participa en las respuestas dependientes de anticuerpos (tal como la CCDA mediada por células NK), CD16 también existe como forma anclada a glucosilfosfatidilinositol (también conocida como Fc γ RIIIB o CD16B). Se entiende que la referencia a CD16 en el presente documento se refiere a la forma CD16a que se expresa en las células NK y no a la forma anclada al glicosilfosfatidilinositol. El receptor CD16 es capaz de asociarse con adaptadores, la cadena ζ del complejo TCR-CD3 (CD3 ζ) y/o la cadena Fc γ R, para transducir señales a través de motivos de activación basados en tirosinas inmunorreceptoras (ITAM). En algunos aspectos, el acoplamiento de CD16 (entrecruzamiento de CD16) inicia las respuestas de las células NK a través de señales intracelulares que se generan a través de una, o ambas, de las cadenas adaptadoras asociadas a CD16, Fc γ R o CD3 ζ . La activación de CD16 conduce a la fosforilación de la cadena γ o ζ , que a su vez recluta tirosina quinasas, syk y ZAP-70, iniciando una cascada de transducción de señales que conduce a funciones efectoras rápidas y potentes. La función efectora más conocida es la liberación de gránulos citoplasmáticos que transportan proteínas tóxicas para eliminar las células diana cercanas mediante el proceso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. El entrecruzamiento de CD16 también da lugar a la producción de citocinas y quimiocinas que, a su vez, activan y orquestan una serie de respuestas inmunitarias.

Esta liberación de citocinas y quimiocinas puede desempeñar un papel en la actividad anticancerosa de las células NK *in vivo*. Las células NK también tienen pequeños gránulos en su citoplasma que contienen perforina y proteasas (granzimas). Al liberarse de la célula NK, la perforina forma poros en la membrana celular de las células diana a través de los cuales pueden entrar las granzimas y las moléculas asociadas, induciendo apoptosis. El hecho de que las células NK induzcan la apoptosis en lugar de la necrosis de las células diana es significativo, ya que la necrosis de una célula infectada por un virus liberaría los viriones, mientras que la apoptosis conduce a la destrucción del virus dentro de las células.

La mayoría de los seres humanos expresan CD16, que tiene una afinidad relativamente baja por los anticuerpos IgG1. No obstante, se ha descubierto que las células NK de individuos portadores de un polimorfismo de nucleótido único (SNP rs396991) en el gen CD16, nucleótido 526 [timidina (T) → guanina (G)] que da lugar a una sustitución de aminoácidos (aa) de valina (V) por fenilalanina (F) en la posición 158 (F158V, también denominada 158V+ en el presente documento) en la forma madura (procesada) de la proteína, se asocia con una afinidad sustancialmente mayor por los anticuerpos IgG1 y tienen la capacidad de montar respuestas CCDA mediadas por células NK más robustas (Mellor *et al.* (2013) *Journal of Hematology & Oncology*, 6:1; Musolino *et al.* (2008) *Journal of Clinical Oncology*, 26:1789-1796 y Hatjiharissi *et al.* (2007) *Blood*, 110:2561-2564).

También se ha descubierto que subconjuntos de células NK deficientes en la cadena FcR γ (denominadas g-NK) también son capaces de mediar respuestas CCDA robustas (véase, por ejemplo, la solicitud de patente publicada N.º US2013/0295044). El mecanismo del aumento de las respuestas puede deberse a cambios en la modificación epigenética que influyen en la expresión del FcR γ . Las células g-NK expresan abundantemente la cadena ζ del adaptador de señalización, pero son deficientes en la expresión de la cadena γ y del adaptador de señalización. En comparación con las células NK convencionales, estas células g-NK deficientes en γ muestran una actividad dramáticamente mejorada cuando son activadas por anticuerpos. Por ejemplo, las células g-NK pueden activarse mediante la reticulación de CD16 mediada por anticuerpos o por células tumorales recubiertas de anticuerpos. En algunos aspectos, las células g-NK producen mayores cantidades de citocinas (por ejemplo, IFN- γ o TNF- α) y quimiocinas (por ejemplo, MIP-1 α , MIP-1 β , y RANTES) y/o muestran respuestas de desgranulación más elevadas que las células NK convencionales que expresan la cadena γ . Las células g-NK proporcionan una alta expresión de Granzima B, un componente de la maquinaria citotóxica de las células citolíticas naturales. Más aún, las células g-NK tienen una vida útil prolongada, en comparación con las células NK convencionales, y su presencia se mantiene a largo plazo. En algunas realizaciones, las células g-NK son estables desde el punto de vista funcional y fenotípico.

En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ y las células NK CD16 158V+/g- son más eficaces para provocar respuestas CCDA que las células NK convencionales, por ejemplo, células NK que no contengan el polimorfismo 158V+ y/o que no sean deficientes en la cadena γ . En algunos casos, la CCDA es un mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos, incluidos los anticuerpos contra el cáncer. En algunos aspectos, la terapia celular mediante la administración de células NK puede utilizarse conjuntamente con anticuerpos con fines terapéuticos y afines. En el presente documento se proporcionan métodos que implican la administración combinada de una composición enriquecida para células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- como se proporciona y un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo contra el cáncer. En algunas realizaciones, la selección de células NK CD16 158V+ o CD16 158V+/g- como diana dirigida por anticuerpos mejora los resultados en los pacientes debido a mejores afinidades, funciones de efecto citotóxico y/o mediado por citocinas de los subconjuntos de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-.

En algunas realizaciones, las células g-NK producen cantidades significativamente mayores de una citocina que las células citolíticas naturales que sí expresan FcR γ . En otra realización, la citocina es el interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), o una combinación de los mismos. En una realización, las células g-NK producen cantidades significativamente mayores de una quimiocina. En una realización, la quimiocina es MIP-1 α , MIP-1 β o una combinación de los mismos. En otra realización, las células g-NK producen la citocina o la quimiocina tras la estimulación a través del receptor Fc CD16.

Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en las subsecciones siguientes. Los encabezados de sección utilizados en el presente documento son sólo con fines organizativos y no han de interpretarse como una limitación de la materia objeto descrita.

I. Definiciones

A menos que defina lo contrario, todos los términos de la técnica, se pretende que las notaciones y otros términos o terminología técnicos y científicos utilizados en el presente documento tengan el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la materia objeto reivindicada. En algunos casos, los términos con significados comúnmente comprendidos se definen en el presente documento con fines de claridad y/o para tener una referencia inmediata, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no se ha de considerar necesariamente como representativa de una diferencia sustancial frente a lo que se comprende en la materia.

Como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contenido indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas, y similares.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere al intervalo de error habitual para el valor correspondiente, fácilmente conocido por los expertos en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro en sí mismo.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste", y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

5 Como se utilizan en el presente documento, "opcional" u "opcionalmente" significa que el acontecimiento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que dicho acontecimiento o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, un grupo opcionalmente sustituido significa que el grupo no está sustituido o está sustituido.

10 Como se utilizan en el presente documento, "anticuerpo" se refiere a inmunoglobulinas y fragmentos de inmunoglobulina, ya sean naturales o parcial o totalmente sintéticos, tales como producidos de forma recombinante, incluyendo cualquier fragmento del mismo que contenga al menos una porción de la cadena pesada variable y/o de la región de la cadena ligera de la molécula de inmunoglobulina que sea suficiente para formar un sitio de unión al antígeno y, cuando se ensamblan, para unirse de manera específica a un antígeno. Por consiguiente, un anticuerpo incluye cualquier proteína que tenga un dominio de unión que sea homólogo o sustancialmente homólogo a un dominio de unión a antígeno de inmunoglobulina (sitio de combinación de anticuerpos). Habitualmente, los anticuerpos incluyen mínimamente toda o al menos una porción de la cadena variable pesada (V_H) y/o la cadena variable ligera (V_L). En general, el emparejamiento de una V_H y una V_L entre sí, forma un único sitio de unión a antígeno, aunque, en algunos casos, un único dominio V_H o V_L es suficiente para la unión al antígeno. El anticuerpo también puede incluir toda o una parte de la región constante. La referencia a un anticuerpo en el presente documento incluye el anticuerpo de longitud completa y los fragmentos de unión a antígeno. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa indistintamente con "anticuerpo" en el presente documento.

25 Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, a diferencia de un fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo que suele tener dos cadenas pesadas de longitud completa (por ejemplo, $VH-CH1-CH2-CH3$ o $VH-CH1-CH2-CH3-CH4$) y dos cadenas ligeras de longitud completa ($VL-CL$) y regiones bisagra, tales como los anticuerpos producidos a partir de especies de mamífero (por ejemplo, de humano, ratón, rata, conejo o primate no humano, etc.) por linfocitos B secretores de anticuerpos y anticuerpos con los mismos dominios que se producen sintéticamente. Específicamente, los anticuerpos completos incluyen aquellos con cadenas pesadas y ligeras que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, los dominios constantes de secuencia natural humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

35 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, la unión a antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv, Fv unidos por enlaces disulfuro (dsFv), fragmentos Fd, fragmentos Fd'; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de Estados Unidos n.º 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario, incluidos Fv de cadena única (scFv) o Fab de cadena única (scFab); fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores y anticuerpos multiespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. A efectos del presente documento, un fragmento de anticuerpo incluye típicamente uno que es suficiente para acoplar o reticular CD16 en la superficie de una célula NK.

45 El término "autólogo" se refiere a las células o tejidos procedentes de los propios tejidos de un individuo. Por ejemplo, en una transferencia autóloga o trasplante de células NK, el donante y el receptor son la misma persona.

50 El término "alogénico" se refiere a células o tejidos que pertenecen o se obtienen de la misma especie pero que son genéticamente diferentes, y que, en algunos casos, son, por tanto, inmunológicamente incompatibles. Habitualmente, el término "alogénico" se utiliza para definir las células que se trasplantan de un donante a un receptor de la misma especie.

55 El término "expresión" se refiere al proceso por el cual un polinucleótido se transcribe a partir de un molde de ADN (tal como en un ARNm u otro transcrito de ARN) y/o el proceso por el cual un ARNm transcrito se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. Los transcritos y los polipéptidos codificados pueden denominarse en conjunto "producto génico". Si el polinucleótido deriva de ADN genómico, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariota.

60 El término "heterólogo" con referencia a una proteína o ácido nucleico se refiere a una proteína o ácido nucleico procedente de una fuente genética diferente. Por ejemplo, una proteína o ácido nucleico heterólogo para una célula procede de un organismo o individuo distinto de la célula en la que se expresa.

65 Como se utilizan en el presente documento, el término "introducir" engloba diversos métodos de introducción de ADN en una célula, ya sea *in vitro* o *in vivo*, tales métodos, incluidos transformación, transducción, transfección (por ejemplo, electroporación) e infección. Los vectores son útiles para introducir en las células moléculas que codifican ADN. Los posibles vectores incluyen vectores plasmídicos y vectores virales. Los vectores virales incluyen vectores retrovirales,

vectores lentivirales u otros vectores tales como vectores adenovirales o vectores adenoasociados.

5 El término "composición" se refiere a cualquier mezcla de dos o más productos, sustancias o compuestos, incluyendo células o anticuerpos. Puede ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos. Por lo general, la preparación tiene una forma tal que permite que la actividad biológica del principio activo (por ejemplo, el anticuerpo) sea eficaz.

10 El término "enriquecido" con referencia a una composición celular se refiere a una composición en la que hay un aumento en el número o porcentaje del tipo de célula o población en comparación con el número o porcentaje del tipo de célula en una composición de partida del mismo volumen, tal como una composición de partida directamente obtenida o aislada de un sujeto. El término no requiere la eliminación total de otras células, tipo o poblaciones celulares de la composición y no requiere que las células enriquecidas de este modo estén presentes en o incluso cerca del 100 % en la composición enriquecida.

15 Un "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto del principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante.

20 Como se utilizan en el presente documento, combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más elementos. La combinación puede ser de dos o más elementos separados, tal como dos composiciones o dos colecciones, puede ser una mezcla de los mismos, tal como una sola mezcla de los dos o más elementos, o cualquier variación de los mismos. Los elementos de una combinación están generalmente asociados o relacionados funcionalmente.

25 Como se utilizan en el presente documento, un kit es una combinación envasada que opcionalmente incluye otros elementos, tales como agentes adicionales e instrucciones de uso de la combinación o elementos de la misma, para fines que incluyen, pero sin limitación, usos terapéuticos.

30 Como se utilizan en el presente documento, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen disminuir la tasa de progresión de la enfermedad, mejorar o paliar la patología y la remisión o el pronóstico mejorado. Un individuo es "tratado" con éxito, por ejemplo, si uno o más síntomas asociados con un trastorno (por ejemplo, una enfermedad mediada por eosinófilos) se mitigan o eliminan. Por ejemplo, un individuo es "tratado" con éxito si el tratamiento consigue aumentar la calidad de vida de quienes padecen una enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, reducir la frecuencia de recurrencia de la enfermedad, disminuir la gravedad de la enfermedad, retrasar el desarrollo o la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

40 Una "cantidad eficaz" se refiere al menos a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el efecto deseado o indicado, incluido un resultado terapéutico o profiláctico. Una cantidad eficaz puede proporcionarse en una o más administraciones. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es al menos la dosis mínima de células requerida para lograr una mejora medible de un trastorno particular. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad de una composición que reduce la gravedad, la duración y/o los síntomas asociados con el cáncer, infección vírica, infección microbiana o choque séptico en un animal. Una cantidad terapéuticamente eficaz, en el presente documento, puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz también puede ser aquella en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Generalmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una fase más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

55 Como se utilizan en el presente documento, un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Un "mamífero" a efectos de tratamiento incluye a seres humanos, animales domésticos, de granja y de zoológico, animales destinados al deporte o de compañía, tales como perros, caballos, conejos, ganado vacuno, cerdos, hámsteres, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc. En algunas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

II. MÉTODOS PARA OBTENER Y PREPARAR COMPOSICIONES QUE CONTENGAN SUBCONJUNTOS DE CÉLULAS CITOLÓDICAS NATURALES

60 Se proporcionan métodos para preparar composiciones que contienen o están enriquecidas para células NK CD16 158V+ primarias o células NK CD16 158V+/g-. También se proporcionan composiciones resultantes que contienen o están enriquecidas para subconjuntos De células NK CD16 158V+ primarias o CD16 158V+/g-. En algunas realizaciones, las células primarias proporcionadas se enriquecen a partir de un sujeto, tal como un sujeto mamífero, por ejemplo, un sujeto humano. En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones que contienen o están enriquecidas para células NK CD16 158V+ humanas primarias o células NK CD16 158V+/g-.

En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto sano. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que padece una enfermedad de afecciones, por ejemplo, un cáncer. En algunas realizaciones, las composiciones que contienen o están enriquecidas para células NK CD16 158V+ primarias o células NK CD16 158V+/g- pueden administrarse para terapia celular adoptiva alogénica o autóloga.

5 En algunas realizaciones, los métodos para enriquecer células NK incluyen (a) aislar células NK o un subconjunto de las mismas de un sujeto identificado como poseedor del genotipo de células NK CD16 158V+; y (b) cultivar las células NK aisladas o un subconjunto de las mismas en condiciones para expandir las células, enriqueciendo así las células NK o el subconjunto de las mismas del sujeto. En algunas realizaciones, antes de la etapa (a), el método incluye el
10 cribado de los sujetos para detectar la presencia del genotipo de células NK CD16 158V+.

En algunas realizaciones, los sujetos son examinados para detectar CD16 158V+, es decir, se examinó la presencia del polimorfismo V158F en CD16 (SNP rs396991). En algunas realizaciones, el ADN genómico se extrae de una muestra biológica del sujeto, tal como una muestra de sangre o de médula ósea. En algunas realizaciones, la muestra
15 es o comprende células sanguíneas, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de un sujeto donante sano. Puede emplearse cualquier método para extraer ADN de la muestra. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse fácilmente de una muestra, por ejemplo, células, utilizando técnicas estándar tales como extracción con tiocianato de guanidinio y fenol-cloroformo (Chomocyznski *et al.* (1987) *Anal. Biochem.* 162: 156). También existen kits comerciales disponibles para la extracción de ADN genómico,
20 tal como el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, Madison, WI).

El genotipado puede realizarse en cualquier muestra adecuada. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, puede ser la reacción de genotipado, por ejemplo, una reacción de pirosecuenciación, reacción de secuenciación del ADN, MassARRAY MALDI-TOF, RFLP, PCR específica de alelo, discriminación alélica en
25 tiempo real, o micromatriz. En algunas realizaciones, una técnica basada en PCR, tales como RT-PCR, del ADN genómico se lleva a cabo utilizando cebadores específicos del alelo para el polimorfismo. El método de PCR para amplificar secuencias de ácido nucleico diana en una muestra es bien conocido en la técnica y se ha descrito en, por ejemplo, Innis *et al.* (eds.) *PCR Protocols* (Academic Press, NY 1990); Taylor (1991) *Polymerase chain reaction: basic principles and automation*, en PCR: A Practical Approach, McPherson *et al.* (eds.) IRL Press, Oxford; Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324: 163; así como en las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.889.818, todas ellas
30 incorporadas por referencia en su totalidad en el presente documento.

Los cebadores para detectar el polimorfismo 158V+ son conocidos o pueden ser diseñados fácilmente por un experto, Véase, por ejemplo, la solicitud PCT publicada internacional N.º WO2012/061814; Kim *et al.* (2006) *Blood*, 108:2720-2725; Cartron *et al.* (2002) *Blood*, 99:754-758; Koene *et al.* (1997) *Blood*, 90:1109-1114). En algunas realizaciones, la PCR puede llevarse a cabo utilizando cebadores anidados seguidos de una digestión con enzimas de restricción específicas del alelo. En algunas realizaciones, los primeros cebadores de PCR comprenden las secuencias de ácido nucleico 5' -ATA TTT ACA GAA TGG CAC AGG -3' (SEQ ID NO:1) y 5'-GAC TTG GTA CCC AGG TTG AA-3' (SEQ ID NO:2), mientras que los segundos cebadores de PCR son 5'-ATC AGA TTC GAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT-3' (SEQ ID NO:3) y 5'-ACG TGC TGA GCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC-3' (SEQ ID NO:4), que, en algunos casos, genera un fragmento de 94 pb según la naturaleza del alelo. En algunas realizaciones, el par de cebadores comprende las secuencias de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO:5 (CCCAACTCAA CTTCCCAGTG TGAT) y la SEQ ID NO:6 (GAAATCTACC TTTTCTCTA ATAGGGCAAT). En algunas realizaciones, el par de cebadores comprende las secuencias de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO:5 (CCCAACTCAA CTTCCCAGTG TGAT) y la SEQ ID NO:7 (GAAATCTACC TTTTCTCTA ATAGGGCAA). En algunas realizaciones, el par de cebadores comprende las secuencias de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NO:5 (CCCAACTCAA CTTCCCAGTG TGAT) y la SEQ ID NO:8 (GAAATCTACC TTTTCTCTA ATAGGGCA).

La secuencia genómica de CD16a está disponible en la base de datos NCBI en NG_009066.1. La identificación del gen para CD16A es 2214. La información sobre la secuencia de CD16, incluidos los polimorfismos genéticos, está disponible en UniProt Acc. P08637. La secuencia de CD16 (F158) se expone en la SEQ ID NO:9 (el resto F158 está en negrita y subrayado). En algunas realizaciones, CD16 (F158) comprende además un péptido señal expuesto como MWQLLLPTALLLLVSA (SEQ ID NO:10).

GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCGAYSPEDNSTQWFHINESLISSQASSYFIDA
ATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQAPRWVFKKEDPIHLRCHSWKNTALHKV
TYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSYFCRGLFGSKNVSSETVNIITITQGLAVSTHSSFF
PPGYQVSI~~CLVMVLLFAVDTGLYF~~SVKTNIRSSSTRDWKDKHFKWRKDPQDK (SEQ ID
55 NO:9)

La secuencia de CD16 158V+ (polimorfismo que resulta en F158V) se conoce como VAR_003960 y tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:11 (el polimorfismo 158V+ está en negrita y subrayado). En algunas realizaciones, CD16 (158V+) comprende además un péptido señal expuesto como MWQLLLPTALLLLVSA (SEQ ID NO: 10).

GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCGAYSPEPNSTQWFHNESLISSQASSYFI
 DAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRWVFKKEDPIHLRCHSWKNTA
 LHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSSGSYFCRGLVGSKNVSSSETVNITITQGLA
 VSTISSFFPPGYQVSHCLVMVLLFAVDTGLYFSVKTNIRSSTRDWKDHKFKWRKDPQDK
 (SEQ ID NO:11)

5 En algunas realizaciones, las células proporcionadas incluyen o están enriquecidas para células NK CD16 158V+ que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:11 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:11 y que contiene el polimorfismo 158V+. En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ muestran una mayor afinidad de unión a Fc, tal como la región Fc de IgG, y/o se asocia con una mayor destrucción de células tumorales en comparación con las células NK que expresan CD16 (F158) expuestas en la SEQ ID NO:9. En algunas realizaciones, el aumento es superior a 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o más.

15 En algunas realizaciones, el análisis del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) se emplea en muestras de ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico utilizando sondas específicas de alelo que contienen un marcador de colorante fluorescente (por ejemplo, FAM o VIC) en el extremo 5' y un agente de unión al surco menor (MGB) y un inactivador no fluorescente (NFQ) en el extremo 3' y un cebador de PCR no marcado para detectar una diana de SNP específica. En algunas realizaciones, el ensayo mide o detecta la presencia de un SNP mediante un cambio en la fluorescencia de los colorantes asociados a la sonda. En dichas realizaciones, las sondas se hibridan con el ADN diana entre los
 20 dos cebadores no marcados y la señal del colorante fluorescente en el extremo 5' es inactivada por el NFQ en su extremo 3' mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Durante la PCR, la Taq polimerasa extiende los cebadores no marcados utilizando el molde como guía y cuando la polimerasa alcanza la sonda marcada, escinde la molécula que separa el colorante del inactivador. En algunos aspectos, un instrumento de qPCR puede detectar la fluorescencia del marcador no inactivado. Un ejemplo de ello son los ensayos SNP disponibles
 25 en el mercado, por ejemplo, código C_25815666_10 para rs396991 (Applied Biosystems, n.º de cat. 4351379 para genotipado SNP de V158F en CD16).

30 En algunas realizaciones, se identifican sujetos heterocigotos u homocigotos para el polimorfismo CD16 158V+ (V158F). En algunas realizaciones, se identifican sujetos homocigotos para el polimorfismo CD16 158V+ (V158F). En algunas realizaciones, se aíslan células NK o un subconjunto de células NK de sujetos identificados como heterocigotos u homocigotos para el polimorfismo CD16 158 V+. En algunas realizaciones, se aíslan células NK o un subconjunto de células NK de sujetos identificados como homocigotos para el polimorfismo CD16 158 V+. Los métodos para aislar células NK son bien conocidos por un experto en la técnica.

35 En algunas realizaciones, las células citolíticas naturales se aíslan primero y se clasifican después mediante los procedimientos disponibles. Por ejemplo, se puede obtener una población de linfocitos o de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células citolíticas naturales que expresan uno o más marcadores específicos de células citolíticas naturales, tal como se ha descrito anteriormente, se aíslan de la población celular. Está al alcance de un experto en la técnica elegir marcadores particulares o combinaciones de marcadores de superficie. En algunas
 40 realizaciones, el marcador o marcadores de superficie son uno o varios de los siguientes antígenos de superficie CD11a, CD3, CD7, CD14, CD16, CD19, CD25, CD27, CD56, CD57, CD161, CD226, NKB1, CD62L; CD244, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2A, NKG2C, KIR2DL1 y/o KIR2DL3. Los reactivos, incluidos los anticuerpos conjugados con fluorocromos, para detectar dichos antígenos de superficie son bien conocidos y están a disposición de un experto en la técnica.

45 En algunas realizaciones, las células no NK se excluyen en función de la expresión en superficie positiva de CD19 y/o CD14.

50 En algunas realizaciones, las células NK se aíslan como aquellas presentes en una subpoblación denominada población CD3-CD56^{dim}. En algunas realizaciones, las células NK aisladas están presentes en la subpoblación denominada CD3-CD56^{dim}CD14-CD19⁻.

55 En algunas realizaciones, se aísla o enriquece un subconjunto de células g-NK del sujeto. En algunas realizaciones, las células g-NK se aíslan o se enriquecen a partir de sujetos identificados como portadores del polimorfismo CD16 158V+, por ejemplo, sujetos identificados como heterocigotos u homocigotos para el polimorfismo. En algunas realizaciones, se proporciona un método para identificar células g-NK de un sujeto portador del polimorfismo CD16 158V+, por ejemplo, sujetos identificados como heterocigotos u homocigotos para el polimorfismo, que comprende: identificar un subconjunto de células citolíticas naturales en una población de linfocitos del sujeto que no expresan FcRγ sustancial para identificar así células g-NK. En una realización, se obtienen o aíslan linfocitos del sujeto. En

algunas realizaciones, se identifican las células que no expresan FcR γ sustancial pero sí al menos un marcador de células citolíticas naturales.

- 5 Una secuencia de aminoácidos para la cadena FcR γ (*Homo sapiens*, también denominada receptor Fc I de inmunoglobulina gamma de alta afinidad) está disponible en la base de datos NCBI como número de acceso NP_004097.1 (GI:4758344), y se reproduce a continuación como la SEQ ID NO:12.

MIPAVVLLLLLLVEQAAALGEPQLCYILDAILFLYGIVLT LLYCRLKIQVRKAAITSYEK
SDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ (SEQ ID NO:12)

- 10 En algunas realizaciones, el aislamiento o enriquecimiento de las células g-NK se lleva a cabo mediante métodos basados en la inmunoafinidad. En algunas realizaciones, pueden emplearse estrategias positivas y/o negativas para enriquecer las células que son positivas en superficie para uno o más marcadores y/o que son negativas o bajas en superficie para uno o más marcadores, respectivamente. En algunas realizaciones, el aislamiento o enriquecimiento se lleva a cabo mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FAC), recogiendo las células acotadas o
15 positivas para la expresión de superficie de uno o más marcadores particulares (enriquecimiento positivo) y/o excluyendo las células positivas para la expresión de superficie de uno o más marcadores particulares (enriquecimiento negativo). En algunas realizaciones, el aislamiento o enriquecimiento se lleva a cabo poniendo en contacto los linfocitos con una superficie sólida a la que están unidos uno o varios anticuerpos específicos de un marcador y recuperando las células no unidas al anticuerpo (enriquecimiento negativo) o recuperando las células
20 unidas al anticuerpo (enriquecimiento positivo).

- En algunos aspectos, las células g-NK se identifican por la presencia, ausencia o nivel de expresión en superficie de uno o más marcadores diversos que distinguen a las células NK de otros linfocitos o células inmunitarias y que distinguen a las células g-NK de las células NK convencionales. En algunas realizaciones, las células g-NK pueden aislarse como se describe en la solicitud de patente N.º US2013/0295044 o Zhang *et al.* (2013) J. Immunol., 190:1402-1406.
25

- En algunas realizaciones, una célula (por ejemplo, subconjunto de células NK) es positiva para un marcador concreto si hay presencia detectable sobre o en la célula de un marcador concreto, normalmente un marcador de superficie. En las realizaciones, la expresión en superficie puede determinarse mediante citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se una específicamente al marcador y detección de la unión del anticuerpo al marcador, en donde la expresión en superficie es positiva si la tinción es detectable a un nivel sustancialmente superior a la tinción detectada llevando a cabo los mismos procedimientos con un control de isotipo similar en condiciones por lo demás idénticas y/o a un nivel sustancialmente similar a, o en algunos casos superior a, una célula que se sabe que es positiva para el marcador y/o a un nivel superior al de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.
30
35

- En algunas realizaciones, una célula (por ejemplo, subconjunto de células NK) es negativa para un marcador particular si hay una ausencia de presencia detectable sobre o en la célula de un marcador particular, normalmente un marcador de superficie. En las realizaciones, la expresión en superficie puede determinarse mediante citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se una específicamente al marcador y detección de la unión del anticuerpo al marcador, en donde la expresión en superficie es negativa si la tinción no es detectable a un nivel sustancialmente por encima de la tinción detectada llevando a cabo los mismos procedimientos con un control de isotipo emparejado en condiciones idénticas por lo demás y/o a un nivel sustancialmente menor que el de una célula que se sabe que es positiva para el marcador y/o a un nivel sustancialmente similar en comparación con el de una célula que se sabe que es negativa para el marcador.
40
45

- En algunas realizaciones, una célula (por ejemplo, subconjunto de células NK) es baja para un marcador particular si hay un nivel más bajo de presencia detectable sobre o en la célula de un marcador particular, normalmente un marcador de superficie, en comparación con una célula que se sabe que es positiva para el marcador. En las realizaciones, la expresión en superficie puede determinarse mediante citometría de flujo, por ejemplo, mediante tinción con un anticuerpo que se una específicamente al marcador y detección de la unión del anticuerpo al marcador, en donde la expresión superficial es baja si la tinción es a un nivel inferior al de una célula que se sabe que es positiva para el marcador.
50

- 55 En algunas realizaciones, una célula NK que se sabe que es positiva para un marcador de superficie puede ser una célula NK convencional y/o un subconjunto de células NK que representen la mayoría de las células NK presentes en un sujeto o que representen la mayoría de las células NK presentes de media en una población de sujetos.

- 60 En algunas realizaciones, el subconjunto de células g-NK puede detectarse observando si una población de células NK o una subpoblación de células NK expresa FcR γ . Las células NK que no expresan FcR γ son células g-NK. En algunas realizaciones, puede ser útil detectar la expresión de cualquiera de los otros marcadores de células NK mencionados anteriormente como identificador positivo de que la célula es una célula citolítica natural, confirmando al mismo tiempo que la célula no expresa FcR γ . La expresión de un marcador de superficie de células citolíticas naturales que se correlaciona con la expresión de FcR γ (o su ausencia) puede detectarse mediante cualquier procedimiento

disponible que no lesione las células. Por ejemplo, las células g-NK se pueden detectar, identificar y/o aislar por citometría de flujo mediante el uso de dicho marcador de superficie celular que se correlaciona con la expresión de FcRγ.

- 5 Las proteínas CD3ζ y/o FcRγ son proteínas intracelulares que no se detectan fácilmente a menos que las células se traten para permitir la detección de proteínas intracelulares, por ejemplo, mediante fijación y permeabilización. Aunque dicho tratamiento puede utilizarse para confirmar la identidad de una población de células sustancialmente pura, en muchos casos pueden emplearse marcadores de la superficie celular que pueden detectarse sin lesionar las células al identificar y aislar las células g-NK. En algunas realizaciones, las células g-NK pueden identificarse basándose en la expresión en superficie positiva de un KIR (receptores similares a inmunoglobulinas en células citolíticas) y/o basándose en la expresión superficial baja o negativa de los receptores de citotoxicidad natural (NCR).

15 En algunas realizaciones, las células g-NK son positivas para la expresión en superficie de un KIR (por ejemplo, KIR2DL1, KIR2DL2/3 y/o KIR3DL1) y pueden utilizarse para identificar y aislar células g-NK, tales como por métodos de selección positiva. En algunas realizaciones, las células g-NK son positivas en superficie para uno o más de KIR2DL1, KIR2DL2/3 y KIR3DL1.

20 En algunas realizaciones, NCR (por ejemplo, Nkp30 y/o Nkp46), que normalmente se expresan en las células NK, no se expresan o se expresan a niveles bajos en las células g-NK y pueden utilizarse para identificar y aislar las células g-NK, tales como, por ejemplo, mediante métodos de selección negativa. En algunas realizaciones, las células g-NK son negativas o bajas en la superficie para Nkp30 y/o Nkp46. En algunas realizaciones, las células g-NK son positivas en superficie para NKG2C. En algunas realizaciones, las células g-NK expresan CD57 alto y NKG2A bajo.

25 Pueden utilizarse anticuerpos y otras entidades de unión para detectar los niveles de expresión de proteínas marcadoras (por ejemplo, KIR y/o NCR), y aislar las células g-NK. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para las células que expresan FcRγ (por ejemplo, anticuerpos específicos para un marcador de la superficie celular tal como NCR que se correlaciona con la expresión de FcRγ) pueden unirse a un sustrato sólido, las células citolíticas naturales pueden ponerse en contacto con el anticuerpo-sustrato, y se recogen las células que no se unen a los anticuerpos. También pueden emplearse otros métodos conocidos por los expertos en la materia. Los anticuerpos adecuados pueden ser policlonales, monoclonales, fragmentos (tales como fragmentos Fab), anticuerpos de cadena simple y otras formas de moléculas de unión específica.

35 En algunas realizaciones, las células citolíticas naturales pueden identificarse basándose en la expresión en superficie de marcadores típicos de las células citolíticas naturales humanas, tales como KIR, NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, CD56 y CD161. En algunas realizaciones, se identifica un subconjunto de células citolíticas naturales en una población de linfocitos que comprende el contacto de una muestra de linfocitos con un anticuerpo que se une a un antígeno específico de células citolíticas naturales. En una realización, el marcador de las células citolíticas naturales es CD16, KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1, NKp30, NKp46 o una combinación de los mismos. Las células NK, incluyendo células g-NK, pueden aislarse basándose en la expresión en superficie positiva o negativa/baja de cualquiera de los marcadores anteriores. En un método, el método implica aislar una población sustancialmente pura de células citolíticas naturales, tal como en función de la expresión en superficie de KIR, NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, CD16, CD56 y/o CD161.

45 En algunas realizaciones, las células g-NK se identifican como aquellas que no expresan o tienen una baja expresión en superficie de la proteína NCR. En algunas realizaciones, el NCR es Nkp30 y/o Nkp46. Por ejemplo, la población de células que contienen células citolíticas naturales puede clasificarse por citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico para la proteína NCR (por ejemplo, Nkp30 y/o Nkp46). Las células que están marcadas con los anticuerpos anti-NCR son descartadas y las células que no se han marcado por los anticuerpos anti-NCR son retenidas como células que son o están enriquecidas para células que contienen células g-NK. De manera alternativa, la población de células que contiene células citolíticas naturales puede ponerse en contacto con un sustrato sólido al que están unidos anticuerpos anti-NCR. Las células que no se unen son o están enriquecidas para células g-NK. En otra realización, la población de células que contiene células citolíticas naturales puede ponerse en contacto con perlas magnéticas a las que están unidos anticuerpos anti-NCR, tras la incubación, las perlas magnéticas se retiran de la población celular, dejando las células que son o están enriquecidas para células g-NK como una población sustancialmente pura de células.

60 En algunas realizaciones, las células g-NK se identifican como aquellas que expresan uno o más KIR. En algunas realizaciones, el KIR es KIR2DL1, KIR2DL2/3 y/o KIR3DL1. Por ejemplo, la población de células que contienen células citolíticas naturales puede clasificarse por citometría de flujo utilizando un anticuerpo específico para la proteína KIR (por ejemplo, KIR2DL1, KIR2DL2/3 y/o KIR3DL1). Las células que están marcadas por los anticuerpos anti-KIR se retienen como un subconjunto de células NK que son o están enriquecidas para células g-NK y las células que no están marcadas por los anticuerpos anti-KIR se descartan. De manera alternativa, la población de células que contiene células citolíticas naturales puede ponerse en contacto con un sustrato sólido al que están unidos anticuerpos anti-KIR. Las células que se unen son o están enriquecidas para células g-NK. En otra realización, la población de células que contienen células citolíticas naturales puede ponerse en contacto con perlas magnéticas a las que se unen los anticuerpos anti-KIR, tras la incubación se recuperan las perlas magnéticas, aislando u obteniendo de la población

celular células que son o están enriquecidas para células g-NK.

En algunas realizaciones, se identifican células g-NK que son positivas en superficie para CD16 y un KIR (por ejemplo, KIR2DL1, KIR2DL2/3 y/o KIR3DL1) y/o que son negativas en superficie o bajas para un NCR (por ejemplo, NKp30 y/o NKp46), por ejemplo, CD16⁺, KIR⁺, y NCR^{-/lo} (por ejemplo, NKp30^{-/lo} y/o NKp46^{-/lo}). En algunas realizaciones, las células g-NK también presentan un fenotipo de superficie que es CD3⁺CD56^{dim}CD14⁻CD19⁻.

En algunas realizaciones, tras el aislamiento o enriquecimiento, células enriquecidas para células NK CD16 158V⁺ o células NK CD16 158V⁺/g se cultivan en un medio de cultivo celular, tal como para expandir las células aisladas o enriquecidas. En algunos casos, puede ser necesario o deseable cultivar las células NK para expandirlas antes de formularlas como una composición para su administración. En algunas de las realizaciones, los métodos para producir una composición que comprende células NK manipuladas comprenden cultivar o incubar las células NK aisladas o enriquecidas para células NK CD16 158V⁺ o células NK CD16 158V⁺/g, tal como para expandir las células hasta una cantidad terapéuticamente eficaz antes de administrar las células NK a un individuo que las necesite.

Se conocen métodos adecuados para cultivar y expandir las células NK. Por ejemplo, las células NK pueden cultivarse utilizando células alimentadoras, o en presencia de citocinas para potenciar su crecimiento y/o activación. Como se usa en el presente documento, "cultivar" incluye proporcionar las condiciones químicas y físicas (p. ej., temperatura, gas) que son necesarias para el mantenimiento de linfocitos NK y factores de crecimiento. En una realización, cultivar los linfocitos NK incluye proporcionar a los linfocitos NK condiciones para la proliferación. Los ejemplos de condiciones químicas que pueden favorecer la proliferación de linfocitos NK incluyen, pero sin limitación, tampones, nutrientes, suero, vitaminas y antibióticos, así como citocinas y otros factores de crecimiento que se proporcionan normalmente en el medio de crecimiento (es decir, cultivo). En una realización, el medio de cultivo de NK incluye MEM α que comprende 10 % de FCS o CellGro SCGM (Cell Genix) que comprende suero humano al 5 %/reemplazo de FBS LiferCell® (Lifeblood Products). Otros medios adecuados para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, el medio de Glasgow (Gibco Carlsbad CA), medio RPMI (Sigma-Aldrich, St Louis MO) o DMEM (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). Se observará que muchos de los medios de cultivo contienen nicotinamida como complemento vitamínico, por ejemplo, MEM α (nicotinamida 8,19 μ M), RPMI (nicotinamida 8,19 μ M), DMEM (nicotinamida 32,78 μ M) y medio de Glasgow (nicotinamida 16,39 μ M).

En algunas realizaciones, tal como para aplicaciones en las que se introducen (o reintroducen) células en un sujeto humano, el cultivo se lleva a cabo utilizando fórmulas sin suero, tales como medio sin suero AIM VTM para cultivo de linfocitos o medio de médula ósea MARROWMAXTM. Dichas formulaciones y complementos de medios están disponibles en fuentes comerciales tales como Invitrogen (GIBCO) (Carlsbad, Calif.). Los cultivos se pueden complementar con aminoácidos, antibióticos y/o con citocinas para promover una viabilidad, proliferación, funcionalidad y/o supervivencia óptimas.

En algunas realizaciones, el cultivo de la población de células que comprende las células NK modificadas se efectúa sin una capa alimentadora ni células alimentadoras. En algunas de estas realizaciones, las células NK modificadas pueden cultivarse con un factor de crecimiento. Según algunas realizaciones, el al menos un factor de crecimiento comprende un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en SCF, FLT3, IL-2, IL-7, IL-15, IL-12 y IL-21. Según algunas realizaciones, el al menos un factor de crecimiento es IL-2 o IL-7 e IL-15. Según algunas realizaciones, el al menos un factor de crecimiento es únicamente IL-2. En algunas realizaciones, las células se cultivan durante de 3 días a 30 días, tal como durante de 7 a 28 días, por ejemplo, durante al menos o aproximadamente 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o más días.

En algunas realizaciones, IL-12, IL-15, IL-18, IL-2 y/o CCL5 se administran a un sujeto antes de aislar o enriquecer las células NK CD16 158V⁺ o las células NK CD16 158V⁺/g.

En algunas realizaciones, las células pueden aislarse de un sujeto elegido para expresar un alelo HLA de una restricción MHC (HLA) deseada. En algunas realizaciones, puede realizarse la tipificación HLA de las células antes o después del aislamiento o enriquecimiento. En algunas realizaciones, la tipificación HLA de las células, incluidas las células primarias obtenidas de un sujeto, puede determinarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tal como la tipificación de tejidos mediante ensayos moleculares de haplotipos (BioTest ABC SSPtray, BioTest Diagnostics Corp, Denville, NJ; SeCore Kits, Life Technologies, Grand Island, NY). En algunos casos, está al alcance de un experto en la técnica realizar una tipificación estándar de las células para determinar el genotipo HLA, tal como mediante la tipificación basada en secuencias (SBT) (Adams *et al.*, (2004) J. Transl. Med., 2:30; Smith (2012) Methods Mol Biol., 882:67-86).

III. COMPOSICIONES Y KITS

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden las células enriquecidas para células NK CD16 158V⁺ o células NK CD16 158V⁺/g-. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente el 5-99 % de células NK CD16 158V⁺ o células NK CD16 158V⁺/g-, o cualquier porcentaje de células NK CD16 158V⁺ o células NK CD16 158V⁺/g- comprendido entre el 5 y el 99 %, ambos incluidos. En algunas realizaciones, la composición puede incluir un porcentaje aumentado o mayor de células NK CD16 158V⁺ o células NK CD16 158V⁺/g-

en relación con el total de células NK o células totales en comparación con el porcentaje de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- en relación con el total de células NK o células totales presentes de forma natural en el sujeto del que se aislaron las células. En algunas realizaciones, el porcentaje aumenta al menos o al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces o más.

En algunas realizaciones, la composición puede incluir el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 81 %, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 % o sustancialmente el 100 % de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-. En algunas realizaciones, la composición comprende más del 50 % de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-. En otra realización, la composición comprende más del 70 % de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-. En otra realización, la composición comprende más del 80 % de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas incluyen aquellas en las que las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- constituyen al menos o aproximadamente el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o más de las células de la composición o de las células NK de la composición.

Entre las composiciones se encuentran composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración, tal como para la terapia celular adoptiva. En algunas realizaciones, las células manipuladas genéticamente se formulan con un transportador farmacéuticamente aceptable.

Un transportador farmacéuticamente aceptable puede incluir todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica (Gennaro, 2000, Remington: The science and practice of pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Los ejemplos de tales transportadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y seroalbúmina humana al 5 %. También pueden utilizarse liposomas y vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones. El transportador farmacéutico debe ser uno que sea adecuado para los linfocitos NK, tal como una solución salina, una solución de dextrosa o una solución que comprende seroalbúmina humana.

En algunas realizaciones, el transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable para dichas células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- es cualquier solución acuosa no tóxica en la que las células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- pueden mantenerse o permanecer viables, durante un tiempo suficiente para permitir la administración de células NK CD16 158V+ vivas o células NK CD16 158V+/g- vivas. Por ejemplo, el transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una solución salina o una solución salina tamponada. El transportador o vehículo farmacéuticamente aceptable también puede incluir diversos biomateriales que pueden aumentar la eficacia de las células NK CD16 158V+ o de las células NK CD16 158V+/g-. Los vehículos y transportadores celulares pueden, por ejemplo, incluir polisacáridos tales como metilcelulosa (M. C. Tate, D. A. Shear, S. W. Hoffman, D. G. Stein, M. C. LaPlaca, *Biomaterials* 22, 1113, 2001, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), quitosano (Suh J K F, Matthew H W T. *Biomaterials*, 21, 2589, 2000; Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford D S, *et al.*, *J Biomed Mater Res*, 51, 586, 2000, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), copolímero de N-isopropilacrilamida P(NIPAM-co-AA) (Y. H. Bae, B. Vernon, C. K. Han, S. W. Kim, *J. Control. Release* 53, 249, 1998; H. Gappa, J. J. Koh, S. W. Kim, Y. H. Bae, *Tissue Eng.* 7, 35, 2001, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), así como poli(oxietileno)/poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (B. Jeong, K. M. Lee, A. Gutowska, Y. H. An, *Biomacromolecules* 3, 865, 2002, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), P(PF-co-EG) (Suggs L J, Mikos A G. *Cell Trans*, 8, 345, 1999, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), PEO/PEG (Mann B K, Gobin A S, Tsai A T, Schmedlen R H, West J L., *Biomaterials*, 22, 3045, 2001; Bryant S J, Anseth K S. *Biomaterials*, 22, 619, 2001, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), PVA (Chih-Ta Lee, Po-Han Kung and Yu-Der Lee, *Carbohydrate Polymers*, 61, 348, 2005, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), colágeno (Lee C R, Grodzinsky A J, Spector M., *Biomaterials* 22, 3145, 2001, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad), alginato (Bouhadir K H, Lee K Y, Alsberg E, Damm K L, Anderson K W, Mooney D J. *Biotech Prog* 17, 945, 2001; Smidsrd O, Skjak-Braek G., *Trends Biotech*, 8, 71, 1990, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- pueden estar presentes en la composición en una cantidad eficaz. Una cantidad eficaz de células NK CD16 158V+ activadas o células NK CD16 158V+/g- puede variar en función del paciente, así como del tipo, gravedad y extensión de la enfermedad. Por lo tanto, un médico puede determinar cuál es una cantidad eficaz después de considerar la salud del sujeto, la extensión y gravedad de la enfermedad y otras variables.

En determinadas realizaciones, el número de células de la composición proporciona las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- en una cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la cantidad es una cantidad que reduce la gravedad, la duración y/o los síntomas asociados con el cáncer, infección vírica, infección microbiana o choque séptico en un animal. En otras realizaciones determinadas, una cantidad terapéuticamente eficaz

- es una dosis de células que da como resultado una reducción del crecimiento o la propagación del cáncer en al menos el 2,5 %, al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 25 %, al menos el 35 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 85 %, en al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 99 % en un paciente o un animal al que se le ha administrado una composición descrita en el presente documento con respecto al crecimiento o propagación del cáncer en un paciente (o un animal) o un grupo de pacientes (o animales) a los que no se les ha administrado la composición. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz para la citotoxicidad se define como una cantidad de células NK capaz de inhibir o reducir el crecimiento del cáncer, las células virales y microbianas.
- 10 En algunas realizaciones, la composición comprende una dosis de una composición enriquecida para o que contiene células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- que es desde o de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{12} células o de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células o de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células o de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células o de aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células. En algunas realizaciones, la composición comprende más de o más de aproximadamente 10^5 , aproximadamente 10^6 , aproximadamente 10^7 , aproximadamente 10^8 , about 10^9 , about 10^{10} , aproximadamente 10^{11} o aproximadamente 10^{12} células. En algunas realizaciones, tal cantidad puede administrarse a un paciente con cáncer.
- 20 En algunas realizaciones, el volumen de la composición es al menos o al menos aproximadamente 10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml o 500 ml, tal como de o de aproximadamente 10 ml a 500 ml, de 10 ml a 200 ml, de 10 ml a 100 ml, de 10 ml a 50 ml, de 50 ml a 500 ml, de 50 ml a 200 ml, de 50 ml a 100 ml, de 100 ml a 500 ml, de 100 ml a 200 ml o de 200 ml a 500 ml, cada uno inclusive. En algunas realizaciones, la composición tiene una densidad celular de al menos o al menos aproximadamente 1×10^5 células/ml, 5×10^5 células/ml, 1×10^6 células/ml, 5×10^6 células/ml, 1×10^7 células/ml, 5×10^7 células/ml o 1×10^8 células/ml. En alguna realización, la densidad celular de la composición está entre o entre aproximadamente 1×10^5 células/ml y 1×10^8 células/ml, entre 1×10^5 células/ml y 1×10^7 células/ml, entre 1×10^5 células/ml y 1×10^6 células/ml, entre 1×10^6 células/ml y 1×10^7 células/ml, entre 1×10^6 células/ml y 1×10^8 células/ml, entre 1×10^6 células/ml y 1×10^7 células/ml o entre 1×10^7 células/ml y 1×10^8 células/ml, cada uno inclusive.
- 30 En algunas realizaciones, la composición, incluyendo composición farmacéutica, es estéril. En algunas realizaciones, el aislamiento o el enriquecimiento de las células se lleva a cabo en un ambiente cerrado o estéril, por ejemplo, para minimizar el error, la manipulación y/o contaminación del usuario. En algunas realizaciones, la esterilidad puede conseguirse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.
- 35 En el presente documento también se proporcionan composiciones que son adecuadas para criopreservar las células NK proporcionadas. En algunas realizaciones, la composición comprende células NK que son o están enriquecidas para células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- y un crioprotector. En algunas realizaciones, el crioprotector es o comprende DMSO y/o glicerol. En algunas realizaciones, las composiciones formuladas para la crioconservación se pueden almacenar a bajas temperaturas, tal como temperaturas ultrabajas, por ejemplo, almacenamiento con temperaturas que varían de -40 °C a 150 °C, tal como o aproximadamente 80 °C \pm $6,0$ °C.
- 40 En algunas realizaciones, las composiciones pueden conservarse a temperatura ultrabaja antes de su administración a un paciente. Las composiciones también pueden conservarse a temperatura ultrabaja tras su aislamiento a partir de un sujeto mamífero y antes de su expansión y/o administración a un sujeto. Por ejemplo, pueden aislarse o enriquecerse células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-, almacenarse a temperatura ultrabaja y, a continuación, procesarse o expandirse hasta su rendimiento antes de ser administrados a un sujeto. De manera alternativa, las células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- pueden aislarse, procesarse o expandirse y luego almacenarse a temperatura ultrabaja antes de su administración a un sujeto.
- 45 Se describe un método típico para la conservación a temperatura ultrabaja a pequeña escala, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 6,0168,991. A pequeña escala, las células pueden conservarse a temperatura ultrabaja mediante suspensión a baja densidad (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 200×10^6 /ml) en seroalbúmina humana (HAS) al 5 % previamente enfriado. Puede añadirse una cantidad equivalente de DMSO al 20 % a la solución DE HAS. Las Alícuotas de la mezcla pueden colocarse en viales y congelarse durante la noche dentro de una cámara de temperatura ultrabaja a aproximadamente -80 °C.
- 50 En algunas realizaciones, las células NK crioconservadas se preparan para la administración mediante descongelación. En algunos casos, las células NK se pueden administrar a un sujeto inmediatamente después de descongelarlas. En dicha realización, la composición está lista para usar sin ningún procesamiento adicional. En otros casos, las células NK se procesan aún más después de la descongelación, tal como mediante resuspensión con un transportador farmacéuticamente aceptable, incubación con un agente activador o estimulante, o se activan, se lavan y se resuspenden en un tampón farmacéuticamente aceptable antes de la administración a un sujeto.
- 55 En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden las composiciones proporcionadas enriquecidas para o que contienen células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-. Por ejemplo, en algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un kit que comprende células NK CD16 158V+ o células NK

CD16 158V+/g- y un agente adicional. En algunas realizaciones, el agente adicional comprende un dominio Fc. En algunas realizaciones, el agente adicional es una proteína de fusión Fc o un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente adicional es un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. En algunas de estas realizaciones, el agente adicional es un anticuerpo de longitud completa. A continuación, se describen anticuerpos ilustrativos.

5

IV. MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para tratar una afección en un individuo, que comprende administrar a un individuo que la necesita una composición que comprende o está enriquecida para células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-, tal como cualquiera de las composiciones descritas.

10

En algunas realizaciones, el método comprende administrar a un individuo una cantidad eficaz de una composición que contiene células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-. En algunas realizaciones, se administran al sujeto desde o de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{12} células o de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células o de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células o de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células o de aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células. En algunas realizaciones, se administran al individuo aproximadamente 10^5 , aproximadamente 10^6 , aproximadamente 10^7 , aproximadamente 10^8 , aproximadamente 10^9 , aproximadamente 10^{10} , aproximadamente 10^{11} o aproximadamente 10^{12} células. En algunas realizaciones, el número de células se refiere al número de células NK CD16 158V+/kg o células NK CD16 158V+/g- en la composición administrada. En algunas realizaciones, se administran al sujeto desde o de aproximadamente 10^6 a 10^{10} células NK CD16 158V+/kg o células NK CD16 158V+/g- /kg.

15

20

En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- se administran a un individuo poco después de su aislamiento. En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- se administran a un individuo en el plazo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 o 28 días desde el aislamiento y la ingeniería.

25

En otras realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- se almacenan o se expanden mediante crecimiento en cultivo antes de su administración, tal como mediante los métodos descritos anteriormente. Por ejemplo, las células NK se pueden almacenar durante más de 6, 12, 18 o 24 meses antes de su administración al individuo.

30

En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- y las composiciones pueden administrarse a un sujeto por cualquier vía conveniente, incluidas las vías parenterales tales como las vías de administración subcutánea, intramuscular, intravenosa y/o epidural.

35

Las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- y las composiciones proporcionadas pueden utilizarse en métodos de tratamiento de un individuo con un tumor o trastornos hiperproliferativos o una infección microbiana tal como una infección vírica, infección por levaduras, infección fúngica, infección por protozoos y/o infección bacteriana. Los métodos divulgados de tratamiento de un sujeto con las células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- y composiciones proporcionadas pueden ser en combinación con un anticuerpo monoclonal terapéutico, tal como un antígeno antitumoral o un anticuerpo anticanceroso, anticuerpo antivírico o anticuerpo antibacteriano. Las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- y las composiciones proporcionadas pueden administrarse para el tratamiento de animales, tales como animales mamíferos, por ejemplo, sujetos humanos.

40

45

En algunos ejemplos, los métodos incluyen el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo, tal como una neoplasia hematológica o un tumor sólido. Ejemplos de tipos de cáncer y trastornos proliferativos que pueden tratarse con las composiciones descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, leucemia (por ejemplo, leucemias mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica), linfomas (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma escamocelular, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, hepatoma, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, displasia e hiperplasia. El tratamiento y/o la prevención del cáncer incluye, pero sin limitación, aliviar uno o más síntomas asociados al cáncer, la inhibición o reducción de la progresión del cáncer, la promoción de la regresión del cáncer y/o la promoción de la respuesta inmunitaria.

50

55

60

En algunos ejemplos, los métodos incluyen el tratamiento de una infección vírica, tal como una infección causada por la presencia de un virus en el organismo. Las infecciones víricas incluyen las infecciones víricas crónicas o persistentes, que son infecciones víricas capaces de infectar a un huésped y reproducirse dentro de sus células durante un periodo de tiempo prolongado, normalmente semanas, meses o años, antes de resultar mortales. Los virus que dan lugar a infecciones crónicas que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, los virus del papiloma humano (VPH), virus del herpes simple y otros virus de herpes, los virus de la hepatitis B y C,

65

así como otros virus de hepatitis, el virus de la inmunodeficiencia humana y el virus del sarampión, todos los cuales pueden producir importantes enfermedades clínicas. La infección prolongada puede conducir finalmente a la inducción de una enfermedad que puede ser, por ejemplo, en el caso del cáncer de hígado por virus de la hepatitis C, letal para el paciente. Otras infecciones víricas crónicas que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen virus de Epstein Barr (VEB), así como otros virus tales como los que pueden estar asociados a tumores.

Entre los ejemplos de infecciones víricas que pueden tratarse o prevenirse con las composiciones y métodos descritos en el presente documento se incluyen, pero sin limitación, infecciones víricas causadas por retrovirus (por ejemplo, virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV) de los tipos I y II, y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)), virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple (VHS) de los tipos I y II, virus de Epstein-Barr y citomegalovirus), arenavirus (por ejemplo, virus de la fiebre de lassa), paramixovirus (por ejemplo, virus morbillivirus, virus respiratorio sincitial humano y neumovirus), adenovirus, bunyavirus (por ejemplo, hantavirus), coronavirus, filovirus (por ejemplo, virus del Ébola), flavivirus (por ejemplo, virus de la hepatitis C (VHC), virus de la fiebre amarilla y virus de la encefalitis japonesa), hepadnavirus (por ejemplo, virus de la hepatitis B (VHB)), ortomiovirus (por ejemplo, el virus de Sendai y los virus de la gripe A, B y C), papovavirus (por ejemplo, papilomavirus), picornavirus (por ejemplo, rinovirus, enterovirus y virus de la hepatitis A), poxvirus, reovirus (por ejemplo, rotavirus), togavirus (por ejemplo, el virus de la rubéola) y rhabdovirus (por ejemplo, el virus de la rabia). El tratamiento y/o prevención de una infección vírica incluye, pero sin limitación, aliviar uno o más síntomas asociados a dicha infección, la inhibición, reducción o supresión de la replicación del virus y/o la potenciación de la respuesta inmunitaria.

En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- y las composiciones proporcionadas se utilizan en un método de tratamiento de una infección por hongos o bacterias. Por ejemplo, las células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- y las composiciones y métodos proporcionados descritos en el presente documento pueden tratar infecciones relacionadas con *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter (Vibrio) fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Edwardsiella tarda*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*, *Treponema apertum*, *Treponema caratenum*, *Borrelia vincentii*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira icterohemorrhagiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Pneumocystis carinii*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma spp.*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia tsutsugumushi*, *Chlamydia spp.*, *Helicobacter pylori* o combinaciones de los mismos.

35 Terapia combinada

En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- proporcionadas muestran una mayor actividad cuando se activan o entran en contacto con anticuerpos o proteínas que contienen Fc. Por ejemplo, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- pueden activarse mediante la reticulación de CD16 mediada por anticuerpos o por células tumorales recubiertas de anticuerpos.

En algunas realizaciones, en el presente documento se proporciona un método para tratar una afección en un individuo que comprende administrar a un sujeto células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- o una composición de las mismas y un anticuerpo. Un experto en la técnica puede seleccionar un anticuerpo monoclonal terapéutico (por ejemplo, anticanceroso) adecuado para administrar al sujeto las células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- y las composiciones proporcionadas descritas en el presente documento, tal como en función de la enfermedad o afección concreta del individuo. Los anticuerpos adecuados pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonal, fragmentos (tales como los fragmentos Fab), anticuerpos de cadena simple y otras formas de moléculas de unión específica.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede incluir además anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos son Ig quiméricas, cadenas o fragmentos de Ig (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de un anticuerpo) que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un dominio Fc.

Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos a partir de una fuente no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización se consigue sustituyendo las CDR o secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; Verhoeyen *et al.*, 1988). Tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (1989) en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de Fc están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos humanos (anticuerpo receptor) en los cuales los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como de ratón, rata o conejo, con la

- especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos no humanos correspondientes sustituyen a los restos del marco Fv del anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o las secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que la mayoría sino todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y la mayoría sino todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.*, 1986; Presta, 1992; Riechmann *et al.*, 1988).
- Los anticuerpos humanos también pueden producirse mediante diversas técnicas, incluidas las bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1991) y la preparación de mA b humanos (Boerner *et al.*, 1991; Reisfeld y Sell, 1985). De forma similar, la introducción de genes de Ig humana en animales transgénicos en los que los genes de anticuerpos endógenos se han inactivado parcial o totalmente puede aprovecharse para sintetizar Ab humanos. Después de la exposición, se observa una producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el montaje y el repertorio de anticuerpos (1997a; 1997b; 1997c; 1997d; 1997; 1997; Fishwild *et al.*, 1996; 1997; 1997; 2001; 1996; 1997; 1997; 1997; Lonberg y Huszar, 1995; Lonberg *et al.*, 1994; Marks *et al.*, 1992; 1997; 1997; 1997).
- Específicamente, las células de la presente invención pueden dirigirse a los tumores mediante la administración de un anticuerpo que reconozca un antígeno asociado al tumor. Un experto en la técnica apreciará que las presentes células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- son adecuadas para su uso con una amplia variedad de anticuerpos que reconocen antígenos asociados a tumores. Ejemplos no limitantes de un antígeno asociado a un tumor incluyen CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD74, CD140, EpCAM, CEA, gpA33, mesotelina, α -fetoproteína, mucina, PDGFR-alfa, TAG-72, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, receptor quinasa del factor de dispersión, un gangliósido, citoqueratina, receptores de Frizzled, VEGF, VEGFR, integrina α V β 3, integrina α 5 β 1, EGFR, EGFL7, ERBB2(HER2), ERBB3, fibronectina, HGF, HER3, LOXL2, MET, IGF1R, IGLF2, EPHA3, FR-alfa, fosfatidilserina, Syndecan 1, SLAMF7(CD319), TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, vimentina o tenascina. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20, un anticuerpo anti-HER2, un anticuerpo anti-CD52, un anticuerpo anti-EGFR y un anticuerpo anti-CD38. Entre los anticuerpos ilustrativos se incluyen rituximab, trastuzumab, aletuzumab, certuximab, daratumumab, veltuzumab, ofatumumab, ublituximab, ocaratuzumab. Pueden elegirse anticuerpos específicos para un tipo de cáncer seleccionado, e incluir cualquier anticuerpo aprobado para el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos son el trastuzumab (Herceptin) para el cáncer de mama, rituximab (Rituxan) para el linfoma y cetuximab (Erbix) para el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Un experto en la técnica está familiarizado con los anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA capaces de unirse a antígenos tumorales o de enfermedades concretas, cualquiera de los cuales puede utilizarse de acuerdo con los métodos proporcionados para tratar el tumor o la enfermedad.
- Las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- y el agente adicional pueden administrarse secuencial o simultáneamente. En algunas realizaciones, el agente adicional puede administrarse antes de la administración de las células NK CD16 158V+ o de las células NK CD16 158V+/g-. En algunas realizaciones, el agente adicional puede administrarse después de la administración de las células NK CD16 158V+ o de las células NK CD16 158V+/g-. Por ejemplo, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- pueden administrarse simultáneamente con anticuerpos específicos para un tipo de cáncer seleccionado. De manera alternativa, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- pueden administrarse en momentos seleccionados que son distintos de los momentos en los que se administran anticuerpos específicos para un tipo de cáncer seleccionado.
- En ejemplos particulares, se administra al sujeto una dosis eficaz de un anticuerpo antes, después o sustancialmente simultáneamente con la población de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g-. En algunos ejemplos, se administra al sujeto aproximadamente de 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del anticuerpo (por ejemplo, aproximadamente 0,5-10 mg/kg), aproximadamente 1-20 mg/kg, aproximadamente 10-50 mg/kg, aproximadamente 20-100 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 24 mg/kg, aproximadamente 36 mg/kg, aproximadamente 48 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg). Un clínico experto puede seleccionar una cantidad eficaz del anticuerpo, teniendo en cuenta el anticuerpo concreto, la enfermedad o afecciones concretas (por ejemplo, tumor u otro trastorno), el estado general del sujeto, cualquier tratamiento adicional que el sujeto esté recibiendo o haya recibido previamente, y otros factores relevantes. También se administra al sujeto una población de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- descritas en el presente documento. Tanto el anticuerpo como la población de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- se administran normalmente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa; no obstante, también puede utilizarse la inyección o infusión en un tumor o cerca de un tumor (administración local) o la administración en la cavidad peritoneal. Un experto en la técnica puede determinar las vías de administración apropiadas.
- Las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- también pueden administrarse simultánea o secuencialmente con agentes antimicrobianos, antivirales y otros agentes terapéuticos. En algunas realizaciones

proporcionadas en el presente documento, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- pueden administrarse a un individuo en combinación con citocinas y/o factores de crecimiento. Según algunas realizaciones, el al menos un factor de crecimiento comprende un factor de crecimiento seleccionado del grupo que consiste en SCF, FLT3, IL-2, IL-7, IL-15, IL-12 y IL-21. En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- y las citocinas o factores de crecimiento se administran secuencialmente. Por ejemplo, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g- pueden administrarse en primer lugar, seguido de la administración de citocinas y/o factores de crecimiento. En algunas realizaciones, las células NK CD16 158V+ o las células NK CD16 158V+/g se administran simultáneamente con las citocinas o los factores de crecimiento.

En algunas realizaciones, se administra al sujeto una o más citocinas (tales como IL-2, IL-15, IL-21, y/o IL-12) para favorecer la supervivencia y/o el crecimiento de las células NK. La(s) citocina(s) puede(n) administrarse antes, después o sustancialmente al mismo tiempo que las células NK. En algunos ejemplos, la(s) citocina(s) puede(n) administrarse después de las células NK. En un ejemplo específico, la(s) citocina(s) se administra(n) al sujeto en un plazo de entre 1 y 8 horas (tal como en un plazo de entre 1 y 4 horas), aproximadamente 2-6 horas, aproximadamente 4-6 horas o aproximadamente 5-8 horas) desde la administración de las células NK.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados también pueden incluir la administración de células NK CD16 158V+ o células NK CD16 158V+/g- a un individuo en combinación con un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico puede comprender ciclofosfamida, fludarabina, metil prednisona. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en: talidomida, cisplatino (cis-DDP), oxaliplatino, carboplatino, antracenedionas, mitoxantrona; hidroxiurea, derivados de metilhidrazina, procarbazona (N-metilhidrazina, MM), supresores adrenocorticales, mitotano (.omicron.,.rho.'-DDD), aminoglutetimida, agonistas de RXR, bexaroteno, inhibidores de tirosina cinasa, imatinib, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina), clorambucilo, etileniminas, metilmelaminas, hexametilmelamina, tiotepa, busulfán, carmustina (BCNU), semustina (metil-CCNTJ), lomustina (CCNU), estreptozocina (estreptozotocina), antagonistas de la síntesis del ADN, fosfato de estramustina, triazinas, dacarbazina (OTIC, dimetil-triazenoimidazolecarboxamida), temozolomida, análogos de ácido fólico, metotrexato (ametofterina), análogos de pirimidina, fluorouracilo (5-fluorouracilo, 5-FU, 5FTJ), floxuridina (fluorodeox>'uridina, FUDR), citarabina (arabinósido de citosina), gemcitabina, análogos de purina, mercaptopurina (6-mercaptopurina, 6-MP), tioguanina (6-tioguanina, TG), pentostatina (2'-desoxicoformicina, desoxicoformicina), cladribina y fludarabina, inhibidores de la topoisomerasa, amsacrina, alcaloides de la vinca, vinblastina (VLB), vincristina, taxanos, paclitaxel, paclitaxel unido a proteínas (Abraxane(R)), docetaxel (Taxotere(R)); epipodofilotoxinas, etopósido, tenipósido, camptotecinas, topotecán, irinotecán, dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina, rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, mitomicina (mitomicina C), idarrubicina, epirubicina, buserelina, adrenocorticoesteroides, prednisona, progestinas, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, dietilestilbestrol, etinilestradiol, tamoxifeno, anastrozol; propionato de testosterona, fluoximesterona, flutamida, bicalutamida y leuprólido.

En algunas realizaciones, el fármaco contra el cáncer es talidomida o sus derivados. En algunas realizaciones, el fármaco contra el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. En determinadas realizaciones, el fármaco contra el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en paclitaxel, Abraxane(R) y Taxotere(R). En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en asparaginasa, bevacizumab, bleomicina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, 5-fluorouracilo, hidroxiurea, estreptozocina y 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, paclitaxel y gemcitabina.

45 V. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se incluyen con fines ilustrativos únicamente y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

50 **Ejemplo 1: Aislamiento y enriquecimiento del subconjunto de células NK q-158V+ de un donante humano**

Para identificar a un sujeto portador del polimorfismo V158+, el ADN se extrae de la sangre periférica de muestras procedentes de donantes sanos. El ADN genómico se extrae de las muestras de sangre utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, Madison, WI). El genotipado para CD16 158V+ (polimorfismo V158V) se lleva a cabo sustancialmente como se ha descrito previamente, por ejemplo, Cartron *et al.* (2002) Blood, 99:754-758; Koene *et al.* (1997) Blood, 90:1109-1114) mediante una PCR anidada seguida de digestión con enzimas de restricción específicas para cada alelo.

Brevemente, la primera PCR utiliza cebadores específicos 5'-ATATTTACAGAATGGCACAGG-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-GACTTGGTACCCAGGTTGAA-3' (SEQ ID NO:2) para amplificar un fragmento de 1,2 kilobases que contiene el sitio polimórfico. El ensayo PCR inicial se realiza con aproximadamente 1,25 µg de ADN genómico, 200 ng de cada cebador, 200 µM de cada desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) y 1 U de Taq ADN polimerasa. Esta primera PCR se lleva a cabo durante 10 minutos a 95 °C durante 35 ciclos (cada uno de los cuales incluye etapas a 95 °C durante 1 minuto), 57 °C durante 1,5 minutos, y 72 °C durante 1,5 minutos), y 8 minutos a 72 °C para lograr la extensión completa. La segunda PCR utiliza los cebadores 5'-ATCAGATTCGATCCTACTTCTGCAGGGGGCAT-3' (SEQ ID NO:3) y 5'-ACGTGCTGAGCTTGAGTGGATGGTATGTTTAC-3' (SEQ ID NO:4), amplificando así un fragmento de

94 pares de bases (pb) y creando un sitio de restricción NlaIII sólo en el alelo 158V+. Esta PCR anidada se realiza con 1 µl del ADN amplificado, 150 ng de cada cebador, 200 µM de cada dNTP y 1 U de Taq ADN polimerasa. El ciclo incluye 5 minutos a 95 °C, a continuación, 35 ciclos (cada uno de los cuales incluye las etapas a 95 °C durante 1 minuto, 64 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto), y 9,5 minutos a 72 °C para completar la extensión.

5 A continuación, el ADN amplificado (10 µl) se digiere con 10 U de NlaIII a 37 °C durante 12 horas y se separa por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8 %. Después de la tinción con bromuro de etidio, las bandas de ADN se visualizan bajo luz ultravioleta. Para donantes homocigotos 158F, sólo es visible una banda no digerida (94 pb). Se observan tres bandas (94 pb, 61 pb, y 33 pb) en individuos heterocigotos, mientras que en los pacientes homocigotos 158V+ sólo se obtienen 2 bandas digeridas (61 pb y 33 pb).

15 Se obtienen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes homocigotos para 158V+ y se tiñen los marcadores de superficie de las PBMC utilizando anticuerpos específicos para CD56 (N901), CD3(UCHT1), CD14 (HCD14) y CD19 (HIB19) seguido de una clasificación celular activada por fluorescencia acotando las células que tienen el fenotipo CD56^{dim}CD3⁻CD14⁻CD19⁻ y son positivas en superficie para un KIR, bien KIR2DL1 (CD158a; HP-MA4), KIR2DL2/3 (CD158b; CH-L) o KIR3DL1 (CD158e; DX9) y/o negativas en superficie para un NCR, bien Nkp46 (CD335; 9E2) o Nkp30 (CD337; p30-15), excluyendo así las células no NK y enriqueciendo para deficientes en FcRγ-d (gNK) a partir de PBMC recién aisladas con una pureza de aproximadamente el 70 % o superior, tal como se describe en Hwang *et al.* (2012) *Int. Immunol.*, 24:793-802. Los anticuerpos se obtienen de proveedores comerciales, tal como Beckman Coulter (CA, EE.UU.), BD Biosciences (CA, EE.UU.), Biolegend (CA, EE.UU.) o eBiosciences (CA, EE.UU.).

25 En lo que respecta a la expansión, las células enriquecidas resultantes se siembran por dilución limitante en medio de clonación NK [RPMI1640 (Invitrogen, NY, EE.UU.) suplementado con un 5 % de suero AB humano (Cellgro, VA, EE. UU.), suero bovino fetal al 10 % (Hyclone, UT, EE. UU.), 1 µg/ml de PHA (Roche, IN, EE.UU.), 100 U ml⁻¹ de IL-2, y 10 ng ml⁻¹ de IL-15 (Peprotech, NJ, EE.UU.)] junto con PBMC alogénicas estimuladas con PHA (1 µg ml⁻¹ durante 1 h) y células RPMI 8866 que habían sido tratadas con mitomicina C (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) durante 2 horas a 37 °C. Se añaden 25.000 células de alimentación por pocillo cada 10-14 días durante un máximo de 2 meses.

30 Para evaluar la actividad dirigida por anticuerpos de las células NK CD16 158V+/g- enriquecidas, aproximadamente células diana MM1S de mieloma múltiple se marcan con 100 µCi de ⁵¹Cr durante 1 hora a 37 °C., se lavan dos veces con PBS y se resuspenden en medio RPMI. Un total de 3×10⁴ células diana en 100 µl de medio RPMI se colocan por triplicado en placas de 96 pocillos con fondo en V en presencia o ausencia de 10 µg/ml del anticuerpo anti-CD38 daratumumab. Las células tumorales se incuban durante aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente y luego se lavan dos veces para eliminar el anticuerpo. Las células se resuspenden en 100 µl de medio al que se añade un volumen igual de células NK CD16 158V+/g- en varias proporciones efector:diana de 1:3 a 10:1 y las células se incuban durante 4 horas. Las alícuotas de sobrenadantes se cuentan utilizando un sistema de recuento Packard Cobra Auto-Gamma Serie 5000 (Meriden, Conn., EE.UU.). El porcentaje específico de liberación de ⁵¹Cr se calcula según la fórmula: porcentaje de liberación específica=[(liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea)]×100. Como control, se llevan a cabo experimentos con células NK CD56+ convencionales o en ausencia del anticuerpo anti-CD38 daratumumab. Los resultados muestran que las células NK CD16 158V+/g- presentan actividad de CCDA en presencia de células tumorales recubiertas con anti-CD38, que es superior a la actividad de CCDA de las células NK convencionales.

45 Se realizan experimentos similares con células de linfoma de linfocitos B CD20+ recubiertas de rituximab. Los resultados muestran que las células NK CD16 158V+/g- muestran una mayor capacidad para mediar en la CCDA cuando se co-cultivan con células de linfoma de linfocitos B transformadas por EBV recubiertas de rituximab que las células NK convencionales o los controles.

50 **Ejemplo 2: Evaluación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de subconjuntos de células NK**

158V es un polimorfismo genético de CD16 en el que el aminoácido valina (V) está presente en la posición 158 de aminoácidos de la proteína en lugar del más común fenilalanina (F) (Koene *et al.*, 1997, *Blood* 90:1109-14). Esto conduce a una mayor expresión y afinidad de anticuerpos de CD16, lo que resulta en una mayor CCDA por parte de las células NK CD16 158V+ (Hatjiharissi *et al.*, 2007, *Blood* 110:2561-4). Específicamente, los donantes 158 V/V y 158 V/F matan las células ARH-77 y Daudi mediante CCDA mucho mejor que los donantes 158 F/F, siendo los donantes 158 V/V los que obtienen mejores resultados (Hatjiharissi *et al.*, 2007).

60 Se examinaron cuarenta (40) donantes seropositivos al CMV de BloodWorks NW para determinar los 12 donantes con mayor proporción de g-NK. Las células g-NK de estos donantes se enriquecieron a partir de PBMC mediante separación con microesferas magnéticas (CD3-/CD57+). Las células NK masivas de donantes convencionales también se enriquecieron a partir de PBMC de donantes que no tenían g-NK mediante separación con microesferas magnéticas (CD3-/CD57+). La proporción de células g-NK se determinó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos fluorescentes para los siguientes marcadores extracelulares: CD45, 7-AAD, CD3, CD56, CD16, CD57, CD7 y CD161. Tras la incubación con anticuerpos durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, las

células se lavaron con PBS y el número de leucocitos 7-AAD^{neg}/CD45^{pos} se cuantificó mediante citometría de flujo. Las células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se lavaron y resuspendieron en saponina al 0,2 % para permeabilizar la membrana celular. Después, se añadió el anticuerpo anti-FcεRI conjugado con fluorescencia. Tras una incubación adicional de 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, las células se analizaron mediante citometría de flujo y el porcentaje de g-NK se evaluó como el porcentaje de linfocitos CD45^{pos}/7-AAD^{neg}/CD3^{neg}/CD56^{pos}/FcεRI^{neg}.

Las células enriquecidas se sometieron a pruebas de CCDA contra las siguientes combinaciones de tumor/anticuerpo: 1) SW-480/cetuximab; 2) SKOV3/trastuzumab; 3) SKOV3/cetuximab; 4) MM.1S/daratumumab; y 5) MM.1S/elotuzumab.

Para el ensayo de citotoxicidad CCDA contra la línea celular de cáncer de ovario SKOV3 (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.) como dianas, las células NK se co-cultivaron con células diana SKOV3 marcadas con CD71 ($1,0 \times 10^4$ células) a proporciones de células NK: células diana de 0,5:1, 1:1, 2,5:1, y 5:1 en un volumen final de 2,2 ml de medio específico para células diana (Bigley *et al.*, 2014, *Brain Behav Immun.*, 39:160-71). Los medios utilizados para el ensayo CCDA fueron medio de McCoy 5A suplementado con FBS al 10 % con 1 µg/ml de Trastuzumab (anti-HER2) o 5 µg/ml de cetuximab (anti-EGFR). En cada caso, también se midió la citotoxicidad basal sin la presencia del anticuerpo tratante. Sólo se utilizaron tubos de células diana para controlar la muerte celular espontánea (menos del 10 % en todos los ensayos). Tras una incubación de 4 horas a 37 °C, se lavaron las células y se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y CD56 para cuantificar el número de células NK en el tubo. Después de un lavado final, se añadió yoduro de propidio (PI) y el número de células NK, células diana vivas y células diana muertas se resolvieron mediante citometría de flujo de 4 colores (Bigley *et al.*, 2018, *J Appl Physiol*, 126:842-853).

Para el ensayo de citotoxicidad CCDA contra la línea celular de mieloma múltiple MM.1S (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.) como dianas. Las células NK se co-cultivaron con células diana MM.1S marcadas con CD71 ($1,0 \times 10^4$ células) en proporciones de células NK: células diana de 0,5:1, 1:1, 2,5:1, y 5:1 en un volumen final de 2,2 ml de medio específico de la célula diana. El medio utilizado para el ensayo de CCDA fue medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 10 % con 1 µg/ml de Daratumumab (anti-CD38) o 1 µg/ml de Elotuzumab (anti-CD319). En cada caso, también se midió la citotoxicidad basal sin la presencia del anticuerpo tratante. Sólo se utilizaron tubos de células diana para controlar la muerte celular espontánea (menos del 10 % en todos los ensayos). Tras una incubación de 4 horas a 37 °C, se lavaron las células y se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y CD56 para cuantificar el número de células NK en el tubo. Después de un lavado final, se añadió yoduro de propidio (PI) y el número de células NK, células diana vivas y células diana muertas se resolvieron mediante citometría de flujo de 4 colores (Bigley *et al.*, 2018).

Para el ensayo de citotoxicidad CCDA contra la línea celular de CCR SW-480 (ATCC; Manassas, VA, EE.UU.) como dianas, las células NK se co-cultivaron con células diana SW-480 marcadas con CD71 ($1,0 \times 10^4$ células) en proporciones de células NK: células diana de 0,5:1, 1:1, 2,5:1, y 5:1 en un volumen final de 2,2 ml de medio específico de la célula diana. El medio utilizado para el ensayo de CCDA fue medio L-15 de Leibovitz suplementado con FBS al 10 % con 5 µg/ml de Cetuximab (anti-EGFR). También se midió la citotoxicidad basal sin la presencia de Cetuximab. Sólo se utilizaron tubos de células diana para controlar la muerte celular espontánea (menos del 10 % en todos los ensayos). Tras una incubación de 4 horas a 37 °C, se lavaron las células y se tiñeron con anticuerpos anti-CD3 y CD56 para cuantificar el número de células NK en el tubo. Después de un lavado final, se añadió yoduro de propidio (PI) y el número de células NK, células diana vivas y células diana muertas se resolvieron mediante citometría de flujo de 4 colores (Bigley *et al.*, 2018).

Como se muestra en la **Figura 1**, la CCDA de las g-NK se comparó con las células NK convencionales (c-NK) de donantes que no tenían g-NK (n=4). De estos 12 donantes, 5 "superdonantes" destacaron por sus elevados valores de CCDA.

A continuación, se evaluó a los donantes para determinar a qué subgrupo pertenecía cada donante en relación con el polimorfismo 158V de CD16 (V/V, V/F y F/F). La distribución esperada era del 35 % V/V, 25 % V/F y 40 % F/F (Hatjiharissi *et al.*, 2007; Somboonyosdech *et al.*, 2012, *Asian Biomedicine*, 6:883-89], por lo tanto, cualquier desviación de esta expectativa sería coherente con la conclusión de que el polimorfismo 158V puede desempeñar un papel en la elevada CCDA observada con estos donantes. Para las pruebas de polimorfismo, las células NK congeladas se descongelaron, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 100 g. Tras la etapa de lavado, el sobrenadante se decantó y las células NK se resuspendieron en 10 ml para el recuento celular por citometría de flujo. Brevemente, se recogieron 50 µl de la suspensión celular en un tubo de flujo y se tiñeron con 2 µl de un anticuerpo fluorescente para CD45 (para discernir los leucocitos de los glóbulos rojos residuales) y 2 µl de 7-AAD (un colorante de viabilidad). Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, las células se diluyeron con 500 µl de PBS y el número de leucocitos 7-AAD^{neg}/CD45^{pos} se cuantificó mediante citometría de flujo. Siguiendo el recuento de células, se realizó una separación con perlas magnéticas para aislar una población de células NK CD16^{pos}. Para este protocolo, la separación con perlas magnéticas se realizó utilizando Miltenyi MACS™ CD16 Microbeads siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la separación por perlas magnéticas, se utilizó la secuenciación de ARN unicelular de 10X Genomics para determinar a qué grupo polimórfico CD16 pertenecen los donantes (V/V, V/F o F/F). Como se muestra en la **Figura 1**, los donantes 158V (V/V o V/F) tienen la CCDA más alta.

La presente invención no pretende limitar su alcance a las realizaciones particulares desveladas, que se proporcionan, por ejemplo, para ilustrar diversos aspectos de la invención. Diversas modificaciones de las composiciones y métodos descritos resultarán evidentes a partir de la descripción y enseñanzas del presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un subconjunto de células citolíticas naturales (NK) positivas en superficie para un polimorfismo CD16 158V+ y deficiente en la expresión de la cadena FcRγ (CD16 158V+/g-), en donde al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 % o al menos aproximadamente el 90 % de las células de la composición comprenden el subconjunto de células NK CD16 158V+/g-, y en donde la composición es estéril.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde las células NK CD16 158V+ comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:11 o una secuencia que presenta al menos un 85 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:11 y comprende el polimorfismo 158V+.
3. La composición de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde:
 - el subconjunto de células NK es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3;
 - el subconjunto de células NK tiene una expresión de superficie negativa o baja de Nkp30 y/o Nkp46;
 - el subconjunto de células NK es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3 y es negativa o baja para la expresión en superficie de Nkp30 y/o Nkp46; y/o
 - el subconjunto de células NK es positivo en superficie para NKG2C.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde:
 - la composición comprende de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células, de o desde aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células o de o desde aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células;
 - el volumen de la composición es de al menos o al menos aproximadamente 10 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml o 500 ml y/o la composición comprende entre 1×10^5 y 1×10^8 células/ml;
 - la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un crioprotector; y/o
 - el subconjunto de células NK son células NK primarias obtenidas de un sujeto, opcionalmente en donde el sujeto es un ser humano.
5. Un método para enriquecer células NK, que comprende:
 - (a) proporcionar un subconjunto de células NK aisladas de un sujeto identificado como poseedor del genotipo de células NK CD16 158V+, en donde el subconjunto de células NK comprende o está enriquecido por células que no expresan la cadena FcRγ (CD16 158V+/g-); y
 - (b) cultivar el subconjunto de células NK CD16 158V+/g- aislado o enriquecido en condiciones de expansión celular, enriqueciendo así las células NK del sujeto.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el subconjunto de células NK se ha aislado de un sujeto identificado como heterocigoto u homocigoto para el polimorfismo CD16 158V+.
7. El método de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde:
 - IL-12, IL-15, IL-18, IL-2 y/o CCL5 se ha administrado al sujeto antes de aislar las células NK; y/o
 - el método comprende, antes de la etapa (a), cribado de sujetos para detectar la presencia del genotipo de células NK CD16 158V+, opcionalmente, en donde los sujetos se identifican como heterocigotos u homocigotos para el polimorfismo.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde:
 - el subconjunto de células NK se ha aislado de una población de células que comprende linfocitos, opcionalmente en donde la población de células comprende una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), un producto de aféresis o un producto de leucaféresis;
 - el subconjunto de células NK es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3;
 - el subconjunto de células NK tiene una expresión de superficie negativa o baja de Nkp30 y/o Nkp46;
 - el subconjunto de células NK es positivo en superficie para un KIR, opcionalmente KIR2DL2/3 y es negativa o baja para la expresión en superficie de Nkp30 y/o Nkp46; y/o
 - las células NK o un subconjunto de las mismas es positivo en superficie para NKG2C.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en donde:
 - las células se cultivan en presencia de células alimentadoras o en presencia de una o más citocinas, opcionalmente IL-2, IL-15 y/o IL-7;
 - las células NK se cultivan durante un periodo de tiempo para lograr una expansión de las células de al menos 5

- veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 400 veces, 500 veces o más en comparación con el número de células NK aisladas antes del cultivo;
 las células NK se cultivan durante de 7 a 28 días, opcionalmente aproximadamente 14 días, 15 días, 16 días, 17 días o 18 días, 19 días, 20 días o 21 días;
- 5 las células NK se cultivan para conseguir un número de células NK enriquecidas de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^8 células, de o desde aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} células, de o desde aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células o de o desde aproximadamente 10^9 a aproximadamente 10^{10} células; y/o
- 10 el método comprende además la criopreservación de las células y/o la formulación de las células en presencia de un crioprotector.
10. Una composición, que comprende células NK enriquecidas producidas por el método de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en donde la composición es estéril.
- 15 11. La composición de la reivindicación 10, en donde la composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un crioprotector.
- 20 12. Un kit que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 10 y 11 y un agente adicional para el tratamiento de una enfermedad, en donde el agente adicional es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc, y opcionalmente comprende además instrucciones para administrar la composición y el agente adicional para tratar una enfermedad o afección.
- 25 13. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 10 y 11 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en un individuo que la necesite, opcionalmente, en donde la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en una afección inflamatoria, una infección y cáncer.
- 30 14. La composición para su uso de la reivindicación 13, en donde la composición es para administrar en combinación con un agente adicional, en donde el agente adicional es un anticuerpo o una proteína de fusión Fc, opcionalmente, en donde el agente adicional se administra simultánea o secuencialmente con la composición, opcionalmente, en donde el agente adicional se administra antes de la composición.
- 35 15. El kit de la reivindicación 12 o la composición para su uso de la reivindicación 14, en donde el anticuerpo reconoce un antígeno asociado al tumor, opcionalmente, en donde el anticuerpo reconoce o se une específicamente a CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD52, CD56, CD70, CD74, CD140, EpCAM, CEA, gpA33, mesotelina, α -fetoproteína, mucina, PDGFR-alfa, TAG-72, CAIX, PSMA, proteína de unión a folato, receptor quinasa del factor de dispersión, un gangliósido, citoqueratina, receptores de Frizzled, VEGF, VEGFR, integrina $\alpha\beta 3$, integrina $\alpha 5\beta 1$, EGFR, EGFL7, ERBB2(HER2), ERBB3, fibronectina, HGF, HER3, LOXL2, MET, IGF1R, IGLF2, EPHA3, FR-alfa, fosfatidilserina, Syndecan 1, SLAMF7(CD319), TRAILR1, TRAILR2, RANKL, FAP, vimentina o tenascina y/u opcionalmente en donde el anticuerpo comprende un dominio Fc y/o es un anticuerpo de longitud completa.

