

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende:

(a) un primer sitio de unión al antígeno que comprende un fragmento variable monocatenario (scFv) que se une a NKG2D;

(b) un segundo sitio de unión al antígeno que se une a otro antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA); y

(c) un dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16

en donde el scFv que se une a NKG2D está unido al extremo C-terminal del dominio Fc del anticuerpo o una porción del mismo suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante un enlazador flexible que comprende Gly o Ser.

2. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un sitio de unión al antígeno adicional que se une a BCMA.

3. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el segundo sitio de unión al antígeno que se une a BCMA es un fragmento Fab.

4. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el segundo sitio de unión al antígeno y el adicional que se unen a BCMA son fragmentos Fab.

5. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el segundo sitio de unión al antígeno y el adicional que se unen a BCMA son scFv.

6. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el dominio variable de cadena pesada del scFv que une NKG2D se ubica en el extremo N o el extremo C del dominio variable de cadena ligera del scFv.

7. La proteína de acuerdo con la reivindicación 6, donde el dominio variable de cadena ligera se ubica en el extremo N del dominio variable de cadena pesada del scFv que se une a NKG2D.

8. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16 o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16.

9. La proteína de acuerdo con la reivindicación 8, donde el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16, o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
10. La proteína de acuerdo con la reivindicación 8, donde el scFv que se une a NKG2D se une al extremo C del dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16 o un tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante un enlazador flexible que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:168.
11. La proteína de acuerdo con la reivindicación 10, donde el extremo C del dominio Fc del anticuerpo está unido al extremo N del dominio variable de cadena ligera del scFv que se une a NKG2D.
12. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde dentro del scFv que se une a NKG2D, se forma un puente disulfuro entre el dominio variable de cadena pesada del scFv y el dominio variable de cadena ligera del scFv.
13. La proteína de acuerdo con la reivindicación 12, donde el puente disulfuro se forma entre C44 del dominio variable de la cadena pesada y C100 del dominio variable de la cadena ligera.
14. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde, dentro del scFv que se une a NKG2D, el dominio variable de cadena pesada está unido al dominio variable de la cadena ligera mediante un enlazador flexible.
15. La proteína de acuerdo con la reivindicación 14, donde el enlazador flexible comprende (GlyGlyGlyGlySer)_n (G4S)_n (SEQ ID NO:198), donde n es un número entero entre 1-10.
16. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, donde el segundo sitio de unión al antígeno scFv y el adicional se unen al dominio Fc del anticuerpo o una parte de este suficiente para unirse a CD16 o el tercer sitio de unión al antígeno que se une a CD16 mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
17. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, donde el segundo sitio de unión al antígeno scFv y el adicional se unen al dominio Fc del anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.
18. La proteína de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, donde un puente de disulfuro se forma entre el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera del segundo sitio de unión al antígeno y/o el sitio de unión al antígeno adicional.

19. La proteína de acuerdo con la reivindicación 18, donde el puente disulfuro se forma entre C44 del dominio variable de la cadena pesada y C100 del dominio variable de la cadena ligera.

20. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde el scFv que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena ligera ubicado en el extremo N de un dominio variable de cadena pesada, donde el dominio variable de cadena ligera se une al dominio variable de cadena pesada del scFv mediante un enlazador flexible que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:167, y el scFv que se une a NKG2D se une al dominio Fc de anticuerpo mediante una bisagra que comprende Ala-Ser.

21. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el primer sitio de unión a antígenos que se une a NKG2D comprende:

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de la región determinante de complementariedad 1 (CDR1), la región determinante de complementariedad 2 (CDR2) y la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 191, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 193, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(c) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 95, 96 y 97, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(d) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 188, 88 y 189, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 91, 92 y 93, respectivamente;

(e) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 185, 104 y 192, respectivamente; y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias

CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 107, 108 y 109, respectivamente;

(f) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 185, 72 y 159, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 75, 76 y 77, respectivamente;

(g) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 186, 80 y 187, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 83, 84 y 85, respectivamente;

(h) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 194, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(i) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 195, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(j) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 196, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente;

(k) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 197, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente; o

(l) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 190, 96 y 160, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias

CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 99, 100 y 101, respectivamente.

22. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:94.

23. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:98.

24. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada al menos 95% idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95% idéntico a la SEQ ID NO:98.

25. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:94 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

26. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:169 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

27. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:171 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

28. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:173 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

29. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:175 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

30. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:177 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

31. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-21, donde el primer sitio de unión al antígeno que se une a NKG2D comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:179 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:98.

32. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, donde el segundo sitio de unión al antígeno y/o el adicional que se unen a BCMA comprenden:

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 149, 150 y 151, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 153, 154 y 155, respectivamente;

(b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 1117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 120, 121 y 123, respectivamente;

(c) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 125, 126 y 127, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 129, 130 y 131, respectivamente;

(d) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 133, 134 y 135, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 137, 138 y 139, respectivamente;

(e) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 141, 142 y 143, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 145, 146 y 147, respectivamente; o

(f) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 115, 116 y 117, respectivamente, y un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 representadas por las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 120, 121 y 122, respectivamente.

33. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde el segundo sitio de unión al antígeno y/o el adicional que se unen a BCMA comprenden: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:152; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:152; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:148 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:152.

34. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde el segundo sitio de unión al antígeno y/o el adicional que se unen a BCMA comprenden: (a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:119; (b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:119; o (c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:119.

35. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde el segundo sitio de unión al antígeno y/o el adicional que se unen a BCMA comprenden:

(a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:128;

(b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:128; o

(c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:124 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:128.

36. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde el segundo sitio de unión al antígeno y/o el adicional que se unen a BCMA comprenden:

(a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:136;

(b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:136; o

(c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:132 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:136.

37. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde el segundo sitio de unión al antígeno y/o el adicional que se unen a BCMA comprenden:

(a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO:144;

(b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:144; o

(c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:140 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:144.

38. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-32, donde el segundo sitio de unión al antígeno y/o el adicional que se unen a BCMA comprenden:

(a) un dominio variable de cadena pesada al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 90 % idéntico a la SEQ ID NO:118;

(b) un dominio variable de cadena pesada al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera al menos 95 % idéntico a la SEQ ID NO:118; o

(c) un dominio variable de cadena pesada idéntico a la SEQ ID NO:114 y un dominio variable de cadena ligera idéntico a la SEQ ID NO:118.

39. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-38, donde el dominio Fc del anticuerpo comprende los dominios Ch2 y bisagra de un anticuerpo de IgG1 humana.

40. La proteína de acuerdo con la reivindicación 39, donde el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a los aminoácidos 234-332 de un anticuerpo IgG1 humano.

41. La proteína de acuerdo con la reivindicación 39 o 40, donde el dominio Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica al dominio Fc de la IgG1 humana y difiere en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en Q347, Y349, T350, L351, S354, E356, E357, K360, Q362, S364, T366, L368, K370, N390, K392, T394, D399, S400, D401, F405, Y407, K409, T411 y K439.

42. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-41, donde el dominio Fc es un dominio Fc de una IgG1 humana que comprende las sustituciones Q347R, D399V y F405T.
43. La proteína de acuerdo con la reivindicación 42, donde el dominio Fc que comprende las sustituciones está unido al scFv que se une a NKG2D.
44. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-43, donde el dominio Fc es un dominio Fc de una IgG1 humana que comprende las sustituciones K360E y K409W.
45. La proteína de acuerdo con la reivindicación 44, donde el dominio Fc que comprende las sustituciones está unido al segundo sitio de unión al antígeno.
46. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33 y 39-45 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:162.
47. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33 y 39-45, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:163 y la SEQ ID NO:165.
48. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33 y 39-45 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
49. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33 y 39-45 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
50. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33 y 39-45 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162.
51. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33 y 39-45 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:162, que comprende además la SEQ ID NO:163 y SEQ ID NO:165.
52. La proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-51, donde la proteína se une a NKG2D con una KD de 2 a 120 nM, medido por resonancia de plasmones superficiales.
53. Una formulación que comprende la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 y un portador farmacéuticamente aceptable.

54. Una célula que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-52.

55. Un método para potenciar directa y/o indirectamente la muerte de células tumorales, en donde el método comprende exponer el tumor y un linfocitos citolíticos natural a la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-52.

56. Un método para tratar el cáncer, donde el método comprende administrar la proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-52 o la formulación de acuerdo con la reivindicación 53 a un paciente.

57. El método de la reivindicación 56, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en mieloma múltiple, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas de linfocitos B y leucemia mieloide aguda.