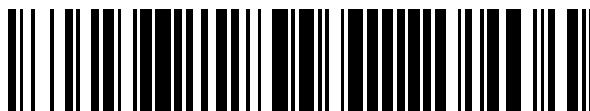


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 977**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.07.2015 PCT/IB2015/055226**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2016 WO16005950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2015 E 15759938 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3166973**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales inmunoestimuladores contra interleucina 2 humana**

30 Prioridad:

10.07.2014 EP 14176619

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

21.08.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)
Rämistrasse 71
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**BOYMAN, ONUR;
ARENAS-RAMIREZ, NATALIA y
ZOU, CHAO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 779 977 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

Anticuerpos monoclonales inmunoestimuladores contra interleucina 2 humana

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a la interleucina 2 humana (hIL-2). La invención se refiere más específicamente a anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo particular de hIL-2 y cuando se unen a este epítipo son capaces de inhibir la unión de hIL-2 a CD25. Además, la invención se refiere a aplicaciones terapéuticas *in vitro* e *in vivo* de los anticuerpos.

Antecedentes de la invención

El melanoma maligno es un tipo de cáncer frecuente en hombres y mujeres. Una vez que el melanoma se vuelve metastásico y se propaga a sitios distantes, la tasa de supervivencia a 5 años es bastante pobre, calculada en aproximadamente el 15%. Las estrategias de tratamiento disponibles actualmente para el melanoma metastásico apenas mejoran esta tasa de supervivencia.

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina capaz de estimular potentemente los linfocitos citotóxicos contra los tumores metastásicos. Sin embargo, IL-2 también puede estimular las llamadas células T reguladoras CD25⁺ CD4⁺ (células Treg) que son cruciales para la prevención de enfermedades autoinmunes. Es importante destacar que las células Treg pueden amortiguar significativamente las respuestas antitumorales de los linfocitos citotóxicos, lo que antagoniza un poco los efectos antitumorales beneficiosos de la IL-2. Además, a las dosis requeridas para lograr una respuesta antitumoral clínica, la IL-2 puede ejercer efectos adversos tóxicos.

La inmunoterapia estándar con IL-2 se ha utilizado desde principios de la década de 1980 para la inmunoterapia del melanoma metastásico y el carcinoma metastásico de células renales, lo que condujo a la aprobación por la FDA para estas indicaciones en 1996 y 1992, respectivamente. Mientras que la IL-2 administrada a altas dosis ha mostrado tasas de respuesta objetivas en aproximadamente el 17% y la regresión completa en aproximadamente el 6-9% de los pacientes que padecen estos cánceres metastásicos mortales, la IL-2 administrada a estas dosis con frecuencia condujo a efectos adversos tóxicos, tales como hipotensión, edema pulmonar, daño de células hepáticas, toxicidad gastrointestinal y edema general. Además, como se mencionó anteriormente, la IL-2 puede estimular las células Treg, que a su vez pueden amortiguar la actividad de las células T CD8⁺ antitumorales y las células NK.

Se divulgó previamente que la actividad biológica de las citocinas en un sujeto mamífero se puede aumentar administrando un anticuerpo capaz de unirse a la citocina (documento WO 2007/095643 A2). Específicamente, se ha demostrado que la combinación de IL-2 con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-IL-2 particular mejora la terapia con IL-2 en modelos murinos experimentales de inmunoterapia contra el cáncer. Se divulgó que los complejos IL-2/anticuerpo anti-IL-2 muestran una fuerte actividad biológica al evitar la interacción con la subunidad α del receptor de IL-2 CD25 (Letourneau S, van Leeuwen EMM, Krieg C, Martin C, Pantaleo G, Sprent J., Surh CD y Boyman O. Los complejos, IL-2/anticuerpo anti-IL-2 muestran una fuerte actividad biológica al evitar la interacción con la subunidad α del receptor de IL-2 CD25. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. (2010) 107: 2171 - 2176). Dirigiendo así IL-2 preferentemente a los linfocitos citotóxicos, pero no a las células Treg.

Se divulgó además que la combinación de IL-2 con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-IL-2 hace que la IL-2 sea más potente pero menos tóxica (Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD y Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* (2006) 311:1924-1927; Krieg C, Letourneau S, Pantaleo G, y Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2010) 107:11906-11911).

Este enfoque tiene la ventaja de que la IL-2 natural no mutada se administra a través del mAb anti-IL-2 a células T CD8⁺ y células NK, que posteriormente ejercen potentes propiedades antitumorales, mientras que IL-2 forma un complejo con este tipo de mAb anti-IL-2 apenas activa las células Treg. Además, IL-2 que forma complejo con este tipo de mAb anti-IL-2 es mucho menos tóxico que la inmunoterapia con IL-2 estándar en ratones. Sin embargo, esta terapia hasta la fecha no ha estado disponible para su uso en pacientes debido a la falta de mAb anti-IL-2 humano apropiados.

Sumario de la invención

El problema abordado por la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal anti-IL-2 humana capaz de reconocer y unir un epítipo específico de IL-2 humana, favoreciendo así la estimulación de células T citotóxicas y células NK en comparación con células Treg, para uso en aplicaciones terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones, por lo tanto, se refiere a los siguientes elementos.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno específico de interleucina 2 humana

(hIL-2) que comprende HCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, HCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, HCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, LCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, LCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, LCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, en el que la unión de dicho anticuerpo, o fragmento del mismo de unión a antígeno, a hIL-2 inhibe la unión de hIL-2 a CD25, y la unión a hIL-2 se caracteriza por una constante de disociación (K_D) $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L determinada en un ensayo de unión de resonancia de plasmón superficial.

En ciertas partes de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en las que la unión a hIL-2 se caracteriza por una tasa de disociación ($K_{\text{disociación}}$) $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

En ciertas partes de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en las que el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno, no muestra reactividad cruzada medible con IL-2 murina.

En ciertas partes de la invención, se proporcionan anticuerpos monoclonales específicos de interleucina 2 humana (hIL-2), o fragmentos del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, caracterizados porque comprenden al menos una secuencia de V_H y/o una secuencia de V_L que tiene una identidad de $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 19 o 20.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En ciertas partes de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, en las que la molécula de ácido nucleico tiene una identidad de secuencia $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 3 o 4.

En ciertas partes de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto, que comprende la secuencia de las SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21 o 22, o una secuencia que tiene una identidad de $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21 o 22.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una célula que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o que expresa la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona una célula capaz de producir un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

De acuerdo con un sexto aspecto de la invención, se proporciona una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales, caracterizada porque los anticuerpos producidos son los del primer aspecto de la invención.

De acuerdo con un séptimo aspecto de la invención, se proporciona una formulación terapéutica para uso como medicamento, particularmente para uso en el tratamiento de cáncer o infecciones virales, que comprende:

- a. el anticuerpo monoclonal (mAb) hIL-2, o el fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, y
- b. interleucina 2 humana.

De acuerdo con un octavo aspecto de la invención, se proporciona el anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer o infecciones virales, en el que el anticuerpo, o fragmento del mismo de unión a antígeno, se administra junto con interleucina 2 humana.

De acuerdo con un noveno aspecto de la invención, se proporciona una formulación terapéutica para uso como medicamento, particularmente para uso en el tratamiento de cáncer o infecciones virales, que contiene una proteína de fusión que comprende:

- a. un fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 que comprende HCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, HCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, HCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, LCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, LCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, LCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, en el que la unión a hIL-2 se

caracteriza por una constante de disociación (K_D) $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L determinado en un ensayo de unión de resonancia de plasmón superficial,

b. un fragmento de polipéptido de IL-2 humana que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con la SEQ ID NO: 1 y, opcionalmente,

c. un enlazador de aminoácidos de 1 a 50, particularmente de 5 a 40, más particularmente de 10 a 30, aún más particularmente de aproximadamente 15 a 25 aminoácidos, que enlaza el fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 con el fragmento de polipéptido de IL-2 humana como una sola cadena de polipéptido.

De acuerdo con un décimo aspecto de la invención, se proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, que se une a un epítipo de interleucina 2 humana (hIL-2) que comprende los aminoácidos K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 y K96.

En ciertas partes de la invención, se proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con el décimo aspecto de la invención, en el que el epítipo comprende además uno cualquiera o más de los aminoácidos N50, N53, N91, L92, A93, N97.

De acuerdo con un primer aspecto de la divulgación, se proporciona un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, en el que el anticuerpo puede unirse a un epítipo particular en hIL-2 inhibiendo así la unión a CD25, modulando de este modo los efectos inmunológicos de la interacción hIL-2/IL-2R. El anticuerpo de la divulgación se caracteriza además por al menos uno de los parámetros:

a) la cadena variable del mAb comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$ o $\geq 99\%$ en comparación con la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO 6;

b) el anticuerpo que se une a hIL-2 es, es decir, la reacción $\text{mAb} + \text{hIL-2} \rightleftharpoons \text{mAb} * \text{hIL-2}$, en la que $\text{mAb} * \text{hIL-2}$ simboliza el complejo unido de anticuerpo e interleucina, se caracteriza por una constante de disociación (K_D) $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L;

c) el anticuerpo que se une a hIL-2 se caracteriza por una tasa de disociación ($K_{\text{disociación}}$) $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$;

d) tras la unión de mAb a hIL-2, el complejo resultante $\text{mAb} * \text{hIL-2}$ ya no puede unirse eficientemente al receptor α de IL-2 humana (también conocido como CD25), volviendo efectivamente la unión de CD25 humano a $\text{mAb} * \text{hIL-2}$ a niveles de fondo en comparación con la unión de CD25 humano a hIL-2 libre (no complejo) cuando se mide mediante resonancia de plasmón superficial; y/o

e) el anticuerpo no muestra reactividad cruzada medible con IL-2 murina.

Una falta de reactividad cruzada con IL-2 murina es ventajosa para estudios preclínicos, que generalmente implican modelos de ratón, tales como el uso de complejos de $\text{mAb} * \text{hIL-2}$ para el tratamiento de modelos tumorales murinos en los que un mAb anti-IL-2 de reactividad cruzada podría unirse y aislar IL-2 murina endógena de las células Treg murinas endógenas, potenciando así la respuesta antitumoral.

Una falta de reactividad cruzada con IL-2 murina también es ventajosa para los estudios de seguridad y eficacia preclínicos realizados antes del desarrollo de un mAb candidato en pacientes humanos.

En ciertas realizaciones, el mAb hIL-2 comprende al menos una secuencia de V_H y/o V_L que tiene una identidad de $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 19 o SEQ ID NO 20.

En ciertas realizaciones, la cadena variable del mAb hIL-2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$ o $\geq 99\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 3, 4, 5 o 6 y el mAb hIL-2 se caracteriza por una constante de disociación $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L.

En ciertas realizaciones, la cadena variable del mAb hIL-2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ o $\geq 99\%$ en comparación con la SEQ ID NO: 5 o 6 y el mAb hIL-2 se caracteriza por una tasa de disociación $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

En ciertas realizaciones, la cadena variable del mAb hIL-2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ o $\geq 99\%$ en comparación con la SEQ ID NO 5 o 6 y el mAb hIL-2 no muestra reactividad cruzada medible con IL-2 murina.

En ciertas realizaciones, la secuencia del mAb hIL-2 se humaniza para la administración a pacientes humanos para prevenir reacciones adversas.

En ciertas realizaciones, el mAb hIL-2 se proporciona como un fragmento de unión a antígeno (Fab) o un fragmento variable de cadena sencilla (scFv).

5 En ciertas realizaciones, el mAb hIL-2 comprende al menos una secuencia determinante de complementariedad (CDR) que tiene una identidad de $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 7, 8, 9, 10, 11 o 012.

10 De acuerdo con un segundo aspecto de la divulgación, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, capaz de unirse a interleucina 2 humana de acuerdo con el primer aspecto de la divulgación.

En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la divulgación tiene una identidad de secuencia $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$ o $\geq 99\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 3 a 4.

15 De acuerdo con un tercer aspecto de la divulgación, se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación.

20 De acuerdo con un cuarto aspecto de la divulgación, se proporciona una célula que comprende o expresa la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la divulgación.

De acuerdo con un quinto aspecto de la divulgación, se proporciona una célula capaz de producir los anticuerpos de acuerdo con el primer aspecto de la divulgación.

25 De acuerdo con un sexto aspecto de la divulgación, se proporciona una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales, caracterizada porque los anticuerpos producidos son aquellos del primer aspecto de la divulgación.

30 De acuerdo con un séptimo aspecto de la divulgación, una formulación terapéutica para uso en el tratamiento del cáncer u otras enfermedades que se benefician de la terapia inmunoestimuladora, tales como infecciones virales, que comprende

i. el anticuerpo monoclonal (mAb) de acuerdo con el primer aspecto de la divulgación, y/o

35 ii. mutantes de interleucina 2 humana o IL-2 humana, administrados al sujeto ya sea al mismo tiempo o en diferentes puntos de tiempo.

De acuerdo con un octavo aspecto de la divulgación, se proporciona una proteína de fusión. La proteína de fusión comprende:

40 a. un fragmento de polipéptido de unión a hIL-2, en el que dicho polipéptido se caracteriza por uno cualquiera de los parámetros:

45 i. el fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con la SEQ ID NO: 21 o la SEQ ID NO: 22;

ii. la unión de hIL-2 de dicho fragmento de polipéptido a hIL-2 se caracteriza por una constante de disociación (K_D) $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L;

50 iii) la unión de dicho fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 a hIL-2 se caracteriza por una tasa de disociación ($K_{\text{disociación}}$) $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; y/o

55 iv. el fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 no muestra reactividad cruzada medible con IL-2 murina.

b. un fragmento de polipéptido IL-2 humano que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con la SEQ ID NO: 1 y, opcionalmente,

60 c. un enlazador de aminoácidos de 1 a 50, particularmente de 5 a 40, más particularmente de 10 a 30, aún más particularmente de aproximadamente 15 a 25 aminoácidos, que enlaza el fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 con el fragmento de polipéptido de IL-2 humano como una sola cadena de polipéptido.

En otras palabras, la proteína de fusión retiene la capacidad del anticuerpo para unirse y dirigir la interleucina 2 humana para estimular las células inmunes seleccionadas, tales como las células T CD8+ y las células NK.

65 La ventaja de usar dicha proteína de fusión es que IL-2 humana no podrá disociarse del anticuerpo y que la terapia

estará compuesta por un solo producto en lugar de dos, lo que facilita varios aspectos de fabricación, dosificación y cumplimiento normativo.

De acuerdo con un noveno aspecto de la divulgación, se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de unión a antígeno que se une a un epítipo específico. Dicho epítipo puede ser el epítipo al que se une un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con otros aspectos de la divulgación. En una realización, el anticuerpo aislado o molécula se une a un epítipo de interleucina 2 humana (hIL-2) que comprende los aminoácidos K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 y K96. En otra realización, el anticuerpo o molécula aislada se une a un epítipo que comprende además uno cualquiera o más de los aminoácidos N50, N53, N91, L92, A93 y N97. También se proporciona un anticuerpo o molécula aislada, que comprende una superficie de reconocimiento de antígeno que tiene características de reconocimiento de epítipo equivalentes a un anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con otros aspectos.

Siempre que las alternativas para características separables individuales tales como, por ejemplo, una secuencia de codificación o epítipo de unión se expongan en el presente documento como "realizaciones", debe entenderse que tales alternativas pueden combinarse libremente para formar realizaciones discretas de la invención divulgada en el presente documento.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, a partir de los cuales pueden extraerse realizaciones y ventajas adicionales. Estos ejemplos están destinados a ilustrar la invención tal como se define en las reivindicaciones pero no a limitar su alcance.

Definiciones

Por "interleucina 2 humana" o "hIL-2" se entiende la proteína designada UniProt ID P60568 y se reproduce como la SEQ ID NO: 1.

La identidad en el contexto de la presente especificación es un único parámetro cuantitativo que representa el resultado de una comparación de secuencia posición por posición. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en la técnica; El algoritmo BLAST disponible públicamente es un ejemplo. Un ejemplo de este tipo para la comparación de secuencias de ácido nucleico es el algoritmo BLASTN que utiliza la configuración predeterminada: umbral esperado: 10; tamaño de palabra: 28; coincidencias máximas en un intervalo de consulta: 0; puntajes de coincidencia/falta de coincidencia: 1-2; costos por hueco: lineal. En ausencia de otras variables de medición, la identidad se medirá de acuerdo con la especificación anterior.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término anticuerpo se usa en su significado conocido en la técnica de biología e inmunología celular; se refiere a anticuerpos completos, cualquier fragmento de unión a antígeno o cadenas individuales de los mismos y constructos relacionados o derivados. Un anticuerpo completo es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera (C_L). La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas 20 regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente del sistema de complemento clásico.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término porción de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno se usa en su significado conocido en la técnica de biología e inmunología celular; se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (por ejemplo, interleucina 2). Las funciones de unión a antígeno de un anticuerpo pueden realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término porción de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H ; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y C_H ; un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb), que consiste en un dominio V_H o un dominio V_L ; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. HCDR significa una CDR de la cadena pesada y LCDR significa una CDR de la cadena ligera.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término anticuerpo quimérico se usa en su significado conocido en la técnica de biología e inmunología celular; se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la región constante,

o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, citocina, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc. Por ejemplo, un anticuerpo puede modificarse reemplazando su región constante con una citocina. Debido al reemplazo con una citocina, el anticuerpo quimérico puede retener su especificidad en el reconocimiento del antígeno mientras tiene también la función, o parte de ella, de la molécula de citocina original.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término híbrido se usa en su significado conocido en la técnica de la biología celular y la bioquímica; se refiere a una célula híbrida creada por fusión de una célula B productora de anticuerpos específicos con una célula de mieloma (cáncer de células B). Las células de híbrido pueden crecer en cultivo de tejidos y producir anticuerpos de una especificidad única (anticuerpos monoclonales).

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término fragmento variable de cadena sencilla (scFv) se usa en su significado conocido en la técnica de biología celular y bioquímica; se refiere a una proteína de fusión de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de las inmunoglobulinas, conectadas con un péptido conector corto de diez a aproximadamente 25 aminoácidos. El scFv conserva la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción del enlazador.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término fragmento de unión a antígeno (Fab) se usa en su significado conocido en la técnica de biología e inmunología celular; se refiere a una región en un anticuerpo que se une a antígenos. Se compone de un dominio constante y uno variable de cada una de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) de las inmunoglobulinas. Estos dominios dan forma al sitio de unión al antígeno en el extremo terminal amino del monómero.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término constante de disociación (K_D) se usa en su significado conocido en el arte de la química y la física; se refiere a una constante de equilibrio que mide la propensión de un objeto más grande a disociarse reversiblemente en componentes más pequeños, como cuando un complejo se desmorona en sus moléculas componentes. K_D se expresa en unidades molares [M] y corresponde a la concentración de [Ab] a la que los sitios de unión de [Ag] están medio ocupados. En otras palabras, la concentración de [Ab] no unido es igual a la concentración del complejo [AbAg]. La constante de disociación se puede calcular de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$K_D = \frac{[Ab] * [Ag]}{[AbAg]}$$

[Ab]: concentración de anticuerpo; [Ag]: concentración de antígeno; [AbAg]: concentración del complejo anticuerpo-antígeno

En el contexto de la presente memoria descriptiva, los términos tasa de disociación ($K_{disociación}$; [1/s]) y tasa de asociación ($K_{asociación}$; [1/s * M]) se usan en su significado conocido en la técnica de química y física; se refieren a una constante de velocidad que mide la disociación ($K_{disociación}$) o asociación ($K_{asociación}$) de un anticuerpo con su antígeno objetivo. $K_{disociación}$ y $K_{asociación}$ pueden determinarse experimentalmente utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método para determinar la $K_{disociación}$ y $K_{asociación}$ de un anticuerpo emplea resonancia de plasmón superficial. Este es el principio detrás de los sistemas de biosensores tales como el sistema Biacore® o el ProteOn®. También se pueden usar para determinar la constante de disociación K_D usando la siguiente fórmula:

$$K_D = \frac{[K_{disociación}]}{[K_{asociación}]}$$

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término anticuerpos humanizados se usa en su significado conocido en la técnica de la biología celular y la bioquímica; se refiere a anticuerpos producidos originalmente por células inmunes de una especie no humana, cuyas secuencias de proteínas se han modificado para aumentar su similitud con las variantes de anticuerpos producidas naturalmente en humanos.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término no reactividad cruzada medible se refiere a la falta de capacidad de un anticuerpo para reconocer y unirse a proteínas ortólogas de otras especies. Por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra la interleucina 2 humana no tendría una reactividad cruzada medible con la interleucina 2 murina si, en condiciones adecuadas, la unión del anticuerpo a la interleucina 2 murina no se pudiera detectar con métodos suficientemente sensibles tales como la resonancia de plasmón superficial. Un ejemplo de este tipo de reactividad cruzada no medible se muestra en la Figura 9 para el anticuerpo en el panel inferior (NARA1).

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo o una proteína que "se une específicamente a hIL-2" se refiere a un anticuerpo o proteína que se une al polipéptido IL-2 humano con una K_D de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o 10 pM o menos. Un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada con un antígeno

que no sea la IL-2 humana" se refiere a un anticuerpo que se une a ese antígeno con una K_D de 10 nM o menos, 1 nM o menos, o 100 pM o menos. Un anticuerpo que "no reacciona de forma cruzada con un antígeno particular" se refiere a un anticuerpo que se une a ese antígeno, con una K_D de 100 nM o mayor, o una K_D de 1 μ M o mayor, o una K_D de 10 μ M o mayor. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con el antígeno exhiben una unión esencialmente indetectable contra estas proteínas en ensayos de unión estándar.

El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

El término "dominio de unión al epítipo" o "EBD" se refiere a porciones de una molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al epítipo o derivado del mismo), que interactúa específicamente con (por ejemplo, por unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un sitio de unión en un epítipo objetivo. EBD también se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de interactuar específicamente (por ejemplo, mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) con un epítipo de IL-2 e inhiben la transducción de señales. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un scFv, un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 ; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1 ; un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

Los EBD también incluyen anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, unicuerpos, minicuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv, como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23: 1126-1136), diacuerpos de cadena sencilla biespecíficos o diacuerpos de cadena sencilla diseñados para unir dos epítipos distintos. Los EBD también incluyen moléculas similares a anticuerpos o miméticos de anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, minicuerpos, maxicuerpos, andamios de proteínas basados en Fn3, repeticiones de Anquirina (también conocidas como DARpins), polipéptidos VASP, polipéptido pancreático aviar (aPP), Afilina, Knotinas, Dominios SH3, dominios PDZ, Tendamistat, Neocarzinostatina, dominios de proteína A, lipocalinas, transferrina y dominios Kunitz que se unen específicamente a epítipos, que están dentro del alcance de la divulgación. Los fragmentos de anticuerpos pueden injertarse en andamios basados en polipéptidos tales como Fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de los Estados Unidos No. 6.703.199, que describe monocuerpos de polipéptidos de fibronectina).

La presente invención también abarca un anticuerpo contra la IL-2 humana, que es un anticuerpo aislado.

La frase "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-2 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a otros antígenos diferentes a hIL-2). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-2 puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de IL-2 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" o "secuencias de codificación de nucleótidos" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen (por ejemplo, una sonda, cebador, etiqueta EST o SAGE), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, ARNpi, ARNbp, agentes de ARNi y cebadores. Un polinucleótido puede modificarse o sustituirse en una o más bases, azúcar y/o fosfato, con cualquiera de las diversas modificaciones o sustituciones descritas en este documento o conocidas en la técnica. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, se pueden impartir modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede ser interrumpida por componentes que no son nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente marcador. El término también se refiere a las moléculas de cadena doble y sencilla. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de esta invención que sea un polinucleótido abarca tanto la forma bicatenaria como cada una de las dos formas monocatenarias complementarias conocidas o previstas para elaborar la forma bicatenaria.

El término "polipéptido" se usa indistintamente con el término "proteína" y en su sentido más amplio se refiere a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad puede estar unida por

otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) se refiere en una realización a mejorar la enfermedad o trastorno (por ejemplo, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o en al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico que incluye aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra realización más, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico) o ambos. Los métodos para evaluar el tratamiento y/o prevención de enfermedades generalmente se conocen en la técnica, a menos que se describa específicamente a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los ligantes anti-IL-2 humano. Los sobrenadantes de los clones de células B obtenidos después de la fusión del hibridoma de células B se agregaron a una placa previamente recubierta con IL-2 humana. Los mAb anti-IL-2 humanos se detectaron usando un anticuerpo biotinilado anti-IgG de ratón.

La Figura 2 muestra el cribado de los mAb anti-IL-2 humana para la unión al supuesto epítipo específico de IL-2 humana. Las placas se recubrieron con 5344 (un mAb hIL-2 sin el comportamiento superagonista dirigido en el presente documento) y se bloquearon, seguido de la adición de IL-2 humana para permitir que la citocina se una a 5344, cubriendo así un epítipo específico de la IL-2. Luego se agregaron los sobrenadantes que daban una señal positiva en el primer cribado (véase Figura 1). Después de permitir que los mAb en los sobrenadantes se unan al complejo IL-2-5344, se agregó un anticuerpo biotinilado MAB602 a la placa para evaluar si los mAb probados de los sobrenadantes se unieron al mismo (llamados "competidores") o a una región diferente a MAB602. Los mAb competidores condujeron a una absorbancia (OD450) que es dos veces menor que la absorbancia obtenida con MAB602 solo (en este caso OD = 1,1, como se muestra en H11).

La Figura 3 muestra la competencia dependiente de la concentración de hibridomas de células B. Los sobrenadantes de 8 clones de hibridoma de células B competidoras del primer cribado (véase Figura 2) se expandieron y se concentraron antes de su uso en este ensayo. Los sobrenadantes de estos 8 clones de hibridoma de células B competidoras (marcados del 1 al 8) se añadieron en cantidades crecientes. Los clones de hibridoma de células B competidoras competentes redujeron la OD450 tanto como MAB602 o incluso más, lo que es evidente para los clones 1 y 2. MAB602 a diferentes concentraciones (círculos verdes abiertos) sirvió como control.

La Figura 4 muestra la proliferación *in vivo* de células T CD8+. Las células T CD8+ marcadas con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE) de ratones transgénicos IL-7 congénicos CD45.1 se transfirieron a ratones receptores tipo silvestre congénicos CD45.2, seguido por inyecciones diarias de solución salina tamponada con fosfato (PBS), IL-2, IL-2 más MAB602 (IL-2/MAB602), IL-2 más 5344 (IL-2/5344), IL-2 más hibridoma 1 (IL-2/Hib # 1) o IL-2 más hibridoma 2 (IL-2/Hib # 2) durante 4 días. El día 5, se analizaron los ganglios linfáticos y los bazo para ver los perfiles de CFSE de las células T CD45.1+ CD8+ del donante. Se muestran los resultados obtenidos con los ganglios linfáticos, se obtuvieron resultados similares en los bazo.

La Figura 5 muestra la caracterización fenotípica de las células T CD8+ endógenas y las células NK después del tratamiento *in vivo* usando IL-2 más hibridoma 1 y 2. Los ratones fueron tratados como en la Figura 4, seguido de la evaluación por citometría de flujo de subconjuntos de células T CD8+ endógenas y células NK en los ganglios linfáticos y el bazo. Se muestran (A) los perfiles de CD8 frente a CD3 de células de ganglios linfáticos totales (gráficos de la izquierda) y perfiles de CD44 (células T activadas o de memoria) frente a CD122 (subunidad β del receptor de IL-2, presente en las células T activadas o de memoria) de células de ganglios linfáticos CD3+ CD8+, o (B) perfiles NK1.1 frente a los perfiles CD3 de ratones que recibieron el tratamiento indicado. Las células T CD8+ activadas/de memoria son altas para CD44 e intermedias a altas para CD122. Las células NK son negativas para CD3 y positivas para NK1.1. Se obtuvieron resultados similares usando células de bazo.

La Figura 6 muestra recuentos totales de células de células T CD8+ activadas/de memoria y células NK en ganglios linfáticos y bazo. Los animales fueron tratados y analizados como en la Figura 5. Se muestran los recuentos absolutos de células T CD8+ altas en CD44+ (denominadas fenotipo de memoria, MP CD8+) y de células NK1.1 + NK negativas para CD3 en ganglios linfáticos (panel superior) y bazo (panel inferior).

La Figura 7 muestra curvas de unión de resonancia de plasmón superficial del anticuerpo monoclonal comercialmente disponible MAB602 (gráfico izquierdo) y el anticuerpo monoclonal NARA1 (gráfico derecho), que es el sujeto de esta invención, para IL-2 humana. Para este experimento se usó un chip GLM de acoplamiento de amina. La activación de los grupos de ácido carboxílico en el chip se realizó usando una mezcla de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC a 0,2 M) y sulfo N-hidroxisulfosuccinimidias (s_NHS a 0,05M) a razón de 30 mL/min durante 420 segundos. Los anticuerpos NARA1 y MAB602 se recubrieron en el chip a razón de 100 mg/mL en un tampón de acetato de sodio (10 mM, pH 4,5). La desactivación fue seguida por la adición de etanolamina HCl a razón de 30 mL/min durante 300 s. Finalmente, se añadió IL-2 humana a diferentes concentraciones (a partir de 100 nM y seguida por 3 de diluciones) a razón de 100 mL/min, 600 s de asociación y 240 s de disociación.

La Figura 8 muestra curvas de unión de resonancia de plasmón superficial de IL-2 humana unida al anticuerpo monoclonal NARA1 con las subunidades de receptores de IL-2 CD25 (usadas en el presente documento como una fusión Fc de CD25-Fc), CD122, el anticuerpo monoclonal MAB602 o un anti-anticuerpo anti-hIL-2 que se une a un epítipo IL-2 humano diferente que NARA1 y MAB602. El chip descrito en la Figura 7 recubierto con NARA1 y MAB602 fue reutilizado. La regeneración del chip se realizó usando glicina 10 mM, pH 2,5, 30 mL/min, 60 s. Se añadió IL-2 humana a una concentración de saturación (1 mM), a razón de 100 mL/min, 120 s de asociación y 0 s de disociación. Inmediatamente después de la asociación de IL-2 a los anticuerpos, se agregaron los segundos analitos a razón de 100 mL/min, 120 s de asociación y 240 s de disociación. Las concentraciones utilizadas para la unión cruzada fueron: MAB602:50 nM; NARA1:50 nM; control positivo:50 nM; CD25-Fc:500 nM; CD122: 138 nM. Cuando hIL-2 se une a NARA1, un anticuerpo anti-hIL-2 que reconoce un epítipo diferente de hIL-2 (en el presente documento denominado 'control positivo') se une fuertemente al complejo hIL-2/NARA1 como se esperaba (línea verde en la Figura 8). Alternativamente, IL-2Ra (en la forma de CD25-Fc) no puede unirse a hIL-2 cuando hIL-2 ya está unido a NARA1 (línea rosa, Figura 8), sin embargo, IL-2R β (CD122) todavía se une a hIL-2 cuando hIL-2 ya está unido a NARA1 (línea naranja, Figura 8).

La Figura 9 muestra las curvas de unión de resonancia de plasmón superficial de los anticuerpos monoclonales MAB602 (gráfico superior) y NARA1 (gráfico inferior) a IL-2 murina. El mismo chip usado para la generación de los datos en las Figuras 7 y 8 fue reutilizado. La regeneración del chip se realizó con glicina 10 mM, pH 2,5, 30 mL/min, 60 s. La IL-2 de ratón (mIL-2) o la IL-2 humana (hIL-2) comenzando a 10 nM y luego haciendo una dilución triple se inyectó a 100 mL/min, 120 s de asociación, 5 y 240 s de disociación. En el gráfico superior, MAB602 muestra reactividad cruzada al unirse a IL-2 de ratón. Especialmente, con concentraciones más altas de interleucina 2 murina (>1 nM) las curvas de unión difieren significativamente de los niveles de fondo con 10 unidades de respuesta (RU) muy superiores a 10. Mientras que NARA1 (gráfico inferior) no muestra reactividad cruzada medible con IL-2 murina en todas las concentraciones probadas.

La Figura 10 proporciona una visión general de la estructura tridimensional del complejo Proleucina/Fab-NARA1 como se obtuvo en el Ejemplo 1.

La Figura 11 proporciona un análisis adicional de los residuos del epítipo. El eje X enumera la secuencia de aminoácidos y la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. El lado superior del eje Y muestra el número total de átomos de NARA1-Fab que están dentro de 4 Å del residuo correspondiente de Proleucina y el lado inferior del eje Y muestra el área reducida accesible al solvente (Å²) del residuo correspondiente de Proleucina como consecuencia de la unión a NARA1-Fab.

La Figura 12 ilustra el residuo de epítipo más crítico reconocido por el NARA1-Fab.

La Figura 13 muestra la superposición del complejo Proleucina/NARA1-Fab con el complejo cuaternario IL-2/CD25/CD122/CD132.

La Figura 14 muestra la superposición de las hélices C de IL-2_C145A (PDB: 3INK), Superquina (PDB:3QB1), IL-2/CD25/CD122/CD132 (PDB: 2B5I) y Proleucina/NARA1-Fab.

Descripción detallada de la invención

Hasta ahora, no se dispone de anticuerpos monoclonales adecuados para la invención divulgada. Los inventores divulgan sus mAb anti-IL-2 humanos que permiten las siguientes etapas cruciales hacia el uso y comercialización de esta tecnología en aplicaciones clínicas:

- Secuenciación adicional y caracterización fina de los mAb anti-IL-2 humanos.
- Humanización de los mAb anti-IL-2 humanos, que es esencial para evitar (o minimizar) la inmunogenicidad en pacientes.
- Generación de diferentes formatos de mAb anti-IL-2 humanos, como IgG, IgG1, IgG4, Fab y Fv de cadena sencilla (scFv).
- Generación de una proteína de fusión que consiste en IL-2 humana y un mAb anti-IL-2 humano (o un fragmento del mAb anti-IL-2 humano): tal constructo tiene la ventaja de consistir en un solo componente, en lugar de dos como en IL-2 unido a un mAb anti-IL-2 humano.

Los inventores han generado y caracterizado mAb anti-IL-2 humanos específicos que pueden unirse a IL-2 humana y, cuando se prueban en ratones, pueden ejercer una estimulación específica y potente de linfocitos citotóxicos, incluidas Células T CD8+ y células asesinas naturales (NK). Con estos fines, se tuvieron que superar varias dificultades.

- IL-2 humana muestra una gran similitud con IL-2 de ratón y rata, por lo que IL-2 humana puede estimular los linfocitos de ratón *in vitro* e *in vivo*. Además, IL-2 está presente en altas concentraciones en los órganos inmunes primarios (tales como la médula ósea), razón por la cual la IL-2 es un antígeno "prohibido", lo que significa que es

muy difícil generar respuestas de células B que conduzcan a la neutralización de anticuerpos contra IL-2. Sin embargo, los inventores pudieron producir respuestas de anticuerpos anti-IL-2 humanos policlonales, después de la inmunización de ratones C57BL/6 usando IL-2 humana recombinante purificada más adyuvante.

- De las respuestas de anticuerpos generadas, solo algunos mAb se unieron eficientemente a IL-2 (denominados "aglutinantes") y de esos solo aproximadamente el 0,35% interactuaron con el supuesto sitio activo de IL-2.
- Finalmente, de estos mAb anti-IL-2 humana, algunos mostraron la actividad específica y potente deseada *in vivo* como se evaluó mediante ensayos especializados *in vivo* en ratones que no son reemplazables por experimentos *in vitro*.

Los inventores han desarrollado ensayos de cribado específicos que permiten la detección de anticuerpos anti-IL-2 humanos específicos (denominados "aglutinantes") en el suero de animales inmunizados y en el sobrenadante de los clones de células B obtenidos después de la fusión del hibridoma de células B. En una segunda etapa, se discriminó entre aglutinantes estándar y aquellos dirigidos a un presunto epítipo específico de la molécula de IL-2 humana. En las Figuras 1 a 3 se muestra un ejemplo de un ensayo inmunsorbente ligado a enzimas (ELISA) *in vitro* realizado con diferentes clones de células B.

Después del cribado *in vitro* de los mAb anti-IL-2 humanos, estos mAb se caracterizaron *in vivo*. Con este fin y para obtener cantidades suficientes de mAb, los mAb se concentraron a partir del sobrenadante de los hibridomas, la cantidad se estimó usando un ELISA y finalmente los mAb anti-IL-2 humanos se probaron en ratones. Los resultados obtenidos en la proliferación y expansión de células T CD8+ y células NK se muestran en las Figuras 4 a 6.

Con el fin de caracterizar las propiedades de unión de los mAb anti-IL-2 humanos, se probó la unión a la interleucina 2 humana con ensayos de unión de resonancia de plasmón superficial. El mAb anti-IL-2 humano comercialmente disponible MAB602 se midió como comparación. En la Figura 7 se muestran curvas de unión de MAB602 (gráfico izquierdo) y NARA1 (un anticuerpo de acuerdo con esta invención; gráfico derecho) a interleucina 2 humana a diferentes concentraciones. La constante de disociación (K_D) así como las constantes de velocidad $K_{\text{asociación}}$ y $K_{\text{disociación}}$ medidas para MAB602 y NARA1 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tabla 1: Propiedades de unión de mAb anti-IL-2 humanos a IL-2 humana

	$K_{\text{asociación}} (M^{-1}s^{-1})$	$K_{\text{disociación}} (s^{-1})$	$K_D (nM)$
MAB602	58×10^4	$4,94 \times 10^4$	9,7
NARA1	$1,78 \times 10^4$	$2,08 \times 10^{-5}$	1,2

Ejemplos

Los anticuerpos de la invención incluyen el anticuerpo NARA1, que se derivó, aisló y caracterizó estructuralmente por su cadena pesada de longitud completa de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 y sus secuencias de aminoácidos de cadena ligera de longitud completa de acuerdo con la SEQ ID NO: 6.

Las regiones variables correspondientes, las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L de NARA1 son: la SEQ ID NO: 19 (pesada variable) y la SEQ ID NO: 20 (ligera variable).

Las secuencias de codificación de nucleótidos de cadenas ligera y pesada de longitud completa de NARA1 son la SEQ ID NO: 3 (secuencia de codificación de cadena pesada, que incluye la secuencia líder) y la SEQ ID NO: 4 (secuencia de codificación de cadena ligera, que incluye la secuencia líder).

Las secuencias de codificación de nucleótidos de cadenas ligera y pesada variables de NARA1 son la SEQ ID NO: 21 (secuencia de codificación pesada variable) y la SEQ ID NO: 22 (secuencia de codificación ligera variable).

Las regiones CDR de NARA1 se delinear usando el sistema de Kabat (Kabat, EA, et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU., Publicación del NIH No. 91-3242, véase también Zhao & Lu 2009, Molecular Immunology 47: 694-700). Por facilidad de lectura, cuando las regiones CDR se delinear de acuerdo con la definición de Kabat, se denominan en lo sucesivo HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 respectivamente. Las regiones CDR de NARA1 son: HCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, HCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, HCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, LCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, LCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, LCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.

Las secuencias de codificación de nucleótidos para las regiones CDR de NARA1 son: secuencia de codificación HCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 13, secuencia de codificación HCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 14, secuencia de codificación HCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 15, secuencia de codificación LCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 16, secuencia de codificación LCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 17, secuencia de codificación LCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 18.

Las proteínas de fusión también se proporcionan de acuerdo con la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24. La SEQ ID NO: 23 es una proteína de fusión que comprende la cadena pesada variable de NARA1 con su extremo terminal N

fusionado al extremo terminal C de hIL-2 a través de un enlazador GxS. La SEQ ID NO: 24 es una proteína de fusión que comprende la cadena ligera variable de NARA1 con su extremo terminal N fusionado al extremo terminal C de hIL-2 a través de un enlazador GxS.

5 (a) Ejemplo 1. Estructura cristalina de NARA1

(i) Material y métodos

10 Se determinó la estructura compleja de un mutante de interleucina 2 humana (SEQ ID NO: 2), llamada "Proleucina", unida al fragmento Fab del anticuerpo "NARA 1" (SEQ ID NO: 5 y 6). La numeración resultante de los residuos en la Proleucina se da de acuerdo con la numeración de IL-2 de tipo silvestre.

Como se discutirá en detalle a continuación, las diferencias en la secuencia entre Proleucina y hIL-2 de tipo silvestre son irrelevantes y la Proleucina es un modelo válido para el análisis estructural de hIL-2.

15 Para definir el epítipo, se usó cristalografía de rayos X para resolver la estructura a nivel atómico del complejo mencionado anteriormente. La cristalografía de rayos X es una tecnología que se ha vuelto rutinaria y ampliamente utilizada para generar datos estructurales para biomoléculas, incluidos los anticuerpos y sus complejos con antígenos (Adams et al., (2013) Annual Review Biophysics 42: 265-287; Garman, (2014) Science 343: 1102-1108; Joachimiak, (2009) Current Opinion Structural Biology 19: 573-584.)

20 El antígeno, Proleucina, está disponible comercialmente como un polvo liofilizado junto con excipientes (cada 1 mg de Proleucina se mezcla con aproximadamente 50 mg de manitol, 0,18 mg de dodecilsulfato de sodio, 0,173 mg de dihidrógeno fosfato de sodio y 0,89 mg de hidrógeno fosfato disódico). Antes de usarse para la formación del complejo, la Proleucina se purificó por HPLC de fase inversa para eliminar los excipientes.

30 El fragmento Fab de NARA1 (NARA1-Fab) se generó por escisión con papaína del anticuerpo de longitud completa seguido por cromatografía de proteína A. En resumen, se mezclaron 6,5 mL de NARA1 de longitud completa (9 mg/mL en tampón de citrato 50 mM con cloruro de sodio 90 mM a pH 7,0) con DTT 5 mM y 590 µg de papaína (Roche). La reacción de escisión se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 h y se detuvo mediante la adición de 15 µL de solución E64 56 mM (Roche). La solución de escisión se diluyó 10 veces con Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 8,0 y se cargó en una columna de proteína A de 5 mL (GE Healthcare) equilibrada con un 5 volúmenes de columna de Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 8,0 y el fragmento Fab estaba en la fracción de carga y el fragmento Fc se unió a la columna de proteína A.

35 Para formar el complejo, se disolvió el polvo de Proleucina después de la HPLC en H₂O a la concentración de 5,5 mg/mL. Se añadieron 6,6 mg de Proleucina en exceso a 11,5 mg de solución del fragmento Fab de NARA1 gota a gota. La centrifugación se usó para eliminar el exceso de Proleucina que se precipitó bajo las condiciones actuales. El complejo se purificó luego por filtración en gel con Superdex 200, 10 x 300 (GE Healthcare) con tampón de proceso de Tris 25 mM, NaCl 25 mM, pH 7,4.

40 El complejo proleucina/NARA1-Fab después de filtración en gel se concentró hasta 14 mg/mL y se cribó mediante el método de difusión de vapor como gotas asentadas. La solución de proteína se mezcló 1:1 con tampón de reserva hasta un tamaño total de 0,4 µL. Los experimentos se configuraron con el sistema robótico Phoenix (Art Robbins Instruments), se almacenaron en un hotel RockImager (Formulatrix) a 19 °C y se tomaron imágenes automáticamente. Los cristales se recolectaron 4 días después del cribado bajo condiciones de polietilenglicol 3350 al 20% p/v y nitrato de sodio 0,2 M. Los cristales se crioprotegieron con tampón de reserva que contenía 10% de glicerol y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido antes de la recopilación de datos. Los datos de difracción se recolectaron con la Swiss Light Source (Villigen, Suiza) en la línea del haz PX-II con un detector de píxeles Pilatus usando una longitud de onda de radiación de rayos X de 0,99998 Å.

45 El conjunto de datos se procesó con XDS y XSCALE (versión 6 de diciembre de 2010) y la estructura se resolvió con el método de reemplazo molecular con el programa PHASER usando la entrada del banco de datos de proteínas "3INK" como modelo de búsqueda para IL-2 y la entrada del Banco de Datos de Proteínas "3TTI" como modelo de búsqueda del fragmento Fab. La construcción y el refinamiento de modelos iterativos se realizaron con los programas Coot (Kit de herramientas orientado al objetivo cristalográfico) y AUTOBUSTER (Bricogne et al., 2011). Todas las Figuras se generaron con el programa PyMOL (Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA; <http://www.pymol.org>).

60 Los residuos de epítipos se definen como aquellos residuos de Proleucina que están dentro de una distancia de 4 Å de cualquier átomo en el fragmento Fab de NARA1 y se confirman aún más por el programa CCP4 CONTACT y AREAIMOL (Collaborative Computational Project, Número 4, versión 6.4.0). De manera similar, los residuos de parátipo se definen como aquellos residuos de NARA1-Fab que están dentro de una distancia de 4 Å de cualquier átomo en la Proleucina.

65 (ii) Resultados

El complejo Proleucina/NARA1-Fab se resolvió a 1,95 Å en el grupo espacial C 1 2 1 con una dimensión de celda unitaria $a = 201,8$ Å, $b = 36,2$ Å, $c = 88,7$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 102,9^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. Por favor consulte la Tabla 2 para obtener estadísticas detalladas de la estructura. En cada unidad asimétrica, existe una molécula del complejo.

5

Tabla 2. Estadísticas de estructura para el complejo Proleucina/NARA1-Fab

Recolección de datos	
Grupo espacial	C1 2 1
Dimensiones de la celda	
a, b, c (Å)	201,757; 36,233; 88,707
a, b, g (°)	90; 102,93; 90
Resolución (Å)	58,74-1,95
R _{fusion}	0,066 (0,472)
I/ σ	14,18 (2,59)
Integridad (%)	84,8 (96)
Redundancia	3,19
Refinamiento	
Resolución (Å)	58,74-1,95
No. de reflexiones	34750
R _{trabajo} /R _{libre}	0,2052/0,2872
Gráfico de Ramachandran	
Delineadores	0,0162
Permitido	0,0378
Favorecido	0,9459
Desviaciones cuadráticas medias	
Longitudes de enlace (Å)	0,01
Ángulos de enlace (°)	1,7

1) Análisis de epítomos y parátomos

10 La Figura 10 proporciona la visión general de la estructura tridimensional del complejo Proleucina/Fab-NARA1 como la obtenida en el Ejemplo 1. La cadena ligera del fragmento Fab de NARA1 se designa como A, la cadena pesada del fragmento Fab de NARA1 se muestra como B, los residuos de los epítomo reconocidos por NARA1-Fab se designan como D, y Proleucina se designa como C y se resalta la mutación, C145S.

15 La Figura 11 proporciona un análisis adicional de los residuos de epítomos. El eje X enumera la secuencia de aminoácidos y la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. El lado superior del eje Y demuestra el número total de átomos de NARA1-Fab que están dentro de 4 Å del residuo correspondiente de Proleucina y el lado inferior del eje Y demuestra el área reducida accesible al solvente (Å²) después de la unión a NARA1-Fab.

20 La proleucina usada en el Ejemplo 1 contiene la mutación de C145S. Como se muestra en la Figura 10, C145S está muy lejos de la región del epítomo. Además, la superposición de átomos de C α entre Proleucina en el Ejemplo 1 con átomos de C α de hIL-2 de tipo silvestre en el complejo con CD25, CD122 y CD132 (PDB: 2B5I) muestra la desviación cuadrática media de 0,447 Å, lo que indica que la mutación no perturba toda la estructura. Por lo tanto, la Proleucina con la mutación C145S es un modelo válido para el análisis estructural para hIL-2 de tipo silvestre.

25 La hIL-2 es una proteína de haz de 4 hélices y las 4 hélices se nombran desde el extremo terminal N al extremo terminal C como A, B, C y D, respectivamente. El epítomo reconocido por NARA1-Fab como se muestra en la Figura 10 es un epítomo conformacional y abarca dos regiones como se muestra en la Figura 11: una región (N50-K63) comprende un bucle y una hélice corta y conecta las hélices A y B, y la otra región (N91-N97) comprende un bucle y conecta las hélices B y C.

Los residuos de epítomos junto con los residuos de parátomos que interactúan de NARA1-Fab se resumen en la Tabla 3. Entre todos los residuos de epítomos, Arg58 como se muestra en la Figura 11 es el residuo de epítomo más crítico para la unión con NARA1-Fab, ya que este residuo solo tiene 42 átomos que interactúan de NARA1-Fab y representa el 17,7% del área de superficie total reducida accesible al disolvente como consecuencia de la unión a NARA1-Fab. Además, Arg58, como se muestra en la Figura 12, forma dos puentes salinos fuertes con Glu35 de HCDR1 y con Asp100 de LCDR3, respectivamente. Arg58 también hace interacción de acción π con el anillo aromático de Try100 de LCDR3. Los residuos K52, P54, K55, T57, T61, F62, K63, Q94 y K96 también se consideran importantes para la unión a NARA1-Fab, ya que todos muestran igual a/más de 5 átomos que interactúan de NARA1-Fab y mayores que 30 Å² del área reducida accesible al disolvente como se muestra en la Figura 11.

35

40

Tabla 3. Resumen de epítomos y parátomos

Residuo de cadena ligera	Residuo del epítipo	Residuo de cadena pesada
Y31	N50	
Y31	K52	
Y31	N53	
Y31, Y36, S95, N96	P54	
	K55	W99, G101, G103, Y105
D98	T57	
D98, Y100	R58	L33, E35, W47, W99
	T61	N52, S55, N59
	F62	L33, N52
	K63	S55
	N91	G101, D102, G103
	L92	W99, G101
	A93	G101
	Q94	D102, G103, Y104
D32, D34	K96	Y104
D32	N97	

La Figura 12 ilustra Arg58 como el residuo del epítipo más crítico reconocido por NARA1-Fab. A representa Proleucina, B representa la cadena pesada y C representa la cadena ligera. Los residuos involucrados se muestran como barras.

5

2) propiedades de unión de NARA1-Fab

La Figura 13 muestra la superposición del complejo Proleucina/NARA1-Fab con el complejo cuaternario IL-2/CD25/CD122/CD132. La estructura del complejo cuaternario proviene de la entrada PDB "2B5I" con el dibujo D en color cian pálido que representa hIL-2 de tipo silvestre, el dibujo B en rojo que representa CD122, el dibujo C en azul que representa CD132 y la superficie A en verde que representa CD25. En la estructura del complejo Proleucina/NARA1-Fab, el dibujo D en color cian superpuesto con hIL-2 tipo silvestre representa la Proleucina, el dibujo E en magenta representa la cadena pesada y el dibujo F en amarillo representa la cadena ligera.

10

La superposición de la estructura de los dos complejos, como se muestra en la Figura 13, muestra claramente que NARA1-Fab forma una competencia directa contra CD25 pero no contra CD122/CD132, lo que es consistente con la observación de que el complejo IL-2/NARA1 demuestra principalmente actividad pro células T efectoras en lugar de actividad pro células T reguladoras.

15

3) La hélice C de Proleucina en complejo con NARA1-Fab adopta una conformación similar a aquella del complejo cuaternario

20

La Figura 14 muestra la superposición de hélices C de IL-2_C145A (PDB: 3INK), Superquina (PDB: 3Q81), IL-2/CD25/CD122/CD132 (PDB: 2B5I) y Proleucina/NARA1-Fab.

La interfaz polar entre la hélice C en IL-2 y CD122 juega un papel importante en la unión entre las dos partes (Wang et al., (2005) Science 310: 1159-1163). En 2012, Levin et al., demostraron que la superquina, en un mutante de IL-2, solo tiene una hélice C que adopta una confirmación similar a la del complejo cuaternario y la superquina mostró una afinidad de unión 215 veces mayor hacia CD122 que IL-2 de tipo silvestre (Levin et al., (2012) Nature 484: 529-533). Se observó que dicho cambio conformacional en la hélice C está asociado con la estabilización conformacional, que luego reduce las penalizaciones energéticas por la unión a CD122. Como se muestra en la Figura 14, la conformación de la hélice C de Proleucina en complejo con NARA1-Fab también es similar a la observada en Superquina así como en el complejo cuaternario IL-2/CD25/CD122/CD132, por lo tanto, es posible que el complejo Proleucina/NARA1-Fab puede demostrar una mayor afinidad de unión hacia CD122 de lo que lo hace hIL-2 tipo silvestre.

25

30

(b) Ejemplo 2. Mapeo lineal de péptidos de NARA1 y MAB602

35

Con el fin de mapear el epítipo de los anticuerpos NARA1 y MAB602, se generó una primera biblioteca de péptidos de 15 mer con base en la secuencia de IL2 humana. También se generó una segunda biblioteca de péptidos seleccionados de 15 mer con base en la mutación de 3 residuos específicos F(62), Y(65) y L(92). Las últimas mutaciones se realizaron con base en la muteína Roche/Glycart IL2, como se describe en el documento WO2012/107417A1 que tiene estas 3 mutaciones. El trabajo previo realizado en el laboratorio Boyman (no publicado) demostró que el mAb comercial 602 anti-IL-2 humano de ratón con función análoga a la de A1 ha reducido fuertemente la unión al mutante F42A de IL-2 (uno de los sitios de acoplamiento de IL-2 a CD25).

40

(i) Material y métodos

45

Por consiguiente, cada péptido en la primera biblioteca tiene 15 aminoácidos y la secuencia se obtiene escaneando la secuencia de interés (véase Tabla 4, péptidos de referencia 1 a 41) con una etapa de 3 residuos, comenzando desde el extremo terminal N. Por lo tanto, se genera una escalera y cada péptido contiene 12 residuos superpuestos con el péptido anterior y 12 residuos superpuestos con el siguiente péptido en la escalera. En total, se generaron 41 péptidos a partir de la secuencia de IL-2 humana expresada.

Se generó una segunda biblioteca de péptidos mutando F(62), Y(65) y L(92) a alanina en todos los péptidos correspondientes en la primera biblioteca generada como se describió anteriormente (véase la Tabla 4, péptidos de referencia no 42 a 60).

Para ambas bibliotecas, las cisteínas parentales han sido reemplazadas por una serina (residuos subrayados) para evitar la unión inespecífica.

Tabla 4. Biblioteca de péptidos de referencia

Péptido de referencia No.	Secuencia. Los residuos en negrita son la Alanina (A) que reemplaza residuos específicos. Los residuos son la serina (S) que reemplaza las cisteínas (C)
1	APTSSSTKKTQLQLE
2	SSSTKKTQLQLEHLL
3	TKKTQLQLEHLLLDL
4	TQLQLEHLLLDLQMI
5	QLEHLLLDLQMLNG
6	HLLLDLQMLNGINN
7	LDLQMLNGINNYKN
8	QMILNGINNYKNPKL
9	LNGINNYKNPKLTRM
10	INNYKNPKLTRMLTF
11	YKNPKLTRMLTFKFY
12	PKLTRMLTFKFYMPK
13	TRMLTFKFYMPKKAT
14	LTFFKFYMPKKATELK
15	KFYMPKKATELKHLQ
16	MPKKATELKHLQSLE
17	KATELKHLQSLEEEEL
18	ELKHLQSLEEEELKPL
19	HLQSLEEEELKPLEEV
20	SLEEEELKPLEEVLNL
21	EELKPLEEVLNLAQS
22	KPLEEVLNLAQSKNF
23	EEVLNLAQSKNFHLR
24	LNLAQSKNFHLRPRD
25	AQSKNFHLRPRDLIS
26	KNFHLRPRDLISNIN
27	HLRPRDLISNINVIV
28	PRDLISNINVIVLEL
29	LISNINVIVLELKGS
30	NINVIVLELKGSETT
31	VIVLELKGSETTFMS
32	LELKGSETTFMSEYA
33	KGSETTFMSEYADET
34	ETTFMSEYADETATI
35	FMSEYADETATIVEF
36	EYADETATIVEFLNR
37	DETATIVEFLNRWIT
38	ATIVEFLNRWITFSQ
39	VEFLNRWITFSQSII
40	LNRWITFSQSIISTL
41	NRWITFSQSIISTLT
42	INNYKNPKLTRMLTA

43	YKNPKLTRMLTAKFY
47	YKNPKLTRMLTFKFA
52	YKNPKLTRMLTAKFA
44	PKLTRMLTAKFYMPK
48	PKLTRMLTFKFAMPK
53	PKLTRMLTAKFAMPK
45	TRMLTAKFYMPKKAT
49	TRMLTFKFAMPKKAT
54	TRMLTAKFAMPKKAT
46	LTAKFYMPKKATELK
50	LTFKFAMPKKATELK
55	LTAKFAMPKKATELK
51	KFAMPKKATELKHLQ
56	SLEELKPLEEVLNA
57	EELKPLEEVLNAAQS
58	KPLEEVLNAAQSKNF
59	EEVLNAAQSKNFHLR
60	ANLAQSKNFHLRPD

Ambos conjuntos de péptidos se imprimieron en portaobjetos de microarreglos por triplicado, se incubaron con los anticuerpos de interés (MAB602 y NARA1) y los anticuerpos de control. Las incubaciones adicionales son con anticuerpos no relacionados del mismo isotipo (control de ratón IgG2a/lambda y control de ratón IgG2a/Kappa) y anticuerpos secundarios (anti-IgG de ratón (Thermo 84545, etiqueta DL650) o anti-IgG de ratón (JIR 115-175-072, Etiqueta Cy5)) para evaluar la unión inespecífica debido al anticuerpo de detección. Los experimentos se realizaron esencialmente como se describe en MaKsimov P, et al., 2012, PLoS One 7: e34212. doi: 10.1371/journal.pone.0034212.

La determinación de la unión péptido-anticuerpo se realizó mediante análisis RepliTope en la que el microarreglo de péptidos (triplicado) se incubó con el anticuerpo primario seguido de un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente dirigido contra la parte Fc del primario. Todas las etapas se realizaron en una estación de procesamiento de microarreglos TECAN que permite etapas de incubación y lavado altamente confiables y reproducibles. Después de realizar las etapas de incubación y posteriores a las etapas finales de lavado (para eliminar los anticuerpos secundarios no unidos), los microarreglos se secaron usando una corriente de nitrógeno y se escanearon en un sistema de escaneo de microarreglos de alta resolución con ajustes de longitud de onda apropiados. Las incubaciones de control se realizaron con un anticuerpo no relacionado que tenía el mismo isotipo para excluir señales positivas falsas.

Las imágenes resultantes se analizaron y cuantificaron utilizando el software de reconocimiento de puntos GenePix (Molecular Devices). Para cada punto, se extrajo la intensidad media de la señal (entre 0 y 65535 unidades arbitrarias). Para una evaluación adicional de los datos, se determinaron los valores de MMC2. El MMC2 es igual al valor medio de las tres instancias en el microarreglo. Excepto que el coeficiente de variación (CV), desviación estándar dividido por el valor medio, es mayor 0,5, en este caso la media de los dos valores más cercanos (MC2) se asigna a MMC2.

(ii) Resultados

Los datos se resumen en la Tabla 5.

El anticuerpo anti-IL2 (NARA1) no mostró ninguna reactividad significativa hacia los péptidos inmovilizados. Solo el péptido 10 exhibió una respuesta débil, sin embargo, este péptido también fue débilmente reconocido por los anticuerpos de control de ratón.

El anticuerpo comercial MAB602 (mIgG2a) proporcionó algunas señales débiles en el péptido 22 a 26 y algunas fuertes para los péptidos 10 a 13.

Tabla 5. Resultado del mapeo de epítomos lineales

Péptido de referencia no.	Secuencia	Intensidad de señal para MAB602 después de restar la señal de control (AU)	Intensidad de señal para NARA1 después de restar la señal de control (AU)
10	INNYKNPKLTRMLTF	45954	20883
11	YKNPKLTRMLTFKFY	49726	1189
12	PKLTRMLTFKFYMPK	28849	1127
13	TRMLTFKFYMPKKAT	5250	224

22	KPLEEVLNLAQSKNF	4998	0
23	EEVLNLAQSKNFHLR	13287	32
24	LNLAQSKNFHLRPRD	3289	282
25	AQSKNFHLRPRDLIS	5220	0
26	KNFHLRPRDLISNIN	7509	0

Se considera que las secuencias superpuestas dentro de ambos conjuntos de péptidos contienen el aminoácido de unión al anticuerpo objetivo (Tabla 5). Un tramo es un aglutinante fuerte para MAB602 mientras que el otro es más bien un aglutinante débil para MAB602:

5

Fuerte: (57) TRMLTF (62)
Más débil: (96) KNF (98)

La mutación Ala en los residuos específicos F42(62), Y45(65), L72(92) mostró que el residuo F42(62) es claramente un residuo importante para la unión al anticuerpo MAB602 (Tabla 6).

10

Tabla 6. Caracterización de la mutagénesis.

Péptido de referencia No.	Los residuos de secuencia en negrita son la Alanina (A) que están reemplazando residuos específicos	Intensidad de la señal para MAB602 después de restar la señal de control (AU)	Intensidad de la señal para NARA1 después de restar la señal de control (AU)
10	INNYKNPKLTRMLTF	45954	20883
42	INNYKNPKLTRML TA	246	162
11	YKNPKLTRMLTFKFY	49726	1189
43	YKNPKLTRML AK FY	42784	507
47	YKNPKLTRMLTFK FA	21382	251
52	YKNPKLTRML AKFA	13089	238
12	PKLTRMLTFKFYMPK	28849	1127
44	PKLTRML AK FYMPK	5027	432
48	PKLTRMLTFKF AMPK	13394	6205
53	PKLTRML AKFAMPK	0	24
13	TRMLTFKFYMPKKAT	5250	224
45	TRML AK FYMPKKAT	0	0
49	TRMLTFKF AMPK KAT	3018	1492
54	TRML AKFAMPK KAT	0	0

15 Listado de secuencias

Los aminoácidos útiles y las secuencias de nucleótidos para practicar la invención se encuentran en la Tabla 7.

Tabla 7. Listado de secuencias

SEQ ID NÚMERO	Región Ab	Secuencia
SEQ ID NO: 1	IL-2 Humana	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMI ¹ LNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLT
SEQ ID NO: 2	Proleucina	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMI ¹ LNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
Anticuerpo 1		

SEQ ID NÚMERO	Región Ab	Secuencia
SEQ ID NO: 3	Cadena pesada de ADN	ATGGAATGGAGCGGAGTCTTTATCTTTCTCCTGTCAG TAACTGCAGGTGTTCACTCCCAGGTCCAGCTGCAGCA GTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCCTGGGACTTCAGTG AAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCCTTCACTA ATTACTTGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCCTGGACA GGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGT GGTGGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGG CAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTA CATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCG GTCTATTTCTGTGCAAGATGGAGGGGGGATGGTTACT ACGCGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGT CACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTC TATCCACTGGCCCCGTGTGTGTGGAGATACAACCTGGCT CCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGGTCAAGGGTTATTT CCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTCGGATCC

(continuación)

Anticuerpo 1		
		CTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTCTGC AGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGT AACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGC AATGTGGCCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACA AGAAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTG TCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGT GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGG ATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATG TGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTC CAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACA CAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAG TACTCTCCGGGTGGTCACTGCCCTCCCATCCAGCAC CAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGG TCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAAC CATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAG GTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA AGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTT CATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAAC GGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAG TCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAA GCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAAT AGCTACTCCTGTTCACTGGTCCACGAGGGTCTGCACA ATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGG TAAATGA
SEQ ID NO: 4	Cadena ligera de ADN	ATGGAGACAGACACAATCCTGCTATGGGTGCTGCTGC TCTGGGTTCAGGCTCCACTGGTGACATTGTGCTGAC CCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTTAGGGCAG AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTTG ATTATGATGGTGATAGTTATATGAACTGGTACCAACA GAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGCT GCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACAT CCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTAC TGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACACGTTCCGGAG GGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGC ACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAG TTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGA ACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAA GATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTCTGAAC AGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACA GCATGAGCAGCACCTCAGCTTGACCAAGGACGAGTA TGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCAC AAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACA GGAATGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 5	Cadena pesada	MEWSGVFIFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSV KVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPQGLEWIGVINPGS GGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSA VYFCARWRGDGYAYFDVWGAGTTVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLG GPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDV QISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSEKFEKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 6	Cadena ligera	METDTILLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQ RATISCKASQSDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYA ASNLESGIPARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYY CQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVISIFPPSSEQ LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNREK

ES 2 779 977 T3

SEQ ID NO: 7 (Kabat)	HCDR1	NYLIE
SEQ ID NO: 8 (Kabat)	HCDR2	VINPGSGGTNYNEKFKG
SEQ ID NO: 9 (Kabat)	HCDR3	WRGDGYAYFDV
SEQ ID NO: 10 (Kabat)	LCDR1	KASQSVDDYDGDSYMN
SEQ ID NO: 11 (Kabat)	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 12 (Kabat)	LCDR3	QQSNEDPYT
SEQ ID NO: 13	HCDR1 ADN	AATTACTTGATAGAG
SEQ ID NO: 14	HCDR2 ADN	GTGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTAACTACAATG AGAAGTTCAAGGGC
SEQ ID NO: 15	HCDR3 ADN	TGGAGGGGGGATGGTTACTACGCGTACTTCGATGTC
SEQ ID NO: 16	LCDR1 ADN	AAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTT ATATGAAC
SEQ ID NO: 17	LCDR2 ADN	GCTGCATCCAATCTAGAATCT
SEQ ID NO: 18	LCDR3 ADN	CAGCAAAGTAATGAGGATCCGTACACG
SEQ ID NO: 19	VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWV KQRPQGQLEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCARWRGDGYAYFDVW GAGTTVTVSS
SEQ ID NO: 20	VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYM NWYQQKPGQPPKLLIYAASNLESIGIPARFSGSGSGTD FTLNHPVEEEDAATYYCQQSNEDPYTFGGGKLEIK
SEQ ID NO: 21	VH de ADN	CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAA GGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTC TGGATACGCCCTTCACTAATTACTTGATAGAGTGGGTA AAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAG TGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTAACTACAATGA GAAGTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAA TCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGA CATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATG GAGGGGGGATGGTTACTACGCGTACTTCGATGTCTGG GGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 22	VL de ADN	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTG TGCTCTAGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGC CAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATATG AACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAAC TCCTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGAT CCCAGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC TTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATG CTGCAACCTATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCC GTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAAAAA

SEQ ID NO: 23	Fusión de cadena pesada	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGQVQLQQSGAELVRPG TSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVIN PGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSD DSAVYFCARWRGDGYAYFDVWGAGTTVTVSSAKTTA PSVYPLAPVCGDFTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN LLGGPSVFIFFPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDD PDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALP IQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVR APQVYVLPPEEEEMTKKQVTLTCMVTDFFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWV ERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
SEQ ID NO: 24	Fusión de cadena ligera	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLEHL LLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINV IVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSI ISTLTGGGGSGGGSGGGSGGGDIVLTQSPASLAVSL GQRATISCKASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLI YAASNLESIGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAAT YYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRADAAPT VSIFFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGV LNSWTDQDSKDSYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA THKTSTSPIVKSFNRNEC

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno específico de interleucina 2 humana (hIL-2) que comprende HCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, HCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, HCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, LCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, LCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, LCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, en el que la unión de dicho anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno, a hIL-2 inhibe la unión de hIL-2 a CD25, y la unión a hIL-2 se caracteriza por una constante de disociación (K_D) $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L determinada en un ensayo de unión de resonancia de plasmón superficial.
2. El anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la unión a hIL-2 se caracteriza por una tasa de disociación ($K_{\text{disociación}}$) $\leq 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $\leq 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $\leq 3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o $\leq 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.
3. El anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo, o fragmento del mismo de unión a antígeno, no muestra reactividad cruzada medible a IL-2 murina.
4. El anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque comprende al menos una secuencia de VH y/o una secuencia de VL que tiene una identidad de $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 19 o 20.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se une a un epítipo de interleucina 2 humana (hIL-2) que comprende los aminoácidos K52, P54, K55, T57, R58, T61, F62, K63, Q94 y K96.
6. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el epítipo comprende además uno cualquiera o más de los aminoácidos N50, N53, N91, L92, A93, N97.
7. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
8. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7, en la que dicha molécula de ácido nucleico tiene una identidad de secuencia $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con las SEQ ID NOS: 3 o 4.
9. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende la secuencia de las SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21 o 22, o una secuencia que tiene una identidad de $\geq 80\%$, $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con cualquiera de las SEQ ID NOS: 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21 o 22.
10. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 7, 8 o 9.
11. Una célula que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, 8 o 9, o que expresa la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, 8 o 9.
12. Una célula capaz de producir un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de interleucina 2 humana (hIL-2), o un fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4.
13. Una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales caracterizada porque dichos anticuerpos producidos son aquellos de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Una formulación terapéutica para su uso en el tratamiento del cáncer o infecciones virales, que comprende:
 - a. el anticuerpo monoclonal (mAb) hIL-2, o el fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y
 - b. interleucina 2 humana.
15. El anticuerpo monoclonal específico de interleucina 2 humano (hIL-2), o el fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de cáncer o infecciones virales, en el que el anticuerpo, o fragmento del mismo de unión a antígeno se administra junto con interleucina 2 humana.
16. Una formulación terapéutica para su uso en el tratamiento del cáncer o infecciones virales, que contiene una proteína de fusión que comprende:

- 5 a. un fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 que comprende HCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, HCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, HCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, LCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, LCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, LCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, en el que la unión a hIL-2 se caracteriza por una constante de disociación (K_D) $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L determinada en un ensayo de unión de resonancia de plasmón superficial,
- 10 b. un fragmento de polipéptido IL-2 humano que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con la SEQ ID NO: 1 y, opcionalmente,
- 15 c. un enlazador de aminoácidos de 1 a 50, particularmente de 5 a 40, más particularmente de 10 a 30, incluso más particularmente de 15 a 25 aminoácidos, que une el fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 con el fragmento de polipéptido de IL-2 humano como una cadena polipeptídica sencilla.
17. Una formulación terapéutica para uso como un medicamento, que comprende: a. el anticuerpo monoclonal (mAb) hIL-2, o el fragmento del mismo de unión a antígeno, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y
- 15 b. interleucina 2 humana.
18. Una formulación terapéutica para uso como un medicamento, que contiene una proteína de fusión que comprende:
- 20 a. un fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 que comprende HCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 7, HCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 8, HCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 9, LCDR1 de acuerdo con la SEQ ID NO: 10, LCDR2 de acuerdo con la SEQ ID NO: 11, LCDR3 de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, en el que la unión a hIL-2 se caracteriza por una constante de disociación (K_D) $\leq 7,5$ nmol/L, ≤ 5 nmol/L, ≤ 3 nmol/L, ≤ 2 nmol/L o $\leq 1,5$ nmol/L determinado en un ensayo de unión de resonancia de plasmón superficial,
- 25 b. un fragmento de polipéptido de IL-2 humano que tiene una identidad de $\geq 85\%$, $\geq 90\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$ o $\geq 98\%$ en comparación con la SEQ ID NO: 1, y, opcionalmente,
- c. un enlazador de aminoácidos de 1 a 50, particularmente de 5 a 40, más particularmente de 10 a 30, incluso más particularmente de 15 a 25 aminoácidos, que une el fragmento de polipéptido de unión a hIL-2 con el fragmento de polipéptido de IL-2 humano como una cadena polipeptídica sencilla.

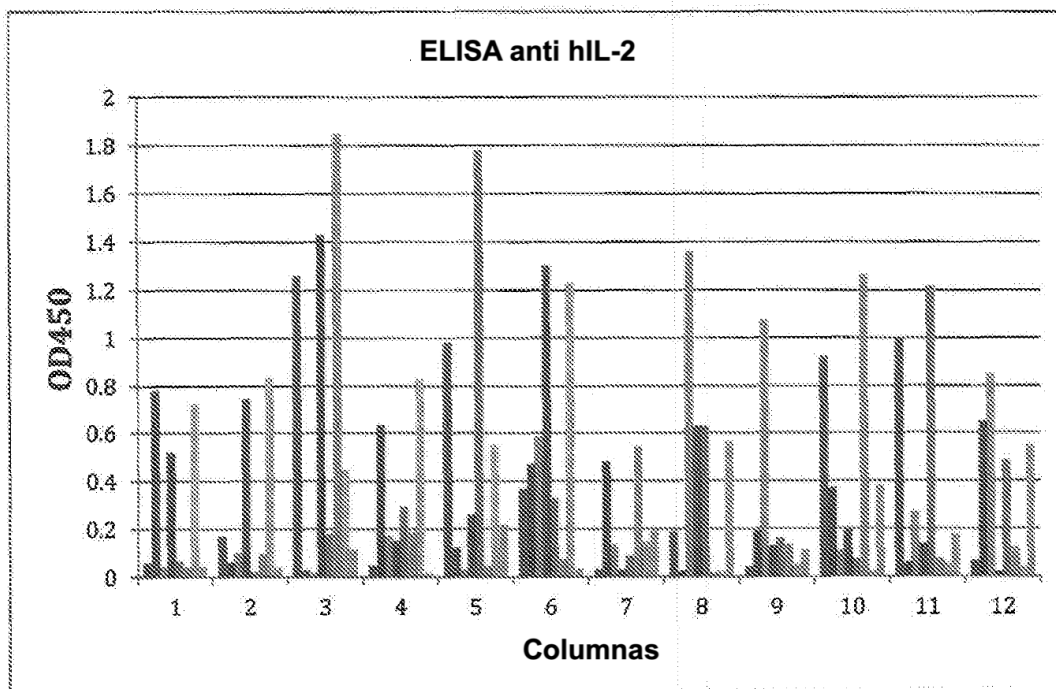


FIG. 1

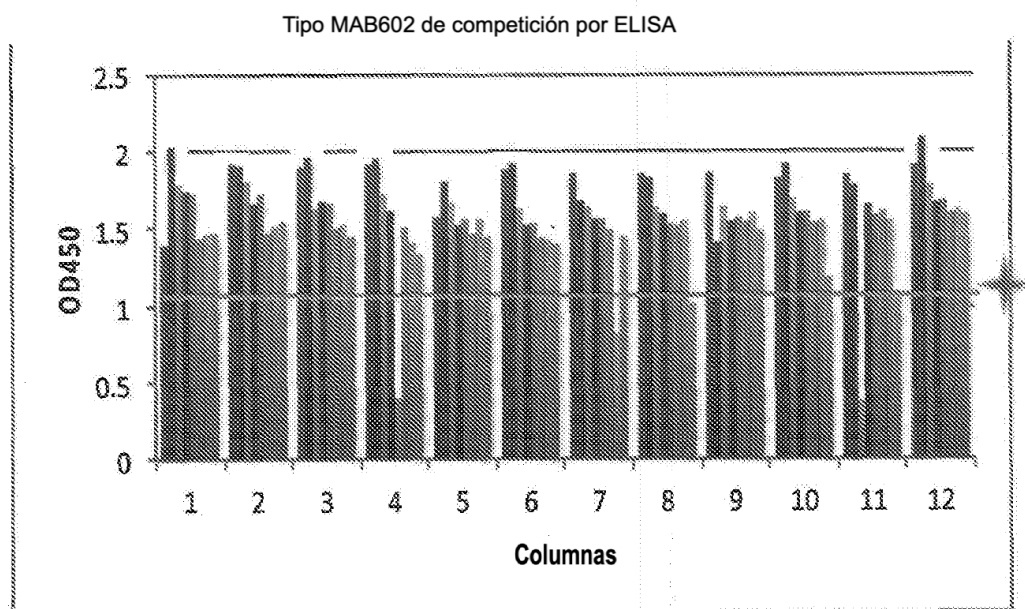


FIG. 2

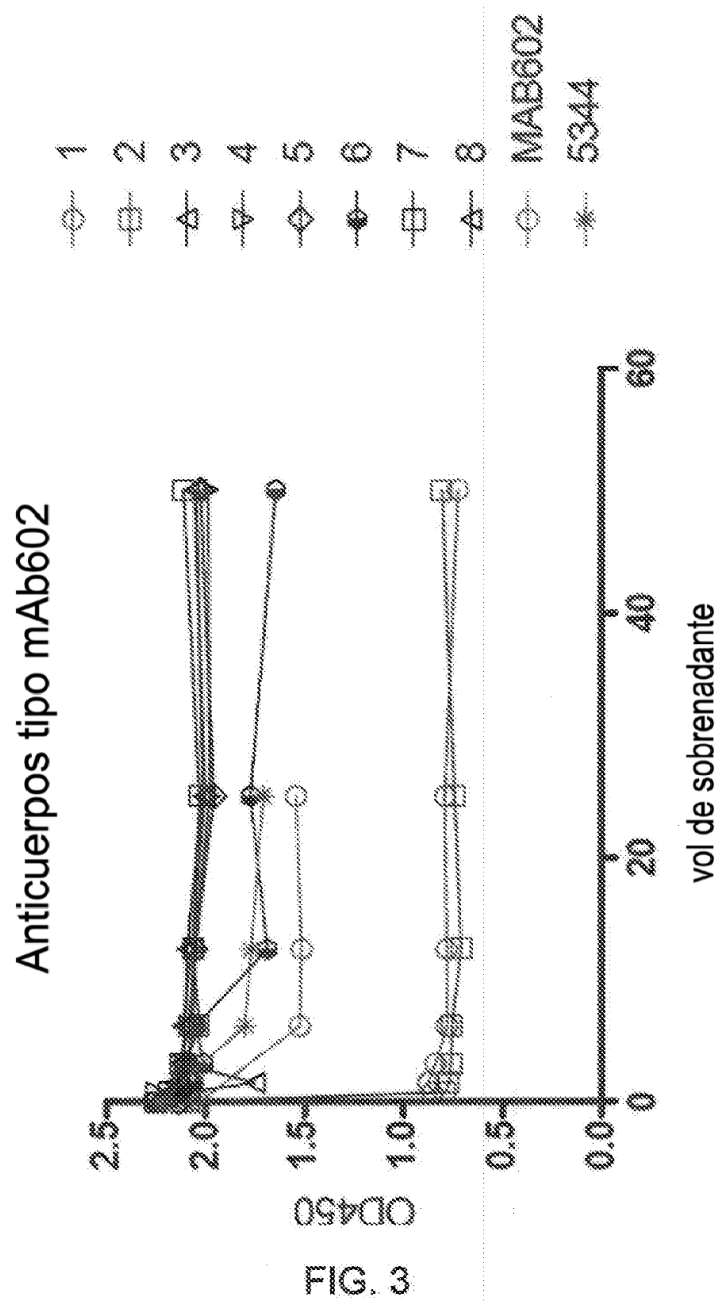


FIG. 4

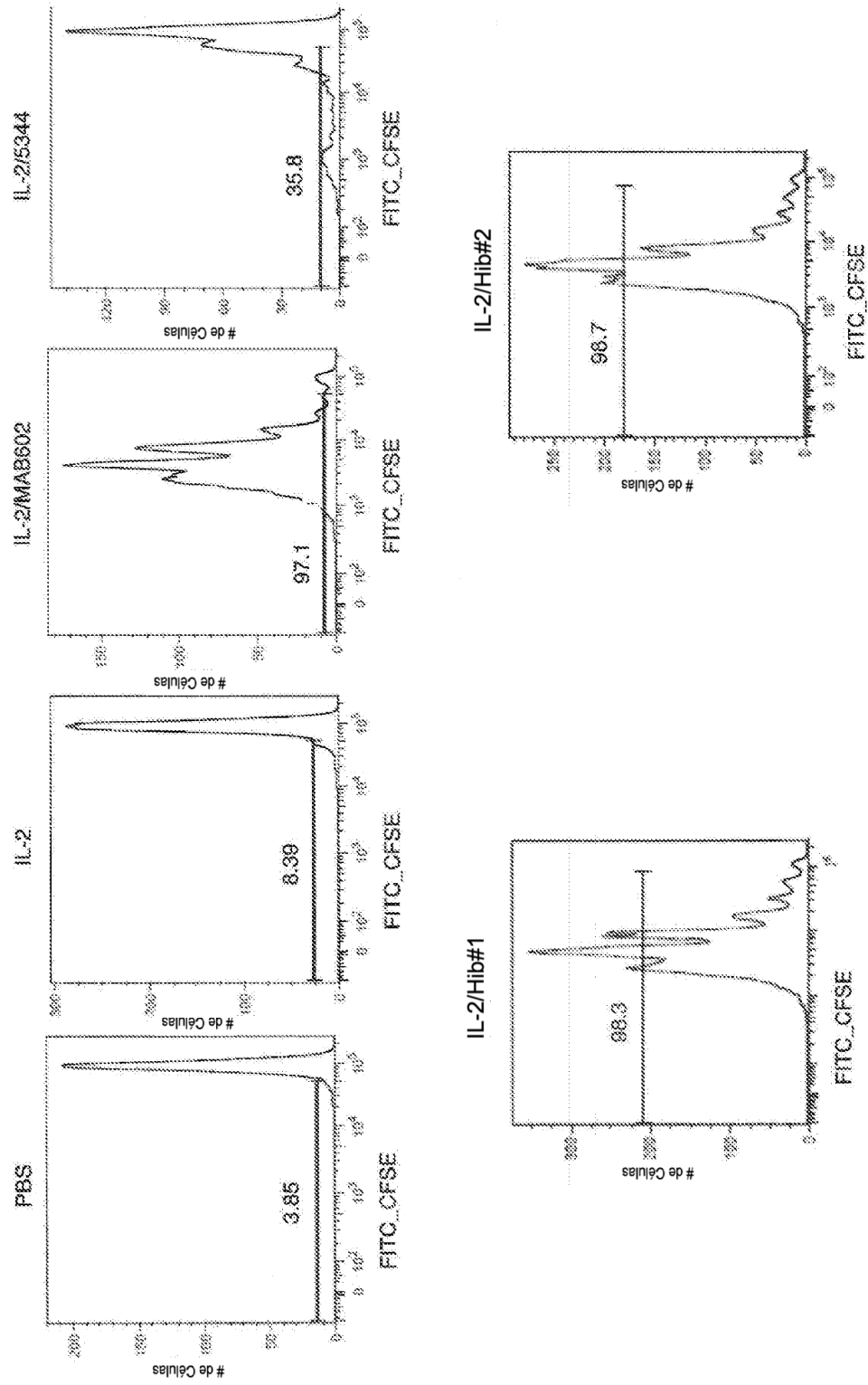


FIG. 5A

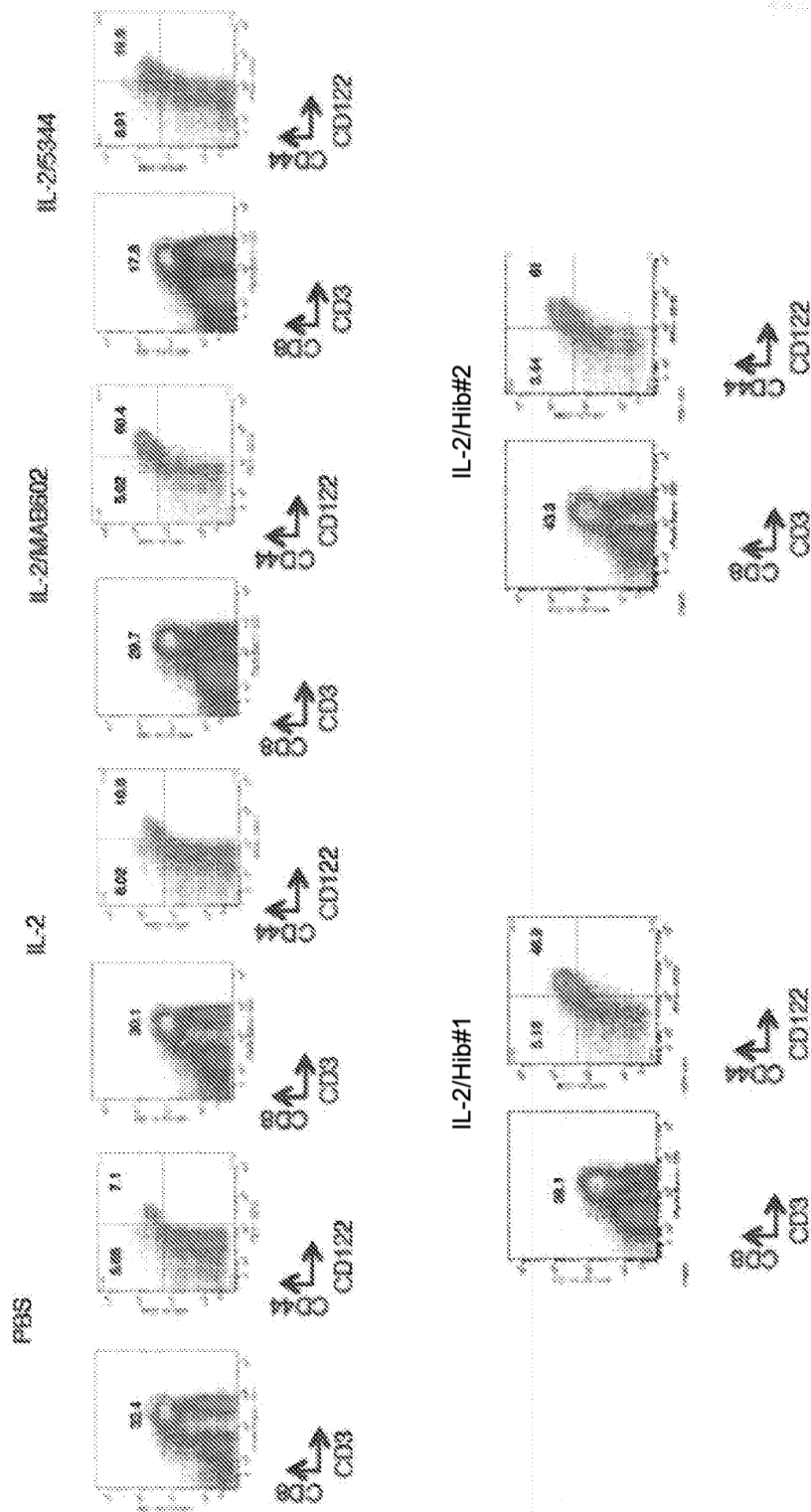
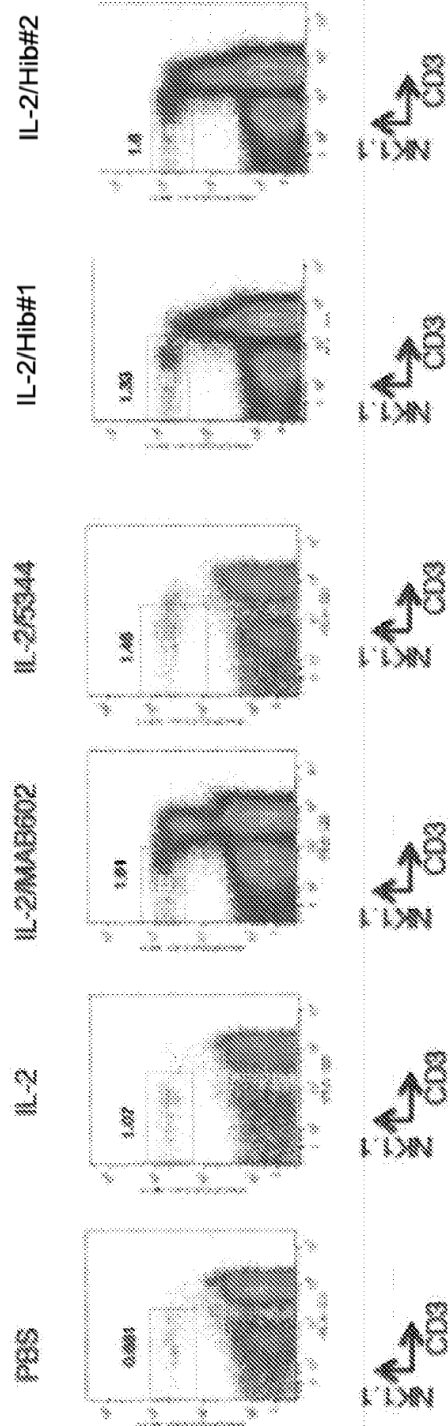


FIG. 5B



Anticuerpos anti-hIL-2 de hibridomas_Ganglios linfáticos

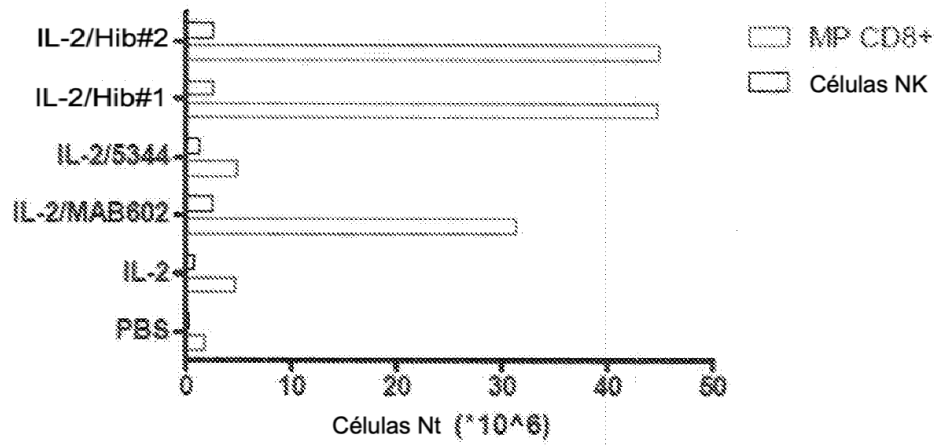


FIG. 6A

Anticuerpos anti-hIL-2 de hibridomas_Bazo

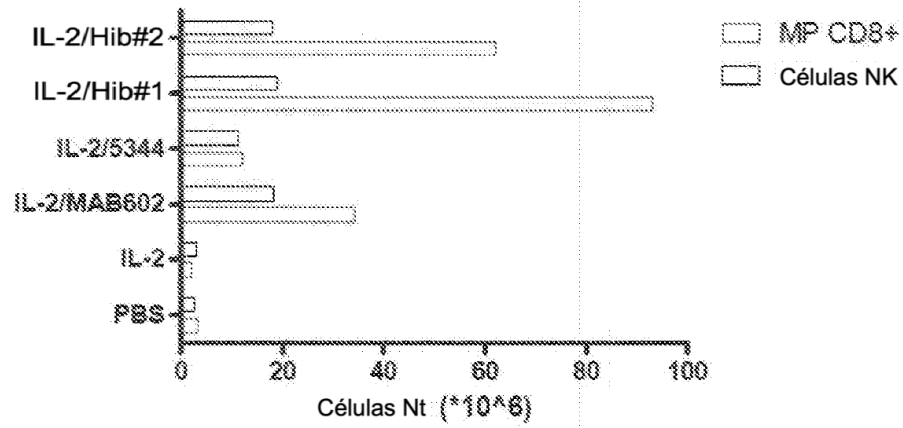
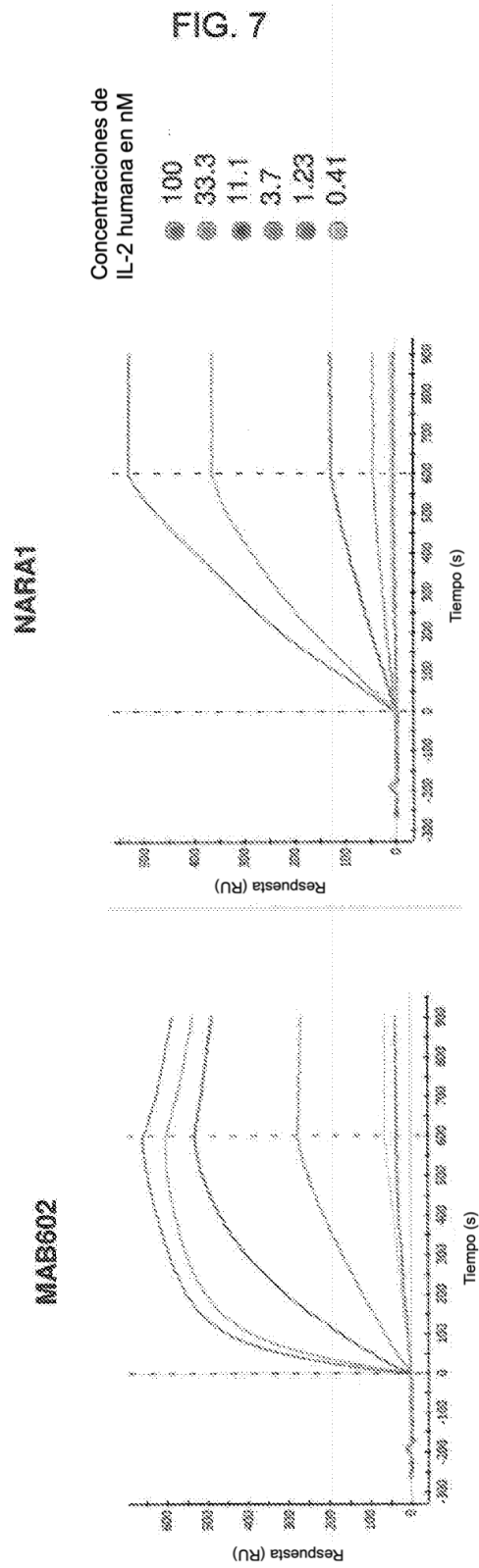


FIG. 6B



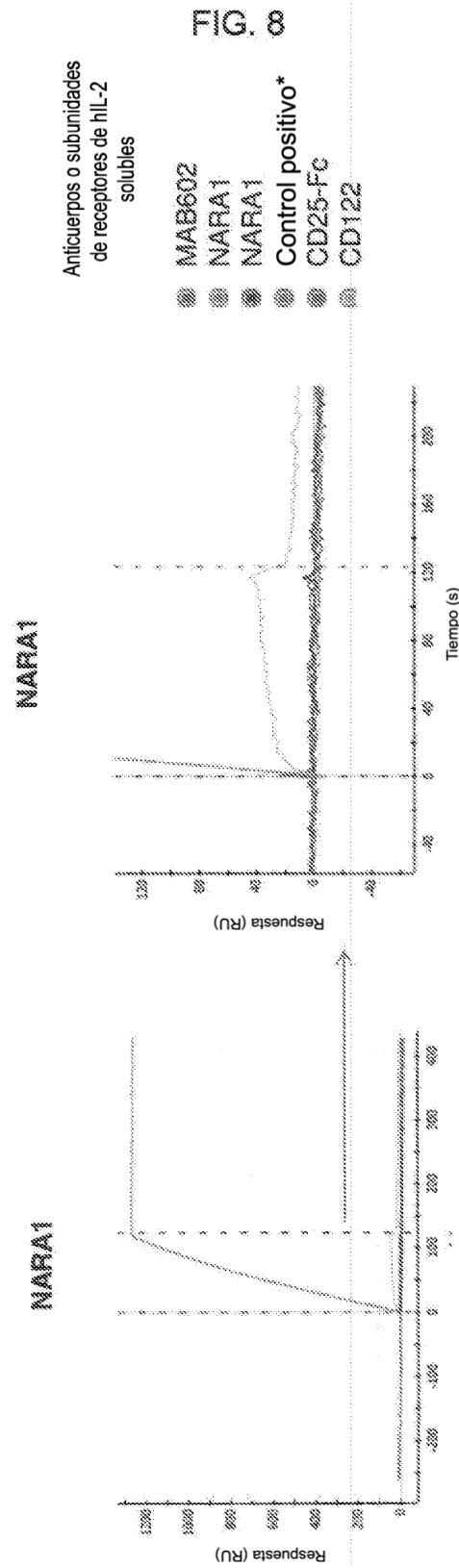
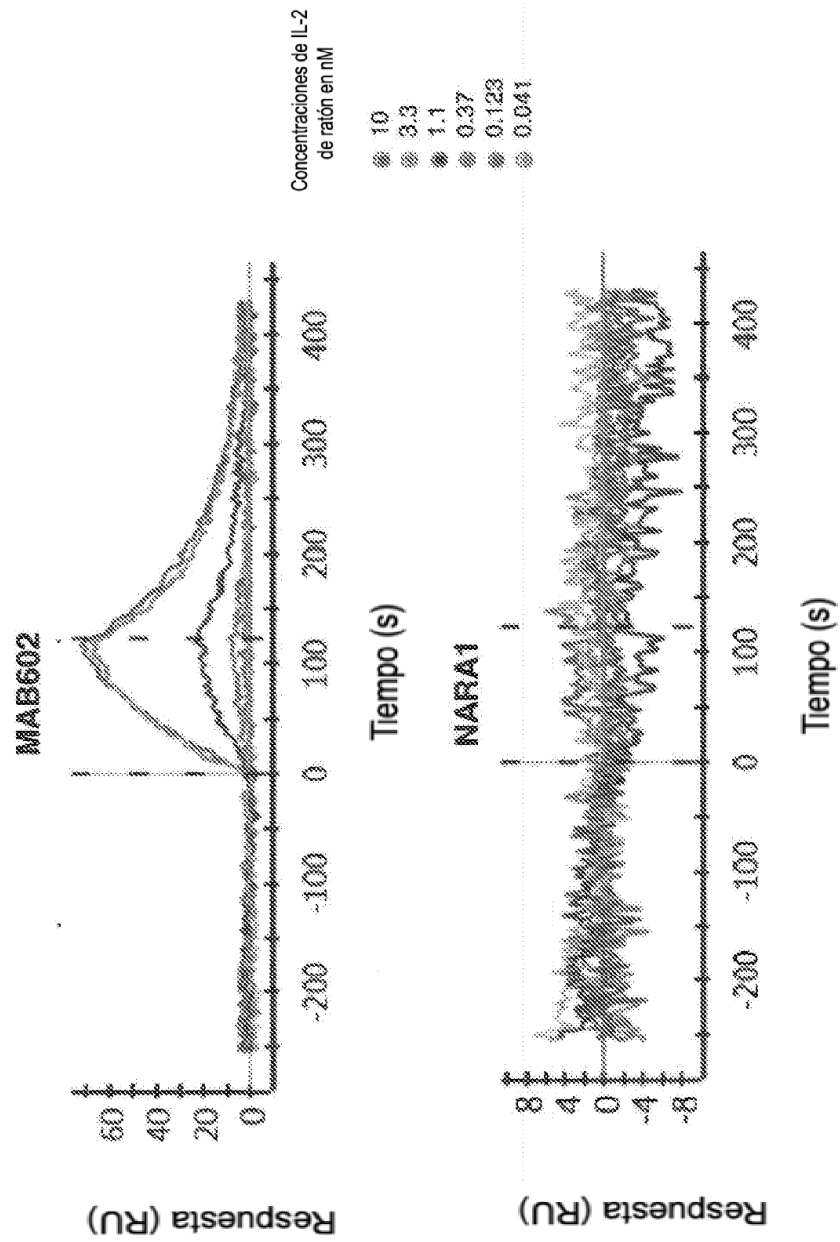


FIG. 9



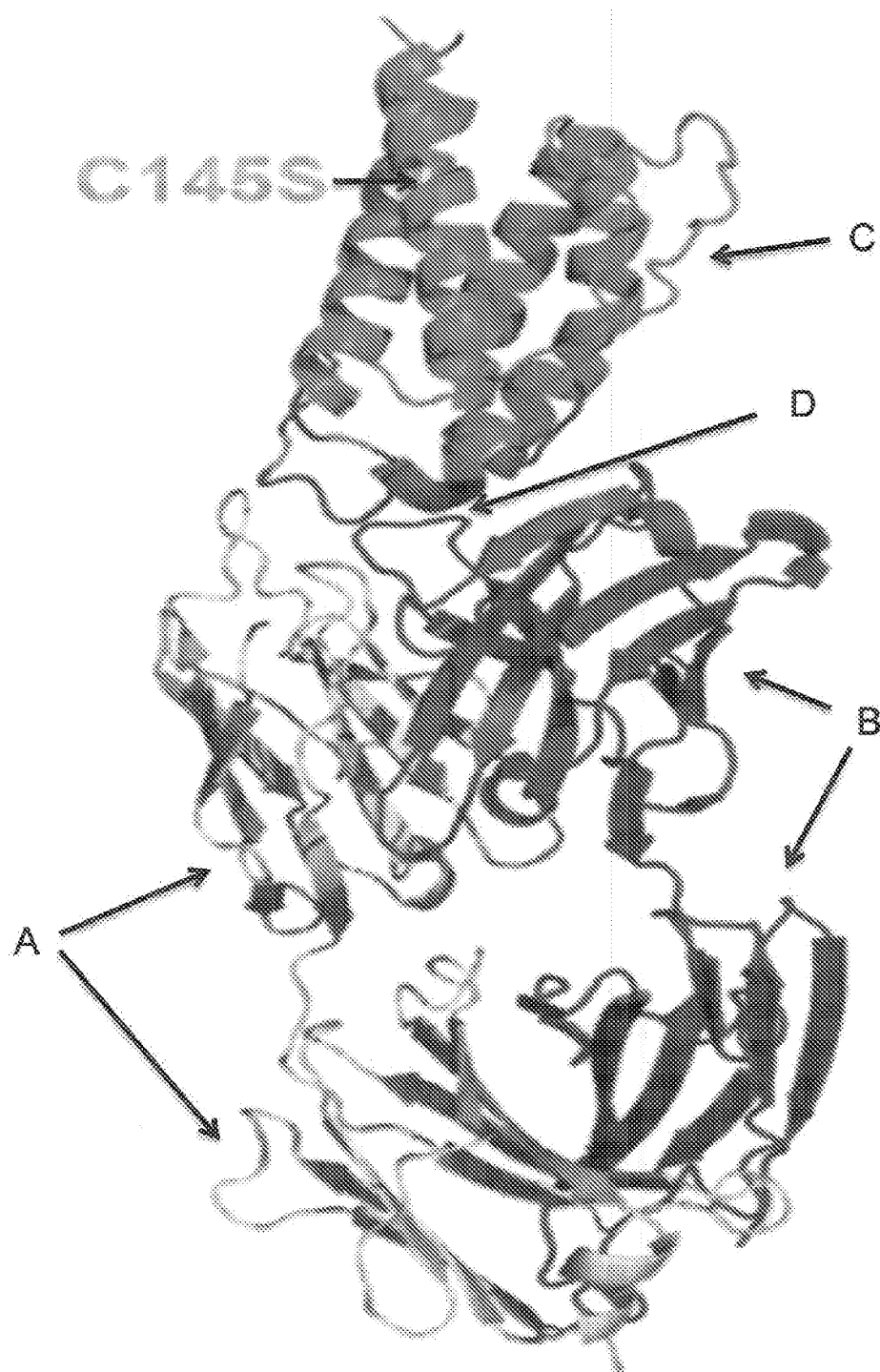


FIG. 10

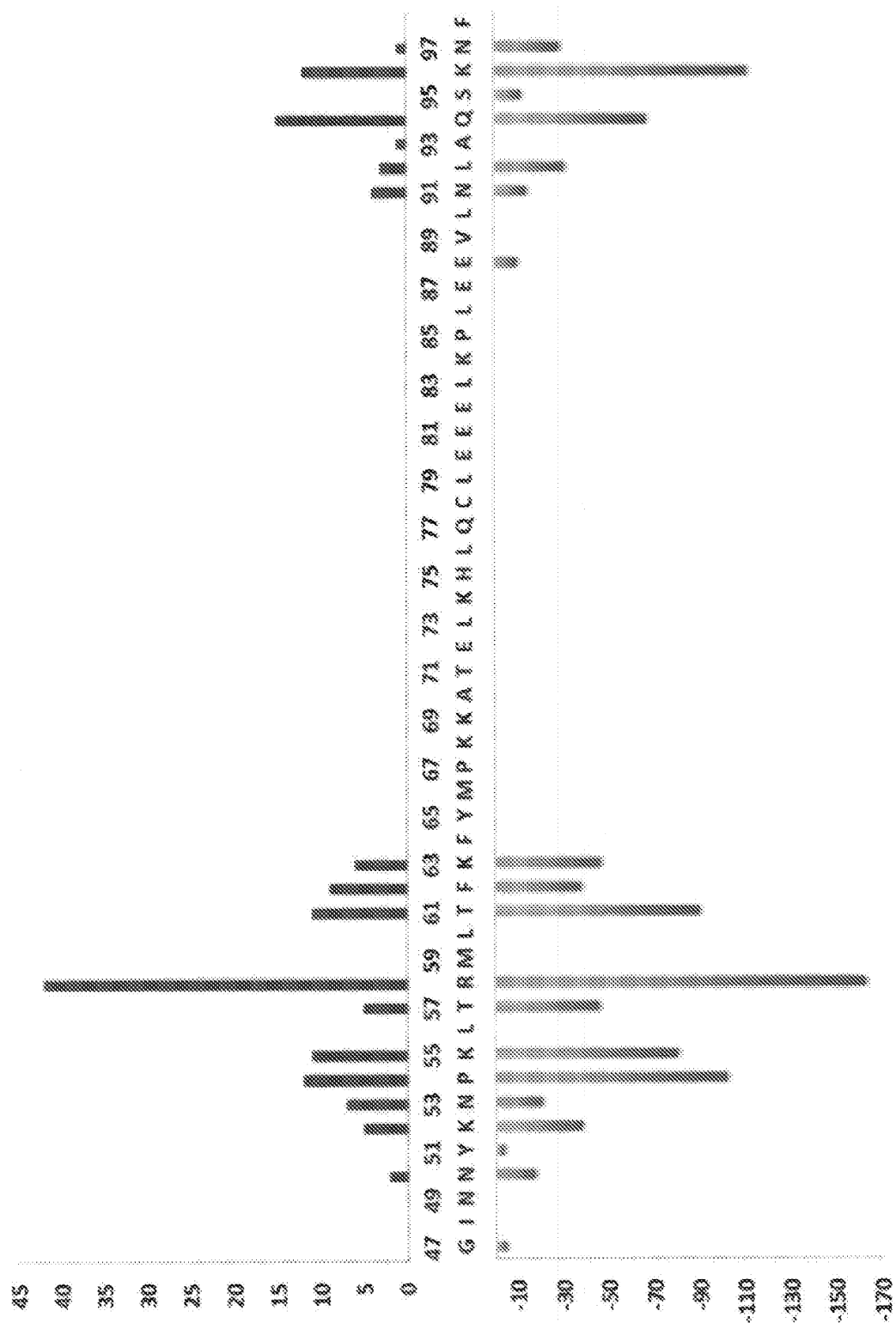


FIG. 11

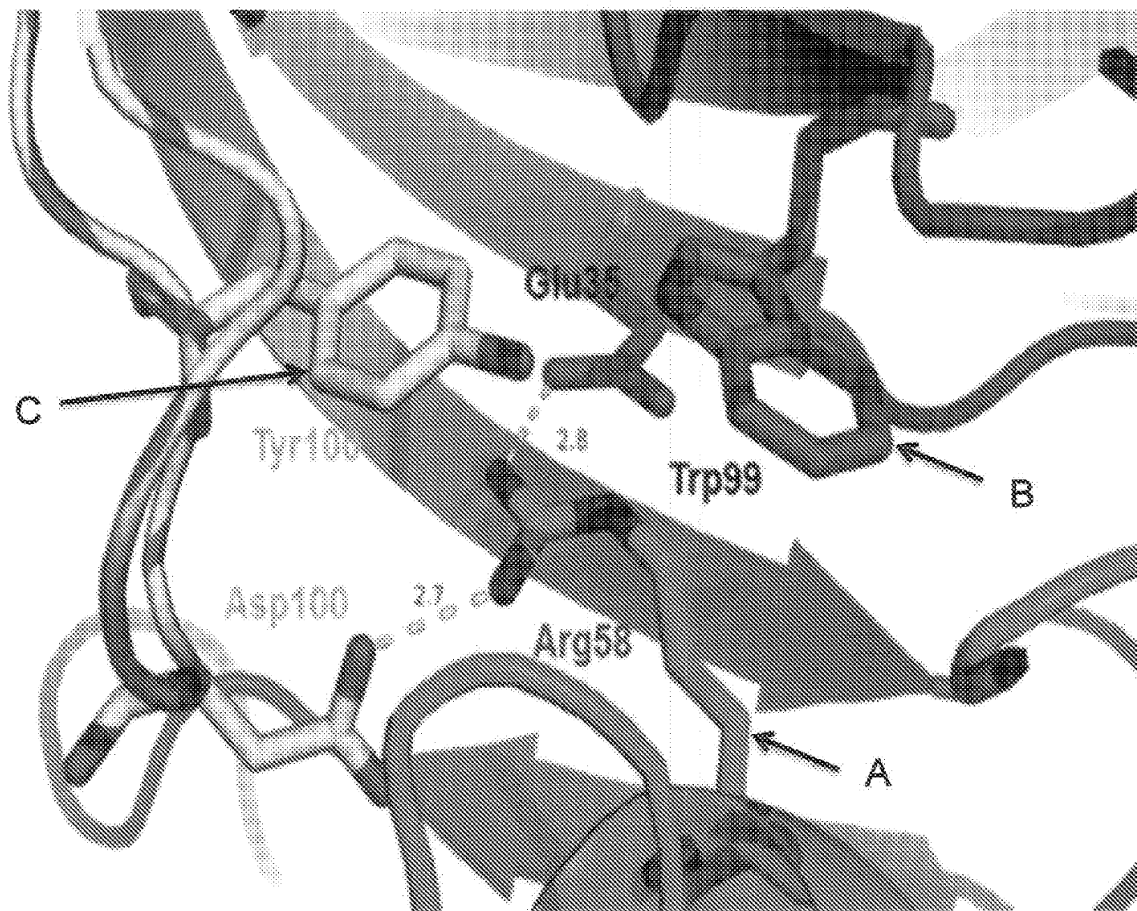


FIG. 12

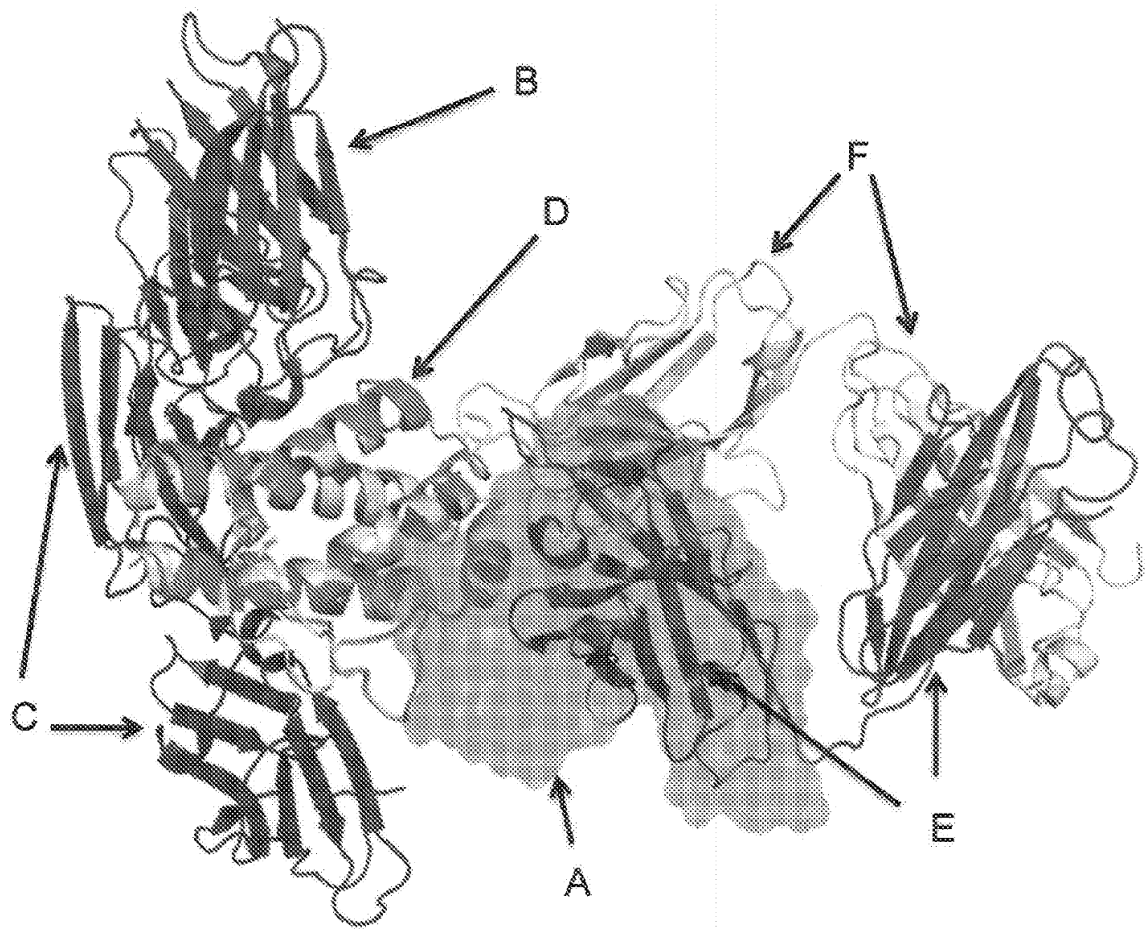


FIG. 13

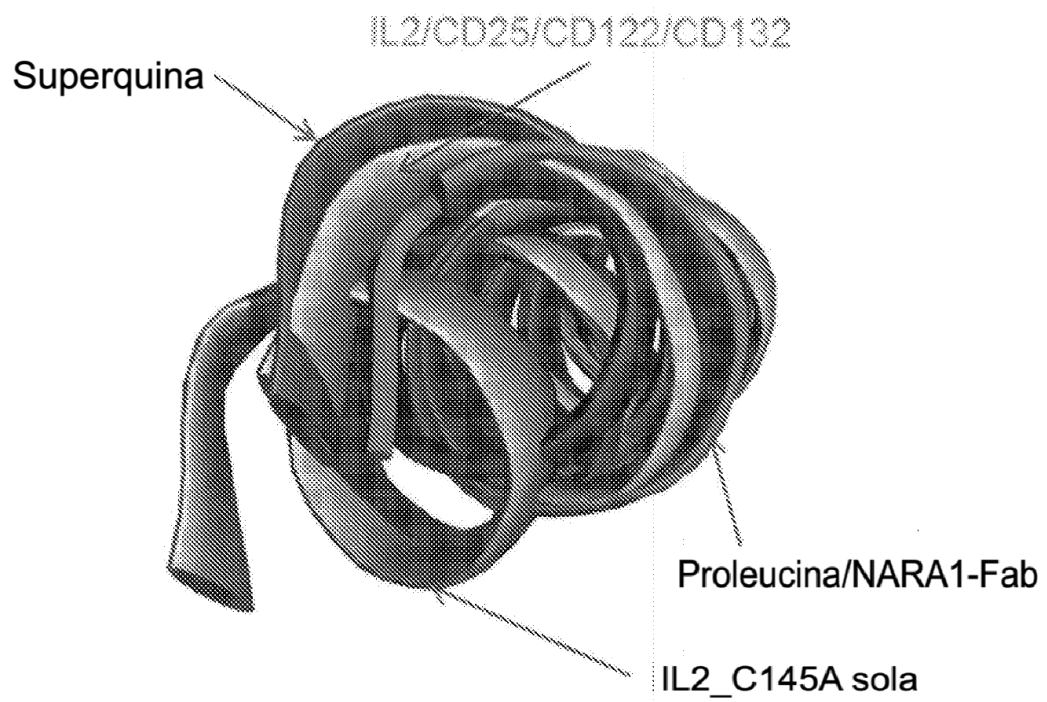


FIG. 14