

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 906**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2011 E 11744051 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2598888**

54 Título: **Método analítico para moléculas Fab y Fab'**

30 Prioridad:

**29.07.2010 GB 201012784**

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

**23.06.2016**

73 Titular/es:

**UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)  
60, Allée de la Recherche  
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**SMITH, BRYAN JOHN y  
KIRKE, HELEN MARIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 574 906 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

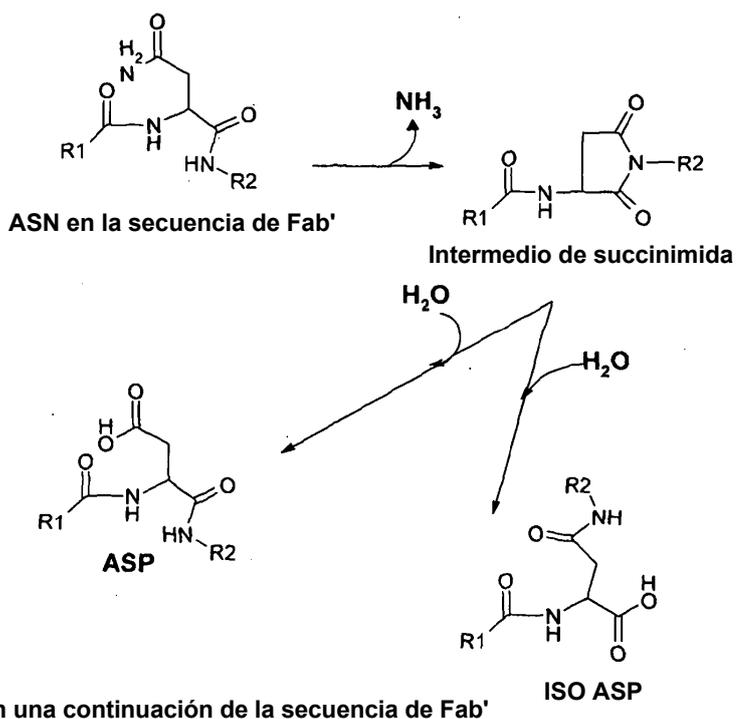
Método analítico para moléculas Fab y Fab'

## Descripción

5 La presente invención se refiere a un método de ensayo mejorado para la medición de especies ácidas en proteínas pegiladas. En particular, la presente invención se refiere a un método de ensayo mejorado para la medición de especies ácidas para formatos de anticuerpos de Fab pegilado y Fab' pegilado.

10 Los formatos de anticuerpos de Fab pegilado y Fab' pegilado son útiles porque proporcionan una vida media circulante in vivo similar a la de un anticuerpo entero sin las funciones efectoras asociadas a los anticuerpos completos. Estos formatos se han convertido en útiles en terapia y en las pruebas de estabilidad a largo plazo que se requieren para apoyar el procedimiento regulador de aprobación que autoriza la venta de estos productos terapéuticos. Además, una vez aprobados para su uso por el público general, los productos fabricados deben someterse a pruebas de liberación de los lotes antes de que se puedan poner a disposición para la venta.

15 La presencia de especies ácidas en las formulaciones, por ejemplo, después del almacenamiento, puede ser indicativa de degradación (en particular de desamidación) de los fragmentos Fab o Fab'. La desamidación es clasificada por las autoridades reguladoras como una ruta de degradación y, como tal, se establecen los límites de concentración de desamidación para el producto. Estos niveles no se deben exceder durante la vida útil del producto. Aunque que no se desea estar ligado a ninguna teoría, se cree que los residuos de asparagina se pueden degradar a través de un intermedio de succinimida por desamidación para generar especies ácidas, tales como ácido isoaspártico/ácido aspártico, tal como se establece en el Esquema 1:



20 Esta desamidación de residuos de asparagina puede resultar en un cambio en la carga global de proteínas y puede aumentar la inmunogenicidad de los fragmentos Fab o Fab'. Además, esta desamidación puede dar como resultado cambios en la función/eficacia de los fragmentos Fab o Fab', lo que puede dar lugar a efectos terapéuticos impredecibles/efectos secundarios o simplemente la pérdida de actividad. Esto puede aumentar los efectos adversos en los pacientes después de la administración de la formulación. Por lo tanto, la degradación debe ser mínima y los tiempos y las condiciones de almacenamiento deben limitarse a aquellas que se producen con poca o ninguna degradación. Por lo tanto, es importante ser capaz de medir la desamidación en una formulación de Fab pegilado o Fab' dado. El análisis puede tener un impacto en la vida útil de almacenamiento y en las condiciones dadas en el etiquetado del producto. También es importante ser capaz de controlar los niveles de desamidación en el producto ya que si se exceden los límites predefinidos entonces esto puede dar lugar a productos comercializados que tienen que ser retirados de la venta o un bloque en la liberación para la venta de ciertos lotes de los productos. En teoría, la desamidación en la proteína podría medirse mediante la cuantificación de las especies ácidas generadas en el mismo.

25

30

Zuang et al (2009. Anal Chem, 81, 1686-1692) describe un método para medir la desaminación (es decir, medir la formación de especies ácidas, incluyendo isoAsp, aspartil succinimida, etc.) de un anticuerpo IgG. El método comprende incubar el anticuerpo con tripsina a 37°C y separar y cuantificar los líquidos de digestión vía RP-HPLC y MS /MS. Los líquidos de digestión de tripsina generan fragmentos peptídicos.

5 En la actualidad, el contenido total de especies ácidas de Fab pegilado o Fab' pegilado se mide usando intercambio de cationes (CEX)-HPLC.

El método mide un valor agregado o el total de especies ácidas en el producto. Sin embargo, hay un número de rutas por las que se generan las especies ácidas y no todas están asociadas con la desamidación (y, por tanto, la degradación) de la proteína. Así, el valor obtenido a partir del análisis no es un valor para la cantidad real de desamidación en la proteína. De hecho, incluye especies ácidas generadas por:

10

- degradación del Fab', e

- hidrólisis del enlazador que se une al Fab' o Fab y la molécula de PEG.

La hidrólisis del enlazador PEG se cree que procede a través del anillo de succinimida, como se muestra en la figura 4. Esta hidrólisis puede ser en realidad el efecto dominante y generar un gran componente del valor del agregado de las especies ácidas cuando se analizan. El contenido total de especies ácidas se representa esquemáticamente en la figura 3, que muestra las especies ácidas generadas en la proteína por la desamidación y las especies ácidas generadas por la hidrólisis del enlazador. Esto se puede representar esquemáticamente como se muestra en la figura 5, que muestra las proporciones relativas de especies ácidas generadas por la hidrólisis del enlazador por la desamidación y una combinación de las mismas.

15

20 El valor del agregado de las especies ácidas en una molécula no es de interés primordial. En cambio, lo que interesa es la cantidad de desamidación en la proteína. Sin embargo, el análisis del contenido total de especies ácidas no proporciona un valor representativo de la desamidación en la proteína.

La cantidad de desamidación se puede medir, por ejemplo, empleando los kits de detección de aspartato ISOQUANT®. La desamidación se representa esquemáticamente en la figura 2, que muestra la desamidación solamente en la proteína. Sin embargo, este ensayo de desamidación no es particularmente robusto (Alfaro et al., Anal. Chem, 2008, 80, 3882 a 3889).

25

Para apoyar la fabricación comercial de un producto terapéutico, se requieren técnicas analíticas robustas. Los inventores creen que han diseñado un método robusto y eficaz para el análisis de la desamidación de las proteínas pegiladas, en particular, los Fab y Fab' pegilados.

30 El método de la presente descripción permite la medición directa de especies ácidas en las moléculas Fab' resultantes de la desamidación/degradación en la molécula Fab' y no en el PEG o en el enlazador.

Por lo tanto, se proporciona un método de medición de especies ácidas generadas por la degradación de un componente de Fab'-PEG que comprende las etapas de:

35 a) escindir el PEG y el enlazador del Fab'-PEG con una enzima que rompe la porción oculta del Fab' y libera al PEG y al enlazador del Fab',

b) separar opcionalmente el PEG y el enlazador generado en la etapa a) del Fab', para proporcionar un Fab o Fab', y

c) analizar cuantitativamente especies ácidas asociadas con el Fab' escindido y/o el PEG escindido.

Al eliminar el PEG y el enlazador del Fab' la cantidad de desamidación en la proteína puede medirse mediante la cuantificación de las especies ácidas en la misma. El método es reproducible y robusto y, además, la escisión del PEG y del enlazador no interfiere o cambia la cantidad de desamidación en la proteína. Así, la desamidación en el Fab' escindido debe ser representativa de la desamidación en la porción de la proteína del Fab' pegilado.

40

En otra realización, el método también permite la extensión de la hidrólisis del enlazador de PEG que se determina determinando primero las especies ácidas "totales" para el Fab'-PEG antes de la escisión en la etapa (a) del método y luego restando la especies ácidas cuantificadas asociadas con el componente de Fab' determinado en la etapa (c) del método de las especies ácidas totales.

45

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática de un Fab' pegilado.

La Figura 2 muestra una representación esquemática de la desamidación que se produce en un Fab' pegilado.

La Figura 3 muestra una representación esquemática de la desamidación y la hidrólisis del enlazador ambas de las cuales generan especies ácidas.

50

La Figura 4 muestra una representación esquemática del proceso químico de pegilación de un Fab' y la posterior apertura de anillo para generar una especie ácida.

La Figura 5 es una representación esquemática de las proporciones relativas de los valores de las especies ácidas que contribuyen al contenido total de especies ácidas.

- 5 La Figura 6 es una representación esquemática de las especies generadas a partir de un Fab' pegilado después de la digestión enzimática.

La Figura 7 muestra la eficiencia de una digestión con tripsina de un Fab' pegilado con el tiempo.

La Figura 8 es un análisis CEX-HPLC del producto bruto resultante de la digestión con tripsina de un Fab' pegilado.

La Figura 9 es una ICEF de un Fab' pegilado digerido por tripsina.

- 10 La Figura 10 muestra las secuencias 1-9.

La Figura 11 muestra las secuencias 10 y 11.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH1 de CDP870.

SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH2 de CDP870.

- 15 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH3 de CDP870.

SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL1 de CDP870.

SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL2 de CDP870.

SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL3 de CDP870.

SEQ ID NO: 7 muestra el nucleótido y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera CDP870.

- 20 SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de la región variable de la cadena pesada CDP870.

SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera injertada de Fab CDP870 anti-TNF $\alpha$ .

SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada injertada de Fab CDP870 anti-TNF $\alpha$ .

Descripción detallada de la invención

- 25 Las especies ácidas, como se emplea en el presente documento pretende referirse a un resto, molécula, que comprende un ácido carboxílico, es decir que comprende, el grupo -C(O)OH.

- 30 En una realización, la enzima es una proteasa, por ejemplo tripsina o quimotripsina, tal como tripsina. Cuando la enzima empleada es tripsina entonces se espera que el punto de escisión esté entre K y T en, por ejemplo, la secuencia de SCDKTHHTCAA (extremo C-terminal de la cadena pesada) del fragmento Fab'. La escisión ventajosamente a que este punto no dé como resultado un cambio en el valor de la desamidación en la proteína debido a que la pequeña parte de la bisagra que se escinde no contiene residuos de asparagina.

- 35 Los Fab tienen de forma natural una secuencia en la bisagra, que es un sustrato adecuado para la enzima. Las moléculas Fab no tienen de forma natural una secuencia de sustrato para la enzima, pero si se desea una secuencia apropiada pueden ser diseñadas en una posición apropiada lo que permite la eliminación del PEG unido al Fab por digestión enzimática.

La digestión enzimática puede realizarse a una temperatura en el intervalo de 20 y 40°C, tal como de 25 a 38°C, en particular se lleva a cabo de manera óptima a 37°C.

En una realización, cuando la entidad de partida es un Fab' pegilado, la enzima divide la parte de bisagra del Fab' y libera al PEG y al enlazador del Fab'.

- 40 La digestión enzimática, por ejemplo la digestión triptica, se puede efectuar durante un período de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 minutos o más.

Las entidades generadas por la digestión no necesitan ser separadas porque si se emplea una técnica, tal como HPLC/cIEF para la cuantificación de las especies ácidas, las entidades generadas tienen diferentes tiempos de retención y por lo tanto pueden ser cuantificadas individualmente sin una etapa de separación adicional.

Sin embargo, opcionalmente, las entidades generadas por la etapa a) se pueden separar por técnicas conocidas, por ejemplo cromatografía de intercambio catiónico, CIEF, cromatografía de exclusión de tamaño y similares.

En una realización, las especies ácidas asociadas con Fab, Fab' y/o PEG se cuantifican.

En una realización, se mide la desamidación de los fragmentos Fab o Fab'.

- 5 En una realización, las especies ácidas en la etapa c) se analizan mediante análisis HPLC, por ejemplo empleando un gradiente de elución. En una realización, el análisis HPLC es el análisis CEX-HPLC.

Alternativamente, la cantidad de la desamidación en la proteína dividida se puede medir por electroforesis capilar.

En una realización, las especies ácidas en la etapa c) se analizan mediante análisis de CIEF; los cartuchos adecuados incluyen el iCE280 disponible en Convergent Bioscience.

- 10 En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF, más preferiblemente un CDP870 de Fab' anti-TNF, tal como se describe en el documento WO01/094585.

En una realización, el anticuerpo que tiene especificidad para TNF $\alpha$  humano, comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 para CDRH1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 para CDRH2 o la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 para CDRH3.

- 15 En una realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 para CDRL1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 para CDRL2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6 para CDRL3.

- 20 En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 para CDRH1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 para CDRH2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 para CDRH3 y una cadena ligera en la que el dominio variable comprende una CDR que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 para CDRL1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 para CDRL2 o la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6 para CDRL3.

En una realización, el anticuerpo comprende SEQ ID NO: 1 para CDRH1, SEQ ID NO: 2 para CDRH2, SEQ ID NO: 3 para CDRH3, SEQ ID NO: 4 para CDRL1, SEQ ID NO: 5 para CDRL2 y SEQ ID NO: 6 para CDRL3.

- 25 El anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo injertada de CDR y típicamente el dominio variable comprende regiones marco aceptoras humanas y CDR donantes no humanas.

Preferiblemente, el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera CDP870 (SEQ ID NO: 7) y el dominio variable de cadena pesada CDP870 (SEQ ID NO: 8).

- 30 De acuerdo con la descripción, el anticuerpo puede ser un fragmento Fab modificado, en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora o reportera. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o dos residuos de cisteína a los que la molécula efectora o reportera puede estar unida. Dicho fragmento Fab modificado tiene preferiblemente una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia dada como SEQ ID NO: 10 y comprendiendo o consistiendo la cadena ligera en la secuencia dada como SEQ ID NO: 9.

Las preferencias y/o las realizaciones se pueden combinar cuando sea técnicamente posible.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no deben de ninguna manera ser interpretados como limitantes del alcance de la presente invención.

### Ejemplo

- 40 Método de digestión trípica

Se añade a un eppendorf 1,0 mg de Fab'PEG con acetato sódico 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,0 hasta un volumen total de 50  $\mu$ l. Se añaden 50  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M, seguido de 40  $\mu$ l de tampón de resuspensión de tripsina (ácido acético 50 mM); el pH final debe estar en la región de pH 7,5. Vortex durante 10 segundos.

La reacción se incuba a 37°C durante 2 horas. Análisis por HPLC CEX o isoelectroforesis capilar de imágenes.

- 45 Eficiencia de la digestión determinada por HPLC HTRP

Se creó un digesto trípico utilizando un Fab'PEG utilizando un automuestreador automático de la serie 1100 de Agilent incubado a 37°C, con el fin de que la reacción pudiera ser inyectada directamente en el ensayo HPLC HTRP. 9 inyecciones de Fab' PEG y Fab' de control se llevaron a cabo de forma secuencial. El Fab' PEG dio un perfil de



## ES 2 574 906 T3

- Anfolitos portadores: (3-10 Pharmalytes)-8  $\mu\text{l}$  (los anfolitos portadores deben tener una concentración de 4% en la mezcla final de la muestra).

- Marcadores de pI: se añade 1  $\mu\text{l}$  de cada uno de los dos marcadores de pI diferente, cuyos valores de pI deberían corresponder a cada lado de la proteína y sus especies relacionadas.

5 Agua de calidad HPLC: Se añade la cantidad necesaria de agua HPLC para completar el volumen a 200 mL.

Se mezcla la muestra anterior con agitación entre 15 y 30 segundos para asegurar una mezcla adecuada de los diferentes componentes. Se centrifuga la mezcla a 16.000 g durante 10 minutos para eliminar las burbujas de aire y las partículas de polvo, que interferirían con el análisis.

Configuración del instrumento y análisis empleando la tecnología iCE280

10 El ICE 280 de Convergent Biosciences (Isogen en Europa) es un instrumento de captación de imágenes por isoelectroforesis capilar, que se utiliza para determinar los pI de varias muestras de proteínas y sus especies relacionadas.

15 Se aplica alta tensión a través del capilar utilizando un ánodo y un cátodo, que se sumergen en pequeños recipientes que contienen el catolito ( $\text{OH}^-$ ) y el anolito ( $\text{H}^+$ ). Las muestras se preparan con anfolitos portadores y, al aplicar la alta tensión, las moléculas de proteínas migran en función de sus respectivos pI y, finalmente, se concentran en estos. El anolito se puede preparar mediante la adición de la cantidad calculada de ácido fosfórico para dar una solución final de ácido fosfórico 0,08 M en celulosa de metilo al 0,1%. El catolito se puede preparar mediante la adición de 10,4  $\mu\text{l}$  de solución de NaOH 50% p/p a 2 ml de celulosa de metilo al 0,1%. El catolito debe estar recién preparado y no debe ser reutilizado. Generalmente con 2 ml es suficiente para un solo llenado del depósito.

20 En general, para todas las muestras no pegiladas, un período de concentración de 5-6 minutos a 3000 V debería ser suficiente, pero como las diferentes proteínas tienen diferentes distribuciones de carga, el tiempo de concentración también podría variar en consecuencia. En ese caso, los ajustes deben ser optimizados mediante la aplicación de dos o tres muestras.

25 El análisis de datos se puede llevar a cabo utilizando el software EZChrom. Los perfiles pueden ser comparados mediante la superposición de estos utilizando 'Supercompare' y los electroferogramas pueden ser integrados utilizando las opciones "Desarrollo del método" dentro del software EZChrom. Véase la figura 9 para un ejemplo del electroferograma de la digestión de Fab' PEG. Los siguientes son detectados: marcador de pI bajo, especies de Fab' ácidas divididas, Fab' dividido, especies de Fab' básicas divididas, marcador de pI alto.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de medición de especies ácidas generadas por la degradación de un componente de Fab' de un Fab'-PEG que comprende las etapas de:
- 5 a) dividir el PEG y el enlazador del Fab'-PEG con una enzima que divide la porción de bisagra del Fab' y libera el PEG y el enlazador del Fab',
- b) separar el PEG y el enlazador generado en la etapa a) del Fab', para proporcionar un Fab' y
- c) analizar cuantitativamente las especies ácidas asociadas con el Fab' dividido.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que la enzima es tripsina o quimotripsina.
- 10 3. Un método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la división en la etapa a) se realiza a una temperatura en el intervalo de 25 a 40°C, tal como 37°C.
4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la división de la etapa a) se produce entre una lisina y una treonina, en particular en el extremo C-terminal de la cadena pesada de Fab'.
5. Un método según la reivindicación 4, en el que la lisina y la treonina se encuentran en la secuencia SCDKTHTCAA localizada en el extremo C-terminal de un Fab'.
- 15 6. Un método según la reivindicación 1, en el que la separación se efectúa por cromatografía de intercambio catiónico, cIEF y/o cromatografía de exclusión por tamaños.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cuantificación de las especies ácidas se lleva a cabo empleando cromatografía de intercambio catiónico o isoelectroforesis capilar por imágenes, tal como CEX-HPLC.
- 20 8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho Fab' comprende o consiste en SEQ ID NO: 10.

Figura 1. Diagrama esquemático de un formato Fab' pegilado

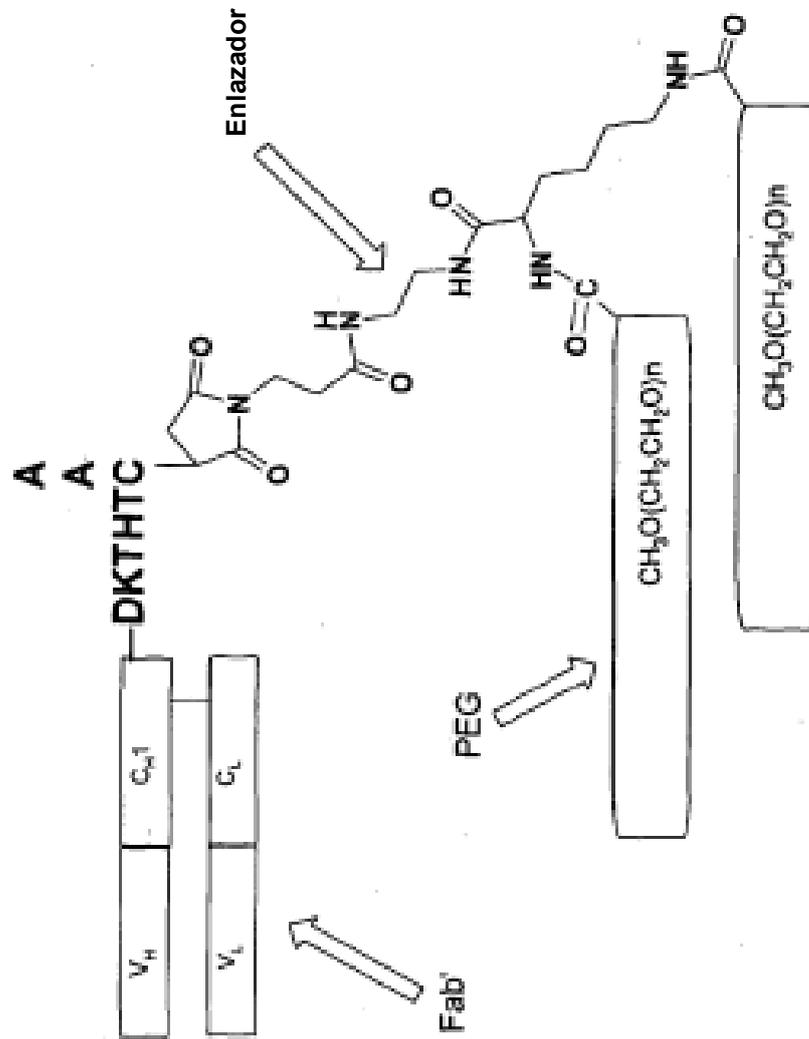


Figura 2. Diagrama esquemático de un formato Fab' pegilado con desamidación en el fragmento Fab'

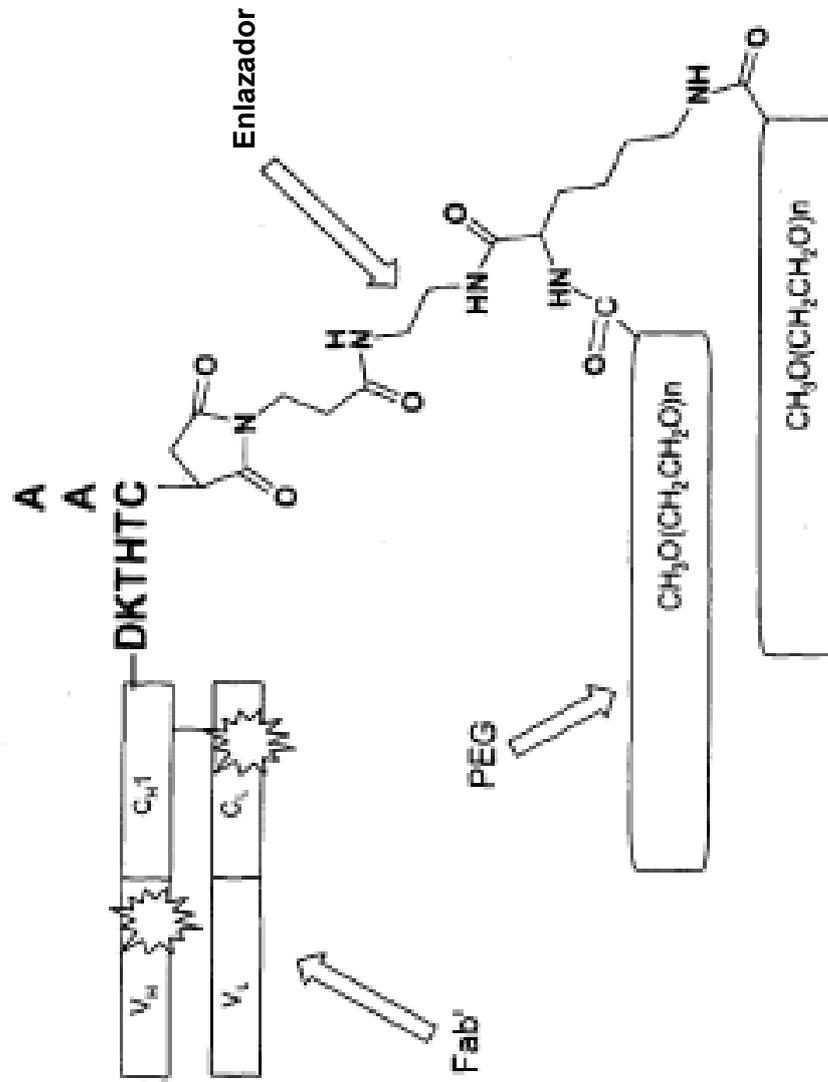


Figura 3. Diagrama esquemático de un formato Fab' pegilado con desamidación en el fragmento Fab' e hidrólisis del enlazador para generar especies ácidas

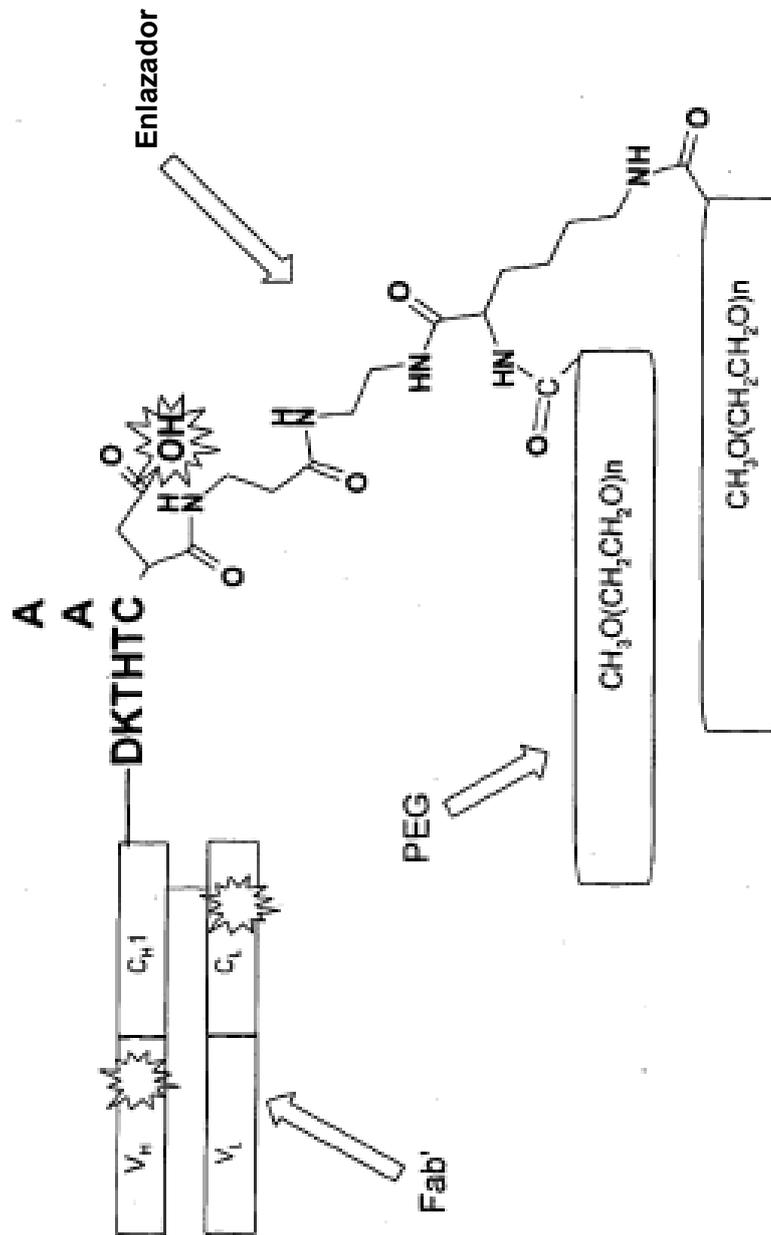
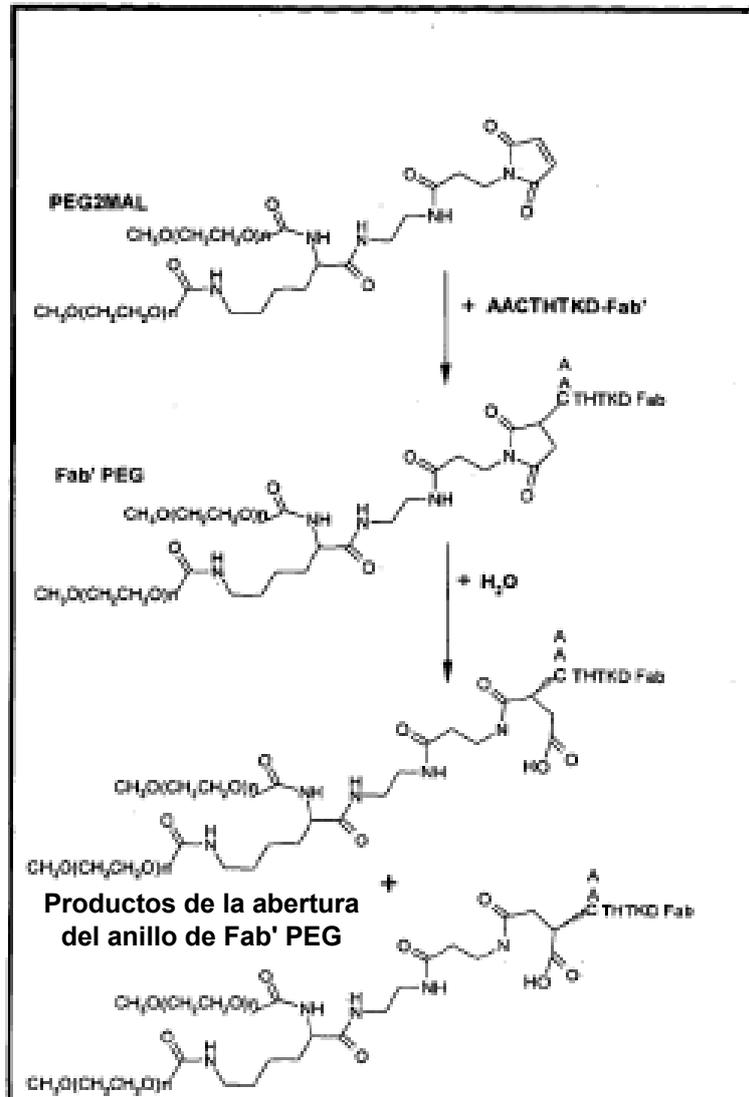
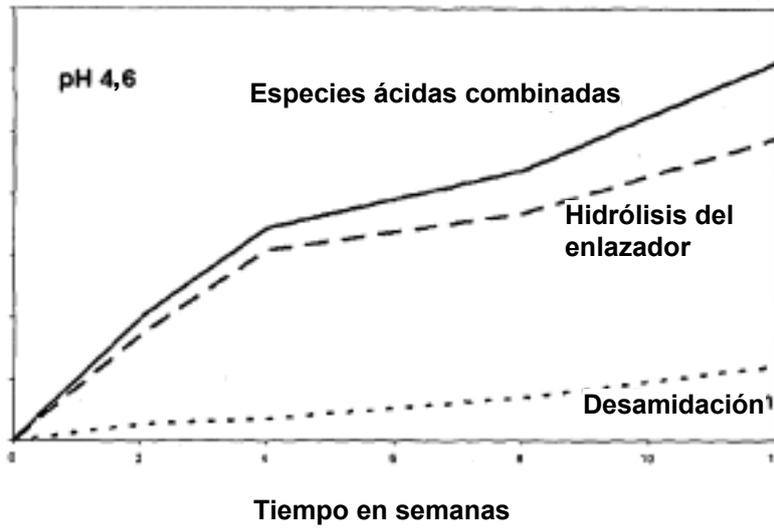


Figura 4. Representación esquemática de la hidrólisis de Fab' y maleimida de PEG seguido de la apertura del anillo del anillo de succinimida del enlazador de PEG



**Figura 5. Análisis de las especies ácidas combinadas, especies ácidas generadas por la hidrólisis del enlazador y especies ácidas generadas a través de la desamidación**

% de especies ácidas generadas



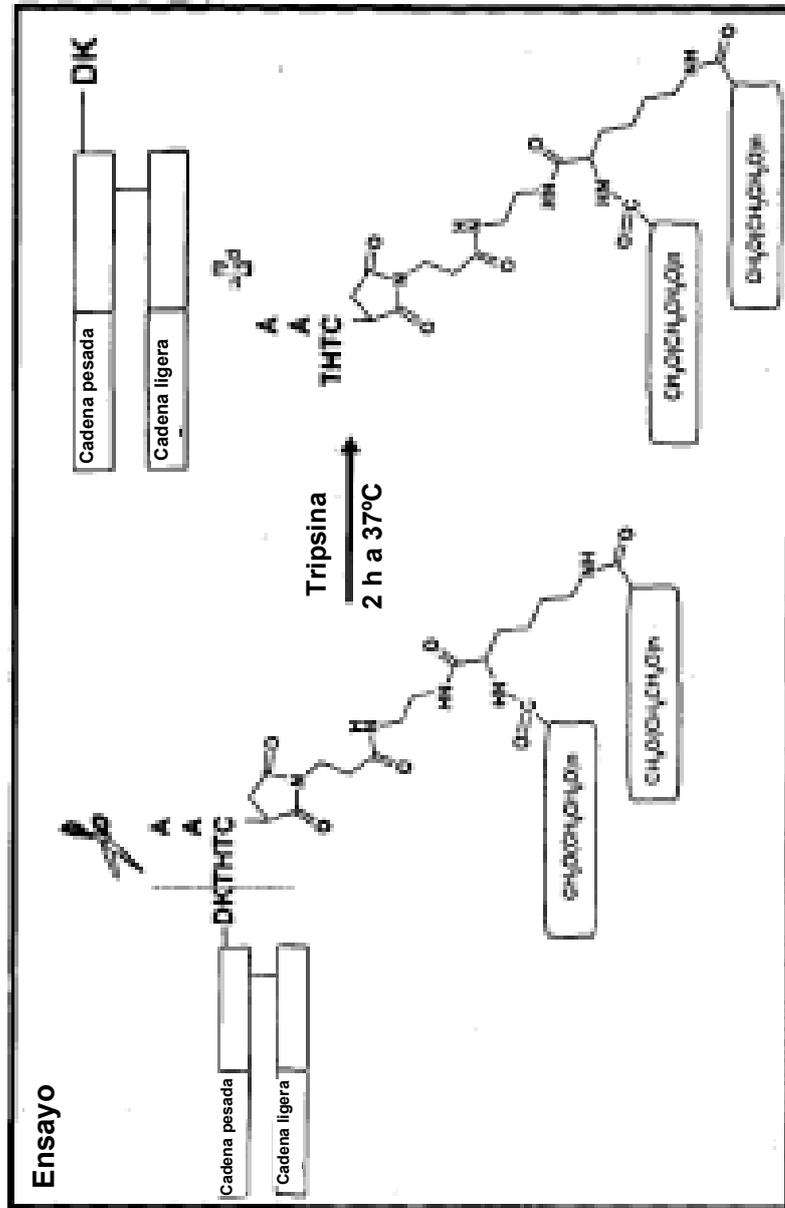


Figura 6

Figura 7. Eficiencia de las condiciones de digestión de tripsina seguido de HPLC HTRP

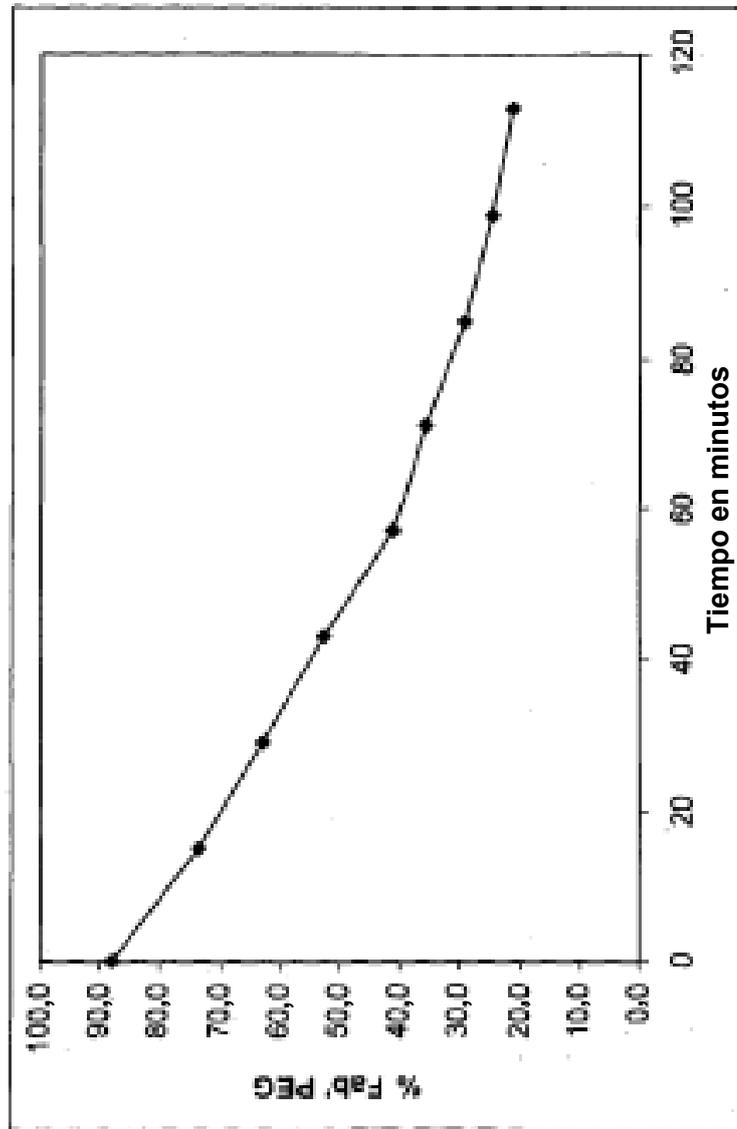


Figura 8. Perfil de digestión de HPLC CEX de Fab' PEG

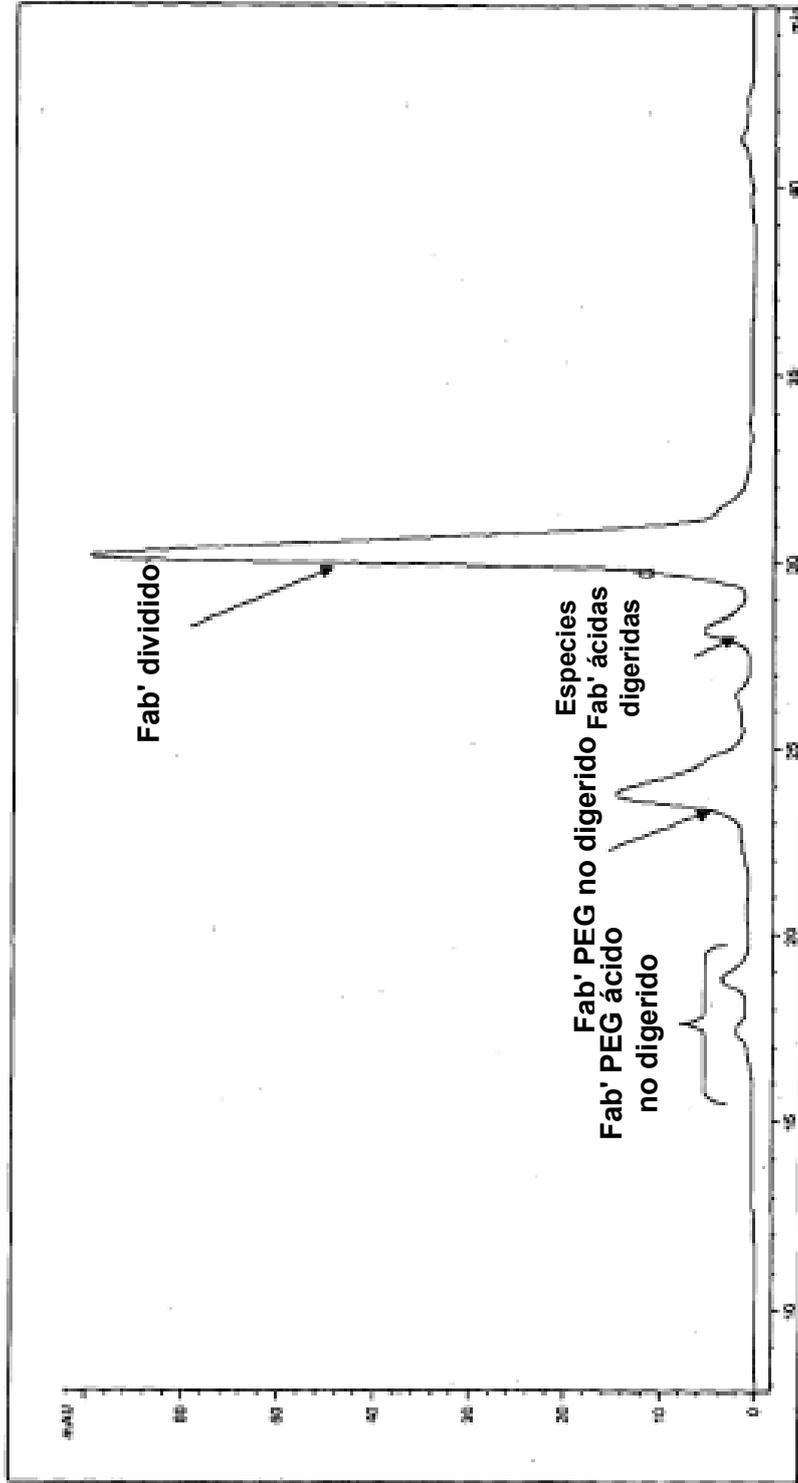
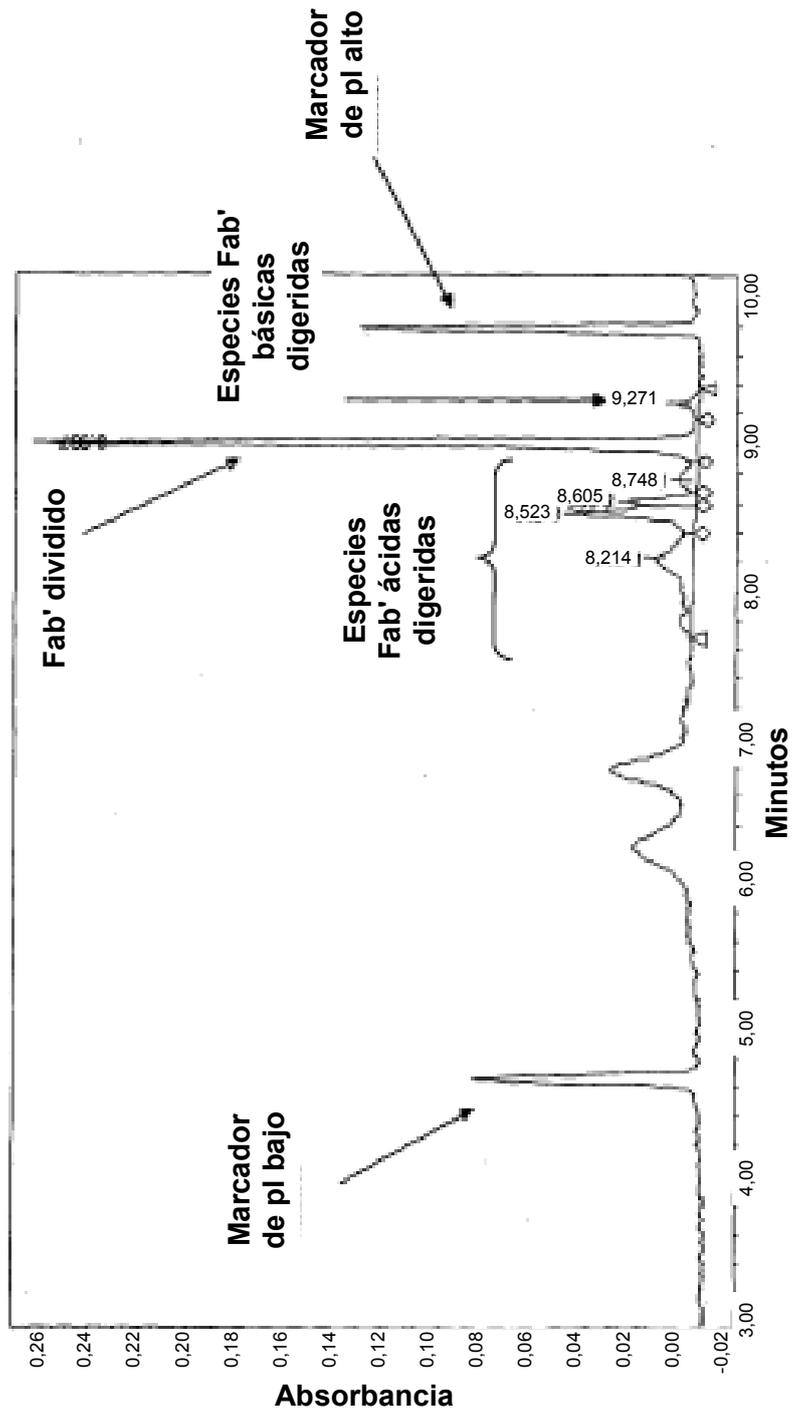


Figura 9. Perfil cIEF de la digestión tripsina de Fab' PEG



**Figura 10**

SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH1 de CDP870.

Asp Tyr Gly Met Asn

SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH2 de CDP870.

Trp Ile Asn Thr Tyr Ile Gly Glu Pro Ile Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly

SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRH3 de CDP870.

Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL1 de CDP870.

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL2 de CDP870.

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL3 de CDP870.

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Leu Thr

SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de CDRL3 de CDP870.

SEQ ID NO: 7 shows the amino acid sequence of the light chain variable region CDP870

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera CDP870.

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn

Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada CDP870.

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala

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

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

Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

Val Ser Ser

Figura 11

SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera injertada de Fab CDP870 anti-TNF $\alpha$ .

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

SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada injertada de Fab CDP870 anti-TNF $\alpha$ .

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