SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-151313- -00000-0000
Fecha: 2012-09-04 16:27:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: POLIPÉPTIDOS DE UNIÓN A A-BETA BIPARATÓPICOS.

SOLICITANTES: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

DIRECCIÓN: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 04 de Septiembre de 2012

P2012/000092

OLARTE

OLARTE MOURE & A

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-151313- -00000-0000

Fecha: 2012-09-04 16:27:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2012/000092**

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2)

SOLICITANTE (71)

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**
Dirección: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein
Nacionalidad o Domicilio: Alemania
Lugar de Constitución: Alemania
Teléfono: _____ **Fax:** _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual _____
Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/EP2011/053090 Fecha Marzo 02, 2011

Publicación Internacional No. WO 2011/107507 A1 Fecha Septiembre 09, 2011

(6) **Título (54)** **POLIPÉPTIDOS DE UNIÓN A A-BETA BIPARATÓPICOS.**

Clasificación Internacional (51) C07K 16/18; C07K 16/46; A61K 39/395.

Prioridad **SI** [X] **NO** [ ]

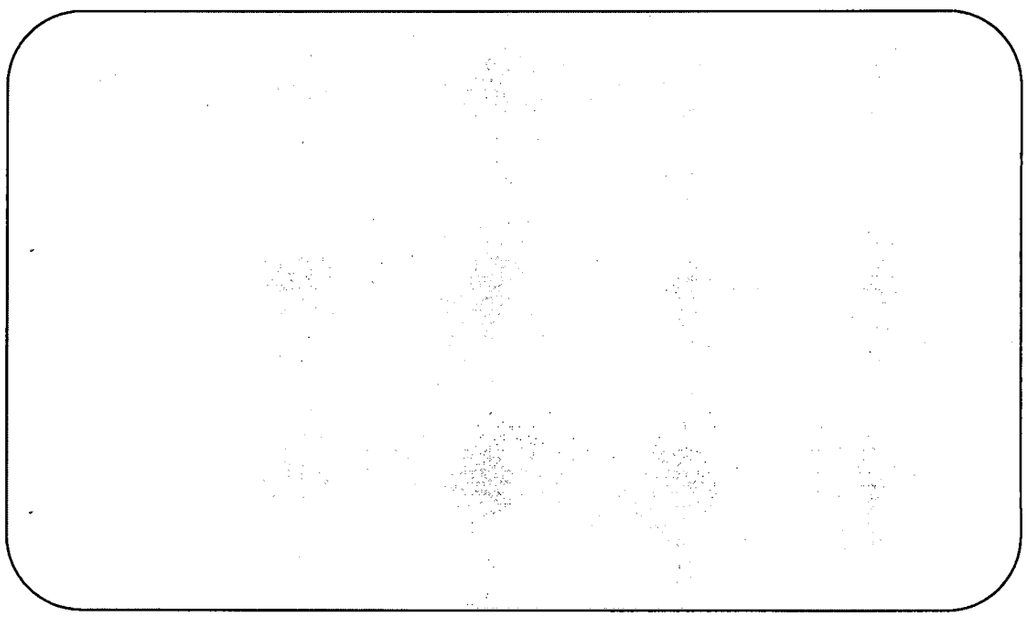
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
EP	Marzo 03, 2010	10155339.4

(9) **Comprobante de pago No.** 12- **Fecha** _____

ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) **FIGURA CARACTERÍSTICA:**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES

PCT/EP2011/053090

John E. PARK
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Estadounidense

Cornelia DORNER-CIOSSEK
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Stefan HOERER
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Lothar KUSSMAUL
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Martin LENTER
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Katharina ZIMMERMANN
Boehringer Ingelheim GmbH,
Corporate Patents
Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim Am Rhein
Alemania
Nacionalidad: Alemana

Gerald BESTE
Jozef Kluyskensstraat 25 bus 20
B-9000 Gent
Bélgica
Nacionalidad: Alemana

Toon LAEREMANS
Krauwenberg 35 B-1653
Dworp
Bélgica
Nacionalidad: Belga

Pascal MERCHIERS
Loopstraat 23 B- 2460
Kasterlee
Bélgica
Nacionalidad: Belga

Jo VERCAMMEN

Pijnbroekstraat 64 B-1600

Sint-Pieters-Leeuw

Bélgica

Nacionalidad: Belga

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0089990

Bogotá D.C., Agosto 31 de 2012 - 16:19:58

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	494783634	31/08/2012	5.310.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	590.000.00	590.000.00
				$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-151313- -00000-0000
Fecha: 2012-09-04 16:27:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-151313- -00000-0000

Fecha: 2012-09-04 16:27:15 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: _____/ _____/ _____/ AAAA MM DD	Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:	Planilla:

ID	*No. Radicación*	*Consecutivo*	*Item*
1	12-151313	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	*Unidad de Conservación*
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	*Soporte Documental*
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Anexan CD [illegible]

TESTIMONIO

ESCRITURA: 001416 K: 007735
MINUTA: 000657

DELEGACION DE PODER
QUE OTORGA
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
REPRESENTADO POR
JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS
A FAVOR DE
CARLOS REINALDO OLARTE

&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&&

I N T R O D U C C I O N ===

EN LA CIUDAD DE LIMA AL VEINTISEIS DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, ANTE MI; MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA, NOTARIO DE ESTA CAPITAL. ===

C O M P A R E C E N: ===

JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS, QUIEN MANIFIESTA SER DE NACIONALIDAD: PERUANA, DE ESTADO CIVIL CASADA, DE PROFESION U OCUPACIÓN: ABOGADA Y DOMICILIAR EN AVENIDA REPUBLICA DE PANAMA 3531, OFICINA 1203, DISTRITO DE SAN ISIDRO PROVINCIA Y DEPARTAMENTO DE LIMA, DEBIDAMENTE IDENTIFICADA CON DOCUMENTO NACIONAL DE IDENTIDAD NUMERO 29562321, QUIEN PROCEDE EN REPRESENTACION DE **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**, CUYAS FACULTADES CONSTAN EN EL PODER OTORGADO CON FECHA QUINCE DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, DEBIDAMENTE LEGALIZADO POR EL MINISTERIO DE RELACIONES ESTERIORES CON FECHA VEINTITRES DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, QUE SE INSERTA. ==== LA COMPARECIENTE ES INTELIGENTE EN EL IDIOMA CASTELLANO, QUIEN SE OBLIGA CON CAPACIDAD, LIBERTAD Y CONOCIMIENTO SUFICIENTE DE CONFORMIDAD CON EL EXAMEN QUE LE HE EFECTUADO DE LO QUE DOY FE; Y ME ENTREGO UNA MINUTA QUE ARCHIVO EN SU LEGAJO RESPECTIVO BAJO EL NUMERO DE ORDEN CORRESPONDIENTE Y CUYO TENOR LITERAL ES COMO SIGUE: ===

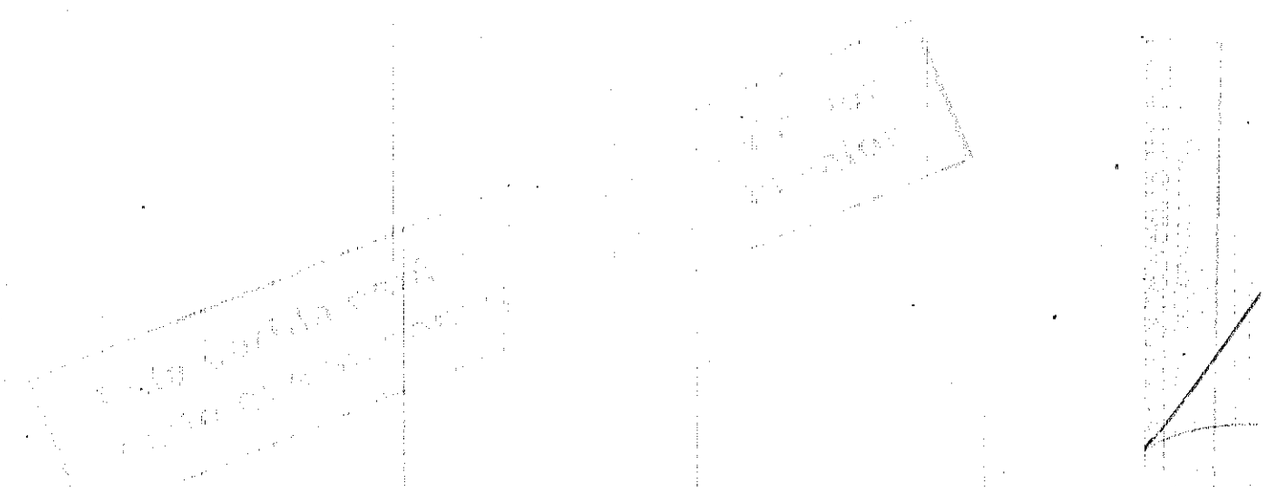
M I N U T A: ===

SEÑOR NOTARIO: ===

SIRVASE EXTENDER EN SU REGISTRO DE ESCRITURAS PÚBLICAS UNA DE **DELEGACION DE PODER** QUE OTORGA LA SEÑORA **IVETTE LUQUE CARDENAS,** IDENTIFICADA CON DNI N° 29562321, DE NACIONALIDAD PERUANA, ESTADO CIVIL CASADA, OCUPACIÓN ABOGADO Y CON DOMICILIO EN AV. REPÚBLICA DE PANAMÁ N° 3531, OFICINA 1203, SAN ISIDRO, QUIEN ACTÚA EN REPRESENTACIÓN DE **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**, UNA EMPRESA CONSTITUIDA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE ALEMANIA, CON DOMICILIO EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, ALEMANIA, SEGÚN PODER OTORGADO CON FECHA 13 DE OCTUBRE DE 2009, Y A QUIEN EN ADELANTE SE LE DENOMINARÁ **EL PODERDANTE**; A FAVOR DEL SEÑOR **CARLOS REINALDO OLARTE**, IDENTIFICADO CON CÉDULA N° 79.782.747, A QUIEN EN ADELANTE SE LE DENOMINARÁ **EL APODERADO**; EN LOS SIGUIENTES TÉRMINOS Y CONDICIONES: ===

PRIMERO: CON FECHA 15 DE JULIO DE 2010, LA EMPRESA **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**, UNA EMPRESA CONSTITUIDA Y EXISTENTE BAJO LAS LEYES DE ALEMANIA, CON DOMICILIO EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM AM RHEIN, ALEMANIA, OTORGÓ PODER A FAVOR DE **EL PODERDANTE**, EL CUAL USTED SEÑOR NOTARIO SE SERVIRÁ INSERTAR. ==

SEGUNDO: POR EL PRESENTE DOCUMENTO, **EL PODERDANTE** DELEGA PODER A FAVOR DE **EL APODERADO** PARA QUE REPRESENTE EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA A LA SOCIEDAD **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**, TAL COMO CONSTA EN EL PODER ADJUNTO, ANTE CUALQUIER AUTORIDAD ADMINISTRATIVA O JUDICIAL, INCLUYENDO LA SECRETARÍA Y TRIBUNAL DE JUSTICIA DE LA COMUNIDAD ANDINA, PARA EL INICIO, TRAMITACIÓN, OBTENCIÓN, DEFENSA Y HACER RESPETAR TODAS Y CUALQUIERA DE LAS PATENTES DE INVENCIÓN, MODELOS DE UTILIDAD, DISEÑOS INDUSTRIALES, MARCAS, LEMAS COMERCIALES, NOMBRES COMERCIALES, PROTECCIÓN DE DATOS DE PRUEBA, PROTECCIÓN DE SECRETOS EMPRESARIALES, DERECHOS DE AUTOR, REGISTRO DE NOMBRES DE DOMINIO, O SEGUIMIENTO DE PROCEDIMIENTOS EN MATERIAS TALES COMO PROPIEDAD INTELECTUAL. ===



TESTIMONIO

EL APODERADO ACTUANDO EN FORMA INDIVIDUAL PODRÁ DEMANDAR, RECONVENIR, CONTESTAR DEMANDAS Y RECONVENCIONES, PRESENTAR TODO TIPO DE SOLICITUDES, RECURSOS, RESPUESTAS U OPOSICIONES, PRESENTAR TODO TIPO DE RECURSOS DE IMPUGNACIÓN, PRESENTAR DECLARACIONES, JURADAS O NO, PRESENTAR CUALQUIER OTRO RECURSO O REMEDIO PROCESAL PERMITIDO POR LEY, PAGAR IMPUESTOS Y ANUALIDADES, SOLICITAR TESTIMONIOS, RENUNCIAR A LOS DERECHOS DE REGISTRO SOBRE UN ELEMENTO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL, DESISTIRSE DEL PROCESO Y DE LA PRETENSIÓN, ALLANARSE A LA PRETENSIÓN, CONCILIAR, TRANSIGIR, SOMETER A ARBITRAJE LAS PRETENSIONES CONTROVERTIDAS EN EL PROCESO, SOLICITAR Y EJECUTAR MEDIDAS CAUTELARES ASÍ COMO VISITAS INSPECTIVAS, RATIFICAR LOS ACTOS JURÍDICOS PROCESALES SUSCRITOS CON ANTERIORIDAD AL OTORGAMIENTO Y/O PRESENTACIÓN DEL PRESENTE PODER, SUSTITUIR O DELEGAR LA REPRESENTACIÓN, REVOCAR LOS PODERES OTORGADOS, RECIBIR NOTIFICACIONES EN NOMBRE DE LA COMPAÑÍA Y LOS DEMÁS ACTOS QUE EXPRESE LA LEY. ==========
AGREGUE USTED SEÑOR NOTARIO, LAS CLÁUSULAS DE LEY, E INSERTE EL PODER AL QUE SE HA HECHO REFERENCIA. =======
LIMA, 21 DE JULIO DE 2010. ==========
FIRMADO.- UNA FIRMA ILEGIBLE.- ==========
ABOGADO QUE AUTORIZA.- UN SELLO QUE DICE.- JURGEN STROBACH FLORIAN.- ABOGADO.- C.A.L: 30548.- UNA FIRMA ILEGIBLE.-
INSERTO UNO: TRADUCCION OFICIAL ==========
MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA, ABOGADO NOTARIO DE LIMA, CERTIFICO QUE HE TENIDO A LA VISTA **LA TRADUCCION OFICIAL DEL PODER ESPECIAL,** DEBIDAMENTE LEGALIZADO POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES CON FECHA VEINTITRES DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ, CUYO TENOR LITERAL ES COMO SIGUE: ==========

TRADUCCIÓN OFICIAL

TRA. N° TOI.0077.10

Primera página del documento original:

PODER ESPECIAL de fecha 15 de julio de 2010 redactado en idioma castellano e inglés

---

Segunda página del documento original:

UR. Nr. 1446/2010

Por la presente se certifica que las firmas que anteceden de:

- Dr. Michael Kompter, nacido el 11 de mayo de 1955, con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173.
- Dr. Christian Hauke, nacido el 31 de agosto de 1947, con domicilio en 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173.

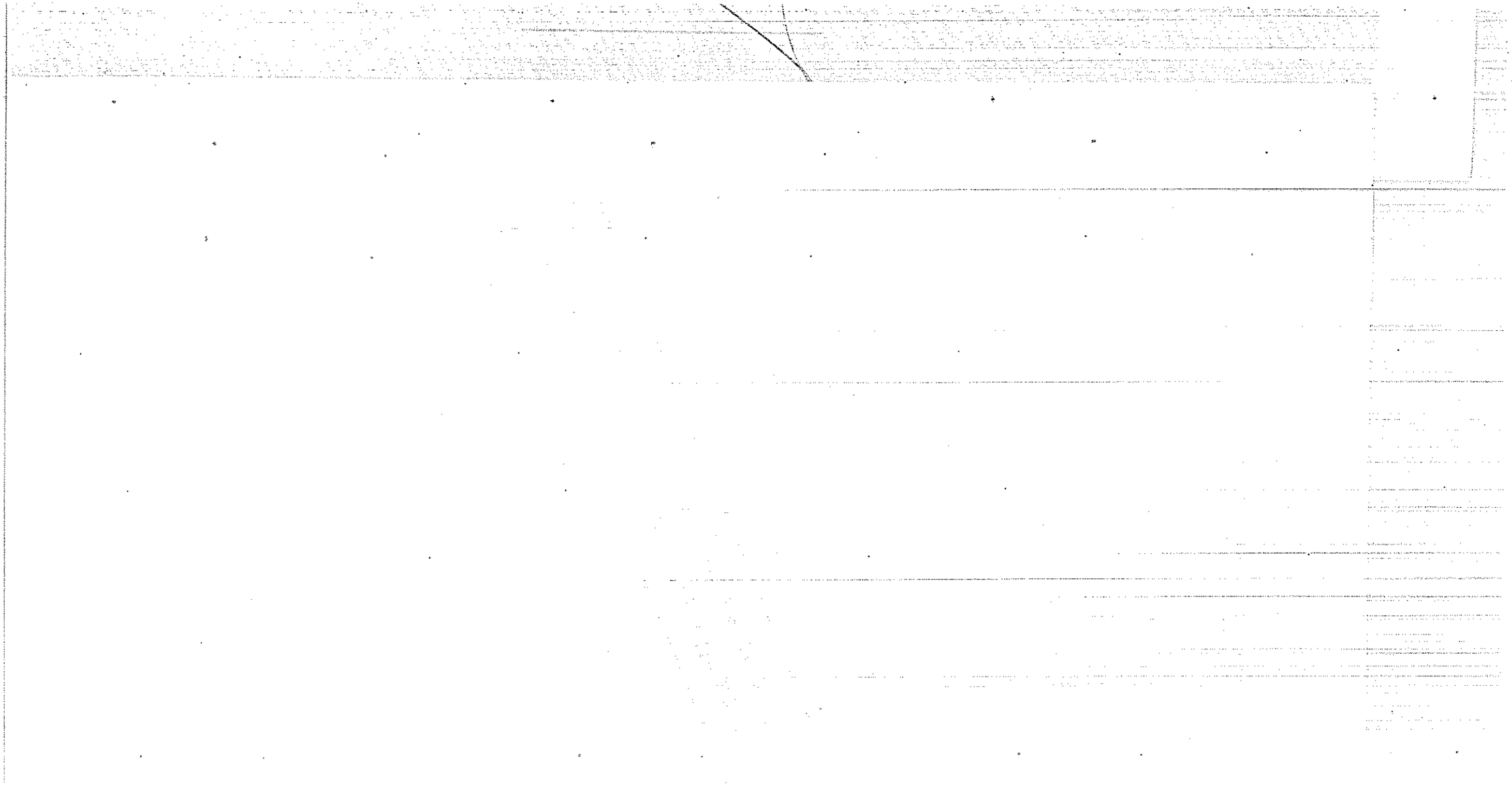
a quienes he conocido en persona,
han sido estampadas en mi presencia

Asimismo, certifico que Boehringer Ingelheim International GmbH es una sociedad debidamente constituida bajo las leyes de la República Federal de

Mary Ann Montenegro Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro JVT N° 105

1

Estados Unidos 888 - Lima 11 - Perú - Telfs. (511) 460-1659 • (511) 463-1157 • Fax: (511) 463-4546
maemm@terra.com.pe



TESTIMONIO

TRA. N° TOI.0077.10

Alemania, con domicilio en Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Alemania.

Dicha sociedad se encuentra inscrita en el Registro Mercantil del Juzgado de Distrito de Bingen, bajo el número HR B 1063 desde el 14 de mayo de 1968. Dicha inscripción ha sido transferida por ley al Registro Mercantil del Juzgado de Distrito de Mainz, donde se encuentra inscrita bajo el número HR B 21063 desde el 28 de diciembre de 2005.

Asimismo, certifico que los doctores Michael Kompter y Christian Hauke, han sido autorizados para firmar el documento que antecede y actualmente se encuentran debidamente autorizados para firmar a nombre de Boehringer Ingelheim International GmbH en calidad de apoderados.

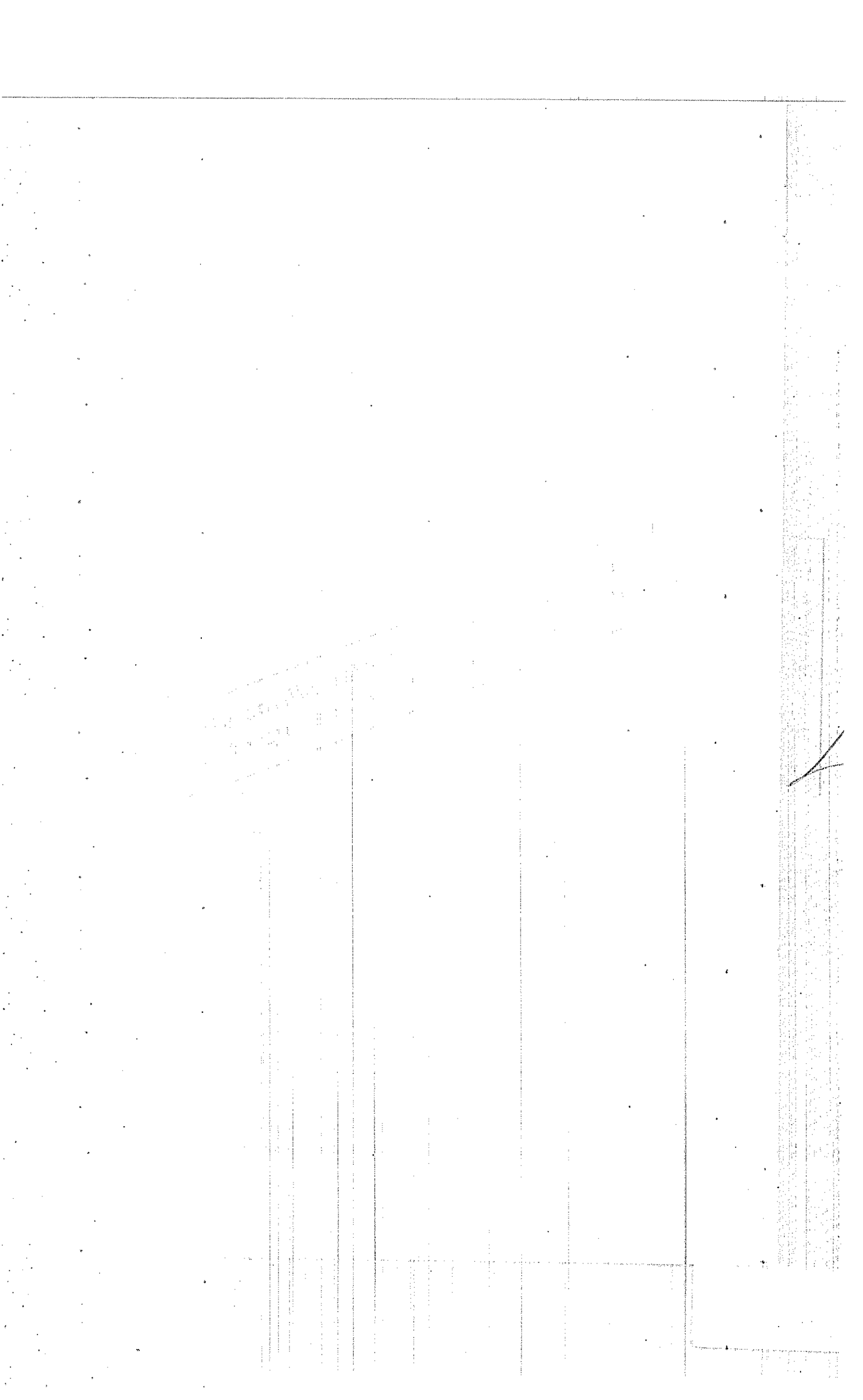
Ingelheim am Rhein, 15 de julio de 2010

(firmado ilegible)
Notario Público

Mary Ann Monteagudo Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro JVT N° 105

Estados Unidos 888 - Lima 11 - Perú - Tells.: (511) 460-1859 • (511) 463-1167 • Fax: (511) 463-4548
maemm@terra.com.pe

Av. Juan de Arona N° 545 Altura Cdra. 31 de la Av. Arequipa – San Isidro
Central: 719 – 1667 / 719 – 1668 / 719 – 1669 / Telefax.: 717 – 1031
www.notariabenvenuto.com / e-mail: notario@notariabenvenuto.com



TESTIMONIO

TRA. N° TOI.0077.10

Reverso de la segunda página del documento original:

(sello en idioma extranjero distinto al inglés, de fecha 16 de julio de 2010)

(sello en idioma castellano del Consulado del Perú, de fecha 20 de julio de 2010)

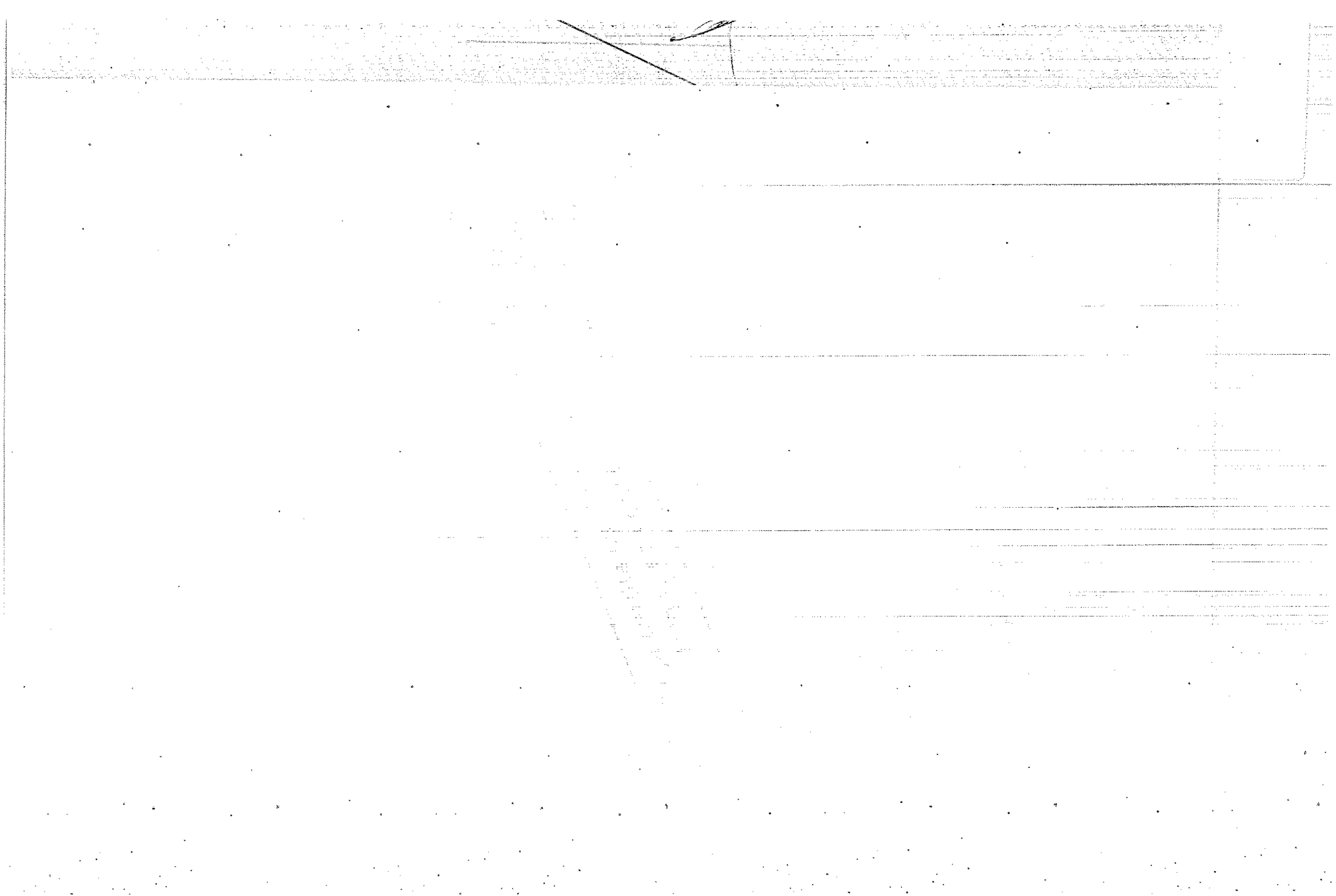
(sello) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización N° 092720
Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a) Alfredo Arecco-Sablich sin juzgar el contenido del documento
Lima, 23 de julio de 2010
(fdo.) Maribel del Rosario LUYO JAVIER
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares/sello

La infrascrita, Traductora Pública Juramentada, certifica que la presente traducción es fiel y correcta del texto original en idioma Castellano..... adjunto. Esta traducción no debe interpretarse como reconocimiento de la autenticidad del documento traducido.
En fe de lo cual, firmo y sello en.....Lima.....
a los...26....días del mes de...julio.....de 2010..

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización N°
Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO
Julia Adela Moreano de Dueñas
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares
LIMA 27 JUL. 2010

Mary Ahn Montesinos Medina
Traductora Pública Juramentada
Registro JVT N° 105

Estados Unidos 888 - Lima 11 - Perú - Telfs.: (511) 460-1859 • (511) 463-1167 • Fax: (511) 463-4548
maemm@terra.com.pe



TESTIMONIO

FERNÁNDEZ - DÁVILA & BUENO
ABOGADOS

PODER ESPECIAL

Conste por el presente documento el Poder Especial que otorga *[insertar nombre de poderdante]*, domiciliada en *[insertar domicilio]* constituida de acuerdo a las leyes de *[insertar país de constitución]*, representada por su *[insertar cargo en la cía.]* Sr.(a) *[insertar nombre del representante de la cía.]*, a favor de FERNÁNDEZ-DÁVILA ABOGADOS SAC, CARLOS FERNÁNDEZ DAVILA WINKLER, ROSA BUENO MERA, JULIETA DEL PILAR TIJERO MARTINO, DIEGO CORDOVA FLORES, IVETTE LUQUE CARDENAS y/o CLARISA SILES VASCONES, domiciliados en Av. República de Panamá 3531, Oficina 1203, San Isidro, Lima, Perú, para que la representen en la República de Perú, República de Bolivia, República de Chile, República de Colombia, República de Ecuador y República Bolivariana de Venezuela, ante cualquier autoridad administrativa o judicial, incluyendo la Secretaría y Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, para el inicio, tramitación, obtención, defensa y hacer respetar todas y cualquiera de las patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas, lemas comerciales, nombres comerciales, protección de datos de prueba, protección de secretos empresariales, derechos de autor, registro de nombres de dominio, o seguimiento de procedimientos en materias tales como Propiedad Intelectual.

Los apoderados podrán ejercer el presente poder actuando en forma individual e indistinta, y gozarán de las siguientes facultades, tales como demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones, presentar todo tipo de solicitudes, recursos, respuestas u oposiciones, presentar todo tipo de recursos de impugnación, presentar declaraciones, juradas o no, presentar cualquier otro recurso o remedio procesal permitido por ley, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios renunciar a los derechos de registro sobre un elemento de la propiedad industrial, desistirse del proceso y de la pretensión, allanarse a la pretensión, conciliar, transigir, someter a arbitraje las pretensiones controvertidas en el proceso, solicitar y ejecutar medidas cautelares así como visitas inspectivas, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal, revocar los poderes otorgados, recibir notificaciones en nombre de la compañía y los demás actos que exprese la ley.

Suscrito en..... el ..... de ..... de 2010

ESTE PODER REQUIERE DE LEGALIZACIÓN NOTARIAL (PRECISANDO QUE EL REPRESENTANTE TIENE LAS FACULTADES PARA OTROGARLO Y QUE ESTUVO PRESENTE AL MOMENTO DE HACERLO) Y DE CONSUL PERUANO (CUANDO ES OTORGADO EN EL EXTRANJERO)

SPECIAL POWER OF ATTORNEY

By means of this Special Power of Attorney *Boehringer Ingelheim International GmbH* with address in *Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany* and incorporated under the laws of *Germany* duly represented by its *Authorized Signatories* Dr. Michael KOMPTER and Dr. Christian HAUKE, grants to FERNÁNDEZ-DÁVILA ABOGADOS SAC, CARLOS FERNÁNDEZ DAVILA WINKLER, ROSA BUENO MERA, JULIETA DEL PILAR TIJERO MARTINO, DIEGO CORDOVA FLORES, IVETTE LUQUE CARDENAS and/or CLARISA SILES VASCONES, with address at Av. República de Panamá 3531, Oficina 1203, San Isidro, Lima, Perú, the powers to represent in the Republic of Perú, the Republic of Bolivia, Republic of Chile, Republic of Colombia, Republic of Ecuador and the Bolivarian Republic of Venezuela before any administrative or judicial authority of any class, including the Andean Secretariat and the Andean Court of Justice to initiate, prosecution, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Invention, Utility Models, Industrial Designs, Trademarks, Trade Names, Commercial Emblems, Test Data Protection, Protection of Trade Secrets, Copyrights, Registration of Domain names and handle proceedings related to Intellectual Property.

The empowered representatives will exert this power of attorney acting individually and indistinctively with the following powers, having authority to claim, to counter-claim, to answer complaints and counter-claims, to file petitions, recourses, replies and oppositions, to withdraw the registration of an industrial property element, to abandon the action and the requested relief, to defend a suit, to file standard or sworn declarations, to file all sort of petitions, appeal and motions permitted by law, pay taxes and annuities, request testimonies, to accept in total or part the demanded pretensions, conciliate, settle, submit to arbitration the contradicted pretensions in the process, to require and execute precautionary measures and inspections among others, to ratify all the acts in regular procedures and proceedings entered into before the granting and/or presentation of this document, substitute or delegate the representation, revoke such substitutions, receive notifications on behalf of the Company and for the rest of the acts which the law provides.

Executed in Ingelheim, on 15th July of 2010

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

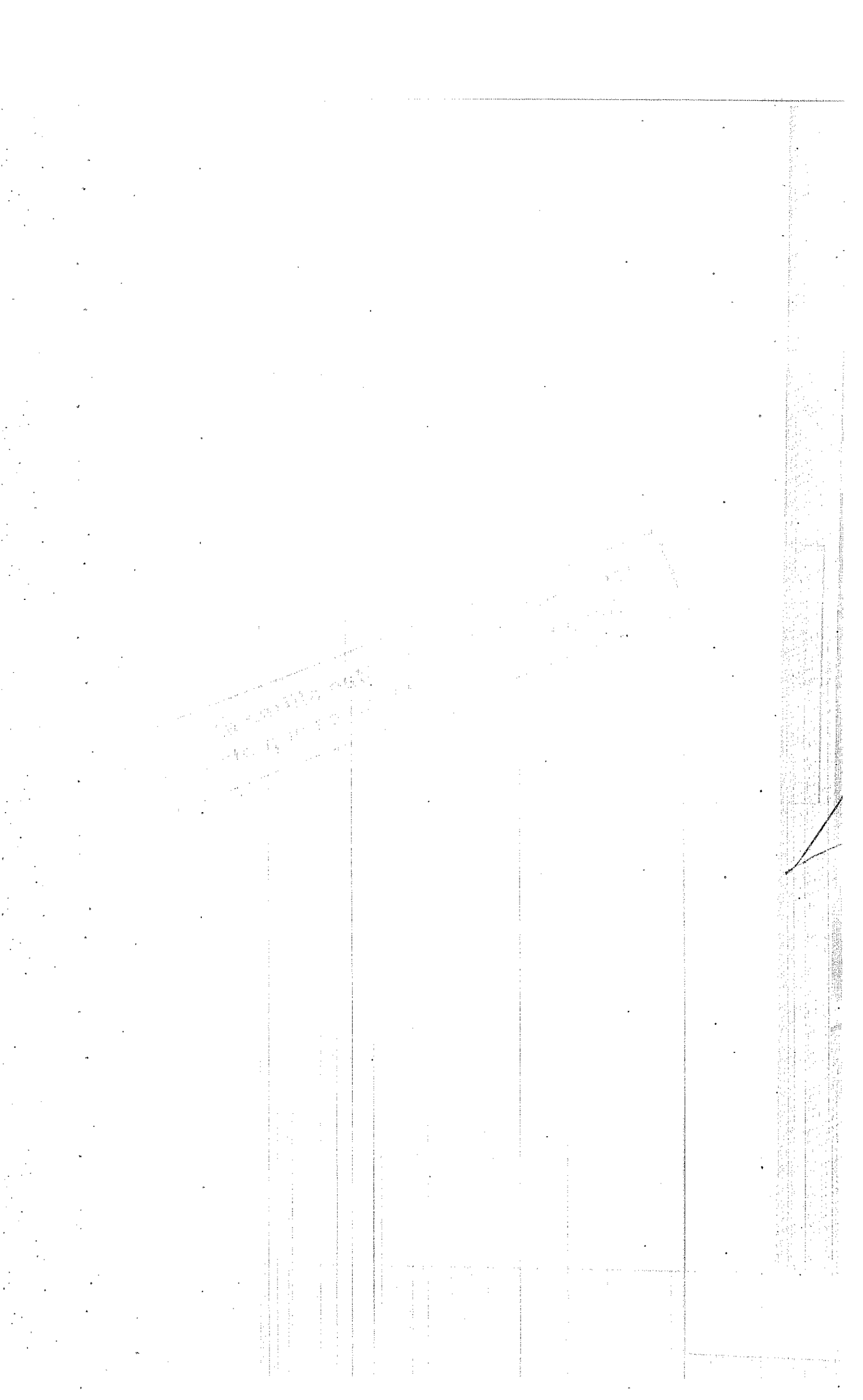
ppa.

Dr. Michael KOMPTER
Authorized Signatory

ppa.

Dr. Christian HAUKE
Authorized Signatory

THIS POWER OF ATTORNEY REQUIRES LEGALIZATION OF A NOTARY (STATING THAT THE REPRESENTATIVE HAS ENOUGH POWERS TO GRANT IT AND APPEARED AND EXECUTED IT PERSONALLY) AND OF A PERUVIAN CONSUL (WHEN GRANTED ABROAD)



TESTIMONIO

UR.Nr. 1446/2010

It is herewith certified that above signatures of:

- Dr. Michael **K o m p t e r**, born 11th day of May 1955, with its business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,
- Dr. Christian **H a u k e**, born 31st day of August 1947, with its business address at 55216 Ingelheim am Rhein, Binger Straße 173,

personally known,
were duly given in my presence.

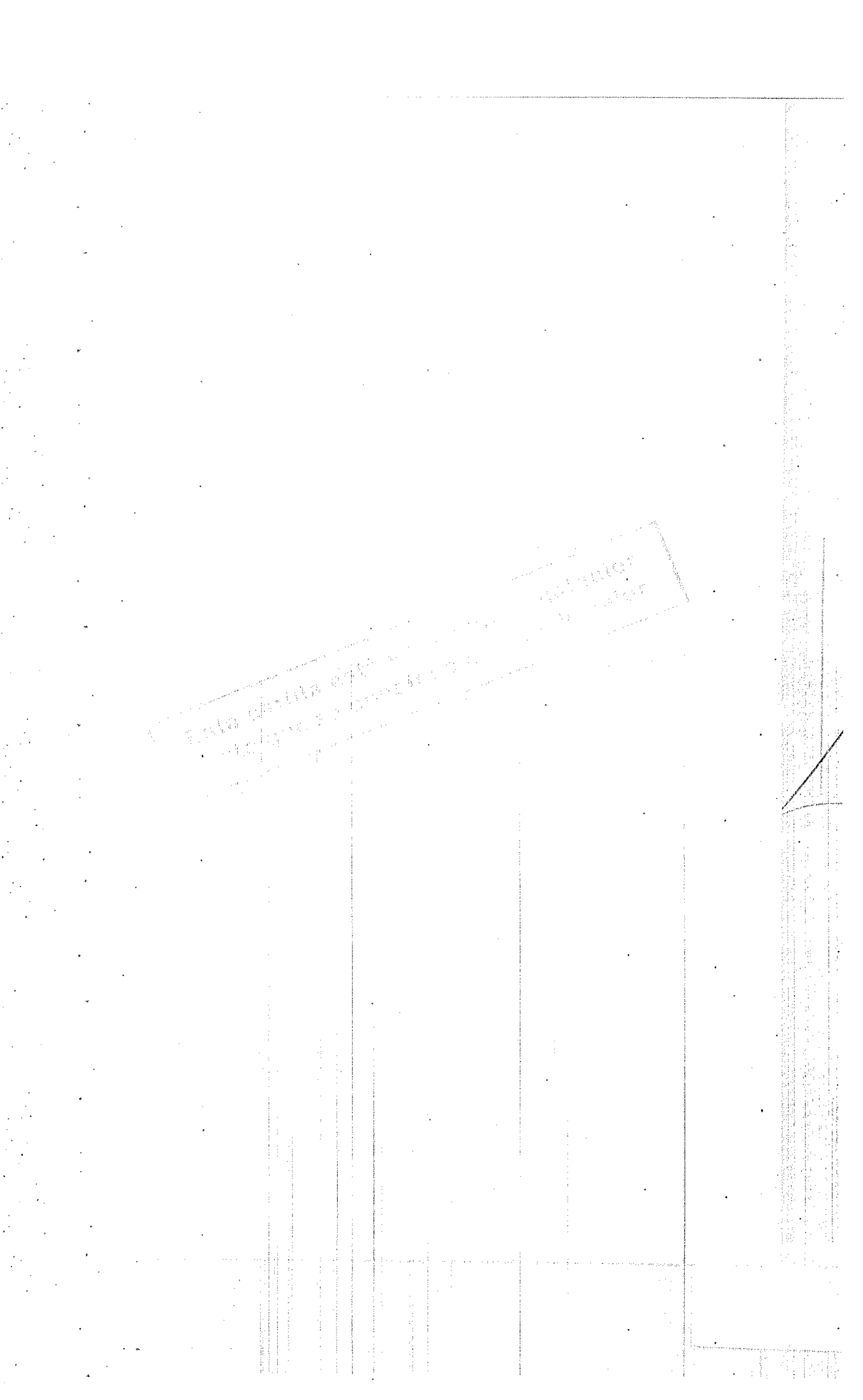
It is herewith certified that **Boehringer Ingelheim International GmbH** is a corporation duly organized and existing under the laws of the Federal Republic of Germany having its principal place of business at Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany.

It had been entered into the Commercial Register of the District Court of Bingen under HR B 1063 as of 14th day of May 1968. This registration was transferred by law to the Commercial Register of the District Court of Mainz, where it has been registered under HR B 21063 since 28th day of December 2005.

Furthermore, I certify that Dr. Michael Kompter and Dr. Christian Hauke were authorized to sign the foregoing document and still are duly authorized to sign on behalf as procurists of **Boehringer Ingelheim International GmbH**.

Ingelheim am Rhein, the 15th day of July 2010/Ge

Notary public



TESTIMONIO

AL DORSO: ==========

910 E 1

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des
Notars Horst Heintskill in Ingelheim am Rhein
und die Echtheit des beigedrückten Dienstsiegels
werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, dass der
Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Präsidentin des Landgerichts 2 Mainz

Kostenrechnung:
Gebühr für die Erteilung
der Legalisation
Wert: 50.000,00 €
JVKostO v. 26.7.1957
i.V.m. § 45 KostO
Gebühr: 33,00 €
Mainz, 16.07.10
Heppes-Schwarz
Amtsinspektorin

Präsidentin des Landgerichts 2 Mainz

Mainz, den 16. Juli 2010
Die Präsidentin des Landgerichts
In Vertretung
Dr. Matthias Friedrich
Vorsitzender Richter am Landgericht

CONSULADO GENERAL DEL PERU
FRANCFORT DEL MENO

Se legaliza la firma de:
DR. MATTHIAS FRIEDRICH

Quien desempeña el cargo de:
REPRASENTANTE DEL PRESIDENTE
DEL JUZGADO REGIONAL
EN MAINZ

Nº de Orden: 0363
Nº de Actuación: 1471
Nº de Tarifa: 22 a
Derechos percibidos: S/C: 80.00
e: 72.00

Francfort del Meno, 20 DE Julio DE 2010

ALFREDO ARECCO-SABLICH
Cónsul General del Perú

CONSULADO GENERAL DEL PERU FRANCFORT DEL MENO

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización Nº 022420
Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)
Alfredo Arecco - Sablich
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

Maribel del Rosario Llaya Jaylar
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares

LIMA, 23 JUL 2010

Esta carilla está en blanco. Cualquier texto que se consigne carece de valor

O DE NOT
a y sellos
en al (la)
Nº 116
rma del N
amín Gut
MSC

Mario Gino Benvenuto Murguía
ABOGADO NOTARIO DE LIMA

TESTIMONIO

INSERTO. ==========

DE CONFORMIDAD CON LA LEY DEL NOTARIADO, ARTICULO 59, INCISO D), TRANSCRIBO: ==========

CÓDIGO PROCESAL CIVIL: "ARTÍCULO 74º.- FACULTADES GENERALES.- LA REPRESENTACIÓN JUDICIAL CONFIERE AL REPRESENTANTE LAS ATRIBUCIONES Y POTESTADES GENERALES QUE CORRESPONDEN AL REPRESENTADO, SALVO AQUELLAS PARA LAS QUE LA LEY EXIGE FACULTADES EXPRESAS. LA REPRESENTACIÓN SE ENTIENDE OTORGADA PARA TODO EL PROCESO, INCLUSO PARA LA EJECUCIÓN DE LA SENTENCIA Y EL COBRO DE COSTAS Y COSTOS, LEGITIMANDO AL REPRESENTANTE PARA SU INTERVENCIÓN EN EL PROCESO Y REALIZACIÓN DE TODOS LOS ACTOS DEL MISMO, SALVO AQUELLOS QUE REQUIERAN LA INTERVENCIÓN PERSONAL Y DIRECTA DEL REPRESENTADO." ==========

CÓDIGO PROCESAL CIVIL: "ARTÍCULO 75º.- FACULTADES ESPECIALES.- SE REQUIERE EL OTORGAMIENTO DE FACULTADES ESPECIALES PARA REALIZAR TODOS LOS ACTOS DE DISPOSICIÓN DE DERECHOS SUSTANTIVOS Y PARA DEMANDAR, RECONVENIR, CONTESTAR DEMANDAS Y RECONVENCIONES, DESISTIRSE DEL PROCESO Y DE LA PRETENSIÓN, ALLANARSE A LA PRETENSIÓN, CONCILIAR, TRANSIGIR, SOMETER A ARBITRAJE LAS PRETENSIONES CONTROVERTIDAS EN EL PROCESO, SUSTITUIR O DELEGAR LA REPRESENTACIÓN PROCESAL Y PARA LOS DEMÁS ACTOS QUE EXPRESE LA LEY. EL OTORGAMIENTO DE FACULTADES ESPECIALES SE RIGE POR EL PRINCIPIO DE LITERALIDAD. NO SE PRESUME LA EXISTENCIA DE FACULTADES ESPECIALES NO CONFERIDAS EXPLÍCITAMENTE." ==========

CONCLUSION: ==========

FORMALIZADO EL INSTRUMENTO LA COMPARECIENTE LE DIO LECTURA, DESPUES DE LO CUAL SE AFIRMA Y RATIFICA EN SU CONTENIDO, DECLARANDO QUE SE TRATA DE UN ACTO VALIDO Y NO SIMULADO, MANIFESTANDO IGUALMENTE CONOCER LOS ANTECEDENTES Y/O TITULOS QUE SE ORIGINAN POR EL PRESENTE INSTRUMENTO Y DECLARANDO RECONOCER COMO SUYA LA FIRMA DE LA MINUTA QUE LA ORIGINA. ==========

DEJO CONSTANCIA DE HABER ADVERTIDO A LA INTERESADA DE LOS EFECTOS LEGALES DEL PRESENTE INSTRUMENTO NOTARIAL. ==========

LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA SE INICIA EN LA FOJA DE PAPEL NOTARIAL CON NUMERO DE SERIE B Nº0706090 Y CONCLUYE EN LA FOJA DE PAPEL NOTARIAL CON NUMERO DE SERIE B Nº0706093(VUELTA), DE LO QUE DOY FE. ==========

FIRMADO: JANNE IVETTE LUQUE CARDENAS.- UNA HUELLA DIGITAL.- UNA FIRMA ILEGIBLE.- FIRMÓ EL VEINTISEIS DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ.- ==========

EL PROCESO DE FIRMAS CONCLUYO EL: VEINTISEIS DE JULIO DEL DOS MIL DIEZ.- ==========

FIRMADO: DR. MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA. ABOGADO - NOTARIO DE LIMA. ==========

ES TRANSCRIPCION DE LA ESCRITURA PUBLICA QUE CORRE EN EL REGISTRO CON FECHA VEINTISEIS DIAS DEL MES DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ DE FOJAS 004590 A FOJAS 004593(VUELTA), Y A SOLICITUD DE PARTE INTERESADA EXPIDO EL PRESENTE, DE ACUERDO A LEY EL QUE RUBRICO EN CADA UNA DE SUS HOJAS, SELLO, SIGNO Y FIRMO EN LIMA, VEINTISEIS DE JULIO DEL AÑO DOS MIL DIEZ. ==========

MARIO GINO BENVENUTO MURGUIA
ABOGADO
NOTARIO DE LIMA

O DE NOTARIOS DE LIMA CERTIFICA:
a y sellos que anteceden en esta foja
en al (la) Notario(a) de Lima,
Benvenuto Murguia
Nº 116766 Fecha: 26 JUL 2010
irma del Notario(a) más no el contenido

Juan Gutiérrez Adriazola
FISCAL

Av. Juan de Arona N° 545 Miraflores Cdra. 31 de la Av. Arequipa – San Isidro
Central: 719 – 1667 / 719 – 1668 / 719 – 1669 / Telefax.: 717 – 1031
www.notariabenvenuto.com / e-mail: notario@notariabenvenuto.com

Esta carilla está en blanco. Cualquier texto que se consigne carece de valor

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICA CONSULAR
Legalización Nº 053417
Se legaliza la firma que antecede del Sr.(a)
SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

Julia Adela Morenaú de Dueñas
Departamento de Legalizaciones
Dirección de Trámites Consulares

LIMA 27 JUL. 2010

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
Lima – Perú

No. 1793

Lima, 02 Agosto 2010

El suscrito Cónsul General Consulares hace constar que el(a) señor (a) JULIA ADELA MOREANO DE DUEÑAS - DIRECION DE TRAMITES CONSULARES. Cuya firma aparece al pie del presente documento desempeñaba las funciones allí indicadas.

El suscrito Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido de este documento.

Pago Impuesto de Timbre US$10.00
Y derechos consulares US$15.00

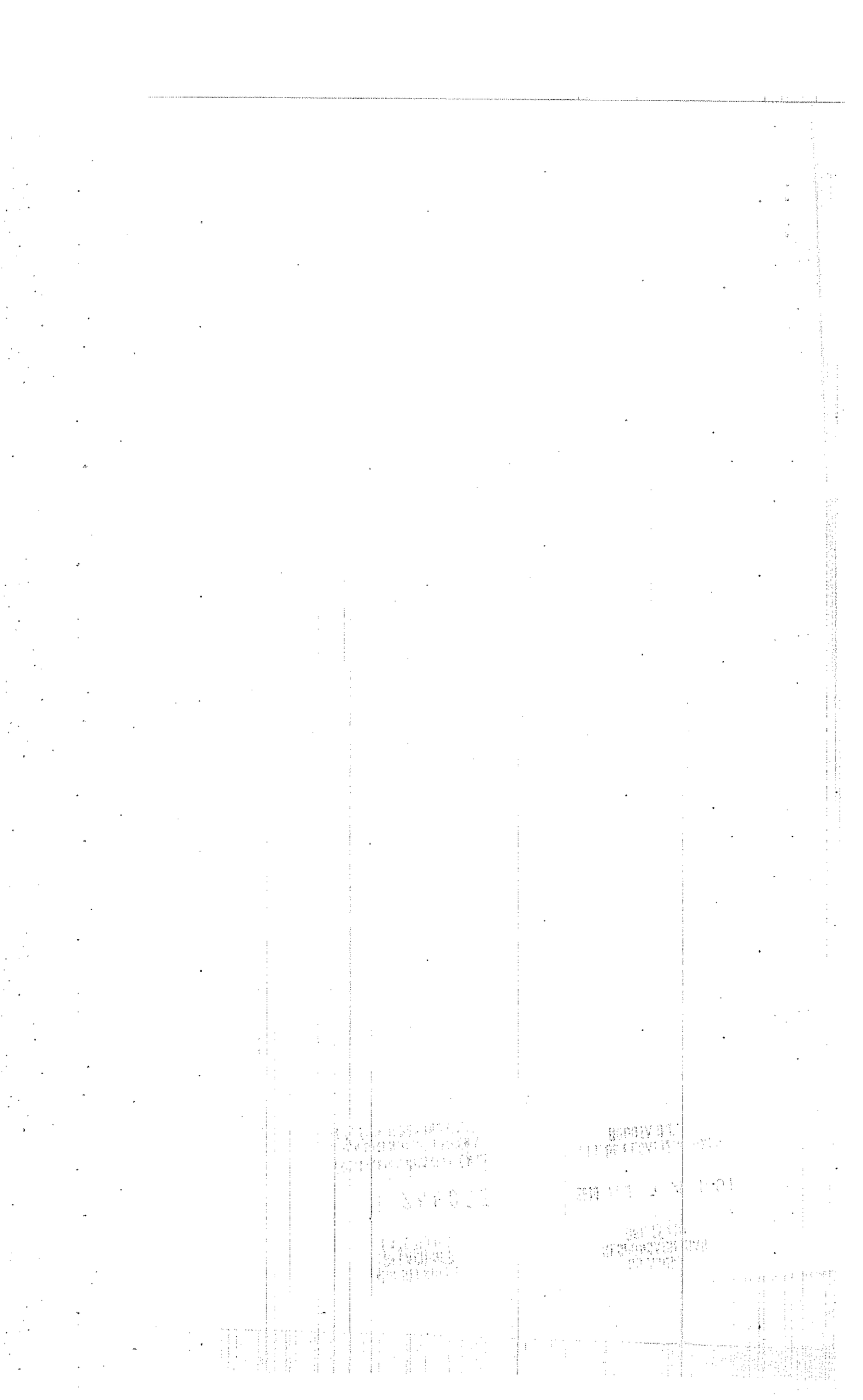
JAIRO MONTES MORENO
Cónsul General

Dirección: Jorge Basadre 1580 TEL. (511) 4410530- 4410954 Fax: 2213661-4416922-4218029
Sitio Web: http://www.embajadacolombia.org.pe/html/ - consuladogeneral@embajadacolombia.org.pe

Perú no es miembro del convenio de Apostilla.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
264815
JAIRO MONTES
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2010 AUG A 1:51
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
9 September 2011 (09.09.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/107507 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2011/053090

(22) International Filing Date:
2 March 2011 (02.03.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10155339.4 3 March 2010 (03.03.2010) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **PARK, John, E.** [US/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **DORNER-CIOSSEK, Cornelia** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **HOERER, Stefan** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **KUSSMAUL, Lothar** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **LENTER, Martin** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **ZIMMERMANN, Katharina** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE). **BESTE, Gerald** [DE/BE]; Jozef Kluyskensstraat 25 bus 20, B-9000 Gent (BE). **LAEREMANS, Toon** [BE/BE]; Krauwenberg 35, B-1653 Dworp (BE). **MERCHIERS, Pascal** [BE/BE]; Loopstraat 23, B-2460 Kasterlee (BE). **VERCAMMEN, Jo** [BE/BE]; Pijnbroekstraat 64, B-1600 Sint-Pieters-Leeuw (BE).

(74) Agents: **HAMMANN, Heinz** et al.; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) **Title**: BIPARATOPIC ABETA BINDING POLYPEPTIDES

(57) **Abstract**: The invention relates to biparatopic A-beta binding polypeptides and, more specifically, to biparatopic A-beta binding polypeptides comprising at least two immunoglobulin single variable domains binding to different epitopes of A-beta. The invention also relates to specific sequences of such polypeptides, methods of their production, and methods of using them, including methods of treatment of diseases such as Alzheimer's Disease.

WO 2011/107507 A1

BIPARATOPIC ABETA BINDING POLYPEPTIDES

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to novel beta-amyloid peptide (in the following: "A-beta") binding polypeptides, the polypeptides comprising specific immunoglobulin domains. The invention also relates to nucleic acids encoding such polypeptides; to methods for preparing such polypeptides; to host cells expressing or capable of expressing such polypeptides; to compositions comprising such polypeptides; and to uses of such polypeptides or such compositions, in particular for prophylactic, therapeutic and diagnostic purposes.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Several degenerative neural diseases are caused by the improper folding or processing of proteins or by prions, both of which result in invasive neural depositions known as amyloid plaques. The most widely known degenerative neural disease is probably Alzheimer's Disease (AD).

The incidence of AD warrants an urgent and unmet medical need: between 10 and 40% of all people aged 65 to 85 develop AD. Moreover, this segment of the population continues to grow exponentially. Therefore, from a humane, as well as from a social and economical point of view, it is imperative to find ways to efficiently diagnose and treat this devastating disorder. Concerning treatment, drugs are needed not only to slow or stop the disease progression, but also to restore brain damage that has already occurred during the initial stages of AD (before diagnosis). At this moment, neither early-diagnosis nor therapy treatment are efficient.

AD is defined as a dementia that coincides with the presence in the brain of extracellular amyloid plaques, composed mainly of amyloid peptides, and by intracellular neurofibrillary tangles (NFT) composed mainly of protein tau.

A primary component of amyloid plaques characteristic of AD is beta amyloid peptide (A-beta), a highly insoluble peptide 39-43 amino acids (aa) in length that has a strong propensity to adopt beta sheet structures, oligomerize and form protein aggregates. A-beta is produced from the A-beta precursor protein (APP) by two proteolytic events. A beta-secretase activity cleaves APP at the N-terminus of A-beta ("beta-site") between amino acids Met-671 and Asp-672 (using the numbering of the 770 aa isoform of APP). Cleavage at the beta-site yields a membrane-associated APP fragment of 99 aa (C99). A second site within the transmembrane domain of C99 ("gamma site") can then be cleaved by a gamma-secretase to release A-beta. APP can alternatively be cleaved within its A-beta region, predominantly at the alpha-secretase cleavage site of APP, to produce a C-terminal APP fragment of 83 aa (C83), which can also be further cleaved by gamma-secretase to produce a small soluble secreted peptide, p3. This pathway reduces the potential accumulation of A-beta.

The intra- and extracellular A-beta adopts a beta-sheet conformation and forms intermediates named ADDL (amyloid derived diffusible ligands) and protofibrils, finally precipitates in the form of amyloid fibrils which assemble into amyloid plaques. In these processes, the more hydrophobic A-beta(1-42) peptide (cf. below) is presumed to serve as a nucleating agent around which the plaques steadily grow.

A number of missense mutations in APP have been implicated in forms of early-onset familial AD. All of these are at or near one of the canonical cleavage sites of APP. Thus, the Swedish double mutation (K670N/M671L) is immediately adjacent to the beta-secretase cleavage site and increases the efficiency of beta-secretase activity, resulting in production of more total A-beta. Any of three mutations at APP residue 717, near the gamma-secretase cleavage site,

increases the proportion of a more amyloidogenic 42 aa form of A-beta, also named A-beta(1-42), relative to the more common 40 aa form, A-beta(1-40). Two additional mutations of APP have been described which are close but not adjacent to the alpha-site. A mutation (A692G, A-beta residue 21) in a Flemish family and a mutation (E693Q, A-beta residue 22) in a Dutch family each have been implicated in distinct forms of familial AD. The Flemish mutation, in particular, presents as a syndrome of repetitive intracerebral hemorrhages or as an AD-type dementia. The neuropathological findings include senile plaques in the cortex and hippocampus, and usually multiple amyloid deposits in the walls of cerebral microvessels.

Several years ago, the membrane-associated aspartyl protease, BACE (also called memapsin or Asp2) has been shown to exhibit properties expected of a beta-secretase. This enzyme cleaves APP at its beta-site and between Tyr-10 and Glu-11 of the A-beta region with comparable efficiency. A-beta fragments cleaved at this latter site have been observed in amyloid plaques in AD and in media of APP-transfected HEK293 human embryonic kidney cells. Several groups also observed the presence in the database of an additional aspartyl protease, BACE2 (also called Asp1), a close homologue of BACE (now also referred to as BACE1). BACE2 cleaves APP at its beta-site and more efficiently at sites within the A-beta region of APP, after Phe-19 and Phe-20 of A-beta. These internal A-beta-sites are adjacent to the Flemish APP mutation at residue 21, and this mutation markedly increases the proportion of beta-site cleavage product generated by BACE2. Conservative beta-site mutations of APP that either increase (the Swedish mutation) or inhibit (M671V) beta-secretase activity affect BACE1 and BACE2 activity similarly. BACE2, like BACE1, proteolyzes APP maximally at acidic pH.

Mutations in the APP gene or in the presenilin 1 (PS1) gene (carrying "gamma-secretase" activity) cause early-onset familial AD. Examples of APP mutations are the above-mentioned 'Swedish' and 'London' (717) mutations located respectively near the beta- and gamma-secretase cleavage sites. These mutations increase the formation of A-beta peptides and especially of A-beta(1-

42), and thereby increase the formation of amyloid aggregates and plaques. Whereas initially plaques were believed
to be a major trigger for the development of AD, current studies emphasize the role of protofibrils and ADDL as the major toxic components. It is even conceivable that plaques are a mechanism whereby the neurotoxic peptides are actually rendered biologically inactive.

Further information on neurodegenerative diseases and on the role of A-beta therein can be taken from Wisniewski & Konietzko (2008), Lancet Neurol. 7(9), 805-811, Spires-Jones et al. (2009), Neurobiology of Disease, 213-220, and Lichlen & Mohajeri (2008), Journal of Neurochem. 104, 859-874.

Most current treatments of AD target the acetylcholine deficiency using acetylcholinesterase inhibitors such as donepezil (Aricept®), galantamine (Reminyl®), and rivastigmine (Exelon®) which are registered for the treatment of mild to moderate AD. Donepezil is also approved for severe Dementia Alzheimer's type (DAT) in the U.S.A. and Canada. The acetylcholine deficit reflects the degeneration of cholinergic neurons of the basal forebrain and appears to correlate well with the neuropsychiatric manifestations of the disease. Treatment with acetylcholinesterase inhibitors has some beneficial effects (consistent and significant but modest efficacy on clinical measures of cognition and global function), but cannot cure or stop the progression of the disease, as the etiology of the neurodegeneration is left untreated.

Memantine (Axura®, Namenda®, Ebixa®; Merz Pharmaceuticals) is an NMDA receptor antagonist that showed better outcome in comparison to placebo in the clinical domains cognition, activities of daily living and overall clinical response in AD patients with moderate to severe Alzheimer's disease. Memantine remains a symptomatic therapy that is approved for moderate to severe Alzheimer's disease only. It neither cures nor stops the progression of the disease. A combination of memantine and acetylcholinesterase inhibitors has been shown to have superior efficacy in moderately severe to severe DAT but not in the mild to moderate disease stage.

Some current experimental therapeutic strategies focus on A-beta as a target. There are three major research lines:

a) The development of small molecules (often peptido-mimetics) named beta-sheet breakers, which are designed to interfere with the beta-sheet structure of amyloid peptide aggregates. It has been demonstrated that a stable "beta-sheet breaker", when administered to a transgenic mouse model of AD, is able to penetrate the blood brain barrier and reduce the number of plaques (Permanne et al. (2002), FASEB J. 16, 860-862). It remains to be demonstrated whether this approach results in cognitive protection and/or restoration.

b) The development of small molecules which inhibit the proteolytic processing of APP into amyloid peptides. Inhibitors of the beta- or gamma-secretase should efficiently block the formation of A-beta and hence protect the brain from neurotoxic effects of amyloid. Effects on already existing brain A-beta burden, such as amyloid plaques which have accumulated over years, are not expected.

c) Passive and active vaccination against A-beta. This research line started with the observation by Schenk et al. (1999), Nature 400, 173-177, that vaccination of transgenic AD mice with A-beta(1-42) prevented the formation of amyloid plaques. In a first experiment, monthly vaccination of young adult mice (age 6 weeks) essentially prevented plaque formation and the concomitant inflammatory reaction in the brain, i.e. absence of amyloid plaques, of astrocytosis and microgliosis. Vaccination starting at a later age, when amyloid plaques were already established, resulted in a partial clearance. Subsequently, it was demonstrated that vaccination with A-beta improved the behavioral and memory deficits as measured in the water maze memory tests. Given the side-effects of vaccination with the entire A-beta, alternative shorter peptides have been designed and used to vaccinate transgenic mice. Clinical trials suggested that the active immunization with A-beta is therapeutically active, as demonstrated by eliciting plaque clearance, attenuating plaque-related pathology, decreasing tau levels and slowing patients' cognitive decline. However, a significant number of

patients developed autoimmune meningoencephalitis, caused primarily by the infiltration of autoreactive T lymphocytes into the brain in response to active immunization (Ferrer et al. (2004), Brain Pathol. 14, 11-20; Nicoll et al. (2003), Nat. Med. 9, 448-452; Masliah et al. (2005), Neurology 64, 1553-1562).

As an alternative to active immunization approaches, antibodies directed against A-beta may be administered to a patient. Such passive immunization approach was shown to be successful in reducing brain A-beta burden in transgenic AD mice (DeMattos et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8850-8855). The underlying mechanisms remain open for speculation since it was thought unlikely that antibodies could cross the blood-brain barrier and target the plaques present in brain. The authors therefore suggested that the antibody created an 'A-beta sink' in the plasma which titrated A-beta out of the brain. Subsequently, using gelsolin and ganglioside 1, it was demonstrated that any A-beta-binding ligand has the potential to reduce amyloid burden in transgenic AD mice without crossing the blood-brain barrier (Matsuoka et al. (2003) J. Neuroscience 23, 29-33). Short-term (24 hours) passive immunization appeared to restore cognitive deficits of transgenic AD mice even without affecting the total brain amyloid load (Dodart et al. (2002) Nature Neuroscience 5, 452-457). The result would suggest that smaller, still soluble aggregates of A-beta are targeted first by some antibodies, and also that these are the most toxic forms of A-beta. Hence, clearance of proto-fibrillar A-beta could restore memory, at least in transgenic APP-mice.

The humanized anti-A-beta monoclonal antibody bapineuzumab (an analogue of the anti-A-beta mouse antibody known as "3D6") has meanwhile entered clinical trials. However, the first data reported from Phase II trial showed mixed results: Statistically significant effects on several efficacy endpoints were observed in ApoE4 non-carriers only. Furthermore, bapineuzumab was well tolerated and safe in ApoE4 non-carriers, while in ApoE4 carriers, serious adverse events were more frequently observed in bapineuzumab-treated patients than in the placebo arm. Moreover, vasogenic edema events have been observed. The induction of

cerebral microhemorrhages has also been described pre-clinically in transgenic APP mice.

Conventional antibodies (containing an Fc part) used in anti-A-beta passive immunizations are suspected to account for the induction of vasogenic edema or microhemorrhages observed in humans and animal models, which are associated with a targeting of cerebral vascular A-beta deposits (Cerebral amyloid angiopathy) leading to microbleedings via ADCC and/or CDC (Wilcock, DM, Colton, CA, CNS Neurol. Disord. Drug Targets (2009) Vol. 8(1):50-64). Finally, the binding affinity of about 2.5 nM of this antibody, as measured by Biacore, is assumed to be too low to induce an effective “peripheral sink effect”.

Another anti-A-beta antibody, solanezumab (humanized antibody m266; LY-2062430), has also entered clinical testings. The maximal plaque load reduction that could be achieved was published to be about 60% . In addition, specificity of this antibody is limited to soluble A-beta, so that binding of aggregates or plaques cannot be expected.

A third anti-A-beta antibody, ponezumab (PF4360365), only binds to A-beta(x-40) molecules, and not to A-beta(x-42) molecules, the latter being assumed to be the (more) pathogenic A-beta species. Its affinity is even lower than the affinity of bapineuzumab, and the risk of cerebral microhemorrhages can not yet be ruled out, due to its ability to bind to A-beta plaques in blood vessels, combined with a remaining ADCC/CDC activity of its Fc portion.

In summary, the above demonstrates that even if A-beta binding and clearance by (classical) antibodies appears to be an attractive mode-of-action for the development of therapeutical agents for the treatment of e.g. AD, other characteristics and effects of such immunoglobulins which have not yet been fully elucidated, such as the pharmacological implications of their property to bind to certain forms of A-beta, make it far more difficult than one might have initially assumed to find and develop safe and efficient therapeutical antibodies.

Antibody fragments, such as immunoglobulin single variable domain antibodies or VHH domains (as defined below), having specificity for A-beta have also been described in the art: WO2004/44204; WO2006/40153; WO2007/35092; WO2008/122441; and WO2009/04494. Binding characteristics of VHHs synthesized by the present inventors in accordance with the above WO publications were unsatisfactory, for which reason they are not supposed to enter clinical development.

WO09/149185 discloses so-called DVD constructs, and, *inter alia*, DVD constructs having A-beta binding specificity. Upon combination of two different anti-A-bata variable domains in such DVD constructs, binding of the parental antibodies was maintained, but no increase in affinity was observed by this combination. Moreover, the disclosed DVD constructs contain an Fc part which is present in “classical” antibodies, so that side effects caused by Fc effector functions, such as complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), cannot be avoided (cf. above).

Definitive diagnosis of AD still requires post-mortem pathological examination of the brain to demonstrate the presence of amyloid plaques, neurofibrillary tangles, synaptic loss and neuronal degeneration. This is essentially the same procedure as defined by Alois Alzheimer in 1906. In 1984 the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) established formal criteria for the diagnosis of AD (reviewed in Petrella et al. (2003), Radiology 226, 315-336). Patients meeting all of the following criteria are diagnosed probable AD: dementia evidenced by examination and testing (e.g. Mini-Mental Test, Blessed Dementia Scale, or similar tests), impairment of memory and at least one other cognitive function, normal consciousness, onset between 40 and 90 years of age, absence of signs of other diseases that cause dementia (exclusion criterion). A gradual progressive, cognitive impairment without an identifiable cause will be diagnosed as possible AD. Probable AD is further defined as mild (early), moderate (middle) or severe (late) dementia. Laboratory analysis is used to objectively define or exclude alternative causes of

dementia. ELISA assays of A-beta(1-42) and phospho-tau in cerebrospinal fluid (CSF), combined with genotyping for ApoE4 (a predisposing genetic factor) appear to be sensitive and specific. The methods are, however, not widely applicable because of the invasive CSF puncture, preventing this to become routine screening. ELISA for the neural thread protein (AD7C-NTP) (developed by Nymox) demonstrated higher levels in urine from AD patients than from non-AD dementia patients or healthy controls. However, the mean levels were significantly lower in early AD cases, suggesting the test is not reliable for testing for early onset of AD.

No biochemical method is as yet suited for the firm diagnosis of early stages of AD, rather they merely help to confirm the clinical diagnosis of advanced cases. Clearly, more advanced techniques are needed to allow early diagnosis before onset of clinical symptoms that signal irreversible brain damage.

Finally, not only for diagnostic purposes but also in e.g. pre-clinical research and development, A-beta binding molecules are useful as research tools. Widely used are the antibodies already mentioned above, i.e. antibody 3D6 and antibody m266. Antibody 3D6 binds to A-beta with a relatively low affinity and may therefore not be suitable for all purposes. Antibody m266 cross-reacts with N-termially truncated versions of A-beta, such as p3, which does not allow to distinguish between disease-relevant A-beta species, such as A-beta(1-40) and A-beta(1-42), and other molecules such as p3.

In view of the above, it is an object of the invention to provide pharmacologically active agents, as well as compositions comprising the same, that can be used in the prevention, treatment, alleviation and/or diagnosis of diseases, disorders or conditions associated with A-beta and/or mediated by A-beta, such as AD, and to provide methods for the prevention, treatment, alleviation and/or diagnosis of such diseases, disorders or conditions, involving the use and/or administration of such agents and compositions. Such agents may also be useful for doing research into the field of AD in general and, specifically, into the elucidation of

AD disease mechanisms and potential therapeutic and/or prophylactic mechanisms.

In particular, it is an object of the invention to provide such pharmacologically active agents, compositions and/or methods that provide certain advantages compared to the agents, compositions and/or methods currently used and/or known in the art. These advantages include improved therapeutic and/or pharmacological properties and/or other advantageous properties (such as, for example, improved ease of preparation and/or reduced costs of goods), especially as compared to conventional antibodies against A-beta or fragments thereof as those described in the above section. Further advantages will become clear from the further description below.

More in particular, it is an object of the invention to provide novel A-beta binding molecules and, specifically, polypeptides binding to mammalian and, especially, human A-beta, wherein such molecules or polypeptides are suitable for the above diagnostic, therapeutic and research purposes.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

According to a first aspect of the invention, there are provided polypeptides which comprise a first immunoglobulin single variable domain which specifically binds to a first epitope of A-beta, and a second immunoglobulin single variable domain which specifically binds to a second epitope of A-beta, wherein said first and said second epitopes of A-beta are not identical epitopes, i.e. are different epitopes, such as e.g. the N-terminal epitope (SEQ ID NO:3) on the one hand and the central epitope (SEQ ID NO:4) on the other hand.

Preferably, said first and said second immunoglobulin single variable domains each essentially consist of four framework regions (FR1 to FR4, respectively) and three complementarity determining regions (CDR1 to CDR3, respectively), wherein said first and said second immunoglobulin single variable domains are covalently linked by a linker peptide, wherein said linker peptide optionally

comprises or consists of a third immunoglobulin domain, such as e.g. a third immunoglobulin single variable domain.

Furthermore, said first and said second immunoglobulin single variable domains are preferably antibody domains, more preferably VHH domains, and even more preferably humanized VHH domains.

The immunoglobulin single variable domains comprised in such polypeptide of the invention will typically have the structure
FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4, and
FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4, respectively.
Preferably, CDR(1)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:16; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:16, respectively; and
CDR(2)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequence according to SEQ ID NO:19; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequence according to SEQ ID NO:19.

Alternatively, CDR(1)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequence according to SEQ ID NO:19; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequence according to SEQ ID NO:19; and
CDR(2)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:16; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:16, respectively.

Especially useful polypeptides of the invention will include the following CDR sequences (numbering as indicated in the paragraph above):

- CDR(1)1: SEQ ID NO:11
- CDR(1)2: SEQ ID NO:12
- CDR(1)3: SEQ ID NO:13
- CDR(2)1: SEQ ID NO:17
- CDR(2)2: SEQ ID NO:18
- CDR(2)3: SEQ ID NO:19

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:14
- CDR(1)2: SEQ ID NO:15
- CDR(1)3: SEQ ID NO:16
- CDR(2)1: SEQ ID NO:17
- CDR(2)2: SEQ ID NO:18
- CDR(2)3: SEQ ID NO:19

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:17
- CDR(1)2: SEQ ID NO:18
- CDR(1)3: SEQ ID NO:19
- CDR(2)1: SEQ ID NO:11
- CDR(2)2: SEQ ID NO:12
- CDR(2)3: SEQ ID NO:13

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:17
- CDR(1)2: SEQ ID NO:18
- CDR(1)3: SEQ ID NO:19
- CDR(2)1: SEQ ID NO:14
- CDR(2)2: SEQ ID NO:15
- CDR(2)3: SEQ ID NO:16.

According to a specific embodiment of the invention, the polypeptides of the invention comprise, as a first immunoglobulin single variable domain, the VHH

domain ABII035 (SEQ ID NO:44), and as the second immunoglobulin single variable domain the VHH domain ABII059 (SEQ ID NO:45), or vice versa.

In an especially preferred embodiment, such polypeptide of the invention additionally comprises a half-life extending moiety, preferably covalently linked to said polypeptide, such as an albumin binding moiety (e.g. an anti-albumin immunoglobulin domain), a transferrin binding moiety (e.g. an anti-transferrin immunoglobulin domain), a polyethylene glycol molecule, a recombinant polyethylene glycol molecule, human serum albumin, a fragment of human serum albumin, and an albumin binding peptide.

Very specific embodiments of the invention are the polypeptides having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NOs:26 to 31 (Fc fusion polypeptides); SEQ ID NO:32 (HSA fusion polypeptide); SEQ ID NOs:34 to 39 and 145 to 152 (albumin binding immunoglobulin single variable domain fusion polypeptides); and SEQ ID NOs:40 to 43, 142 and 143 (PEGylated polypeptides).

The polypeptides of the invention preferably bind, with one of its immunoglobulin single variable domains, to the A-beta epitope defined by SEQ ID NO:3 (N-terminal epitope), and with another immunoglobulin single variable domain to the A-beta epitope defined by SEQ ID NO:4 (central epitope). Even more preferably, such polypeptides of the invention form contacts to at least amino acids 1 (aspartate), 3 (glutamate), 19 (phenylalanine), 20 (phenylalanine), and 23 (aspartate) of the human A-beta peptide (SEQ ID NO:1). The IC50 values as measured in a TR-FRET binding assay (using ABII002 = SEQ ID NO:62 and ABII050 = SEQ ID NO:100 as competitors; cf. Example 9.3) are preferably in the range of 10^{-9} moles/litre or less, and more preferably in the range of from 5×10^{-10} moles/litre to 10^{-12} moles/litre.

According to another aspect, the invention relates to polypeptides comprising or consisting of an immunoglobulin single variable domain essentially consisting of four framework regions (FR1 to FR4 respectively) and three complementarity

determining regions (CDR1 to CDR3 respectively), wherein said CDR sequences are defined as follows:

- CDR1: SEQ ID NO:11
- CDR2: SEQ ID NO:12
- CDR3: SEQ ID NO:13

or

- CDR1: SEQ ID NO:14
- CDR2: SEQ ID NO:15
- CDR3: SEQ ID NO:16

or

- CDR1: SEQ ID NO:17
- CDR2: SEQ ID NO:18
- CDR3: SEQ ID NO:19,

and to polypeptides comprising or consisting of a VHH domain having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 47 to 111. These polypeptides are useful building blocks or intermediates for the construction of biparatopic A-beta binding polypeptides in accordance with the first aspect of the invention.

According to further aspects, the invention relates to nucleic acid molecules, expression vectors, host cells, and methods of manufacturing used in the production of a polypeptide of the invention. Nucleic acid molecules encoding the polypeptides of the invention can be used, in an isolated form, for contructing respective expression vectors, which then may be transfected into host cells used for biopharmaceutical production of the polypeptides of the invention. Such method of manufacturing typically comprises the steps of culturing the host cell under conditions that allow expression of the polypeptide, recovering the polypeptide and purifying it according to methods known in the art.

The polypeptides of the present invention are specifically useful in methods of diagnosis, prevention, treatment and/or alleviation of the diseases, disorders and conditions as set out in detail below, and, especially, for the treatment of Alzheimer's disease (AD). Thus, according to this aspect, the polypeptides of the

invention will be used in the form of a pharmaceutical composition, i.e. as a medicament for the treatment, alleviation or prevention of a disease, disorder or condition, preferably in a human being, such disease, disorder or condition being selected from the group consisting of neurodegenerative diseases or disorders, Alzheimer's disease, dementia of the Alzheimer type, cerebral amyloid angiopathy (CAA), trisomy 21 (Down's Syndrome), adult Down syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch-type (HCHWA-D), dementia with Lewy Bodies, frontotemporal lobar degeneration, glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis, sporadic inclusion body myositis, and anxiety disorder in an elderly human subject, or will be used for the diagnosis of such disease, disorder or condition.

In addition to the above, the polypeptides of the present invention are specifically useful for the treatment of dry AMD (age-related macular degeneration) and glaucoma. The "dry" form of AMD, also known as "central geographic atrophy", results from atrophy to the retinal pigment epithelial layer below the neurosensory retina, which causes vision loss through loss of photoreceptors (rods and cones) in the central part of the eye. No medical or surgical treatment is currently available for this condition. Treatments available so far (e.g. suggested by the National Eye Institute) include the use of vitamin supplements with high doses of antioxidants, lutein and zeaxanthin, which may slow the progression of dry macular degeneration. Glaucoma is a disease where fluid pressure inside the eye increases, causing irreversible damage to the optic nerve and loss of vision. A-beta colocalizes with apoptotic retinal ganglion cells in experimental glaucoma and induces significant retinal ganglion cell apoptosis in a dose- and time-dependent manner.

For therapeutic purposes, the polypeptides of the invention or pharmaceutical compositions comprising such polypeptides may be administered to a human being in need thereof by e.g. parenteral (esp. intravenous or subcutaneous) or intravitreal (esp. for the treatment of dry AMD or glaucoma) injection.

Further aspects, embodiments and applications of the invention will become clear

from the further description and the appended claims hereinbelow.

Unexpectedly, although intensive research into A-beta binding monoclonal antibodies has already been carried out and although highly specific antibodies with high affinity to A-beta are already available, the inventors succeeded to provide a group of A-beta binding molecules which have improved characteristics, e.g. are having still even better IC50 values than e.g. antibodies 3D6 and m266 (cf. e.g. Table XVI), the humanized counterparts of which are currently tested for therapeutical use in humans.

In addition, although it could be demonstrated that anti-A-beta antibodies known in the art are indeed able to reduce amyloid plaque load in transgenic mice overproducing A-beta (maximal plaque load reduction achieved by administration of monoclonal antibody m266 or its humanized counterpart having been published to be about 60%), e.g. antibody m266 lacks amyloid plaque binding. Thus, such conventional antibody may be expected to have less potential in situations where a direct binding of the anti-A-beta molecule to A-beta present in amyloid aggregates brings about additional benefit. In contrast thereto, the inventors were able to generate A-beta binding molecules which bind to amyloid plaques and are therefore expected to reduce or remove vascular amyloid by promoting physical dissociation, without increasing the risk or inducing microhemorrhages. As vascular amyloid is associated with the severity of AD, this advantage of the polypeptides of the invention may prove to be particularly useful in the treatment of later-stage or severe AD, i.e. they can be expected to be particularly useful for the treatment of patients which have a high brain amyloid plaque load, accumulated over many years.

Thus, in summary, the higher affinity of the A-beta binding polypeptides of the invention and their unique plaque binding capabilities provide an unexpected superiority as compared to conventional anti-A-beta antibodies described in the art.

Another antibody currently in clinical trials, Ponezumab, has a specificity for A-beta(x-40) and does not bind to A-beta(x-42), the major pathogenic species in AD, and is therefore expected to shift the A-beta(x-40):A-beta(x-42) balance towards the toxic A-beta(x-42) species. In contrast thereto, the present inventors succeeded to provide A-beta binding molecules which, by binding to at least two different epitopes, are able to capture the A-beta(x-40) and the A-beta(x-42) in order to neutralize toxic effects of both species.

When compared to conventional antibodies in general, the polypeptides of the invention can be manufactured much easier, quicker and cheaper, have a higher stability and low antigenicity, and may be suitable for more convenient administration routes than injection or infusion, due to their small size and structure. More specifically, production of the polypeptides of the invention through fermentation in convenient recombinant host organisms such as *E. coli* and yeast is cost-effective, as compared to the manufacture of conventional antibodies which require expensive mammalian cell culture facilities. Furthermore, achievable levels of expression are high and yields of the polypeptides of the invention are in the range of 1 to 10 g/l (E. coli) and up to 10 g/l (yeast) and more. The polypeptides of the invention are more soluble, meaning they may be stored and/or administered in higher concentrations compared to conventional antibodies. They are stable at room temperature, meaning they may be prepared, stored and/or transported without the use of refrigeration equipment, conveying cost, time and environmental savings. The polypeptides of the present invention also exhibit a prolonged stability at extremes of pH, meaning they would be suitable for delivery by oral administration.

Furthermore, the polypeptides of the invention do not need to comprise an Fc part which is present in “classical” antibodies, so that side effects caused by Fc effector functions, such as complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), can be avoided. When used in anti-A-beta passive immunizations, conventional antibodies (having an Fc part) are suspected to account for the induction of microhemorrhages observed in

humans and animal models, which are associated with a targeting of cerebral vascular A-beta deposits (Cerebral amyloid angiopathy) leading to microbleedings via ADCC and/or CDC (Wilcock, DM, Colton, CA, CNS Neurol. Disord. Drug Targets (2009) Vol. 8(1):50-64).

Thus, in summary, the polypeptides of the invention combine the advantageous characteristics of conventional antibodies, such as high specificity and high selectivity, with the advantages as outlined above, and have surprisingly improved characteristics with regard to affinity and specificity as compared to conventional A-beta binding antibodies.

When compared to A-beta binding VHH domains already known in the art, such as the VHHs described in WO2006/040153, WO2007/35092 and WO2004/44204, the polypeptides of the invention show significantly improved binding characteristics, with respect to the binding to monomeric A-beta as well as with respect to binding to aggregated A-beta (cf. e.g. Examples 3.2 and 6 below). Moreover, the polypeptides according to the invention do bind to both monomeric A-beta as well as amyloid plaques, in contrast to VHH domains as described e.g. in WO2008/122441 or in Habicht et al. (2007), Proc. Natl. Acad. Sci. USA;104(49):19232-19237, which only bind to aggregated amyloid plaques.

Even more, the VHH domains of A-beta binding polypeptides of the invention bind equally potent to human and rodent A-beta, as shown e.g. in Example 7 and Fig. 2. Binding of the biparatopic polypeptide of the invention even increases the affinity to human as well as rodent A-beta by a factor of at least 103, as compared to the single VHH domains. Thus, the polypeptides of the invention are ideal detection tools across species for the disease-relevant A-beta forms, such as A-beta(1-40) and A-beta(1-42), allowing the use of esp. rodent animal models for preclinical and scientific research. They provide superiority over antibody 3D6 which binds to A-beta with a significantly lower affinity and which is only weakly cross-reactive to rodent A-beta. There is also superiority as compared to antibody m266 which recognizes rodent and human A-beta equally well, but cross-reacts with N-termially truncated versions of A-beta, such as p3 so

that this antibody is not useful for certain tests or assays relying on the specific detection of disease-relevant A-beta species, such as A-beta(1-40) and A-beta(1-42).

Finally, biparatopic anti-A-beta VHH constructs according to the invention gain affinity by a factor of >1000 fold when two VHH detecting two different A-beta epitopes were combined, which is in clear contrast to those constructs disclosed in WO09/149185.

Of course, the polypeptides of the invention are also useful for diagnostic purposes, based on their affinity (sensitivity), specificity (with regard to epitopes as well as to species), and other characteristics thereof as outlined above, as compared to other A-beta binding molecules known in the art.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 shows the decrease of free/unbound A-beta(1-40) in plasma after i.p. administration of ABII320, ABII322, 3D6-IgG and m266-IgG, as detected 2 hrs after injection, in APP transgenic mice (n=3). Depicted in the first column (unfilled box): vehicle (PBS); second column: ABII320 (132 nmol/kg); third column: ABII322 (132 nmol/kg); fourth column: IgG 3D6 (132 nmol/kg); fifth column: IgG m266 (66.6 nmol/kg); concentrations for IgGs are calculated per binding site (2 binding sites per IgG molecule).

Fig. 2 shows the binding of a biparatopic anti-A-beta VHH construct, including VHH domains ABII035 and ABII059, to human and rodent (mouse) A-beta

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

The above and other aspects and embodiments of the invention will become clear from the further description herein, in which:

a) Unless indicated or defined otherwise, all terms used have their usual meaning in the art, which will be clear to the skilled person. Reference is for example made to the standard handbooks, such as Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), and Roitt et al., "Immunology" (2nd Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), as well as to the general background art cited herein; Furhermore, unless indicated otherwise, all methods, steps, techniques and manipulations that are not specifically described in detail can be performed and have been performed in a manner known *per se*, as will be clear to the skilled person. Reference is for example again made to the standard handbooks, to the general background art referred to above and to the further references cited therein;

b) Unless indicated otherwise, the terms "*immunoglobulin*" and "*immunoglobulin sequence*" - whether used herein to refer to a *heavy chain antibody* or to a *conventional 4-chain antibody* - are used as general terms to include both the full-size antibody, the individual chains thereof, as well as all parts, domains or fragments thereof (including but not limited to antigen-binding domains or fragments such as VHH domains or VH/VL domains, respectively). In addition, the term "sequence" as used herein (for example in terms like "immunoglobulin sequence", "antibody sequence", "(single) variable domain sequence", "VHH sequence" or "protein sequence"), should generally be understood to include both the relevant amino acid sequence as well as nucleic acid sequences or nucleotide sequences encoding the same, unless the context requires a more limited interpretation;

c) The term "*domain*" (of a polypeptide or protein) as used herein refers to a folded protein structure which has the ability to retain its tertiary structure independently of the rest of the protein. Generally, domains are responsible for discrete functional properties of proteins, and in many cases may be added,

removed or transferred to other proteins without loss of function of the remainder of the protein and/or of the domain.

d) The term "*immunoglobulin domain*" as used herein refers to a globular region of an antibody chain (such as e.g. a chain of a conventional 4-chain antibody or of a heavy chain antibody), or to a polypeptide that essentially consists of such a globular region. Immunoglobulin domains are characterized in that they retain the immunoglobulin fold characteristic of antibody molecules, which consists of a 2-layer sandwich of about 7 antiparallel beta-strands arranged in two beta-sheets, optionally stabilized by a conserved disulphide bond.

e) The term "*immunoglobulin variable domain*" as used herein means an immunoglobulin domain essentially consisting of four "framework regions" which are referred to in the art and hereinbelow as "framework region 1" or "FR1"; as "framework region 2" or"FR2"; as "framework region 3" or "FR3"; and as "framework region 4" or "FR4", respectively; which framework regions are interrupted by three "complementarity determining regions" or "CDRs", which are referred to in the art and hereinbelow as "complementarity determining region 1"or "CDR1"; as "complementarity determining region 2" or "CDR2"; and as "complementarity determining region 3" or "CDR3", respectively. Thus, the general structure or sequence of an immunoglobulin variable domain can be indicated as follows: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. It is the immunoglobulin variable domain(s) that confer specificity to an antibody for the antigen by carrying the antigen-binding site.

f) The term "*immunoglobulin single variable domain*" as used herein means an immunoglobulin variable domain which is capable of specifically binding to an epitope of the antigen without pairing with an additional variable immunoglobulin domain. One example of immunoglobulin single variable domains in the meaning of the present invention are "*domain antibodies*", such as the immunoglobulin single variable domains VH and VL (VH domains and VL domains). Another example of immunoglobulin single variable domains are "*VHH domains*" (or simply "VHHs") from camelids, as defined hereinafter.

In view of the above definition, the antigen-binding domain of a conventional 4-chain antibody (such as an IgG, IgM, IgA, IgD or IgE molecule; known in the art) or of a Fab fragment, a F(ab')2 fragment, an Fv fragment such as a disulphide linked Fv or a scFv fragment, or a diabody (all known in the art) derived from such conventional 4-chain antibody, would normally not be regarded as an immunoglobulin single variable domain, as, in these cases, binding to the respective epitope of an antigen would normally not occur by one (single) immunoglobulin domain but by a pair of (associating) immunoglobulin domains such as light and heavy chain variable domains, i.e. by a VH-VL pair of immunoglobulin domains, which jointly bind to an epitope of the respective antigen.

f1) "*VHH domains*" , also known as VHHs, V_HH domains, VHH antibody fragments, and VHH antibodies, have originally been described as the antigen binding immunoglobulin (variable) domain of "heavy chain antibodies" (i.e. of "antibodies devoid of light chains"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993)). The term "VHH domain" has been chosen in order to distinguish these variable domains from the heavy chain variable domains that are present in conventional 4-chain antibodies (which are referred to herein as "V_H domains" or "VH domains") and from the light chain variable domains that are present in conventional 4-chain antibodies (which are referred to herein as "V_L domains" or "VL domains"). VHH domains can specifically bind to an epitope without an additional antigen binding domain (as opposed to VH or VL domains in a conventional 4-chain antibody, in which case the epitope is recognized by a VL domain together with a VH domain). VHH domains are small, robust and efficient antigen recognition units formed by a single immunoglobulin domain.

In the context of the present invention, the terms VHH domain, VHH, V_HH domain, VHH antibody fragment, VHH antibody, as well as "Nanobody®" and "Nanobody® domain" ("Nanobody" being a trademark of the company Ablynx

N.V.; Ghent; Belgium) are used interchangeably and are representatives of immunoglobulin single variable domains (having the structure: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 and specifically binding to an epitope without requiring the presence of a second immunoglobulin variable domain), and which are distinguished from VH domains by the so-called "hallmark residues", as defined in e.g. WO2009/109635, Fig. 1.

The amino acid residues of a VHH domain are numbered according to the general numbering for V_H domains given by Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91), as applied to VHH domains from Camelids, as shown e.g. in Figure 2 of Riechmann and Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). According to this numbering,

- FR1 comprises the amino acid residues at positions 1-30,
- CDR1 comprises the amino acid residues at positions 31-35,
- FR2 comprises the amino acids at positions 36-49,
- CDR2 comprises the amino acid residues at positions 50-65,
- FR3 comprises the amino acid residues at positions 66-94,
- CDR3 comprises the amino acid residues at positions 95-102, and
- FR4 comprises the amino acid residues at positions 103-113.

However, it should be noted that - as is well known in the art for V_H domains and for VHH domains - the total number of amino acid residues in each of the CDRs may vary and may not correspond to the total number of amino acid residues indicated by the Kabat numbering (that is, one or more positions according to the Kabat numbering may not be occupied in the actual sequence, or the actual sequence may contain more amino acid residues than the number allowed for by the Kabat numbering). This means that, generally, the numbering according to Kabat may or may not correspond to the actual numbering of the amino acid residues in the actual sequence.

Alternative methods for numbering the amino acid residues of V_H domains, which methods can also be applied in an analogous manner to VHH domains, are known in the art. However, in the present description, claims and figures, the

numbering according to Kabat and applied to VHH domains as described above will be followed, unless indicated otherwise.

The total number of amino acid residues in a VHH domain will usually be in the range of from 110 to 120, often between 112 and 115. It should however be noted that smaller and longer sequences may also be suitable for the purposes described herein.

Further structural characteristics and functional properties of VHH domains and polypeptides containing the same can be summarized as follows:

VHH domains (which have been "designed" by nature to functionally bind to an antigen without the presence of, and without any interaction with, a light chain variable domain) can function as a single, relatively small, functional antigen-binding structural unit, domain or polypeptide. This distinguishes the VHH domains from the VH and VL domains of conventional 4-chain antibodies, which by themselves are generally not suited for practical application as single antigen-binding proteins or immunoglobulin single variable domains, but need to be combined in some form or another to provide a functional antigen-binding unit (as in for example conventional antibody fragments such as Fab fragments; in scFv's, which consist of a VH domain covalently linked to a VL domain).

Because of these unique properties, the use of VHH domains - either alone or as part of a larger polypeptide - offers a number of significant advantages over the use of conventional VH and VL domains, scFv's or conventional antibody fragments (such as Fab- or F(ab')2-fragments):

- only a single domain is required to bind an antigen with high affinity and with high selectivity, so that there is no need to have two separate domains present, nor to assure that these two domains are present in the right spacial conformation and configuration (i.e. through the use of especially designed linkers, as with scFv's);
- VHH domains can be expressed from a single gene and require no post-translational folding or modifications;

- VHH domains can easily be engineered into multivalent and multispecific formats (as further discussed herein);
- VHH domains are highly soluble and do not have a tendency to aggregate (as with the mouse-derived antigen-binding domains described by Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989));
- VHH domains are highly stable to heat, pH, proteases and other denaturing agents or conditions and, thus, may be prepared, stored or transported without the use of refrigeration equipments, conveying a cost, time and environmental savings;
- VHH domains are easy and relatively cheap to prepare, even on a scale required for production. For example, VHH domains and polypeptides containing the same can be produced using microbial fermentation (e.g. as further described below) and do not require the use of mammalian expression systems, as with for example conventional antibody fragments;
- VHH domains are relatively small (approximately 15 kDa, or 10 times smaller than a conventional IgG) compared to conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof, and therefore
-- show high(er) penetration into tissues and
-- can be administered in higher doses
than such conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof;
- VHH domains can show so-called cavity-binding properties (inter alia due to their extended CDR3 loop, compared to conventional VH domains) and can therefore also access targets and epitopes not accessible to conventional 4-chain antibodies and antigen-binding fragments thereof.

Methods of obtaining VHH domains binding to a specific antigen or epitope have been described earlier, e.g. in WO2006/040153 and WO2006/122786. As also described therein in detail, VHH domains derived from camelids can be "humanized" by replacing one or more amino acid residues in the amino acid sequence of the original VHH sequence by one or more of the amino acid residues that occur at the corresponding position(s) in a VH domain from a conventional 4-chain antibody from a human being. A humanized VHH domain can contain one or more fully human framework region sequences, and, in an

even more specific embodiment, can contain human framework region sequences derived from DP-29, DP-47, DP-51, or parts thereof, optionally combined with JH sequences, such as JH5.

f2) "*Domain antibodies*", also known as "Dab"s, "Domain Antibodies", and "dAbs" (the terms "Domain Antibodies" and "dAbs" being used as trademarks by the GlaxoSmithKline group of companies) have been described in e.g. Ward, E.S., *et al.*: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli"; Nature 341: 544-546 (1989); Holt, L.J. *et al.*: "Domain antibodies: proteins for therapy"; TRENDS in Biotechnology 21(11): 484-490 (2003); and WO2003/002609.
Domain antibodies essentially correspond to the VH or VL domains of non-camelid mammalians, in particular human 4-chain antibodies. In order to bind an epitope as a single antigen binding domain, i.e. without being paired with a VL or VH domain, respectively, specific selection for such antigen binding properties is required, e.g. by using libraries of human single VH or VL domain sequences. Domain antibodies have, like VHHs, a molecular weight of approximately 13 to approximately 16 kDa and, if derived from fully human sequences, do not require humanization for e.g. therapeutical use in humans. As in the case of VHH domains, they are well expressed also in prokaryotic expression systems, providing a significant reduction in overall manufacturing cost.

Domain antibodies, as well as VHH domains, can be subjected to affinity maturation by introducing one or more alterations in the amino acid sequence of one or more CDRs, which alterations result in an improved affinity of the resulting immunoglobulin single variable domain for its respective antigen, as compared to the respective parent molecule. Affinity-matured immunoglobulin single variable domain molecules of the invention may be prepared by methods known in the art, for example, as described by Marks *et al.*, 1992, Biotechnology 10:779-783, or Barbas, *et al.*, 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813.; Shier *et al.*, 1995, Gene 169:147-155; Yelton *et al.*, 1995, Immunol. 155: 1994-2004; Jackson *et al.*, 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; and Hawkins *et al.*, 1992, J. Mol. Biol.

226(3): 889 896; KS Johnson and RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

f3) Furthermore, it will also be clear to the skilled person that it is possible to "graft" one or more of the CDR's mentioned above onto other "scaffolds", including but not limited to human scaffolds or non-immunoglobulin scaffolds. Suitable scaffolds and techniques for such CDR grafting are known in the art.

g) The terms "*epitope*" and "*antigenic determinant*", which can be used interchangeably, refer to the part of a macromolecule, such as a polypeptide, that is recognized by antigen-binding molecules, such as conventional antibodies or the polypeptides of the invention, and more particularly by the antigen-binding site of said molecules. Epitopes define the minimum binding site for an immunoglobulin, and thus represent the target of specificity of an immunoglobulin.

The part of an antigen-binding molecule (such as a conventional antibody or a polypeptide of the invention) that recognizes the epitope is called a *paratope*.

h) The term "*biparatopic*" (antigen-)binding molecule or "biparatopic" polypeptide as used herein shall mean a polypeptide comprising a first immunoglobulin single variable domain and a second immunoglobulin single variable domain as herein defined, wherein these two variable domains are capable of binding to two different epitopes of one antigen, which epitopes are not normally bound at the same time by one monospecific immunoglobulin, such as e.g. a conventional antibody or one immunoglobulin single variable domain. The biparatopic polypeptides according to the invention are composed of variable domains which have different epitope specificities, and do not contain mutually complementary variable domain pairs which bind to the same epitope. They do therefore not compete with each other for binding to A-beta.

i) A polypeptide (such as an immunoglobulin, an antibody, an immunoglobulin single variable domain, a polypeptide of the invention, or generally an antigen

binding molecule or a fragment thereof) that can "*bind to*" or "*specifically bind to*", that "*has affinity for*" and/or that "*has specificity for*" a certain epitope, antigen or protein (or for at least one part, fragment or epitope thereof) is said to be "*against*" or "*directed against*" said epitope, antigen or protein or is a "*binding*" molecule with respect to such epitope, antigen or protein.

k) Generally, the term "*specificity*" refers to the number of different types of antigens or epitopes to which a particular antigen-binding molecule or antigen-binding protein (such as an immunoglobulin, an antibody, an immunoglobulin single variable domain, or a polypeptide of the invention) can bind. The specificity of an antigen-binding protein can be determined based on its affinity and/or avidity. The affinity, represented by the equilibrium constant for the dissociation of an antigen with an antigen-binding protein (KD), is a measure for the binding strength between an epitope and an antigen-binding site on the antigen-binding protein: the lesser the value of the KD, the stronger the binding strength between an epitope and the antigen-binding molecule (alternatively, the affinity can also be expressed as the affinity constant (KA), which is 1/KD). As will be clear to the skilled person (for example on the basis of the further disclosure herein), affinity can be determined in a manner known *per se*, depending on the specific antigen of interest. Avidity is the measure of the strength of binding between an antigen-binding molecule (such as an immunoglobulin, an antibody, an immunoglobulin single variable domain, or a polypeptide of the invention) and the pertinent antigen. Avidity is related to both the affinity between an epitope and its antigen binding site on the antigen-binding molecule and the number of pertinent binding sites present on the antigen-binding molecule.

Typically, antigen-binding proteins (such as the polypeptides of the invention) will bind with a dissociation constant (K_D) of 10E-5 to 10E-14 moles/liter (M) or less, and preferably 10E-7 to 10E-14 moles/liter (M) or less, more preferably 10E-8 to 10E-14 moles/liter, and even more preferably 10E-11 to 10E-13 (as measured e.g. in a Kinexa assay as described in Example 9.7), and/or with an association constant (K_A) of at least 10E7 ME-1 , preferably at least 10E8 ME-1, more preferably at least 10E9 ME-1, such as at least 10E11 ME-1. Any K_D value

greater than 10E-4 M is generally considered to indicate non-specific binding. Preferably, a polypeptide of the invention will bind to the desired antigen with a K_D less than 500 nM, preferably less than 200 nM, more preferably less than 10 nM, such as less than 500 pM. Specific binding of an antigen-binding protein to an antigen or epitope can be determined in any suitable manner known per se, including, for example, the assays described herein, Scatchard analysis and/or competitive binding assays, such as radioimmunoassays (RIA), enzyme immunoassays (EIA) and sandwich competition assays, and the different variants thereof known per se in the art.

l) Amino acid residues will be indicated according to the standard three-letter or one-letter amino acid code, as generally known and agreed upon in the art. When comparing two amino acid sequences, the term "*amino acid difference*" refers to insertions, deletions or substitutions of the indicated number of amino acid residues at a position of the reference sequence, compared to a second sequence. In case of substitution(s), such substitution(s) will preferably be conservative amino acid substitution(s), which means that an amino acid residue is replaced with another amino acid residue of similar chemical structure and which has little or essentially no influence on the function, activity or other biological properties of the polypeptide. Such conservative amino acid substitutions are well known in the art, for example from WO 98/49185, wherein conservative amino acid substitutions preferably are substitutions in which one amino acid within the following groups (i) - (v) is substituted by another amino acid residue within the same group: (i) small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues: Ala, Ser, Thr, Pro and Gly; (ii) polar, negatively charged residues and their (uncharged) amides: Asp, Asn, Glu and Gln; (iii) polar, positively charged residues: His, Arg and Lys; (iv) large aliphatic, nonpolar residues: Met, Leu, Ile, Val and Cys; and (v) aromatic residues: Phe, Tyr and Trp. Particularly preferred conservative amino acid substitutions are as follows:

Ala into Gly or into Ser;

Arg into Lys;

Asn into Gln or into His;

Asp into Glu;

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

m) A nucleic acid or polypeptide molecule is considered to be "*(in) essentially isolated (form)*" - for example, when compared to its native biological source and/or the reaction medium or cultivation medium from which it has been obtained - when it has been separated from at least one other component with which it is usually associated in said source or medium, such as another nucleic acid, another protein/polypeptide, another biological component or macromolecule or at least one contaminant, impurity or minor component. In particular, a nucleic acid or polypeptide molecule is considered "essentially isolated" when it has been purified at least 2-fold, in particular at least 10- fold, more in particular at least 100-fold, and up to 1000-fold or more. A nucleic acid or polypeptide molecule that is "in essentially isolated form" is preferably essentially homogeneous, as determined using a suitable technique, such as a suitable chromatographical technique, such as polyacrylamide-gelelectrophoresis;

n) "*Sequence identity*" between e.g. two immunoglobulin single variable domain sequences indicates the percentage of amino acids that are identical between these two sequences. It may be calculated or determined as described in

paragraph f) on pages 49 and 50 of WO08/020079. "*Sequence similarity*" indicates the percentage of amino acids that either are identical or that represent conservative amino acid substitutions.

Target specificity

The polypeptides of the invention have specificity for A-beta in that they comprise immunoglobulin single variable domains specifically binding to one or more A-beta molecules and, more precisely, to epitopes within the A-beta molecule(s). A-beta may adopt and may occur e.g. in the human body in different forms, such as in monomeric form, in oligo- and multimeric forms, in aggregated soluble and insoluble forms, in fibrillar form, in proto-fibrillar form, in the form of amyloid plaques and deposits that are present in the central nervous system, skeletal muscle, platelets, vascular system, pancreas, kidney, spleen, heart, liver, testis, aorta, lung, intestine, skin, adrenal, salivary, and thyroid glands (Roher et al. Alzheimer's & Dementia 5 (2009) p.18-29). It is within the scope of the invention that the polypeptides of the invention bind to any of the forms in which A-beta may occur, and especially to the forms that are most relevant from a biological and/or therapeutic point of view.

The polypeptides of the invention may bind to A-beta peptide molecules of different length, such as A-beta(1-42) which consists of the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:1, A-beta(1-40) which consists of the amino acids 1 to 40 of the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:1, A-beta(1-39) (amino acids 1 to 39), A-beta(1-38) (amino acids 1 to 38), A-beta(1-37) (amino acids 1 to 37), and the like. Binding of the polypeptide of the invention may occur at the N-terminal end, the C-terminal end, or somewhere in between.

Also, the invention is not limited with regard to the species form of A-beta. Thus, the polypeptides of the invention may preferably bind to human A-beta (SEQ ID NO:1), if intended for therapeutic purposes. However, polypeptides binding to e.g. other warm-blooded animal or, preferably, mammalian forms of A-beta are within the scope of the invention as well. A poplypeptide of the invention binding to one

species form of A-beta may cross-react with A-beta from one or more other species. For example, polypeptides of the invention binding to human A-beta may or may not show cross-reactivity with A-beta from one or more other species of primates and/or with A-beta from one or more species of animals that are often used in animal models for diseases (for example mouse - cf. SEQ ID NO:2, rat, rabbit, pig or dog), and in particular in animal models for diseases and disorders associated with A-beta (such as the species and animal models mentioned herein). Polypeptides of the invention that show such cross-reactivity may have advantages from a research and/or drug development point of view, since it allows the polypeptides of the invention binding to human A-beta to be tested in important disease models such as mice or rats.

Also, the invention is not limited to or defined by a specific antigenic determinant, epitope, part, domain, subunit or confirmation (where applicable) of A-beta against which the polypeptides of the invention are directed. Some of the preferred epitopes of A-beta against which the polypeptides of the present invention may be directed are the epitopes used for immunotherapy, and in particular for passive immunotherapy of AD. For example, as mentioned in Weksler M., Immunity and Ageing 1, 2 (2004) and in the background art referred to therein, it is known that there are three major epitopes on A-beta, i.e. an N-terminal epitope (amino acids 1-16 of A-beta: DAEFRHDSGYEVHHQK; SEQ ID NO:3), a central epitope (amino acids 16-28: KLVFFAEDVGSNK; SEQ ID NO:4) and a C-terminal epitope (amino acids 28-42; KGAIIGLMVGGVVIA; SEQ ID NO:5). The polypeptides of the invention may be directed against either of these epitopes. Specifically preferred are polypeptides of the invention comprising at least two immunoglobulin single variable domains, wherein one immunoglobulin single variable domain binds to the N-terminal epitope and a second immunoglobulin single variable domain binds to the central epitope.

Polypeptides of the invention

In its broadest sense, the invention provides novel pharmaceutically active agents for the prevention, treatment, alleviation and/or diagnosis of A-beta associated

diseases, disorders or conditions and, specifically, AD. The agents according to the invention belong to a novel class of A-beta binding molecules, namely biparatopic polypeptides comprising two or more immunoglobulin single variable domains binding to the antigen A-beta at different epitopes. More specifically, such polypeptide of the invention essentially consists of or comprises (i) a first immunoglobulin single variable domain specifically binding to a first epitope of A-beta and (ii) a second immunoglobulin single variable domain specifically binding to a second epitope of A-beta, wherein the first epitope of A-beta and the second epitope of A-beta are not identical epitopes. In other words, such polypeptide of the invention comprises or essentially consist of two or more immunoglobulin single variable domains that are directed against at least two different epitopes present in A-beta, wherein said immunoglobulin single variable domains are linked to each other in such a way that they are capable of simultaneously binding A-beta. In this sense, the polypeptide of the invention can also be regarded as a "multivalent" immunoglobulin construct, and especially as a "multivalent immunoglobulin single variable domain construct", in that the whole polypeptide includes at least two binding sites for A-beta.

A polypeptide of the invention includes (at least) two anti-A-beta immunoglobulin single variable domains, wherein (the) two immunoglobulin single variable domains are directed against different epitopes within the A-beta molecule. Thus, these two immunoglobulin single variable domains will have a different epitope specificity and therefore different CDR sequences. For this reason, polypeptides of the invention will herein also be named "biparatopic polypeptides", or "biparatopic domain antibody constructs" (if the immunoglobulin single variable domains consist or essentially consist of domain antibodies), or "biparatopic Nanobody constructs" or "biparatopic VHH domain constructs", or "biparatopic VHH constructs" (if the immunoglobulin single variable domains consist or essentially consist of Nanobodies or VHH domains), respectively, as the two immunoglobulin single variable domains will include two different paratopes.

According to a specific embodiment of the invention, in case that the polypeptide of the invention includes more than two anti-A-beta immunoglobulin single

variable domains, i.e three, four or even more anti-A-beta immunoglobulin single variable domains, at least two of the anti-A-beta immunoglobulin single variable domains are directed against different epitopes within the A-beta molecule, wherein any further immunoglobulin single variable domain may bind to any of these two different epitopes and/or a further epitope present in the A-beta molecule.

According to another specific embodiment of the invention, the polypeptide of the invention can, in addition to the two anti-A-beta immunoglobulin single variable domains described above, include any other additional moiety, such as a linker (as described in more detail below) and/or additional protein domains, such as e.g. a further immunoglobulin single variable domain (as descibed in more detail below), as long as its binding to A-beta will not be prevented by such additional moiety. The polypeptide of the invention can additionally contain modifications such as glycosyl residues, modified amino acid side chains, and the like.

As set out before, two immunoglobulin single variable domains within one polypeptide of the invention will bind to different epitopes of A-beta. This can be achieved in one of the following manners: Either, the two immunoglobulin single variable domains will bind the two epitopes within one and the same A-beta molecule (intramolecular binding). Alternatively, they may bind epitopes located within two distinct A-beta molecules, i.e. one immunoglobulin single variable domain will bind to one epitope on one A-beta molecule, whereas the other immunoglobulin single variable domain will bind to the other epitope on another A-beta molecule, thereby cross-linking two A-beta molecules (intermolecular binding).

According to a preferred embodiment, the polypeptide of the invention will bind the two epitopes within one and the same A-beta molecule, so that no cross-linking will occur, and the polypeptide-of-the-invention - A-beta complexes will form in a stoichiometry of 1:1. Thus, (predominantly) intramolecular binding is preferred as compared to (predominantly) intermolecular binding, it being understood that a minor fraction of intermolecular binding may nevertheless

occur. A distinction between intra- and intermolecular binding can be made using Biacore or size exclusion chromatorgraphy assays (as described by Santora et al., Anal. Biochem., 299: 119-129) - cf. Example 8.2 hereinbelow. However, it should be noted that polypeptides that operate via intermolecular binding of separate A-beta molecules are also within the scope of this invention.

In another preferred embodiment of the invention, the first and the second anti-A-beta immunoglobulin single variable domains comprised in a polypeptide of the invention each essentially consists of 4 framework regions (FR1 to FR4 respectively) and 3 complementarity determining regions (CDR1 to CDR3 respectively). Within the polypeptide of the invention, said first and second immunoglobulin single variable domains are covalently linked, optionally by a linker peptide as described below, wherein such linker sterically allows for optimal binding of the at least two immunoglobulin single variable domains to the respective A-beta epitopes.

It will be clear to the skilled person that for pharmaceutical uses in humans, the polypeptides of the invention are preferably directed against human A-beta, whereas for veterinary purposes, the polypeptides of the invention are preferably directed against A-beta from the species to be treated.

It will also be clear to the skilled person that when used as a therapeutic agent in humans, the immunoglobulin single variable domains comprised in the polypeptides according to the invention are preferably humanized immunoglobulin single variable domains.

According to the invention, the two or more immunoglobulin single variable domains can be, independently of each other: Domain antibodies, i.e. VL or VH antibody domains as described above, and/or VHH domains as described above, and/or any other sort of immunoglobulin single variable domains, provided that these immunoglobulin single variable domains will bind the antigen, i.e. A-beta, not by forming mutually complementary variable domain pairs jointly binding to the same epitope (as in the case of e.g. a VL-VH domain pair of a conventional

antibody), but by independently binding to different epitopes (i.e. as a "biparatopic" antigen binding molecule as defined above).

According to a preferred embodiment of the invention, the first and the second immunoglobulin single variable domains essentially consist of either domain antibody sequences or VHH domain sequences as described above. According to a particularly preferred embodiment, the first and the second immunoglobulin single variable domains essentially consist of VHH domain sequences. Accordingly, the invention will herein and, especially, in the experimental part, be described in more detail with reference to biparatopic polypeptides comprising two (optionally humanized) anti-A-beta VHH domain sequences (VHHs) binding to two different epitopes of A-beta, i.e. biparatopic VHH domain constructs. However, it will be clear to the skilled person that the teaching herein may be applied analogously to polypeptides including other anti-A-beta immunoglobulin single variable domains, such as domain antibodies.

The polypeptides of the invention not only possess the advantageous characteristics of conventional antibodies, such as low toxicity and high selectivity, but they also exhibit additional properties. They are more soluble, meaning they may be stored and/or administered in higher concentrations compared to conventional antibodies. They are stable at room temperature, meaning they may be prepared, stored and/or transported without the use of refrigeration equipment, conveying cost, time and environmental savings. The polypeptides of the present invention also exhibit a prolonged stability at extremes of pH, meaning they would be suitable for delivery by oral administration.

Furthermore, the polypeptides of the invention do not need to comprise an Fc part which is present in “classical” antibodies, so that side effects caused by Fc effector functions, such as complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), can be avoided. When used in anti-A-beta passive immunizations, conventional antibodies (having an Fc part) are suspected to account for the induction of microhemorrhages observed in

humans and animal models, which are associated with a targeting of cerebral vascular A-beta deposits (Cerebral amyloid angiopathy) leading to microbleedings via ADCC and/or CDC (Wilcock, DM, Colton, CA, CNS Neurol. Disord. Drug Targets (2009) Vol. 8(1):50-64).

According to another embodiment of the invention, the at least two immunoglobulin single variable domains present in a polypeptide of the invention can be linked to each other directly (i.e. without use of a linker) or via a linker. The linker is preferably a linker peptide and will, according to the invention, be selected so as to allow binding of the at least two different immunoglobulin single variable domains to each of their at least two different epitopes of A-beta, either within one and the same A-beta molecule, or within two different molecules.

Suitable linkers will *inter alia* depend on the epitopes and, specifically, the distance between the epitopes on A-beta to which the immunoglobulin single variable domains bind, and will be clear to the skilled person based on the disclosure herein, optionally after some limited degree of routine experimentation.

Also, when the two or more immunoglobulin single variable domains that bind to A-beta are domain antibodies or VHH domains, they may also be linked to each other via a third domain antibody or VHH domain (in which the two or more immunoglobulin single variable domains may be linked directly to the third domain antibody or VHH domain or via suitable linkers). Such a third domain antibody or VHH domain may for example be a domain antibody or VHH domain that provides for an increased half-life, as further described herein. For example, the latter domain antibody or VHH domain may be a domain antibody or VHH domain that is capable of binding to a (human) serum protein such as (human) serum albumin or (human) transferrin, as further described herein.

Alternatively, the two or more immunoglobulin single variable domains that bind to A-beta may be linked in series (either directly or via a suitable linker) and the third (single) domain antibody or VHH domain (which may provide for increased

half-life, as decribed above) may be connected directly or via a linker to one of these two or more aforementioned immunoglobulin sequences.

Suitable linkers are described herein in connection with specific polypeptides of the invention and may - for example and without limitation - comprise an amino acid sequence, which amino acid sequence preferably has a length of 9 or more amino acids, more preferably at least 17 amino acids, such as about 20 to 40 amino acids. However, the upper limit is not critical but is chosen for reasons of convenience regarding e.g. biopharmaceutical production of such polypeptides.

The linker sequence may be a naturally occurring sequence or a non-naturally occurring sequence. If used for therapeutical purposes, the linker is preferably non-immunogenic in the subject to which the anti-A-beta polypeptide of the invention is administered.

One useful group of linker sequences are linkers derived from the hinge region of heavy chain antibodies as described in WO 96/34103 and WO 94/04678.

Other examples are poly-alanine linker sequences such as Ala-Ala-Ala.

Further preferred examples of linker sequences are Gly/Ser linkers of different length such as $(gly_xser_y)_z$ linkers, including $(gly_4ser)_3$, $(gly_4ser)_4$, (gly_4ser), (gly_3ser), gly_3, and $(gly_3ser_2)_3$.

If the polypeptide of the invention is modified by the attachment of a polymer, for example of a polyethylene glycol (PEG) moiety, the linker sequence preferably includes an amino acid residue, such as a cysteine or a lysine, allowing such modification, e.g. PEGylation, in the linker region. Preferred examples of such linkers are:

GGGGCGGGS (“GS9,C5”, SEQ ID NO:6)
GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (“GS25,C5, SEQ ID NO:7)
GGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGG ("GS27,C14", SEQ ID NO:8),

GGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS35,C15", SEQ ID NO:9), and GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS35,C5", SEQ ID NO:10).

Some non-limiting examples of PEGylated polypeptides of the invention including such linkers are shown in SEQ ID NOs 40 to 43, 142, and 143.

Furthermore, the linker may also be a poly(ethylene glycol) moiety, as shown in e.g. WO04/081026.

In another embodiment, the at least two immunoglobulin single variable domains of the polypeptide of the invention are linked to each other via another moiety (optionally via one or two linkers), such as another polypeptide which, in a preferred but non-limiting embodiment, may be a further immunoglobulin single variable domain as already described above. Such moiety may either be essentially inactive or may have a biological effect such as improving the desired properties of the polypeptide or may confer one or more additional desired properties to the polypeptide. For example, and without limitation, the moiety may improve the half-life of the protein or polypeptide, and/or may reduce its immunogenicity or improve any other desired property.

Some non-limiting examples of such constructs are the constructs of SEQ ID NOs:34 to 39.

According to a preferred embodiment, the polypeptides of the invention comprise a first immunoglobulin single variable domain which binds to the epitope as defined by SEQ ID NO:3, and a second immunoglobulin single variable domain which binds to the epitope as defined by SEQ ID NO:4, or a first immunoglobulin single variable domain which binds to the epitope as defined by SEQ ID NO:4, and a second immunoglobulin single variable domain which binds to the epitope as defined by SEQ ID NO:3.

Even more preferred, contact between the immunoglobulin single variable domains and the A-beta molecule is made as described in Examples 8.2 and 8.3, i.e. the polypeptide of the invention forms contacts to at least amino acids 1, 3, 13, 20, and 23 of the human or mouse A-beta peptide.

Preferably, the polypeptides of the invention are having dissociation constant (K_D) values, measured in Kinexa assays as described in Example 9.7, in the range of 10^{-6} moles/litre or less, more preferably 10^{-9} moles/litre or less, and even more preferably in the range of from 10^{-11} to 10^{-13} moles/litre, or are having an IC50 value as measured in a TR-FRET binding assay, as set out in Example 9.3, of 10^{-9} moles/litre or below, and preferably in the range of from 5×10^{-10} moles/litre to 10^{-12} moles/litre.

According to an even more preferred embodiment of the invention, the CDR sequences in the polypeptide of the invention are as defined below and are also such that the polypeptide of the invention binds to A-beta with a dissociation constant (K_D) as set out in the paragraph above or are having IC50 values as set out above.

According to a specific embodiment of the invention, the polypeptide of the invention comprises two A-beta binding immunoglobulin single variable domains having the structure (SEQ ID NOs as given in Table I below):
Immunoglobulin single variable domain 1:
FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4,
immunoglobulin single variable domain 2:
FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4,
wherein:
CDR(1)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:16; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:16, respectively;
and

CDR(2)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequence according to SEQ ID NO:19; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequence according to SEQ ID NO:19;
and
wherein the other CDR sequences and the framework region sequences are not specifically limited but will be selected by the skilled person according to the specific needs, such as humanized framework regions in case of a polypeptide intended for use in humans in order to reduce immunogenicity of the polypeptide of the invention. The order of the immunoglobulin single variable domains 1 and 2 is not particularly limited, so that, within a polypeptide of the invention, immunoglobulin single variable domain 1 may be located N-terminally and immunoglobulin single variable domain 2 may be located C-terminally, or vice versa.

Preferably, CDR(1)3 is selected from the group consisting of amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:16, and CDR(2)3 is the amino acid sequence according to SEQ ID NO:19.

Even more preferably, the polypeptide of the invention comprises two A-beta binding immunoglobulin single variable domains having the structure (SEQ ID NOs as given in Table I below):
Immunoglobulin single variable domain 1:
FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4,
immunoglobulin single variable domain 2:
FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4,
wherein:
CDR(1)1 is the amino acid sequence according to SEQ ID NO:11 (which is the same as the amino acid sequence according to SEQ ID NO:14);
CDR(1)2 is selected from the group consisting of amino acid sequences according to SEQ ID NO:12 and SEQ ID NO:15;

CDR(1)3 is selected from the group consisting of amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:16;
CDR(2)1 is the amino acid sequence according to SEQ ID NO:17;
CDR(2)2 is the amino acid sequence according to SEQ ID NO:18; and
CDR(2)3 is the amino acid sequence according to SEQ ID NO:19;
and
wherein the framework region sequences are not specifically limited but will be selected by the skilled person according to the specific needs, such as humanized framework regions in case of a polypeptide intended for use in humans in order to reduce immunogenicity of the polypeptide of the invention.

In the polypeptide of the invention as described above, the particular order of the immunoglobulin single variable domains 1 and 2 as set out above within the polypeptide is not critical, so that above-mentioned immunoglobulin single variable domain 1 may be located at the N-terminal end of the polypeptide, followed by above-mentioned immunoglobulin single variable domain 2; alternatively, above-mentioned immunoglobulin single variable domain 2 may be located at the N-terminal end of the polypeptide, followed by above-mentioned immunoglobulin single variable domain 1. In both cases, additional sequences and moieties may be present within the polypeptide of the invention, e.g. N-terminally, C-terminally, or located between the two immunoglobulin single variable domains, as set out in more detail herein.

The above CDR sequences and sets of 6 CDR sequences as present in the polypeptides of the invention and outlined above are summarized in the following Tables I and II, respectively:

TABLE I and TABLE II: Preferred CDR combinations in polypeptides of the invention comprising two different A-beta binding immunoglobulin single variable domains

TABLE I: CDR sequences

SEQ ID NO:	amino acid sequence
11	TDTMG
12	AVTWNSGRTNYADSVKG
13	HRLVVGGTSVGDWRY
14	TDTMG
15	AVTWNSGRINYADSVKG
16	HRFVVGGNRVEDWRY
17	NYNMG
18	AVSRSGVSTYYADSVKG
19	AYRGTAINVRRSYSS

TABLE II: Preferred sets of CDR sequences / CDR combinations (sequences defined by their SEQ ID NO: as given in above TABLE I):

	set 1	set 2	set 3	set4
CDR(1)1	11	14	17	17
CDR(1)2	12	15	18	18
CDR(1)3	13	16	19	19
CDR(2)1	17	17	11	14
CDR(2)2	18	18	12	15
CDR(2)3	19	19	13	16

Human immunoglobulin framework region sequences (FR) that can also be used as framework region sequences for the immunoglobulin single variable domains as described above are known in the art. Also known in the art are methods for humanizing framework regions of immunoglobulin single variable domains derived from species other than humans.

In a preferred embodiment, the polypeptides of the invention comprise the following framework region amino acid sequences 1 to 4 (FR1 to FR4; SEQ ID NOs as indicated in Table III below):
FR1 is or comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences according to SEQ ID NO:20 and SEQ ID NO:21;

FR2 is or comprises an amino acid sequence according to SEQ ID NO:22;
FR3 is or comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences according to SEQ ID NO:23 and SEQ ID NO:24; and
FR4 is or comprises an amino acid sequence according to SEQ ID NO:25.

TABLE III: FR amino acid sequences

SEQ ID NO:	amino acid sequence
20	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFR
21	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN
22	WFRQAPGKGREFVA
23	RFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
24	RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
25	WGQGTLVTVSS

Specific examples of immunoglobulin single variable domains having the FR and CDR sequences as shown above are:

Immunoglobulin single variable domain 1 (first amino acid, i.e. glutamate, may optionally be missing):
evqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvss (ABII035; SEQ ID NO:44)

Immunoglobulin single variable domain 2 (first amino acid, i.e. glutamate, may optionally be missing):
evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvss (ABII059; SEQ ID NO:45)

Specific examples of polypeptides of the invention which include, in one single polypeptide chain, two immunoglobulin single variable domains as shown above and, optionally, a linker which connects the two immunoglobulin single variable domains, are given further below.

According to a preferred embodiment, the polypeptides of the invention include, especially when used as a therapeutic agent, a moiety which extends the half-life of the polypeptide of the invention in serum or other body fluids of a patient. The term "half-life" means the time taken for the serum concentration of the (modified) polypeptide to reduce by 50%, *in vivo*, for example due to degradation of the polypeptide and/or clearance and/or sequestration by natural mechanisms.

More specifically, such half-life extending moiety can be covalently linked or fused to said polypeptide and may be, without limitation, an Fc portion, an albumin moiety, a fragment of an albumin moiety, an albumin binding moiety, such as an anti-albumin immunoglobulin single variable domain, a transferrin binding moiety, such as an anti-transferrin immunoglobulin single variable domain, a polyoxyalkylene molecule, such as a polyethylene glycol molecule, an albumin binding peptide, or hydroxyethyl starch (HES) derivatives.

According to one embodiment, the polypeptide of the invention may be linked to one or more antibody parts, fragments or domains that confer one or more effector functions to the polypeptide of the invention and/or may confer the ability to bind to one or more Fc receptors. For example, for this purpose, and without being limited thereto, the antibody parts may be or may comprise CH2 and/or CH3 domains of an antibody, such as from a heavy chain antibody (as described hereabove) and more preferably from a conventional human 4-chain antibody; specifically, the polypeptide of the invention may be linked to an Fc region, for example from human IgG, from human IgE or from another human Ig. For example, WO 94/04678 describes heavy chain antibodies comprising a Camelid VHH domain or a humanized derivative thereof, in which the Camelidae CH2 and/or CH3 domain have been replaced by human CH2 and/or CH3 domains, so as to provide an immunoglobulin that consists of 2 heavy chains each comprising a - optionally humanized - VHH domain and human CH2 and CH3 domains (but no CH1 domain), which immunoglobulin has the effector function provided by the CH2 and CH3 domains, can function without the presence of any light chains, and has an increased half-life as compared to the corresponding VHH domains without such modification.

Specific examples of polypeptides of the invention including an Fc portion (with or without effector functions) are the polypeptides indicated hereinbelow:

evqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskn taylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssggggsgggsevqllesggglvqpggsl rlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntvylqmnslrpedtavy ycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgalt sgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvf lfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlng keykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpenn ykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO:26)

evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnsk ntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssgggsggggsggggsggggsggggs gggevqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdn skntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaal gclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepks cdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpre eqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclv kgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgk (SEQ ID NO:27)

evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnsk ntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssgggsggggsggggcggggsgggg sggggsggggsevqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyads vkgrftisrdnskntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapss kstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntk vdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvev hnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemt knqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhn hytqkslslspgk (SEQ ID NO:28)

evqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskn
taylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssgggsgggsevqllesggglvqpggsl
rlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntvylqmnslrpedtavy
ycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgalt
sgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpape**aa**ggps
vflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwl
ngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpe
nnykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEQ ID NO:29)

evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnsk
ntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssgggsggggsggggsggggsggggs
gggevqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdn
skntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaal
gclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepks
cdkthtcppcpape**aa**ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpr
eeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltcl
vkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsl
spgk (SEQ ID NO:30)

evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnsk
ntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssgggsggggsggggcggggsgggg
sggggsggggsevqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyads
vkgrftisrdnskntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapss
kstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntk
vdkrvepkscdkthtcppcpape**aa**ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgve
vhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreem
tknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealh
nhytqkslslspgk (SEQ ID NO:31)

According to a further embodiment of the invention, the two immunoglobulin single variable domains may be fused to a serum albumin molecule, such as described e.g. in WO01/79271 and WO03/59934.

An example of a biparatopic A-beta binding polypeptide of the invention comprising a human serum albumin moiety is given in Table IV.

Table IV: HSA-fusion protein

Sequence information	Description	SEQ ID NO:
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWF RQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNS KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSS WGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISR DNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE DWRYWGQGTLVTVSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERN ECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKK YLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEV ENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRP CFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDK ETCFAEEGKKLVAASQAALGL	059-27GS-035-HSA	32

In another preferred embodiment, the polypeptide of the invention comprises a moiety which binds to an antigen found in blood, such as serum albumin, serum immunoglobulins, thyroxine-binding protein, fibrinogen or transferrin, thereby conferring an increased half-life *in vivo* to the resulting polypeptide of the invention. According to a specifically preferred embodiment, such moiety is an albumin-binding immunoglobulin and, especially preferred, an albumin-binding immunoglobulin single variable domain such as an albumin-binding VHH domain.

If intended for use in humans, such albumin-binding immunoglobulin single variable domain will preferably bind to human serum albumin and will preferably be a humanized albumin-binding VHH domain.

Immunoglobulin single variable domains binding to human serum albumin are known in the art and are described in further detail in e.g. WO2006/122786. A specifically useful albumin binding VHH domain consists of or contains the amino acid sequence:

evqlvesggglvqpgnslrlscaasgftfssfgmswvrqapgkglewvssisgsgsdtlyadsvkgrftisrdnak ttlylqmnslrpedtavyyctiggslsrssqgtlvtvss (SEQ ID NO:33)

Specific examples of polypeptides of the invention which comprise an albumin binding VHH domain are shown in Table V:

TABLE V: Biparatopic polypeptides of the invention, comprising two anti-A-beta VHH domains and one anti-HSA VHH domain

Clone	Sequence information	Description	SEQ ID NO:
ABII316	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVR RSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS**EVQLVESGG GLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS**GG GGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADS VKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHR FVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	059-9GS-**Alb8**-9GS-035	34
ABII317	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVR RSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVT WNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPE DTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASG FTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYAD SVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSS	059-35GS-035-9GS-Alb8	35
ABII318	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS	059-9GS-	36

	RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVR RSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGR EFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDT AVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	035-9GS-Alb8	
ABII319	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTIS RDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNR VEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAA VSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLR PEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVS SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIG GSLSRSSQGTLVTVSS	035-35GS-059-9GS-Alb8	37
ABII320	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGW FRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE DWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGS GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNY NMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAI NVRRSYSSWGQGTLVTVSS	035-9GS-Alb8-9GS-059	38
ABII321	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWF RQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVED WRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGG GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINV RRSYSSWGQGTLVTVSS	035-9GS-Alb8-9GS-059 (first E deleted)	39

In still another preferred embodiment, the polypeptide of the invention comprises a moiety which binds to serum albumin, wherein such moiety is an albumin

binding peptide, as described e.g. in international patent publications WO2008/068280 and WO2009/127691.

According to still another embodiment, a half-life extending modification of a polypeptide of the invention (such modification also reducing immunogenicity of the polypeptide) comprises attachment of a suitable pharmacologically acceptable polymer, such as straight or branched chain poly(ethylene glycol) (PEG) or derivatives thereof (such as methoxypoly(ethylene glycol) or mPEG). Generally, any suitable form of PEGylation can be used, such as the PEGylation used in the art for antibodies and antibody fragments (including but not limited to domain antibodies and scFv's); reference is made, for example, to: Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov. 2 (2003); WO 04/060965; and US6,875,841.

Various reagents for PEGylation of polypeptides are also commercially available, for example from Nektar Therapeutics, USA, or NOF Corporation, Japan, such as the Sunbright® EA Series, SH Series, MA Series, CA Series, and ME Series, such as Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA, and Sunbright® ME-400MA.

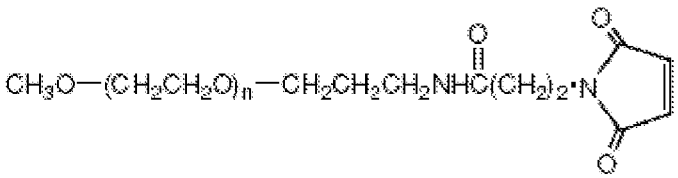
Preferably, site-directed PEGylation is used, in particular via a cysteine-residue (see for example Yang et al., Protein Engineering 16, 761-770 (2003)). For example, for this purpose, PEG may be attached to a cysteine residue that naturally occurs in a polypeptide of the invention, a polypeptide of the invention may be modified so as to suitably introduce one or more cysteine residues for attachment of PEG, or an amino acid sequence comprising one or more cysteine residues for attachment of PEG may be fused to the N- and/or C-terminus and/or of a linker region that bridges two or more functional domains of a polypeptide of the invention, all using techniques of protein engineering known per se to the skilled person.

Preferably, for the polypeptides of the invention, a PEG is used with a molecular weight of more than 5 kDa, such as more than 10 kDa and less than 200 kDa, such as less than 100 kDa; for example in the range of 20 kDa to 80 kDa.

With regard to PEGylation, it should be noted that generally, the invention also encompasses any polypeptide of the invention that has been PEGylated at one or more amino acid positions, preferably in such a way that said PEGylation either (1) increases the half-life in vivo; (2) reduces immunogenicity; (3) provides one or more further beneficial properties known per se for PEGylation; (4) does not essentially affect the affinity of the polypeptide for A-beta (e.g. does not reduce said affinity by more than 50 %, and more preferably not by more than 10%, as determined by a suitable assay, such as those described in the Examples below); and/or (4) does not affect any of the other desired properties of the polypeptides of the invention. Suitable PEG-groups and methods for attaching them, either specifically or non-specifically, will be clear to the skilled person.

According to a specifically preferred embodiment of the invention, a PEGylated polypeptide of the invention includes one PEG moiety of linear PEG having a molecular weight of 40 kDa or 60 kDa, wherein the PEG moiety is attached to the polypeptide in a linker region and, specifially, at a Cys residue at position 5 of a GS9-linker peptide as shown in SEQ ID NO:6, at position 14 of a GS27-linker peptide as shown in SEQ ID NO:8, or at position 15 of a GS35-linker peptide as shown in SEQ ID NO:9, or at position 5 of a 35GS-linker peptide as shown in SEQ ID NO:10.

Preferred examples of polypeptides of the invention, PEGylated preferably with one of the PEG reagents as mentioned above, such as "Sunbright® ME-400MA" as shown in the following chemical formula:



which has an average molecular weight of 40 kDa, are given in Table VI below:

Table VI: PEGylated polypeptides of the invention; C* indicates the Cys residue bearing the PEG moiety

Clone	Sequence information	Description	SEQ ID NO:
ABII322	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFR QAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSW GQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGG**C***GGGGSGGGGS GGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISR DNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE DWRYWGQGTLVTVSS	ABII059-27GS linker with C at position 14-ABII035	40
ABII323	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFR QAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**C***GGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYAD SVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHR FVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	ABII059-35GS linker with C at position 15-ABII035	41
ABII305	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWF RQAPGKEREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNA KNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGAAYRGTAINVRRSYDS WGQGTQVTVSSGGGG**C***GGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYA DSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTQVTVSS	ABII050-35GS linker with C at position 5-ABII002	42
ABII306	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWF RQAPGKEREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNA KNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGAAYRGTAINVRRSYDS WGQGTQVTVSSGGGG**C***GGGSEVQLVESGGGLVLAG GSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVT WNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDE DTAVYYCTAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTQVTVSS	ABII050-9GS linker with C at position 5-ABII002	43
ABII314	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWF RQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNS KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSS WGQGTLVTVSSGGGG**C***GGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYAD SVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHR FVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	ABII059-35GS linker with C at position 5-ABII035	142
ABII315	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWF RQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNS KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSS	ABII059-9GS linker	143

	WGQGTLVTVSSGGGG**C***GGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTW NSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTA VYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	with C at position 5-ABII035	

According to a further embodiment, the polypeptide of the invention additionally comprises a moiety which allows the polypeptide to cross the blood brain barrier. In particular, said moiety that allows the resulting polypeptides of the invention to cross the blood brain barrier may be one or more (such as two and preferably one) immunoglobulin single variable domains such as the brain targeting antibody fragments (VHHs) FC44 and FC5 described in WO02/057445. Examples thereof are shown in Table XIX below.

Thus, the polypeptides of the invention can also be described by the following general formula:

A - ISVD1 - B - ISVD2 - C, wherein
ISVD1 and ISVD2 denote an A-beta binding immunoglobulin single variable domain as described hereinbefore, binding to different epitopes of A-beta, such as e.g. the immunoglobulin single variable domains according to SEQ ID NOs 44 and 45, respectively; and
A, B and C independently of each other denote:
- no additional moiety (i.e. A is the N-terminal end of ISVD1, B is a peptide bond linking ISVD1 and ISVD2, and C is the C-terminal end of ISVD2)
- one or more domains selected from the group of CH1, CH2, and CH3 domains of human IgG, IgM, IgD, IgE, and the like, and preferably C denotes CH2-CH3;
- albumin or a fragment thereof, and preferably human serum albumin or a fragment thereof;
- an albumin binding moiety, and preferably an albumin binding immunoglobulin single variable domain or an albumin binding peptide;
- a linker peptide, which is optionally PEGylated; and preferably B denotes a linker peptide having from 3 to 45 amino acids, including at least one cysteine residue which is PEGylated, preferably with a PEG40 or PEG60 moiety;

- one or more A-beta binding moieties, preferably an additional anti-A-beta immunoglobulin variable domain, identical or not identical to ISVD1 or ISVD2
- a polypeptide, preferably an immunoglobulin single variable domain, conferring to the polypeptide blood-brain-barrier crossing properties, such as FC44 and FC5 described in WO02/057445;

or wherein
ISVD1, ISVD2, B and C have the meaning as above and
- A denotes an N-terminal, optionally formylated, Met residue, for example as result of expression in a heterologous host organism; and/or a signal or leader sequence that directs secretion of the polypeptide of the invention from a host cell upon synthesis; and/or a pro-sequence which is optionally removed after expression of the polypeptide in a suitable host cell;

or wherein
ISVD1, ISVD2, A and B have the meaning as above and
- C denotes a "tag", such as an amino acid sequence or residue that allows or facilitates the purification of the polypeptide of the invention, for example using affinity techniques directed against said sequence or residue; such tag may optionally be removabel after such purification step, e.g. by chemical or enzymatical cleavage, to provide the mature sequence of the polypeptide; for this purpose, the tag may optionally be linked to the polypeptide sequence via a cleavable linker sequence or contain a cleavable motif. Some preferred, but non-limiting examples of such residues are multiple histidine residues, glutathione residues and a myc-tag such as AAAEQKLISEEDLNGAA (SEQ ID NO:46).

Therapeutic use

According to an important further aspect, the polypeptide of the invention is used for therapeutic purposes, such as
- for the prevention, treatment and/or alleviation of a disorder, disease or condition as set out below, especially in a human being, such as Alzheimer's Disease (AD), dry AMD, or glaucoma;

- in a method of treatment of a patient in need of such therapy, such method comprising administering, to the subject in need thereof, a pharmaceutically active amount of at least one polypeptide of the invention or a pharmaceutical composition (as set out in detail below) comprising such polypeptide of the invention, wherein such subject in need of such therapy may be a human being suffering from any of the disorders, diseases or conditions as set out below, such as AD, dry AMD, or glaucoma;
- for the preparation of a medicament for the prevention, treatment or alleviation of disorders, diseases or conditions as set out below, such as AD, dry AMD, or glaucoma in a human being;
- as an active ingredient in a pharmaceutical composition or medicament used for the before-mentioned purposes.

The disorder, disease or condition (in the following: disease) as mentioned above is a disease that can be prevented and/or treated and/or alleviated by administering a polypeptide of the invention to the patient or (human) being, and, more specifically, a disease mediated by A-beta dysfunction, such as a dysfunction of A-beta production, deposition or lack of clearance, and/or a disease mediated by amyloid plaque formation, formation of A-beta oligomers, and the like. Even more specifically, the disease is a disease that can be prevented and/or treated and/or alleviated by modulating, reducing and/or reversing the (undesired) formation or build-up of A-beta and/or of amyloid plaques and/or of A-beta oligomers in a patient, such diseases compring e.g. neurodegenerative diseases, the most prominent A-beta related neurodegenerative disease being AD.

Thus, the polypeptides of the invention can be used in a method for the prevention, treatment or alleviation of diseases such as:
- Alzheimer's disease (AD; all types and stages of the disease including preclinical and prodromal stages); also known as "dementia of the Alzheimer type";
- the dry form of age-related macular degeneration (dry AMD; central geographic atrophy)

- glaucoma
- cerebral amyloid angiopathy (CAA);
- trisomy 21 (Down's Syndrome), including adult Down syndrome;
- hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch-type (HCHWA-D);
- dementia with Lewy Bodies;
- frontotemporal lobar degeneration;
- glaucoma;
- amyotrophic lateral sclerosis;
- sporadic inclusion body myositis; and
- anxiety disorder in an elderly human subject (e.g. of at least 55 years old), selected from the group consisting of obsessive-compulsive disorder, panic disorder, panic attack, agoraphobia, post-traumatic stress disorder, social phobia, disruptive behaviour disorder and chronic fatigue syndrome (wherein said elderly human subject may or may not be diagnosed with a condition related to A-beta, selected from clinical or preclinical AD, chronic amyloid angiopathy and Down's syndrome);

wherein such method comprises administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically active amount of a polypeptide of the invention and/or of a pharmaceutical composition comprising the same.

In the context of the present invention, the term "prevention, treatment and/or alleviation" not only comprises preventing and/or treating and/or alleviating the disease, but also generally comprises preventing the onset of the disease, slowing or reversing the progress of disease, preventing or slowing the onset of one or more symptoms associated with the disease, reducing and/or alleviating one or more symptoms associated with the disease, reducing the severity and/or the duration of the disease and/or of any symptoms associated therewith and/or preventing a further increase in the severity of the disease and/or of any symptoms associated therewith, preventing, reducing or reversing any physiological damage caused by the disease, and generally any pharmacological action that is beneficial to the patient being treated.

Specifically, in the case of AD, the polypeptides, compositions, and methods of the invention can be used for helping to prevent or delay the onset of AD in patients with identified risk factors for AD and / or proven A-beta deposits, for treating patients with mild cognitive impairment (MCI), who are at risk to convert to AD, and for preventing or delaying the onset of AD in those patients who would otherwise be expected to progress from preclinical or prodromal disease stages to dementia. Genetic risk factors for AD include specific mutations in the APP gene (in particular at positions 670 and 671 as well as position 717), in the presenilin genes PS1 and PS2, and in ApoE4. Other risk factors include a family history of AD, hypercholesterolemia, atherosclerosis, diabetes, and/or high age. Disposition for AD can be diagnosed early by analysing A-beta(1-42) and tau concentrations in CSF. Neuroimaging techniques (e.g. PET and MRI) may identify patients at risk of converting to AD. In general, the use of several biomarkers may allow to diagnose AD in a very early stage with a high sensitivity and specificity.

In the case of a predisposition for Down's syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch type, and cerebral beta-amyloid angiopathy, the polypeptides, compositions, and methods of the invention may also be useful for preventing their potential consequences such as single and recurrent lobar hemorrhages.

The subject to be treated will be a mammal, and more in particular a human being. As will be clear to the skilled person, the subject to be treated will in particular be a person suffering from, or at risk from, the diseases, disorders or conditions mentioned herein.

It will also be clear to the skilled person that the above methods of treatment of a disease include the preparation of a medicament for the treatment of said disease. Furthermore, it is clear that the polypeptides of the invention can be used as an active ingredient in a medicament or pharmaceutical composition intended for the treatment of the above diseases. Thus, the invention also relates to the use of a polypeptide of the invention in the preparation of a pharmaceutical

composition for the prevention, treatment and/or alleviation of any of the diseases, disorders or conditions mentioned hereinabove. The invention further relates to a polypeptide of the invention for therapeutic or prophylactic use and, specifically, for the prevention, treatment and/or alleviation of any of the diseases, disorders or conditions mentioned hereinabove. The invention further relates to a pharmaceutical composition for the prevention, treatment and/or alleviation of the diseases, disorders or conditions mentioned hereinabove, wherein such composition comprises at least one polypeptide of the invention.

Without wishing to be bound by a specific theory, the above therapeutic or prophylactic effect may be effected by the following mechanism: The polypeptides of the invention bind to A-beta, thereby inhibiting its interaction with one or more other A-beta molecules or the interaction of A-beta with a receptor or the interaction of A-beta with a soluble biomolecule or the interaction of A-beta with an insoluble biomolecule. The target A-beta may be a part of a plaque or suspension or solution, or one or more of these, wherein the other A-beta molecules may also be a part of a plaque, in suspension or solution or one or more of these. Clearance of different A-beta forms, such as the monomeric form, oligo- and multimeric forms, aggregated soluble and insoluble forms, fibrillar forms, proto-fibrillar forms and amyloid plaques from the brain, blood vessels or other parts in the body may be due to the binding of the polypeptide of the invention to A-beta. Reduction of A-beta levels in a body fluid, and preferably the reduction of the level of soluble A-beta in blood by inhibition of the interaction between an A-beta molecule and another molecule, such as e.g. another A-beta molecule, will alleviate the symptoms of degenerative neural diseases, slow down or stop the disease progression and/or restore brain damage, memory and cognition.

According to a further, more general aspect, the invention relates to a method for immunotherapy, and in particular for passive immunotherapy, which method comprises administering, to a subject suffering from or at risk of the diseases as mentioned herein, a pharmaceutically active amount of a polypeptide of the invention and/or of a pharmaceutical composition comprising the same.

According to still another aspect, the invention relates to a method (i) for the prevention, treatment and/or alleviation of cognitive decline, and/or (ii) for restoring cognitive function and/or of improving cognitive function, said method comprising administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically active amount of a polypeptide of the invention and/or of a pharmaceutical composition comprising the same.

The polypeptides of the invention and/or the compositions comprising the same can be administered to a patient in need thereof in any suitable manner, depending on the specific pharmaceutical formulation or composition to be used. Thus, the polypeptides of the invention and/or the compositions comprising the same can for example be administered intravenously, subcutaneously, intramuscularly, intraperitoneally, transdermally, orally, sublingually (e.g. in the form of a sublingual tablet, spray or drop placed under the tongue and adsorbed through the mucus membranes into the capillary network under the tongue), (intra-)nasally (e.g. in the form of a nasal spray and/or as an aerosol), topically, by means of a suppository, by inhalation, intravitreally (esp. for the treatment of dry AMD or glaucoma), or any other suitable manner in an effective amount or dose.

The polypeptides of the invention and/or the compositions comprising the same are administered according to a regimen of treatment that is suitable for preventing, treating and/or alleviating the disease, disorder or condition to be prevented, treated or alleviated. The clinician will generally be able to determine a suitable treatment regimen, depending on factors such as the disease, disorder or condition to be prevented, treated or alleviated, the severity of the disease, the severity of the symptoms thereof, the specific polypeptide of the invention to be used, the specific route of administration and pharmaceutical formulation or composition to be used, the age, gender, weight, diet, general condition of the patient, and similar factors well known to the clinician. Generally, the treatment regimen will comprise the administration of one or more polypeptides of the

invention, or of one or more compositions comprising the same, in therapeutically and/or prohylactically effective amounts or doses.

Generally, for the prevention, treatment and/or alleviation of the diseases, disorders and conditions mentioned herein and depending on the specific disease, disorder or condition to be treated, the potency of the specific polypeptide of the invention to be used, the specific route of administration and the specific pharmaceutical formulation or composition used, the polypeptides of the invention will generally be administered in an amount between 0.005 and 20.0 mg per kilogram of body weight and dose, preferably between 0.05 and 10.0 mg/kg/dose, and more preferably between 0.5 and 10 mg/kg/dose, either continuously (e.g. by infusion) or as single doses (such as e.g. daily, weekly, or monthly doses; cf. below), but can significantly vary, especially, depending on the before-mentioned parameters.

For prophylactic applications, compositions containing the polypeptides of the invention may also be administered in similar or slightly lower dosages. The dosage can also be adjusted by the individual physician in the event of any complication.

Depending on the specific polypeptide of the invention and its specific pharmacokinetic and other properties, it may be administered daily, every second, third, fourth, fifth or sixth day, weekly, monthly, and the like. An administration regimen could include long-term, weekly treatment. By "long-term" is meant at least two weeks and preferably months, or years of duration.

The efficacy of the polypeptides of the invention, and of compositions comprising the same, can be tested using any suitable in vitro assay, cell-based assay, in vivo assay and/or animal model known per se, or any combination thereof, depending on the specific disease involved. Suitable assays and animal models will be clear to the skilled person, and for example include the assays and animal models used in the Examples below. Thus, suitable assays are, but are not limited to, ELISA binding assays measuring the binding of the anti-A-beta

polypeptides to coated monomeric or aggregated A-beta peptides or to captured biotinylated A-beta, SPR (Surface Plasmon Resonance) assays measuring the binding to coated monomeric or aggregated A-beta peptides or to captured biotinylated A-beta (Malmqvist M.: Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics; Curr. Opin. Immunol. 5(2):282 (1993)), competition TR-FRET (Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer) assays measuring the competition with either an A-beta(1-40) peptide / N-terminal region specific binder interaction or with an A-beta(1-40) / central region specific binder interaction, in vitro A-beta aggregation assays measuring the prevention or disaggregation of the aggregation, TAPIR (Tissue Amyloid Plaque Immunoreactivity) assays measuring the binding of molecules to amyloid plaques using immunohistochemical analysis on brains from Alzheimer's disease patients or APP transgenic animals, as well as *in vivo* mechanistic models.

Preferably, the polypeptides of the invention are having better characteristics than conventional antibodies known in the art (such as m266 and 3D6 anti-A-beta IgG antibodies) or the Nanobodies® described in WO2006/40153 in at least one of these assays or models, and preferably in one or more of the in vivo models.

For pharmaceutical use, the polypeptides of the invention may be formulated as a pharmaceutical preparation comprising (i) at least one polypeptide of the invention and (ii) at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient, adjuvant, and/or stabilizer, and (iii) optionally one or more further pharmaceutically active polypeptides and/or compounds. By "pharmaceutically acceptable" is meant that the respective material does not show any biological or otherwise undesirable effects when administered to an individual and does not interact in a deleterious manner with any of the other components of the pharmaceutical composition (such as e.g. the pharmaceutically active ingredient) in which it is contained. Specific examples can be found in standard handbooks, such as e.g. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Company, USA (1990). For example, the polypeptides of the invention may be formulated and administered in any manner known per se for conventional

antibodies and antibody fragments and other pharmaceutically active proteins. Thus, according to a further embodiment, the invention relates to a pharmaceutical composition or preparation that contains at least one polypeptide of the invention and at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient, adjuvant and/or stabilizer, and optionally one or more further pharmaceutically active substances.

By means of non-limiting examples, such a formulation may be in a form suitable for oral administration, for parenteral administration (such as by intravenous, intramuscular, subcutaneous, intrathecal, intracavernosal or intraperitoneal injection or intravenous infusion), for topical administration, for sublingual administration, for administration by inhalation, by a skin patch, by an implant, by a suppository, for transdermal, nasal, intravitreal, rectal or vaginal administration, and the like. Such suitable administration forms - which may be solid, semi-solid or liquid, depending on the manner of administration - as well as methods and carriers for use in the preparation thereof, will be clear to the skilled person.

Pharmaceutical preparations for parenteral administration, such as intravenous, intramuscular, subcutaneous injection or intravenous infusion may for example be sterile solutions, suspensions, dispersions, emulsions, or powders which comprise the active ingredient and which are suitable, optionally after a further dissolution or dilution step, for infusion or injection. Suitable carriers or diluents for such preparations for example include, without limitation, sterile water and pharmaceutically acceptable aqueous buffers and solutions such as physiological phosphate-buffered saline, Ringer's solutions, dextrose solution, and Hank's solution; water oils; glycerol; ethanol; glycols such as propylene glycol, as well as mineral oils, animal oils and vegetable oils, for example peanut oil, soybean oil, as well as suitable mixtures thereof.

Solutions of the active compound or its salts may also contain a preservative to prevent the growth of microorganisms, such as antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal (thiomersal), and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic

agents, for example, sugars, buffers or sodium chloride. The proper fluidity can be maintained, for example, by the formation of liposomes, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions or by the use of surfactants. Other agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin, may also be added.

In all cases, the ultimate dosage form must be sterile, fluid and stable under the conditions of manufacture and storage. Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compound in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filter sterilization. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and the freeze drying techniques, which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient present in the previously sterile-filtered solutions.

Usually, aqueous solutions or suspensions will be preferred. Generally, suitable formulations for therapeutic proteins such as the polypeptides of the invention are buffered protein solutions, such as solutions including the protein in a suitable concentration (such as from 0.001 to 400 mg/ml, preferably from 0.005 to 200 mg/ml, more preferably 0.01 to 200 mg/ml, more preferably 1.0 - 100 mg/ml, such as 1.0 mg/ml (i.v. administration) or 100 mg/ml (s.c. administration) and an aqueous buffer such as:

- phosphate buffered saline, pH 7.4,
- other phosphate buffers, pH 6.2 to 8.2,
- histidine buffers, pH 5.5 to 7.0,
- succinate buffers, pH 3.2 to 6.6, and
- citrate buffers, pH 2.1 to 6.2,

and, optionally, salts (e.g. NaCl) and/or sugars or polyalcohols (such as trehalose, mannitol, or glycerol) for providing isotonicity of the solution.

Preferred buffered protein solutions are solutions including about 0.05 mg/ml of the polypeptide of the invention dissolved in 25 mM phosphate buffer, pH 6.5,

adjusted to isotonicity by adding 220 mM trehalose. In addition, other agents such as a detergent, e.g. 0.02 % Tween-20 or Tween-80, may be included in such solutions. Formulations for subcutaneous application may include significantly higher concentrations of the polypeptide of the invention, such as up to 100 mg/ml or even above 100 mg/ml. However, it will be clear to the person skilled in the art that the ingredients and the amounts thereof as given above do only represent one, preferred option. Alternatives and variations thereof will be immediately apparent to the skilled person, or can easily be conceived starting from the above disclosure.

The polypeptides of the invention may also be administered using suitable depot, slow-release or sustained-release formulations, e.g. suitable for injection, using controlled-release devices for implantation under the skin, and/or using a dosing pump or other devices known per se for the administration of pharmaceutically active substances or principles. In addition, the polypeptides of the invention may be formulated in the form of a gel, cream, spray, drop, patch or film which, if placed on the skin, passes through the skin.

Also, compared to conventional antibodies or antibody fragments, one major advantage of the use of the polypeptides of the invention is that they can also be easily administered via routes other than parenteral administration and can be easily formulated for such administration. For example, as described in the international application WO2004/041867, such polypeptides may be formulated for oral, intranasal, intrapulmonary and transdermal administration.

According to another embodiment of the invention there is provided a pharmaceutical combination comprising at least one anti-A-beta polypeptide of the invention as disclosed herein and at least one other therapeutic agent selected from the group consisting of : cholinesterase inhibitors such as donepezil, rivastigmine, galantamine, and tacrine; NMDA antagonists such as memantine; A-beta lowering agents such as agents capable of inhibiting one or more enzymes involved in formation of A-beta, such as beta-secretase inhibitors,

gamma-secretase inhibitors and gamma-secretase modulators; agents that prevent or reduce A-beta plaque building; A-beta aggregation inhibitors; RAGE antagonists; and other agents for preventing, treating or alleviating neurodegenerative diseases and/or decline in cognitive function. Specific examples of such other therapeutic agents are: ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513,Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin (Latrepiridin), and PF-4494700. Such pharmaceutical combination may optionally additionally comprise a diluent, excipient, adjuvant and/or stabilizer.

When two or more substances or principles are to be used as part of a combined treatment regimen, they can be administered via the same route of administration or via different routes of administration, at essentially the same time or at different times (e.g. essentially simultaneously, consecutively, or according to an alternating regime). When the substances or principles are to be administered simultaneously via the same route of administration, they may be administered as different pharmaceutical formulations or compositions or part of a combined pharmaceutical formulation or composition. Also, when two or more active substances or principles are to be used as part of a combined treatment regimen, each of the substances or principles may be administered in the same amount and according to the same regimen as used when the compound or principle is used on its own, and such combined use may or may not lead to a synergistic effect. However, when the combined use of the two or more active substances or principles leads to a synergistic effect, it may also be possible to reduce the amount of one, more or all of the substances or principles to be administered, while still achieving the desired therapeutic action. This may for example be useful for avoiding, limiting or reducing any unwanted side-effects that are associated with the use of one or more of the substances or principles when they are used in their usual amounts, while still obtaining the desired pharmaceutical or therapeutic effect.

Yet a further embodiment of the invention is a method for treating the diseases and disorders as set out above, comprising administering to an individual, simultaneously, separately or sequentially, an effective amount of at least one anti-A-beta polypeptide of the invention and at least one agent selected from the group consisting of: cholinesterase inhibitors such as donepezil, rivastigmine, galantamine, and tacrine; NMDA antagonists such as memantine; A-beta lowering agents such as agents capable of inhibiting one or more enzymes involved in formation of A-beta, such as beta-secretase inhibitors, gamma-secretase inhibitors and gamma-secretase modulators; agents that prevent or reduce A-beta plaque building; A-beta aggregation inhibitors; RAGE antagonists; and other agents for preventing, treating or alleviating neurodegenerative diseases and/or decline in cognitive function, including the specific examples as set out above.

According to a further aspect of the invention, the A-beta binding polypeptide of the invention is prepared to be administered in combination with other drugs used for the treatment of the diseases and disorders set out above, such other drugs being selected from the group consisting of: cholinesterase inhibitors such as donepezil, rivastigmine, galantamine, and tacrine; NMDA antagonists such as memantine; A-beta lowering agents such as agents capable of inhibiting one or more enzymes involved in formation of A-beta, such as beta-secretase inhibitors, gamma-secretase inhibitors and gamma-secretase modulators; agents that prevent or reduce A-beta plaque building; A-beta aggregation inhibitors; RAGE antagonists; and other agents for preventing, treating or alleviating neurodegenerative diseases and/or decline in cognitive function, including the specific examples as set out above.

According to still another aspect of the invention, drugs used for the treatment of the diseases and disorders set out above, such drugs being selected from the group consisting of: cholinesterase inhibitors such as donepezil, rivastigmine, galantamine, and tacrine; NMDA antagonists such as memantine; A-beta lowering agents such as agents capable of inhibiting one or more enzymes involved in formation of A-beta, such as beta-secretase inhibitors, gamma-

secretase inhibitors and gamma-secretase modulators; agents that prevent or reduce A-beta plaque building; A-beta aggregation inhibitors; RAGE antagonists; and other agents for preventing, treating or alleviating neurodegenerative diseases and/or decline in cognitive function (including the specific examples as set out above) are prepared to be administered in combination with the A-beta binding polypeptide of the invention.

According to a further aspect of the invention, the A-beta binding polypeptide of the invention is used in combination with a device useful for the administration of the polypeptide, such as a syringe, injector pen, or other device.

According to still another embodiment of the invention, there is provided a method of diagnosing a disease, disorder or condition mediated by A-beta dysfunction and/or amyloid plaque formation comprising the steps of:
a) obtaining a sample from a subject, and
b) contacting, in vitro, the sample with a polypeptide of the invention as defined above, and
c) detecting the binding of said polypeptide to said sample, and
d) comparing the binding detected in step (c) with a standard, wherein a difference in binding relative to said sample is diagnostic of a disease, disorder or condition characterised by A-beta dysfunction and/or amyloid plaque formation.

According to another embodiment of the invention, there is provided a method of diagnosing a disease, disorder or condition mediated by A-beta dysfunction and/or amyloid plaque formation comprising the steps of:
a) obtaining a sample from a subject, and
b) contacting the sample with a polypeptide of the invention as defined above;
c) determining the amount of A-beta in the sample; and
d) comparing the amount determined in step (c) with a standard, wherein a difference in amount relative to said sample is diagnostic of a disease, disorder or condition characterised by A-beta dysfunction and/or amyloid plaque formation.

The sample may e.g. be a body fluid of the subject, such as blood or cerebrospinal fluid (CSF). The step of detecting binding of a polypeptide of the invention to A-beta or the step of determining the amount of A-beta in the sample will generally involve measuring the formation of a complex between the polypeptide and A-beta. According to different embodiments of this method, complex formation will occur in solution or after immobilization of one component on a substrate and will be followed by detection of such complexes. For this purpose, it may be useful to further modify the polypeptide of the invention, such as by introduction of a functional group that is one part of a specific binding pair, such as the biotin-(strept)avidin binding pair. Such a functional group may be used to link the polypeptide of the invention to another protein, polypeptide or chemical compound that is bound to the other half of the binding pair, i.e. through formation of the binding pair. For example, a polypeptide of the invention may be conjugated to biotin, and linked to another protein, polypeptide, compound or carrier conjugated to avidin or streptavidin. For example, such a conjugated polypeptide of the invention may be used as a reporter, for example in a diagnostic system where a detectable signal-producing agent is conjugated to avidin or streptavidin.

The above diagnostic methods can also be used for monitoring the effectiveness of a therapeutic treatment of a subject.

According to another embodiment of the invention, there is provided a kit for diagnosing a disease, disorder or condition mediated by A-beta dysfunction, and especially amyloid plaque formation and/or AD, for use in a method as defined above, such kit comprising at least one polypeptide of the invention and, optionally, one or more media, detection means and/or *in vitro* or *in vivo* imaging agents, and, further optionally, instructions of use. Suitable *in vivo* imaging agents include 99mTc, 111Indium, 123Iodine, and, for magnetic resonance imaging, paramagnetic compounds. The combination of SPECT, PET or MRI with labeled anti-A-beta polypeptides of the invention will allow 'A-beta brain scans' and individual risk assessment for each patient.

According to still another embodiment of the invention, certain A-beta binding polypeptides of the invention can be used as a research tool for the specific detection of human as well as mouse A-beta, or A-beta from other animal species, and for tests and assays relying on such detection. This may be particularly useful for tests and assays making use of animal models.

The invention further provides a kit comprising at least one A-beta binding polypeptide of the invention and, additionally, one or more other components selected from the group consisting of other drugs used for the treatment of the diseases and disorders as described above, and devices as described above.

The invention further provides methods of manufacturing an A-beta binding polypeptide of the invention, such methods generally comprising the steps of:
- culturing host cells comprising a nucleic acid capable of encoding a polypeptide of the invention (hereinafter: "nucleic acid of the invention") under conditions that allow expression of the polypeptide of the invention; and,
- recovering or isolating the polypeptide expressed by the host cells from the culture; and
- optionally further purifying and/or modifying and/or formulating the polypeptide of the invention.

A nucleic acid of the invention can be genomic DNA, cDNA or synthetic DNA (such as DNA with a codon usage that has been specifically adapted for expression in the intended host cell or host organism). According to one embodiment of the invention, the nucleic acid of the invention is in essentially isolated form, as defined hereabove.

The nucleic acid of the invention may also be in the form of, be present in and/or be part of a vector, such as for example a plasmid, cosmid or YAC, which again may be in essentially isolated form. The vector may especially be an expression vector, i.e. a vector that can provide for expression of the polypeptide *in vitro* and/or *in vivo* (e.g. in a suitable host cell, host organism and/or expression system). Such expression vector generally comprises at least one nucleic acid of

the invention that is operably linked to one or more suitable regulatory element(s), such as promoter(s), enhancer(s), terminator(s), and the like. Specific examples of such regulatory elements and other elements, such as integration factor(s), selection marker(s), signal or leader sequence(s), reporter gene(s), and the like, useful or necessary for expressing polypeptides of the invention, are disclosed e.g. on pp. 131 to 133 of WO2006/040153.

The nucleic acids of the invention can be prepared or obtained in a manner known per se (e.g. by automated DNA synthesis and/or recombinant DNA technology), based on the information on the amino acid sequences for the polypeptides of the invention given herein, and/or can be isolated from a suitable natural source.

According to another embodiment, the invention relates to a host or host cell that expresses or is capable of expressing a polypeptide of the invention; and/or that contains a nucleic acid encoding a polypeptide of the invention. According to a particularly preferred embodiment, said host cells are bacterial cells, yeast cells, fungal cells or mammalian cells.

Suitable bacterial cells include cells from gram-negative bacterial strains such as strains of *Escherichia coli*, *Proteus*, and *Pseudomonas*, and gram-positive bacterial strains such as strains of *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, and *Lactococcus.* Suitable fungal cell include cells from species of *Trichoderma*, *Neurospora*, and *Aspergillus*. Suitable yeast cells include cells from species of *Saccharomyces (*for example *Saccharomyces cerevisiae), Schizosaccharomyces* (for example *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (for example *Pichia pastoris* and *Pichia methanolica*), and *Hansenula*.

Suitable mammalian cells include for example CHO cells, BHK cells, HeLa cells, COS cells, and the like. However, amphibian cells, insect cells, plant cells, and any other cells used in the art for the expression of heterologous proteins can be used as well.

For production on industrial scale, preferred heterologous hosts for the (industrial) production of immunoglobulin single variable domain polypeptides and protein therapeutics containing them include strains of *E. coli*, *Pichia pastoris*, and *S. cerevisiae* that are suitable for large scale expression, production and fermentation, and in particular for large scale (bio-)pharmaceutical expression, production and fermentation.

The choice of the specific expression system would depend in part on the requirement for certain post-translational modifications, more specifically glycosylation. The production of a polypeptide of the invention for which glycosylation is desired or required would necessitate the use of mammalian expression hosts that have the ability to glycosylate the expressed protein. In this respect, it will be clear to the skilled person that the glycosylation pattern obtained (i.e. the kind, number and position of residues attached) will depend on the cell or cell line that is used for the expression.

Polypeptides of the invention produced in a cell as set out above can be produced either intracellullarly (e.g. in the cytosol, in the periplasma or in inclusion bodies) and then isolated from the host cells and optionally further purified; or they can be produced extracellularly (secreted into the medium in which the host cells are cultured) and then isolated from the culture medium and optionally further purified.

Further methods and reagents used for the recombinant production of polypeptides, such as suitable expression vectors, transformation or transfection methods, selection markers, methods of induction of protein expression, culture conditions, and the like, are known in the art. Similarly, protein isolation and purification techniques useful in a method of manufacture of a polypeptide of the invention are well known to the skilled person.

Production of the polypeptides of the invention through fermentation in convenient recombinant host organisms such as *E. coli* and yeast is cost-effective, as compared to conventional antibodies which also require expensive

mammalian cell culture facilities. Furthermore, achievable levels of expression are high and yields of the polypeptides of the invention are in the range of 1 to 10 g/l (E. coli) and up to 10 g/l (yeast) and more.

According to still another aspect of the invention, there are provided the immunoglobulin single variable domains as listed in Table VII below, which are useful for building up or constructing A-beta binding polypeptides of the invention. Thus, if any of the immunoglobulin single variable domains as listed in Table VII (optionally after having been humanized) will be combined (preferably in the form of one continuous polypeptide chain) with one or more other A-beta binding immunoglobulin single variable domain(s), wherein such other immunoglobulin single variable domain(s) bind(s) to a different epitope of A-beta, this will result in biparatopic A-beta binding molecules according to the invention, having useful binding characteristics, as set out in detail e.g. in Examples 9 to 11 below.

Table VII: A-beta binding immunoglobulin single variable domains

Clone	IC50 in TR-FRET (M)	melting temperature in °C	amino acid sequence	SEQ ID NO:
ABIIPMP 42D4	4.40E-08	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFSTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRTNYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRL VVGGTSVGDWRYWGQGTQVTVSS	47
ABIIPMP 111B4	5.1E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFWTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWSSGRANYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRG VVGGWVVVDWRYWGQGTQVTVSS	48
ABII111E 5cl1	8.80E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFLTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGREVQDWRYWGQGTQVTVSS	49
ABIIPMP 111C6	6.00E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFWTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRLNYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRQ VVGGVQVLDWRYWGQGTQVTVSS	50
ABIIPMP 111F2	3.40E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFSTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRTNYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTANRH SVGRLSVGDWRYWGQGSQVTVSS	51

ABIIPMP 111E4	6.10E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFSTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRTNYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAARLT VGSLSVGDWRYWGQGTQVTVSS	52
ABIIPMP 111C4	8.60E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFLTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRANYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRS VVGGVGVWDWRYWSQGTQVTVSS	53
ABIIPMP 111B5	4.40E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRNNYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRL VVGGGGVRDWRYWGQGTQVTVSS	54
ABIIPMP 111B9	1.90E-08	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFGTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRANYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGGCVKDWRYWGQGTQVTVSS	55
ABII111B 5_R30K	5.30E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFKTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGNMVEDWRYWGQGTQVTVSS	56
ABII111B 5_R30W	5.00E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFWTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGNMVEDWRYWGQGTQVTVSS	57
ABII111B 5_N106T	9.20E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGTMVEDWRYWGQGTQVTVSS	58
ABII111B 5_N106V	1.00E-08	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGVMVEDWRYWGQGTQVTVSS	59
ABII111B 5_F101W	7.30E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRWV VGGNMVEDWRYWGQGTQVTVSS	60
ABII111B 5_M107E	4.30E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGNEVEDWRYWGQGTQVTVSS	61
ABII111B 5_M107R = ABII002	2.90E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTQVTVSS	62
ABII111B 5_E109W	4.70E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGNMVWDWRYWGQGTQVTVSS	63
ABII111B 5_E109Q	3.70E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRF TVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGNMVQDWRYWGQGTQVTVSS	64
ABII003	2.10E-09	51.1	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM	65

			GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	
ABII004	2.10E-09	56	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	66
ABII005	3.30E-09	48.2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	67
ABII006	8.00E-08	51.7	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVASGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	68
ABII007	1.60E-09	53.2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	69
ABII008	1.90E-09	51.9	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNSRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	70
ABII009	1.70E-09	52.2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTKNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	71
ABII010	1.90E-09	54.8	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNTAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	72
ABII011	2.40E-08	54.6	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNALYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	73
ABII012	1.50E-09	53.5	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMNGLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	74
ABII013	1.60E-09	52.2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSSLKDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	75
ABII014	1.30E-09	52.3	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLRDEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	76
ABII015	1.80E-09	55.5	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKAEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	77
ABII016	2.40E-09	57.9	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR	78

			FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKPEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	
ABII017	2.40E-09	59.4	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCAAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	79
ABII018	3.20E-09	60.1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTVSRDNTRNAAYLQMSGLKPEDTAVYYCTAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	80
ABII019	1.40E-08	71.6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	81
ABII020	1.10E-07	69.8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	82
ABII021	2.40E-08	69.9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	83
ABII022	1.60E-08	68.6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAVYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	84
ABII023	5.80E-09	64.7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	85
ABII024	6.00E-09	63.6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAAYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	86
ABII025	1.80E-08	70.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	87
ABII026	5.10E-09	66.8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	88
ABII027	4.40E-09	65.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTAYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	89
ABII028	1.10E-08	73.8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	90
ABII029	8.90E-08	74.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV	91

			VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	
ABII030	1.20E-08	73.7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	92
ABII031	1.30E-08	72.1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAVYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	93
ABII032	4.90E-09	68.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	94
ABII033	4.00E-09	66.2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNAAYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	95
ABII034	1.00E-08	72.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	96
ABII035	4.00E-09	68.7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	97
ABII036	3.50E-09	67.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTAYLQMSSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	98
ABII037	3.10E-09	66.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHRFV VGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	99
ABII60A10 = ABII050	1.90E-08	68.5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKEREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRF TISRDNAKNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGAAYRGT AINVRRSYDSWGQGTQVTVSS	100
ABII051	1.80E-08	66.2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNAKNAVYLQMNSLRPEDTAIYYCGAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	101
ABII052	1.90E-08	66.1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNAVYLQMNSLRPEDTAIYYCGAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	102
ABII053	2.00E-08	67.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCGAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	103
ABII054	5.10E-08	62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNAKNALYLQMNSLRPEDTAIYYCGAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	104

ABII055	2.20E-08	66.2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNAKNAVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	105
ABII056	2.90E-08	69.8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNAKNAVYLQMNSLRPEDTAIYYCAAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	106
ABII057	4.60E-08	71.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	107
ABII058	7.30E-08	68.9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRG TAINVRRSYDSWGQGTLVTVSS	108
ABII059	3.30E-08	72.7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRG TAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	109
ABII060	5.00E-08	69.2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRG TAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	110
ABII061	2.40E-09	69.3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNM GWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCGAAYRG TAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	111

EXAMPLES

Example 1: Immunization of llamas with A-beta for the induction of humoral immune responses

Generation of monomeric A-beta peptide (BAM): Monomeric A-beta peptide (BAM) is prepared via trifluoroacetic acid (TFA; Sigma)/1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFIP; Fluka) treatment. The lyophilized A-beta peptide is dissolved in its original vial in 100% TFA to a final concentration of 1 mg/ml. The solution is then evaporated in a speedvac at room temperature. After this and all subsequent evaporation steps the remaining pellet is placed on ice. The pellet is resuspended in HFIP and again evaporated in a speedvac at room temperature followed by another HFIP solubilization after which the solution is divided into

aliquots of appropriate volumes. The aliquots are evaporated in a speedvac at room temperature and the pellets are stored at -80°C. Immediately before use, the TFA/HFIP treated A-beta peptide aliquot is dissolved in 100% DMSO via repeated up and down pipetting. The A-beta peptide solution is centrifuged at 14000rpm for 10 minutes to remove possible aggregates and the supernatant is used in the different assays.

Immunization of llamas: Llamas are immunized with aggregated A-beta peptides (BAA) and oligomeric A-beta peptides (BAO) by injecting the immunogens intramuscularly in the neck area applying decreasing doses over time. BAA consist of a mixture of synthetic A-beta(1-40) and A-beta(1-42) peptides which are prepared essentially as described by Schenk et al., 1999, Nature 400: 173-177. BAO are prepared essentially as described by Kayed et al. (2003), Science 300:486-489. The first two antigen injections consist each time of 100µg of antigen per llama, while for all following administrations, the dose is reduced to 50µg per llama. Llamas 144 and 145 are vaccinated with freshly prepared BAA. In total, nine BAA antigen doses are injected as an emulsion using Freund's Complete Adjuvant (first injection) or Stimune (all following immunogen boosts) in intervals of maximally 16 days. Llamas 129, 130, 177 and 178 are vaccinated with BAO. In total, six to nine BAO antigen doses are injected, as an emulsion using Freund's Complete (first injection) and Freund's Incomplete Adjuvant or Stimune (all following antigen boosts) in intervals of maximally 18 days. Llamas are also immunized with A-beta peptide fragment 1-16 conjugated to bovine serum albuming (BSA; llamas 181 and 186) or A-beta peptide fragment 1-30 conjugated to BSA (llamas 185 and 187). Four antigen injections are administered in 14-day intervals, using Freund's Complete or Freund's Incomplete adjuvant with antigen doses decreasing from 100µg (first two injections) to 50µg (two following injections) per llama. Immediately before the start of each immunization scheme a pre-immune serum sample and at regular time points during the immunization experiment multiple immune serum samples are collected to evaluate the A-beta peptide specific humoral response of the distinct animals.

To monitor the A-beta peptide specific serum titers via ELISA, 2 µg/ml A-beta(1-40), biotinylated at the C-terminus (Anaspec), is immobilised for two hours at room temperature on a Neutravidin-coated (0.2-0.5 µg per well) 96-well Maxisorp plate (Nunc). Wells are blocked with a casein solution (1% in PBS). After addition of a dilution series of pre-immune and immune serum samples, specifically bound llama immunoglobulins are detected using a goat anti-llama horseradish peroxidase conjugate (Bethyl Lab. Inc.), allowing to detect the humoral response mediated by both the conventional and heavy-chain only antibodies. In certain cases, a consecutive ELISA is performed to evaluate specifically the heavy-chain antibody mediated response via detection with mouse mAbs specifically recognizing the heavy-chain only llama IgG2 and IgG3 antibodies (Daley et al., 2005, Clin. Diagn. Lab. Imm. 12:380-386), followed by a rabbit anti-mouse-HRP conjugate (DAKO). ELISAs are developed using TMB (Promega) as the chromogenic substrate and absorbance is measured at 450nm. For all four immunogen formats (BAA, BAO, A-beta(1-16)-BSA and A-beta(1-30)-BSA) both conventional and heavy-chain antibody mediated immune responses specific to (biotinylated) monomeric A-beta(1-40) are detected. Serum samples that are positive against monomeric A-beta(1-40) are also positive when tested against BAA directly coated onto a Maxisorp plate, suggesting the presence of at least partially common epitopes in the monomeric A-beta and BAA preparations used.

Example 2: Isolation of A-beta binding VHH domains (VHHs) from immunized llamas

Cloning of the heavy-chain only antibody fragment repertoires: Following the final immunogen injection, immune tissues as the source of the B-cells producing the heavy-chain antibodies are collected from the immunized llamas. Typically, two 150-ml blood samples, are collected 4 and 8 days after the last antigen injection and one lymph node biopsy, collected 4 days after the last antigen injection are collected per animal. From the blood samples, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are prepared using Ficoll-Hypaque according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences). From the PBMCs and the lymph node biopsy, total RNA is extracted, which are used as starting material for

RT-PCR to amplify the VHH encoding gene segments (formerly described in WO2005/044858). For each immunized llama, a library is constructed by pooling the total RNA isolated from all collected immune tissues of that animal. In short, the PCR-amplified VHH repertoire is cloned via specific restriction sites into a vector designed to facilitate phage display of the VHH library. The vector is derived from pUC119 and contained the LacZ promoter, a M13 phage gIII protein coding sequence, a resistance gene for ampicillin or carbenicillin, a multiple cloning site and a hybrid gIII-pelB leader sequence (pAX050). In frame with the VHH coding sequence, the vector encodes for a C-terminal c-myc tag and a $(His)_6$ tag. Phage are prepared according to standard protocols and are stored after filter sterilization at 4ºC for further use.

Selection of A-beta specific VHHs via phage display: VHH repertoires obtained from all llamas and cloned as phage library are used in different selection strategies applying a multiplicity of selection conditions. Variables include:
i) the A-beta peptide format (A-beta(1-40) C- or N-terminally biotinylated, A-beta(1-16) C-terminally biotinylated, A-beta(1-30) N-terminally biotinylated and glutathione-S-transferase (GST) fusions such as A-beta(1-42)-GST, A-beta(1-10)-GST or GST-A-beta(1-42)),
ii) the A-beta peptide aggregation status (monomeric A-beta, BAO or BAA),
iii) the antigen presentation method (solid phase: directly coated or via a biotin-tag onto Neutravidin-coated plates; solution phase: incubation in solution followed by capturing on Neutravidin-coated plates),
iv) the antigen concentration and
v) different elution methods (trypsin or TEA).

Selections are performed as follows: antigen preparations for solid and solution phase selection formats are presented as described above at multiple concentrations. After 2h incubation with the phage libraries followed by extensive washing, bound phage are eluted with trypsin (1 mg/ml) or TEA for 15 minutes. In case trypsin is used for phage elution, the protease activity is immediately neutralized applying 0.8mM protease inhibitor ABSF. As control, selections w/o antigen are performed in parallel. Phage outputs that show enrichment over

background (non-antigen control) are used to infect *E .coli*. Infected *E. coli* cells are either used to prepare phage for the next selection round (phage rescue) or are plated on agar plates (LB + Amp + 2% glucose) for analysis of individual VHH clones. In order to screen a selection output for specific binders, single colonies are picked from the agar plates and grown in 1-ml 96-deep-well plates. The placZ controlled VHH expression is induced by adding IPTG (0.1-1mM final) in absence of glucose. Periplasmic extracts (in a volume of ~ 80 μl) are prepared according to standard methods.

Screening of periplasmic extracts for binding to A-beta: 2 μg/ml A-beta(1-40), biotinylated at the C-terminus (Anaspec), is captured for two hours at room temperature on a Neutravidin-coated (0.2-0.5 μg per well) 96-well Maxisorp plate (Nunc). Wells are blocked with a casein solution (1% in PBS). After addition of typically a 10-fold dilution of the periplasmic extracts, VHH binding is detected using a mouse anti-myc and an anti-mouse-HRP conjugate (DAKO). Clones that give an ELISA signal of minimally two-fold above background are retained for sequence analysis. VHHs that are able to bind (biotinylated) monomeric A-beta(1-40) can be allocated to 16 different B-cell lineages. Clones derived from the same B-cell lineage share a highly similar CDR3 sequence and are thus likely to recognize the same epitope. Table VIII summarizes the selection parameters that leads to the identification of a representative VHH of each of the 16 B-cell lineages. In Table IX, the amino acid sequences of the VHHs listed in Table VIII are shown.

Table VIII: Selection parameters are used for the identification of A-beta specific VHH B-cell lineages

VHH ID	**Library**	**Selection format (immobilized or captured A-beta peptide concentration)**	**Phage elution**	**Rounds of selection**
ABII1E11	130	BAA (200ng)	trypsin	2
ABII5D2	145	BAA (200ng)	trypsin	1
ABII14D4	130	BAA (200-40ng)	trypsin	2
ABII35C7	Pool of 144,	A-beta(1-42)GST and GST-A-beta(1-42)	TEA	2

	145, 129, 130	(10µg/well)		
ABII35D2	Pool of 144, 145, 129, 130	A-beta(1-42)-GST and GST-A-beta(1-42) (10µg/well)	TEA	2
ABII35G2	Pool of 144, 145, 129, 130	A-beta(1-42)GST and GST-A-beta(1-42) (10µg/well)	TEA	2
ABII42D4	178	biotinylated A-beta(1-40) (100nM)	trypsin	2
ABII42B10	178	biotinylated A-beta(1-40) (10nM)	trypsin	2
ABII42F5	178	biotinylated A-beta(1-40) (100nM)	trypsin	2
ABII42E10	178	biotinylated A-beta(1-40) (10nM)	trypsin	2
ABII42G10	178	biotinylated A-beta(1-40) (10nM)	trypsin	2
ABII60A10	185	Round I: BAA (200ng) Round II: biotinylated A-beta(1-40) (1nM)	trypsin	2
ABII60D2	181	Round I: BAA (200ng) Round II: biotinylated A-beta(1-40) (10nM)	trypsin	2
ABII60G11	185	Round I: BAA (200ng) Round II: biotinylated A-beta(1-40) (1nM)	trypsin	2
ABII60H5	181	Round I: BAA (200ng) Round II: biotinylated A-beta(1-40) (1nM)	trypsin	2
ABII61F6	187	Round I: BAA (200ng) Round II: biotinylated A-beta(1-40) (10nM)	trypsin	2

Table IX: Amino acid sequencs of resulting representative VHHs:

VHH ID	**Wild type monovalent A-beta binding VHHs**	**SEQ ID NO:**
ABII1E11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYNMGWFHQAPGKEREIVA AISRSGRSTYYTVSVEGRFTISRDNAKNTVDLEMNSLKPEDTGIYYCAANS AGRAINLPLYKYWGQGTQVTVSS	112
ABII14D4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYNMAWFRHAPGKEREFVA AISRSGGSTYYVDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAAP RGRSIVTTATYDYWGQGTQVTVSS	113
ABII5D2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWVRQAPGKERELVA TISQSGGLRSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTPGDTAVYYCAAQA RATAWSPQRVDYWGQGTQVTVSS	114
ABII35C7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSIYNMGWFRQAPGKEREFVA AISRSGSSTYYGDSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKPEDTAVYHCAAAR FGTPINTRGSYDYWGQGTQVTVSS	115
ABII35D2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWFRQAPGKEREFVA AISRSGGSTYYTDSVKGRFTISRDSSKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAAL FGSAINLLSEYRYWGQGTQVTVSS	116
ABII35G2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSNYGMGWFRQAPGKDREFV AAISRSGGTTYYEDDVKGRFTISRDNAKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAR PSYVAVNIAASYNNWGQGTQVTVSS	117
ABII42D4	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFSTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRTNYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRLVVGGTSVGDWRYWGQGTQVTVSS	118

ABII42B10	EVQLVESGGGLVQRGGSLRLSCAASGRTFSNLNMGWFRQAPGKEREFQ AAISRSGGTTYYADSVKGRFTISRDNAKSTVFLQMNSLKPEDTAVYYCAAA SPGGPINYGRAYDSWGQGTQVTVSS	119
ABII42F5	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRTFTDYNIGWFCQAPGKEREFVAA ISGSGGSTYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYACAAAQ RRLAVNVDTSYNVWGQGTQVTVSS	120
ABII42E10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFTLYTMGWFRQAPGKEREFVA AISASGGTTYYADSVKGRFALSRDNAKNTVFLQMNTLKPEDTAEYLCAAAF RGFAINTPTSYNYWGQGTQVTVSS	121
ABII42G10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLFSGRTFSTNGVGWFRQVPGKEREFVS AINWSGSKTNYAEPVKGRFTISRDNAKNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAAY RTSISRYEYAYWGQGTQVTVSS	122
ABII60A10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKEREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNAKNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGAA YRGTAINVRRSYDSWGQGTQVTVSS	123
ABII60G11	EVQLVESGGGSEQAGGSLRLSCATSGRAFSVYAWFRQAPGKERTFVAAV AWVGGSTFYSDSVKGRFTISRDNAKNTVFLHMNSLKPEDTAAYYCAARLY GGRWYNSPRVDDFEYWGQGTQVTVSS	124
ABII60D2	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAYSGSIFSIKTMGWYRQAPGKQRELVG RITSGDSTNYADSVKGRFTISRDKAKTTVYLQMNNLKPEDTAVYYCAARRP WPRSDVWGQGTQVTVSS	125
ABII60H5	EVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCAASGNIGSINAMGWYRQAPGKEREWVA IITNSGSVNYGPDSVKGRFTISGDNAKNRVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAES WGRSPLKYLGQGTQVTVSS	126
ABII61F6	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGSTVNINAMGWYRQAPGKQRELVAI INKRGVTNYADSTEGRFTISRDNSKRTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNAVVGR YGRTYGYWGQGTQVTVSS	127

The total number of variants (minimally 1 amino acid difference) found for each B-cell lineage is 1 (ABII5D2), 195 (ABII42D4), 1 (ABII42G10), 1 (ABII60D2), 1 (ABII60H5), 23 (ABII1E11), 3 (ABII14D4), 3 (ABII35C7), 6 (ABII35G2), 1 (ABII35D2), 7 (ABII42B10), 2 (ABII42F5), 3 (ABII42E10), 2 (ABII60A10), 2 (ABII60G11) and 15 (ABII61F6).

To identify the B-cell lineage variant with the best binding properties, periplasmic extracts of all VHH variants were used to determine the off-rate (Biacore T100, GE Healthcare). Monomeric A-beta(1-40) (biotinylated at the C-terminus; Anaspec), monomeric A-beta(1-16) (biotinylated at the C-terminus; Bachem) and monomeric A-beta(12-28) (biotinylated at the N-terminus; Bachem), is prepared as described in Example 1, are irreversibly captured via streptavidin on three different channels of the same SA sensor chip (GE Healthcare). Surfaces are first washed via 3x 1-minute injections of surface wash buffer (1M NaCl in 50mM NaOH) followed by injecting biotinylated A-beta at 50 nM up to a target level of

100 RU. After capturing, surfaces are blocked by injecting an excess (200 µg/ml) of d-biotin for 180s at 5µl/min. A reference surface is washed and blocked with d-biotin. HBS-EP+ buffer is used as the running buffer and experiments are performed at 25°C. For off-rate screening, periplasmic extracts of VHHs are injected at a 10-fold dilution for 2 min at 45µl/min and are allowed to dissociate for 10 min. Purified reference binders (VHHs at 100 nM, 3D6 Fab at 10 nM) are injected as positive control samples and evaluated at least at the beginning and at the end of each experiment. Between different VHH samples, the surfaces are regenerated with regeneration buffer (50 mM NaOH) for 25s at 45µl/min followed by 10s 6M GuHCl at 45µl/min if regeneration is incomplete. Off-rates are calculated from the sensorgrams obtained from the channel with captured biotinylated A-beta(1-40). The variants of only two VHH B-cell lineages, ABII42D4 and ABII60G11, showed a monophasic binding pattern and allowed the calculation of off-rates via a 1:1 interaction model: 6.1E-3 s^{-1} and 2.7E-2 s^{-1}, respectively. For all other VHH B-cell lineages, 2 different sections of the dissociation curve are fitted separately, rendering a k_{d1} (calculated from the dissociation frame between 125 and 160s) and a k_{d2} (400s-700s). Data are double referenced by subtraction of the curves on the reference channel and of a blank running buffer injection. Sensorgrams are evaluated by fitting a 1:1 dissociation model using the Biacore T100 Evaluation software v1.1.1. Although binding of VHHs ABII60D2 and ABII60H5 to A-beta is observed in the screening ELISA, these VHHs show poor binding to the sensor chip.

For studying binding characteristics of monovalent non-VHH binders, Fab fragments of monoclonal antibodies m266 and 3D6 are used. Monoclonal antibody 3D6 is described in Johnson-Wood et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94:1550-1555 and in Bard et al., 2000, Nature Medicine 6:916-919 and specifically binds to amino acid residues 1 to 5 of A-beta (N-terminal epitope). Monoclonal antibody m266 is described in Seubert et al., 1992, Nature 359:325-327 and specifically binds to amino acid residues 16 to 24 of A-beta (central epitope of A-beta). Fab fragments, comprising the variable light chain (V_L), variable heavy chain (V_H), constant light chain (C_L) and constant domain 1 of the heavy chain (CH_1) of the respective antibody (sequences as given below) and,

additionally, a C-terminal c-myc tag and a hexa-histidine ($(His)_6$ tag) are cloned, expressed and purified according to conventional techniques, using *E.coli* as the host organism and immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC) for purification. Purified Fab fragments of m266 and 3D6 show, in the above-described binding experiment, off-rates of 4.0E-5 s^{-1} and 4.7E-4 s^{-1}, respectively.

VL- and VH-sequences of Fab fragment of 3D6:

VL:
YVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYL VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRIEAEDLGLYYCWQGTHFPRTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO:128)

VH:
EVKLVESGGGLVKPGASLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQNSDKRLEWVASIRS GGGRTYYSDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCVRYDHYSGSS DYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:129)

VL- and VH-sequences of Fab fragment of m266:

VL:
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLIYSDGNAYLHWFLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVETEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO:130)

VH:
EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTFSRYSMSWVRQTPEKRLELVAQINS VGNSTYYPDTVKGRFTISRDNAEYTLSLQMSGLRSDDTATYYCASGDYWGQGT TLTVSS (SEQ ID NO:131)

Example 3: Characterization of purified VHHs

The VHH variants with the slowest dissociation rates for each B-cell lineage are recloned into an expression vector derived from pUC119, which contains the LacZ promoter, a resistance gene for either ampicillin or kanamycin, a multiple cloning site and a hybrid gIII-pelB leader sequence. In frame with the VHH coding sequence, the vector encodes for a C-terminal c-myc tag and a $(His)_6$ tag. VHHs are produced in *E.coli* TG1 and are purified via immobilized metal affinity

chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC) resulting in 95% purity as assessed via SDS-PAGE.

3.1 VHH binding to immobilized A-beta (ELISA): To quantify the binding of the VHHs to monomeric A-beta peptide (BAM), VHHs are applied as dilution series in an ELISA using the same setup as described in Example 2. Except for VHHs ABII60D2 and ABII60H5, EC50 values can be calculated and are summarized in Table X. The most potent VHHs interacting with the N-terminal epitope of A-beta (amino acids 1 to 16) or the central epitope of A-beta (amino acids 12 to 28) are determined to be ABII42D4 (EC50 of 14.2 nM) and ABII60A10 (EC50 of 4.9 nM), respectively.

VHHs that give detectable signals against BAM are tested for binding to A-beta peptide aggregates (BAA) in ELISA, applying a similar set-up as described in Example 2. Antigen is prepared and immobilized as described in Bohrmann et al., 1999, J Biol Chem 274: 15990-15995. In short, 100µl of 10µg/ml of A-beta(1-40) diluted in TBS buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7.4 and 0.05% Na-azide) from a DMSO stock solution of 2mg/ml synthetic A-beta(1-40) (Bachem) is allowed to aggregate for 60h at 37°C. All VHHs that recognize BAM also recognize BAA and the respective EC50 values are summarized in Table X.

Table X: EC50 values for purified VHHs in BAM and BAA ELISA

VHH B-cell lineage	**Epitope**	**BAM ELISA EC50 in nM**	**BAA ELISA EC50 in nM**	**TR-FRET IC50 in nM**
ABII1E11	12-28	27.3	19.2	844*
ABII5D2	1-16	54.1	11.7	>1000
ABII14D4	12-28	124	6.8	744
ABII35C7	12-28	1.9	1.3	206*
ABII35G2	12-28	10.7	5.4	645*
ABII35D2	12-28	37.5	12.8	773*
ABII42D4	1-16	14.2	0.9	46.8
ABII42B10	12-28	10.8	2.1	85.6
ABII42F5	12-28	41.1	20.0	228*
ABII42E10	12-28	17.5	2.6	205*

ABII42G10	1-16	87.0	49.5	>1000
ABII60A10	12-28	4.9	0.8	11.1
ABII60G11	12-28	187	6.0	34.4
ABII60D2	1-16	>1µM	ND	ND
ABII60H5	1-16	>1µM	ND	ND
ABII61F6	12-28	469	14.5	967*
2D2	12-28	15.8	4.7	404*
2G6	1-16	98.6	7.2	>1000
Fab266	16-24*	1.8	1.8	0.52
Fab3D6	1-5*	1.8	0.3	3.4

ND: not determined; *: IC50 calculated from extrapolated curves

3.2 VHH binding to A-beta in solution (TR-FRET): Interaction of anti-A-beta VHHs and A-beta peptide in solution are evaluated using a Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) competition assay. In two different setups, competition with either the A-beta(1-40) peptide – ABII42D4 interaction (N-terminal region specific) or with the A-beta(1-40) – ABII60A10 interaction (central region specific) are tested. For the assay monomeric A-beta(1-40) (biotinylated at the C-terminus; Anaspec) labeled with streptavidin-Europium chelate and VHHs ABII42D4 or ABII60A10 labeled with AlexaFluor647 are incubated for 1h with different concentrations of a non-labeled competitor (VHH, IgG or Fab). The labeled compounds are used at concentrations of 0.2 nM (A-beta(1-40)), 50 nM (ABII42D4) and 10nM (ABII60A10), respectively and the fluorescence signal emitted upon binding interaction is detected at 665nm. IC50 values are determined in the ABII42D4 and ABII60A10 TR-FRET assays resulting in the following potency ranking for N-terminal region specific binders tested: monoclonal antibody 3D6 (2.5nM) > Fab fragment 3D6 (3.4nM) > ABII42D4 (46.8nM) > ABII5D2 = 42G10 (>1000nM). The most potent central-region specific VHH identified via this assay was ABII60A10, shows an IC50 of 11.1 nM while benchmark antibodies gave IC50s of 0.50nM (monoclonal antibody m266) and 0.52nM (Fab fragment of m266).

For comparative reasons, anti-A-beta VHHs as disclosed previously (the "reference VHHs") are generated and purified as described above, using the

sequence information as available from the international patent publications indicated below:

VHHs 2D2 and 2G6: WO2006/40153;

VHHs 3A, 1B, 11G, 4D, and 8B: WO2007/35092; and

VHH 31-1: WO2004/44204.

Amino acid sequences thereof are shown in Table XI.

Table XI: Amino acid sequences of reference VHHs

VHH ID	A-beta binding reference VHHs	SEQ ID NO:
2D2	AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGGTFSSIGMGWFRQAP GKEREFVGAISRSGDSTYYADSVKGRFTISRDGAKNTVYLQM NSLKDEDTAVYYCAGRPAGTAINIRRSYNYWGQGTQVTVSS	132
2G6	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRQAP GKGLEWVSTISPRAANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMN SLEPDDTALYYCAKSLRYRDRPQSSDFLFWRQGTQVTVSS	133
3A	AVQLVESGGGLVRDGDSLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAP GKEREFVAAIGWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCASAPTRWVPRDSRFYDRWGQGTRVTVSS	134
1B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTLDYYSIAWFRQAPG KEREGVSCISSYDGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAIYYCAAGIRDWATLREYEYDDWGQGTQVTVSS	135
11G	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINTMAWYRQAPG KERDLVAAIISSGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLK LEDTAVYYCNAAIRRSVIDAWGAYWGQGTQVTVSS	136
4D	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAP GKEREFVATIRWNGDYADSVRDRFTISRDDAKNTVFLQMNSL KPEDTAIYYCAARLGPRTSQAALYRYWGQGTQVTVSS	137
8B	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAP GKEREFVAAIGWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCASAPTRWVPRDSRFYDRWGQGTRVTVSS	138
31-1	AEVQLQASGGGSVQPGGSLRLSCAASGFIFGWSTMSWVRQA PGKGLEWVSTISGGGSATTYTDSVKGRFTISRDRAKNTLYLQM NSLKPEDTAIYYCNADVSTGFRYQRKDYWGRGTQVTVSS	139

Compared to the reference VHHs 2G6 (N-terminal region specific) and 2D2 (central-region specific), VHHs 42D4 and 60A10 show ≥ 21fold and 36fold improved IC50s, respectively (cf. Table X).

3.3 Determination of the affinity of A-beta peptide – VHH interaction: Affinities for the A-beta peptide – VHH/Fab interaction are determined via surface plasmon

resonance (Biacore) using C-terminally biotinylated A-beta(1-40) captured on a streptavidin sensor chip as described before (Example 2). Purified VHHs or Fab fragments are injected at 5 different concentrations (between 2.5 and 300 nM for ABII42D4 and ABII60A10) for 2 min and allowed to dissociate for 10 min. For ABII42D4 but not for ABII60A10 association and dissociation curves can be fitted using a 1:1 interaction model (Langmuir binding) and an accurate K_D value can be determined. The affinities are found to be 16nM for VHH ABII42D4, 5.1nM for the Fab fragment of 3D6, and 0.3nM for the Fab fragment of m266, respectively.

3.4 Epitope mapping via surface plasmon resonance: Binding specificity of the VHHs are determined via surface plasmon resonance (Biacore) using A-beta(1-16) (biotinylated at the C-terminus; Bachem) and A-beta(12-28) (biotinylated at the N-terminus; Bachem) peptides are captured on a streptavidin sensor chip as described before. Five of the VHHs listed in Table IX above are found to interact with the N-terminal region of the Abeta peptide (ABII5D2, ABII42D4, ABII42G10, ABII60D2 and ABII60H5), and 11 VHHs are found to interact with the central region (ABII1E11, ABII14D4, ABII35C7, ABII35G2, ABII35D2, ABII42B10, ABII42F5, ABII42E10, ABII60A10, ABII60G11 and ABII61F6; cf. Table X).

3.5 In vitro A-beta aggregation assay: VHHs are tested in an in vitro A-beta aggregation assay to assess whether aggregation can be inhibited or reduced. In vitro A-beta aggregation is measured using Thioflavin T (ThT) fluorescence, which undergoes a typical red shift upon A-beta fibril formation (Levine, H. 1993. Protein Science (2): 404-410). For the assay, stock solutions of synthetic A-beta(1-40) (Bachem) in 100% DMSO and ThT in 25 mM glycine-NaOH pH8.5 is prepared and stored at -20°C. Before usage, the A-beta(1-40) stock solution is diluted to 56 µM in aggregation buffer (50 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl pH5, 0.02% NaN3). Fab fragments and VHHs are tested as dilution series in D-PBS using concentrations between 56 and 7 µM. Equal volumes (20 µl) of the 56 µM A-beta(1-40) solution and the antibody/VHH samples or appropriate negative control are mixed (in triplicate) and mixtures are incubated in low adhesion microcentrifuge tubes for 48 hours at 37°C in a dark environment. After transfer of 30 µl of the incubated samples into a black 96-well flat bottom polypropylene

plate (Greiner Bio-One), 250 µl of 2.5 µM ThT (stock solution diluted into 25 mM glycine-NaOH) solution are added and the fluorescence signal is measured (Envision, PerkinElmer). The maximum fluorescence signal of A-beta(1-40) measured in the absence of competitor is set as 100% aggregation (or 0 % inhibition). The maximum inhibition at the highest VHH concentration tested (28 µM) is calculated as an average of at least two independent experiments. While a consistent background inhibition of approximately 25 % is detected for a non-related (non-A-beta specific) VHH, monovalent Fab fragments 3D6 and 266 show a reproducible dose-dependent inhibition with maximal inhibition of 79 and 85%, respectively. Out of the panel of VHHs tested, 14D4, 35C7, 35G2, 35D2, 42B10, 42F5, 42E10 and 60A10 show a consistent inhibition of 78, 82, 76, 73, 77, 79, 75 and 80% of peptide aggregation, respectively (higher than the 25% background inhibition induced by the non-specific control VHH).

Example 4: Affinity maturation of VHHs

VHH ABII42D4 is subjected to two cycles of affinity maturation. In a first cycle, individual CDR residues are mutated to all other 19 amino acids. The following residues are targeted: CDR1: G26-G35; CDR2: V51-N58; and CDR3: H95-Y102 (numbering according to Kabat). Mutagenesis is performed in a PCR-based approach using degenerate oligonucleotides containing a NNS codon at the mutated position. PCR products are pooled for each CDR and inserted via unique restriction sites into the ABII42D4 gene template. Individual mutants are produced as recombinant protein using an expression vector derived from pUC119, which contain the LacZ promoter, a resistance gene for kanamycin, a multiple cloning site and an ompA leader sequence (pAX100). *E. coli* TG1 cells are transformed with the expression vector library and plated on agar plates (LB + Amp + 2% glucose). Single colonies are picked from the agar plates and grown in 1-ml 96-deep-well plates. VHH expression is induced by adding IPTG (1mM). Periplasmic extracts (in a volume of ~ 80 µl) are prepared according to standard methods and screened for binding to A-beta(1-40) in ELISA and in a Biacore off-

rate assay as described before (Example 2). Mutations at six positions (S30, T57, L97, T100b, S100c, G100e) result in slightly (~2fold) improved off-rates.

In a second cycle, a combinatorial library is created by simultaneously randomising the six susceptible positions identified in cycle one. For this, the full length ABII42D4 gene is synthesized by overlap PCR using oligonucleotides degenerated (NNS) at the randomisation positions and a rescue PCR is performed. The randomised ABII42D4 genes are inserted into a phage display vector (pAX50) yielding a functional library size of 6x10E7. Phages are prepared according to standard protocols. The phage library is subjected to three rounds of solution phase selection against (biotinylated) monomeric A-beta(1-40) using streptavidin-coated magnetic beads (Dynal) for the capturing step. The antigen concentration is decreased 10fold at each round starting from an antigen concentration of 50nM at round one. Bound phages are eluted with trypsin (1 mg/ml) for 30 minutes and phage outputs are infected into *E. coli* TG1 for preparation of periplasmic extracts of individual VHH clones. Screening for binding to A-beta(1-40) in ELISA and in a Biacore off-rate assay (Example 2) identifies clones with up to 10fold improved off-rates. The best ABII42D4 variants are cloned into expression vector pAX100 in frame with a C-terminal c-myc tag and a (His)6 tag. VHHs are produced in *E.coli* as His6-tagged proteins and purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and size exclusion chromatography (SEC). The affinities of the purified VHHs are determined via surface Plasmon resonance (Biacore) and IC50 values are determined in the ABII42D4 TR-FRET competition assay (Example 3.2).

In an attempt to further improve the binding affinity, variant ABIIPMP111B5 is used as template and divergent mutations found in clones ABIIPMP111E4 and ABIIPMP111B4 are introduced one by one. The resulting variants are produced in *E. coli* and characterized as described before. ABII111B5_M107R, ABII111B5_M107E and ABII111B5_E109Q are identified as the best variants with both, IC50 and K_D, being more than 10fold improved over original ABII42D4. Sequence information and biological data for the variants mentioned above are summarized in Table VII above (first line: 42D4; lines 2 to 9: useful clones

resulting from first two cycles of affinity maturation; lines 10 to 18: useful clones resulting from additional targeted mutations).

Example 5: Humanization of VHHs

The amino acid sequences of the anti-A-beta VHH ABII111B5_M107R (= ABII002; SEQ ID NO: 62) and of the anti-A-beta VHH ABII60A10 (= ABII050; SEQ ID NO:100) are blasted against the human germline V_H sequence database. The human germline VH3-23 sequence (DP47; SEQ ID NO: 140) in combination with JH5 showed the highest sequence identity to both VHH sequences.

Sequence DP-47/VH3-23:
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (SEQ ID NO:140)

Sequence JH5:
NWFDSWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:153)

17 and 10 amino acid residues of ABII002 and ABII050, respectively, were substituted for humanization purposes creating a number of different variants of each VHH. All variants were assembled from oligonucleotides using a PCR overlap extension method, cloned into an expression vector (pAX100) and produced in *E.coli*. The sequence information and binding data for the obtained variants of ABII002, i.e. ABII003 to ABII037, and for the obtained variants of ABII0050, i.e. ABII051 to ABII061, are summarized in Table VII above (lines 19 to 53 and lines 55 to the last line 65, respectively). Table XII additionally lists the degree of humanization of ABII002 to ABII036 and ABII050 to ABII060.

Table XII: Humanized variants of ABII002 and ABII050

Clone name	% humanization	T_m (°C)	Mean IC50 in TR-FRET (M)
ABII002	77.8	57.5	2.0E-09

ABII003	81.8	51.1	2.1E-09
ABII004	82.8	56.0	2.1E-09
ABII005	82.8	48.2	3.3E-09
ABII006	82.8	51.7	8.0E-08
ABII007	82.8	53.2	1.6E-09
ABII008	82.8	51.9	1.9E-09
ABII009	82.8	52.2	1.7E-09
ABII010	82.8	54.8	1.9E-09
ABII011	82.8	54.6	2.4E-08
ABII012	82.8	53.5	1.5E-09
ABII013	82.8	52.2	1.6E-09
ABII014	82.8	52.3	1.3E-09
ABII015	82.8	55.5	1.8E-09
ABII016	81.8	57.9	2.4E-09
ABII017	82.8	59.4	2.4E-09
ABII018	82.8	60.1	3.2E-09
ABII019	91.9	71.6	1.4E-08
ABII020	92.9	69.8	1.1E-07
ABII021	90.9	69.9	2.4E-08
ABII022	89.9	68.6	1.6E-08
ABII023	90.9	64.7	5.8E-09
ABII024	89.9	63.6	6.0E-09
ABII025	90.9	70.3	1.8E-08
ABII026	91.9	66.8	5.1E-09
ABII027	90.9	65.3	4.4E-09
ABII028	90.9	73.8	1.1E-08
ABII029	91.9	74.3	8.9E-08
ABII030	89.9	73.7	1.2E-08
ABII031	88.9	72.1	1.3E-08
ABII032	89.9	68.3	4.9E-09
ABII033	88.9	66.2	4.0E-09
ABII034	89.9	72.5	1.0E-08
ABII035	90.9	68.7	4.0E-09

ABII036	89.9	67.5	3.5E-09
ABII050	83.8	68.5	1.9E-08
ABII051	88.9	66.2	1.8E-08
ABII052	89.9	66.1	1.9E-08
ABII053	89.9	67.3	2.0E-08
ABII054	89.9	62.0	5.1E-08
ABII055	89.9	66.2	2.2E-08
ABII056	89.9	69.8	2.9E-08
ABII057	92.9	71.5	4.6E-08
ABII058	93.9	68.9	7.3E-08
ABII059	92.9	72.7	3.3E-08
ABII060	93.9	69.2	5.0E-08

According to the biological data summarizied in Tables VII and XII above, all of the VHH variants listed therein can - at least as intermediates - be used for the construction of the polypeptides of the invention. Specifically, for use in humans, humanized VHH variants ABII003 to ABII037 and ABII051 to ABII061 will be preferred. Particulary useful variants, showing a high degree of humanization but preserving their binding properties are ABII035 derived from the original clone 42D4, and ABII059 derived from original clone 60A10. ABII035 binds to the N-terminal epitope of A-beta and comprises CDR sequences SEQ ID NOs:14 to 16. ABII059 binds to the central epitope and comprises CDR sequences SEQ ID NOs:17 to 19.

Example 6: Comparison of the humanized VHHs to the reference VHHs

Purified anti-A-beta reference VHHs (Example 3.2, Table XI) are tested for binding as described in Example 3 to a SA sensor chip coated with C-terminally biotinylated monomeric A-beta(1-40). While ABII035 and ABII059 showed RU levels > 50 at injected concentrations of 11 and 3 nM, respectively, none of the VHHs 1B, 11G, 8B, 4D, 3A and VHH31-1 show binding (> 10 RUs) to the sensor chip at a concentration of 1000 nM under the conditions tested. In the same experiment, reference VHHs 2G6 and 2D2 show RU levels > 50 at injected

concentrations of 1000 and 100 nM, respectively, thus being much less potent than ABII035 and ABII059. No indication of surface degradation was detected during the experiment. Subsequently, binding of this set of reference VHHs is also verified to bind monomeric A-beta in multiple ELISA setups (detection described in Example 3), using distinct presentations of peptide formats such as captured A-beta(1-40) (C- or N-terminally biotinylated), directly immobilized A-beta(1-40) and A-beta(1-42), GST-A-beta(1-42) or A-beta(1-42)-GST (capturing at concentrations of 1 µg/ml). For the reference VHHs 1B, 11G, 8B, 4D, 3A no binding to monomeric A-beta is detected. In the BAA ELISA only reference VHH 8B show binding to aggregated A-beta at VHH concentrations above 1000 nM. Compared to the 2D2 and 2G6 VHHs, the ABII035 and ABII059 VHHs show > 50 fold higher EC50 values. The results are summarized in Table XIIa.

Table XIIa: Comparison of binding characteristics of 42D4 and 60A10 derived VHHs with binding characteristics of reference anti-A-beta VHHs

VHH	**Aggregation inhibition (% inhibition at 26µM)**	**BAM ELISA EC50 in nM**	**BAA ELISA EC50 in nM**	**TR-FRET IC50 in nM**
ABII42D4 (N-terminal epitope)	ND	14.2	0.9	46.8
ABII035 (N-terminal epitope)	54			
ABII60A10 (central epitope)	80	4.9	0.8	11.1
ABII059 (central epitope)	80			
2D2 (central epitope)	69	15.8	4.7	404*
2G6 (N-terminal epitope)	29	98.6	7.2	>1000
1B	ND	No binding	No binding	No competition
11G	ND	No binding	No binding	No competition
8B	ND	No binding	>1000 nM*	No competition

4D	ND	No binding	No binding	No competition
3A	ND	No binding	No binding	No competition
V31-1 (C-term epitope)	ND	No binding	No binding	No binding
Fab266 (central epitope)	82	1.8	1.8	0.52
Fab3D6 (N-terminal epitope)	82	1.8	0.3	3.4

ND: not determined; *: IC50 calculated from extrapolated curves

Example 7: Binding of anti-human A-beta VHHs to rodent A-beta (ELISA and Biacore)

Binding of VHHs as obtained above to rodent A-beta is assessed in ELISA. Mouse (Bachem) or human A-beta(1-40) (Anaspec) are coated at 2 µg/ml onto Maxisorp plates and binding of VHHs and, for comparative purposes, Fab fragments, is detected via a mouse anti-myc antibody and an anti-mouse-HRP conjugate (DAKO). EC50 values are determined for the Fab fragment of 3D6, VHH ABII002, and VHH ABII035. The results are listed in Table XIII below (average of minimally two independent experiments).

Table XIII: EC50 values for binding to human and mouse A-beta

Clone	**human A-beta(1-40) EC50 (nM)**	**rodent A-beta(1-40) EC50 (nM)**
ABII002	1.8	3.3
ABII035	2.5	5.7
Fab3D6	4.2	110

While 3D6 Fab fragments bind mouse A-beta significantly less than human A-beta (26 fold difference), ABII002 and ABII035 bind equally well to both (1.8 and 2.2 fold difference, respectively), indicating that ABII002 and its humanized derivative ABII035 recognise an epitope that is distinct from the epitope recognized by 3D6.

Binding of the VHHs to mouse and human A-beta is further assessed on Biacore with the non-biotinylated peptide coated directly onto the chip. No difference in affinity to human and rodent A-beta peptide is detected for the VHHs before and after humanisation.

Example 8: Generation and characterization of biparatopic anti-A-beta VHH constructs

VHHs ABII42D4 (recognizing the N-terminal region of the A-beta peptide) and VHH ABII60A10 (recognizing the central region) are fused via flexible glycine-serine linkers (e.g. 9GS: GGGGSGGGG; SEQ ID NO:141) to create bivalent VHH constructs. Four biparatopic constructs (comprising two VHH domains with different epitope specificity) differing in linker length and orientation are explored in more detail: ABII42D4-25GS-ABII60A10, ABII60A10-25GS-ABII42D4, ABII42D4-35GS-ABII60A10 and ABII60A10-35GS-ABII42D4 and compared to respective VHH dimers (comprising two identical VHH domains, such as the bivalent ABII42D4-9GS-ABII42D4 construct). The biparatopic and dimeric/bivalent VHHs are produced in *E.coli* TG1 cells and purified using affinity chromatography (IMAC or protein A) and size exclusion chromatography (Superdex75 or Sephacryl S100), resulting in ≥ 95% purity as assessed via SDS-PAGE.

8.1 TR-FRET binding assays: Binding of the biparatopic VHH constructs to A-beta(1-40) is evaluated using the ABII42D4 and ABII60A10 TR-FRET assays (Example 3.2). While the bivalent ABII42D4-9GS-ABII42D4 construct show only a slightly improved IC50 (3.2 fold improved vs. monovalent ABII42D4), the biparatopic VHHs are surprisingly found to bind significantly stronger to the A-beta peptide than the monovalent building blocks and the 3D6 and m266 Fab fragments (Table XIV) as well as 3D6 and m266 IgG (3D6 and m266 full-length monoclonal antibodies). No difference in potency is found between constructs with different linker lengths and orientations.

Table XIV: IC50 values for biparatopic anti-A-beta VHH constructs and comparative examples in ABII42D4 and ABII60A10 TR-FRET assays

42D4 TR-FRET assay	
Competitor	**IC50 (nM)**
ABII42D4-25GS-ABII60A10	0.047
ABII42D4-35GS-ABII60A10	0.050
ABII60A10-35GS-ABII42D4	0.055
ABII60A10-25GS-ABII42D4	0.043
ABII42D4	51
ABII42D4-9GS-ABII42D4	16
ABII60A10	>1000
m266Fab	>1000
3D6Fab	17
60A10 TR-FRET assay	
Competitor	**IC50 (nM)**
ABII42D4-25GS-ABII60A10	0.066
ABII42D4-35GS-ABII60A10	0.084
ABII60A10-35GS-ABII42D4	0.091
ABII60A10-25GS-ABII42D4	0.091
ABII42D4	>1000
ABII42D4-9GS-ABII42D4	>1000
ABII60A10	30
m266Fab	2.3
3D6Fab	>1000

5

8.2 Determination of binding mode: To explore the binding mode of the biparatopic constructs, it is assessed if both VHH building blocks can bind simultaneously to the same peptide molecule. In a sandwich ELISA, tag-less ABII60A10 or his-tagged ABII42D4 are coated onto a Maxisorp plate and incubated with the A-beta(1-40) peptide. The resulting VHH-peptide complex is then incubated with the c-myc-tagged VHH recognizing the N-terminal or central A-beta peptide epitope. Detection via the c-myc is performed as described before (Example 2). Binding is seen for both setups, indicating that the two VHHs recognizing the N-terminal or central epitope can bind simultaneously to the A-beta peptide.

Determination of the binding mode by SPR-based assay: C-terminally biotinylated A-beta(1-40) is immobilized on the sensor chip as described before (Example 2). ABII60A10 is injected at a saturating concentration of 500 nM and binding to A-beta(1-40) is observed. After 120 seconds, 200 nM of ABII42D4 and 500 nM ABII60A10 are co-injected resulting in additional binding. A control injection of 500 nM 60A10 alone does not result in any additional binding, showing that the additional binding observed is due to the ABII42D4 - A-beta interaction.

Determination of the binding mode using size exclusion chromatography: Size exclusion chromatography (SEC) separates molecules according to differences in size as they pass through a gel filtration medium packed in a column. The binding mode of biparatopic VHH constructs to their target can be identified by analysing the protein complex after incubating a 1:2 molar ratio of the respective VHH construct and the target protein. Therefore the mixture will be separated by SEC and the contents of the resulting peaks is analyzed by protein gel electrophoresis. An A-beta(1-28)-p38 fusion protein, having a calculated molecular weight of 46 kDa, runs as a monomer in the SEC. The biparatopic VHH fused to human serum albumin (60A10-27GS-42D4-Alb) has a calculated molecular weight of 95 kDa. In order to identify whether the biparatopic VHH binds one (= intramolecular binding) or two (= intermolecular binding) A-beta(1-28)-p38 fusion proteins, a 1:2 molar ratio of the VHH and the target protein is mixed, incubated over night at

4°C and applied to SEC using an ÄKTAexplorer (GE Healthcare, USA) in combination with a preparative size exclusion column (HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare, USA) in order to separate the protein complex from the single proteins. The gel filtration produced two peaks which are further analyzed by SDS-PAGE using the automated electrophoresis station Experion (Bio-Rad, USA) and the appropriate chip (Pro260 Chip, Bio-Rad, USA). Analysis on the Experion reveals that the main peak contains the VHH and the A-beta(1-28)-p38 fusion protein whereas the smaller peak contains only the A-beta(1-28)-p38 fusion protein. The amounts of VHH and A-beta(1-28)-p38 fusion protein in the complex are determined using the Experion data analysis software. The molecular weights of the proteins measured with the Experion are 53 kDa for the A-beta-p38 fusion protein and 101 kDa for the 60A10-27GS-42D4-Alb protein. The measured concentrations and therefore calculated molarity is 0,87 µM and 0,86 µM for the A-beta(1-28)-p38 fusion protein and the 60A10-27GS-42D4-Alb protein, respectively. Therefore, the ratio of A-beta(1-28)-p38 to 60A10-27GS-42D4-Alb in the analysed protein complex is about 1:1 although it is mixed at a molar ratio of 1:2. From this result it can be concluded that one biparatopic VHH binds the two epitopes of an A-beta peptide molecule within one and the same A-beta molecule, and does therefore not (or at least not primarily) act via cross-linking of A-beta-molecules via the bivalent VHH constructs.

8.3 Crystallization studies: For crystallization, ABII035 and ABII059 (160 µM each) are incubated with 3-fold molar excess of human A-beta peptide (residues 1-24) for 16 hours and the complex is purified by size exclusion chromatography. The complex is concentrated by diafiltration to a concentration of 4 mg/ml. Crystallization trials are set up as sitting drop vapour diffusion experiments by mixing 200 nl of protein with 200 nl of reservoir solution against a reservoir volume of 100 µl. Crystals appear after several days under a variety of different conditions, among these the following is used to determine the structure: 100 mM MMT buffer pH 5, 25% PEG1500. Crystals are treated with cryo-protectant (85 mM MMT buffer pH 5, 35% PEG1500) and flash-frozen with liquid nitrogen. Data are collected at the beamline 6SA of the swiss light source at the Paul-Scherrer Institute in Villigen, Switzerland.

In the crystal structure one molecule of ABII035, ABII059, and a peptide derived from human A-beta peptide (residues 1-24) form a ternary complex. This complex dimerizes via an anti-parallel beta-sheet which is formed by two molecules of A-beta peptide. The asymmetric unit of the crystal is occupied by two of these structures, which totals to four molecules of each A-beta peptide, ABII035 and ABII059. Residues 1 to 9 of A-beta adopt an alpha-helical conformation, residues 10 to 20 form a beta-strand. Residues 1 to 14 of A-beta are in proximity to ABII035 and among these Asp1, Ala2, Glu3, Phe4, Asp7, and His14 directly contact ABII035. Residues 15 to 24 of A-beta are in proximity to ABII059 and among these Gln15, Lys16, Val18, Phe19, Phe20, Glu22, and Asp23 directly contact ABII059.

In addition to the above, it becomes clear from the crystal structure that ABII035 and ABII059 can bind to one and the same molecule of A-beta simultaneously, confirming the results as obtained in Example 8.2 above.

Furthermore, the mode of interaction of ABII035 with the A-beta derived peptide as evidenced by the above crystal structure data is consistent with the observation as described in Example 7 above: ABII035 shows a good species cross-reactivity with regard to rodent A-beta peptides. The only sequence differences between human and rodent A-beta are R5G, Y10F and H13R. According to the above data, none of these residues form contacts to the VHH. Therefore it is assumed that rodent A-beta can bind to ABII035 in the same conformation as human A-beta, making it particularly useful as a tool reagent (research tool) for assays involving rodent animal models (producing rodent A-beta peptide), such as mice or rats.

Example 9: Generation and characterization of half-life extended humanized biparatopic anti-A-beta VHH constructs

9.1 Generation of constructs ABII314 to ABII323: For *in vivo* validation studies with humanized biparatopic VHH constructs, different half life extension (HLE)

strategies are explored: 1) genetic fusion to an albumin binding VHH (as described e.g. in WO2004/041865), 2) PEGylation of a Cys residue located in the linker between VHHs or at the C-terminus of the VHHs (WO2008/142164) and 3) genetic fusion to human or mouse serum albumin. The different HLE strategies are explored with biparatopic VHH constructs comprising the ABII035 and the ABII059 VHH domains / building blocks. Constructs ABII314 to ABII323 are generated via gene assembly using appropriate sets of overlapping oligonucleotides. Sequence IDs and amino acid sequences of ABII314 to ABII323 are listed in Table XV. In constructs ABII314, ABII315, ABII322 and ABII323, building block ABII059 is fused to ABII035 via a Gly-Ser linker of different length (as indicated in Table XV), containing a cysteine residue for conjugation with PEG (at the position as indicated in Table XV). Constructs ABII316 to ABII321 consist of genetically linked VHHs ABII035, ABII059 and ALB8 (humanized anti-human albumin VHH with mouse albumin cross reactivity), in different orientations and separated by either 9- or 35-GS linkers. The constructs shown in Table XV below may optionally additionally include a hexa-histidine tag and/or other tags for e.g. facilitating purification of the resulting polypeptides.

Table XV: Biparatopic VHH constructs ABII314 to ABII323

Clone	Sequence information	Descrip-tion	SEQ ID NO:
ABII314	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVR RSYSSWGQGTLVTVSSGGGGCGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVT WNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPE DTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	059-35GSC with C at position 5-035	142
ABII315	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVR RSYSSWGQGTLVTVSSGGGGCGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGR EFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQG TLVTVSS	059-9GSC with C at position 5-035	143

ABII316	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINV RRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKG LEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYL QMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGG GGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADS VKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHR FVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	059-9GS-Alb8-9GS-035	34
ABII317	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINV RRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVT WNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVS SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS	059-35GS-035-9GS-Alb8	35
ABII318	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINV RRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKG REFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYL QMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISG SGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	059-9GS-035-9GS-Alb8	36
ABII319	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTIS RDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNR VEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAA VSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLR PEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVS SGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAAS GFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYA DSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS	035-35GS-059-9GS-Alb8	37
ABII320	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGW FRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE	035-9GS-Alb8-	38

	DWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGS GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNY NMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAI NVRRSYSSWGQGTLVTVSS	9GS-059	
ABII321	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWF RQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE DWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGG LVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLE WVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGS GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNY NMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAI NVRRSYSSWGQGTLVTVSS	035-9GS-Alb8-9GS-059 (first E deleted)	39
ABII322	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGW FRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRS YSSWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGG**C***GGGGS GGGGSGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGP TFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADS VKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHR FVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	059-27GSC with C at position 14-035	40
ABII323	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGW FRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVR RSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**C***GG GGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVT WNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVS S	059-35GSC with C at position 15-035	41

9.2 Production, purification and PEGylation of humanized half-life extended biparatopic VHH constructs: His_6-tagged biparatopic VHH constructs ABII314, ABII315, ABII322 and ABII323 are purified via affinity chromatography (IMAC or protein A), cation exchange chromatography (SP Sepharose, Source 30S or POROS 50HS) and size exclusion chromatography (Superdex75 or Sephacryl S100). At protein purity levels of minimally 90% (determined via SDS-PAGE and subsequent Coomassie Brilliant Blue staining), PEGylation is performed.

Intermolecular S-S bonds of VHHs are first reduced by adding DL-Dithiothreitol solution (DTT) to a final concentration of 10 mM followed by 2 to 3h incubation at room temperature or overnight at 4°C. The reducing agent is subsequently removed via size exclusion chromatography (Superdex 75/200) in D-PBS running buffer, collecting the main peak. Immediately after removing the reducing agent, the biparatopic polypeptide construct is incubated with a 5fold molar excess of PEG for 1h at room temperature or overnight at 4°C. The PEGylated polypeptide is separated from free PEG and non-PEGylated polypeptide via cation exchange chromatography (MacroCap SP). A final polishing step and buffer change to D-PBS is performed via preparative size exclusion chromatography on Superdex200 or Sephacryl S200. The quality of the purified PEGylated polypeptide is verified via SDS-PAGE followed by CBB- and PEG-staining as decribed before by Natarajan et al (1995) in Bioconjugate chemistry 16:113-121.

9.3 Characterization of half-life extended humanized biparatopic anti-A-beta VHH constructs by TR-FRET: In order to compare the binding properties of the half-life extended biparatopic VHH constructs described above to those of monoclonal antibodies (IgG) 3D6 and m266, ABII315 to ABII320, ABII322 and ABII323 are tested in ABII002 and ABII050 competition TR-FRET assays (see Examples 8.1 and 3.2). Average IC50s derived from at least two independent experiments are summarized in Table XVI.

Table XVI: IC50 values for half life extended anti-A-beta biparatopic VHHs in absence/presence of albumin.

VHH	**IC50 (nM) ABII002 assay**	**IC50 (nM) ABII050 assay**
Monovalent VHHs and Fabs		
ABII002	2.9	NC
ABII035	3.5	NC
ABII050	NC	6.3
ABII059	NC	12.8
Fab3D6	3.4	NC

Fab266	NC	0.52
Multivalent VHHs and IgGs		
ABII315-PEG20 ABII315-PEG40	0.13 Not tested	0.28 0.31
ABII322-PEG40	0.14	0.17
ABII323-PEG40	0.18	0.20
ABII316	0.19	0.31
ABII316 + 10µM HSA	0.05	0.06
ABII317	0.29	0.49
ABII318	0.13	0.28
ABII319	0.26	0.33
ABII320	0.25	0.21
ABII059-27GS-ABII035-MSA	0.19	0.18
ABII059-27GS-ABII035-MSA_D3	0.10	0.12
IgG 3D6	1.9	NA
IgG m266	NA	0.53

NC: no competition detected
MSA: mouse serum albumin
MSA_D3: domain III of mouse serum albumin

In the ABII002 TR-FRET competition assay, all half-life extended VHH constructs tested show a highly improved potency between 6.5fold and 14.6fold (for ABII315-PEG20) compared to 3D6 IgG (IC50 of 1.9 nM). When compared to IgG m266, all VHH constructs show significantly better IC50 values in the ABII050 TR-FRET competition assay, with VHH ABII320 having the lowest IC50 of 0.21 nM, 2.5fold improved over IgG266.

Compared to the potency of monovalent VHH ABII035, the tailored VHH construct with the highest potency (ABII315-PEG20) show a 27fold improved IC50 in the ABII002 TR-FRET competition assay. VHH construct ABII320 show a 61-fold improved potency over monovalent ABII059 in the ABII050 TR-FRET competition assay.

The increased potency of the biparatopic constructs over the monomeric building blocks ABII035 and ABII059 confirms the results obtained with the non-humanized, non-matured constructs (Example 8.1) and supports the hypothesis of intramolecular binding of one biparatopic VHH construct to one A-beta peptide molecule (cf. Example 8.2 above). Furthermore, these experiments demonstrate that the half-life extension techniques applied to the VHH constructs as described above do not interfere with binding of the constructs to the A-beta peptide.

To assess whether the binding of ALB8-containing VHH constructs to the A-beta peptide is affected by HSA (as present in the bloodstream), biparatopic constructs equivalent to ABII316-ABII320 but containing the non-humanized VHH building blocks are tested in both competition TR-FRET assays in presence and absence of µM amounts of albumin. In both assay formats, pre-incubation with 6.5-10µM human, dog or bovine albumin (the latter two albumin variants showing no detectable interaction with ALB8) do not affect potency in the TR-FRET assays.

To test whether ALB8 can still bind to albumin in the context of the biparatopic VHH constructs, a kinetic analysis of the VHH constructs for binding to a chip coated with HSA is performed (Biacore). Comparable affinities were determined for monovalent ALB8 and the ALB8 fusion construct tested, indicating that HSA-binding of the ALB8 building block is not affected.

9.4 Inhibition of A-beta fibril formation: In a further experiment, a dilution series of the biparatopic VHH construct ABII320 is evaluated for its capacity to inhibit formation of A-beta fibrils *in vitro* as described under Example 3.5 and is compared to the activity of its monovalent building blocks ABII035 and ABII059 and control antibodies. The maximum inhibition at the highest concentration of the VHH construct tested (26 µM) is calculated as an average of two independent experiments. While a consistent background inhibition of approximately 17% is detected when using non-related (non-A-beta specific) VHHs as a control, monovalent 3D6 and m266 Fab fragments show a reproducible dose-dependent inhibition with maximal inhibition of 82%. (Intact) IgGs 3D6 and m266 result in

75% and 83% inhibition, respectively. Monovalent VHHs ABII035 and ABII059 show a maximum inhibition of 54% and 80%, respectively, while the half-life extended biparatopic VHH construct ABII320 shows a maximum inhibition capacity of 84% at 26 µM.

9.5 Binding to soluble APP-alpha: Soluble APP-alpha (sAPPalpha) is released from its cell bound precursor protein APP by alpha-secretase activity. The amino acid sequence of sAPPalpha contains the first sixteen amino acid residues of the A-beta peptide, but does not contain the correct 3D6 epitope, as a free N-terminal amino acid residue in the A-beta peptide is essential for full 3D6 interaction. Epitope mapping indicates that N-terminal region-specific VHH ABII001 and its derivatives interact with a distinct epitope compared to monoclonal antibody 3D6. VHH-binding to sAPPalpha in comparison to A-beta is tested using a TR-FRET-based assay setup. Biotinylated sAPPalpha (Sigma) at a final concentration of 0.82 nM is mixed with the same concentration of streptavidin-Europium labeled beads and 4.4nM of AlexaFluor647-labeled ABII320. The following non-labeled compounds are tested for competition: ABII320, sAPPalpha, IgG m266, IgG 3D6, ABII035 and A-beta(1-40). Two independent experiments are performed applying a dilution series of the competitor compounds. Average IC50 values are 0.72nM, 25.6nM, 0.23nM, and 14 nM for non-labeled ABII320, ABII035, A-beta(1-40) and sAPPalpha, respectively. As expected, no competition is observed for IgG m266 and IgG 3D6. In this assay set-up, ABII320 interacts 63-fold better with A-beta(1-40) than with sAPPalpha. In a parallel set-up using biotinylated A-beta(1-40) instead of biotinylated sAPPalpha, ABII320 interacts at least 20000-fold better with A-beta(1-40) than with sAPPalpha (IC50 estimated based on extrapolated data at higher concentrations), indicating that ABII320 prefers binding to A-beta(1-40) over sAPPalpha.

9.6 Epitope mapping for biparatopic VHH constructs: A-beta(1-42) derived peptides displayed as peptide microarrays (PepStar™) are used to determine the epitopes of VHHs. PepStar™ peptide microarrays (JPT Peptide Technologies, Germany) are customized peptide microarray sets for rapid screening of

antibody/VHH peptide interaction displayed on glass slides. The peptides of the microarray represent a 12/11 scan derived from the primary structure of A-beta(1-42) immobilized via their N-terminus. In addition, truncated peptides of the N-terminus representing the first 16 to the first 7 amino acids of A-beta(1-42) are immobilized via their C-terminus. Upon incubation with the VHH, the binding event can be detected by reading the fluorescence intensity of labeled secondary antibody directed against the VHH.

After blocking the microarray with blocking buffer (PBS, 1% BSA, 0,1% Tween20) over night at 4°C, it is incubated for 2 h at 4°C with 200 µl of the biparatopic VHH construct ABII320 in wash buffer (PBS, 5 mM DTT, 0,05% Triton X-100, 5% Glycerol, 1% BSA) at a concentration of 5 µg/ml. In order to remove excess VHH, the microarray is incubated three times for two minutes on ice with wash buffer. Thereafter, the microarray is incubated for one hour at 4°C with an anti-VHH Alexa Fluor 647 (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Germany) in wash buffer at a concentration of 0,5 µg/ml. The anti-VHH is derived from a goat serum after immunization with the VHH dimer G6-G6. Unbound secondary antibody is removed by incubating the microarray three times for two minutes on ice with wash buffer. Finally the slide is dried in a centrifuge at 800 x g for three minutes and scanned with the ProScanArray from Perkin Elmer using a 633 nm laser. The data are analyzed with the ScanArray Express® software from Perkin Elmer.

As a result, peptide spots having a diameter of 420 µm are obtained which are analyzed for fluorescence intensity, from which interaction of the VHH with the peptides can be assessed in a semi-quantitative manner. Thus, incubation of the biparatopic VHH construct ABII320 with the peptide microarrays reveals that ABII320 interacts with residues 1-11 and 15-24 of the A-beta peptide. The alanine scan indicated that residues Asp1, Glu3, Phe19, Phe20 and Asp23 of the A-beta peptide are essential for the binding of the biparatopic VHH, which is consistent with the data obtained from crystal structure analyses. The same results are obtained using two other biparatopic VHH constructs which include the ABII035 and ABII059 VHH domains.

9.7 Determination of binding constants using kinetic exclusion assay (KinExA):
Affinities of three biparatopic VHH constructs for the A-beta peptide are determined using KinExA (Kinetic Exclusion Assay). KinExA is a technology with the ability to measure unmodified molecules in solution phase (Darling, R.J. and Brault, P.-A.: Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions; Assay and Drug Development Technologies 2(6):647 (2004)) . The KinExA method measures the concentration of uncomplexed VHH molecules in a mixture of VHH, antigen, and VHH-antigen complex. The concentration of uncomplexed VHH is measured by exposing the solution phase mixture to solid phase immobilized antigen for a very brief period of time. The "contact time" between the solution phase mixture and the solid phase immobilized antigen is kept short enough that dissociation of VHH-antigen complex is insignificant. When the possibility of significant dissociation of VHH-antigen complex is kinetically excluded, only uncomplexed ("free") VHH can bind to the solid phase. The amount of free VHH that binds to the solid phase (measured by fluorescence emission from a secondary label) is directly proportional to the concentration of free VHH in the solution phase sample.

A-beta(1-28) peptide (Anaspec, USA) is used as antigen for the incubation with biparatopic VHHs. Fusion protein "His.Xa.Abeta1-28.GS.p38" is used to prepare the solid phase for binding the uncomplexed VHHs. The structure of the fusion protein is as follows: His-tag, factor Xa cleavage site, A-beta(1-28) peptide, GS-linker, murine p38 alpha and has the following sequence:

MHHHHHHIEGRDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGGSGGSQERPTFY
RQELNKTIWEVPERYQNLSPVGSGAYGSVCAAFDTKTGHRVAVKKLSRPFQSII
HAKRTYRELRLLKHMKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVK
CQKLTDDHVQFLIYQILRGLKYIHSADIIHRDLKPSNLAVNEDCELKILDFGLARHT
DDEMTGYVATRWYRAPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAELLTGRTLFPGTDH
IDQLKLILRLVGTPGAELLKKISSESARNYIQSLAQMPKMNFANVFIGANPLAVDL
LEKMLVLDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFESRDLLIDEWK
SLTYDEVISFVPPPLDQEEMES (SEQ ID NO:144).

The fusion protein is expressed in E. coli, purified using Ni-NTA (Qiagen, Germany) and alkylated with Iodoacetamide (Sigma, USA). Polymethylmethacrylate beads (Sapidyne Instruments Inc., USA) are coated with the fusion protein in PBS with 0,02% NaN_3, blocked with 1% BSA in the same buffer and used for all experiments as solid phase. The KinExA experiments are conducted with a KinExA 3000 and the KinExA Pro software (Sapidyne Instruments Inc., USA) at room temperature (ca. 21°C). PBS with 0,02% NaN_3 is used as running buffer. For all experiments, antigen is serially diluted into PBS with 0,1% BSA and 0,02% NaN_3 having a constant VHH concentration. The mixtures of antigen and VHH are incubated for 24h at room temperature prior to measurement. The flow rate of the samples and the labeling antibody for all experiments is 0,25 ml/min.

The secondary fluorescence labeled antibody for the measurement of the ABII320 VHH construct (first VHH construct) is the Alexa 647-conjugated goat anti-G6G6 (anti-VHH) described under 9.6 above. This antibody is used at a volume of 500 µl and a concentration of 0,5 µg/ml in PBS with 0,1% BSA and 0,02% NaN_3. The ABII320 is additionally measured as described in the presence of recombinant human albumin (albcult™, novozymes, USA). Binding of the PEGylated ABII322 VHH construct (second VHH construct) to the solid phase is determined using 500 µl of a rabbit anti-PEG (Epitomics Inc., USA) at a concentration of 0,1 µg/ml in PBS with 0,1% BSA and 0,02% NaN_3 on line 13 of the instrument in combination with 250 µl of an Alexa 647-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes Inc., USA) at a concentration of 0,25 µg/ml in the same buffer. Binding of the HSA-biparatopic VHH construct fusion protein shown in Table IV above (SEQ ID NO:32; third VHH construct) to the solid phase is determined using 500 µl of a goat anti-HSA (Bethyl Laboratories Inc., USA) at a concentration of 0,5 µg/ml in PBS with 0,1% BSA and 0,02% NaN_3 on line 13 of the instrument in combination with 500 µl of an Alexa 647-conjugated rabbit anti-goat (Molecular Probes Inc., USA).at a concentration of 0,5 µg/ml in the same buffer.

The equilibrium titration data are fit to a 1:1 binding model using KinExA Pro software Version 1.0.3 (Sapidyne Instruments Inc., USA). The first VHH construct (biparatopic VHH ABII320) is measured at concentrations of 3, 5 and 10 pM. The sample volume is 5 ml each. The measured K_D is 1,1 ± 0,3 pM and 0,4 ± 0,1 pM in the presence of 1% recombinant human albumin. The second VHH construct (biparatopic PEGylated VHH ABII322) is measured at concentrations of 3, 4, 5 and 6 pM. The sample volume is 11 ml each. The measured K_D is 0,6 ± 0,2 pM. The third VHH construct (HSA-VHH fusion protein) is measured at concentrations of 2, 3 and 4 pM. The sample volume is 5 ml each. The measured K_D is 0,5 ± 0,3 pM.

9.8 Binding to pyroglutamyl-Abeta: Pyroglutamyl (pGlu)-A-beta is a major component of neuritic plaques in Alzheimer's disease. It is formed by cyclization of the N-terminal glutamate at position 3 catalyzed by glutaminyl cyclase (QC) resulting in a very amyloidogenic variant of A-beta. The amino acid sequence of pGlu-A-beta contains the amino acid residues 3-42 of the A-beta peptide. The first two N-terminal amino acids which are essential for full interaction with antibody 3D6 are missing. Affinities for the pGlu-A-beta–ABII320/ABII322/m266/3D6 interaction are determined via surface plasmon resonance (Biacore) using C-terminally biotinylated pGlu-A-beta(1-28) captured on a streptavidin sensor chip as described before (Example 2). Purified polypeptides ABII320 or ABII322 or antibodies m266 or 3D6 are injected at 9 different concentrations (between 0.195 and 50 nM for ABII320, 0.39-100 nM for ABII322 and 0.782-200 nM for 3D6 and m266) for 3 min and allowed to dissociate for 10 min. Association and dissociation curves can be fitted using a 1:1 interaction model and an accurate K_D value can be determined. The affinities are found to be 2 nM for ABII320, 1 nM for ABII322, 224 pM for the antibody m266 and no binding could be observed for the antibody 3D6.

Example 10: Binding of anti-A-beta VHHs to amyloid plaques

VHHs are profiled in a tissue amyloid plaque immunoreactivity (TAPIR) assay according to their capability to bind to amyloid plaques in Tg2576 mouse brain slices. The TAPIR assay allows a qualitative (dense core and/or diffuse amyloid plaques) as well as quantitative assessment (minimum effective dosis MED) of the VHHs. For the assay, cryostat-cut coronal sections of plaque-positive mice are prepared, mounted onto 76x26 mm Superfrost slides (Roth) and stored at -20^0 C. Cryosections are thawed for 20 minutes, fixed in 3% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes on ice. Sections are then incubated in 0.3% hydrogen peroxide for 30 minutes, blocked with PBS containing 2.5% bovine serum albumin (BSA) and 2% mouse serum for 1.5 hours and incubated with a myc-tagged VHH or Fab at different concentrations (3.0 mg/ml to 4.11 ng/ml), dissolved in PBS containing 2.5% BSA. The slices are then incubated for 1.5 hours with 10 mg/ml biotinylated mouse anti c-myc monoclonal antibody (9E10) (Sigma-Aldrich), dissolved in PBS containing 2.5% BSA (except for slices incubated with biotinylated ABII320). The sections are incubated for 1.5 hours with Vectastain ABC ELITE Kit solution (Vector Laboratories) prepared according to manufacturer's instructions, and visualised using Vector VIP SK 4600 solution (Vector Laboratories), again prepared according to manufacturer's instruction. The sections are progressively dehydrated by 5 minute incubations in 60-, 80- and 100% ethanol and 100% isopropanol and cleared for 5 minutes in xylene. The sections are then mounted with Entellan new mounting medium (Merck) and covered with 24x50 mm coverslips (Menzel-Glaeser). The results are summarized in the following table.

In addition to ABII320 and Fab fragments of monoclonal antibody m266 described above, several other (myc-tagged) biparatopic VHH constructs were analysed in the above TAPIR assay. The structure of VHH constructs ABII300 to ABII305 is shown in Table XVII below and, in all cases, includes VHH domains ABII002 (SEQ ID NO:62) and ABII050 (SEQ ID NO:100), in different orders and combined with either an albumin binding VHH domain (ABII300 to ABII304) or a PEG40 moiety (ABII305).

From the results, it can be seen that biparatopic VHHs ABII300, ABII301, ABII302, ABII303 and ABII304 as well as ABII305-PEG40 reveal the same affinity to bona fide tissue amyloid plaques (dense core and diffuse type of plaques) in the TAPIR assay. A particular order of the linkers or conjugation to PEG40 does not appear to have a significant effect on plaque affinity.

Table XVII: Structure of biparatopic VHH constructs ABII300 to 305 and results obtained in TAPIR assay

VHH	Domain Structure	Epitope	MED [ug/ml]
m266 (Fab)		central	no binding
ABII300	ABII050-GS9-Alb8-GS9-ABII002	N-term and central	0.11 > x > 0.04
ABII301	ABII050-GS35-ABII002-GS9-Alb8	N-term and central	0.11 > x > 0.04
ABII302	ABII050-GS9-ABII002-GS9-Alb8	N-term and central	0.11 > x > 0.04
ABII303	ABII002-GS35-ABII050-GS9-Alb8	N-term and central	0.11 > x > 0.04
ABII304	ABII002-GS9-Alb8-GS9-ABII050	N-term and central	0.11 > x > 0.04
ABII320	ABII035-GS9-Alb8-GS9-ABII059	N-term and central	0.11 > x > 0.04
ABII305 -PEG40	ABII050-GSC35(PEG at Cys at position 5)-ABII002	N-term and central	0.11 > x > 0.04

Example 11: Pharmacodynamic of half-life extended biparatopic anti-A-beta VHH constructs

To determine the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of VHHs, samples are injected either i.v. or i.p. into APP transgenic mice. Plasma samples are taken by bleeding the V. saphena. A predose sample was taken before the VHHs, IgGs or vehicle application and after 4 and 24 hours.

As the binding of the VHHs and the IgGs interferes with the detection in the ELISA, the A-beta:VHH or A-beta:IgG complexes are denatured prior to the assay in order to detect the total amount of plasma A-beta(1-40). In brief, samples are denatured with 6M GuHCl (Sigma Aldrich) and purified over a solid-phase extraction column. 60 mg Oasis HLB 96-well plates (Waters) are set into

extraction plate manifolds (Waters) connected to house vacuum. Columns are activated with 1mL methanol (MeOH), followed by 1mL H_2O. GuHCl-extracted samples are loaded and washed sequentially with 1mL volumes of 5 and 30% MeOH and A-beta is then eluted with 2% NH_4OH in 90% MeOH. Eluted samples are collected and vacuum-centrifuged (Eppendorf Vacufuge) at 1400 rpm, 60°C for 90 min. Once samples are dried completely, they are reconstituted in blocking buffer and stored at −20°C until analysis. Total plasma levels of A-beta(1-40) are determined by sandwich ELISA (4G8/anti-A-beta(1-40), mesoscale discoveries) according to the manufacturer's instruction.

Predose total A-beta(1-40) levels for APP transgenic mice are approximately 1.25 nM in plasma. In these mice injected with 15 nmol/kg of biparatopic VHHs or IgG (same dose, normalized to binding sites) the level of total A-beta in plasma peaked around 4 hours after i.v. application.. Data are expressed as 'fold increase over predose' in which the A-beta(1-40) plasma concentrations determined at 4 and 24 hrs after injection are divided by the predose levels. Results are shown in Table XVIII.

Table XVIII: Fold increase and AUD of plasma A-beta(1-40) after i.v. injection of anti-A-beta VHHs, compared to anti-A-beta antibodies 3D6 and m266

plasma A-beta(1-40) fold increase over predose					
			APP transgenic mice		
	exp.	dose (nmol/kg)	4 hrs	24 hrs	AUD
ABII300	14/16	15 i.v.	37.78	21,00	632.5
ABII301	14/16	15 i.v.	26	13.34	402.9
ABII305	16	15 i.v.	33.86	15.81	877.5
ABII306	21	15 i.v.	45.05	32.83	862.5
ABII316	24-26	15 i.v.	21.88	9.26	649
ABII317	24-26	15 i.v.	35.91	18.95	1615
ABII318	24-26	15 i.v.	13.45	5.81	807.9
ABII319	24-26	15 i.v.	36.53	21.53	1313
ABII320	24-26	15 i.v.	42.36	17.57	969.9

ABII315-PEG40	24-26	15 i.v.	28.78	12.14	761
m266 IgG1	20	7.5 i.v. *	25.79	17.9	528.9
3D6 IgG2b	20	7.5 i.v. *	29.47	25.88	673.2

* 15 nmol/kg, when calculated for binding sites (2 per IgG molecule)

Thus, compared to the IgG molecules known in the art, biparatopic VHH constructs have the potential to show up to 50% higher peak levels for total plasma A-beta (4 hrs) and >2 fold increased AUD values, indicating superiority of these VHH constructs over the IgGs in capturing A-beta.

To confirm that the level of free/unbound plasma A-beta decreases subsequent to administration of the VHH construct, a competitive ELISA is developed. Briefly, A-beta(1-40) is captured with an A-beta(1-40)-specific antibody coupled to an ECL-ELISA plate (mesoscale discoveries). The VHH or IgG molecules that are used to treat the animals in passive immunotherapy are tagged using the MSD Sulfo-Tag NHS-Ester (mesoscale discoveries) according to the manufacture's manual and used as detection tool in this sandwich ELISA format. A-beta(1-40) that is bound to the VHH or to IgG can not be detected in these settings whereas free/unbound A-beta(1-40) is detectable. To compare data from different assays, all values are normalized to the data from a vehicle treated group. APP transgenic mice are treated with VHHs or IgGs as indicated and plasma is collected and analyzed for free/unbound A-beta(1-40). As soon as 2 hours after i.p. injection of 132 nmol/kg anti-A-beta VHHs (ABII320 and ABII322, respectively), the levels of free/unbound A-beta(1-40) decreased strongly and highly significant from baseline levels (appr. 2 nM) down to below the detection limit at 2 pM. Equivalent dose of 3D6-IgG (10 mg/kg, 132 nmol/kg binding sites = 66 nmol/kg IgG) is able to reduce unbound A-beta(1-40) in plasma only down to a level of 52 pM (Fig.1). In this comparison the biparatopic VHH constructs ABII320 and ABII322 show, at the same dose, an unexpectedly much stronger decrease in free/unbound A-beta in plasma compared to 3D6 IgG, again indicating superiority in A-beta capture over IgG (3D6). This makes such VHH constructs particularly useful in terms of therapeutic

efficacy of VHHs. Specifically, a more efficient depletion of A-beta in plasma is expected to completely prevent the influx of A-beta from plasma into the brain, thereby generating a steeper concentration gradient between the brain and plasma A-beta pools, thereby accelerating efflux of A-beta from the brain into the plasma.

Example 12: BBB crossing VHHs

In order to further improve the blood brain barrier (BBB) crossing characteristics of the VHH constructs, bispecific VHHs are constructed comprising the biparatopic VHHs and the BBB crossing VHHs FC44 and FC5 (as described in detail in WO2002/057445). These VHHs improve the BBB crossing by binding to a target protein expressed on the BBB, after which the VHHs are transcytosed through the endothelial cells and released in the brain parenchyme. As such, VHHs genetically fused to the FC44 and FC5 VHHs are expected to undergo an active transport into the brain, resulting in higher brain levels and improved therapeutic effect. Constructs ABII400-ABII407, comprising the FC44 or FC5 VHHs, are generated via gene assembly using appropriate sets of overlapping oligonucleotides. SEQ ID NOs and amino acid sequences are listed in Table XIX below. In summary, VHHs are generated that contain the FC5 or FC44 VHH either between the ABII035 and ABII059 VHH building, or between the HSA binding VHH and ABII035 or ABII059 building blocks, or at the amino or carboxy-terminal end of the molecule (see Table XIX). VHHs are expressed in E.coli or in Pichia pastoris and purified as described in Example 9.2. Purified VHHs are assessed in an in vitro BBB crossing assay as described (WO2002/057445 and further references therein). In addition, radiolabeled or non-radiolabeled VHHs comprising the FC5 and FC44 building blocks are administered in vivo and the brain levels are determined using either liquid scintillation counting or ELISA.

TABLE XIX: Biparatopic anti-A-beta VHH constructs, additionally comprising FC5 and FC44 moieties

VHH con-struct ID		domain struc-ture	SEQ ID NO:
ABII400	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYC AAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLQASGGGLVQAGGSLRLS CAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREF VSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPL RVDYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNY NMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	035-9GS-FC5-Alb8-9GS-059	145
ABII401	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYC AAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLQASGGGLVQAGGS LRLSCSASVRTFSIYAMGWFRQAPGK EREFVAGINRSGDVTKYADFVKGRFSISRDNAKNMV YLQMNSLKPEDTALYYCAATWAYD TVGALTSGYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF NNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPE DTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	035-9GS-Alb8-9GS-FC44-9GS-059	146
ABII402	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYC AAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLS CAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMN SLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGK GREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTV YLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGT AINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL QASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKIT HYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVK	035-9GS-Alb8-9GS-059-9GS-FC5	147

	GRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPED TADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSS		
ABII403	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCSASVRTFSIYAMG WFRQAPGKEREFVAGINRSGDVTKY ADFVKGRFSISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTALYYC AATWAYDTVGALTSGYNFWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGRE FVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGN RVEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF NNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPE DTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	FC44- 9GS- 035- 9GS- Alb8- 9GS- 059	148
ABII404	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYC AAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSG VSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRS SQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL QASGGGLVQAGGSLRLSCSASVRTFSIYAMGWFRQ APGKEREFVAGINRSGDVTKYADFV KGRFSISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTALYYCAAT WAYDTVGALTSGYNFWGQGTQVTVS S	035- 35GS- 059- 9GS- Alb8- 9GS- FC44	149
ABII405	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYC AAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLQASGGGLVQAGGSLRLS CSASVRTFSIYAMGWFRQAPGKEREF VAGINRSGDVTKYADFVKGRFSISRDNAKNMVYLQM NSLKPEDTALYYCAATWAYDTVGA LTSGYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYN MGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAV YYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGG SGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL	035- 9GS- FC44- 9GS- 059- 9GS- Alb8	150

	SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS		
ABII406	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMG WFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFY SNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTADYYC AAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTV SSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCV HSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNS LRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE DWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGW FRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYC AAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCA ASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDT LYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	FC5-9GS-035-9GS-059-9GS-Alb8	151
ABII407	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYC AAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSG VSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYL QMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLQASG GGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGK EREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTA TPLRVDYWGKGTQVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSF GMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	035-35GS-059-9GS-FC5-9GS-Alb8	152

Example 13: Industrial manufacturing process for PEGylated biparatopic polypeptides of the invention

13.1 Fermentation: Any of the polypeptides ABII305, ABII306, ABII314, ABII315, ABII322, and ABII323 can be expressed in the cytoplasm of different E. coli strains like W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3), MM294 under control of an inducible promoter. This promoter can be chosen from

lacUV5, tac, T7, trp, T5, araB. The cultivation media are preferably fully defined according to Wilms et al., 2001 (Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., and Altenbuchner, J. : High-Cell-Density Fermentation for Production of L-N-Carbamoylase Using an Expression System Based on the Escherichia coli rhaBAD Promoter. Biotechnology and Bioengineering, 73: 95-103 (2001)), DeLisa et al., 1999 (DeLisa, M. P., Li, J. C., Rao, G., Weigand, W. A., and Bentley, W. E.: Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of Escherichia coli using an on-line optical sensor. Biotechnology and Bioengineering, 65: 54–64.(1999)) or equivalent. However, supplementation of the medium with amino acids like isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan and valin or complex media components such as soy peptone or yeast extract may be beneficial. The process for fermentation is performed in a fed-batch mode. Conditions: Temperature 30 – 40 °C, pH 6 – 7.5, dissolved oxygen is kept above 20%. After consumption of the initial C-source the culture is fed with the feed media stated above (or equivalent). When a dry cell weight in the fermenter of 40 to 90 g/L is reached the culture is induced with an appropriate inducer corresponding to the used promoter system (e.g. IPTG, lactose, arabinose). The induction can either be performed as a pulsed full induction or as a partial induction by feeding the respective inducer into the fermenter over a prolonged time. The production phase should last 4 hours at least. The cells are recovered by centrifugation in bowl centrifuges, tubular bowl centrifuges or disc stack centrifuges, the culture supernatant is discarded.

13.2 Purification: The E. coli cell mass is resuspended in 6- to 8-fold amount of lysis buffer (phosphate or Tris buffer, pH 7-8.5). Cell lysis is preferably performed by high pressure homogenization followed by removing of the cell debris by centrifugation in bowl, tubular bowl or disc stack centrifuges. Supernatant containing the target protein is optionally filtrated using a 0.22-10 µm filter and separated via cation exchange chromatography (e.g. Toyopearl MegaCap® II SP-550EC, Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose BB, SP Sepharose FF or S HyperCel™) at pH 7-8.5. Elution is performed by a linear increasing NaCl gradient at pH 7-8.5. Fractions containing the target protein are pooled and

subsequently incubated with 5-10 mM DTT in order to prevent dimerization or aggregation mediated by free cysteine residues. After further addition of 0.8-1 M ammonium sulfate or 2-3 M NaCl, solution is separated via hydrophilic interaction chromatography (e.g. Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Butyl Sepharose HP, Butyl Sephrose FF, Butyl Toyopearl 650 (S,M,C), Phenyl Toyopearl 650 (S,M,C)) at pH 7-8.5. Elution is carried out at pH 7-8.5 by a linear decreasing ammonium sulfate or NaCl gradient in presence of 5 mM DTT. Fractions containing the target protein with a purity level of minimally 90% are pooled and desalted by diafiltration in presence of 5 mM DTT followed by concentration to approximately 5 mg/ml. Subsequent refolding is performed by diluting the protein solution 1:5-1:20 with 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 4 mM Cystamin, 10 mM CHAPS at pH 8.5 to a final protein concentration of 0.25-1 mg/ml. Refolding solution is incubated under stirring for 12-36 h at room temperature and then separated by cation exchange chromatography (e.g. SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, Toyopearl SP-650 (S, M, C)) at pH 7-8.5. Elution is performed by a linear increasing NaCl gradient at pH 7-8.5. Fractions containing monomeric target protein are pooled and activated for PEGylation by addition of reducing agents such as DTT, DTE or TCEP. The solution is subsequently incubated at room temperature for 2 hours. After diafiltration against Na-phosphate buffer pH 6.5-7.5 or 20 mM HEPES buffer pH 6.5-7.5 or Tris buffer pH 8.0 and concentration to 5-10 mg/ml, 40-kDa maleimide-polyethyleneglycole (PEG) is added (protein to PEG ratio of 1:2-1:10). Solution is incubated under stirring for 3-18 h at room temperature and subsequently filtrated using a 0.22 µm filter. PEGylated target protein is separated from free PEG and non-PEGylated target protein via cation exchange chromatography (SP Sepharose HP, Toyopearl SP 650M, MacroCap™SP, Source™30S or Fractogel®EMD (M)) at pH 5-7. Elution is performed by a linear increasing NaCl gradient. Fractions containing mono-PEGylated target are pooled and formulated in 25 mM Na-phosphate, 220 mM endotoxin free trehalose, pH 7.5 via diafiltration.

Example 14: Pharmaceutical formulation and use

14.1 Pharmaceutical formulation: Any of the humanized biparatopic polypeptide constructs of the invention, such as ABII314 to AbII323, can be selected for the manufacture of a pharmaceutical formulation for subcutaneous application having a composition as follows:

Drug substance: 100 mg/ml (1 to 3 nmol/ml)
Phosphate buffer: 25 mM
Trehalose: 220 mM
Tween-20: 0.02 %

Drug substance is formulated in a solution having the above composition, sterilized and stored at 2 to 8 °C.

14.2 Pharmaceutical use: The solution as prepared under 14.1 above is applied to a patient in need thereof, such as a human being suffering from AD, by subcutaneous injection into the belly in a volume of 1 to 2 ml (dosage of 100 to 200 mg) every two to four weeks.

Claims:

1. A polypeptide comprising a first immunoglobulin single variable domain specifically binding to a first epitope of A-beta and a second immunoglobulin single variable domain specifically binding to a second epitope of A-beta, wherein said first and said second epitopes of A-beta are not identical epitopes.

2. The polypeptide according to claim 1, wherein said first and said second immunoglobulin single variable domains each essentially consist of four framework regions (FR1 to FR4, respectively) and three complementarity determining regions (CDR1 to CDR3, respectively), wherein said first and said second immunoglobulin single variable domains are covalently linked by a linker peptide, wherein said linker peptide optionally comprises or consists of a third immunoglobulin domain.

3. The polypeptide according to claim 1 or claim 2, wherein said first and said second immunoglobulin single variable domains are antibody domains, preferably VHH domains, and more preferably humanized VHH domains.

4. The polypeptide according to any of the preceding claims, wherein said first epitope of A-beta is the epitope defined by SEQ ID NO:3 and said second epitope of A-beta is the epitope defined by SEQ ID NO:4, or wherein said first epitope of A-beta is the epitope defined by SEQ ID NO:4 and said second epitope of A-beta is the epitope defined by SEQ ID NO:3.

5. The polypeptide according to any of the preceding claims, wherein said polypeptide forms contacts to at least amino acids 1 (aspartate), 3 (glutamate), 19 (phenylalanine), 20 (phenylalanine), and 23 (aspartate) of the human A-beta peptide (SEQ ID NO:1)

6. The polypeptide according to any of the preceding claims, wherein the IC50 value as measured in a TR-FRET binding assay (using ABII002 = SEQ ID

NO:62 and ABII050 = SEQ ID NO:100 as competitors) is in the range of 10^{-9} moles/litre or less, and preferably in the range of from 5 x 10^{-10} moles/litre to 10^{-12} moles/litre.

7. The polypeptide according to any of claims 2 to 6, wherein said polypeptide comprises two A-beta binding immunoglobulin single variable domains, said immunoglobulin single variable domains having the structure
FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4, and
FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4,
respectively, and wherein

CDR(1)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:16; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:16, respectively; and
CDR(2)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequence according to SEQ ID NO:19; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequence according to SEQ ID NO:19;

or wherein

CDR(1)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequence according to SEQ ID NO:19; and
- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequence according to SEQ ID NO:19; and
CDR(2)3 is selected from the group consisting of:
- the amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:16; and

- amino acid sequences which have up to three, preferably up to two, and more preferably one amino acid difference as compared to said amino acid sequences according to SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:16, respectively.

8. The polypeptide according to any of claims 2 to 7, wherein the CDR sequences of said first immunoglobulin variable domain (CDR(1) sequences) and the CDR sequences of said second immunoglobulin variable domain (CDR(2) sequences) are defined as follows:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:11
- CDR(1)2: SEQ ID NO:12
- CDR(1)3: SEQ ID NO:13
- CDR(2)1: SEQ ID NO:17
- CDR(2)2: SEQ ID NO:18
- CDR(2)3: SEQ ID NO:19

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:14
- CDR(1)2: SEQ ID NO:15
- CDR(1)3: SEQ ID NO:16
- CDR(2)1: SEQ ID NO:17
- CDR(2)2: SEQ ID NO:18
- CDR(2)3: SEQ ID NO:19

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:17
- CDR(1)2: SEQ ID NO:18
- CDR(1)3: SEQ ID NO:19
- CDR(2)1: SEQ ID NO:11
- CDR(2)2: SEQ ID NO:12
- CDR(2)3: SEQ ID NO:13

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:17
- CDR(1)2: SEQ ID NO:18
- CDR(1)3: SEQ ID NO:19
- CDR(2)1: SEQ ID NO:14

- CDR(2)2: SEQ ID NO:15
- CDR(2)3: SEQ ID NO:16.

9. The polypeptide according to any of the preceding claims, wherein the polypeptide comprises a first immunoglobulin single variable domain and a second immunoglobulin single variable domain, wherein said first immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII035 (SEQ ID NO:44), and said second immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII059 (SEQ ID NO:45), or wherein said first immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII059 (SEQ ID NO:45), and said second immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII035 (SEQ ID NO:44).

10. The polypeptide according to any of claims 1 to 9, wherein the polypeptide additionally includes a half-life extending moiety.

11. The polypeptide according to claim 10, wherein said half-life extending moiety is covalently linked to said polypeptide and is selected from the group consisting of an albumin binding moiety, such as an anti-albumin immunoglobulin domain, a transferrin binding moiety, such as an anti-transferrin immunoglobulin domain, a polyethylene glycol molecule, a recombinant polyethylene glycol molecule, human serum albumin, a fragment of human serum albumin, and an albumin binding peptide.

12. The polypeptide according to any of claims 10 and 11, wherein the polypeptide is selected from the group consisting of polypeptides having SEQ ID NOs: 26 to 32, 34 to 43, 142, 143, and 145 to 152.

---

13. A polypeptide comprising or consisting of an immunoglobulin single variable domain essentially consisting of four framework regions (FR1 to FR4, respectively) and three complementarity determining regions (CDR1 to CDR3, respectively), wherein said CDR sequences are defined as follows:
- CDR1: SEQ ID NO:11

- CDR2: SEQ ID NO:12
- CDR3: SEQ ID NO:13

or

- CDR1: SEQ ID NO:14
- CDR2: SEQ ID NO:15
- CDR3: SEQ ID NO:16

or

- CDR1: SEQ ID NO:17
- CDR2: SEQ ID NO:18
- CDR3: SEQ ID NO:19.

14. A polypeptide comprising or consisting of a VHH domain having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 47 to 111.

15. The polypeptide according to claim 13 or claim 14 for use in the construction of a biparatopic A-beta binding polypeptide according to any of claims 1 to 12.

---

16. A nucleic acid molecule, preferably in isolated form, comprising a region encoding a polypeptide according to any of claims 1 to 15.

17. An expression vector comprising a nucleic acid molecule according to claim 16.

18. A host cell carrying an expression vector according to claim 17, wherein said host cell is capable of expressing a polypeptide according to any of claims 1 to 15, and wherein said host cell is a prokaryotic or a eukaryotic cell.

19. A pharmaceutical composition comprising (i) as the active ingredient, one or more polypeptides according to any of claims 1 to 15, and (ii) a pharmaceutically acceptable carrier, and optionally (iii) a diluent, excipient, adjuvant and/or stabilizer.

20. A method of manufacturing a polypeptide according to any of claims 1 to 15, comprising the steps of
- culturing a host cell according to claim 18 under conditions that allow expression of a polypeptide according to any of claims 1 to 15;
- recovering said polypeptide; and
- purifying said polypeptide.

21. A polypeptide according to any of claims 1 to 15 or a pharmaceutical composition according to claim 19 for use as a medicament for the treatment, prevention or alleviation of a disease, disorder or condition in a human being.

22. A polypeptide according to any of claims 1 to 15 or a pharmaceutical composition according to claim 19 for use as a medicament for the therapeutical treatment, prevention or alleviation of a disease, disorder or condition in a human being, wherein said disease, disorder or condition is selected from the group consisting of neurodegenerative diseases or disorders, Alzheimer's disease, dementia of the Alzheimer type, dry AMD, glaucoma, cerebral amyloid angiopathy, trisomy 21 (Down's Syndrome), adult Down syndrome, hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of the Dutch-type (HCHWA-D), dementia with Lewy Bodies, frontotemporal lobar degeneration, glaucoma, amyotrophic lateral sclerosis, sporadic inclusion body myositis, and anxiety disorder in an elderly human subject.

23. A polypeptide according to any of claims 1 to 15 or a pharmaceutical composition according to claim 19 prepared for being administered to a human being in need thereof by intravenous or subcutaneous injection.

24. A method for the prevention and/or treatment of a disease or disorder that is associated with A-beta deposition, wherein said method comprises administering, to a subject in need thereof, a pharmaceutically active amount

of at least one polypeptide according to any of claims 1 to 15 or a pharmaceutical composition according to claim 19.

25. A polypeptide according to any of claims 1 to 15 or a pharmaceutical composition according to claim 19 prepared for the administration in combination with a therapeutic agent selected from the group consisting of ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513,Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin, and PF-4494700.

26. A therapeutic agent selected from the group consisting of ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513,Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin, and PF-4494700, prepared for the administration in combination with a polypeptide according to any of claims 1 to 15 or a pharmaceutical composition according to claim 19 to a patient in need thereof.

27. A pharmaceutical composition comprising (i) one of more polypeptides according to any of claims 1 to 15, and (ii) one or more additional therapeutic agents, preferably selected from the group consisting of ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513,Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin, and PF-4494700, and (iii) a pharmaceutically acceptable carrier, and optionally (iv) a diluent, excipient, adjuvant and/or stabilizer.

28. A polypeptide according to any of claims 1 to 15 for the reduction of A-beta levels in a body fluid, and preferably for the reduction of the level of soluble A-beta in blood.

29. A polypeptide comprising a first immunoglobulin single variable domain and a second immunoglobulin single variable domain, wherein the CDR sequences of said first immunoglobulin variable domain (CDR(1) sequences) and the CDR sequences of said second immunoglobulin variable domain (CDR(2) sequences) are defined as follows:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:11
- CDR(1)2: SEQ ID NO:12
- CDR(1)3: SEQ ID NO:13
- CDR(2)1: SEQ ID NO:17
- CDR(2)2: SEQ ID NO:18
- CDR(2)3: SEQ ID NO:19

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:14
- CDR(1)2: SEQ ID NO:15
- CDR(1)3: SEQ ID NO:16
- CDR(2)1: SEQ ID NO:17
- CDR(2)2: SEQ ID NO:18
- CDR(2)3: SEQ ID NO:19

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:17
- CDR(1)2: SEQ ID NO:18
- CDR(1)3: SEQ ID NO:19
- CDR(2)1: SEQ ID NO:11
- CDR(2)2: SEQ ID NO:12
- CDR(2)3: SEQ ID NO:13

or:

- CDR(1)1: SEQ ID NO:17
- CDR(1)2: SEQ ID NO:18
- CDR(1)3: SEQ ID NO:19
- CDR(2)1: SEQ ID NO:14
- CDR(2)2: SEQ ID NO:15
- CDR(2)3: SEQ ID NO:16.

30. A polypeptide comprising a first immunoglobulin single variable domain and a second immunoglobulin single variable domain, wherein said first immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII035 (SEQ ID NO:44), and said second immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII059 (SEQ ID NO:45), or wherein said first immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII059 (SEQ ID NO:45), and said second immunoglobulin single variable domain is VHH domain ABII035 (SEQ ID NO:44).

31. The polypeptide according to claim 29 or claim 30, wherein the polypeptide additionally includes a half-life extending moiety, said half-life extending moiety being preferably selected from the group consisting of an albumin binding moiety, such as an anti-albumin immunoglobulin domain, a transferrin binding moiety, such as an anti-transferrin immunoglobulin domain, a polyethylene glycol molecule, a recombinant polyethylene glycol molecule, human serum albumin, a fragment of human serum albumin, and an albumin binding peptide.

32. A polypeptide selected from the group consisting of polypeptides having any of SEQ ID NOs: 26 to 32, 34 to 43, 142, 143, and 145 to 152.

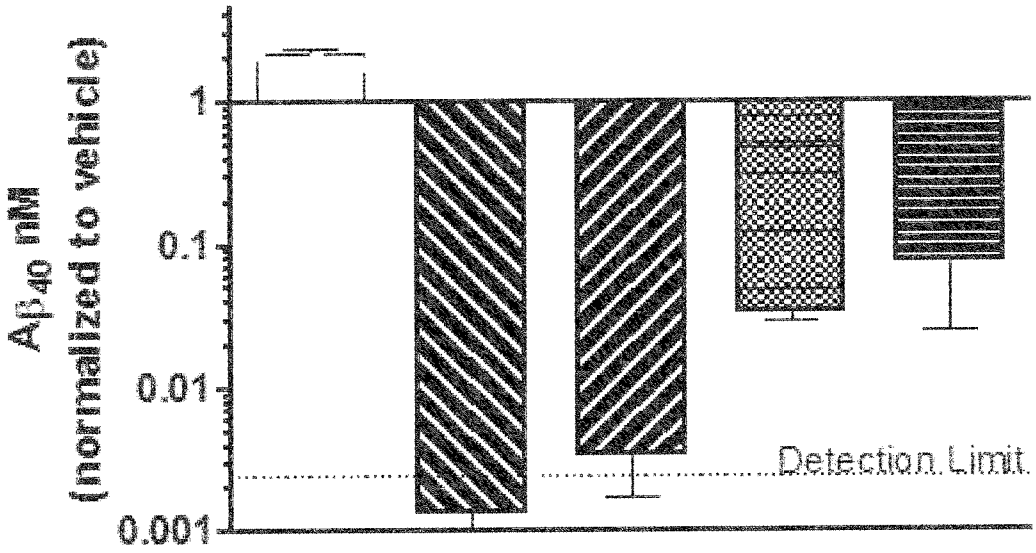


FIG.1

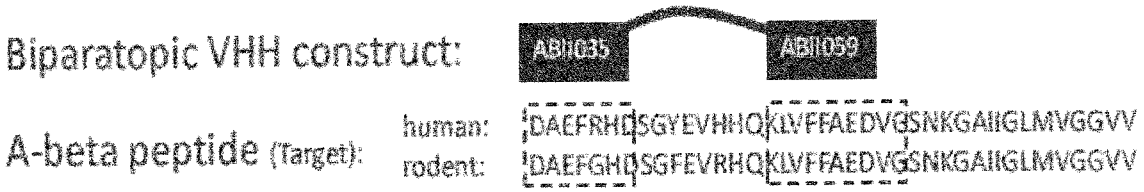

Biparatopic VHH construct:
ABII035
ABII059
A-beta peptide (Target):
human:
rodent:
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
DAEFGHDSGFEVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

FIG.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/053090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18 C07K16/46 A61K39/395
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/149185 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; HAHN ALFRED [DE]; MUELLER BERNHARD) 10 December 2009 (2009-12-10)	1-3
Y	page 14, lines 19-23 page 17, lines 18,19 claim 1	4-12, 16-32

Y	WO 2006/040153 A2 (ABLYNX NV [BE]; LAUWEREYS MARC [BE]; VAN LEUVEN FRED [BE]; VAN DER AUW) 20 April 2006 (2006-04-20) claims 1, 6, 7	1-12, 16-32

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 April 2011	18/07/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Weikl, Martina

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VAN BOCKSTAELE FEMKE ET AL: "The development of nanobodies for therapeutic applications.", CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS (LONDON, ENGLAND : 2000) NOV 2009 LNKD-PUBMED:19876789, vol. 10, no. 11, November 2009 (2009-11), pages 1212-1224, XP002587131, ISSN: 2040-3429 page 1216, column 2, paragraph 4 page 1218, column 2, paragraph 3	1-12, 16-32
Y	JOSEFIN-BEATE HOLZ: "Developing Nanobodies; From Bench to Bedside", , [Online] 24 June 2008 (2008-06-24), XP002587132, PDA/EBE workshop Retrieved from the Internet: URL:http://www.pda.org/Presentation/2008PDAEBEDublin/holzjosefin.aspx> [retrieved on 2010-06-14] pages 14-18	1-12, 16-32
A	ELS CONRATH K ET AL: "Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD-DOI:10.1074/JBC.M007734200, vol. 276, no. 10, 9 March 2001 (2001-03-09), pages 7346-7350, XP002248402, ISSN: 0021-9258 the whole document	1-12, 16-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/053090

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009149185 A2	10-12-2009	AR 072000 A1	28-07-2010
		AU 2009256246 A1	10-12-2009
		CA 2725666 A1	10-12-2009
		CN 102112494 A	29-06-2011
		EP 2297208 A2	23-03-2011
		KR 20110016959 A	18-02-2011
		PE 00542010 A1	03-03-2010
		US 2009304693 A1	10-12-2009
		UY 31861 A	05-01-2010
WO 2006040153 A2	20-04-2006	AU 2005293752 A1	20-04-2006
		BR PI0518151 A2	16-06-2009
		CA 2583017 A1	20-04-2006
		EP 1814917 A2	08-08-2007
		JP 2008515446 A	15-05-2008
		KR 20070084170 A	24-08-2007
		US 2008107601 A1	08-05-2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/053090

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)

   Claims relating to biparatopic immunoglobulin constructs having two immunoglobulin domains binding to two different epitopes of the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptides, pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.

   ---

2. claims: 13-15(completely); 16-28(partially)

   Claims relating to polypeptides having one immunoglobulin domain binding to the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptides, pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.

   ---

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de publicación internacional
25 agosto 2011 (25.08.2011)

PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2011/107507 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional:
PCT/EP2011/053090

(22) Fecha de presentación internacional:
2 marzo 2011 (02.03.2011)

(25) Idioma de la presentación:
inglés

(26) Idioma de la publicación:
inglés

(30) Datos de prioridad:
10155339.4 3 marzo 2010 (03.03.2010) EP

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados excepto EE.UU.)*: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH** [DE/DE]; Binger STr. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes *(solamente para EE.UU.)*: **PARK, John, E.** [US/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE). **DORNER-CIOSSEK, Cornelia** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE). **HOERER, Stefan** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE). **KUSSMAUL, Lothar** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE). **LENTER, Martin** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE). **ZIMMERMANN, Katharina** [DE/DE]; Boehringer Ingelheim GmbH, Corporate Patents, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE). **BESTE, Gerald** [DE/BE]; Jozef Kluyskensstraat 25 bus 20, B-9000 Gent (BE). **LAEREMANS, Toon** [BE/BE]; Krauwenberg 35, B-1653 Dworp (BE). **MERCHIERS, Pascal** [BE/BE]; Loopstraat 23, B-2460 Kasterlee (BE). **VERCAMMEN, Jo** [BE/BE]; Pijnbroekstraat 64, B-1600 Sint-Pieters-Leeuw (BE)

(74) Agente: **HAMMANN, Heinz et al.;** Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein (DE).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección nacional disponible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para todo tipo de protección regional disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Declaraciones de conformidad con la regla 4.17
--- con relación al derecho del solicitante a solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:
--- Con informe de búsqueda internacional *(Art. 21(3))*
--- Antes de expirar el plazo para modificar las reivindicaciones y se volverá a publicar en caso de recibir las modificaciones *(Regla 48.2(h))*
--- Con la parte del listado de secuencias de la descripción *(Regla 5.2(a))*

(54) Título: POLIPÉPTIDOS DE UNIÓN A A-BETA BIPARATÓPICOS

(57) Resumen: La invención se refiere a polipéptidos de unión a A-beta biparatópicos y, más específicamente, a polipéptidos de unión a A-beta biparatópicos que comprenden al menos dos dominios variables de inmunoglobulina que se unen a diferentes epítopos de A-beta. La invención también se refiere a secuencias específicas de dichos polipéptidos, métodos de su producción y métodos de uso de los mismos, incluyendo métodos de tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer.

WO 2011/107507 A1

POLIPÉPTIDOS DE UNIÓN A A-BETA BIPARATÓPICOS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos de unión al péptido beta-amiloide (en lo sucesivo: "A-beta"), comprendiendo los polipéptidos dominios de inmunoglobulinas específicos. La invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos; a métodos para preparar dichos polipéptidos; a células hospedadoras que expresan o capaces de expresar dichos polipéptidos; a composiciones que comprenden dichos polipéptidos; y a usos de dichos polipéptidos o dichas composiciones, en particular para fines profilácticos, terapéuticos y de diagnóstico.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Varias enfermedades neurales degenerativas se producen por el plegamiento o procesamiento inapropiado de proteínas o por priones, produciéndose en ambos casos deposiciones neurales invasivas conocidas como placas amiloides. Probablemente, la enfermedad neural degenerativa más conocida es la Enfermedad de Alzheimer (EA).

La incidencia de EA asegura una necesidad médica urgente y no satisfecha: entre 10 y 40% de todas las personas con edades comprendidas entre los 65 y los 85 años desarrollan EA. Además, este segmento de la población sigue creciendo exponencialmente. Por lo tanto, desde el punto de vista humano, así como desde el punto de vista social y económico, es imprescindible encontrar formas para diagnosticar y tratar de manera eficaz este trastorno devastador. En relación con el tratamiento, se necesitan fármacos no solo para ralentizar o detener la progresión de la enfermedad, sino también para restaurar las lesiones cerebrales que ya se han producido durante las fases iniciales de EA (antes del diagnóstico). En este momento no son eficaces ni el diagnóstico precoz ni el tratamiento terapéutico.

La EA se define como una demencia que coincide con la presencia en el cerebro de placas amiloides extracelulares, compuestas principalmente por péptidos amiloides, y por ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT) compuestos principalmente por la proteína tau.

Un componente principal de las placas amiloides características de la EA es el péptido beta amiloide (A-beta), un péptido muy insoluble de 39-43 aminoácidos (aa) de longitud que tiene una fuerte predisposición a adoptar a estructuras de lámina beta, oligomerizar y formar agregados de proteína. El A-beta se produce a

partir de la proteína precursora de A-beta (APP) por dos acontecimientos proteolíticos. Una actividad beta-secretasa escinde APP en el extremo N de A-beta ("sitio beta") entre los aminoácidos Met-671 y Asp-672 (usando la numeración de la isoforma de 770 aa de APP). La escisión en el sitio beta produce un fragmento de APP asociado a la membrana de 99 aa (C99). Un segundo sitio dentro del dominio transmembrana de C99 ("sitio gamma") después puede escindirse por una gamma-secretasa para liberar A-beta. Como alternativa, APP puede escindirse dentro de su región A-beta, predominantemente en el sitio de escisión por la alfa-secretasa de APP, para producir un fragmento de APP C-terminal de 83 aa (C83), que también puede escindirse adicionalmente por la gamma-secretasa para producir un péptido secretado soluble pequeño, p3. Esta ruta reduce la posible acumulación de A-beta.

El A-beta intra- y extracelular adopta una conformación de lámina beta y forma intermedios denominados ADDL (ligandos difusibles derivados de amiloide) y protofibrillas, y finalmente precipita en forma de fibrillas de amiloide que se unen formando placas amiloides. En estos procesos, se supone que el péptido A-beta(1-42) más hidrófobo (véase más adelante) sirve como agente de nucleación alrededor del cual crecen las placas de forma continuada.

Se han implicado varias mutaciones de sentido erróneo APP en formas de EA familiar de inicio prematuro. Todas estas están en uno de los sitios de escisión canónicos de APP o cerca de ellos. De esta manera, la doble mutación Swedish (K670N/M671L) está inmediatamente adyacente al sitio de escisión de la beta-secretasa y aumenta la eficacia de la actividad de la beta-secretasa, dando como resultado la producción de más A-beta total. Cualquiera de tres mutaciones en el resto 717 de APP, cerca del sitio de escisión de la gamma-secretasa, aumenta la proporción de una forma de 42 aa más amiloidogénica de A-beta, también denominada A-beta(1-42), con respecto a la forma de 40 aa más común, A-beta(1-40).

Se han descrito dos mutaciones adicionales de APP que están próximas pero no adyacentes al sitio alfa. Una mutación (A692G, resto 21 de A-beta) en una familia flamenca y una mutación (E693Q, resto 22 de A-beta) en un familia holandesa se han implicado en distintas formas de EA familiar. La mutación Flemish (flamenca), en particular, se presenta como un síndrome de hemorragias intracerebrales repetitivas o como una demencia de tipo EA. Los descubrimientos neuropatológicos incluyen placas seniles en la corteza y el hipocampo, y normalmente múltiples depósitos amiloides en las paredes de los microvasos

cerebrales.

Hace varios años se ha demostrado que la aspartil proteasa asociada a la membrana, BACE (también denominada memapsina o Asp2) presenta propiedades esperadas de una beta-secretasa. Esta enzima escinde APP en su sitio beta y entre Tyr-10 y Glu-11 de la región de A-beta con eficacia comparable. Los fragmentos de A-beta escindidos en este último sitio se han observado en placas amiloides en casos de EA y en medios de células de riñón embrionario humano HEK293 transfectadas con APP. Varios grupos también observaron la presencia en la base de datos de una aspartil proteasa adicional, BACE2 (también denominada Asp1), un homólogo próximo de BACE (también denominada ahora BACE1). BACE2 escinde APP en su sitio beta y más eficazmente en sitios dentro de la región de A-beta de APP, después de Phe-19 y Phe-20 de A-beta. Estos sitios de A-beta internos están adyacentes a la mutación de APP Flemish en el resto 21, y esta mutación aumenta notablemente la proporción del producto de escisión del sitio beta generado por BACE2. Las mutaciones del sitio beta conservativas de APP que aumentan (la mutación Swedish) o inhiben (M671V) la actividad de la beta-secretasa afectan a la actividad de BACE1 y BACE2 de forma similar. BACE2, al igual BACE1, proteoliza APP de forma máxima a pH ácido.

Las mutaciones en el gen de APP o en el gen de la presenilina 1 (PS1) (que llevan la actividad "gamma-secretasa") producen EA familiar de inicio prematuro. Son ejemplos de mutaciones de APP las mutaciones 'Swedish' y 'London' (717) mencionadas anteriormente localizadas respectivamente cerca de los sitios de escisión de la beta- y gamma-secretasa. Estas mutaciones aumentan la formación de péptidos A-beta y especialmente de A-beta(1-42) y, por lo tanto, aumentan la formación de agregados y placas amiloides. Aunque se cree que las placas inicialmente son un desencadenante importante para el desarrollo de la EA, los estudios actuales subrayan el papel de las protofibrillas y ADDL como componentes tóxicos principales. Incluso es concebible que las placas sean un mecanismo por el que los péptidos neurotóxicos actualmente se están volviendo biológicamente inactivos.

Puede adquirirse más información sobre enfermedades neurodegenerativas y sobre el papel de A-beta en las mismas en Wisniewski & Konietzko (2008), Lancet Neurol. 7(9), 805-811, Spires-Jones et al. (2009), Neurobiology of Disease, 213-220, y Lichlen & Mohajeri (2008), Journal of Neurochem. 104, 859-874.

La mayoría de los tratamientos actuales de la EA se dirigen a la deficiencia

de acetilcolina usando inhibidores de acetilcolinesterasa tales como donepezil (Aricept®), galantamina (Reminyl®) y rivastigmina (Exelon®) que están registrados para el tratamiento de la EA de leve a moderada. El donepezil también está aprobado para la Demencia de tipo Alzheimer (DTA) en los Estados Unidos y en Canadá. El déficit de acetilcolina refleja la degeneración de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal y parece correlacionarse bien con las manifestaciones neuropsiquiátricas de la enfermedad. El tratamiento con inhibidores de acetilcolinesterasa tiene algunos efectos beneficiosos (una eficacia coherente y significativa pero modesta sobre medidas clínicas de cognición y función global), pero no puede curar o detener la progresión de la enfermedad, por lo que la etiología de la neurodegeneración se deja sin tratar.

La memantina (Axura®, Namenda®, Ebixa®; Merz Pharmaceuticals) es un antagonista del receptor NMDA que mostró un mejor resultado que el placebo en los dominios clínicos cognición, actividades de la vida diaria y respuesta clínica global en pacientes con EA con enfermedad de Alzheimer de moderada a severa. La memantina sigue siendo una terapia sintomática que está aprobada para la enfermedad de Alzheimer de moderada a severa únicamente. Ni cura ni detiene la progresión de la enfermedad. Se ha demostrado que una combinación de memantina e inhibidores de acetilcolinesterasa tiene una eficacia superior en la DTA de moderadamente severa a severa, pero no en el estadio de la enfermedad de leve a moderado.

Algunas estrategias terapéuticas experimentales actuales se centran en A-beta como diana. Hay tres líneas de investigación principales:

a) El desarrollo de moléculas pequeñas (con frecuencia peptidomiméticos) denominados disruptores de láminas beta, que están diseñadas para interferir con la estructura de lámina beta de los agregados de péptido amiloide. Se ha demostrado que un "disruptor de láminas beta" estable, cuando se administra a un modelo de ratón transgénico de EA, puede atravesar la barrera hematoencefálica y reducir el número de placas (Permanne et al. (2002), FASEB J. 16, 860-862). Aún no se ha demostrado si es este enfoque da como resultado una protección y/o restauración cognitiva.

b) El desarrollo de moléculas pequeñas que inhiben el procesamiento proteolítico de APP en péptidos amiloides. Los inhibidores de la beta- o gamma-secretasa bloquearían eficazmente la formación de A-beta y, por lo tanto, protegerían al cerebro de los efectos neurotóxicos del amiloide. No se esperan efectos sobre la

carga de A-beta cerebral ya existente, tal como las placas amiloides que se han acumulado durante años.

c) Vacunación pasiva y activa contra A-beta. Esta línea de estrategia empezó con la observación por Schenk et al. (1999), Nature 400, 173-177, de que la vacunación de ratones EA transgénicos con A-beta(1-42) impedía la formación de placas amiloides. En un primer experimento, la vacunación mensual de ratones adultos jóvenes (6 semanas de edad) prevenía esencialmente la formación de placas y la reacción inflamatoria concomitante en el cerebro, es decir, la ausencia de placas amiloides, de astrocitosis y microgliosis. La vacunación empezando en una edad posterior, cuando las placas amiloides ya se habían establecido, dio como resultado una eliminación parcial. Posteriormente, se demostró que la vacunación con A-beta mejoraba los déficits conductuales y de memoria como se medía en los ensayos de memoria con laberinto de agua. Dados los efectos secundarios de la vacunación con A-beta entero, se han diseñado péptidos más cortos alternativos y se han usado para vacunar ratones transgénicos. Los ensayos clínicos sugirieron que la inmunización activa con A-beta es terapéuticamente activa, como se demuestra por la inducción de la eliminación de placas, la atenuación de la patología relacionada con las placas, la reducción de los niveles de tau y la ralentización del deterioro cognitivo de los pacientes. Sin embargo, un número significativo de pacientes desarrollaron meningoencefalitis autoinmune, producida principalmente por la infiltración de linfocitos T autorreactivos en el cerebro en respuesta a una inmunización activa (Ferrer et al. (2004), Brain Pathol. 14, 11-20; Nicoll et al. (2003), Nat. Med. 9, 448-452; Masliah et al. (2005), Neurology 64, 1553-1562).

Como alternativa a las estrategias de inmunización activa, pueden administrarse anticuerpos dirigidos contra A-beta a un paciente. Se demostró que dicha estrategia de inmunización pasiva era satisfactoria para reducir la carga de A-beta cerebral en ratones EA transgénicos (DeMattos et al. (2001), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 8850-8855). Los mecanismos subyacentes siguen estando abiertos a la especulación ya que se pensó que era poco probable que los anticuerpos pudieran atravesar la barrera hematoencefálica y dirigirse a las placas presentes en el cerebro. Por lo tanto, los autores sugirieron que el anticuerpo creaba un 'sumidero de A-beta' en el plasma que sacaba el A-beta del cerebro. Posteriormente, usando gelsolina y gangliósido 1, se demostró que cualquier ligando de unión a A-beta tiene la posibilidad de reducir la carga amiloide en ratones EA transgénicos sin atravesar la barrera hematoencefálica (Matsuoka et al.

(2003) J. Neuroscience 23, 29-33). La inmunización pasiva a corto plazo (24 horas) parecía restaurar los déficit cognitivos de ratones EA transgénicos incluso sin afectar a la carga amiloide cerebral total (Dodart et al. (2002) Nature Neuroscience 5, 452-457). El resultado sugeriría que agregados más pequeños, aunque solubles, de A-beta se fijan como objetivo primero por algunos anticuerpos, y también que estas son las formas más tóxicas de A-beta. Por lo tanto, la eliminación de A-beta protofibrilar podría restaurar la memoria, al menos en ratones transgénicos para APP.

El anticuerpo monoclonal anti-A-beta humanizado bapineuzumab (un análogo del anticuerpo de ratón anti-A-beta conocido como "3D6") mientras tanto se ha introducido en ensayos clínicos. Sin embargo, los primeros datos presentados a partir de un ensayo de Fase II mostraron resultados mixtos: Se observaron efectos estadísticamente significativos sobre varios criterios de valoración de eficacia en no portadores de ApoE4 únicamente. Además, el bapineuzumab se toleraba bien y era seguro en los no portadores de ApoE4, mientras que en los portadores de ApoE4, se observaban acontecimientos adversos graves en los pacientes tratados con bapineuzumab con más frecuencia que en el brazo de placebo. Además, se han observado acontecimientos de edema vasogénico. También se ha descrito la inducción de microhemorragias cerebrales preclínicamente en ratones transgénicos para APP.

Se sospecha que los anticuerpos convencionales (que contienen una parte Fc) usados en las inmunizaciones pasivas anti-A-beta son responsables de la inducción de edema vasogénico o de microhemorragias observadas en modelos humanos y animales, que están asociadas con la fijación como objetivo de depósitos de A-beta vasculares cerebrales (angiopatía amiloide cerebral) que conduce a microhemorragias a través de ADCC y/o CDC (Wilcock, DM, Colton, CA, CNS Neurol. Disord. Drug Targets (2009) Vol. 8(1): 50-64).

Finalmente, se supone que la afinidad de unión de aproximadamente 2,5 nM de este anticuerpo, medida por Biacore, es demasiado baja para inducir un “efecto sumidero periférico” eficaz.

Otro anticuerpo anti-A-beta, solanezumab (anticuerpo humanizado m266; LY-2062430), también se ha introducido en ensayos clínicos. La reducción máxima de carga de placas que pudo conseguirse, según se publicó, fue de aproximadamente 60%. Además, la especificidad de este anticuerpo se limita a A-beta soluble, de forma que no puede esperarse la unión de agregados o placas.

Un tercer anticuerpo anti-A-beta, ponezumab (PF4360365), solo se une a moléculas de A-beta(x-40) y no a moléculas de A-beta(x-42), suponiéndose que estas últimas son las especies de A-beta (más) patógenas. Su afinidad es incluso menor que la afinidad de bapineuzumab, y el riesgo de microhemorragias cerebrales aún no puede descartarse debido a su capacidad unirse a placas de A-beta en vasos sanguíneos, junto con una actividad ADCC/CDC residual de su parte Fc.

En resumen, lo anterior demuestra que aunque la unión y la eliminación de A-beta por anticuerpos (clásicos) parece ser un modo de acción atractivo para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de, por ejemplo EA, otras características y efectos de dichas inmunoglobulinas que aún no se han esclarecido completamente, tales como las implicaciones farmacológicas de su propiedad de unirse a ciertas formas de A-beta, hacen que sea mucho más difícil de lo que se habría asumido inicialmente encontrar y desarrollar anticuerpos terapéuticos seguros y eficaces.

También se han descrito en la técnica fragmentos de anticuerpo, tales como anticuerpos de dominio variable individual de inmunoglobulina o dominios VHH (como se define más adelante), que tienen especificidad por A-beta: documentos WO2004/44204; WO2006/40153; WO2007/35092; WO2008/122441; y WO2009/04494. Las características de unión de VHH sintetizados por los presentes inventores de acuerdo con las publicaciones WO anteriores no fueron satisfactorias, razón por la que se supone que no entraron en el desarrollo clínico.

El documento WO09/149185 describe las denominadas construcciones DVD, y, entre otras, construcciones DVD que tienen especificidad de unión a A-beta. Después de la combinación de dos dominios variables anti-A-beta diferentes en dichas construcciones DVD, se mantuvo la unión de los anticuerpos parentales, pero no se observó ningún aumento en afinidad por esta combinación. Además, las construcciones DVD descritas contienen una parte Fc que está presente en los anticuerpos “clásicos”, de forma que no pueden evitarse los efectos secundarios producidos por las funciones efectoras de Fc, tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase anteriormente).

El diagnóstico definitivo de EA aún requiere un examen patológico post-mortem del cerebro para demostrar la presencia de placas amiloides, ovillos neurofibrilares, pérdida sináptica y degeneración neuronal. Este es esencialmente

el mismo procedimiento definido por Alois Alzheimer en 1906. En 1984, el National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) estableció criterios formales para el diagnóstico de EA (revisado en Petrella et al. (2003), Radiology 226, 315-336). Los pacientes que cumplían todos los criterios siguientes recibían un diagnóstico de EA probable: demencia demostrada por examen y ensayo (por ejemplo, Ensayo Mini-Mental, Escala de Demencia de Blessed, o ensayos similares), pérdida de memoria y al menos otra función cognitiva, consciencia normal, inicio entre 40 y 90 años de edad, y ausencia de signos de otras enfermedades que producen demencia (criterio de exclusión). Un deterioro cognitivo progresivo y gradual sin una causa identificable se diagnosticará como una posible EA. Una EA probable se define adicionalmente como una demencia leve en sus primeras fases), moderada (en fases intermedias) o severa (en fases tardías). Se usa un análisis de laboratorio para definir objetivamente o excluir causas alternativas de demencia. Los ensayos ELISA de A-beta(1-42) y fosfo-tau en líquido cefalorraquídeo (CSF), junto con la genotipificación para ApoE4 (un factor genético de predisposición) parecen ser sensibles y específicos. Sin embargo, los métodos no se pueden aplicar ampliamente debido a la punción invasiva del CSF, lo que impide que esto se convierta una exploración rutinaria. El ELISA para la proteína de cadena neural (AD7C-NTP) (desarrollada por Nymox) demostró mayores niveles en orina de pacientes con EA que en pacientes sin demencia EA o controles sanos. Sin embargo, los niveles medios fueron significativamente menores en los casos con EA prematura, lo sugiere que el ensayo no es fiable para el ensayo del inicio prematuro de EA.

Aún no hay un método bioquímico adecuado para el diagnóstico firme de las primeras fases de EA, sino que más bien simplemente ayudan a confirmar el diagnóstico clínico de los casos avanzados. Claramente, se necesitan técnicas más avanzadas para permitir un diagnóstico prematuro antes del inicio de los síntomas clínicos que indican una lesión cerebral irreversible.

Finalmente, no solo para fines de diagnóstico sino también, por ejemplo, en la investigación preclínica y el desarrollo, las moléculas de unión a A-beta son útiles como herramientas de investigación. Se usan ampliamente los anticuerpos ya mencionados anteriormente, es decir, el anticuerpo 3D6 y el anticuerpo m266. El anticuerpo 3D6 se une a A-beta con una afinidad relativamente baja y, por lo tanto, puede no ser adecuado para todos los fines. El anticuerpo m266 presenta reacción

cruzada con versiones truncadas N-terminalmente de A-beta, tales como p3, lo que no permite distinguir entre especies de A-beta relevantes para la enfermedad, tales como A-beta(1-40) y A-beta(1-42), y otras moléculas tales como p3.

En vista de lo anterior, es un objeto de la invención proporcionar agentes farmacológicamente activos, así como composiciones que los comprenden, que puedan usarse en la prevención, tratamiento, alivio y/o diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con A-beta y/o mediadas por A-beta, tales como EA, y proporcionar métodos para la prevención, tratamiento, alivio y/o diagnóstico de dichas enfermedades, trastornos o afecciones, que impliquen el uso y/o administración de dichos agentes y composiciones. Dichos agentes también pueden ser útiles para realizar investigaciones en el campo de la EA en general y, específicamente, en el esclarecimiento de los mecanismos de la enfermedad EA y posibles mecanismos terapéuticos y/o profilácticos.

En particular, es un objeto de la invención proporcionar dichos agentes farmacológicamente activos, composiciones y/o métodos que proporcionen ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o métodos usados actualmente y/o conocidos en la técnica. Estas ventajas incluyen mejores propiedades terapéuticas y/o farmacológicas y/u otras propiedades ventajosas (tales como, por ejemplo, mayor facilidad de preparación y/o menores costes de los artículos), especialmente en comparación con los anticuerpos convencionales contra A-beta o fragmentos de los mismos como los descritos en la sección anterior. Otras ventajas serán evidentes tras la descripción adicional presentada más adelante.

Más en particular, es un objeto de la invención proporcionar nuevas moléculas de unión a A-beta y, específicamente, polipéptidos de unión a mamíferos y, especialmente a A-beta humano, donde dichas moléculas o polipéptidos son adecuados para los fines anteriores de diagnóstico, terapéutico e investigación.

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporcionan polipéptidos que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que se une específicamente a un primer epítopo de A-beta, y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que se une específicamente a un segundo epítopo de A-beta, donde dicho primer y dicho segundo epítopos de A-beta no son epítopos idénticos, es decir, son epítopos diferentes, tales como, por ejemplo, el epítopo N-terminal (SEC ID Nº: 3) por una

parte y el epítopo central (SEC ID Nº: 4) por otra parte.

Preferiblemente, dichos primer y segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina consisten esencialmente en cuatro regiones flanqueantes (FR1 a FR4, respectivamente) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), donde dicho primer y dicho segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina están unidos covalentemente por un péptido enlazador, donde dicho péptido enlazador comprende opcionalmente o consiste en un tercer dominio de inmunoglobulina, tal como, por ejemplo, un tercer dominio variable individual de inmunoglobulina.

Además, dicho primer y dicho segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina preferiblemente son dominios de anticuerpo, más preferiblemente dominios VHH, e incluso más preferiblemente dominios VHH humanizados.

Los dominios variables individuales de inmunoglobulina comprendidos en dicho polipéptido de la invención típicamente tendrán la estructura
FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4, y
FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4, respectivamente. Preferiblemente, CDR(1)3 se selecciona entre el grupo que consiste en:

- las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 y SEC ID Nº: 16; y
- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dichas secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 o la SEC ID Nº: 16, respectivamente; y

CDR(2)3 se selecciona entre el grupo que consiste en:

- la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19; y
- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19.

Como alternativa, CDR(1)3 se selecciona entre el grupo que consiste en:

- la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19; y
- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19; y

CDR(2)3 se selecciona entre el grupo que consiste en:

- las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 y SEC ID Nº: 16; y

- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dichas secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 o la SEC ID Nº: 16, respectivamente.

Los polipéptidos especialmente útiles de la invención incluirán las siguientes secuencias de CDR (numeración como se indica en el párrafo anterior):

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 11.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 12.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 13.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 19.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 14.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 15.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 16.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 19.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 19.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 11.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 12.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 13.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 19.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 14.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 15.

- CDR(2)3: SEC ID Nº: 16.

De acuerdo con una realización específica de la invención, los polipéptidos de la invención comprenden, como un primer dominio variable individual de inmunoglobulina, el dominio VHH ABII035 (SEC ID Nº: 44), y como segundo dominio variable individual de inmunoglobulina, el dominio VHH ABII059 (SEC ID Nº: 45), o viceversa.

En una realización especialmente preferida, dicho polipéptido de la invención comprende además un resto de amplificación de la semivida, preferiblemente unido covalentemente a dicho polipéptido, tal como un resto de unión a albúmina (por ejemplo, un dominio de inmunoglobulina anti-albúmina), un resto de unión a transferrina (por ejemplo, un dominio de inmunoglobulina anti-transferrina), una molécula de polietilenglicol, una molécula de polietilenglicol recombinante, albúmina de suero humano, un fragmento de albúmina de suero humano y un péptido de unión a albúmina.

Son realizaciones muy específicas de la invención los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEC ID Nº: 26 a 31 (polipéptidos de fusión de Fc); SEC ID Nº: 32 (polipéptido de fusión de HSA); SEC ID Nº: 34 a 39 y 145 a 152 (polipéptidos de fusión del dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina); y SEC ID Nº: 40 a 43, 142 y 143 (polipéptidos PEGilados).

Los polipéptidos de la invención preferiblemente se unen, a través de uno de sus dominios variables individuales de inmunoglobulina, al epítopo de A-beta definido por la SEC ID Nº: 3 (epítopo N-terminal), y a través de otro dominio variable individual de inmunoglobulina al epítopo de A-beta definido por la SEC ID Nº: 4 (epítopo central). Incluso más preferiblemente, dichos polipéptidos de la invención forman contactos con al menos los aminoácidos 1 (aspartato), 3 (glutamato), 19 (fenilalanina), 20 (fenilalanina), y 23 (aspartato) del péptido A-beta humano (SEC ID Nº: 1). Los valores de CI50 medidos en un ensayo de unión TR-FRET (usando ABII002 = SEC ID Nº: 62 y ABII050 = SEC ID Nº: 100 como competidores; véase el Ejemplo 9.3) preferiblemente están en el intervalo de 10^{-9} moles/litro o menos, y más preferiblemente en el intervalo de 5 x 10^{-10} moles/litro a 10^{-12} moles/litro.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a polipéptidos que comprenden o consisten en un dominio variable individual de inmunoglobulina que consiste esencialmente en cuatro regiones flanqueantes (FR1 a FR4

respectivamente) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente), donde dichas secuencias de CDR se definen como se indica a continuación:

- CDR1: SEC ID Nº: 11.
- CDR2: SEC ID Nº: 12.
- CDR3: SEC ID Nº: 13.

o

- CDR1: SEC ID Nº: 14.
- CDR2: SEC ID Nº: 15.
- CDR3: SEC ID Nº: 16.

o

- CDR1: SEC ID Nº: 17.
- CDR2: SEC ID Nº: 18.
- CDR3: SEC ID Nº: 19.

y a polipéptidos que comprenden o consisten en un dominio VHH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nº: 47 a 111. Estos polipéptidos son bloques de construcción o intermedios útiles para la construcción de polipéptidos de unión a A-beta biparatópicos de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

De acuerdo con aspectos adicionales, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico, vectores de expresión, células hospedadoras y métodos de fabricación usados en la producción de un polipéptido de la invención. Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la invención pueden usarse, en forma aislada, para construir vectores de expresión respectivos, que después pueden introducirse por transfección en células hospedadoras usadas para la producción biofarmacéutica de los polipéptidos de la invención. Dicho método de fabricación típicamente comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora en condiciones que permitan la expresión del polipéptido, recuperar el polipéptido y purificarlo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de la presente invención son específicamente útiles en métodos de diagnóstico, prevención, tratamiento y/o alivio de las enfermedades, trastornos y afecciones indicadas con detalle más adelante y, especialmente, para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA). De esta manera, de acuerdo con este aspecto, los polipéptidos de la invención se usarán en forma de una composición farmacéutica, es decir, como un medicamento para el tratamiento,

alivio o prevención de una enfermedad, trastorno o afección, preferiblemente en un ser humano, seleccionándose dicha enfermedad trastorno o afección del grupo que consiste en enfermedades o trastornos neurodegenerativos, enfermedad de Alzheimer, demencia de tipo Alzheimer, angiopatía amiloide cerebral (CAA), trisomía 21 (Síndrome de Down), síndrome de Down en adultos, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (HCHWA-D), demencia con Cuerpos de Lewy, degeneración de lóbulo frontotemporal, glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica, miositis con cuerpos de inclusión esporádicos, y trastorno de ansiedad en un ser humano de edad avanzada, o se usarán para el diagnóstico de dicha enfermedad, trastorno o afección.

Además de lo anterior, los polipéptidos de la presente invención son específicamente útiles para el tratamiento de la DME (degeneración macular relacionada con la edad) seca y el glaucoma. La forma “seca” de DME, también conocida como "atrofia geográfica central", se debe a la atrofia de la capa epitelial de pigmento retiniano por debajo de la retina neurosensorial, que produce una pérdida de visión por la pérdida de fotorreceptores (bastones y conos) en la parte central del ojo. Actualmente no se dispone de ningún tratamiento médico o quirúrgico para esta afección. Los tratamientos disponibles hasta ahora (por ejemplo, sugeridos por el Instituto Nacional del Ojo) incluyen el uso de suplementos de vitaminas con alta dosis de antioxidantes, luteína y zeaxantina, que pueden ralentizar la progresión de la degeneración macular seca. El glaucoma es una enfermedad en la que la presión de fluido dentro del ojo aumenta, produciendo una lesión irreversible en el nervio óptico y pérdida de visión. El A-beta se co-localiza con las células ganglionares retinianas apoptóticas en el glaucoma experimental e induce una apoptosis significativa de las células ganglionares de la retina de una manera dependiente de la dosis y dependiente del tiempo.

Para fines terapéuticos, los polipéptidos de la invención o composiciones farmacéuticas que comprenden dichos polipéptidos pueden administrarse a un ser humano que lo necesita, por ejemplo, por inyección parenteral (esp. intravenosa o subcutánea) o intravítrea (esp. para el tratamiento de DME seca o glaucoma).

Otros aspectos, realizaciones y aplicaciones de la invención serán evidentes tras la descripción adicional y las reivindicaciones adjuntas presentadas más adelante.

Inesperadamente, aunque ya se ha realizado una investigación intensiva de los anticuerpos monoclonales de unión a A-beta y aunque ya se dispone de

anticuerpos muy específicos con alta afinidad por A-beta, los inventores tuvieron éxito al proporcionar un grupo de moléculas de unión a A-beta que tienen mejores características, por ejemplo, al tener valores de CI50 incluso mejores que, por ejemplo, los anticuerpos 3D6 y m266 (véase, por ejemplo, la Tabla XVI), los homólogos humanizados que se están ensayando actualmente para uso terapéutico en seres humanos.

Además, aunque pudo demostrarse que anticuerpos anti-A-beta conocidos en la técnica efectivamente pueden reducir la carga de placas amiloides en ratones transgénicos con una superproducción de A-beta (reducción de carga de placa máxima conseguida por la administración del anticuerpo monoclonal m266 o su homólogo humanizado, según se ha publicado, de aproximadamente 60%), por ejemplo, el anticuerpo m266 carece de unión a placas amiloides. De esta manera, puede esperarse que dicho anticuerpo convencional tenga menos potencial en situaciones en las que una unión directa de la molécula de anti-A-beta al A-beta presente en agregados amiloides producen un efecto beneficioso adicional. Por el contrario, los inventores pudieron generar moléculas de unión a A-beta que se unen a placas amiloides y que, por lo tanto, es de esperar que reduzcan o eliminen el amiloide vascular al promover la disociación física, sin aumentar el riesgo o inducir microhemorragias. Como el amiloide vascular está asociado con la gravedad de EA, esta ventaja de los polipéptidos de la invención puede resultar particularmente útil en el tratamiento de EA en una fase avanzada o severa, es decir, puede esperarse que sean particularmente útiles para el tratamiento de pacientes que tienen una alta carga de placas amiloides cerebrales, acumuladas durante muchos años.

De esta manera, en resumen, la mayor afinidad de los polipéptidos de unión a A-beta de la invención y sus capacidades únicas de unión a placas proporcionan una superioridad inesperada en comparación con los anticuerpos anti-A-beta convencionales descritos en la técnica.

Otro anticuerpo que se encuentra actualmente en ensayos clínicos, Ponezumab, tiene especificidad por A-beta(x-40) y no se une a A-beta(x-42), la especie patógena principal presente en EA y, por lo tanto, es de esperar que desplace el equilibrio A-beta(x-40):A-beta(x-42) hacia la especie tóxica A-beta(x-42). Por el contrario, los presente inventores tuvieron éxito al proporcionar moléculas de unión a A-beta que, mediante la unión a al menos dos epítopos diferentes, pueden capturar el A-beta(x-40) y el A-beta(x-42) para neutralizar los

efectos tóxicos de las dos especies.

En comparación con los anticuerpos convencionales en general, los polipéptidos de la invención pueden fabricarse de una forma mucho más fácil, rápida y barata, tienen mayor estabilidad y baja antigenicidad, y pueden ser adecuados para vías de administración más convenientes que la inyección o infusión, debido a su pequeño tamaño y estructura. Más específicamente, la producción de los polipéptidos de la invención por medio de fermentación en organismos hospedadores recombinantes convenientes tales como *E. coli* y levadura es eficaz en cuanto al coste, en comparación con la fabricación de anticuerpos convencionales que requieren instalaciones de cultivo de células de mamífero caras. Además, los niveles que pueden conseguirse de expresión son elevados y los rendimientos de los polipéptidos de la invención están en el intervalo de 1 a 10 g/l (E. coli) y hasta 10 g/l (levadura) y mayores. Los polipéptidos de la invención son más solubles, lo que significa que pueden almacenarse y/o administrarse en mayores concentraciones en comparación con los anticuerpos convencionales. Son estables a temperatura ambiente, lo que significa que pueden prepararse, almacenarse y/o transportarse sin el uso de un equipo de refrigeración y con ahorros en el coste de transporte, tiempo y ambiental. Los polipéptidos de la presente invención también presentan una estabilidad prolongada en condiciones extremas de pH, lo que significa que serían adecuados para la liberación por administración oral.

Además, los polipéptidos de la invención no necesitan comprender la parte Fc que está presente en los anticuerpos “clásicos”, de forma que pueden evitarse los efectos secundarios producidos por las funciones efectoras de Fc, tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Cuando se usan en inmunizaciones pasivas anti-A-beta, se sospecha que los anticuerpos convencionales (que tienen una parte Fc) son responsables de la inducción de las microhemorragias observadas en modelos humanos y animales, que están asociadas con la fijación como objetivo de los depósitos de A-beta vasculares cerebrales (angiopatía amiloide cerebral) que conduce a microhemorragias a través de ADCC y/o CDC (Wilcock, DM, Colton, CA, CNS Neurol. Disord. Drug Targets (2009) Vol. 8(1): 50-64).

De esta manera, en resumen, los polipéptidos de la invención combinan las características ventajosas de los anticuerpos convencionales, tales como un alta especificidad y una alta selectividad, con las ventajas indicadas anteriormente, y

sorprendentemente tienen características mejoradas con respecto a la afinidad y especificidad en comparación con los anticuerpos de unión a A-beta convencionales.

Cuando se comparan con dominios VHH de unión a A-beta ya conocidos en la técnica, tales como los VHH descritos en los documentos WO2006/040153, WO2007/35092 y WO2004/44204, los polipéptidos de la invención muestran características de unión significativamente mejoradas, con respecto a la unión a A-beta monomérico así como con respecto a la unión a A-beta agregado (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 3.2 y 6 presentados más adelante). Además, los polipéptidos de acuerdo con la invención se unen tanto a A-beta monomérico como a las placas amiloides, a diferencia de los dominios VHH descritos, por ejemplo, en el documento WO2008/122441 o en Habicht et al. (2007), Proc. Natl. Acad. Sci. USA;104(49): 19232-19237, que solo se unen a placas amiloides agregadas.

Además, los dominios VHH de polipéptidos de unión a A-beta de la invención se unen de una forma igualmente potente a A-beta de humano y roedor, como se muestra, por ejemplo, en el Ejemplo 7 y en la Fig. 2. La unión del polipéptido biparatópico de la invención incluso aumenta la afinidad por el A-beta humano así como por el A-beta de roedor en un factor de al menos 103, en comparación con los dominios VHH individuales. De esta manera, los polipéptidos de la invención son herramientas de detección ideales entre especies para las formas de A-beta relevantes para la enfermedad tales como A-beta(1-40) y A-beta(1-42), permitiendo el uso de modelos animales de roedor esp. para la investigación preclínica y científica. Proporcionan superioridad con respecto al anticuerpo 3D6 que se une a A-beta con una afinidad significativamente menor y que solo presenta una reacción cruzada débil con A-beta de roedor. También hay superioridad en comparación con el anticuerpo m266 que reconoce el A-beta de roedor y humano igualmente bien, pero presenta reacción cruzada con versiones truncadas N-terminalmente de A-beta, tales como p3 de forma que este anticuerpo no es útil para ciertos ensayos o análisis que se basan en la detección específica de especies de A-beta relevantes para la enfermedad, tales como A-beta(1-40) y A-beta(1-42).

Finalmente, las construcciones de VHH anti-A-beta biparatópicas de acuerdo con la invención consiguieron afinidad en un factor de >1000 veces cuando se combinaron dos VHH que detectaban dos epítopos de A-beta diferentes, lo cual está en claro contraste con las construcciones descritas en el documento

WO09/149185.

Por supuesto, los polipéptidos de la invención también son útiles para fines de diagnóstico, basándose en su afinidad (sensibilidad), especificidad (con respecto a epítopos así como a especies), y otras características como se ha indicado anteriormente, en comparación con otras moléculas de unión a A-beta conocidas en la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Fig. 1** muestra la reducción de A-beta(1-40) libre/no unido en plasma después de la administración i.p. de ABII320, ABII322, 3D6-IgG y m266-IgG, detectada 2 horas después de la inyección, en ratones transgénicos para APP (n=3). Se representa en la primera columna (recuadro sin relleno): vehículo (PBS); segunda columna: ABII320 (132 nmol/kg); tercera columna: ABII322 (132 nmol/kg); cuarta columna: IgG 3D6 (132 nmol/kg); quinta columna: IgG m266 (66,6 nmol/kg); las concentraciones para las IgG se calculan por sitio de unión (2 sitios de unión por molécula de IgG).

La **Fig. 2** muestra la unión de una construcción de VHH anti-A-beta biparatópica, incluyendo dominios VHH ABII035 y ABII059, a A-beta humano y de roedor (ratón).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definiciones

Los aspectos anteriores y otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes tras la descripción adicional de la presente memoria en la que:

a) A menos que se indique o se definan de otra manera, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que será evidente para el experto en la materia. Se hace referencia, por ejemplo, a manuales convencionales, tales como Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Lewin, "Genes IV", Oxford University Press, New York, (1990), y Roitt et al., "Immunology" (2ª Ed.), Gower Medical Publishing, London, New York (1989), así como a la técnica antecedente general citada en la presente memoria; además, a menos que se indique otra cosa, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente con detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se* como será evidente para el experto en la materia. De nuevo se hace referencia, por ejemplo, a manuales convencionales, a la técnica antecedente general mencionada anteriormente y a las referencias adicionales citadas en la presente memoria;

b) A menos que se indique otra cosa, las expresiones "*inmunoglobulina*" y "*secuencia de inmunoglobulina*" - se usen en la presente memoria para hacer referencia a un anticuerpo de cadena pesada o un anticuerpo de cuatro cadenas convencional - se usan como términos generales para incluir el anticuerpo de tamaño completo, sus cadenas individuales, así como todas las partes, dominios o fragmentos de los mismos (incluyendo, pero sin limitación, dominios de unión a antígenos o fragmentos tales como dominios VHH o dominios VH/VL, respectivamente). Además, debe entenderse que el término "secuencia", como se usa en la presente memoria, (por ejemplo en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable (individual)", "secuencia de VHH" o "secuencia de proteína"), en general, incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante como las secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que las codifican, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada;

c) El término "*dominio*" (de un polipéptido o proteína), como se usa en la presente memoria, se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene la capacidad de conservar su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos casos pueden añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio.

d) La expresión "*dominio de inmunoglobulina*", como se usa en la presente memoria, se refiere a una región globular de una cadena de anticuerpo (tal como, por ejemplo, una cadena de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o de un anticuerpo de cadena pesada), o a un polipéptido que consiste esencialmente en dicha región globular. Los dominios de inmunoglobulina se caracterizan por que retienen el plegamiento de inmunoglobulina característico de las moléculas de anticuerpo, que consiste en un sándwich de dos capas de aproximadamente 7 cadenas beta antiparalela, dispuestas en 2 láminas beta, opcionalmente estabilizadas por un enlace disulfuro conservado.

e) La expresión "*dominio variable de inmunoglobulina*", como se usa en la presente memoria, significa un dominio de inmunoglobulina que consiste esencialmente en cuatro "regiones flanqueantes" que se conocen en la técnica y más adelante como "región flanqueante 1" o "FR1"; como "región flanqueante 2" o "FR2"; como "región flanqueante 3" o "FR3"; y como "región flanqueante 4" o "FR4", respectivamente; estando dichas regiones flanqueantes interrumpidas por tres "regiones

determinantes de complementariedad" o "CDR", que se denominan en la técnica y más adelante en la presente memoria región de determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. De esta manera, la estructura general o secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina puede indicarse como se indica a continuación: FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. Es el o los dominios variables de inmunoglobulina los que confieren especificidad a un anticuerpo para el antígeno al llevar el sitio de unión al antígeno.

f) La expresión "*dominio variable individual de inmunoglobulina*", como se usa en la presente memoria, significa un dominio variable de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a un epítopo del antígeno sin emparejarse con un dominio de inmunoglobulina variable adicional. Un ejemplo de dominios variables individuales de inmunoglobulina en el significado de la presente invención son "*anticuerpos dominio*", tales como los dominios variables individuales de inmunoglobulina VH y VL (dominios VH y dominios VL). Otro ejemplo de dominio variable individual de inmunoglobulina son los "*dominios VHH"* (o simplemente "VHH") de camélidos, como se define más adelante en la presente memoria.

En vista de la definición anterior, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de 4-cadenas convencional (tal como una molécula de IgG, IgM, IgA, IgD o IgE; conocida en la técnica) o de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv tal como un fragmento Fv unido por enlaces disulfuro o un fragmento scFv, o un diacuerpo (todos conocidos en la técnica) derivado de dicho anticuerpo de 4 cadenas convencional, normalmente no se consideraría un dominio variable individual de inmunoglobulina ya que, en estos casos, la unión al epítopo respectivo de un antígeno normalmente no se produciría por un (solo) dominio de inmunoglobulina, sino por un par de dominios de inmunoglobulina (en asociación) tales como dominios variables de cadena ligera y pesada, es decir, por un par VH-VL de dominios de inmunoglobulina, que conjuntamente se unen a un epítopo del antígeno respectivo.

f1) "*dominios de VHH* ", también conocidos como VHH, dominios V_HH, fragmentos de anticuerpo VHH y anticuerpos VHH, se han descrito originalmente como el dominio (variable) de inmunoglobulina de unión a antígeno de "anticuerpos de cadena pesada" (es decir, "anticuerpos que carecen de cadenas ligeras"; Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB,

Bendahman N, Hamers R.: "Naturally occurring antibodies devoid of light chains"; Nature 363, 446-448 (1993). La expresión "dominio VHH" se ha elegido para distinguir estos dominios variables de los dominios variables de cadena pesada que están presentes en anticuerpos de 4 cadenas convencionales (que se denominan en la presente memoria "dominios V_H" o "dominios VH ") y de los dominios variables de cadena ligera que están presentes en anticuerpos de cuatro cadenas convencionales (que se denominan en la presente memoria "dominios V_L" o "dominios VL"). Los dominios VHH pueden unirse específicamente a un epítopo sin un dominio de unión a antígeno adicional (a diferencia a los dominios VH o VL de un anticuerpo de 4 cadenas convencional, en cuyo caso el epítopo se reconoce por un dominio VL junto con un dominio VH). Los dominios VHH son unidades de reconocimiento de antígeno pequeñas, sólidas y eficaces formadas por un solo dominio de inmunoglobulina.

En el contexto de la presente invención, las expresiones dominio VHH, VHH, dominio V_HH, fragmento de anticuerpo VHH, anticuerpo VHH así como "Nanobody®" y "dominio de Nanobody®" (siendo "Nanobody" una marca comercial de la compañía Ablynx N.V.; Ghent; Bélgica) se usan indistintamente y representan dominios variables individuales de inmunoglobulina (que tienen la estructura: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 y se unen específicamente a un epítopo sin necesitar la presencia de un segundo dominio variable de inmunoglobulina), y se distinguen de los dominios VH por los denominados "restos de sello", definidos, por ejemplo, en el documento WO2009/109635, Fig. 1.

Los restos aminoacídicos de un dominio VHH se enumeran de acuerdo con la numeración general para dominios V_H proporcionada por Kabat et al. ("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Nº de Publicación 91), aplicada a los dominios VHH de Camélidos, como se muestra, por ejemplo en la Figura 2 de Riechmann y Muyldermans, J. Immunol. Methods 231, 25-38 (1999). De acuerdo con esta numeración,

- FR1 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 1-30,
- CDR1 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 31-35,
- FR2 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 36-49,
- CDR2 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 50-65,
- FR3 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 66-94,
- CDR3 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 95-102, y
- FR4 comprende los restos aminoacídicos en las posiciones 103-113.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que - como es bien conocido en la técnica para los dominios V_H y para los dominios VHH - el número total de restos aminoacídicos en cada una de las CDR puede variar y puede no corresponder al número total de restos aminoacídicos indicados por la numeración de Kabat (es decir, una o más posiciones de acuerdo con la numeración de Kabat pueden no estar ocupadas en la secuencia real, o la secuencia real puede contener más restos aminoacídicos que el número permitido por la numeración de Kabat). Esto significa que, en general, la numeración de acuerdo con Kabat puede corresponder o no a la numeración real de los restos aminoacídicos en la secuencia real.

En la técnica se conocen métodos alternativos para numerar los restos aminoacídicos de dominios V_H, pudiendo aplicarse también dichos métodos de una manera análoga a dominios VHH. Sin embargo, en la presente descripción, reivindicaciones y figuras, se seguirá la numeración de acuerdo con Kabat y aplicada a dominios VHH como se ha descrito anteriormente, a menos que se indique otra cosa.

El número total de restos aminoacídicos en un dominio VHH normalmente estará en el intervalo de 110 a 120, con frecuencia entre 112 y 115. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que también pueden ser adecuadas para los fines descritos en la presente memoria secuencias más pequeñas y más largas.

Otras características estructurales y propiedades funcionales de dominios VHH y polipéptidos que los contienen pueden resumirse como se indica a continuación:

Los dominios VHH (que se han "diseñado" por la naturaleza para unirse funcionalmente a un antígeno sin la presencia, y sin ninguna interacción con un dominio variable de cadena ligera) pueden funcionar como una sola unidad estructural de unión a antígeno funcional, relativamente pequeña, dominio o polipéptido. Esto distingue los dominios VHH de los dominios VH y VL de los anticuerpos de 4 cadenas convencionales, que por sí mismos generalmente no son adecuados para la aplicación práctica como proteínas de unión a antígeno individuales o dominios variables individuales de inmunoglobulina, sino que necesitan combinarse de una forma u otra para proporcionar un sitio de unión a antígeno funcional (como, por ejemplo, en fragmentos de anticuerpo convencionales tales como fragmentos Fab; en scFv, que consisten en un dominio VH unido covalentemente a un dominio VL).

Debido a estas propiedades únicas, el uso de dominios VHH - solos o como

parte de un polipéptido de mayor tamaño - ofrece varias ventajas significativas con respecto al uso de dominios VH y VL convencionales, scFv o fragmentos de anticuerpo convencionales (tales como fragmentos Fab o F(ab')2):

- solo se necesita un único dominio para unirse un antígeno con alta afinidad y con alta selectividad, de forma que no hay necesidad de tener dos dominios separados, ni de asegurar que estos dos dominios están presentes en la conformación y configuración espacial correcta (es decir, por medio del uso de enlazadores diseñados especialmente, como ocurre con los scFv);

- los dominios VHH pueden expresarse a partir de un solo gen y no necesitan plegamiento o modificaciones postraduccionales;

- los dominios VHH pueden modificarse fácilmente por ingeniería genética en formatos multivalentes y multiespecíficos (como se analiza adicionalmente en la presente memoria);

- los dominios VHH son muy solubles y no tienen tendencia a agregarse (como ocurre con los dominios de unión a antígeno derivados de ratón descritos por Ward et al., Nature 341: 544- -546, (1989));

- los dominios VHH son muy estables al calor, pH, proteasas y otros agentes y condiciones desnaturalizantes y, por lo tanto, pueden prepararse, almacenarse y transportarse sin el uso de equipos de refrigeración, estando asociados con ahorros de coste, tiempo y ambientales;

- los dominios VHH son fáciles y relativamente baratos de preparar, incluso en la escala necesaria para la producción. Por ejemplo, los dominios y polipéptidos de VHH que los contienen pueden producirse usando fermentación microbiana (por ejemplo, como se describe adicionalmente más adelante) y no requieren el uso de sistemas de expresión de mamífero, como ocurre, por ejemplo, con fragmentos de anticuerpo convencionales;

- los dominios VHH son relativamente pequeños (aproximadamente 15 kDa, o 10 veces más pequeños que una IgG convencional) en comparación con anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y, por lo tanto,

-- muestran una mayor penetración en tejidos y

-- pueden administrarse en dosis mayores

que dichos anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos;

- los dominios VHH pueden mostrar las denominadas propiedades de unión a

cavidad (entre otras cosas debidas a su bucle CDR3 extendido, en comparación con los dominios VH convencionales) y, por lo tanto, también pueden acceder a dianas y epítopos no accesibles a anticuerpos de 4 cadenas convencionales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Anteriormente se han descrito métodos para obtener dominios VHH que se unen a un antígeno o epítopo específico, por ejemplo, en los documentos WO2006/040153 y WO2006/122786. Como también se describe en la presente memoria con detalle, los dominios VHH procedentes de camélidos pueden "humanizarse" remplazando uno o más restos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de VHH original por uno o más de los restos aminoacídicos que aparecen en la posición o posiciones correspondientes en un dominio VH de un anticuerpo de 4 cadenas convencional de un ser humano. Un dominio VHH humanizado puede contener una o más secuencias de región flanqueante completamente humana y, en una realización incluso más específica, puede contener secuencias de región flanqueante humana derivadas de DP-29, DP-47, DP-51, o partes de las mismas, opcionalmente combinadas con secuencias de JH, tales como JH5.

f2) "*Anticuerpos de dominio*", también conocidos como "Dab", "Anticuerpos de dominio", y "dAb" (las expresiones "Anticuerpos de dominio" y "dAb" usándose como marcas comerciales por el grupo de compañías GlaxoSmithKline) se han descrito, por ejemplo en Ward, E.S., *et al.*: "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli"; Nature 341: 544-546 (1989); Holt, L.J. *et al.*: "Domain antibodies: proteins for therapy"; TRENDS in Biotechnology 21(11): 484-490, (2003); y el documento WO2003/002609.

Los anticuerpos de dominio corresponden esencialmente a los dominios VH o VL de mamíferos que no son camélidos, en particular anticuerpos de 4 cadenas humanos. Para unirse a un epítopo como un dominio de unión a antígeno individual, es decir, sin estar emparejado con un dominio VL o VH, respectivamente, se necesita la selección específica con respecto a dichas propiedades de unión a antígeno, por ejemplo, usando bibliotecas de secuencias de dominios VH o VL individuales humanas.

Los anticuerpos de dominio tienen, al igual que VHH, un peso molecular de aproximadamente 13 a aproximadamente 16 kDa y, si proceden de secuencias completamente humanas, no requieren la humanización, por ejemplo, para uso

terapéutico en seres humanos. Como ocurre en los dominios VHH, se expresan bien también en sistemas de expresión procariotas, proporcionando una reducción significativa en el coste de fabricación general.

Los anticuerpos de dominio, así como los dominios VHH, pueden someterse a maduración de afinidad introduciendo una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos de una o más CDR, dando como resultado dichas alteraciones una mejor afinidad del dominio variable individual de inmunoglobulina resultante por su antígeno respectivo, en comparación con su molécula parental respectiva. Las moléculas de dominio variable individual de inmunoglobulina de afinidad madurada de la invención pueden prepararse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe por Marks *et al*., 1992, Biotechnology 10:779-783, o Barbas, *et al*., 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91: 38093813 Shier et al., 1995, Gene 169:147-155. Yelton *et al*., 1995, Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9. Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol. 226(3): 889 896; KS Johnson and RE Hawkins, "Affinity maturation of antibodies using phage display", Oxford University Press 1996.

f3) Además, será evidente para el experto en la materia que es posible "injertar" una o más de las CDR mencionadas anteriormente en otros "armazones", incluyendo, pero sin limitación, armazones humanos o armazones que no son de inmunoglobulina. En la técnica se conocen armazones y técnicas adecuadas para dicho injerto de CDR.

g) Las expresiones "*epítopo*" y "*determinante antigénico*", que pueden usarse indistintamente, se refiere a la parte de una macromolécula, tal como un polipéptido, que se reconoce por moléculas de unión a antígeno, tales como anticuerpos convencionales o los polipéptidos de la invención, y más particularmente por el sitio de unión a antígeno de dichas moléculas. Los epítopos definen el sitio de unión mínimo para una inmunoglobulina y, por lo tanto, representan la diana de especificidad de una inmunoglobulina.

La parte de una molécula de unión a antígeno (tal como un anticuerpo convencional o un polipéptido de la invención) que reconoce el epítopo se denomina *parátopo*.

h) La expresión molécula de unión (a antígeno) "*biparatópica*" o polipéptido "biparatópico", como se usa en la presente memoria, hará referencia a un polipéptido que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina como

se define en la presente memoria, donde estos dos dominios variables pueden unirse a dos epítopos diferentes de un antígeno, sin que dichos epítopos normalmente se unan al mismo tiempo por una inmunoglobulina monoespecífica, tal como, por ejemplo, un anticuerpo convencional o un dominio variable individual de inmunoglobulina. Los polipéptidos biparatópicos de acuerdo con la invención se componen de dominios variables que tienen diferentes especificidades de epítopo, y no contienen pares de dominios de variables mutuamente complementarios que se unen al mismo epítopo. Por lo tanto, no compiten entre sí por la unión a A-beta.

i) Un polipéptido (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable individual de inmunoglobulina, un polipéptido de la invención o generalmente una molécula de unión a antígeno o un fragmento de la misma) que puede "*unirse a*" o "*unirse específicamente a*", que "*tiene afinidad por*" y/o que "*tiene especificidad por*" un cierto epítopo, antígeno o proteína (o por al menos una parte, fragmento o epítopo del mismo) se dice que está "*contra*" o está "*dirigido contra*" dicho epítopo, antígeno o proteína o es una molécula de "*unión*" con respecto a dicho epítopo, antígeno o proteína.

k) Generalmente, el término "e*specificidad*" se refiere al número de tipos diferentes de antígenos o epítopos a los que se puede unir una molécula de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno particular (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable individual de inmunoglobulina o un polipéptido de la invención). La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en su afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (KD), es una medida de la fuerza de unión entre un epítopo y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor es el valor de la KD, más fuerte es la unión entre un epítopo y la molécula de unión a antígeno (como alternativa, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (KA), que es 1/KD). Como será evidente para el experto en la materia (por ejemplo, basándose en la descripción adicional de la presente memoria), la afinidad puede determinarse de una manera conocida *per se* dependiendo del antígeno específico de interés. La avidez es la medida de la fuerza de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo, un dominio variable individual de inmunoglobulina o un polipéptido de la invención) y el antígeno pertinente. La avidez está relacionada tanto con la afinidad entre un epítopo y su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno

como con el número de sitios de unión pertinente presentes en la molécula de unión a antígeno.

Típicamente, las proteínas de unión a antígeno (tales como los polipéptidos de la invención) se unirán con una constante de disociación (K_D) de 10E-5 a 10E-14 moles/litro (M) o menos, y preferiblemente de 10E-7 a 10E-14 moles/litro (M) o menos, más preferiblemente de 10E-8 a 10E-14 moles/litro, e incluso más preferiblemente de 10E-11 a 10E-13 (medido, por ejemplo, en un ensayo Kinexa como se describe en el Ejemplo 9.7), y/o con una constante de asociación (K_A) de al menos 10E7 ME-1, preferiblemente al menos 10E8 ME-1, más preferiblemente al menos 10E9 ME-1, tal como al menos 10E11 ME-1. Generalmente se considera que cualquier valor de K_D mayor de 10E-4 M indica unión no específica. Preferiblemente, un polipéptido de la invención se unirá al antígeno deseado con una K_D menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menor de 500 pM. La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o epítopo puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, incluyendo, por ejemplo, los ensayos descritos en la presente memoria, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos competitivos tipo sándwich y sus diferentes variantes conocidas *per se* en la técnica.

l) Los restos aminoacídicos se indicarán de acuerdo con el código de aminoácidos de una letra o tres letras convencional, como se conoce generalmente y está acordado en la técnica. Cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos, la expresión "*diferencia de aminoácidos*" se refiere a inserciones, deleciones o sustituciones del número de restos aminoacídicos indicado en una posición de la secuencia de referencia, en comparación con una segunda secuencia. En caso de una o más sustituciones, dichas sustituciones preferiblemente serán sustituciones de aminoácidos conservativas, lo que significa que un resto aminoacídico se remplaza por otro restos aminoacídico de estructura química similar y que tiene una influencia pequeña o esencialmente nula sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Dichas sustituciones de aminoácidos conservativas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, por el documento WO 98/49185, en el que las sustituciones de aminoácidos conservativas preferiblemente son sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (i) - (v) se sustituye por otro resto aminoacídico dentro del mismo grupo: (i) restos alifáticos

pequeños, no polares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (ii) restos polares cargados negativamente y sus amidas (sin carga): Asp, Asn, Glu y Gln; (iii) restos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (iv) restos alifáticos grandes no polares: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (v) restos aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Son sustituciones de aminoácidos conservativas particularmente preferidas las siguientes:

Ala por Gly o por Ser;

Arg por Lys;

Asn por Gln o por His;

Asp por Glu;

Cys por Ser;

Gln por Asn;

Asp por Glu;

Ala por Gly o por Ser;

His por Asn o por Gln;

Ile por Leu o por Val;

Leu por Ile o por Val;

Lys por Arg, por Gln o por Glu;

Met por Leu, por Tyr o por Ile;

Phe por Met, por Leu o por Tyr;

Ser por Thr;

Thr por Ser;

Trp por Tyr;

Tyr por Trp o por Phe;

Val por Ile o por Leu.

m) Una molécula de ácido nucleico o de polipéptido se considera "*(en) (forma) esencialmente aislada*" - por ejemplo, cuando se compara con su fuente biológica nativa y/o el medio de reacción o el medio de cultivo a partir del cual se ha obtenido - cuando se ha separado de al menos otro componente con el cual normalmente está asociada en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente minoritario. En particular, una molécula de ácido nucleico o polipéptido se considera "esencialmente aislada" cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces y hasta 1000 veces o más. Una molécula de ácido nucleico o de

polipéptido que está "en forma esencialmente aislada" preferiblemente es esencialmente homogénea, como se determina usando una técnica adecuada tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida;

n) "*Identidad de secuencia*" entre, por ejemplo, dos secuencias de dominio variable individual de inmunoglobulina indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre esas dos secuencias. Puede calcularse o determinarse como se describe en el párrafo f) en las páginas 49 y 50 del documento WO08/020079. "*Similitud de secuencia*" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservativas.

Especificidad de diana

Los polipéptidos de la invención tienen especificidad por A-beta ya que comprenden dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen específicamente a una o más moléculas de A-beta y, de forma más precisa, a epítopos dentro de la molécula o moléculas de A-beta. A-beta puede adoptar y puede existir, por ejemplo, en el cuerpo humano en diferentes formas, tales como en forma monomérica, en forma oligomérica y en forma multimérica, en formas agregadas solubles e insolubles, en forma fibrilar, en forma protofibrilar, en forma de placas amiloides y depósitos que están presentes en el sistema nervioso central, músculo esquelético, plaquetas, sistema vascular, páncreas, riñón, bazo, corazón, hígado, testículos, aorta, pulmón, intestino, piel, glándula suprarrenal, glándula salivar y glándula tiroides (Roher et al. Alzheimer's & Dementia 5 (2009) pág. 18-29). Esta dentro del alcance de la invención que los polipéptidos de la invención se unan a cualquiera de las formas en las que puede existir A-beta y especialmente a las formas que son más relevantes desde el punto de vista biológico y/o terapéutico.

Los polipéptidos de la invención pueden unirse a moléculas de péptido A-beta de diferente longitud, tales como A-beta(1-42) que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID Nº: 1, A-beta(1-40) que consiste en los aminoácidos 1 a 40 de la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID Nº: 1, A-beta(1-39) (aminoácidos 1 a 39), A-beta(1-38) (aminoácidos 1 a 38), A-beta(1-37) (aminoácidos 1 a 37), y similares. La unión del polipéptido de la invención puede tener lugar en el extremo N, el extremo C o en cualquier parte entre ellos.

Además, la invención no se limita con respecto a la forma de especie de A-beta. Así pues, los polipéptidos de la invención preferiblemente pueden unirse a A-

beta humano (SEC ID Nº: 1), si se desea para fines terapéuticos. Sin embargo, también están dentro del alcance de la invención polipéptidos que se unen, por ejemplo, a otro animal de sangre caliente o, preferiblemente, a formas de mamífero de A-beta. Un polipéptido de la invención que se une a una forma de especie de A-beta puede presentar reacción cruzada con A-beta de una o más especies distintas. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención que se unen a A-beta humano pueden o no mostrar reactividad cruzada con A-beta de una o más especies distintas de primates y/o con A-beta de una o más especies de animales que con frecuencia se usan en modelos animales para enfermedades (por ejemplo ratón - véase la SEC ID Nº: 2, rata, conejo, cerdo o perro), y en particular en modelos animales de enfermedades y trastornos asociados con A-beta (tales como las especies y modelos animales mencionados en la presente memoria). Los polipéptidos de la invención que muestran dicha reactividad cruzada pueden tener ventajas desde el punto de vista de la investigación y/o el desarrollo de fármacos, ya que permite que los polipéptidos de la invención que se unen a A-beta humano se ensayen en modelos de enfermedad importantes tales como ratones o ratas.

Además, la invención no se limita o se define por un determinante antigénico específico, epítopo, parte, dominio, subunidad o confirmación (cuando es aplicable) de A-beta contra el cual se dirigen los polipéptidos de la invención. Algunos de los epítopos preferidos de A-beta contra los cuales pueden dirigirse los polipéptidos de la invención son los epítopos usados para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva de EA. Por ejemplo, como se menciona en Weksler M., Immunity and Ageing 1, 2 (2004) y en la técnica antecedente mencionada en la presente memoria, se sabe que hay tres epítopos principales en A-beta, es decir, un epítopo N-terminal (aminoácidos 1-16 de A-beta: DAEFRHDSGYEVHHQK; SEC ID Nº: 3), un epítopo central (aminoácidos 16-28: KLVFFAEDVGSNK; SEC ID Nº: 4) y un epítopo C-terminal (aminoácidos 28-42; KGAIIGLMVGGVVIA; SEC ID Nº:5). Los polipéptidos de la invención pueden dirigirse contra cualquiera de estos epítopos. Se prefieren específicamente polipéptidos de la invención que comprenden al menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina, donde un dominio variable individual de inmunoglobulina se une al epítopo N-terminal y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina se une al epítopo central.

Polipéptidos de la invención

En su sentido más amplio, la invención proporciona nuevos agentes

farmacéuticamente activos para la prevención, tratamiento, alivio y/o diagnóstico de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con A-beta y, específicamente, EA. Los agentes de acuerdo con la invención pertenecen a una nueva clase de moléculas de unión a A-beta, particularmente polipéptidos biparatópicos que comprenden dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen al antígeno A-beta en diferentes epítopos. Más específicamente, dicho polipéptido de la invención consiste esencialmente o comprende (i) un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que se une específicamente a un primer epítopo de A-beta y (ii) un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que se une específicamente a un segundo epítopo de A-beta, donde el primer epítopo de A-beta y el segundo epítopo de A-beta no son epítopos idénticos. En otras palabras, dicho polipéptido de la invención comprende o consiste esencialmente en dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina que se dirigen contra al menos dos epítopos diferentes presentes en A-beta, donde dichos dominios variables individuales de inmunoglobulina están unidos entre sí de tal forma que pueden unirse simultáneamente a A-beta. En este sentido, el polipéptido de la invención también puede considerarse una construcción de inmunoglobulina "multivalente" y, especialmente, como una "construcción de dominio variable individual de inmunoglobulina multivalente", ya que el polipéptido entero incluye al menos dos sitios de unión para A-beta.

Un polipéptido de la invención incluye (al menos) dos dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-A-beta, donde (los) dos dominios variables individuales de inmunoglobulina se dirigen contra epítopos diferentes dentro de la molécula de A-beta. De esta manera, estos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina tendrán una especificidad de epítopo diferente y, por lo tanto, diferentes secuencias de CDR. Por esta razón, los polipéptidos de la invención en la presente memoria también se denominan "polipéptidos biparatópicos" o "construcciones de anticuerpo de dominio biparatópico" (si los dominios variables individuales de inmunoglobulina consisten o consisten esencialmente en anticuerpos de dominio), o "construcciones de Nanobody biparatópicas" o "construcciones de dominio VHH biparatópicas" o "construcciones VHH biparatópicas" (si los dominios variables individuales de inmunoglobulina consiste o consisten esencialmente en Nanobodies o dominios VHH), respectivamente, ya que los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina incluirán dos parátopos diferentes.

De acuerdo con una realización específica de la invención, en el caso en el que el polipéptido de la invención incluye más de dos dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-A-beta, es decir, tres, cuatro o incluso más dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-A-beta, al menos dos de los dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-A-beta se dirigen contra diferentes epítopos dentro de la molécula de A-beta, pudiendo unirse cualquier dominio variable individual de inmunoglobulina adicional a cualquiera de estos epítopos diferentes y/o un epítopo adicional presente en la molécula de A-beta.

De acuerdo con otra realización específica de la invención, el polipéptido de la invención puede incluir, además de los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-A-beta descritos anteriormente, cualquier otro resto adicional, tal como un enlazador (como se describe con más detalle más adelante) y/o dominios de proteína adicionales tales como, por ejemplo, un dominio variable individual de inmunoglobulina adicional (como se describe con más detalle más adelante), siempre que su unión a A-beta no se impida por dicho resto adicional. El polipéptido de la invención puede contener adicionalmente modificaciones tales como restos glicosilo, cadenas laterales de aminoácidos modificadas y similares.

Como se ha indicado anteriormente, dos dominios variables individuales de inmunoglobulina dentro de un polipéptido de la invención se unirán a diferentes epítopos de A-beta. Esto puede conseguirse en una de las siguientes maneras: Los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina se unirán a los dos epítopos dentro de la misma molécula de A-beta (unión intramolecular). Como alternativa, pueden unirse a epítopos localizados dentro de dos moléculas de A-beta distintas, es decir, un dominio variable individual de inmunoglobulina se unirá a un epítopo en una molécula de A-beta, mientras que el otro dominio variable individual de inmunoglobulina se unirá al otro epítopo en otra molécula de A-beta, presentando reacción cruzada de esta manera dos moléculas de A-beta (unión intermolecular).

De acuerdo con una realización preferida, el polipéptido de la invención se unirá a los dos epítopos dentro de la misma molécula de A-beta, de forma que no exista reacción cruzada, y los complejos de polipéptido de la invención - A-beta se formarán con una estequiometría de 1:1. De esta manera, se prefiere la unión intramolecular (predominantemente) en comparación con la unión intermolecular (predominantemente), entendiéndose que sin embargo puede producirse una fracción minoritaria de unión intermolecular. Puede realizarse una distinción entre la

unión intra- e intermolecular usando ensayos Biacore o de cromatografía de exclusión molecular (como se describe por Santora et al., Anal. Biochem., 299: 119-129) - véase el Ejemplo 8.2 mostrado más adelante en la presente memoria. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que también están dentro del alcance de esta invención polipéptidos que funcionan a través de la unió intermolecular de moléculas de A-beta separadas.

En otra realización preferida de la invención, el primer y el segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-A-beta comprendidos en un polipéptido de la invención consisten esencialmente en 4 regiones flanqueantes (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente). Dentro del polipéptido de la invención, dichos primer y segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina están unidos covalentemente, opcionalmente por una péptido enlazador como se describe más adelante, donde dicho enlazador permite estéricamente la unión óptima de al menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina a los respectivos epítopos de A-beta.

Será evidente para el experto en la materia que para usos farmacéuticos en seres humanos, los polipéptidos de la invención preferiblemente se dirigen contra A-beta humano, mientras que para fines veterinarios, los polipéptidos de la invención se dirigen preferiblemente contra A-beta de la especie a tratar.

También será evidente para el experto en la materia que cuando se usan como un agente terapéutico en seres humanos, los dominios variables individuales de inmunoglobulina comprendidos en los polipéptidos de acuerdo con la invención preferiblemente son dominios variables individuales de inmunoglobulina humanizados.

De acuerdo con la invención, los dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden ser, independientemente entre sí: Anticuerpos de dominio, es decir, dominios de anticuerpo VL o VH como se han descrito anteriormente y/o dominios VHH como se ha descrito anteriormente, y/o cualquier otro tipo de dominio variable individual de inmunoglobulina, siempre que estos dominios variables individuales de inmunoglobulina se unan al antígeno, es decir, A-beta, no mediante la formación de pares de dominios variables complementarios entre sí que se unen conjuntamente al mismo epítopo (como en el caso de, por ejemplo, un par de dominios VL-VH de un anticuerpo convencional), sino por la unión independiente a diferentes epítopos (es decir, como una molécula de unión a

antígeno "biparatópica" como se ha definido anteriormente).

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el primer y el segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina esencialmente consiste en cualquier secuencia de anticuerpo de dominio o secuencia de dominio VHH como se ha descrito anteriormente. De acuerdo con una realización particularmente preferida, el primer y el segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina esencialmente consisten en secuencias de dominio VHH. Por consiguiente, la invención en la presente memoria y, especialmente, en la parte experimental, se describirá con más detalle haciendo referencia a polipéptidos biparatópicos que comprenden dos secuencias de dominio VHH (VHH) anti-A-beta (opcionalmente humanizadas) que se unen a dos epítopos diferentes de A-beta, es decir, construcciones de dominio VHH biparatópicas. Sin embargo, será evidente para un experto en la materia que la enseñanza de la presente memoria puede aplicarse de forma análoga a polipéptidos que incluyen otros dominios variables individuales de inmunoglobulina anti-A-beta, tales como anticuerpos de dominio.

Los polipéptidos de la invención no solo poseen las características ventajosas de los anticuerpos convencionales, tales como baja toxicidad y alta selectividad, sino que también presentan propiedades adicionales. Son más solubles, lo que significa que pueden almacenarse y/o administrarse en mayores concentraciones en comparación con los anticuerpos convencionales. Son estables a temperatura ambiente, lo que significa que pueden prepararse, almacenarse y/o transportarse sin el uso de un equipo de refrigeración, lo que lleva asociado ahorros de coste, de tiempo y ambientales. Los polipéptidos de la presente invención también presentan una estabilidad prolongada en condiciones extremas de pH, lo que significa que serían adecuados para la liberación por administración oral.

Además, los polipéptidos de la invención no necesitan comprender una parte Fc que está presente en los anticuerpos “clásicos”, de forma que pueden evitarse los efectos secundarios producidos por funciones efectoras de Fc, tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Cuando se usan en inmunizaciones pasivas anti-A-beta, se sospecha que los anticuerpos convencionales (que tienen un parte Fc) son responsables de la inducción de microhemorragias observadas en modelos humanos y animales, que están asociadas con la dirección a depósitos de A-beta vasculares cerebrales (angiopatía amiloide cerebral) que conduce a microhemorragias por medio de ADCC y/o CDC (Wilcock, DM, Colton, CA, CNS

Neurol. Disord. Drug Targets (2009) Vol. 8(1): 50-64).

De acuerdo con otra realización de la invención, los al menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina presentes en un polipéptido de la invención pueden unirse entre sí directamente (en decir, sin el uso de un enlazador) o a través de un enlazador. El enlazador preferiblemente es un péptido enlazador y, de acuerdo con la invención, se seleccionará para permitir la unión de sus al menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina diferentes a cada uno de al menos dos epítopos diferentes de A-beta, dentro de la misma molécula de A-beta o dentro de dos moléculas diferentes.

Los enlazadores adecuados, entre otras cosas, dependerán de los epítopos y, específicamente, la distancia entre los epítopos en A-beta a los que se unen los dominios variables individuales de inmunoglobulina, y serán evidentes para el experto en la materia basándose en la descripción de la presente memoria opcionalmente después de algún grado limitado de experimentación rutinaria.

Además, cuando los dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen a A-beta son anticuerpos de dominio o dominios VHH, también pueden unirse entre sí a través de un tercer anticuerpo de dominio o dominio VHH (en el que los dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden unirse directamente al tercer anticuerpo de dominio o dominio VHH o a través de enlazadores adecuados). Dicho tercer anticuerpo de dominio o dominio VHH puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de dominio o dominio VHH que proporciona una mayor semivida, como se describe adicionalmente en la presente memoria. Por ejemplo, el último anticuerpo de dominio o dominio VHH puede ser un anticuerpo de dominio o dominio VHH que es capaz de unirse a una proteína de suero (humana) tal como albúmina de suero (humano) o transferrina (humana), como se describe adicionalmente en la presente memoria.

Como alternativa, los dos o más dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen a A-beta pueden unirse en serie (directamente o a través de un enlazador adecuado) y el tercer anticuerpo de dominio (individual) o dominio VHH (que puede proporcionar una mayor semivida, como se ha descrito anteriormente) puede conectarse directamente o a través de un enlazador a una de estas dos o más secuencias de inmunoglobulina mencionadas anteriormente.

En la presente memoria se describen enlazadores adecuados en relación con polipéptidos específicos de la invención y pueden comprender - por ejemplo y

sin limitación - una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos preferiblemente una longitud de 9 o más aminoácidos, más preferiblemente de al menos 17 aminoácidos, tal como de aproximadamente 20 a 40 aminoácidos. Sin embargo, el límite superior no es crítico sino que se elige por razones de conveniencia en relación, por ejemplo, con la producción biofarmacéutica de dichos polipéptidos.

La secuencia del enlazador puede ser un secuencia natural o una secuencia no natural. Si se usa para fines terapéuticos, el enlazador preferiblemente es no inmunogénico en el sujeto al que se administra el polipéptido anti-A-beta de la invención.

En los documentos WO 96/34103 y WO 94/04678 se describe otro grupo útil de secuencias enlazadoras que son enlazadores derivados de la región de bisagra de anticuerpos de cadena pesada.

Otros ejemplos son secuencias enlazadoras de polialanina tales como Ala-Ala-Ala.

Otros ejemplos preferidos de secuencias enlazadoras son enlazadores Gly/Ser de diferente longitud tales como enlazadores $(gly_xser_y)_z$, incluyendo $(gly_4ser)_3$, $(gly_4ser)_4$, (gly_4ser), (gly_3ser), gly_3 y $(gly_3ser_2)_3$.

Si el polipéptido de la invención se modifica por la unión de un polímero, por ejemplo de un resto de polietilenglicol (PEG), la secuencia enlazadora preferiblemente incluye un resto aminoacídico, tal como una cisteína o una lisina, que permite dicha modificación, por ejemplo PEGilación, en la región enlazadora. Son ejemplos preferidos de dichos enlazadores:

GGGGCGGGS (“GS9,C5”, SEC ID Nº: 6)

GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (“GS25,C5, SEC ID Nº: 7)

GGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGG ("GS27,C14", SEC ID Nº: 8),

GGGGSGGGGSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS ("GS35,C15", SEC ID Nº: 9), y

GGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (“GS35,C5”, SEC ID Nº: 10).

En las SEC ID Nº 40 a 43, 142 y 143 se muestran algunos ejemplos no limitantes de polipéptidos PEGilados de la invención, incluyendo dichos enlazadores.

Además, el enlazador también puede ser un resto de poli(etilenglicol), como se muestra, por ejemplo, en el documento WO04/081026.

En otra realización, los al menos dos dominios variables individuales de inmunoglobulina del polipéptido de la invención están unidos entre sí a través de otro resto (opcionalmente a través de uno o dos enlazadores), tal como otro polipéptido que, en una realización preferida pero no limitante, puede ser un dominio variable individual de inmunoglobulina adicional como ya se ha descrito anteriormente. Dicho resto puede ser esencialmente inactivo o puede tener un efecto biológico tal como una mejora de las propiedades deseadas del polipéptido o puede conferir una o más propiedades deseadas adicionales al polipéptido. Por ejemplo, y sin limitación, el resto puede mejorar la semivida de la proteína o el polipéptido y/o puede reducir su inmunogenicidad o mejorar cualquier otra propiedad deseada.

Algunos ejemplos no limitantes de dichas construcciones son las construcciones de las SEC ID Nº: 34 a 39.

De acuerdo con una realización preferida, los polipéptidos de la invención comprenden un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que se une al epítopo como se define por la SEC ID Nº: 3, y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que se une al epítopo como se define por la SEC ID Nº: 4, o un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que se une al epítopo como se define por la SEC ID Nº: 4, y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que se une al epítopo como se define por la SEC ID Nº: 3.

Incluso más preferiblemente, el contacto entre los dominios variables individuales de inmunoglobulina y la molécula de A-beta se realiza como se describe en los Ejemplos 8.2 y 8.3, es decir, el polipéptido de la invención contacta con al menos los aminoácidos 1, 3, 13, 20 y 23 del péptido A-beta humano o de ratón.

Preferiblemente, los polipéptidos de la invención tienen valores de la constante de disociación (K_D), medidos en los ensayos Kinexa descritos en el Ejemplo 9.7, en el intervalo de 10^{-6} moles/litro o menos, más preferiblemente 10^{-9} moles/litro o menos e incluso más preferiblemente en el intervalo de 10^{-11} a 10^{-13} moles/litro, o tienen un valor de CI50 medido en un ensayo de unión TR-FRET, como se expone en el Ejemplo 9.3, de 10^{-9} moles/litro o inferior, y preferiblemente en el intervalo de 5×10^{-10} moles/litro a 10^{-12} moles/litro.

De acuerdo con una realización incluso más preferida de la invención, las secuencias de CDR en el polipéptido de la invención son como se definen más

adelante y también son tales que el polipéptido de la invención se une a A-beta con una constante de disociación (K_D) como la establecida en el párrafo anterior o tienen valores de CI50 como los indicados anteriormente.

De acuerdo con una realización específica de la invención, el polipéptido de la invención comprende dos dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a A-beta que tienen la estructura (SEC ID Nº proporcionadas en la Tabla I más adelante):

Dominio variable individual de inmunoglobulina 1:

FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4,

Dominio variable individual de inmunoglobulina 2:

FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4,

donde:

CDR(1)3 se selecciona del grupo que consiste en:

- las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 y SEC ID Nº: 16; y

- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dichas secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 o la SEC ID Nº: 16, respectivamente;

y

CDR(2)3 se selecciona entre el grupo que consiste en:

- la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19; y

- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19.

y

donde las otras secuencias de CDR y las secuencias de región flanqueante no se limitan específicamente, sino que se seleccionan por el experto en la materia de acuerdo con las necesidades específicas, tales como regiones flanqueantes humanizadas en caso de un polipéptido destinado para el uso en seres humanos para reducir la inmunogenicidad del polipéptido de la invención. El orden de los dominios variables individuales de inmunoglobulina 1 y 2 no se limita de forma particular, de forma que, dentro de un polipéptido de la invención, el dominio variable individual de inmunoglobulina 1 puede localizarse en el extremo N y el dominio variable individual de inmunoglobulina 2 puede localizarse en el extremo C,

o viceversa.

Preferiblemente, CDR(1)3 se selecciona del grupo que consiste en las secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 y SEC ID Nº: 16 y CDR(2)3 es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19.

Incluso más preferiblemente, el polipéptido de la invención comprende dos dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a A-beta que tienen la estructura (SEC ID Nº proporcionadas en la Tabla I a continuación):

Dominio variable individual de inmunoglobulina 1:

FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4,

Dominio variable individual de inmunoglobulina 2:

FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4,

donde:

CDR(1)1 es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 11 (que es igual que la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 14);

CDR(1)2 se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 12 y SEC ID Nº: 15;

CDR(1)3 se selecciona del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 y SEC ID Nº: 16;

CDR(2)1 es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 17;

CDR(2)2 es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 18; y

CDR(2)3 es la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19;

y

donde las otras secuencias de región flanqueante no se limitan específicamente sino que se seleccionan por el experto en la materia de acuerdo con las necesidades específicas, tales como regiones flanqueantes humanizadas en caso de un polipéptido destinado para el uso en seres humanos para reducir la inmunogenicidad del polipéptido de la invención.

En el polipéptido de la invención como se ha descrito anteriormente, el orden particular de los dominios variables individuales de inmunoglobulina 1 y 2 como se ha indicado anteriormente dentro del polipéptido no es crítico, de forma que el dominio variable individual de inmunoglobulina 1 mencionado anteriormente puede localizarse en el extremo N del polipéptido, seguido del dominio variable individual de inmunoglobulina 2 mencionado anteriormente; como alternativa, el dominio variable individual de inmunoglobulina 2 mencionado anteriormente puede localizarse en el extremo N del polipéptido, seguido del dominio variable individual

de inmunoglobulina 1 mencionado anteriormente. En ambos casos, pueden estar presentes secuencias y restos adicionales dentro del polipéptido de la invención, por ejemplo, en el extremo N, en el extremo C o localizados entre los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina, como se indica con más detalle en la presente memoria.

Las secuencias de CDR anteriores y series de 6 secuencias de CDR como se presentan en los polipéptidos de la invención y se ha indicado anteriormente se resumen en las siguientes Tablas I y II, respectivamente:

TABLA I y TABLA II: Combinaciones de CDR preferidas en polipéptidos de la invención que comprenden dos dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a A-beta diferentes

TABLA I: Secuencias de CDR

SEC ID Nº:	Secuencia de aminoácidos
11	TDTMG
12	AVTWNSGRTNYADSVKG
13	HRLVVGGTSVGDWRY
14	TDTMG
15	AVTWNSGRINYADSVKG
16	HRFVVGGNRVEDWRY
17	NYNMG
18	AVSRSGVSTYYADSVKG
19	AYRGTAINVRRSYSS

TABLA II: Series preferidas de combinaciones de secuencias de CDR / CDR (secuencias definidas por su SEC ID Nº: como se proporciona en la TABLA I anterior):

	serie 1	serie 2	serie 3	serie 4
CDR(1)1	11	14	17	17
CDR(1)2	12	15	18	18
CDR(1)3	13	16	19	19

CDR(2)1	17	17	11	14
CDR(2)2	18	18	12	15
CDR(2)3	19	19	13	16

En la técnica se conocen secuencias de región flanqueante (FR) de inmunoglobulina humana que también pueden usarse como secuencias de región flanqueante para los dominios variables individuales de inmunoglobulina como se han descrito anteriormente. También se conocen en la técnica métodos para humanizar regiones flanqueantes de dominios variables individuales de inmunoglobulina derivados de especies distintas de seres humanos.

En una realización preferida, los polipéptidos de la invención comprenden las siguientes secuencias de aminoácidos de región flanqueante 1 a 4 (FR1 a FR4; SEC ID Nº indicados en la Tabla III mostrada a continuación):

FR1 es o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 20 y SEC ID Nº: 21;

FR2 es o comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 22;

FR3 es o comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 23 y SEC ID Nº: 24; y

FR4 es o comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 25;

TABLA III Secuencias de aminoácidos de FR

SEC ID Nº:	Secuencia de aminoácidos
20	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFR
21	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN
22	WFRQAPGKGREFVA
23	RFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
24	RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA
25	WGQGTLVTVSS

Son ejemplos específicos de dominios variables individuales de inmunoglobulina que tienen las secuencias de FR y CDR mostradas anteriormente:

Dominio variable individual de inmunoglobulina 1 (el primer aminoácido, es decir, el glutamato, opcionalmente puede estar ausente):

evqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskntay lqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvss (ABII035; SEC ID Nº: 44).

Dominio variable individual de inmunoglobulina 2 (el primer aminoácido, es decir, el glutamato, opcionalmente puede estar ausente):

evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntv ylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvss (ABII059; SEC ID Nº: 45).

A continuación se proporcionan también ejemplos específicos de polipéptidos de la invención que incluyen, en una sola cadena polipeptídica, dos dominios variables individuales de inmunoglobulina como se ha mostrado anteriormente y, opcionalmente, un enlazador que conecta los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina.

De acuerdo con una realización preferida, los polipéptidos de la invención incluyen, especialmente cuando se usan como un agente terapéutico, un resto que prolonga la semivida del polipéptido de la invención en suero u otros fluidos corporales de un paciente. El término "semivida" significa el tiempo que se necesita para que la concentración en suero del polipéptido (modificado) se reduzca en 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación del polipéptido y/o la eliminación y/o secuestro por mecanismos naturales.

Más específicamente, dicho resto que prolonga la semivida puede estar unido covalentemente o fusionado a dicho polipéptido y puede ser, sin limitación, una parte Fc, un resto de albúmina, un fragmento de un resto de albúmina, un resto de unión a albúmina, tal como un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-albúmina, un resto de unión a transferrina, tal como un dominio variable individual de inmunoglobulina anti-transferrina, una molécula de polioxialquileno, tal como una molécula de polietilenglicol, un péptido de unión a albúmina o derivados de hidroxietil almidón (HES).

De acuerdo con una realización, el polipéptido de la invención puede unirse a una o más partes de anticuerpos, fragmentos o dominios que confieren una o más funciones efectoras al polipéptido de la invención y/o puede conferir la capacidad de unirse a uno o más receptores de Fc. Por ejemplo, para este fin y sin limitación, las partes de anticuerpo pueden ser o pueden comprender dominios CH2 y/o CH3 de

un anticuerpo, tales como de un anticuerpo de cadena pesada (como se ha descrito anteriormente en la presente memoria) y más preferiblemente de un anticuerpo de 4 cadenas humano convencional; específicamente, el polipéptido de la invención puede unirse a una región Fc, por ejemplo de IgG humana, de IgE humana o de otra Ig humana. Por ejemplo, el documento WO 94/04678 describe anticuerpos de cadena pesada que comprenden un dominio VHH de Camélido o un derivado humanizado del mismo, donde el dominio CH2 y/o CH3 de Camélido se han remplazado por dominios CH2 y/o CH3 humanos, para proporcionar una inmunoglobulina que consiste en 2 cadenas pesadas que comprenden, cada una, un dominio VHH - opcionalmente humanizado - y dominios CH2 y CH3 humanos (pero no dominio CH1), teniendo dicha inmunoglobulina la función efectora proporcionada por los dominios CH2 y CH3, pudiendo funcionar sin presencia de ninguna cadena ligera y teniendo una mayor semivida en comparación con los dominios VHH correspondientes sin dicha modificación.

Son ejemplos específicos de polipéptidos de la invención que incluyen una parte Fc (con o sin funciones efectoras) los polipéptidos indicados a continuación en la presente memoria:

evqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssggggsgggsevqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEC ID Nº: 26)

evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssgggsggggsggggsggggsggggsgggevqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEC ID Nº: 27)

evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntvylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssggggsggggsggggcggggsggggsgggg

sggggsevqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrd
nskntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalg
clvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkt
htcppcpapellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynsty
rvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiav
ewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEC ID
Nº: 28)

evqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskntay
lqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssggggsgggsevqllesggglvqpggslrlscaa
sgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntvylqmnslrpedtavyycaaayr
gtainvrrsysswgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavl
qssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpape**aa**ggpsvflfppkpkdtlm
isrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalp
apiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsffly
skltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEC ID Nº: 29)
evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntv
ylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssgggsggggsggggsggggsggggsgggev
qllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrdnskntaylq
mnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpe
pvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpa
pe**aa**ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltv
lhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesng
qpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEC ID Nº: 30)
evqllesggglvqpggslrlscaasgrtfnnynmgwfrqapgkgrefvaavsrsgvstyyadsvkgrftisrdnskntv
ylqmnslrpedtavyycaaayrgtainvrrsysswgqgtlvtvssggggsggggsggggcggggsggggsgggg
sggggsevqllesggglvqpggslrlscvhsgptfrtdtmgwfrqapgkgrefvaavtwnsgrinyadsvkgrftisrd
nskntaylqmnslrpedtavyycaahrfvvggnrvedwrywgqgtlvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalg
clvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkt
htcppcpape**aa**ggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyns
tyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdia
vewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk (SEC
ID Nº: 31)

De acuerdo con una realización adicional de la invención, los dos dominios variables individuales de inmunoglobulina pueden fusionarse a una molécula de albúmina de suero, tal como se describe, por ejemplo, en los documentos

WO01/79271 y WO03/59934.

En la Tabla IV se proporciona un ejemplo de un polipéptido de unión a A-beta biparatópico de la invención que comprende un resto de albúmina de suero humano.

Tabla IV: Proteína de fusión a HSA

Información de secuencia	Descripción	SEC ID Nº:
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWF RQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNS KNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSS WGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISR DNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE DWRYWGQGTLVTVSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKAL VLIAFAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERN ECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKK YLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAW AVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLEC ADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEV ENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFL YEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECY AKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLV RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP CAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRP CFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDK ETCFAEEGKKLVAASQAALGL	059-27GS-035-HSA	32

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención comprende un resto que se une a un antígeno encontrado en la sangre, tal como albúmina de suero, inmunoglobulinas de suero, proteína de unión a tirosina, fibrinógeno o transferrina, confiriendo de esta manera una mayor semivida *in vivo* al polipéptido

resultante de la invención. De acuerdo con una realización preferida específicamente, dicho resto es una inmunoglobulina de unión a albúmina y, de una forma especialmente preferida, un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina tal como un dominio VHH de unión a albúmina.

Si está destinado para el uso en seres humanos, dicho dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina preferiblemente se unirá a albúmina de suero humano y preferiblemente será un dominio VHH de unión a albúmina humanizado.

En la técnica se conocen dominios variables individuales de inmunoglobulina que se unen a albúmina de suero humano y se describen con más detalle, por ejemplo, en el documento WO2006/122786. Un dominio VHH de unión a albúmina específicamente útil consiste o contiene la secuencia de aminoácidos: evqlvesggglvqpgnslrlscaasgftfssfgmswvrqapgkglewvssisgsgsdtlyadsvkgrftisrdnakttly lqmnslrpedtavyyctiggslsrssqgtlvtvss (SEC ID Nº: 33)

En la Tabla V se muestran ejemplos específicos de polipéptidos de la invención que comprenden un dominio VHH de unión a albúmina:

TABLA V: Polipéptidos biparatópicos de la invención, que comprenden dos dominios VHH anti-A-beta y un dominio VHH anti-HSA

Clon	Información de secuencia	Descripción	SEC ID Nº:
ABII316	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAIN VRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGS**EVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTV SS**GGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCV HSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRI NYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVY YCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	059-9GS-**Alb8**-9GS-035	34
ABII317	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTI	059-35GS-035-9GS-Alb8	35

	SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAIN VRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMN SLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSG SDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS		
ABII318	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMG WFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAIN VRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAP GKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKN TAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWR YWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNS LRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	059-9GS-035-9GS-Alb8	36
ABII319	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTI SRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGG NRVEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGRE FVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQG TLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLR LSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGS GSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS	035-35GS-059-9GS-Alb8	37
ABII320	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTIS RDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGN	035-9GS-Alb8-9GS-059	38

	RVEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVES GGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPG KGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS GGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA AAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS		
ABII321	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGW FRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISR DNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNR VEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSG GGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR TFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA AYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	035-9GS-Alb8-9GS-059 (primera E delecionada)	39

En otra realización preferida, el polipéptido de la invención comprende un resto que se une a albúmina de suero, donde dicho resto es un péptido de unión a albúmina, como se describe, por ejemplo, en las publicaciones de patente internacionales WO2008/068280 y WO2009/127691.

De acuerdo con otra realización, una modificación que prolonga la semivida de un polipéptido de la invención (reduciendo también dicha modificación la inmunogenicidad del polipéptido) comprende la unión de un polímero farmacológicamente aceptable adecuado, tal como poli(etilenglicol) (PEG) de cadena lineal o ramificada o derivados del mismo (tales como metoxipoli(etilenglicol) o mPEG). Generalmente, puede usarse cualquier forma adecuada de PEGilación, tal como la PEGilación usada en la técnica para anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos de dominio y scFv); se hace referencia, por ejemplo, a: Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002); Veronese y Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003); Harris y Chess, Nat. Rev. Drug. Discov. 2 (2003); documento WO 04/060965; y documento US6.875.841.

También están disponibles en el mercado diversos reactivos para la PEGilación de polipéptidos, por ejemplo, en Nektar Therapeutics, USA o NOF Corporation, Japón, tal como la Serie Sunbright® EA, Serie SH, Serie MA, Serie CA y Serie ME, tal como Sunbright® ME-100MA, Sunbright® ME-200MA y Sunbright® ME-400MA.

Preferiblemente se usa PEGilación dirigida, en particular a través de un resto de cisteína (véase, por ejemplo, Yang et al., Protein Engineering 16, 761-770 (2003)). Por ejemplo, para este fin, el PEG puede unirse a un resto de cisteína que existe de forma natural en un polipéptido de la invención, un polipéptido de la invención puede modificarse para introducir convenientemente uno o más restos de cisteína para la unión de PEG, o una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más restos de cisteína para la unión de PEG puede fusionarse al extremo N y/o C y/o de una región enlazadora que une dos o más dominios funcionales de un polipéptido de la invención, todo ello usando técnicas de ingeniería de proteínas conocidas *per se* para el experto en la materia.

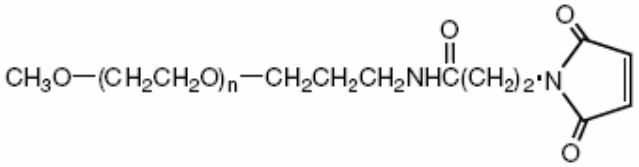
Preferiblemente, para los polipéptidos de la invención, se usa un PEG con un peso molecular mayor de 5 kDa, tal como mayor de 10 kDa y menor de 200 kDa, tal como menor de 100 kDa; por ejemplo en el intervalo de 20 kDa a 80 kDa.

Con respecto a la PEGilación, debe indicarse que, en general, la invención también incluye cualquier polipéptido de la invención que se ha PEGilado en una o más posiciones de aminoácidos, preferiblemente de tal forma que dicha PEGilación (1) aumenta la semivida *in vivo*; (2) reduce la inmunogenicidad; (3) proporciona una o más propiedades beneficiosas adicionales conocidas *per se* para la PEGilación; (4) no afecta esencialmente a la afinidad del polipéptido por A-beta (por ejemplo no reduce dicha afinidad en más de 50 %, y más preferiblemente no la reduce en más de 10%, como se determina por un ensayo adecuado, tal como los descritos en los Ejemplos presentados más adelante); y/o (4) no afecta a ninguna de las otras propiedades deseadas de los polipéptidos de la invención. Los grupos PEG adecuados y métodos para unirlos, de forma específica o no específica, serán evidentes para el experto en la materia.

De acuerdo con una realización preferida específicamente de la invención, un polipéptido PEGilado de la invención incluyen un resto de PEG lineal que tiene un peso molecular de 40 kDa o 60 kDa, donde el resto de PEG se une al polipéptido en una región enlazadora y, específicamente, a un resto de Cys en la posición 5 de un péptido enlazador-GS9 como se muestra en la SEC ID Nº: 6, en la

posición 14 de un péptido enlazador-GS27 como se muestra en la SEC ID Nº: 8, o en la posición 15 de un péptido enlazador-GS35 como se muestra en la SEC ID Nº: 9, o en la posición 5 de un péptido enlazador-35GS como se muestra en la SEC ID Nº: 10.

En la Tabla VI mostrada a continuación se proporcionan ejemplos preferidos de polipéptidos de la invención, PEGilados preferiblemente con uno de los reactivos de PEG mencionados anteriormente, tales como "Sunbright® ME-400MA" como se muestra en la siguiente fórmula química:



que tiene un peso molecular medio de 40 kDa:

Tabla VI: Polipéptidos PEGilados de la invención; C* indica el resto de Cys que lleva el resto de PEG

Clon	Información de secuencia	Descripción	SEC ID Nº:
ABII322	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGG**C***GGGGSGGGGSGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	ABII059-enlazador 27GS con C en la posición 14-ABII035	40
ABII323	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**C***GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR	ABII059-enlazador 35GS con C en la posición 15-ABII035	41

	FTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS		
ABII305	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYN MGWFRQAPGKEREFVAAVSRSGVSTYYADSVK GRFTISRDNAKNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGAA YRGTAINVRRSYDSWGQGTQVTVSSGGGG**C***G GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTM GWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKG RFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAH RFVVGGNRVEDWRYWGQGTQVTVSS	ABII050-enlazador 35GS con C en la posición 5-ABII002	42
ABII306	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYN MGWFRQAPGKEREFVAAVSRSGVSTYYADSVK GRFTISRDNAKNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGAA YRGTAINVRRSYDSWGQGTQVTVSSGGGG**C***G GGSEVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFR TDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYAD SVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYY CTAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTQVTVSS	ABII050-enlazador 9GS con C en la posición 5-ABII002	43
ABII314	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYN MGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAA YRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGG**C***GG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMG WFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGR FTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRF VVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	ABII059-enlazador 35GS con C en la posición 5-ABII035	142
ABII315	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYN MGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAA YRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGG**C***GG GSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRT	ABII059-enlazador 9GS con C en la posición 5-	143

	DTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADS VKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCA AHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	ABII035	

De acuerdo con una realización adicional, el polipéptido de la invención comprende además un resto que permite que el polipéptido atraviese la barrera hematoencefálica. En particular, dicho resto que permite que los polipéptidos resultantes de la invención atraviesen la barrera hematoencefálica pueden ser uno o más (tales como dos y preferiblemente uno) dominios variables individuales de inmunoglobulina, tales como los fragmentos de anticuerpo que se dirigen al cerebro (VHH) FC44 y FC5 descritos en el documento WO02/057445. Se muestran ejemplos de los mismos en la Tabla XIX mostrada a continuación.

De esta manera, los polipéptidos de la invención también pueden describirse por la siguiente fórmula general:

A - ISVD1 - B - ISVD2 - C, donde

ISVD1 e ISVD2 indican un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a A-beta como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, que se une a diferentes epítopos de A-beta, tales como, por ejemplo, los dominios variables individuales de inmunoglobulina de acuerdo con las SEC ID Nº 44 y 45, respectivamente; y

A, B y C independientemente entre sí, indican:

- ningún resto adicional (es decir, A es el extremo N de ISVD1, B es un enlace peptídico que une ISVD1 e ISVD2 y C es el extremo C de ISVD2)
- uno o más dominios seleccionados del grupo de dominios CH1, CH2 y CH3 de IgG, IgM, IgD, IgE humanas y similares, y preferiblemente C indica CH2-CH3;
- albúmina o un fragmento de la misma y preferiblemente albúmina de suero humano o un fragmento de la misma;
- un resto de unión a albúmina, y preferiblemente un dominio variable individual de inmunoglobulina de unión a albúmina o un péptido de unión a albúmina;
- un péptido enlazador, que opcionalmente está PEGilado; y preferiblemente B indica un péptido enlazador que tiene de 3 a 45 aminoácidos, incluyendo al menos un resto de cisteína que está PEGilado, preferiblemente con un resto PEG40 o PEG60;
- uno o más restos de unión a A-beta, preferiblemente un dominio variable de inmunoglobulina anti-A-beta adicional, idéntico o no idéntico a ISVD1 o ISVD2

- un polipéptido, preferiblemente un dominio variable individual de inmunoglobulina, que confiere al polipéptido propiedades de paso a través de la barrera hematoencefálica, tal como FC44 y FC5 descritos en el documento WO02/057445;

o donde

ISVD1, ISVD2, B y C tienen el significado indicado anteriormente y

- A indica un resto de Met N-terminal, opcionalmente formilado, por ejemplo como resultado de la expresión en un organismo hospedador heterólogo; y/o una secuencia señal o líder que dirige la secreción del polipéptido de la invención desde una célula hospedadora tras la síntesis; y/o una pro-secuencia que se elimina opcionalmente después de la expresión del polipéptido en una célula hospedadora adecuada;

o donde

ISVD1, ISVD2, A y B tienen el significado indicado anteriormente y

- C indica un "marcador", tal como una secuencia de aminoácidos o resto que permite o facilita la purificación del polipéptido de la invención, por ejemplo usando técnicas de afinidad dirigidas contra dicha secuencia o resto; pudiendo eliminarse dicho marcador opcionalmente después de dicha etapa de purificación, por ejemplo, por escisión química o enzimática, para proporcionar la secuencia madura del polipéptido; para este fin, el marcador puede unirse opcionalmente a la secuencia del polipéptido a través de una secuencia enlazadora escindible o contener un motivo escindible. Algunos ejemplos preferidos pero no limitantes de dichos restos son múltiples restos de histidina, restos de glutatión y un marcador myc tal como AAAEQKLISEEDLNGAA (SEC ID Nº: 46).

Uso terapéutico

De acuerdo con un aspecto adicional importante, el polipéptido de la invención se usa para fines terapéuticos, tales como

- para la prevención, tratamiento y/o alivio de un trastorno, enfermedad o afección como se indica más adelante, especialmente en un ser humano, tal como la Enfermedad de Alzheimer (EA), DME seca o glaucoma;

- en un método de tratamiento de un paciente que necesita dicha terapia, comprendiendo dicho método la administración, al sujeto que lo necesita, de una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un polipéptido de la invención o una composición farmacéutica (como se indica con detalle más adelante) que comprende dicho polipéptido de la invención, donde dicho sujeto que necesita dicha terapia puede ser un humano que padece cualquiera de los trastornos,

enfermedades o afecciones indicadas más adelante, tales como EA, DME seca o glaucoma;

- para la preparación de un medicamento para la prevención, tratamiento o alivio de trastornos, enfermedades o afecciones como se indica más adelante, tales como EA, DME seca o glaucoma en un ser humano;

- como ingrediente activo en una composición farmacéutica o medicamento usado para los fines mencionados anteriormente.

El trastorno, enfermedad o afección (en lo sucesivo: enfermedad) como se ha mencionado anteriormente es una enfermedad que puede prevenirse y/o tratarse y/o aliviarse mediante la administración de un polipéptido de la invención al paciente o ser (humano) y, más específicamente, una enfermedad mediada por la disfunción de A-beta, tal como una disfunción de la producción, deposición o ausencia de eliminación de A-beta y/o una enfermedad mediada por la formación de placas amiloides, formación de oligómeros de A-beta y similares. Incluso más específicamente, la enfermedad es una enfermedad que puede prevenirse y/o tratarse y/o aliviarse mediante la modulación, reducción y/o inversión de la formación (indeseada) o acumulación de A-beta y/o de placas amiloides y/o de oligómeros de A-beta en un paciente, comprendiendo dichas enfermedades, por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas, siendo la enfermedad neurodegenerativa relacionada con A-beta más prominente la EA.

De esta manera, los polipéptidos de la invención pueden usarse en un método para la prevención, tratamiento o alivio de enfermedades tales como:

- Enfermedad de Alzheimer (EA; todos los tipos y estadios de la enfermedad incluyendo estadios preclínicos y prodromales); también conocida como "demencia de tipo Alzheimer";

- la forma seca de degeneración macular relacionada con la edad (DME seca; atrofia geográfica central)

- glaucoma;

- angiopatía amiloide cerebral (CAA);

- trisomía 21 (Síndrome de Down), incluyendo síndrome de Down en adultos;

- hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (HCHWA-D);

- demencia con Cuerpos de Lewy;

- degeneración de lóbulo frontotemporal;

- glaucoma;

- esclerosis lateral amiotrófica;

- miositis con cuerpos de inclusión esporádicos; y

- trastorno de ansiedad en seres humanos de edad avanzada (por ejemplo, de al menos 55 años), seleccionados del grupo que consiste en trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de pánico, ataque de pánico, agorafobia, trastorno de estrés post-traumático, fobia social, trastorno con comportamiento destructivo y síndrome de fatiga crónica (donde dicho ser humano de edad avanzada puede tener un diagnóstico o no de una afección relacionada con A-beta, seleccionada entre EA clínica o preclínica, angiopatía amiloide crónica y síndrome de Down);

donde dicho método comprende administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que lo comprende.

En el contexto de la presente invención, la expresión "prevención, tratamiento y/o alivio" no solo comprende la prevención y/o tratamiento y/o alivio de la enfermedad, sino que también comprende, en general, la prevención del inicio de la enfermedad, la ralentización o inversión del progreso de la enfermedad, la prevención o ralentización del inicio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la reducción y/o alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la reducción de la gravedad y/o la duración de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma y/o la prevención de un aumento adicional en la gravedad de la enfermedad y/o de cualquier síntoma asociado con la misma, la prevención, reducción o inversión de cualquier lesión fisiológica producida por la enfermedad, y en general cualquier acción farmacológica que sea beneficiosa para el paciente que está tratando.

Específicamente, en el caso de EA, los polipéptidos, composiciones y métodos de la invención pueden usarse para ayudar a prevenir o retrasar el inicio de EA en pacientes con factores de riesgo identificados para EA y/o depósito de A-beta demostrados, para tratar pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI), que tienen riesgo de padecer EA, y para prevenir o retrasar el inicio de EA en los pacientes que por otra razón se esperaría que progresaran desde fases de enfermedad preclínicas o prodromales a demencia. Los factores de riesgo genéticos para EA incluyen mutaciones específicas en el gen APP (en particular en las posiciones 670 y 671 así como en la posición 717), en los genes de presenilina PS1 y PS2 y en ApoE4. Otros factores de riesgo incluyen una historia familiar de EA, hipercolesterolemia, aterosclerosis, diabetes y/o edad avanzada. La disposición de para EA puede diagnosticarse de forma prematura analizando las

concentraciones de A-beta(1-42) y tau en el CSF. Las técnicas de formación de imágenes neurales (por ejemplo PET y MRI) pueden identificar pacientes con riesgo de convertirse en EA. En general, puede permitirse el uso de varios biomarcadores para diagnosticar EA en una fase muy temprana con una alta sensibilidad y especificidad.

En el caso de una predisposición al síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch y angiopatía beta-amiloide cerebral, los polipéptidos, composiciones y métodos de la invención también pueden ser útiles para prevenir sus posibles consecuencias, tales como hemorragias lobulares únicas y recurrentes.

El sujeto a tratar será un mamífero, y en más en particular un ser humano. Como será evidente para el experto en la materia, el sujeto a tratar en particular será una persona que padece, o con riesgo de padecer, las enfermedades, trastornos o afecciones mencionadas en la presente memoria.

También será evidente para el experto en la materia que los métodos de tratamiento anteriores de una enfermedad incluyen la preparación de un medicamento para el tratamiento de dicha enfermedad. Además, está claro que los polipéptidos de la invención pueden usarse como ingrediente activo en un medicamento o composición farmacéutica destinada al tratamiento de las enfermedades anteriores. De esta manera, la invención también se refiere al uso de un polipéptido de la invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento y/o alivio de cualquiera de las enfermedades, trastornos o afecciones mencionadas anteriormente en la presente memoria. La invención además se refiere a un polipéptido de la invención para uso terapéutico o profiláctico y, específicamente, para la prevención, tratamiento y/o alivio de cualquiera de las enfermedades, trastornos o afecciones mencionadas anteriormente en la presente memoria. La invención además se refiere a una composición farmacéutica para la prevención, tratamiento y/o alivio de las enfermedades, trastornos o afecciones mencionadas anteriormente en la presente memoria, donde dicha composición comprende al menos un polipéptido de la invención.

Sin deseo de limitarse por una teoría específica, el efecto terapéutico o profiláctico anterior puede obtenerse por el siguiente mecanismo: Los polipéptidos de la invención se unen A-beta, con lo que se inhibe su interacción con una o más moléculas de A-beta distintas o la interacción de A-beta con un receptor o la

interacción de A-beta con una biomolécula soluble o la interacción de A-beta con una biomolécula insoluble. El A-beta diana puede ser parte de una placa o suspensión o solución, o una o más de estas, donde las otras moléculas de A-beta también pueden formar parte de una placa, en suspensión o solución o una o más de estas. La eliminación de diferentes formas de A-beta, tales como la forma monomérica, formas oligo- y multiméricas, formas agregadas solubles e insolubles, formas fibrilares, formas proto-fibrilares y placas amiloides del cerebro, vasos sanguíneos u otras partes del cuerpo, puede deberse a la unión del polipéptido de la invención a A-beta. La reducción de los niveles de A-beta en un fluido corporal, y preferiblemente la reducción del nivel de A-beta soluble en la sangre por inhibición de la interacción entre una molécula de A-beta y otra molécula, tal como, por ejemplo, otra molécula de A-beta, aliviará los síntomas de enfermedades neurales degenerativas, ralentizará o detendrá la progresión de la enfermedad y/o restaurará la lesión cerebral, memoria y cognición.

De acuerdo con un aspecto adicional y más general, la invención se refiere a un método para inmunoterapia, y en particular para inmunoterapia pasiva, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que padece, o con riesgo de padecer, las enfermedades mencionadas en la presente memoria, una cantidad farmacéuticamente activa de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que lo comprende.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un método (i) para la prevención, tratamiento y/o alivio del deterioro cognitivo, y/o (ii) para restaurar la función cognitiva y/o mejorar la función cognitiva, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéutica activa de un polipéptido de la invención y/o de una composición farmacéutica que lo comprende.

Los polipéptidos de la invención y/o las composiciones que los comprenden pueden administrarse a un paciente que lo necesita de cualquier manera adecuada, dependiendo de la formulación farmacéutica o composición específica a usar. De esta manera, los polipéptidos de la invención y/o las composiciones que los comprenden pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, oral, sublingual (por ejemplo en forma de un comprimido sublingual, pulverización o gota puesta debajo de la lengua y adsorbida a través de las membranas mucosas en la red capilar debajo de la lengua), (intra)nasal (por ejemplo en forma de una pulverización nasal y/o como un aerosol), tópicamente, por medio de un supositorio, por inhalación, por vía

intravítrea (esp. para el tratamiento de DME seca o glaucoma), o cualquier otra manera adecuada en una cantidad o dosis eficaz.

Los polipéptidos de la invención y/o las composiciones que los comprenden se administran de acuerdo con un régimen de tratamiento que es adecuado para prevenir, tratar y/o aliviar la enfermedad, trastorno o afección a prevenir, tratar o aliviar. El médico generalmente podrá determinar un régimen de tratamiento adecuado, dependiendo de factores tales como la enfermedad, trastorno o afección a prevenir, tratar o aliviar, la gravedad de la enfermedad, la gravedad de sus síntomas, el polipéptido específico de la invención a usar, la vía de administración específica y la formulación farmacéutica o composición a usar, la edad, sexo, peso, dieta, estado general del paciente y factores similares bien conocidos para el médico. En general, el régimen de tratamiento comprenderá la administración de uno o más polipéptidos de la invención, o de una o más composiciones que los comprenden, en cantidades o dosis terapéutica y/o profilácticamente eficaces.

Generalmente, para la prevención, tratamiento y/o alivio de las enfermedades, trastornos y afecciones mencionadas en la presente memoria y dependiendo de la enfermedad, trastorno o afección específica a tratar, la potencia del polipéptido específico de la invención a usar, la vía específica de administración y la formulación farmacéutica o composición específica usada, los polipéptidos de la invención generalmente se administrarán en una cantidad comprendida entre 0,005 y 20,0 mg por kilogramo de peso corporal y dosis, preferiblemente entre 0,05 y 10,0 mg/kg/dosis, y más preferiblemente entre 0,5 and 10 mg/kg/dosis, de forma continua (por ejemplo, por infusión) o como dosis individuales (tales como, por ejemplo, dosis diarias, semanales o mensuales; véase más adelante), pero puede variar significativamente, especialmente dependiendo de los parámetros mencionados anteriormente.

Para aplicaciones profilácticas, también pueden administrarse composiciones que contienen los polipéptidos de la invención en dosificaciones similares o ligeramente menores. La dosificación también puede ajustarse por el médico individual en caso de cualquier complicación.

Dependiendo del polipéptido específico de la invención y sus propiedades farmacocinéticas específicas y otras propiedades, puede administrarse diariamente, un día si y otro no, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días o cada seis días, semanalmente, mensualmente y similares. Un régimen de administración podría incluir el tratamiento semanal a largo plazo. Por "largo plazo" se entiende al

menos dos semanas y preferiblemente meses o años de duración.

La eficacia de los polipéptidos de la invención y de composiciones que los comprenden, puede ensayarse usando cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad específica implicada. Los ensayos y modelos animales adecuados serán evidentes para el experto en la materia, y por ejemplo incluyen los ensayos y modelos animales usados en los Ejemplos proporcionados a continuación. De esta manera, son ensayos adecuados, pero sin limitación, ensayos de unión ELISA que miden la unión de los polipéptidos anti-A-beta a péptidos A-beta monoméricos o agregados recubiertos o a A-beta biotinilado capturado, ensayos de SPR (Resonancia de Plasmón de Superficie) que mide la unión a péptidos A-beta monoméricos o agregados recubiertos o a A-beta biotinilado capturado (Malmqvist M.: Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics; Curr. Opin. Immunol. 5(2):282 (1993)), ensayos TR-FRET de competición (Transferencia Resonante de Energía de Fluorescencia de Resolución en el Tiempo) que miden la competición con una interacción de agente de unión específico a péptido A-beta(1-40) /región N-terminal o con una interacción de agente de unión específico a A-beta(1-40) / región central, ensayos de agregación de A-beta *in vitro* que miden la prevención o desagregación de la agregación, ensayos TAPIR (Inmunorreactividad de Placas Amiloides en Tejidos) que miden la unión de moléculas a placas amiloides usando análisis inmunohistoquímico en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer o animales transgénicos para APP, así como modelos mecánicos *in vivo*.

Preferiblemente, los polipéptidos de la invención tienen mejores características que anticuerpos convencionales conocidos en la técnica (tales como anticuerpos IgG anti-A-beta m266 y 3D6) o los Nanobodies® descritos en el documento WO2006/40153 en al menos uno de estos ensayos o modelos, y preferiblemente en uno o más de los modelos *in vivo*.

Para uso farmacéutico, los polipéptidos de la invención pueden formularse como una preparación farmacéutica que comprende (i) al menos un polipéptido de la invención y (ii) al menos un vehículo, diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable, y (iii) opcionalmente uno o más polipéptidos y/o compuestos farmacéuticamente activos adicionales. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende que el material respectivo no muestra ningún efecto biológico o indeseable de otra manera cuando se administra a un

individuo y no interacciona de una manera perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica (tales como, por ejemplo, el ingrediente farmacéuticamente activo) en el que está contenido. Pueden encontrarse ejemplos específicos en manuales convencionales tales como, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., Mack Publishing Company, USA (1990). Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden formularse y administrarse de cualquier manera conocida *per se* para anticuerpos y fragmentos de anticuerpos convencionales y otras proteínas farmacéuticamente activas. De esta manera, de acuerdo con una realización adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica o preparación que contiene al menos un polipéptido de la invención y al menos un vehículo, diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizante farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente una o más sustancias farmacéuticamente activas adicionales.

Por medio de ejemplos no limitantes, dicha formulación puede estar en una forma adecuada para administración oral, para administración parenteral (tal como por inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intracavernosa o intraperitoneal o infusión intravenosa), para administración tópica, para administración sublingual, para administración por inhalación, por un parche cutáneo, por un implante, por un supositorio, para administración transdérmica, nasal, intravítrea, rectal o vaginal, y similares. Dichas formas de administración adecuadas, que pueden ser sólidas, semisólidas o líquidas, dependiendo de la manera de la administración - así como los métodos y vehículos para uso en su preparación, serán evidentes para el experto en la materia.

Las preparaciones farmacéuticas para administración parenteral, tales como inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o infusión intravenosa pueden ser, por ejemplo, soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones o polvos estériles que comprenden el ingrediente activo y que son adecuados, opcionalmente después de una etapa adicional de disolución o dilución, para la infusión o inyección. Los vehículos o diluyentes adecuados para dichas preparaciones, por ejemplo, incluyen, sin limitación, agua estéril y tampones y soluciones acuosas farmacéuticamente aceptables tales como solución salina tamponada con fosfato fisiológica, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank; agua; aceites; glicerol; etanol; glicoles tales como propilenglicol así como aceites minerales, aceites animales y aceites vegetales, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja así como mezclas adecuadas de los mismos.

Las soluciones del compuesto activo o sus sales también pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos, tales como agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal (tiomersal) y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones y cloruro sódico. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. También pueden añadirse otros agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los demás ingredientes indicados anteriormente, cuando sea necesario, seguido de esterilización por filtro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado al vacío y las técnicas de liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones filtradas de forma estéril previamente.

Normalmente, se preferirán soluciones o suspensiones acuosas. En general, las formulaciones adecuadas para proteínas terapéuticas tales como los polipéptidos de la invención son soluciones de proteínas tamponadas, tales como soluciones que incluyen la proteína en una concentración adecuada (tal como de 0,001 a 400 mg/ml, preferiblemente de 0,005 a 200 mg/ml, más preferiblemente de 0,01 a 200 mg/ml, más preferiblemente de 1,0 - 100 mg/ml, tal como 1,0 mg/ml (administración i.v.) o 100 mg/ml (administración s.c.) y un tampón acuoso tal como:

- solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4,
- otros tampones fosfato, pH 6,2 a 8,2,
- tampones histidina, pH 5,5 a 7,0,
- tampones succinato, pH 3,2 a 6,6, y
- tampones citrato, pH 2,1 a 6,2,

y, opcionalmente, sales (por ejemplo NaCl) y/o azúcares o polialcoholes (tales como trealosa, manitol o glicerol) para proporcionar isotonicidad en la solución.

Son soluciones de proteínas tamponadas preferidas soluciones que incluyen

aproximadamente 0,05 mg/ml del polipéptido de la invención disuelto en tampón fosfato 25 mM, pH 6,5, ajustado a isotonicidad por la adición de trehalosa 220 mM. Además, pueden incluirse en dichas soluciones otros agentes tales como un detergente, por ejemplo, Tween-20 o Tween-80 al 0,02%. Las formulaciones para aplicación subcutánea pueden incluir significativamente mayores concentraciones del polipéptido de la invención, tales como hasta 100 mg/ml o incluso por encima de 100 mg/ml. Sin embargo, será evidente para el experto en la materia que los ingredientes y las cantidades de los mismos proporcionadas anteriormente solo representan una opción preferida. Serán inmediatamente evidentes para el experto en la materia alternativas y variaciones de las mismas, o pueden concebirse fácilmente a partir de la descripción anterior.

Los polipéptidos de la invención también pueden administrarse usando formulaciones de deposito, de liberación lenta o de liberación sostenida adecuadas, por ejemplo, adecuadas para inyección, usando dispositivos de liberación controlada para la implantación debajo de la piel y/o usando una bomba de dosificación u otros dispositivos conocidos *per se* para la administración de sustancias o principios farmacéuticamente activos. Además, los polipéptidos de la invención pueden formularse en forma de un gel, crema, pulverización, gota, parche o película que, si se pone en la piel, pasa a través de la piel.

Además, en comparación con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo convencionales, un inconveniente importante del uso de los polipéptidos de la invención es que también pueden administrarse fácilmente a través de rutas distintas de la administración parenteral y pueden formularse fácilmente para dicha administración. Por ejemplo, como se describe en la solicitud internacional WO2004/041867, dichos polipéptidos pueden formularse para administración oral, intranasal, intrapulmonar y transdérmica.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona una combinación farmacéutica que comprende al menos un polipéptido anti-A-beta de la invención como se describe en la presente memoria y al menos otro agente terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en: inhibidores de colinesterasa tales como donepezil, rivastigmina, galantamina y tacrina; antagonista de NMDA tales memantina; agentes reductores de A-beta tales como agentes capaces de inhibir una o más enzimas implicadas en las formación de A-beta, tales como inhibidores de beta-secretasa, inhibidores de gamma-secretasa y moduladores de gamma-secretasa; agentes que previenen o reducen la

acumulación de placas de A-beta; inhibidores de la agregación de A-beta; antagonistas de RAGE; y otros agentes para prevenir, tratar o aliviar enfermedades neurodegenerativas y/o reducir la función cognitiva. Son ejemplos específicos de dichos otros agentes terapéuticos: ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513, Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin (Latrepiridin) y PF-4494700. Dicha combinación farmacéutica opcionalmente puede comprender además un diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizante.

Cuando dos o más sustancias o principios se van a usar como parte de un régimen de tratamiento combinado, pueden administrarse a través de la misma vía de administración o a través de vías de administración diferentes, esencialmente al mismo tiempo o en momentos diferentes (por ejemplo, esencialmente de forma simultánea, consecutiva o de acuerdo con un régimen alternativo). Cuando las sustancias o principios se van administrar simultáneamente a través de la misma vía de administración, pueden administrarse como diferentes formulaciones o composiciones farmacéuticas o como parte de una formulación o composición farmacéutica combinada. Además, cuando dos o más sustancias o principios activos se van a usar como parte de un régimen de tratamiento combinado, cada una de las sustancias o principios pueden administrarse en la misma cantidad y de acuerdo con el mismo régimen que se usó cuando el compuesto o principio se usa por sí mismo, y dicho uso combinado puede conducir o no a un efecto sinérgico. Sin embargo, cuando el uso combinado de dos o más sustancias o principios activos conduce a un efecto sinérgico, también puede ser posible reducir la cantidad de uno, más o todas las sustancias o principios a administrar, consiguiéndose todavía la acción terapéutica deseada. Esto puede ser útil, por ejemplo, para evitar, limitar o reducir cualquier efecto secundario indeseado que esté asociado con el uso de una o más sustancias o principios cuando se usan en sus cantidades habituales, mientras que aún se obtiene el efecto farmacéutico o terapéutico deseado.

Otra realización adicional de la invención es un método para tratar las enfermedades y trastornos indicados anteriormente, que comprende administrar a un individuo, de forma simultánea, separada o secuencial, una cantidad eficaz de al menos un polipéptido anti-A-beta de la invención y al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en: inhibidores de colinesterasa tales como donepezil, rivastigmina, galantamina y tacrina; antagonista de NMDA tales como

memantina; agentes reductores de A-beta tales como agentes capaces de inhibir una o más enzimas implicadas en las formación de A-beta, tales como inhibidores de beta-secretasa, inhibidores de gamma-secretasa y moduladores de gamma-secretasa; agentes que previenen o reducen la acumulación de placas de A-beta; inhibidores de la agregación de A-beta; antagonistas de RAGE; y otros agentes para prevenir, tratar o aliviar enfermedades neurodegenerativas y/o reducir la función cognitiva, incluyendo los ejemplos específicos indicados anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el polipéptido de unión a A-beta de la invención se prepara para administrarse en combinación con otros fármacos usados para el tratamiento de las enfermedades y trastornos indicados anteriormente, seleccionándose dichos otros fármacos del grupo que consiste en: inhibidores de colinesterasa tales como donepezil, rivastigmina, galantamina y tacrina; antagonista de NMDA tales memantina; agentes reductores de A-beta tales como agentes capaces de inhibir una o más enzimas implicadas en las formación de A-beta, tales como inhibidores de beta-secretasa, inhibidores de gamma-secretasa y moduladores de gamma-secretasa; agentes que previenen o reducen la acumulación de placas de A-beta; inhibidores de la agregación de A-beta; antagonistas de RAGE; y otros agentes para prevenir, tratar o aliviar enfermedades neurodegenerativas y/o reducir la función cognitiva, incluyendo los ejemplos específicos indicados anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, fármacos usados para el tratamiento de las enfermedades y trastornos indicados anteriormente, seleccionándose dichos fármacos del grupo que consiste en: inhibidores de colinesterasa tales como donepezil, rivastigmina, galantamina y tacrina; antagonista de NMDA tales memantina; agentes reductores de A-beta tales como agentes capaces de inhibir una o más enzimas implicadas en las formación de A-beta, tales como inhibidores de beta-secretasa, inhibidores de gamma-secretasa y moduladores de gamma-secretasa; agentes que previenen o reducen la acumulación de placas de A-beta; inhibidores de la agregación de A-beta; antagonistas de RAGE; y otros agentes para prevenir tratar o aliviar enfermedades neurodegenerativas y/o el deterioro en la función cognitiva (incluyendo los ejemplos específicos expuestos anteriormente) se preparan para administrarse en combinación con el polipéptido de unión a A-beta de la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, el polipéptido de unión a A-beta de la invención se usa en combinación con un dispositivo útil para la

administración del polipéptido, tal como un jeringa, pluma de inyección u otro dispositivo.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección mediada por la disfunción de A-beta y/o la formación de placas amiloides, que comprende las etapas de:

a) obtener una muestra a partir de un sujeto,

b) poner en contacto, *in vitro*, la muestra con un polipéptido de la invención como se ha definido anteriormente y

c) detectar la unión de dicho polipéptido o dicha muestra, y

d) comparar la unión detectada en la etapa (c) con un patrón, donde una diferencia en la unión con respecto a dicha muestra es diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección caracterizado por la disfunción de A-beta y/o la formación de placas amiloides.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección mediada por la disfunción de A-beta y/o la formación de placas amiloides, que comprende las etapas de:

a) obtener una muestra a partir de un sujeto,

b) poner en contacto la muestra con un polipéptido de la invención como se ha definido anteriormente;

c) determinar la cantidad de A-beta en la muestra; y

d) comparar la cantidad determinada en la etapa (c) con un patrón, donde una diferencia en la cantidad con respecto a dicha muestra es diagnóstico de una enfermedad, trastorno o afección caracterizada por la disfunción de A-beta y/o la formación de placas amiloides.

La muestra puede ser, por ejemplo, un fluido corporal del sujeto, tal como sangre o líquido cefalorraquídeo (CSF). La etapa de detectar la unión de un polipéptido de la invención a A-beta o la etapa de determinar la cantidad de A-beta en la muestra generalmente implicará medir la formación de un complejo entre el polipéptido y A-beta. De acuerdo con diferentes realizaciones de este método, la formación de complejos se producirá en solución o después de la inmovilización de un componente en un sustrato y se continuará por la detección de dichos complejos. Para este fin, puede ser útil modificar adicionalmente el polipéptido de la invención, tal como mediante la introducción de un grupo funcional que es una parte de un par de unión específico, tal como el par de unión biotina-(estrept)avidina. Dicho grupo funcional puede usarse para unir el polipéptido de la invención a otra

proteína, polipéptido o compuesto químico que se une a la otra mitad del par de unión, es decir, por medio de la formación del par de unión. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede conjugarse con biotina y unirse a otra proteína, polipéptido, compuesto o vehículo conjugado con avidina o estreptavidina. Por ejemplo, dicho polipéptido conjugado de la invención puede usarse como indicador, por ejemplo en un sistema de diagnóstico donde un agente productor de señales detectables se conjuga con avidina o estreptavidina.

Los métodos de diagnóstico anteriores también pueden usarse para controlar la eficacia de un tratamiento terapéutico de un sujeto.

De acuerdo con otra realización de la invención, se proporciona un kit para diagnosticar una enfermedad, trastorno o afección mediada por la disfunción de A-beta, y especialmente la formación de placas amiloides y/o EA, para uso en un método como se ha definido anteriormente, comprendiendo dicho kit al menos un polipéptido de la invención y, opcionalmente, uno o más medios, medios de detección y/o agentes de formación de imágenes *in vitro* o *in vivo* y, opcionalmente, además, instrucciones de uso. Los agentes de formación de imágenes *in vivo* adecuados incluyen 99mTc, 111Indio, 123Iyodo y, para la formación de imágenes por resonancia magnética, compuestos paramagnéticos. La combinación de SPECT, PET o MRI con polipéptidos anti-A-beta marcados de la invención permitirá 'exploraciones de A-beta en el cerebro' y las evaluaciones de los riesgos individuales para cada paciente.

De acuerdo con otra realización de la invención, ciertos polipéptidos de unión a A-beta de la invención pueden usarse como herramienta de investigación para la detección específica de A-beta humano, así como A-beta de ratón, o A-beta de otra especie animal, y para ensayos y análisis que se basan en dicha detección. Esto puede ser particularmente útil para ensayos y análisis que hacen uso de modelos animales.

La invención también proporciona un kit que comprende al menos un polipéptido de unión a A-beta de la invención y, adicionalmente, uno o más componentes distintos seleccionados del grupo que consiste en otros fármacos usados para el tratamiento de las enfermedades y trastornos descritos anteriormente y dispositivos como se ha descrito anteriormente.

La invención proporciona además métodos para fabricar un polipéptido de unión a A-beta de la invención, comprendiendo dichos métodos generalmente las etapas de:

- cultivar células hospedadoras que comprenden un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido de la invención (en lo sucesivo: "ácido nucleico de la invención") en condiciones que permiten la expresión del polipéptido de la invención; y,

- recuperar o aislar el polipéptido expresado por las células hospedadoras del cultivo; y

- opcionalmente purificar y/o modificar adicionalmente y/o formular el polipéptido de la invención.

Un ácido nucleico de la invención puede ser ADN genómico, ADNc o ADN sintético (tal como ADN con uso de codones que se ha adaptado específicamente para la expresión en la célula hospedadora u organismo hospedador deseado). De acuerdo con una realización de la invención, el ácido nucleico de la invención está en forma esencialmente aislada, como se ha definido anteriormente en la presente memoria.

El ácido nucleico de la invención también puede estar en forma de, estar presente y/o ser parte de un vector, tal como por ejemplo un plásmido, cósmido o YAC, que de nuevo puede estar en forma esencialmente aislada. El vector puede ser especialmente un vector de expresión, es decir un vector que puede proporcionar la expresión del polipéptido *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula hospedadora adecuada, organismo hospedador y/o sistema de expresión). Dicho vector de expresión generalmente comprende al menos un ácido nucleico de la invención y está unido operativamente a uno o más elementos reguladores adecuados, tales como uno o más promotores, potenciadores, terminadores y similares. Se describen ejemplos específicos de dichos elementos reguladores y otros elementos, tales como uno o más factores de integración, marcadores de selección, secuencias señal o líder, genes indicadores y similares, útiles o necesarios para expresar polipéptidos de la invención, en la pág. 131 a 133 del documento WO2006/040153.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse u obtenerse de una manera conocida per se (por ejemplo por síntesis de ADN automática y/o tecnología de ADN recombinante), basándose en la información de las secuencias de aminoácidos para los polipéptidos de la invención proporcionados en la presente memoria, y/o pueden aislarse a partir de una fuente natural adecuada.

De acuerdo con otra realización, la invención se refiere a un hospedador o célula hospedadora que expresa o es capaz de expresar un polipéptido de la

invención; y/o que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. De acuerdo con una realización particularmente preferida, dichas células hospedadoras son células bacterianas, células de levadura, células fúngicas o células de mamífero.

Las células bacterianas adecuadas incluyen células de cepas de bacterias gram negativas tales como cepas de *Escherichia coli*, *Proteus y Pseudomonas* y cepas de bacterias gram positivas tales como cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus* y *Lactococcus.* Una célula fúngica adecuada incluye células de especies de *Trichoderma*, *Neurospora* y *Aspergillus*. Las células de levadura adecuada incluyen células de especies de *Saccharomyces (*por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae),* *Schizosaccharomyces* (por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe*), *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris* y *Pichia methanolica*) y *Hansenula*.

Las células de mamífero adecuadas incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células HeLa, células COS y similares. Sin embargo, también pueden usarse células de anfibio, células de insecto, células vegetales y cualquier otra célula usada en la técnica para la expresión de proteínas heterólogas.

Para la producción a escala industrial, los hospedadores heterólogos preferidos para la producción (industrial) de polipéptidos de dominio variable individual de inmunoglobulina y productos terapéuticos proteicos que los contienen incluyen cepas de *E. coli*, *Pichia pastoris* y *S. cerevisiae* que son adecuadas para la expresión a gran escala, producción y fermentación, y en particular para la expresión a gran escala (bio-)farmacéutica, producción y fermentación.

La elección del sistema de expresión específico dependerá en parte de la necesidad de ciertas modificaciones post-traduccionales, más específicamente glicosilación. La producción de un polipéptido de la invención para el que se desea o se necesita la glicosilación necesitaría el uso de hospedadores de expresión de mamífero que tienen la capacidad de glicosilar la proteína expresada. A este respecto, será evidente para el experto que el patrón de glicosilación obtenido (en el tipo, número y posición de restos unidos) dependerá de la célula o línea celular que se usa para la expresión.

Los polipéptidos de la invención producidos en una célula expuesta anteriormente pueden producirse intracelularmente (por ejemplo en el citosol, el periplasma o en cuerpos de inclusión) y después aislarse de las células hospedadoras y opcionalmente purificarse adicionalmente; o pueden producirse

extracelularmente (secretarse en el medio en el que se cultivan las células hospedadoras) y después aislarse del medio de cultivo y opcionalmente purificarse adicionalmente.

En la técnica se conocen otros métodos y reactivos usados para la producción recombinante de polipéptidos, tales como vectores de expresión adecuados, métodos de transformación o transfección, marcadores de selección, métodos de inducción de expresión de proteínas, condiciones de cultivo y similares. De forma similar son bien conocidas para el experto en la materia las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas útiles en un método de fabricación de un polipéptido de la invención.

La producción de los polipéptidos de la invención por medio de fermentación en organismos hospedadores recombinantes convenientes tales como *E. coli* y levadura es eficaz en cuanto al coste, en comparación con anticuerpos convencionales que también necesitan instalaciones caras de cultivo de células de mamífero. Además, los niveles que pueden conseguirse de expresión son elevados y los rendimientos de los polipéptidos de la invención están en el intervalo de 1 a 10 g/l (E. coli) y hasta 10 g/l (levadura) y mayores.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporcionan los dominios variables individuales de inmunoglobulina indicados en la Tabla VII presentada a continuación, que son útiles para acumular o construir polipéptidos de unión a A-beta de la invención. De esta manera, si cualquiera de los dominios variables individuales de inmunoglobulina indicados en la Tabla VII (opcionalmente después de haberse humanizado) se combina (preferiblemente en forma de una cadena polipeptídica continua) con uno o más dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a A-beta, donde dichos otros dominios variables individuales de inmunoglobulina se unen a un epítopo diferente de A-beta, se obtendrán como resultado moléculas de unión a A-beta biparatópicas de acuerdo con la invención, que tienen características de unión útiles, como se expone con detalle, por ejemplo, en los Ejemplos 9 a 11 presentados más adelante.

Tabla VII: Dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a A-beta

Clon	**CI50 en TR-FRET** (M)	**temperatura de fusión en ºC**	**Secuencia de aminoácidos**	**SEC ID Nº:**
ABIIPMP 42D4	4,40E-08	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFSTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRTNYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRLVVGGTSVGDWRYWGQGTQVT VSS	47
ABIIPMP 111B4	5,1E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFWTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWSSGRANYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRGVVGGWVVVDWRYWGQGTQV TVSS	48
ABII111E 5cl1	8,80E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFLTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGREVQDWRYWGQGTQVT VSS	49
ABIIPMP 111C6	6,00E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFWTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRLNYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRQVVGGVQVLDWRYWGQGTQVT VSS	50

ABIIPMP 111F2	3,40E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFSTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRTNYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA NRHSVGRLSVGDWRYWGQGSQVT VSS	51
ABIIPMP 111E4	6,10E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFSTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRTNYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA ARLTVGSLSVGDWRYWGQGTQVTV SS	52
ABIIPMP 111C4	8,60E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFLTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRANYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRSVVGGVGVWDWRYWSQGTQVT VSS	53
ABIIPMP 111B5	4,40E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRNNYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRLVVGGGGVRDWRYWGQGTQVT VSS	54
ABIIPMP 111B9	1,90E-08	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHS GPTFGTDTMGWFRQAPGKEREFVA AVTWNSGRANYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGGCVKDWRYWGQGTQVT VSS	55

ABII111B5_R30K	5,30E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFKTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGNMVEDWRYWGQGTQVTVSS	56
ABII111B5_R30W	5,00E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFWTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGNMVEDWRYWGQGTQVTVSS	57
ABII111B5_N106T	9,20E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGTMVEDWRYWGQGTQVTVSS	58
ABII111B5_N106V	1,00E-08	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGVMVEDWRYWGQGTQVTVSS	59
ABII111B5_F101W	7,30E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRWVVGGNMVEDWRYWGQGTQVTVSS	60

ABII111B5_M107E	4,30E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGNEVEDWRYWGQGTQVTVSS	61
ABII111B5_M107R = ABII002	2,90E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTQVTVSS	62
ABII111B5_E109W	4,70E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGNMVWDWRYWGQGTQVTVSS	63
ABII111B5_E109Q	3,70E-09	n.d.	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKEREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGNMVQDWRYWGQGTQVTVSS	64
ABII003	2,10E-09	51,1	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRDNTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	65

ABII004	2,10E-09	56	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	66
ABII005	3,30E-09	48,2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCAHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	67
ABII006	8,00E-08	51,7	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVAS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	68
ABII007	1,60E-09	53,2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDN TRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAH RFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTV SS	69
ABII008	1,90E-09	51,9	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NSRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCT AHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSS	70

ABII009	1,70E-09	52,2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTKNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	71
ABII010	1,90E-09	54,8	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNTAYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	72
ABII011	2,40E-08	54,6	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNALYLQMSGLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	73
ABII012	1,50E-09	53,5	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMNGLKDEDTAVYYCT AHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSS	74
ABII013	1,60E-09	52,2	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSSLKDEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	75

ABII014	1,30E-09	52,3	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLRDEDTAVYYCT AHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSS	76
ABII015	1,80E-09	55,5	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKAEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	77
ABII016	2,40E-09	57,9	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKPEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	78
ABII017	2,40E-09	59,4	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLSCVHS GPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCA AHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSS	79
ABII018	3,20E-09	60,1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTVSRD NTRNAAYLQMSGLKPEDTAVYYCTA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	80

ABII019	1,40E-08	71,6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	81
ABII020	1,10E-07	69,8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	82
ABII021	2,40E-08	69,9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	83
ABII022	1,60E-08	68,6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAVYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	84
ABII023	5,80E-09	64,7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAAYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	85

ABII024	6.00E-09	63,6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAAYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	86
ABII025	1,80E-08	70,3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	87
ABII026	5,10E-09	66,8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	88
ABII027	4,40E-09	65,3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	89
ABII028	1,10E-08	73,8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	90

ABII029	8,90E-08	74,3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	91
ABII030	1,20E-08	73,7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	92
ABII031	1,30E-08	72,1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAVYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	93
ABII032	4,90E-09	68,3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAAYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	94
ABII033	4,00E-09	66,2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNAAYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	95

ABII034	1,00E-08	72,5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	96
ABII035	4,00E-09	68,7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	97
ABII036	3,50E-09	67,5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMSSLRPEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	98
ABII037	3,10E-09	66,3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVH SGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRD NSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAA HRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSS	99
ABII60A10 = ABII050	1,90E-08	68,5	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGRTFNNYNMGWFRQAPGKEREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NAKNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTQVTV SS	100

ABII051	1,80E-08	66,2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NAKNAVYLQMNSLRPEDTAIYYCGA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTVS S	101
ABII052	1,90E-08	66,1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NSKNAVYLQMNSLRPEDTAIYYCGA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTVS S	102
ABII053	2,00E-08	67,3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NAKNTVYLQMNSLRPEDTAIYYCGA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTVS S	103
ABII054	5,.10E-08	62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NAKNALYLQMNSLRPEDTAIYYCGA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTVS S	104
ABII055	2,20E-08	66,2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NAKNAVYLQMNSLRPEDTAVYYCG AAYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTV SS	105

ABII056	2,90E-08	69,8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NAKNAVYLQMNSLRPEDTAIYYCAA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTVS S	106
ABII057	4,60E-08	71,5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTVS S	107
ABII058	7,30E-08	68,9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAA AYRGTAINVRRSYDSWGQGTLVTVS S	108
ABII059	3,30E-08	72,7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA AYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVS S	109
ABII060	5,00E-08	69,2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAA AYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVS S	110

ABII061	2,40E-09	69,3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCG AAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTV SS	111

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Inmunización de llamas con A-beta para la inducción de respuestas inmunes humorales

Generación de péptido A-beta monomérico (BAM): Se prepara péptido A-beta monomérico (BAM) mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA; Sigma)/1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFIP; Fluka). El péptido A-beta liofilizado se disuelve en su vial original en TFA al 100% a una concentración final de 1 mg/ml. La solución después se evapora en un speedvac a temperatura ambiente. Después de esta y de todas las etapas de evaporación posteriores, el sedimento restante se pone en hielo. El sedimento se resuspende en HFIP y se evapora de nuevo en un speedvac a temperatura ambiente seguido de otra solubilización de HFIP, después de lo cual la solución se divide en alícuotas de volúmenes apropiados. Las alícuotas se evaporan en un speedvac a temperatura ambiente y se los sedimentos se almacenan a -80°C. Inmediatamente antes del uso, la alícuota del péptido A-beta tratado con TFA/HFIP se disuelve en DMSO al 100% levantando y bajando la pipeta de forma repetida. La solución de péptido A-beta se centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos para retirar los posibles agregados y el sobrenadante se usa en los diferentes ensayos.

Inmunización de llamas: Se inmunizan llamas con péptidos A-beta agregados (BAA) y péptidos A-beta oligoméricos (BAO) mediante la inyección de los inmunógenos por vía intramuscular en el área del cuello aplicando dosis decrecientes a lo largo del tiempo. BAA consiste en una mezcla de péptidos A-beta(1-40) y A-beta(1-42) sintéticos que se prepara esencialmente como se describe por Schenk et al., 1999, Nature 400: 173-177. BAO se preparan esencialmente como se describe por Kayed et al. (2003), Science 300: 486-489. Las primeras dos inyecciones de antígeno consisten cada vez en 100 µg de antígeno por llama, mientras que para todas las administraciones siguientes, la dosis se reduce a 50 µg por llama. Las llamas 144 y 145 se vacunan con BAA recién preparado. En total, se inyectan nueve dosis de

antígeno BAA como una emulsión usando Adyuvante Completo de Freund (primera inyección) o Stimune (todos los refuerzos siguientes con inmunógeno) en intervalos de 16 días como máximo. Las llamas 129, 130, 177 y 178 se vacunan con BAO. En total, se inyectan de seis a nueve dosis de antígeno BAO, como una emulsión usando adyuvante Completo de Freund (primera inyección) y Adyuvante Incompleto de Freund o Stimune (todos los refuerzos siguientes con antígeno) en intervalos de 18 días como máximo. Las llamas también se inmunizan con el fragmento del péptido A-beta 1-16 conjugado con albúmina de suero bovino (BSA; llamas 181 y 186) o el fragmento 1-30 del péptido A-beta conjugado con BSA (llamas 185 y 187). Se administran cuatro inyecciones de antígeno en intervalos de 14 días, usando Adyuvante Completo de Freund o Adyuvante Incompleto de Freund con dosis de antígeno decrecientes desde 100 µg (primeras dos inyecciones) a 50 µg (dos inyecciones siguientes) por llama. Inmediatamente antes del inicio de cada esquema de inmunización se recoge una muestra de suero preinmune y a puntos de tiempo regulares durante el experimento de inmunización se recogen múltiples muestras de suero inmunes para evaluar la respuesta humoral específica del péptido A-beta de los distintos animales.

Para controlar los títulos en suero específicos de péptido A-beta mediante ELISA, se inmovilizan 2 µg/ml de A-beta(1-40), biotinilado en el extremo C (Anaspec), durante dos horas a temperatura ambiente en una placa Maxisorp (Nunc) de 96 pocillos recubierta con Neutravidina (0,2-0,5 µg por pocillo). Los pocillos se bloquean con una solución de caseína (al 1% en PBS). Después de la adición de una seria de dilucion de muestras de suero pre-inmune e inmune, se detectan inmunoglobulinas de llama unidas específicamente usando un conjugado de anticuerpo de cabra anti-llama con peroxidasa de rábano picante (Bethyl Lab. Inc.), lo que permite detectar la respuesta humoral mediada tanto por los anticuerpos convencionales como los anticuerpos únicamente con cadena pesada. En ciertos casos, se realiza un ELISA consecutivo para evaluar específicamente la respuesta mediada por anticuerpo de cadena pesada mediante detección con mAb de ratón que reconoce específicamente los anticuerpos IgG2 e IgG3 de llama solo de cadena pesada (Daley et al., 2005, Clin. Diagn. Lab. Imm. 12:380-386), seguido de un conjugado de anticuerpo de conejo anti-ratón-HRP (DAKO). Los ELISA se revelan usando TMB (Promega) como sustrato cromogénico y la absorbancia se mide a 450 nm. Para los cuatro formatos de inmunógeno (BAA, BAO, A-beta(1-16)-BSA y A-beta(1-30)-BSA) se detectan tanto las respuestas inmunes mediadas por

anticuerpos convencionales como las respuestas inmunes mediadas por anticuerpo de cadena pesada específicas para A-beta(1-40) monomérico (biotinilado). Las muestras de suero que son positivas contra A-beta(1-40) monomérico también son positivas cuando se ensayan con BAA directamente aplicado como recubrimiento sobre una capa Maxisorp, lo que sugiere la presencia de al menos epítopos parcialmente comunes en el A-beta monomérico y preparaciones de BAA usadas.

Ejemplo 2: Aislamiento de dominios VHH de unión a A-beta (VHH) de llamas inmunizadas

Clonación de los repertorios de fragmentos de anticuerpo solo de cadena pesada: Después de la inyección final de inmunógeno, se recogen tejidos inmunes como fuente de células B que producen los anticuerpos de cadena pesada a partir de las llamas inmunizadas. Típicamente, se recogen dos muestras de 150 ml 4 y 8 días después de la última inyección de antígeno y se recoge una biopsia de ganglio linfático, recogida 4 días después de la última inyección de antígeno por animal. A partir de las muestras de sangre, se preparan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando Ficoll-Hypaque de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). A partir de las PBMC y la biopsia de ganglios linfáticos, se extrae el ARN total, que se usa como material de partida para RT-PCR para amplificar los segmentos génicos que codifican VHH (descritos anteriormente en el documento WO2005/044858). Para cada llama inmunizada, se construye una biblioteca reuniendo el ARN total aislado de todos los tejidos inmunes recogidos de ese animal. En resumen, el repertorio de VHH amplificado por PCR se clona a través de sitios de restricción específicos en un vector diseñado para facilitar la presentación en fagos de la biblioteca de VHH. El vector procede de pUC119 y contenía el promotor de LacZ, una secuencia codificante de la proteína gIII del fago M13, un gen de resistencia para ampicilina o carbenicilina, un sitio de clonación múltiple y una secuencia líder gIII-pelB híbrida (pAX050). En fase con la secuencia codificante de VHH, el vector codifica un marcador c-myc C-terminal y un marcador $(His)_6$. Los fagos se preparan de acuerdo con protocolos convencionales y se almacenan después de esterilización en filtro a 4ºC para el uso adicional.

Selección de VHH específicos de A-beta mediante presentación en fagos: Los repertorios de VHH obtenidos de todas las llamas y clonados como bibliotecas de fagos se usan en diferentes estrategias de selección aplicando una multiplicidad de condiciones de selección. Las variables incluyen:

i) el formato de péptido A-beta (A-beta(1-40) biotinilado en el extremo C o N, A-

beta(1-16) biotinilado en el extremo C, A-beta(1-30) biotinilado en el extremo N y fusiones de glutatión-S-transferasa (GST) tales como A-beta(1-42)-GST, A-beta(1-10)-GST o GST-A-beta(1-42)),

ii) el estado de agregación del péptido A-beta (A-beta monomético, BAO o BAA),

iii) el método de presentación de antígeno (fase sólida: aplicado directamente como un recubrimiento o a través de un marcador de biotina en placas recubiertas con Neutravidina; fase de solución: incubación en solución seguido de captura en placas recubiertas con Neutravidina),

iv) la concentración de antígeno y

v) diferentes métodos de elución (tripsina o TEA).

Las selecciones de realizan como se indica a continuación: se presentan preparaciones de antígeno para formatos de selección en fase sólida y en fase de solución como se ha descrito anteriormente a múltiples concentraciones. Después de 2 h de incubación con las bibliotecas de fago seguido de un lavado minucioso, los fagos unidos se eluyen con tripsina (1 mg/ml) o TEA durante 15 minutos. En caso de que se use tripsina para la elución del fago, la actividad de la proteasa se neutraliza inmediatamente aplicando inhibidor de proteasa ABSF 0,8 mM. Como control, se realizan selecciones sin antígeno en paralelo. Los resultados del fago que muestran enriquecimiento con respecto al nivel de fondo (control sin antígeno) se usan para infectar *E.coli*. Las células *E. coli* infectadas se usan para preparar fago para la siguiente vuelta de selección (rescate de fago) o se cultivan el placas de agar (LB + Amp + glucosa al 2%) para el análisis de clones de VHH individuales. Para explorar un resultado de selección con respecto a agentes de unión específicos, se repican colonias individuales a partir de las placas de agar y se cultivan en placas de 96 pocillos profundos de 1 ml. La expresión de VHH controlada por placZ se induce añadiendo IPTG (0,1-1 mM final) en ausencia de glucosa. Se preparan extractos periplásmicos (en un volumen de ~ 80 µl) de acuerdo con métodos convencionales.

Exploración de extractos periplásmicos para la unión a A-beta: se capturan 2 µg/ml de A-beta(1-40), biotinilado en el extremo C (Anaspec), durante dos horas a temperatura ambiente en una placa; Maxisorp de 96 pocillos recubierta con Neutravidina (0,2-0,5 µg por pocillo) (Nunc). Los pocillos se bloquean con una solución de caseína (al 1% en PBS). Después de la adición de típicamente un dilución de 10 veces de los extractos periplásmicos, se detecta la unión a VHH usando un anticuerpo de ratón anti-myc y un conjugado de anticuerpo anti-ratón-

HRP (DAKO). Los clones que proporcionan una señal ELISA de como mínimo dos veces el nivel de fondo se conservan para el análisis de la secuencia. Los VHH que puede unirse a A-beta(1-40) monomérico (biotinilado) pueden asignarse 16 linajes de células B diferentes. Los clones derivados del mismo linaje de células B comparten una secuencia de CDR3 muy similar y, por lo tanto, es probable que reconozcan el mismo epítopo. La Tabla VIII resume los parámetros de selección que conducen a la indentificación de un VHH representativo de cada uno de los 16 linajes de células B. En la Tabla IX, se muestran las secuencias de aminoácidos de los VHH indicada en la Tabla VIII.

Tabla VIII: Se usan parámetros de selección para la identificación de linajes de células B de VHH específicos de A-beta

VHH ID	**Biblioteca**	**Formato de selección (concentración de péptido A-beta inmovilizado o capturado)**	**Elución de Fago**	**Vueltas de selección**
ABII1E11	130	BAA (200 ng)	tripsina	2
ABII5D2	145	BAA (200 ng)	tripsina	1
ABII14D4	130	BAA (200-40 ng)	tripsina	2
ABII35C7	Conjunto de 144, 145, 129, 130	A-beta(1-42)GST y GST-A-beta(1-42) (10 µg/pocillo)	TEA	2
ABII35D2	Conjunto de 144, 145, 129, 130	A-beta(1-42)-GST y GST-A-beta(1-42) (10 µg/pocillo)	TEA	2
ABII35G2	Conjunto de 144, 145, 129, 130	A-beta(1-42)GST y GST-A-beta(1-42) (10 µg/pocillo)	TEA	2
ABII42D4	178	A-beta(1-40) biotinilado (100 nM)	tripsina	2
ABII42B10	178	A-beta(1-40) biotinilado (10 nM)	tripsina	2
ABII42F5	178	A-beta(1-40) biotinilado (100	tripsina	2

		nM)		
ABII42E10	178	A-beta(1-40) biotinilado (10 nM)	tripsina	2
ABII42G10	178	A-beta(1-40) biotinilado (10 nM)	tripsina	2
ABII60A10	185	Vuelta I: BAA (200 ng) Vuelta II: A-beta(1-40) biotinilado (1 nM)	tripsina	2
ABII60D2	181	Vuelta I: BAA (200 ng) Vuelta II: A-beta(1-40) biotinilado (10 nM)	tripsina	2
ABII60G11	185	Vuelta I: BAA (200 ng) Vuelta II: A-beta(1-40) biotinilado (1 nM)	tripsina	2
ABII60H5	181	Vuelta I: BAA (200 ng) Vuelta II: A-beta(1-40) biotinilado (1 nM)	tripsina	2
ABII61F6	187	Vuelta I: BAA (200 ng) Vuelta II: A-beta(1-40) biotinilado (10 nM)	tripsina	2

Tabla IX: Secuencias de aminoácidos VHH representativos resultantes:

VHH ID	**VHH de unión a A-beta monovalentes de tipo silvestre**	**SEC ID Nº:**
ABII1E11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDYNMGW FHQAPGKEREIVAAISRSGRSTYYTVSVEGRFTISRDNA KNTVDLEMNSLKPEDTGIYYCAANSAGRAINLPLYKYW GQGTQVTVSS	112
ABII14D4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYNMAWF RHAPGKEREFVAAISRSGGSTYYVDSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAAPRGRSIVTTATYDY WGQGTQVTVSS	113

ABII5D2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWV RQAPGKERELVATISQSGGLRSYADSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNSLTPGDTAVYYCAAQARATAWSPQRVDY WGQGTQVTVSS	114
ABII35C7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSIYNMGWF RQAPGKEREFVAAISRSGSSTYYGDSVKGRFTISRDNA KKTVYLQMNSLKPEDTAVYHCAAARFGTPINTRGSYDY WGQGTQVTVSS	115
ABII35D2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWF RQAPGKEREFVAAISRSGGSTYYTDSVKGRFTISRDSS KNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAALFGSAINLLSEYRY WGQGTQVTVSS	116
ABII35G2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRTFSNYGMGW FRQAPGKDREFVAAISRSGGTTYYEDDVKGRFTISRDN AKNSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPSYVAVNIAASYN NWGQGTQVTVSS	117
ABII42D4	EVQLVESGGGLVLAGGSLRLSCVHSGPTFSTDTMGWF RQAPGKEREFVAAVTWNSGRTNYADSVKGRFTVSRDN TRNAAYLQMSGLKDEDTAVYYCTAHRLVVGGTSVGDW RYWGQGTQVTVSS	118
ABII42B10	EVQLVESGGGLVQRGGSLRLSCAASGRTFSNLNMGWF RQAPGKEREFQAAISRSGGTTYYADSVKGRFTISRDNA KSTVFLQMNSLKPEDTAVYYCAAASPGGPINYGRAYDS WGQGTQVTVSS	119
ABII42F5	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRTFTDYNIGWF CQAPGKEREFVAAISGSGGSTYYADSAKGRFTISRDNA KNTVYLQMNSLKPEDTAVYACAAAQRRLAVNVDTSYNV WGQGTQVTVSS	120
ABII42E10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFTLYTMGWF RQAPGKEREFVAAISASGGTTYYADSVKGRFALSRDNA KNTVFLQMNTLKPEDTAEYLCAAAFRGFAINTPTSYNY WGQGTQVTVSS	121
ABII42G10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLFSGRTFSTNGVGWF	122

	RQVPGKEREFVSAINWSGSKTNYAEPVKGRFTISRDNA KNTAYLQMNSLKPEDTAVYYCAAYRTSISRYEYAYWGQ GTQVTVSS	
ABII60A10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGW FRQAPGKEREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDN AKNAVYLQMNSLKPEDTAIYYCGAAYRGTAINVRRSYD SWGQGTQVTVSS	123
ABII60G11	EVQLVESGGGSEQAGGSLRLSCATSGRAFSVYAWFRQ APGKERTFVAAVAWVGGSTFYSDSVKGRFTISRDNAKN TVFLHMNSLKPEDTAAYYCAARLYGGRWYNSPRVDDF EYWGQGTQVTVSS	124
ABII60D2	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAYSGSIFSIKTMGWYR QAPGKQRELVGRITSGDSTNYADSVKGRFTISRDKAKT TVYLQMNNLKPEDTAVYYCAARRPWPRSDVWGQGTQ VTVSS	125
ABII60H5	EVQLVESGGGLVQVGGSLRLSCAASGNIGSINAMGWY RQAPGKEREWVAIITNSGSVNYGPDSVKGRFTISGDNA KNRVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAESWGRSPLKYLGQG TQVTVSS	126
ABII61F6	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGSTVNINAMGWY RQAPGKQRELVAIINKRGVTNYADSTEGRFTISRDNSKR TLYLQMNSLKPEDTAVYYCNAVVGRYGRTYGYWGQGT QVTVSS	127

El número total de variantes (como mínimo diferencia de 1 aminoácido) encontrado para cada linaje de células B es 1 (ABII5D2), 195 (ABII42D4), 1 (ABII42G10), 1 (ABII60D2), 1 (ABII60H5), 23 (ABII1E11), 3 (ABII14D4), 3 (ABII35C7), 6 (ABII35G2), 1 (ABII35D2), 7 (ABII42B10), 2 (ABII42F5), 3 (ABII42E10), 2 (ABII60A10), 2 (ABII60G11) y 15 (ABII61F6).

Para identificar la variante de linaje de célula B con las mejores propiedades de unión, se usaron extractos periplásmicos de todas las variantes de VHH para determinar la velocidad de disociación (Biacore T100, GE Healthcare). Se prepara A-beta(1-40) monomérico (biotinilado en el extremo C; Anaspec), A-beta(1-16) monomérico (biotinilado en el extremo C; Bachem) y A-beta(12-28) monomérico

(biotinilado en el extremo N; Bachem), como se describe en el Ejemplo 1, irreversiblemente mediante estreptavidina en tres canales diferentes de la misma microplaca de detección de SA (GE Healthcare). Las superficies primero se lavan con 3 inyecciones de 1 minuto de tampón de lavado de superficie (NaCl 1 M en NaOH 50 mM) seguido de la inyección de A-beta biotinilado 50 nM hasta un nivel diana de 100 UR. Después de la captura, las superficies se bloquean por la inyección de un exceso (200 µg/ml) de d-biotina durante 180 s a 5 µl/min. Una superficie de referencia se lava y se bloquea con d-biotina. Como tampón de proceso se usa tampón HBS-EP+ y los experimentos se realizan a 25ºC. Para la exploración de la velocidad de disociación, se inyectan extractos periplásmicos de VHH a una dilución de 10 veces durante 2 min a 45 µl/min y se dejan disociar durante 10 min. Se inyectan agentes de unión de referencia purificados (VHH a 100 nM, Fab 3D6 a 10 nM) como muestras de control positivo y se evalúan al menos al principio y al final de cada experimento. Entre las diferentes muestras de VHH, las superficies se regeneran con tampón de regeneración (NaOH 50 mM) durante 25 s a 45 µl/min seguido de GuHCl 6 M 10 s a 45 µl/min si la regeneración no es completa. Las velocidades de disociación se calculan a partir de los sensogramas obtenidos del canal con A-beta(1-40) biotinilado capturado. Las variantes de solo dos linajes de células B de VHH, ABII42D4 y ABII60G11, mostraron un patrón de unión monofásico y permitieron el cálculo de velocidades de disociación a través de un modelo de interacción 1:1: 6,1E-3 s^{-1} y 2,7E-2 s^{-1}, respectivamente. Para todos los demás linajes de células B de VHH, se ajustan por separado dos secciones diferentes de la curva de disociación, produciendo una k_{d1} (calculada a partir del marco de disociación entre 125 y 160 s) y una k_{d2} (400-700). Se proporciona una doble referencia a los datos restando las curvas en el canal de referencia y una inyección blanco con tampón de proceso. Los sensogramas se evalúan ajustando un modelo de disociación 1:1 usando el software Evaluación Biacore T100 v 1.1.1. Aunque se observa unión de los VHH ABII60D2 y ABII60H5 a A-beta en el ELISA de exploración, estos VHH muestran muy poca unión a la microplaca de deleción.

Para estudiar las características de unión de agentes de unión que no son VHH monovalentes, se usan fragmentos Fab de anticuerpos monoclonales m266 y 3D6. El anticuerpo monoclonal 3D6 se describe en Johnson-Wood et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94:1550-1555 y en Bard et al., 2000, Nature Medicine 6:916-919 y se une específicamente a los restos aminoacídicos 1 a 5 de A-beta (epítopo N-terminal). El anticuerpo monoclonal m266 se describe en Seubert et al., 1992,

Nature 359:325-327 y se une específicamente a los restos aminoacídicos 16 a 24 de A-beta (epítopo central de A-beta). Los fragmentos Fab, que comprenden la cadena ligera variable (V_L), la cadena pesada variable (V_H), la cadena ligera constante (C_L) y el dominio constante 1 de la cadena pesada (CH_1) del anticuerpo respectivo (las secuencias se proporcionan más adelante) y, además, un marcador c-myc C-terminal y un marcador de hexa-histidina ($(His)_6$ se clonan, se expresan y se purifican de acuerdo con técnicas convencionales, usando *E.coli* como el organismo hospedador y cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) y cromatografía de exclusión molecular (SEC) para la purificación. Los fragmentos de Fab purificados de m266 y 3D6 muestran, en el experimento de unión descrito anteriormente, velocidades de disociación de 4,0E-5 s^{-1} y 4,7E-4 s^{-1}, respectivamente.

Secuencias de VL y VH de fragmento Fab de 3D6:

VL:

YVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVS KLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRIEAEDLGLYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIK (SEC ID Nº: 128)

VH:

EVKLVESGGGLVKPGASLKLSCAASGFTFSNYGMSWVRQNSDKRLEWVASIRSG GGRTYYSDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCVRYDHYSGSSDYW GQGTTVTVSS (SEC ID Nº: 129)

Secuencias de VL y VH de fragmento Fab de m266:

VL:

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLIYSDGNAYLHWFLQKPGQSPKLLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVETEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEI K (SEC ID Nº: 130)

VH:

EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAVSGFTFSRYSMSWVRQTPEKRLELVAQINSVG NSTYYPDTVKGRFTISRDNAEYTLSLQMSGLRSDDTATYYCASGDYWGQGTTLTV SS (SEC ID Nº: 131)

Ejemplo 3: Caracterización de VHH purificados

Las variantes de VHH con las menores velocidades de disociación para cada linaje de células B se vuelven a clonar en un vector de expresión derivado de pUC119, que contiene el promotor de LacZ, un gen de resistencia para ampicilina o kanamicina, un sitio de clonación múltiple y una secuencia líder de gIII-pelB híbrida.

En fase con la secuencia codificante de VHH, el vector codifica un marcador c-myc C-terminal y un marcador $(His)_6$. Se producen VHH en *E.coli* TG1 y se purifican por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) y cromatografía de exclusión molecular (SEC) dando como resultado un pureza de 95% como se evalúa por SDS-PAGE.

3.1 Unión de VHH a A-beta inmovilizado (ELISA): Para cuantificar la unión de los VHH al péptido A-beta monomérico (BAM), se aplican VHH como series de dilución en un ELISA usando la misma preparación que se ha descrito en el Ejemplo 2. Con la excepción de los VHH ABII60D2 y ABII60H5, los valores de CE50 pueden calcularse y se resumen en la Tabla X. Los VHH más potentes que interaccionan con el epítopo N-terminal de A-beta (aminoácidos 1 a 16) o el epítopo central de A-beta (aminoácidos 12 a 28), según se determina, son ABII42D4 (CE50 de 14,2 nM) y ABII60A10 (CE50 de 4,9 nM), respectivamente.

Los VHH que proporcionan señales detectables contra BAM se ensayan con respecto a la unión a agregados de péptido A-beta (BAA) en ELISA, aplicando una preparación similar a la descrita en el Ejemplo 2. El antígeno se prepara y se inmoviliza como se describe en Bohrmann et al., 1999, J Biol Chem 274: 15990-15995. En resumen, se deja que 100 µl de A-beta(1-40) a 10 µg/ml diluido en tampón TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 y azida Na al 0,05%) de una solución madre en DMSO de A-beta(1-40) sintético a 2 mg/ml (Bachem) se agreguen durante 60 h a 37ºC. Todos los VHH que reconocen BAM también reconocen BAA y los valores de CE50 respectivos se resumen en la Tabla X.

Tabla X: valores de CE50 para VHH purificados en ELISA de BAM BAA

Linaje de células B de VHH	**Epítopo**	**ELISA de BAM CE50 en nM**	**ELISA de BAA CE50 en nM**	**TR-FRET CI50 en nM**
ABII1E11	12-28	27,3	19,2	844*
ABII5D2	1-16	54.1	11,7	> 1000
ABII14D4	12-28	124	6,8	744
ABII35C7	12-28	1,9	1,3	206*
ABII35G2	12-28	10,7	5,4	645*
ABII35D2	12-28	37.5	12,8	773*
ABII42D4	1-16	14.2	0,9	46.8

ABII42B10	12-28	10,8	2,1	85,6
ABII42F5	12-28	41.1	20,0	228*
ABII42E10	12-28	17,5	2,6	205*
ABII42G10	1-16	87.0	49.5	> 1000
ABII60A10	12-28	4,9	0,8	11.1
ABII60G11	12-28	187	6,0	34.4
ABII60D2	1-16	>1 µM	ND	ND
ABII60H5	1-16	>1 µM	ND	ND
ABII61F6	12-28	469	14,5	967*
2D2	12-28	15,8	4,7	404*
2G6	1-16	98.6	7,2	> 1000
Fab266	16-24*	1,8	1,8	0,52
Fab3D6	1-5*	1,8	0,3	3,4

ND: no determinado; *: CI50 calculada a partir de curvas extrapoladas

3.2 Unión de VHH a A-beta en solución (TR-FRET): Se evalúa la interacción de VHH anti-A-beta VHH y péptido A-beta en solución usando un ensayo competitivo de transferencia resonante de energía de fluorescencia de resolución en el tiempo (TR-FRET). En dos preparaciones diferentes, se ensaya la competición con la interacción de péptido A-beta(1-40) - ABII42D4 (región N-terminal específica) o con la interacción A-beta(1-40) - ABII60A10 (específico para región central). Para el ensayo, A-beta (1-40) monomérico (biotinilado en el extremo C; Anaspec) marcado con quelato de estreptavidina-Europio y VHH ABII42D4 o ABII60A10 marcados con AlexaFluor647 se incuban durante 1 h con diferentes concentraciones de un competidor no marcado (VHH, IgG o Fab). Los compuestos marcados se usan a concentraciones de 0,2 nM (A-beta(1-40)), 50 nM (ABII42D4) y 10 nM (ABII60A10), respectivamente, y la señal de fluorescencia emitida tras la interacción de unión se detecta a 665 nm. Los valores de CI50 se determinan en los ensayos de TR-FRET de ABII42D4 y ABII60A10 dando como resultado la siguiente variación de potencia para los agentes de unión específicos para la región N-terminal ensayados: anticuerpo monoclonal 3D6 (2,5 nM) > fragmento Fab 3D6 (3,4 nM) > ABII42D4 (46,8 nM) > ABII5D2 = 42G10 (>1000 nM). El VHH específico de la región central

más potente identificado por este ensayo fue ABII60A10, muestra un valor de CI50 de 11,1 nM mientras que los anticuerpos comparativos dieron valores de CI50 de 0,50 nM (anticuerpo monoclonal m266) y 0,52 nM (fragmento Fab de m266).

Por razones comparativas, se generan VHH anti-A-beta como los descritos previamente (los "VHH de referencia") y se purifican como se ha descrito anteriormente, usando la información de secuencia disponible de las publicaciones de patente internacional indicadas a continuación:

VHH 2D2 y 2G6: documento WO2006/40153;

VHH 3A, 1B, 11G, 4D y 8B: documento WO2007/35092; y

VHH 31-1: documento WO2004/44204.

Sus secuencias de aminoácidos se muestran en la Tabla XI.

Tabla XI:Secuencias de aminoácidos de VHH de referencia

VHH ID	**VHH de referencia de unión a A-beta**	**SEC ID Nº:**
2D2	AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGGTFSSIGMGWFRQAPGKEREFVGAISRSGDSTYYADSVKGRFTISRDGAKNTVYLQMNSLKDEDTAVYYCAGRPAGTAINIRRSYNYWGQGTQVTVSS	132
2G6	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRQAPGKGLEWVSTISPRAANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLEPDDTALYYCAKSLRYRDRPQSSDFLFWRQGTQVTVSS	133
3A	AVQLVESGGGLVRDGDSLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAPGKEREFVAAIGWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASAPTRWVPRDSRFYDRWGQGTRVTVSS	134
1B	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTLDYYSIAWFRQAPGKEREGVSCISSYDGSTSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAAGIRDWATLREYEYDDWGQGTQVTVSS	135
11G	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINTMAWYRQAPGKERDLVAAIISSGSTNYADSVKGRFTISRDNTKNTVYLQMNSLKLEDTAVYYCNAAIRRSVIDAWGAYWGQGTQVTVSS	136
4D	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVATIRWNGDYADSVRDRFTISRDDAKNTVFLQMNSLKPEDTAIYYCAARLGPRTSQAALYRYWGQGTQVTVSS	137

8B	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYVMGWFRQAP GKEREFVAAIGWSGGSTAYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCASAPTRWVPRDSRFYDRWGQGTRVTVSS	138
31-1	AEVQLQASGGGSVQPGGSLRLSCAASGFIFGWSTMSWVRQA PGKGLEWVSTISGGGSATTYTDSVKGRFTISRDRAKNTLYLQM NSLKPEDTAIYYCNADVSTGFRYQRKDYWGRGTQVTVSS	139

En comparación con el VHH de referencia 2G6 (específico de la región N-terminal) y 2D2 (específico de la región central), los VHH 42D4 y 60A10 muestran CI50 mejoradas ≥21 veces y 36 veces, respectivamente (véase la Tabla X).

3.3 Determinación de la afinidad de la interacción péptido A-beta - VHH: Las afinidades de la interacción de péptido A-beta - VHH/Fab se determinan por resonancia de plasmón de superficie (Biacore) usando A-beta(1-40) biotinilado en el extremo C capturado en una microplaca de detección con estreptavidina como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2). Se inyectan VHH purificados o fragmentos Fab en 5 concentraciones diferentes (entre 2,5 300 nM para ABII42D4 y ABII60A10) durante 2 min y se dejan disociar durante 10 min. En el caso de ABII42D4 pero no en el caso de ABII60A10 las curvas de asociación y disociación pueden ajustarse usando un modelo de interacción 1:1 (unión Langmuir) y puede determinarse un valor de K_D preciso. Se descubre que las afinidades son de 16 nM para VHH ABII42D4, 5,1 nM para el fragmento Fab de 3D6 y 0,3 nM para el fragmento Fab de m266, respectivamente.

3.4 Localización de epítopo mediante resonancia de plasmón de superficie: La especificidad de unión de los VHH se determina mediante resonancia de plasmón de superficie (Biacore) usando A-beta(1-16) biotinilado en el extremo C; Bachem) y A-beta(12-28) (biotinilado en el extremo N; Bachem) y los péptidos se capturan en una microplaca de detección con estreptavidina como se ha descrito anteriormente. Se descubre que cinco de los VHH indicados en la Tabla IX anterior interaccionan con la región N-terminal del péptido A-beta (ABII5D2, ABII42D4, ABII42G10, ABII60D2 y ABII60H5) y se descubre que 11 VHH interaccionan con la región central (ABII1E11, ABII14D4, ABII35C7, ABII35G2, ABII35D2, ABII42B10, ABII42F5, ABII42E10, ABII60A10, ABII60G11 y ABII61F6; véase la Tabla X).

3.5 Ensayo de agregación de A-beta in vitro: Se ensaya VHH en un ensayo de agregación de A-beta *in vitro* para evaluar si la agregación puede inhibirse o reducirse. La agregación de A-beta *in vitro* se mide usando fluorescencia de

Tioflavina T (ThT), que experimenta un desplazamiento típico al rojo tras la formación de fibrillas de A-beta (Levine, H. 1993. Protein Science (2): 404-410). Para el ensayo, se preparan soluciones madre de A-beta(1-40) sintético (Bachem) en DMSO al 100% y ThT en glicina-NaOH 25 mM pH 8,5 y se almacena a -20°C. Antes del uso, la solución madre de A-beta(1-40) se diluye a 56 µM en tampón de agregación (fosfato sódico 50 mM, NaCl 100 mM, pH 5, NaN3 al 0,02%). Los fragmentos Fab y VHH se ensayan como series de dilución en D-PBS usando concentraciones comprendidas entre 56 y 7 µM. Se mezclan volúmenes iguales (20 µl) de la solución de A-beta(1-40) 56 µM y las muestra de anticuerpo/VHH o el control negativo apropiado (por triplicado) y las mezclas se incuban en tubos de microcentrífuga de baja adhesión durante 48 horas a 37°C en un medio oscuro. Después de la transferencia de 30 µl de las muestras incubadas en una placa de polipropileno de fondo plano de 96 pocillos negra (Greiner Bio-One), se añaden 250 µl de ThT 2,5 µM (solución madre diluida en glicina NaOH 25 mM) y se mide la señal de fluorescencia (Envision, PerkinElmer). La señal de fluorescencia máxima de A-beta(1-40) medida en ausencia de competidor se fija como la agregación de 100% (inhibición de 0%). La inhibición máxima a la mayor concentración de VHH ensayada (28 µM) se calcula como una media de al menos dos experimentos independientes. Aunque se detecta una inhibición de fondo consistente de aproximadamente 25% para una VHH no relacionado (no específico de A-beta), los fragmentos Fab monovalentes de 3D6 y 266 muestran una inhibición dependiente de la dosis reproducible con una inhibición máxima de 79 y 85%, respectivamente. Del panel de VHH ensayado, 14D4, 35C7, 35G2, 35D2, 42B10, 42F5, 42E10 y 60A10 muestran una inhibición consistente de 78, 82, 76, 73, 77, 79, 75 y 80% de agregación de péptido, respectivamente (mayor que la inhibición de fondo de 25% inducida por el VHH de control no específico).

Ejemplo 4: Maduración de afinidad de VHH

VHH ABII42D4 se somete a dos ciclos de maduración de afinidad. En un primer ciclo, se mutan restos de CDR individuales por los otros 19 aminoácidos. Se fijan como objetivo los siguientes restos: CDR1: G26-G35; CDR2: V51-N58; y CDR3: H95-Y102 (numeración de acuerdo con Kabat). La mutagénesis se realiza en una estrategia basada en PCR usando oligonucleótidos degenerados que contienen un codón NNS en la posición mutada. Se reúnen productos de PCR para cada CDR y se insertan a través de un solo sitio de restricción en el molde del gen de ABII42D4. Se producen mutantes individuales como proteínas recombinantes

usando un vector de expresión derivado de pUC119, que contiene el promotor de LacZ, un gen de resistencia para kanamicina, un sitio de clonación múltiple y una secuencia líder de ompA (pAX100). Las células *E. coli* TG1 se transforman con la biblioteca de vectores de expresión y se cultivan en placas de agar (LB + Amp + glucosa al 2%). Se recogen colonias individuales de las placas de agar y se cultivan en placas de 96 pocillos profundos de 1 ml. La expresión de VHH se induce añadiendo IPTG (1 mM). Se preparan extractor periplásmicos (en un volumen de ~ 80 µl) de acuerdo con métodos convencionales y se exploran con respecto a la unión a A-beta(1-40) en ELISA y en un ensayo de velocidad de disociación Biacore como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2). Las mutaciones en seis posiciones (S30, T57, L97, T100b, S100c, G100e) dan como resultado velocidades de disociación ligeramente (~2 veces) mejoradas.

En un segundo ciclo, se crea una biblioteca combinatoria mediante la aleatorización simultánea de las seis posiciones susceptibles identificadas en el ciclo uno. Para esto, se sintetiza el gen ABII42D4 de longitud completa por PCR solapante usando oligonucleótidos degenerados (NNS) en las posiciones de aleatorización y se realiza una PCR de rescate. Los genes de ABII42D4 aleatorizados se insertan en un vector de presentación en fago (pAX50) que produce un tamaño de biblioteca funcional de 6x10E7. Se preparan fagos de acuerdo con protocolos convencionales. La biblioteca de fagos se somete a tres vueltas de selección en fase de solución contra A-beta(1-4) monomérico (biotinilado) usando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal) para la etapa de captura. La concentración se antígeno se reduce 10 veces en cada vuelta empezando con una concentración de antígeno de 50 nM en la vuelta uno. Los fagos unidos se eluyen con tripsina (1 mg/ml) durante 30 minutos y las producciones de fagos se infectan en *E. coli* TG1 para la preparación de extractos periplásmicos de clones de VHH individuales. La exploración para la unión A-beta(1-40) en ELISA y en un ensayo de velocidad de disociación Biacore (Ejemplo 2) identifica clones con velocidades de disociación mejoradas hasta 10 veces. Las mejores variantes de ABII42D4 se clonan en el vector de expresión pAX100 en fase con el marcador c-myc C terminal y un marcador (His)6. Se producen VHH en *E.coli* como proteínas marcadas con His6 y se purifican por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC) y cromatografía de exclusión molecular (SEC). Las afinidades de los VHH purificados se determinan por resonancia de Plasmón de superficie (Biacore) y los valores de CI50 se determinan en el ensayo

de competición TR-FRET de ABII42D4 (Ejemplo 3.2).

En un intento de mejorar adicionalmente la afinidad de unión, la variante ABIIPMP111B5 se usa como molde y se introduce mutaciones divergentes encontradas en los clones ABIIPMP111E4 y ABIIPMP111B4 una por una. Las variantes resultantes se producen en *E. coli* y se caracterizan como se ha descrito anteriormente. ABII111B5_M107R, ABII111B5_M107E y ABII111B5_E109Q se identifican como las mejores variantes, siendo tanto la CI50 como la K_D, mayores de 10 veces mejores que el ABII42D4 original. La información de secuencia y los datos biológicos para las variantes mencionadas anteriormente se resumen en la Tabla VII anterior (primera línea: 42D4; líneas 2 a 9: clones útiles resultantes de los dos primeros ciclos de maduración de afinidad; líneas 10 a 18: clones útiles resultantes de mutaciones dirigidas adicionales).

Ejemplo 5: Humanización de VHH

Las secuencias de aminoácidos del VHH anti-A-beta ABII111B5_M107R (= ABII002; SEC ID Nº: 62) y del VHH anti-A-beta ABII60A10 (= ABII050; SEC ID Nº: 100) se somete a la tecnología blast frente a la base de datos de la secuencia de V_H de línea germinal humana. La secuencia de VH3-23 de línea germinal humana (DP47; SEC ID Nº: 140) en combinación con JH5 mostró la mayor identidad de secuencia con las dos secuencias de VHH.

Secuencia de DP-47/VH3-23:
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (SEC ID Nº: 140)

Secuencia JH5:
NWFDSWGQGTLVTVSS (SEC ID Nº: 153)

Se sustituyeron 17 y 10 restos aminoacídicos de ABII002 y ABII050, respectivamente, para la humanización creando varias variantes diferentes de cada VHH. Todas las variantes se ensamblaron a partir de oligonucleótidos usando el método de extensión solapante de PCR, se clonaron en un vector de expresión (pAX100) y se produjeron en *E.coli*. La información de secuencia y los datos de unión para las variantes obtenidas de ABII002, es decir ABII003 a ABII037, y para las variantes obtenidas de ABII0050, es decir ABII051 a ABII061, se resumen en la Tabla VII anterior (líneas 19 a 53 y líneas 55 hasta la última línea 65, respectivamente). La Tabla XII indica además el grado de humanización de ABII002 a ABII036 y ABII050 a ABII060.

Tabla XII Variantes humanizadas de ABII002 y ABII050

Nombre del clon	**% de humanización**	**T_m (ºC)**	**CI50 Media en TR-FRET (M)**
ABII002	77,8	57,5	2,0E-09
ABII003	81,8	51,1	2,1E-09
ABII004	82,8	56,0	2,1E-09
ABII005	82.8	48,2	3,3E-09
ABII006	82,8	51,7	8,0E-08
ABII007	82,8	53,2	1,6E-09
ABII008	82,8	51,9	1,9E-09
ABII009	82.8	52,2	1,7E-09
ABII010	82,8	54,8	1,9E-09
ABII011	82,8	54,6	2,4E-08
ABII012	82,8	53,5	1,5E-09
ABII013	82,8	52,2	1,6E-09
ABII014	82,8	52,3	1,3E-09
ABII015	82,8	55,5	1,8E-09
ABII016	81,8	57,9	2,4E-09
ABII017	82.8	59,4	2,4E-09
ABII018	82,8	60,1	3,2E-09
ABII019	91,9	71,6	1,4E-08
ABII020	92,9	69,8	1,1E-07
ABII021	90,9	69,9	2,4E-08
ABII022	89,9	68,6	1,6E-08
ABII023	90,9	64,7	5,8E-09
ABII024	89,9	63,6	6,0E-09

ABII025	90,9	70,3	1,8E-08
ABII026	91,9	66,8	5,1E-09
ABII027	90,9	65,3	4,4E-09
ABII028	90,9	73,8	1,1E-08
ABII029	91,9	74,3	8,9E-08
ABII030	89,9	73,7	1,2E-08
ABII031	88,9	72.1	1,3E-08
ABII032	89,9	68,3	4,9E-09
ABII033	88,9	66,2	4,0E-09
ABII034	89,9	72,5	1,0E-08
ABII035	90,9	68,7	4,0E-09
ABII036	89,9	67,5	3,5E-09
ABII050	83,8	68,5	1,9E-08
ABII051	88,9	66,2	1,8E-08
ABII052	89,9	66,1	1,9E-08
ABII053	89,9	67,3	2,0E-08
ABII054	89,9	62,0	5,1E-08
ABII055	89,9	66,2	2,2E-08
ABII056	89,9	69,8	2,9E-08
ABII057	92,9	71,5	4,6E-08
ABII058	93,9	68,9	7,3E-08
ABII059	92,9	72,7	3,3E-08
ABII060	93,9	69,2	5,0E-08

De acuerdo con los datos biológicos resumidos en las Tablas VII y XII anteriores, todas las variantes de VHH indicadas en la presente memoria pueden - al menos como intermedios - usarse para la construcción de los polipéptidos de la

invención. Específicamente, para uso en seres humanos, se preferirán las variantes de VHH humanizadas ABII003 a ABII037 y ABII051 a ABII061. Son variantes particularmente útiles, que muestran un alto grado de humanización pero conservando sus propiedades de unión, ABII035 derivada del clon original 42D4 y ABII059 derivada del clon original 60A10. ABII035 se une al epítopo N-terminal de A-beta y comprende las secuencias de CDR SEC ID Nº: 14 a 16. ABII059 se une al epítopo central y comprende las secuencias de CDR SEC ID Nº: 17 a 19.

Ejemplo 6: Comparación de VHH humanizados con los VHH de referencia

Se ensayan VHH de referencia anti-A-beta purificados (Ejemplo 3.2, Tabla XI) como se describe en el Ejemplo 3 en una microplaca de detección de SA recubierta con A-beta(1-40) monomérico biotinilado en el extremo C. Aunque ABII035 y ABII059 mostraron niveles de UR > 50 a concentraciones inyectadas de 11 y 3 nM, respectivamente, ninguno de los VHH 1B, 11G, 8B, 4D, 3A y VHH31-1 muestran unión (> 10 UR) a la microplaca de detección a una concentración de 1000 nM en las condiciones ensayadas. En el mismo experimento, los VHH de referencia 2G6 y 2D2 muestran niveles de UR > 50 a concentraciones inyectadas de 1000 y 100 nM, respectivamente, siendo por lo tanto mucho menos potentes que ABII035 y ABII059. No se detectó ninguna indicación de la degradación de superficie durante el experimento. Posteriormente, la también se verifica que la unión de esta serie de VHH de referencia se une a A-beta monomérico en preparaciones de ELISA múltiples (detección descrita en el Ejemplo 3), usando distintas presentaciones de formatos de péptidos tales como A-beta(1-40) capturado (biotinilado en el extremo C o N), A-beta(1-40) y A-beta (1-42) inmovilizados directamente, GST-A-beta(1-42) o A-beta(1-42)-GST (captura a concentraciones de 1 µg/ml). Para los VHH de referencia 1B, 11G, 8B, 4D, 3A no se detecta unión a A-beta monomérico. En el ELISA de BAA, únicamente el VHH de referencia 8B muestra unión a A-beta agregado a concentraciones de VHH por encima de 1000 nM. En comparación con los VHH 2D2 y 2G6, los VHH ABII035 y ABII059 muestran valores de CE50 > 50 veces mayores. Los resultados se resumen en la Tabla XIIa.

Tabla XIIa: Comparación de características de unión de VHH derivados de 42D4 y 60A10 con características de unión de VHH de referencia anti-A-beta

VHH	**Inhibición de Agregación (% de inhibición a 26 µM)**	**ELISA de BAM CE50 en nM**	**ELISA de BAA CE50 en nM**	**TR-FRET CI50 en nM**
ABII42D4 (epítopo N terminal)	ND	14,2	0,9	46,8
ABII035 (epítopo N terminal)	54			
ABII60A10 (epítopo central)	80	4,9	0,8	11,1
ABII059 (epítopo central)	80			
2D2 (epítopo central)	69	15,8	4,7	404*
2G6 (epítopo N terminal)	29	98,6	7,2	> 1000
1B	ND	Sin unión	Sin unión	Sin competición
11G	ND	Sin unión	Sin unión	Sin competición
8B	ND	Sin unión	>1000 nM*	Sin competición
4D	ND	Sin unión	Sin unión	Sin competición
3A	ND	Sin unión	Sin unión	Sin competición
V31-1 (epítopo C term)	ND	Sin unión	Sin unión	Sin unión
Fab266 (epítopo central)	82	1,8	1,8	0,52

Fab3D6 (epítopo N terminal)	82	1,8	0,3	3,4

ND: no determinado; *: CI50 calculada a partir de curvas extrapoladas

Ejemplo 7: Unión de VHH de A-beta anti-humanos a A-beta de roedor (ELISA y Biacore)

Se evalúa en un ELISA la unión de los VHH obtenidos anteriormente a A-beta de roedor. Se aplican como recubrimientos A-beta(1-40) de ratón (Bachem) o humano (Anaspec) a 2 µg/ml en placas Maxisorp y se detecta la unión de VHH y, con fines comparativos, fragmentos Fab, mediante un anticuerpo anti-myc de ratón y un conjugado anti-ratón-HRP (DAKO). Se determinan los valores de CE50 para el fragmento Fab de 3D6, VHH ABII002 y VHH ABII035. Los resultados se indican en la Tabla XIII mostrada a continuación (media de dos experimentos independientes como mínimo).

Tabla XIII Valores de CE50 para la unión a A-beta humano y de ratón

Clon	**A-beta(1-40) humano CE50 (nM)**	**A-beta(1-40) de roedor CE50 (nM)**
ABII002	1,8	3,3
ABII035	2,5	5,7
Fab3D6	4,2	110

Aunque los fragmentos Fab de 3D6 se unen a A-beta de ratón significativamente menos que a A-beta humano (diferencia de 26 veces), ABII002 y ABII035 se unen igualmente bien a los dos (diferencia de 1,8 y 2,2 veces respectivamente), lo que indica que ABII002 y su derivado humanizado ABII035 reconocen un epítopo que es distinto del epítopo reconocido por 3D6.

La unión de los VHH a A-beta de ratón y humano se evalúa adicionalmente en Biacore con el péptido no biotinilado aplicado directamente como un recubrimiento sobre la microplaca. No se detecta ninguna diferencia en afinidad al péptido A-beta humano y de roedor para los VHH antes y después de la humanización.

Ejemplo 8: Generación y caracterización de construcciones de VHH anti-A-beta biparatópicas

Se fusionan VHH ABII42D4 (que reconoce la región N terminal del péptido A-beta) y VHH ABII60A10 (que reconoce la región central) a través de enlazadores de glicina-serina flexibles (por ejemplo 9GS: GGGGSGGGG; SEC ID Nº: 141) para crear construcciones de VHH bivalentes. Cuatro construcciones biparatópicas (que comprenden dos dominios VHH con diferente especificidad de epítopo) que difieren en la longitud y en la orientación del enlazador se exploran con más detalle: ABII42D4-25GS-ABII60A10, ABII60A10-25GS-ABII42D4, ABII42D4-35GS-ABII60A10 y ABII60A10-35GS-ABII42D4 y se comparan con dímeros de VHH respectivos (que comprenden dos dominios VHH idénticos, tales como la construcción ABII42D4-9GS-ABII42D4 bivalente). Los VHH biparatópicos y dimérico/bivalentes se producen en células *E.coli* TG1 y se purifican usando cromatografía de afinidad (IMAC o proteína A) y cromatografía de exclusión molecular (Superdex75 o Sephacryl S100), dando como resultado una pureza ≥ 95% según se evalúa por SDS-PAGE.

8.1 Ensayos de unión TR-FRET: La unión de las construcciones de VHH biparatópicas a A-beta(1-40) se evalúa usando los ensayos TR-FRET de ABII42D4 y ABII60A10 (Ejemplo 3.2). Aunque la construcción ABII42D4-9GS-ABII42D4 bivalente muestra solo una CI50 ligeramente mejorada (mejorada 3,2 veces frente a ABII42D4 monovalente), se descubre que sorprendentemente los VHH biparatópicos se unen de una forma significativamente más fuerte al péptido A-beta que los bloques de construcción monovalentes y los fragmentos Fab 3D6 y m266 (Tabla XIV) así como la IgG 3D6 y m266 (anticuerpos monoclonales de longitud completa 3D6 y m266). No se encuentra diferencia en potencia entre las construcciones con diferentes longitudes y orientaciones de enlazador.

Tabla XIV Valores de CI50 para construcciones de VHH anti-A-beta biparatópicas y ejemplos comparativos en ensayos TR-FRET de ABII42D4 y ABII60A10

Ensayo TR-FRET de 42D4	
Competidor	**CI50 (nM)**
ABII42D4-25GS-ABII60A10	0,047
ABII42D4-35GS-ABII60A10	0,050
ABII60A10-35GS-ABII42D4	0,055
ABII60A10-25GS-ABII42D4	0,043
ABII42D4	51
ABII42D4-9GS-ABII42D4	16
ABII60A10	> 1000
m266Fab	> 1000
3D6Fab	17
Ensayo TR-FRET de 60A10	
Competidor	**CI50 (nM)**
ABII42D4-25GS-ABII60A10	0,066
ABII42D4-35GS-ABII60A10	0,084
ABII60A10-35GS-ABII42D4	0,091
ABII60A10-25GS-ABII42D4	0,091
ABII42D4	> 1000
ABII42D4-9GS-ABII42D4	> 1000
ABII60A10	30
m266Fab	2,3
3D6Fab	> 1000

8.2 Determinación del modo de unión: Para explorar el modo de unión de las construcciones biparatópicas, se evalúa si los dos bloques de construcción de VHH

pueden unirse simultáneamente a la misma molécula de péptido. En un ELISA de tipo sándwich, se aplican como recubrimientos ABII60A10 sin marcador o ABII42D4 marcado con his en una placa Maxisorp y se incuban con el péptido A-beta(1-40). El complejo de VHH-péptido resultante después de incuba con el VHH marcado con c-myc que reconoce el epítopo del péptido A-beta N terminal o central. La detección a través de c-myc se realiza como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2). Se observa unión para las dos preparaciones, indicando que los dos VHH que reconocen el epítopo N terminal o central puede unirse simultáneamente al péptido A-beta.

Determinación del modo de unión por el ensayo basado en SPR: Se inmoviliza A-beta(1-40) biotinilado en el extremo C sobre la microplaca de detección descrita anteriormente (Ejemplo 2). ABII60A10 se inyecta a una concentración de saturación de 500 nM y se observa unión a A-beta(1-40). Después de 120 segundos, se co-inyecta una concentración 200 nM de ABII42D4 y una concentración 500 nM de ABII60A10 dando como resultado una unión adicional. Una inyección de control de 60A10 500 nM solo no da como resultado ninguna unión adicional, lo que demuestra que la unión adicional observada se debe a la interacción de ABII42D4 - A-beta.

Determinación del modo de unión usando cromatografía de exclusión molecular: La cromatografía de exclusión molecular (SEC) separa moléculas de acuerdo con diferencias en tamaño según pasan a través de un medio de filtración en gel introducido en una columna. El modo de unión de construcciones de VHH biparatópicas a su diana puede identificarse analizando el complejo de proteína después de incubar una relación molar 1:2 de la construcción de VHH respectiva y la proteína diana. Por lo tanto, la mezcla se separará por SEC y el contenido de los picos resultante se analiza por electroforesis en gel de proteínas. Una proteína de fusión A-beta(1-28)-p38, que tiene un peso molecular calculado de 46 kDa, es desplaza como un monómero en la SEC. El VHH biparatópico fusionado a albúmina de suero humano (60A10-27GS-42D4-Alb) tiene un peso molecular calculado de 95 kDa. Para identificar si el VHH biparatópico se une a una (= unión intramolecular) o dos (= unión intermolecular) proteínas de fusión A-beta(1-28)-p38, se mezcla una relación molar 1:2 del VHH y la proteína diana, se incuba durante noche a 4ºC y se aplica a SEC usando un ÄKTAexplorer (GE Healthcare, USA) en combinación con una columna de exclusión molecular preparativa (HiLoad 26/60 Superdex 200 calidad prep, GE Healthcare, USA) para separar el complejo de proteína de las

proteínas individuales. La filtración en gel produjo dos picos que se analizan adicionalmente por SDS-PAGE usando la estación de electroforesis automática Experion (Bio-Rad, USA) y la microplaca apropiada (Pro260 Chip, Bio-Rad, USA). El análisis en el Experion revela que el pico principal contiene el VHH y la proteína de fusión a A-beta(1-28)-p38 mientras que el pico más pequeño contiene solo la proteína de fusión A-beta(1-28)-p38. Las cantidades de VHH y proteína de fusión a A-beta(1-28)-p38 en el complejo se determinan usando el software de análisis de datos Experion. Los pesos moleculares de las proteínas medidos con el Experion son 53 kDa para la proteína de fusión A-beta-p38 y 101 kDa para la proteína 60A10-27GS-42D4-Alb. Las concentraciones medidas y, por lo tanto, la molaridad calculada es 0,87 µM y 0,86 µM para la proteína de fusión A-beta(1-28)-p38 y la proteína 60A10-27GS-42D4-Alb respectivamente. Por lo tanto, la relación entre A-beta(1-28)-p38 y 60A10-27GS-42D4-Alb en el complejo de proteína analizado es de aproximadamente 1:1, aunque se mezcla a una relación molar de 1:2. A partir de este resultado puede concluirse que un VHH biparatópico se une a los dos epítopos de una molécula de péptido A-beta dentro de la misma molécula de A-beta y, por lo tanto, no actúa (o al menos no actúa principalmente) mediante entrecruzamiento de moléculas de A-beta a través de las construcciones de VHH bivalentes.

8.3 Estudios de cristalización: Para la cristalización, se incuban ABII035 y ABII059 (160 µM de cada uno) con un exceso molar de 3 veces de péptido A-beta humano (restos 1-24) durante 16 horas y el complejo se purifica por cromatografía de exclusión molecular. El complejo se concentra por diafiltración a una concentración de 4 mg/ml. Los ensayos de cristalización se preparan como experimentos de difusión de vapor con gota sentada mezclando 200 nl de proteína con 200 nl de solución de depósito contra un volumen de depósito de 100 µl. Los cristales aparecen después de varios días en una diversidad de condiciones diferentes, entre las que se usan las siguientes para determinar la estructura: tampón MMT 100 mM pH 5, PEG1500 al 25%. Los cristales se tratan con crio-protector (tampón MMT 85 mM pH 5, PEG1500 35%) y se congelan inmediatamente con nitrógeno líquido. Los datos se recogen en la línea experimental 6SA de la fuente de luz en el Paul-Scherrer Institute en Villigen, Suiza.

En la estructura cristalina, una molécula de ABII035, ABII059 y un péptido derivado del péptido A-beta humano (restos 1-24) forman un complejo ternario. Este complejo forma dímeros a través de una lámina beta antiparalela que se forma por dos moléculas de péptido A-beta. La unidad asimétrica del cristal está ocupada por

dos de estas estructuras, que da un total de cuatro moléculas de cada péptido A-beta, ABII035 y ABII059. Los restos 1 a 9 de A-beta adoptan una conformación alfa-helicoidal, los restos 10 a 20 forman una cadena beta. Los restos 1 a 14 de A-beta están cerca de ABII035 y entre estos Asp1, Ala2, Glu3, Phe4, Asp7 e His14 contactan directamente con ABII035. Los restos 15 a 24 de A-beta están próximos a ABII059 y entre estos Gln15, Lys16, Val18, Phe19, Phe20, Glu22 y Asp23 contactan directamente con ABII059.

Además de lo anterior, por la estructura cristalina es evidente que ABII035 y ABII059 pueden unirse a la misma molécula de A-beta simultáneamente, lo que confirma los resultados obtenidos en el Ejemplo 8.2 anterior.

Además, el modo de interacción de ABII035 con el péptido derivado de A-beta como se demuestra por los datos de estructura cristalina anterior es coherente con la observación descrita en el Ejemplo 7 anterior: ABII035 muestra una buena reactividad cruzada de especie con respecto a los péptidos A-beta de roedor. Las únicas diferencias de secuencia entre A-beta de humano y roedor son R5G, Y10F y H13R. De acuerdo con los datos anteriores, ninguno de estos restos forma contactos con el VHH. Por lo tanto, se supone que el A-beta de roedor puede unirse a ABII035 en la misma conformación que el A-beta humano, lo que hace que sea particularmente útil como reactivo de herramienta (herramienta de investigación) para ensayos que implican modelos animales de roedores (que producen péptido A-beta de roedor), tales como ratones o ratas.

Ejemplo 9: Generación y caracterización de construcciones de VHH anti-A-beta biparatópicas humanizadas extendidas

9.1 Generación de construcciones ABII314 a ABII323: Para estudios de validación *in vivo* con construcciones de VHH biparatópicas humanizadas, se exploran diferentes estrategias de extensión de semivida (HLE): 1) fusión genética a un VHH de unión a albúmina (como se describe, por ejemplo, en el documento WO2004/041865), 2) PEGilación de un resto de Cys localizado en el enlazador entre VHH o en el extremo C de los VHH (documentos WO2008/142164) y 3) fusión genética a albúmina de suero humano o de ratón. Las diferentes estrategias de HLE se exploran con construcciones de VHH biparatópicas que comprenden ABII035 y los bloques de construcción/dominios VHH de ABII059. Las construcciones ABII314 a ABII323 se generan a través de montaje de genes usando series apropiadas de oligonucleótidos solapantes. En la Tabla XV se presentan ID de secuencias y secuencias de aminoácidos de ABII314 a ABII323.

En las construcciones ABII314, ABII315, ABII322 y ABII323, el bloque de construcción ABII059 se fusiona con ABII035 a través de un enlazador Gly-Ser de diferente longitud (como se indica en la Tabla XV), que contiene un resto de cisteína para la conjugación con PEG (en la posición indicada en la Tabla XV). Las construcciones ABII316 a ABII321 consisten en VHH unidos genéticamente a ABII035, ABII059 y ALB8 (VHH humanizado con albúmina humana con reactividad cruzada con albúmina de ratón), en diferentes orientaciones y separados por enlazadores 9- o 35-GS. Las construcciones mostradas en la Tabla XV presentada a continuación pueden incluir además opcionalmente un marcador de hexa-histidina y/o otros marcadores, por ejemplo, para facilitar la purificación de los polipéptidos resultantes.

Tabla XV Construcciones de VHH biparatópicas ABII314 a ABII323

Clon	Información de secuencia	Descripción	SEC ID Nº:
ABII314	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTV SSGGGGCGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAV TWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQ MNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWR YWGQGTLVTVSS	059-35GSC con C en la posición 5-035	142
ABII315	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDT AVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTV SSGGGGCGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFV AAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTA YLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVE DWRYWGQGTLVTVSS	059-9GSC con C en la posición 5-035	143
ABII316	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN	059-9GS-	34

	NYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPED TAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTL VTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKG REFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNS KNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGG NRVEDWRYWGQGTLVTVSS	Alb8-9GS- 035	
ABII317	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPED TAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAY LQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVED WRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKG RFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTI GGSLSRSSQGTLVTVSS	059-35GS- 035-9GS- Alb8	35
ABII318	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPED TAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVT VSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREF VAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNT AYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRV	059-9GS- 035-9GS- Alb8	36

	EDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYY CTIGGSLSRSSQGTLVTVSS		
ABII319	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFR TDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDT AVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREF VAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNT VYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRR SYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVK GRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTLVTVSS	035-35GS-059-9GS-Alb8	37
ABII320	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRT DTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYA DSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTA VYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNS LRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTL VTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGR EFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINV RRSYSSWGQGTLVTVSS	035-9GS-Alb8-9GS-059	38
ABII321	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTD	035-9GS-	39

	TMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS	Alb8-9GS-059 (primera E delecionada)	
ABII322	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGSGGGGSGGGG**C***GGGGSGGGGSGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	059-27GSC con C en la posición 14-035	40
ABII323	VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGG**C***GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWGQGTLVTVSS	059-35GSC con C en la posición 15-035	41

9.2 Producción, purificación y PEGilación de construcciones de VHH biparatópicas de semivida prolongada humanizadas: Se purifican construcciones de VHH biparatópicas marcadas con His_6 ABII314, ABII315, ABII322 y ABII323 mediante cromatografía de afinidad (IMAC o proteína A), cromatografía de intercambio catiónico (SP Sepharose, Source 30S o POROS 50HS) y cromatografía de exclusión molecular (Superdex75 o Sephacryl S100). A niveles de pureza de la proteína de 90% como mínimo (determinado por SDS-PAGE y posterior tinción con Azul Brilliant de Coomassie), se realiza una PEGilación. Primero se reducen los enlaces S-S intermoleculares de los VHH añadiendo solución de DL-Ditiotreitol (DTT) a una concentración final de 10 mM seguido de una incubación de 2 a 3 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4ºC. Posteriormente se retira el agente reductor por cromatografía de exclusión molecular (Superdex 75/200) en tampón de proceso D-PBS, recogiendo el pico principal. Inmediatamente después de retirar el agente reductor, la construcción del polipéptido biparatópico se incuba con un exceso molar de 5 veces de PEG durante 1 h a temperatura ambiente o durante una noche a 4ºC. El polipéptido PEGilado se separa de PEG libre y del polipéptido no PEGilado por cromatografía de intercambio catiónico (MacroCap SP). Se realiza una etapa de pulido final y de cambio de tampón a D-PBS mediante cromatografía de exclusión molecular preparativa en Superdex200 o Sephacryl S200. La calidad del polipéptido PEGilado purificado se verifica por SDS-PAGE seguido de tinción con CBB y PEG como se ha descrito anteriormente por Natarajan et al (1995) en Bioconjugate chemistry 16: 113-121.

9.3 Caracterización de construcciones de VHH anti-A-beta biparatópico humanizado de semivida prolongada por TR-FRET: Para comparar las propiedades de unión de las construcciones de VHH biparatópicas de semivida prolongada descritas anteriormente con los anticuerpos monoclonales (IgG) 3D6 y m266, se ensayan ABII315 a ABII320, ABII322 y ABII323 en ensayos TR-FRET competitivos de ABII002 y ABII050 (véanse los Ejemplos 8.1 y 3.2). En la Tabla XVI se resumen las CI50 medias derivadas de al menos dos experimentos independientes Tabla XVI.

Tabla XVI Valores de CI50 para VHH biparatópicos anti-A-beta de semivida prolongada en ausencia/presencia de albúmina.

VHH	**CI50 (nM) ensayo de ABII002**	**CI50 (nM) ensayo de ABII050**
VHH monovalentes y Fab		
ABII002	2,9	NC
ABII035	3,5	NC
ABII050	NC	6,3
ABII059	NC	12,8
Fab3D6	3,4	NC
Fab266	NC	0,52
VHH Multivalentes e IgG		
ABII315-PEG20 ABII315-PEG40	0,13 No ensayado	0,28 0,31
ABII322-PEG40	0,14	0,17
ABII323-PEG40	0,18	0,20
ABII316	0,19	0,31
ABII316 + HSA 10 µM	0.05	0,06
ABII317	0,29	0,49
ABII318	0,13	0,28
ABII319	0,26	0,33
ABII320	0,25	0,21
ABII059-27GS-ABII035-MSA	0,19	0,18
ABII059-27GS-ABII035-MSA_D3	0,10	0,12
IgG 3D6	1,9	NA
IgG m266	NA	0.53

NC: no se detectó competición

MSA: albúmina de suero de ratón

MSA_D3: dominio III de albúmina de suero de ratón

En el ensayo competitivo TR-FRET de ABII002, todas las construcciones de VHH de semivida prolongada muestran una potencia muy mejorada entre 6,5 veces y 14,6 veces (para ABII315-PEG20) en comparación con la IgG 3D6 (CI50 de 1,9 nM). En comparación con IgG m266, todas las construcciones de VHH muestran valores de CI50 significativamente mejores en el ensayo competitivo TR-FRET de ABII050, teniendo el VHH ABII320 la menor CI50 de 0,21 nM, mejorada 2,5 veces con respecto a la IgG266.

En comparación con la potencia del VHH monovalente ABII035, la construcción de VHH adaptada con la máxima potencia (ABII315-PEG20) muestra una CI50 mejorada 27 veces en el ensayo competitivo TR-FRET ABII002. La construcción de VHH ABII320 muestra una potencia mejorada 61 veces con respecto a ABII059 monovalente en el ensayo competitivo TR-FRET de ABII050.

La mayor potencia de las construcciones biparatópicas con respecto a los bloques de construcción monoméricos ABII035 y ABII059 confirma los resultados obtenidos con las construcciones no humanizadas y no maduradas (Ejemplo 8.1) y confirma la hipótesis de la unión intramolecular de una construcción de VHH biparatópica a una molécula de péptido A-beta (véase el Ejemplo 8.2 anterior). Además, estos experimentos demuestran que las técnicas de prolongación de semivida aplicadas a las construcciones de VHH descritas anteriormente no interfiere con la unión de las construcciones al péptido A-beta.

Para evaluar si la unión de construcciones de VHH que contienen ALB8 al péptido A-beta se ve afectada por HSA (como está presente en la corriente sanguínea), se ensayan construcciones biparatópicas equivalentes a ABII316-ABII320 pero que contienen los bloques de construcción de VHH no humanizado en ensayos TR-FRET competitivos tanto en presencia como ausencia de cantidades µM de albúmina. En los dos formatos de ensayo, la pre-incubación con albúmina humana, de perro o bovina 6,5-10 µM, (sin que las dos últimas variantes de albúmina muestren una interacción detectable con ALB8) no afectan a la potencia en los ensayos TR-FRET.

Para ensayar si ALB8 puede unirse aún a la albúmina en el contexto de las construcciones de VHH biparatópicas, se realiza un análisis cinético de las

construcciones de VHH para la unión a una microplaca recubierta con HSA (Biacore). Se determinaron afinidades comparables para ALB8 monovalente y la construcción de fusión de ALB8 ensayada, indicando que no se realiza la unión a HSA del bloque de construcción de ALB8.

9.4 Inhibición de la formación de fibrillas de A-beta: En un experimento adicional, se evalúa una serie de dilución de la construcción de VHH biparatópica ABII320 con respecto a su capacidad de inhibir la formación de fibrillas de A-beta *in vitro* como se describe en el Ejemplo 3.5 y se compara con la actividad de sus bloques de construcción monovalentes ABII035 y ABII059 y anticuerpos de control. La máxima inhibición a la mayor concentración de la construcción de VHH ensayada (26 µM) se calcula como una media de dos experimentos independientes. Aunque se detecta una inhibición de fondo consistente de aproximadamente 17% para un VHH no relacionado (no específico de A-beta), como control, los fragmentos Fab de 3D6 y m266 monovalentes muestran una inhibición dependiente de la dosis reproducible con una inhibición máxima de 82 %. Las IgG (intactas) 3D6 y m266 producen una inhibición de 75% y 83% respectivamente. Los VHH monovalentes ABII035 y ABII059 muestran una inhibición máxima de 54% y 80%, respectivamente, mientras que la construcción de VHH biparatópica de semivida prolongada ABII320 muestra una capacidad de inhibición máxima de 84% a 26 µM.

9.5 Unión a APP-alfa soluble: APP-alfa soluble (sAPPalfa) se libera de su proteína precursora unida a la célula APP por una actividad alfa-secretasa. La secuencia de aminoácidos de sAPPalfa contiene los primeros dieciséis restos aminoacídicos del péptido A-beta, pero no contiene el epítopo de 3D6 correcto, ya que un resto aminoacídico N-terminal libre en el péptido A-beta es esencial para la interacción completa de 3D6. La localización de epítopos indica que el VHH específico de región N terminal ABII001 y sus derivados interaccionan con un epítopo distinto en comparación con el anticuerpo monoclonal 3D6. La unión de VHH a sAPPalfa en comparación con A-beta se ensaya usando una preparación de ensayo basándose en TR-FRET. Se mezcla sAPPalfa biotinilado (Sigma) a una concentración final de 0,82 nM con la misma concentración de perlas marcadas con estreptavidina-Europio y una concentración 4,4 nM de ABII320 marcado con AlexaFluor647. Los siguientes compuestos no marcados se ensayan con respecto a la competición: ABII320, sAPPalfa, IgG m266, IgG 3D6, ABII035 y A-beta(1-40). Se realizan dos experimentos independientes aplicando una serie de dilución de los compuestos competidores. Los valores de CI50 medios son 0,72 nM, 25,6 nM, 0,23 nM y 14 nM

para ABII320 no marcado, ABII035, A-beta(1-40) y sAPPalfa, respectivamente. Como era de esperar, no se observa competición para la IgG m266 y la IgG 3D6. En esta preparación de ensayo, ABII320 interacciona 63 veces mejor con A-beta(1-40) que con sAPPalfa. En una situación paralela usando A-beta(1-40) biotinilado en lugar de sAPPalfa, biotinilado, ABII320 interacciona al menos 20000 veces mejor con A-beta(1-40) que con sAPPalfa (CI50 estimada basándose en datos extrapolados a mayores concentraciones), lo que indica que ABII320 prefiere la unión a A-beta(1-40) con respecto a sAPPalfa.

9.6 Localización de epítopos para construcciones de VHH biparatópicas: Se usan péptidos derivados de A-beta(1-42) presentados como micromatrices de péptidos (PepStar™) para determinar los epítopos de VHH. Las micromatrices de péptidos de PepStar™ (JPT Peptide Technologies, Alemania) son series de micromatrices de péptidos adaptadas para la exploración rápida de la interacción anticuerpo/péptido VHH presentada en portaobjetos. Los péptidos de la micromatriz representan una exploración 12/11 derivada de la estructura primaria de A-beta(1-42) inmovilizado a través de su extremo N. Además, se inmovilizan péptidos truncados el extremo N que representan los primeros 16 hasta los primero 7 aminoácidos de A-beta(1-42) a través de su extremo C. Tras la incubación con el VHH, el acontecimiento de unión puede detectarse leyendo la intensidad de fluorescencia del anticuerpo secundario marcado dirigido contra el VHH.

Después del bloqueo de la micromatriz con tampón de bloqueo (PBS, BSA al 1%, Tween20 al 0,1%) durante una noche a 4ºC, se incuba durante 2 h a 4ºC con 200 µl de la construcción de VHH biparatópica ABII320 en tampón de lavado (PBS, DTT 5 mM, Tritón X-100 0,05%, Glicerol 5%, BSA 1%) a una concentración de 5 µg/ml. Para retirar el exceso de VHH, la micromatriz se incuba tres veces durante dos minutos en hielo con tampón de lavado. Posteriormente, la micromatriz se incuba durante una hora a 4ºC con un Alexa Fluor 647 anti-VHH (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Alemania) en tampón de lavado a una concentración de 0,5 µg/ml. El anti-VHH procede de suero de cabra después de la inmunización con el dímero de VHH G6-G6. El anticuerpo secundario no unido se retira por incubación de la micromatriz tres veces durante 2 minutos en hielo con tampón de lavado. Finalmente, el portaobjetos se seca en una centrífuga a 800 x g durante tres minutos y se explora con el ProScanArray de Perkin Elmer usando un láser de 633 nm. Los datos se analizan con el software ScanArray Express® de Perkin Elmer.

Como resultado, se obtienen manchas de péptido que tiene un diámetro de 420 µm que se analizan con respecto a la intensidad de fluorescencia, a partir de las cuales puede evaluarse la interacción del VHH con los péptidos de una manera semicuantitativa. De esta manera, la incubación de la construcción de VHH biparatópica ABII320 con las micromatrices de péptidos revela que ABII320 interacciona con los restos 1-11 y 15-24 del péptido A-beta. La exploración mediante alanina indicó que los restos Asp1, Glu3, Phe19, Phe20 y Asp23 del péptido A-beta son esenciales para la unión del VHH biparatópico, lo cual es coherente con los datos obtenidos a partir del análisis de la estructura cristalina. Se obtienen los mismos resultados usando otras dos construcciones de VHH biparatópicas que incluyen los dominios VHH de ABII035 y ABII059.

9.7 Determinación de constantes de unión usando ensayo de exclusión cinética (KinExA): Se determinan las afinidades de tres construcciones de VHH biparatópicas para el péptido A-beta usando KinExA (Ensayo de Exclusión Cinética). KinExA es una tecnología con la capacidad de medir moléculas no modificadas en fase de solución (Darling, R.J. y Brault, P.-A.: Kinetic exclusion assay technology: Characterization of Molecular Interactions; Assay and Drug Development Technologies 2(6): 647 (2004)). El método KinExA mide la concentración de moléculas de VHH no complejadas en una mezcla de VHH, antígeno y complejo de VHH-antígeno. La concentración del VHH no complejado se mide exponiendo la mezcla en fase de solución a antígeno inmovilizado en fase sólida durante un periodo de tiempo muy breve. El "tiempo de contacto" entre la mezcla en fase de solución y el antígeno inmovilizado en fase sólida se mantiene suficientemente corto como para que la disociación del complejo de VHH-antígeno sea insignificante. Cuando se excluye cinéticamente la posibilidad de una disociación significativa del complejo de VHH-antígeno, solo el VHH no complejado ("libre") puede unirse a la fase sólida. La cantidad de VHH libre que se une a la fase sólida (medida por emisión de fluorescencia de un marcador secundario) es directamente proporcional a la concentración de VHH libre en la muestra en fase de solución.

El péptido A-beta(1-28) (Anaspec, USA) se usa como antígeno para la incubación con VHH biparatópicos. La proteína de fusión "His.Xa.Abeta1-28.GS.p38" se usa para preparar la fase sólida para la unión de los VHH no complejados. La estructura de la proteína de fusión es la siguiente: Marcador His, sitio de escisión de factor Xa, péptido A-beta(1-28), enlazador GS, p38 alfa murina y

tiene la siguiente secuencia:
MHHHHHHIEGRDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGGSGGSQERPTFYR
QELNKTIWEVPERYQNLSPVGSGAYGSVCAAFDTKTGHRVAVKKLSRPFQSIIHAK
RTYRELRLLKHMKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLVTHLMGADLNNIVKCQKLT
DDHVQFLIYQILRGLKYIHSADIIHRDLKPSNLAVNEDCELKILDFGLARHTDDEMTG
YVATRWYRAPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAELLTGRTLFPGTDHIDQLKLILR
LVGTPGAELLKKISSESARNYIQSLAQMPKMNFANVFIGANPLAVDLLEKMLVLDSD
KRITAAQALAHAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFESRDLLIDEWKSLTYDEVISFVP
PPLDQEEMES (SEC ID Nº: 144).

La proteína de fusión se expresa en E. coli, se purifica usando Ni-NTA (Qiagen, Alemania) y se alquila con yodoacetamida (Sigma, USA). Se recubren perlas de polimetilmetacrilato (Sapidyne Instruments Inc., USA) con la proteína de fusión en PBS con NaN_3 al 0,02%, bloqueadas con BSA al 1% en el mismo tampón y se usan para todos los experimentos como fase sólida. Los experimentos KinExA se realizan con el software KinExA 3000 y KinExA Pro (Sapidyne Instruments Inc., USA) a temperatura ambiente (aprox. 21ºC). Como tampón de proceso se usa PBS con NaN_3 0,02%. Para todos los experimentos, el antígeno se diluye en serie en PBS con BSA al 0,1% y NaN_3 al 0,02% que tiene una concentración constante de VHH. Las mezclas de antígeno y VHH se incuban durante 24 h a temperatura ambiente antes de la medición. El caudal de las muestras y el anticuerpo de marcaje para todos los experimentos es 0,25 ml/min.

El anticuerpo marcado con fluorescencia secundario para la medición de la construcción de VHH ABII320 (primera construcción de VHH) es el anticuerpo de cabra conjugado con Alexa 647 anti-G6G6 (anti-VHH) descrito en el punto 9.6 anterior. Este anticuerpo se usa a un volumen de 500 µl y una concentración de 0,5 µg/ml en PBS con BSA al 0,1% y NaN_3 al 0,02%. El ABII320 se mide adicionalmente como se describe en presencia de albúmina humana recombinante (albcult™, novozymes, USA). La unión de la construcción de VHH ABII322 PEGilada (segunda construcción de VHH) a la fase sólida se determina usando 500 µl de anti-PEG de conejo (Epitomics Inc., USA) a una concentración de 0,1 µg/ml en PBS con BSA 0,1% y NaN_3 0,02% en la línea 13 del instrumento en combinación con 250 µl de un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Alexa 647(Molecular Probes Inc., USA) a una concentración de 0,25 µg/ml en el mismo tampón. La unión de la proteína de fusión de la construcción de VHH biparatópica-HSA mostrada en la Tabla IV-anterior (SEC ID Nº: 32; (tercera construcción de

VHH) en la fase sólida se determina usando 500 µl de un anticuerpo de cabra anti-HSA (Bethyl Laboratories, Inc., USA) a una concentración de 0,5 µg/ml en PBS con BSA 0,1% y NaN_3 0,02% en la línea 13 del instrumento en combinación con 500 µl de un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Alexa 647(Molecular Probes Inc., USA) a una concentración de 0,5 µg/ml en el mismo tampón.

Los datos de titulación en equilibrio se ajustan a un modelo de unión 1:1 usando el software KinExA Pro Versión 1.0.3 (Sapidyne Instruments Inc., USA). La primera construcción de VHH (VHH biparatópico ABII320) se mide a concentraciones de 3, 5 y 10 pM. El volumen de muestra es 5 ml de cada una. La K_D medida es 1,1 ± 0,3 pM y 0,4 ± 0,1 pM en presencia de albúmina humana recombinante 1%. La segunda construcción de VHH (VHH PEGilado biparatópico ABII322) se mide a concentraciones de 3, 4, 5 y 6 pM. El volumen de muestra es 11 ml cada una. La K_D medida es 0,6 ± 0,2 pM. La tercera de construcción de VHH (proteína de fusión HSA-VHH) se mide a concentraciones de 2, 3 y 4 pM. El volumen de muestra es 5 ml cada una. La K_D medida es 0,5 ± 0,3 pM.

9.8 Unión a piroglutamil-Abeta: Piroglutamil (pGlu)-A-beta es un componente principal de las placas neuríticas en la enfermedad de Alzheimer. Se forma por ciclación del glutamato N-terminal en la posición 3 catalizada por la glutaminil ciclasa (QC) dando como resultado una variante muy amiloidogénica de A-beta. La secuencia de aminoácidos de pGlu-A-beta contiene los restos aminoacídicos 3-42 del péptido A-beta. Los dos primeros aminoácidos N-terminales que son esenciales para la interacción completa con el anticuerpo 3D6 están ausentes. Las afinidades para la interacción pGlu-A-beta– ABII320/ABII322/m266/3D6 se determinan mediante resonancia de plasmón de superficie (Biacore) usando pGlu-A-beta(1-28) biotinilado en el extremo C capturado en una microplaca de detección con estreptavidina como se ha descrito anteriormente (Ejemplo 2). Se inyectan polipéptidos purificados ABII320 o ABII322 o anticuerpos m266 o 3D6 a 9 concentraciones diferentes (entre 0,195 y 50 nM para ABII320, 0,39-100 nM para ABII322 y 0,782-200 nM para 3D6 y m266) durante 3 min y se deja disociar durante 10 min. Las curvas de asociación y disociación pueden ajustarse usando un modelo de interacción 1:1 y puede determinarse un valor de K_D preciso. Se observa que las afinidades son 2 nM para ABII320, 1 nM para ABII322, 224 pM para el anticuerpo m266 y no pudo observarse ninguna unión para el anticuerpo 3D6.

Ejemplo 10: Unión de VHH anti-A-beta a placas amiloides

Se perfilan VHH en un ensayo de inmunorreactividad de placas amiloides en

tejido (TAPIR) de acuerdo con su capacidad de unirse a placas amiloides en cortes de cerebro de ratón de Tg2576. El ensayo TAPIR muestra una evaluación cualitativa (núcleo denso y/o placas amiloides difusas) así como cuantitativa (dosis eficaz mínima MED) de los VHH. Para el ensayo, se preparan secciones de corona cortadas con criostato de ratones positivos para placas, se montan en portaobjetos Superfrost de 76x26 mm (Roth) y se almacenan a -20°C. Las criosecciones se descongelan durante 20 minutos y se fijan en paraformaldehído (PFA) al 3% durante 10 minutos en hielo. Las secciones después se incuban en peróxido de hidrógeno 0,3% durante 30 minutos, se bloquean con PBS que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 2,5% y suero de ratón al 2% durante 1,5 horas y se incuban con VHH marcado con myc o Fab a diferentes concentraciones (3,0 mg/ml a 4,11 ng/ml), disuelto en PBS que contiene BSA al 2,5%. Los cortes después se incuban durante 1,5 horas con anticuerpo monoclonal de ratón anti c-myc biotinilado a 10 mg/ml (9E10) (Sigma-Aldrich), disuelto en PBS que contiene BSA al 2,5% (con la excepción de los cortes incubados con ABII320 biotinilado). Las secciones se incuban durante 1,5 horas con solución de kit Vectastain ABC ELITE (Vector Laboratories) preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se visualizan usando solución Vector VIP SK 4600 (Vector Laboratories), preparada de nuevo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secciones se deshidratan progresivamente por incubaciones durante 5 minutos en etanol al 60-, 80- y 100% e isopropanol 100% y se limpian durante 5 minutos en xileno. Las secciones después se montan con medio de montaje nuevo Entellan (Merck) y se cubren con cubreobjetos de 24x50 mm (Menzel-Glaeser). Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Además de ABII320 y fragmentos Fab de anticuerpo monoclonal m266 descrito anteriormente, se analizaron otras diversas construcciones de VHH biparatópicas (marcadas con myc) en el ensayo TAPIR anterior. La estructura de las construcciones de VHH ABII300 a ABII305 se muestra en la Tabla XVII proporcionada más adelante y, en todos los casos, incluye dominios VHH ABII002 (SEC ID Nº: 62) y ABII050 (SEC ID Nº: 100), en diferentes órdenes y combinados con un dominio VHH de unión a albúmina (ABII300 a ABII304) o un resto PEG40 (ABII305).

A partir de los resultados, puede verse que los VHH biparatópicos ABII300, ABII301, ABII302, ABII303 y ABII304 así como ABII305-PEG40 revelan la misma afinidad por placas amiloides de tejidos auténticos (núcleo denso y tipo difuso de

placas) en el ensayo TAPIR. El orden particular de los enlazadores o la conjugación con PEG40 no parece tener un efecto significativo sobre la afinidad de las placas.

Tabla XVII Estructura de construcciones de VHH biparatópicas ABII300 a 305 y resultados obtenidos en el ensayo TAPIR

VHH	**Estructura del dominio**	**Epítopo**	**MED [ug/ml]**
m266 (Fab)		central	Sin unión
ABII300	ABII050-GS9-Alb8-GS9-ABII002	Extremo N y central	0,11 > x > 0,04
ABII301	ABII050-GS35-ABII002-GS9-Alb8	Extremo N y central	0,11 > x > 0,04
ABII302	ABII050-GS9-ABII002-GS9-Alb8	Extremo N y central	0,11 > x > 0,04
ABII303	ABII002-GS35-ABII050-GS9-Alb8	Extremo N y central	0,11 > x > 0,04
ABII304	ABII002-GS9-Alb8-GS9-ABII050	Extremo N y central	0,11 > x > 0,04
ABII320	ABII035-GS9-Alb8-GS9-ABII059	Extremo N y central	0,11 > x > 0,04
ABII305 -PEG40	ABII050-GSC35(PEG a Cys en la posición 5)-ABII002	Extremo N y central	0,11 >x >0,04

Ejemplo 11: Farmacodinámica de construcciones de VHH anti-A-beta biparatópicas de semivida prolongada

Para determinar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de VHH, se inyectan muestras i.v. o i.p. en ratones transgénicos para APP. Se toman muestras de plasma extrayendo sangre de la V. safena. Se tomó una muestra antes de la dosis antes de la aplicación de VHH, IgG o vehículo y después de 4 y 24 horas.

Como la unión de los VHH y las IgG interfiere con la detección en el ELISA, los complejos A-beta:VHH o A-beta:IgG se desnaturalizan antes del ensayo para detectar la cantidad total de A-beta(1-40) en plasma. En resumen, la muestras se

desnaturalizan con GuHCl 6 M (Sigma Aldrich) y se purifican sobre una columna de extracción en fase sólida. Se preparan placas de 96 pocillos HLB Oasis de 60 mg (Waters) en colectores de placas de extracción (Waters) conectados a vacío doméstico. Las columnas se activan con 1 ml de metanol (MeOH), seguido de 1 ml de H_2O. Se cargan muestras extraídas con GuHCl y se lavan secuencialmente con volúmenes de 1 ml de MeOH al 5 y 30% y después se eluye A-beta con NH_4OH al 2% en MeOH al 90%. Se recogen muestras eluidas y se centrifugan al vacío (Eppendorf Vacufuge) a 1400 rpm, 60ºC durante 90 min. Una vez que las muestras se han secado completamente, se reconstituyen en tampón de bloqueo y se almacenan a –20ºC hasta el análisis. Los niveles totales en plasma de A-beta(1-40) se determinan por ELISA de tipo sándwich (4G8/anti-A-beta(1-40), mesoscale discoveries) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles totales de A-beta(1-40) previos a la dosis para ratones transgénicos para APP son aproximadamente 1,25 nM en plasma. En estos ratones inyectados con 15 nmol/kg de VHH biparatópicos o IgG (misma dosis, normalizada para los sitios de unión), el nivel de A-beta total en plasma alcanzó un máximo aproximadamente 4 horas después de la aplicación i.v. Los datos se expresan como "aumento en veces con respecto a antes de la dosis" donde las concentraciones en plasma de A-beta(1-40) determinadas a 4 y 24 horas después de la inyección se dividen por los niveles previos a la dosis. Los resultados se muestran en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII Aumento en veces y AUD de A-beta(1-40) en plasma después de la inyección i.v. de VHH anti-A-beta en comparación con anticuerpos anti-A-beta 3D6 y m266

Aumento en veces de A-beta(1-40) en plasma con respecto a antes de la dosis					
		ratones transgénicos para APP			
	exp.	dosis (nmol/kg)	4 h	24 h	AUD
ABII300	14/16	15 i.v.	37,78	21,00	632,5
ABII301	14/16	15 i.v.	26	13,34	402,9
ABII305	16	15 i.v.	33,86	15,81	877,5
ABII306	21	15 i.v.	45,05	32,83	862,5
ABII316	24-26	15 i.v.	21,88	9,26	649

ABII317	24-26	15 i.v.	35,91	18,95	1615
ABII318	24-26	15 i.v.	13,45	5,81	807,9
ABII319	24-26	15 i.v.	36,53	21,53	1313
ABII320	24-26	15 i.v.	42,36	17,57	969,9
ABII315-PEG40	24-26	15 i.v.	28,78	12,14	761
m266 IgG1	20	7.5 i.v. *	25,79	17,9	528,9
3D6 IgG2b	20	7.5 i.v. *	29,47	25,88	673,2

* 15 nmol/kg, cuando se calcula para los sitios de unión (2 por molécula de IgG)

De esta manera, en comparación con las moléculas de IgG conocidas en la técnica, las construcciones de VHH biparatópicas tienen el potencial de mostrar niveles máximos hasta 50% mayores para A-beta en plasma total (4 h) y valores de AUD aumentados >2, que indican superioridad de las construcciones de VHH con respecto a las IgG en la captura de A-beta.

Para confirmar que el nivel de A-beta en plasma libre/no unido se reduce después de la administración de la construcción de VHH, se desarrolla un ELISA competitivo. En resumen, se captura A-beta(1-40) con un anticuerpo específico para A-beta(1-40) acoplado a una placa ECL-ELISA (mesoscale discoveries). Las moléculas de VHH o IgG que se usan para tratar los animales en inmunoterapia pasiva se marcan usando MSD Sulfo-Tag NHS-Ester (mesoscale discoveries) de acuerdo con el manual del fabricante y se usa como herramienta de detección en este formato ELISA de tipo sándwich. El A-beta(1-40) que se une al VHH o a IgG no puede detectarse en estas situaciones mientras que el A-beta(1-40) libre/no unido es detectable. Para comparar los datos de diferentes ensayos, todos los valores se normalizan a los datos de un grupo tratado con vehículo. Los ratones transgénicos para APP se tratan con VHH o IgG como se indica y el plasma se recoge y se analiza para el A-beta(1-40) libre/no unido. Ya a las 2 horas después de la inyección i.p. de 132 nmol/kg de VHH anti-A-beta (ABII320 y ABII322, respectivamente), los niveles de A-beta(1-40) libre/no unido se redujeron fuertemente y de una forma muy significativa desde los niveles basales (aprox. 2 nM) hasta por debajo del límite de detección a 2 pM. Una dosis equivalente de 3D6-IgG (10 mg/kg, 132 nmol/kg sitios de unión = 66 nmol/kg IgG) puede reducir A-beta(1-40) no unido en plasma sólo hasta un nivel de 52 pM (Fig.1). En esta

comparación, las construcciones de VHH biparatópicas ABII320 y ABII322 muestran, a la misma dosis, una reducción inesperadamente mucho mayor en A-beta libre/no unido en plasma en comparación con IgG 3D6, indicando de nuevo superioridad en la captura de A-beta con respecto a IgG (3D6). Esto hace que estas construcciones de VHH sean particularmente útiles en términos de eficacia terapéutica de VHH. Específicamente, se espera una reducción más eficaz de A-beta en plasma para prevenir completamente la entrada de A-beta desde el plasma al cerebro, generando de esta manera una gradiente de concentración más escalonado entre las reservas de A-beta en el cerebro y en plasma, acelerándose de esta manera la salida de A-beta desde el cerebro al plasma.

Ejemplo 12: VHH que atraviesan la BBB

Para mejorar adicionalmente las características de cruce de la barrera hematoencefálica (BBB) de las construcciones de VHH, se construyen VHH biespecíficas que comprenden los VHH biparatópicos y los VHH que atraviesan BBB FC44 y FC5 (descritos con detalle en el documento WO2002/057445). Estos VHH mejoran el paso a través de la BBB por unión a una proteína diana expresada en la BBB, después de lo cual los VHH se someten a transcitosis a través de las células endoteliales y se liberan en el parénquima cerebral. Como tales, los VHH fusionados genéticamente a los VHH FC44 y FC5 es de esperar que experimenten un transporte activo al interior del cerebro, dando como resultado mayores niveles cerebrales y un mejor efecto terapéutico. Las construcciones ABII400-ABII407, que comprenden los VHH FC44 o FC5, se generan mediante montaje génico usando series apropiadas de oligonucleótidos solapantes. En la Tabla XIX proporcionada a continuación se presentan las SEC ID Nº y las secuencias de aminoácidos. En resumen, se generan VHH que contienen los VHH FC5 o FC44 entre la construcción de VHH ABII035 y ABII059, o entre el VHH que se une a HSA y los bloques de construcción ABII035 o ABII059, o en extremo amino o carboxi de la molécula (véase la Tabla XIX). Los VHH se expresan en E.coli o en Pichia pastoris y se purifican como se describe en el Ejemplo 9.2. Los VHH purificados se evalúan en un ensayo de cruce de la BBB *in vitro* como se describe (documento WO2002/057445 y referencia adicionales en el mismo). Además, se administran *in vivo* VHH radiomarcados o no radiomarcados que comprenden los bloques de construcción FC5 y FC44 y se determinan los niveles cerebrales usando recuento de centelleo de líquidos o ELISA.

Tabla XIX Construcciones de VHH anti-A-beta biparatópicas, que comprenden

además restos FC5 y FC44

Construcción de VHH ID		estructura de dominio	SEC ID Nº:
ABII400	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNS GRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWG QGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLQASGGGLVQA GGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPG KEREF VSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTST ATPL RVDYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFS SFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSV KGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAV YYC TIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FNNY NMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLR PEDTA VYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLV TVSS	035-9GS-FC5-Alb8-9GS-059	145
ABII401	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNS GRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP	035-9GS-Alb8-9GS-FC44-9GS-059	146

	EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWG QGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAP GKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRS SQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLQASGGG LVQAGGSLRLSCSASVRTFSIYAMGWFR QAPGK EREFVAGINRSGDVTKYADFVKGRFSISR DNAKNMVYLQMNSLKPEDTALYYCAAT WAYD TVGALTSGYNFWGQGTQVTVSSGGGGS GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGRTF NNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGV STYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRPE DTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQG TLVTVSS		
ABII402	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNS GRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWG QGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAP GKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRS SQ GTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGG	035-9GS-Alb8- 9GS-059-9GS- FC5	147

	LVQPGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWF RQAPGK GREFVAAVSRSGVSTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAA YRGT AINVRRSYSSWGQGTLVTVSSGGGGSG GGSEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAA SGFKIT HYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDN TFYSNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL KPED TADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQV TVSS		
ABII403	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCSASVRT FSIYAMGWFRQAPGKEREFVAGINRSGD VTKY ADFVKGRFSISRDNAKNMVYLQMNSLKP EDTALYYCAATWAYDTVGALTSGYNFW GQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQA PGKGRE FVAAVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFV VGGN RVEDWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGG SEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGF TFSSFG MSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLY ADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPE DTAV YYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSG GGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTF NNYNMGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGV	FC44-9GS-035-9GS-Alb8-9GS-059	148

	STYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRPE DTAVYYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQG TLVTVSS		
ABII404	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNS GRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWG QGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLS CAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTVYL QMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRR SYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV QLVESG GGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYAD SVKGRF TISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCT IGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSE VQL QASGGGLVQAGGSLRLSCSASVRTFSIY AMGWFRQAPGKEREFVAGINRSGDVTK YADFV KGRFSISRDNAKNMVYLQMNSLKPEDTA LYYCAATWAYDTVGALTSGYNFWGQGT QVTVS S	035-35GS-059- 9GS-Alb8-9GS- FC44	149
ABII405	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNS	035-9GS- FC44-9GS-	150

	GRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWG QGTLV TVSSGGGGSGGGSEVQLQASGGGLVQA GGSLRLSCSASVRTFSIYAMGWFRQAPG KEREF VAGINRSGDVTKYADFVKGRFSISRDNAK NMVYLQMNSLKPEDTALYYCAATWAYDT VGA LTSGYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGG SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR TFNNYN MGWFRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRP EDTAV YYCAAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG NSLRL SCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEW VSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAK TTLY LQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQG TLVTVSS	059-9GS-Alb8	
ABII406	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGF KITHYTMGWFRQAPGKEREFVSRITWGG DNTFY SNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKP EDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGT QVTV SSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCVHSGPTFRTDTMGWFRQAPGK GREFVA AVTWNSGRINYADSVKGRFTISRDNSKN TAYLQMNSLRPEDTAVYYCAAHRFVVGG	FC5-9GS-035- 9GS-059-9GS- Alb8	151

	NRVE DWRYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV QLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFN NYNMGW FRQAPGKGREFVAAVSRSGVSTYYADSV KGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTA VYYC AAAYRGTAINVRRSYSSWGQGTLVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCA ASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSS ISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTL YLQM NSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVT VSS		
ABII407	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCVHSGPT FRTDTMGWFRQAPGKGREFVAAVTWNS GRINY ADSVKGRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRP EDTAVYYCAAHRFVVGGNRVEDWRYWG QGTLV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLV QPGGSLRLS CAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKGREFV AAVSRSGVSTYYADSVKGRFTISRDNSK NTVYL QMNSLRPEDTAVYYCAAAYRGTAINVRR SYSSWGQGTLVTVSSGGGGSGGGSEV QLQASG GGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGW FRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSV KGRF TISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTADYYC AAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSSG	035-35GS-059-9GS-FC5-9GS-Alb8	152

	GGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAA SGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSL RPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS		

Ejemplo 13: Proceso de fabricación industrial para polipéptidos biparatópicos PEGilados de la invención

13.1 Fermentación: Cualquiera de los polipéptidos ABII305, ABII306, ABII314, ABII315, ABII322 y ABII323 puede expresarse en el citoplasma de diferentes cepas de E. coli, tales como W3110, TG1, BL21, BL21(DE3), HMS174, HMS174(DE3), MM294 bajo el control de un promotor inducible. Este promotor puede elegirse entre lacUV5, tac, T7, trp, T5 y araB. El medio de cultivo preferiblemente se define completamente de acuerdo con Wilms et al., 2001 (Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M., y Altenbuchner, J. : High-Cell-Density Fermentation for Production of L-N-Carbamoylase Using an Expression System Based on the Escherichia coli rhaBAD Promoter. Biotechnology and Bioengineering, 73: 95-103 (2001)), DeLisa et al., 1999 (DeLisa, M. P., Li, J. C., Rao, G., Weigand, W. A., and Bentley, W. E.: Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of Escherichia coli using an on-line optical sensor. Biotechnology and Bioengineering, 65: 54-64. (1999)) o equivalente. Sin embargo, puede ser beneficioso el suplemento del medio con aminoácidos tales como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, trionina, tritófano y valina o componentes complejos de medio, tales como peptona de soja o extracto de levadura. El proceso para la fermentación se realiza en un modo semicontinuo. Condiciones: Temperatura 30 – 40ºC, pH 6 – 7,5, el oxígeno disuelto se mantiene por encima de 20%. Después del consumo de la fuente de C inicial, el cultivo se alimenta con el medio de alimentación indicado anteriormente (o equivalente). Cuando se alcanza un peso celular seco en el fermentador de 40 a 90 g/l, el cultivo se induce con un inductor apropiado correspondiente al sistema promotor usado (por ejemplo IPTG, lactosa, arabinosa). La inducción puede realizarse como una inducción completa pulsátil o como una inducción parcial mediante el suministro del inductor respectivo al fermentador durante un periodo de tiempo prolongado. La fase de producción debe durar al menos 4 horas. Las células se recuperan por

centrifugación en decantadores centrífugos o decantadores centrífugos tubulares o centrífugas verticales y se desecha el sobrenadante del cultivo.

13.2 Purificación: La masa de células E. coli se resuspende en una cantidad de 6 a 8 veces mayor de tampón de lisis (tampón fosfato o Tris, pH 7-8,5). La lisis celular preferiblemente se realiza por homogeneización a alta presión seguido de retirada del desecho celular por centrifugación en un decantador centrífugo, decantador centrífugo tubular o centrífuga vertical. El sobrenadante que contiene la proteína diana opcionalmente se filtra usando un filtro de 0,22-10 µm y se separa por cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, Toyopearl MegaCap® II SP-550EC, Toyopearl GigaCap S-650M, SP Sepharose BB, SP Sepharose FF o S HyperCel™) a pH 7-8,5. La elución se realiza por un gradiente lineal creciente de NaCl a pH 7-8,5. Las fracciones que contienen la proteína diana se reúnen y posteriormente se incuban con DTT 5-10 mM para prevenir la dimerización o la agregación mediada por restos de cisteína libres. Después de la adición adicional de sulfato amónico 0,8-1 M o NaCl 2-3 M, la solución se separa por cromatografía de interacción hidrófila (por ejemplo, Phenyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose FF, Butyl Sepharose HP, Butyl Sephrose FF, Butyl Toyopearl 650 (S,M,C), Phenyl Toyopearl 650 (S,M,C)) a pH 7-8,5. La elución se realiza a pH 7-8,5 por un gradiente decreciente lineal de sulfato amónico o NaCl en presencia de DTT 5 mM. Se reúnen las fracciones que contienen la proteína diana con un nivel de pureza de 90% como mínimo y se desalifican por diafiltración en presencia de DTT 5 mM seguido de concentración a aproximadamente 5 mg/ml. El replegamiento posterior se realiza diluyendo la solución de proteína 1:5-1:20 con Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Cystamin 4 mM, CHAPS 10 mM a pH 8,5 a una concentración final de proteína de 0,25-1 mg/ml. La solución de replegamiento se incuba con agitación durante 12-36 h a temperatura ambiente y después se separa por cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, SP Sepharose FF, SP Sepharose HP, Toyopearl SP-650 (S, M, C)) a pH 7-8,5. La elución se realiza por un gradiente lineal creciente de NaCl a pH 7-8,5. Las fracciones que contienen proteína diana monomérica se reúnen y se activan para la PEGilación por la adición de agentes reductores tales como DTT, DTE o TCEP. La solución posteriormente se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la diafiltración frente a tampón pH 6,5-7,5 o tampón HEPES 20 mM pH 6,5-7,5 o o tampón Tris pH 8,0 y concentración a 5-10 mg/ml, se añade maleimida-polietilenglicol (PEG) de 40-kDa (relación entre proteína y PEG 1:2-1:10). La solución se incuba con agitación durante 3-18 h a temperatura

ambiente y posteriormente se filtra usando un filtro de 0,22 µm. La proteína dinana PEGilada se separa del PEG libre y la proteína diana no PEGilada por cromatografía de intercambio cationico (SP Sepharose HP, Toyopearl SP 650M, MacroCap™SP, Source™30S o Fractogel®EMD (M)) a pH 5-7. La elución se realiza mediante un gradiente de NaCl creciente lineal. Las fracciones que contienen diana mono-PEGilada se reúnen y formulan en fosfato Na 25 mM, trehalosa sin endotoxina 220 mM, pH 7,5 por diafiltración.

Ejemplo 14: Formulación farmacéutica y uso

14.1 Formulación farmacéutica: Cualquiera de las construcciones biparatópicas de polipéptidos humanizados de la invención, tales como ABII314 a AbII323, puede seleccionarse para la fabricación de un formulación farmacéutica para aplicación subcutánea que tiene una composición como la siguiente:

Sustancia farmacéutica: 100 mg/ml (1 a 3 nmol/ml)
Tampón fosfato: 25 mM
Trehalosa: 220 mM
Tween-20: 0,02 %

La sustancia farmacéutica se formula en una solución que tiene la composición anterior, se esteriliza y se almacena a 2-8ºC.

14.2 Uso farmacéutico: La solución preparada según el punto 14.1 anterior se aplica a un paciente que lo necesita, tal como un ser humano que padece EA, por inyección subcutánea en el abdomen en un volumen de 1 a 2 ml (dosificación de 100 a 200 mg) cada dos a cuatro semanas.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina que se une específicamente a un primer epítopo de A-beta y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina que se une específicamente a un segundo epítopo de A-beta, donde dicho primer y dicho segundo epítopos de A-beta no son epítopos idénticos.

2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho primer y dicho segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina consisten esencialmente, cada uno, en cuatro regiones flanqueantes (FR1 a FR4, respectivamente) y tres regiones determinantes de complementaridad (CDR1 a CDR3, respectivamente), donde dicho primer y dicho segundo dominios variables individuales de immunoglobulina se unen covalentemente por un péptido enlazador, donde dicho péptido enlazador comprende o consiste opcionalmente en un tercer dominio de immunoglobulina.

3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde dicho primer y dicho segundo dominios variables individuales de inmunoglobulina son dominios de anticuerpo, preferiblemente dominios VHH, y más preferiblemente dominios VHH humanizados.

4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho primer epítopo de A-beta es el epítopo definido por la SEC ID Nº: 3 y dicho segundo epítopo de A-beta es el epítopo definido por la SEC ID Nº: 4, o donde dicho primer epítopo de A-beta es el epítopo definido por la SEC ID Nº: 4 y dicho segundo epítopo de A-beta es el epítopo definido por la SEC ID Nº: 3.

5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho polipéptido forma contactos con al menos los aminoácido 1 (aspartato), 3 (glutamato), 19 (fenilalanina), 20 (fenilalanina) y 23 (aspartato) del péptido A-beta humano (SEC ID Nº: 1)

6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el valor de CI50 medido en un ensayo de unión TR-FRET (usando ABII002 =

SEC ID Nº: 62 y ABII050 = SEC ID Nº: 100 como competidores) está en el intervalo de 10^{-9} moles/litro o menos, y preferiblemente en el intervalo de 5 x 10^{-10} moles/litro a 10^{-12} moles/litro.

7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde dicho polipéptido comprende dos dominios variables individuales de inmunoglobulina de unión a A-beta, teniendo dichos dominios variables individuales de inmunoglobulina la estructura

FR(1)1 - CDR(1)1 - FR(1)2 - CDR(1)2 - FR(1)3 - CDR(1)3 - FR(1)4, y

FR(2)1 - CDR(2)1 - FR(2)2 - CDR(2)2 - FR(2)3 - CDR(2)3 - FR(2)4, respectivamente y donde

CDR(1)3 se selecciona del grupo que consiste en:

- las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 y SEC ID Nº: 16; y
- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dichas secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 o la SEC ID Nº: 16, respectivamente; y

CDR(2)3 se selecciona entre el grupo que consiste en:

- la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19; y
- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19;

o donde

CDR(1)3 se selecciona del grupo que consiste en:

- la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19; y
- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 19; y

CDR(2)3 se selecciona entre el grupo que consiste en:

- las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 y SEC ID Nº: 16; y
- secuencias de aminoácidos que tienen hasta tres, preferiblemente hasta dos y más preferiblemente una diferencia de aminoácidos en comparación con dichas secuencias de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID Nº: 13 o la SEC ID

Nº: 16, respectivamente;

8. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde las secuencias de CDR de dicho primer dominio variable de inmunoglobulina (secuencias de CDR(1)) y las secuencias de CDR de dicho segundo dominio variable de inmunoglobulina (secuencias de CDR(2)) se definen como se indica a continuación:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 11.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 12.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 13.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 19.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 14.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 15.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 16.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 19.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 19.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 11.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 12.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 13.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 19.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 14.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 15.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 16.

9. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el polipéptido comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina, donde dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina es un dominio VHH ABII035 (SEC ID Nº: 44) y ducho segundo dominio variable individual de inmunogolobulina es el dominio VHH ABII059 (SEC ID Nº: 45) o donde dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina es el dominio VHH ABII059 (SEC ID Nº: 45) y dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina es el dominio VHH ABII035 (SEC ID Nº: 44).

10. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el polipéptido incluye además un resto de prolongación de la semivida.

11. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho resto de prolongación de la semivida está unido covalentemente a dicho polipéptido y se selecciona del grupo que consiste en un resto de unión a albúmina, tal como un dominio de inmunoglobulina anti-albúmina, un resto de unión a transferrina, tal como un dominio de inmunoglobulina anti-transferrina, una molécula de polietilenglicol, una molécula de polietilenglicol recombinante, albúmina de suero humano, un fragmento de albúmina de suero humano y un péptido de unión a albúmina.

12. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, donde el polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en polipéptidos que tienen las SEC ID Nº: 26 a 32, 34 a 43, 142, 143 y 145 a 152.

13. Un polipéptido que comprende o consiste en un dominio variable individual de inmunoglobulina que consiste esencialmente en cuatro regiones flanqueantes (FR1 a FR4, respectivamente) y tres regiones determinantes de complementaridad (CDR1 a CDR3, respectivamente), donde dichas secuencias de CDR se definen como se indica a continuación:

- CDR1: SEC ID Nº: 11.
- CDR2: SEC ID Nº: 12.
- CDR3: SEC ID Nº: 13.

o

- CDR1: SEC ID Nº: 14.
- CDR2: SEC ID Nº: 15.
- CDR3: SEC ID Nº: 16.

o

- CDR1: SEC ID Nº: 17.
- CDR2: SEC ID Nº: 18.
- CDR3: SEC ID Nº: 19.

14. Un polipéptido que comprende o consiste en un dominio VHH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nº: 47 a 111.

15. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 13 o reivindicación 14 para uso en la construcción de un polipéptido de unión a A-beta biparatópico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

16. Una molécula de ácido nucleico, preferiblemente en forma aislada, que comprende una región que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 16.

18. Una célula hospedadora que lleva un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicha célula hospedadora es capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y donde dicha célula hospedadora es una célula procariota o eucariota.

19. Una composición farmacéutica que comprende (i) como ingrediente activo, uno o más polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente (iii) un diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizante.

20. Un método para fabricar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende las etapas de

- cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 18 en condiciones que permiten la expresión de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15;
- recuperar dicho polipéptido; y
- purificar dicho polipéptido.

21. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 para uso como un medicamento para el tratamiento, prevención o alivio de una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano.

22. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 para uso como un medicamento para el tratamiento terapéutico, prevención o alivio de una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano, donde dicha enfermedad, trastorno o afección se selecciona del grupo que consiste en enfermedades o trastornos neurodegenerativos, enfermedad de Alzheimer, demencia de tipo Alzheimer, DME seca, glaucoma, angiopatía amiloide cerebral, trisomía 21 (síndrome de Down), síndrome de Down en adulto, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis de tipo Dutch (HCHWA-D), demencia con cuerpos de Lewy, degeneración del lóbulo frontotemporal, glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica, miositis con cuerpos de inclusión esporádicos y trastorno de ansiedad en un ser humano de edad avanzada.

23. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 preparada para administrarse a un ser humano que lo necesita mediante inyección intravenosa o subcutánea.

24. Un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno que está asociada con la deposición de A-beta, donde dicho método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad farmacéuticamente activa de al menos un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19.

25. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 preparada para la administración en combinación con un agente terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste en ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513, Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin y PF-4494700.

26. Un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513,Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin y PF-4494700, preparado para la administración en combinación con un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 a un paciente que lo necesita.

27. Una composición farmacéutica que comprende (i) uno o más polipéptidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y (ii) uno o más agentes terapéuticos adicionales, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en ELND-005, Caprospinol, NRM-8499, PBT-2, Posiphen, EHT-0202, CTS-21166, Semagacest, BMS-708163, BMS-299897, BMS-433796, ELND-006, ELN-475516, ELN-318463, ELN-475513,Begacestat, E-2012, CHF-5074, Dimebolin y PF-4494700, y (iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente (iv) un diluyente, excipiente, adyuvante y/o estabilizante.

28. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la reducción de los niveles de A-beta en un fluido corporal, y preferiblemente para la reducción del nivel de A-beta soluble en la sangre.

29. Un polipéptido que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina, donde las secuencias de CDR de dicho primer dominio variable de inmunoglobulina (secuencias de CDR(1)) y las secuencias de CDR de dicho segundo dominio variable de inmunoglobulina (secuencias de CDR(2)) se definen como se indica a continuación:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 11.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 12.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 13.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 19.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 14.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 15.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 16.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 19.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 19.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 11.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 12.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 13.

o:

- CDR(1)1: SEC ID Nº: 17.
- CDR(1)2: SEC ID Nº: 18.
- CDR(1)3: SEC ID Nº: 19.
- CDR(2)1: SEC ID Nº: 14.
- CDR(2)2: SEC ID Nº: 15.
- CDR(2)3: SEC ID Nº: 16.

30. Un polipéptido que comprende un primer dominio variable individual de inmunoglobulina y un segundo dominio variable individual de inmunoglobulina, donde dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina es el dominio VHH ABII035 (SEC ID Nº: 44) y dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina es el dominio VHH ABII059 (SEC ID Nº: 45), o donde dicho primer dominio variable individual de inmunoglobulina es el dominio VHH ABII059 (SEC ID Nº: 45) y dicho segundo dominio variable individual de inmunoglobulina es el

dominio VHH ABII035 (SEC ID Nº: 44).

31. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 29 o la reivindicación 30, donde el polipéptido incluye además un resto que prolonga la semivida, seleccionándose preferiblemente dicho resto que prolonga la semivida del grupo que consiste en un resto de unión a albúmina, tal como un dominio de inmunoglobulina antialbúmina, un resto de unión a transferrina, tal como un dominio de inmunoglobulina anti-transferrina, una molécula de polietilenglicol, una molécula de polietilenglicol recombinante, albúmina de suero humano, un fragmento de albúmina de suero humano y un péptido de unión a albúmina.

32. Un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos que tiene cualquiera de las SEC ID Nº: 26 a 32, 34 a 43, 142, 143 y 145 a 152.

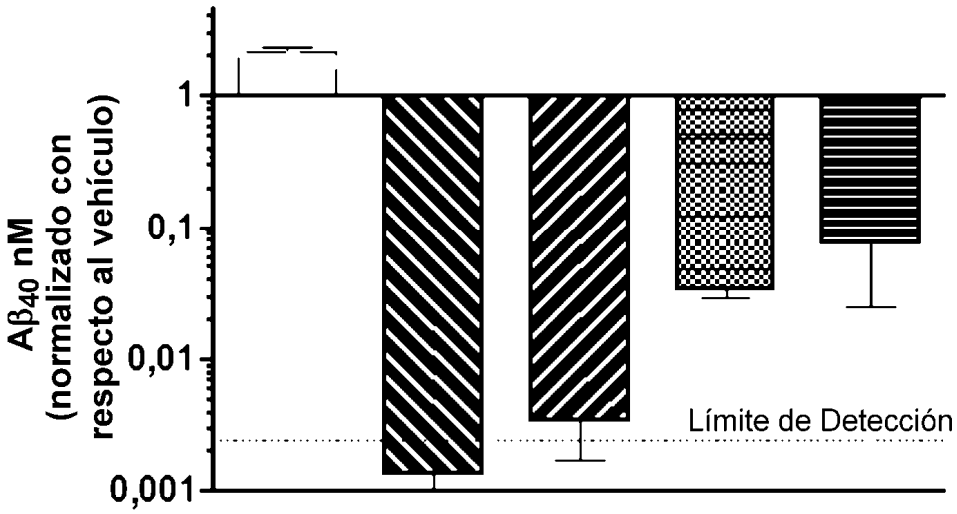

Aβ40 nM
(normalizado con
respecto al vehículo)
1
0,1
0,01
0,001
Límite de Detección

FIG.1

Construcción de VHH biparotópica:
ABII035
ABII059
Péptido A-beta (Diana):
humano:
DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
roedor:
DAEFGHDSGFEVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

FIG.2

SEQUENCE LISTING

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> A-BETA BINDING POLYPEPTIDES

<130> P01-2596

<150> EP 10 155 339.4
<151> 2010-03-03

<160> 153

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 2
<211> 40
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Gly His Asp Ser Gly Phe Glu Val Arg His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10 15

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> linker GS9, C5

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> linker GS25, C5

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> linker GS27, C14

<400> 8

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20 25

<210> 9
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> linker GS35, C15

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 10
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> linker GS35, C5

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 11

Thr Asp Thr Met Gly
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 12

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 13

His Arg Leu Val Val Gly Gly Thr Ser Val Gly Asp Trp Arg Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 14

Thr Asp Thr Met Gly
1 5

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 15

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 16

His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 17

Asn Tyr Asn Met Gly
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 18

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 19

Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser

1 5 10 15

<210> 20
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR1/1

<400> 20

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg
20 25

<210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR1/2

<400> 21

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn
20 25

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR2

<400> 22

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR3/1

<400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR3/2

<400> 24

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR4

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fc fusion protein

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val

```
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg
145                 150                 155                 160

Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
        195                 200                 205

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val
225                 230                 235                 240

Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                245                 250                 255

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
            260                 265                 270

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
        275                 280                 285

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
    290                 295                 300
```

```
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
                325                 330                 335

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
            340                 345                 350

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
        355                 360                 365

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
    370                 375                 380

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
385                 390                 395                 400

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
                405                 410                 415

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
            420                 425                 430

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
        435                 440                 445

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
    450                 455                 460

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
465                 470                 475                 480

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
                485                 490                 495

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
            500                 505                 510

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
        515                 520                 525

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
    530                 535                 540

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
545                 550                 555                 560
```

```
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
                565                 570                 575


Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            580                 585
```

<210> 27
<211> 605
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fc fusion protein

<400> 27

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125


Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140


Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160


Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser
                165                 170                 175
```

```
Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg
        195                 200                 205

Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    210                 215                 220

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225                 230                 235                 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly
                245                 250                 255

Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        275                 280                 285

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    290                 295                 300

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
305                 310                 315                 320

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                325                 330                 335

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            340                 345                 350

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        355                 360                 365

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    370                 375                 380

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
385                 390                 395                 400

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                405                 410                 415

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            420                 425                 430
```

```
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        435                 440                 445

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    450                 455                 460

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
465                 470                 475                 480

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                485                 490                 495

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            500                 505                 510

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        515                 520                 525

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    530                 535                 540

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
545                 550                 555                 560

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                565                 570                 575

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            580                 585                 590

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        595                 600                 605


<210>  28
<211>  330
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Fc fusion protein

<400>  28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
```

```
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
```

```
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 29
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fc fusion protein

<400> 29

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160
```

```
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 30
<211> 605
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Fc fusion protein

<400> 30

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
```

```
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser
                165                 170                 175

Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg
        195                 200                 205

Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    210                 215                 220

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225                 230                 235                 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly
                245                 250                 255

Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        275                 280                 285
```

```
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    290                 295                 300

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
305                 310                 315                 320

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                325                 330                 335

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            340                 345                 350

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        355                 360                 365

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    370                 375                 380

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
385                 390                 395                 400

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                405                 410                 415

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            420                 425                 430

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        435                 440                 445

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    450                 455                 460

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
465                 470                 475                 480

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                485                 490                 495

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            500                 505                 510

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        515                 520                 525

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    530                 535                 540
```

```
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
545                 550                 555                 560


Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                565                 570                 575


Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            580                 585                 590


His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        595                 600                 605


<210>  31
<211>  613
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  Fc fusion protein

<400>  31

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125


Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140
```

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        275                 280                 285

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
305                 310                 315                 320

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                325                 330                 335

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            340                 345                 350

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        355                 360                 365

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
    370                 375                 380

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
385                 390                 395                 400
```

```
Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                405                 410                 415

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            420                 425                 430

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        435                 440                 445

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    450                 455                 460

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
465                 470                 475                 480

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                485                 490                 495

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            500                 505                 510

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
        515                 520                 525

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    530                 535                 540

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
545                 550                 555                 560

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                565                 570                 575

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            580                 585                 590

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        595                 600                 605

Leu Ser Pro Gly Lys
    610
```

<210> 32
<211> 860
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> HSA fusion protein

<400> 32

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser
                165                 170                 175

Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg
        195                 200                 205

Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    210                 215                 220

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225                 230                 235                 240
```

```
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly
                245                 250                 255

Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
        275                 280                 285

Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
    290                 295                 300

Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
305                 310                 315                 320

Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
                325                 330                 335

Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
            340                 345                 350

Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
        355                 360                 365

Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
    370                 375                 380

Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
385                 390                 395                 400

Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
                405                 410                 415

Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
            420                 425                 430

Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
        435                 440                 445

Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
465                 470                 475                 480

Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
                485                 490                 495
```

```
Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
            500                 505                 510

Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
        515                 520                 525

Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp
    530                 535                 540

Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu
545                 550                 555                 560

Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp
                565                 570                 575

Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys
            580                 585                 590

Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu
        595                 600                 605

Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu
    610                 615                 620

Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp
625                 630                 635                 640

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val
                645                 650                 655

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln
            660                 665                 670

Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys
        675                 680                 685

Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn
    690                 695                 700

Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg
705                 710                 715                 720

Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys
                725                 730                 735

Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys
```

740 745 750

Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val
755 760 765

Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe
770 775 780

His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys
785 790 795 800

Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys
805 810 815

Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys
820 825 830

Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys
835 840 845

Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
850 855 860

<210> 33
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> albumin binding protein

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII316

<400> 34

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
130 135 140

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145 150 155 160

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
165 170 175

```
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr
        275                 280                 285

Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
            340                 345                 350

Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp
        355                 360                 365

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    370                 375                 380


<210>  35
<211>  407
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII317

<400>  35
```

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255
```

```
Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305                 310                 315                 320

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            340                 345                 350

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
385                 390                 395                 400

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                405
```

<210> 36
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII318

<400> 36

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
```

```
Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro
145                 150                 155                 160

Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
        195                 200                 205

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg
225                 230                 235                 240

Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                245                 250                 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        275                 280                 285

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
    290                 295                 300
```

```
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
305                 310                 315                 320

Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            340                 345                 350

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
        355                 360                 365

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    370                 375                 380


<210>  37
<211>  407
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII319

<400>  37

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125
```

```
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305                 310                 315                 320

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            340                 345                 350

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380
```

```
Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
385                 390                 395                 400


Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                405
```

<210> 38
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII320

<400> 38

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125


Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140


Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160


Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175
```

```
Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn
        275                 280                 285

Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
            340                 345                 350

Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr
        355                 360                 365

Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    370                 375                 380


<210>  39
<211>  380
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII321

<400>  39

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
```

```
1               5                  10                  15

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            20                  25                  30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        35                  40                  45

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    130                 135                 140

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145                 150                 155                 160

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                165                 170                 175

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            180                 185                 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        195                 200                 205

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    210                 215                 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
225                 230                 235                 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                245                 250                 255
```

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
            260                 265                 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
        275                 280                 285

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
    290                 295                 300

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
305                 310                 315                 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
                325                 330                 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
            340                 345                 350

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
        355                 360                 365

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    370                 375                 380


<210>  40
<211>  274
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII322; PEGylated at Cys 137

<400>  40

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1               5                   10                  15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            20                  25                  30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        35                  40                  45

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
```

85 90 95

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
145 150 155 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly
165 170 175

Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
180 185 190

Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile
195 200 205

Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
210 215 220

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
225 230 235 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn
245 250 255

Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
260 265 270

Ser Ser

<210> 41
<211> 282
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII323; PEGylated at Cys 138

<400> 41

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

```
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            20                  25                  30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        35                  40                  45

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145                 150                 155                 160

Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
                165                 170                 175

Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met
            180                 185                 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala
        195                 200                 205

Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
    210                 215                 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
225                 230                 235                 240

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
                245                 250                 255

His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp
```

260 265 270

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
275 280

<210> 42
<211> 283
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII305; PEGylated at Cys 129

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145 150 155 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly Ser
165 170 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
180 185 190

```
Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
                245                 250                 255

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        275                 280


<210>  43
<211>  257
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII3O6; PEGylated at Cys 129

<400>  43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110
```

```
Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Cys Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Leu Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro
145                 150                 155                 160

Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr
        195                 200                 205

Arg Asn Ala Ala Tyr Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg
225                 230                 235                 240

Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
                245                 250                 255

Ser
```

<210> 44
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII035

<400> 44

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
```

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII059

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> myc tag

<400> 46

Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
1 5 10 15

Ala

<210> 47
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP42D4

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Leu Val Val Gly Gly Thr Ser Val Gly Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111B4

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Trp Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Ser Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Thr Ala His Arg Gly Val Val Gly Gly Trp Val Val Val Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 49
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111E5c11

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Leu Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Arg Glu Val Gln Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111C6

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Trp Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Leu Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Gln Val Val Gly Gly Val Gln Val Leu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111F2

<400> 51

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala Asn Arg His Ser Val Gly Arg Leu Ser Val Gly Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 52
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111E4

<400> 52

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala Ala Arg Leu Thr Val Gly Ser Leu Ser Val Gly Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111C4

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Leu Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Ser Val Val Gly Gly Val Gly Val Trp Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111B5

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Thr Ala His Arg Leu Val Val Gly Gly Gly Gly Val Arg Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 55
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111B9

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Gly Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Gly Cys Val Lys Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_R30K

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Lys Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_R30W

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Trp Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Glu Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 58
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_N106T

<400> 58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Thr Met Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_N106V

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Val Met Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_F101W

<400> 60

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Trp Val Val Gly Gly Asn Met Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 61
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_M107E

<400> 61

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Glu Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  62
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII111B5_M107R = ABII002

<400>  62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  63
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII111B5_E109W

<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Trp Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 64
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_E109Q

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Gln Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  65
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII003

<400>  65

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  66
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII004

<400> 66

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII005

<400> 67

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII006

<400> 68

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII007

<400> 69

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 70
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII008

<400> 70

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII009

<400> 71

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 72
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII010

<400> 72

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Thr Ala Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 73
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII011

<400> 73

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 74
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII012

<400> 74

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII013

<400> 75

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 76
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII014

<400> 76

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 77
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII015

<400> 77

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 78
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII016

<400> 78

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII017

<400> 79

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII018

<400> 80

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 81
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII019

<400> 81

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 82
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII020

<400> 82

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  83
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII021

<400>  83

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  84
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII022

<400> 84

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 85
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII023

<400> 85

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  86
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII024

<400>  86

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  87
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII025

<400> 87

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 88
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII026

<400> 88

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  89
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII027

<400>  89

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  90
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII028

<400> 90

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 91
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII029

<400> 91

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 92
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII030

<400> 92

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 93
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII031

<400> 93

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 94
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII032

<400> 94

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  95
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII033

<400>  95

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  96
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII034

<400> 96

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 97
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII035

<400> 97

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  98
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII036

<400>  98

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  99
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII037

<400> 99

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 100
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII60A10 = ABII050

<400> 100

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20   25   30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  101
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII051

<400>  101

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  102
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII052

<400> 102

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 103
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII053

<400> 103

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  104
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII054

<400>  104

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  105
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII055

<400> 105

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 106
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII056

<400> 106

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  107
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII057

<400>  107

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  108
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII058

<400> 108

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20   25   30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100   105   110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 109
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII059

<400> 109

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20   25   30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  110
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII060

<400>  110

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  111
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII061

<400> 111

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20   25   30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100   105   110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 112
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII1E11

<400> 112

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
            20   25   30

Asn Met Gly Trp Phe His Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ile Val
        35   40   45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Thr Val Ser Val
    50   55   60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asp
65 70 75 80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Asn Ser Ala Gly Arg Ala Ile Asn Leu Pro Leu Tyr Lys Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 113
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII14D4

<400> 113

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Asn Met Ala Trp Phe Arg His Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Pro Arg Gly Arg Ser Ile Val Thr Thr Ala Thr Tyr Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 114
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII5D2

<400> 114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
        35   40   45

Ala Thr Ile Ser Gln Ser Gly Gly Leu Arg Ser Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Ala Gln Ala Arg Ala Thr Ala Trp Ser Pro Gln Arg Val Asp Tyr
            100   105   110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 115
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII35C7

<400> 115

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
            20   25   30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Arg Phe Gly Thr Pro Ile Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 116
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII35D2

<400> 116

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Leu Phe Gly Ser Ala Ile Asn Leu Leu Ser Glu Tyr Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 117
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII35G2

<400> 117

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
            20   25   30

Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Glu Asp Asp Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Ala Arg Pro Ser Tyr Val Ala Val Asn Ile Ala Ala Ser Tyr Asn
            100   105   110

Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 118
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII42D4

<400> 118

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Leu Val Val Gly Gly Thr Ser Val Gly Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 119
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII42B10

<400> 119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Arg Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Leu
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Gln
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Ser Pro Gly Gly Pro Ile Asn Tyr Gly Arg Ala Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 120
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII42F5

<400> 120

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30


Asn Ile Gly Trp Phe Cys Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ala Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Gln Arg Arg Leu Ala Val Asn Val Asp Thr Ser Tyr Asn
            100                 105                 110


Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 121
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII42E10

<400> 121

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Leu Tyr
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Ile Ser Ala Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Ala Leu Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Phe
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Leu Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Phe Arg Gly Phe Ala Ile Asn Thr Pro Thr Ser Tyr Asn
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  122
<211>  121
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII42G10

<400>  122

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Phe Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Asn
            20                  25                  30


Gly Val Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ser Ala Ile Asn Trp Ser Gly Ser Lys Thr Asn Tyr Ala Glu Pro Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Tyr Arg Thr Ser Ile Ser Arg Tyr Glu Tyr Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110


Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  123
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII60A10

<400> 123

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII60G11

<400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Arg Ala Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Thr Phe Val Ala Ala
35 40 45

Val Ala Trp Val Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly
50 55 60

```
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Phe Leu His
65                  70                  75                  80


Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Ala
                85                  90                  95


Arg Leu Tyr Gly Gly Arg Trp Tyr Asn Ser Pro Arg Val Asp Asp Phe
            100                 105                 110


Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125


<210>  125
<211>  117
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII60D2

<400>  125

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Lys
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45


Gly Arg Ile Thr Ser Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60


Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Thr Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80


Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95


Ala Arg Arg Pro Trp Pro Arg Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln
            100                 105                 110


Val Thr Val Ser Ser
        115


<210>  126
<211>  119
<212>  PRT
<213>  Artificial
```

<220>
<223> ABII60H5

<400> 126

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Val Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Gly Ser Ile Asn
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Ile Ile Thr Asn Ser Gly Ser Val Asn Tyr Gly Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Arg Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Glu Ser Trp Gly Arg Ser Pro Leu Lys Tyr Leu Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 127
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII61F6

<400> 127

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Val Asn Ile Asn
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ile Ile Asn Lys Arg Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Thr Glu
    50                  55                  60
```

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
85 90 95

Ala Val Val Gly Arg Tyr Gly Arg Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 128
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 3D6 VL

<400> 128

Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 129
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 3D6 VH

<400> 129

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> m266 VL

<400> 130

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
20 25 30

Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

```
Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
                85                  90                  95


Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110


<210>  131
<211>  112
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  m266 VH

<400>  131

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
            20                  25                  30


Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
        35                  40                  45


Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Tyr Thr Leu Ser
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110


<210>  132
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  2D2

<400>  132

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Ile
            20                  25                  30
```

```
Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Gly Ala Ile Ser Arg Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Ala Ile Asn Ile Arg Arg Ser Tyr Asn
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 133
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 2G6

<400> 133

```
Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Thr Ile Ser Pro Arg Ala Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Glu Pro Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Leu Arg Tyr Arg Asp Arg Pro Gln Ser Ser Asp Phe Leu
            100                 105                 110
```

Phe Trp Arg Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 134
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 3A

<400> 134

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Asp Gly Asp
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Ile Gly Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Ser Ala Pro Thr Arg Trp Val Pro Arg Asp Ser Arg Phe Tyr Asp
            100   105   110

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 135
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 1B

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
            20   25   30

```
Ser Ile Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35                  40                  45

Ser Cys Ile Ser Ser Tyr Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Gly Ile Arg Asp Trp Ala Thr Leu Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp
            100                 105                 110

Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 136
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 11G

<400> 136

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn
            20                  25                  30

Thr Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ile Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
                85                  90                  95

Ala Ala Ile Arg Arg Ser Val Ile Asp Ala Trp Gly Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110
```

```
Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  137
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  4D

<400>  137

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Thr Ile Arg Trp Asn Gly Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Asp Arg
    50                  55                  60


Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Val Phe Leu Gln Met
65                  70                  75                  80


Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
                85                  90                  95


Leu Gly Pro Arg Thr Ser Gln Ala Ala Leu Tyr Arg Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110


Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  138
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  8B

<400>  138

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
```

```
Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Gly Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Ala Pro Thr Arg Trp Val Pro Arg Asp Ser Arg Phe Tyr Asp
            100                 105                 110

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  139
<211>  123
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  31-1

<400>  139

Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly
1               5                   10                  15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Gly Trp
            20                  25                  30

Ser Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Thr Asp Ser
    50                  55                  60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Ala Lys Asn Thr Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Asn Ala Asp Val Ser Thr Gly Phe Arg Tyr Gln Arg Lys Asp Tyr
            100                 105                 110
```

```
Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  140
<211>  98
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  VH3-23 (DP-47)

<400>  140

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45


Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Lys



<210>  141
<211>  9
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  9GS

<400>  141

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1               5


<210>  142
<211>  283
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
```

<223> ABII314, PEGylated at Cys 129

<400> 142

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240
```

```
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        275                 280
```

<210> 143
<211> 257
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII315, PEGylated at Cys 129

<400> 143

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Cys Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro
145                 150                 155                 160
```

```
Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175


Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn
            180                 185                 190


Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
        195                 200                 205


Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220


Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg
225                 230                 235                 240


Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                245                 250                 255


Ser
```

<210> 144
<211> 403
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> His.Xa.Abeta1-28.GS

<400> 144

```
Met His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asp Ala Glu Phe Arg
1               5                   10                  15


His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
            20                  25                  30


Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Glu Arg
        35                  40                  45


Pro Thr Phe Tyr Arg Gln Glu Leu Asn Lys Thr Ile Trp Glu Val Pro
    50                  55                  60


Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly Ala Tyr Gly Ser
65                  70                  75                  80


Val Cys Ala Ala Phe Asp Thr Lys Thr Gly His Arg Val Ala Val Lys
                85                  90                  95


Lys Leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Ile Ile His Ala Lys Arg Thr Tyr
```

```
            100                 105                 110

Arg Glu Leu Arg Leu Leu Lys His Met Lys His Glu Asn Val Ile Gly
        115                 120                 125

Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Arg Ser Leu Glu Glu Phe Asn Asp
    130                 135                 140

Val Tyr Leu Val Thr His Leu Met Gly Ala Asp Leu Asn Asn Ile Val
145                 150                 155                 160

Lys Cys Gln Lys Leu Thr Asp Asp His Val Gln Phe Leu Ile Tyr Gln
                165                 170                 175

Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asp Ile Ile His Arg
            180                 185                 190

Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Ala Val Asn Glu Asp Cys Glu Leu Lys
        195                 200                 205

Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Thr Asp Asp Glu Met Thr Gly
    210                 215                 220

Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Trp
225                 230                 235                 240

Met His Tyr Asn Gln Thr Val Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Met
                245                 250                 255

Ala Glu Leu Leu Thr Gly Arg Thr Leu Phe Pro Gly Thr Asp His Ile
            260                 265                 270

Asp Gln Leu Lys Leu Ile Leu Arg Leu Val Gly Thr Pro Gly Ala Glu
        275                 280                 285

Leu Leu Lys Lys Ile Ser Ser Glu Ser Ala Arg Asn Tyr Ile Gln Ser
    290                 295                 300

Leu Ala Gln Met Pro Lys Met Asn Phe Ala Asn Val Phe Ile Gly Ala
305                 310                 315                 320

Asn Pro Leu Ala Val Asp Leu Leu Glu Lys Met Leu Val Leu Asp Ser
                325                 330                 335

Asp Lys Arg Ile Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ala His Ala Tyr Phe Ala
            340                 345                 350
```

```
Gln Tyr His Asp Pro Asp Asp Glu Pro Val Ala Asp Pro Tyr Asp Gln
        355                 360                 365

Ser Phe Glu Ser Arg Asp Leu Leu Ile Asp Glu Trp Lys Ser Leu Thr
    370                 375                 380

Tyr Asp Glu Val Ile Ser Phe Val Pro Pro Pro Leu Asp Gln Glu Glu
385                 390                 395                 400

Met Glu Ser
```

<210> 145
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII400

<400> 145

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
```

```
145                 150                 155                 160

Lys Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Glu Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe
            180                 185                 190

Tyr Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu
225                 230                 235                 240

Arg Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
            260                 265                 270

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
        275                 280                 285

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
    290                 295                 300

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser
305                 310                 315                 320

Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
                325                 330                 335

Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
            340                 345                 350

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg
        355                 360                 365

Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
385                 390                 395                 400
```

```
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
                405                 410                 415

Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
            420                 425                 430

Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr
        435                 440                 445

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
    450                 455                 460

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
465                 470                 475                 480

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg
                485                 490                 495

Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            500                 505                 510


<210>  146
<211>  515
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII401

<400>  146

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
```

```
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg Thr Phe Ser Ile
        275                 280                 285

Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys Tyr Ala Asp Phe
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
            340                 345                 350
```

```
Cys Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala Leu Thr Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
385                 390                 395                 400

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                405                 410                 415

Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser
        435                 440                 445

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    450                 455                 460

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
465                 470                 475                 480

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile
                485                 490                 495

Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            500                 505                 510

Val Ser Ser
        515


<210>  147
<211>  512
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII402

<400>  147

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
```

```
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn
        275                 280                 285
```

```
Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
            340                 345                 350

Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr
        355                 360                 365

Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly
385                 390                 395                 400

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
                405                 410                 415

Phe Lys Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
            420                 425                 430

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr
        435                 440                 445

Phe Tyr Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    450                 455                 460

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
465                 470                 475                 480

Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro
                485                 490                 495

Leu Arg Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
            500                 505                 510


<210>  148
<211>  515
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII403
```

<400> 148

```
Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala Leu Thr Ser Gly Tyr
            100                 105                 110

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly
145                 150                 155                 160

Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
                165                 170                 175

Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile
            180                 185                 190

Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        195                 200                 205

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn
225                 230                 235                 240
```

```
Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
            260                 265                 270

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser
        275                 280                 285

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val
    290                 295                 300

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly
305                 310                 315                 320

Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
            340                 345                 350

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser
        355                 360                 365

Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
385                 390                 395                 400

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                405                 410                 415

Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser
        435                 440                 445

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    450                 455                 460

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
465                 470                 475                 480

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile
                485                 490                 495
```

```
Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            500                 505                 510


Val Ser Ser
        515


<210>  149
<211>  541
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII404

<400>  149

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125


Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140


Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160


Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175
```

```
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305                 310                 315                 320

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            340                 345                 350

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
385                 390                 395                 400

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                405                 410                 415

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
            420                 425                 430
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
        435                 440                 445


Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
    450                 455                 460


Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val
465                 470                 475                 480


Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr
                485                 490                 495


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
            500                 505                 510


Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala Leu Thr Ser Gly Tyr
        515                 520                 525


Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
    530                 535                 540


<210>  150
<211>  515
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII405

<400>  150

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg
145                 150                 155                 160

Thr Phe Ser Ile Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala
225                 230                 235                 240

Leu Thr Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
            260                 265                 270

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
        275                 280                 285

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe
    290                 295                 300

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg
305                 310                 315                 320

Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
            340                 345                 350
```

```
Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg
        355                 360                 365

Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly
    370                 375                 380

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
385                 390                 395                 400

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
                405                 410                 415

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
            420                 425                 430

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        435                 440                 445

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
    450                 455                 460

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
465                 470                 475                 480

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                485                 490                 495

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
            500                 505                 510

Val Ser Ser
        515


<210>  151
<211>  512
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII406

<400>  151

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr
            20                  25                  30
```

```
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    130                 135                 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe
145                 150                 155                 160

Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
                165                 170                 175

Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala
            180                 185                 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
        195                 200                 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu
225                 230                 235                 240

Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly
            260                 265                 270

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
        275                 280                 285
```

```
Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala
    290                 295                 300

Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
                325                 330                 335

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
            340                 345                 350

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala
        355                 360                 365

Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    370                 375                 380

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
385                 390                 395                 400

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
                405                 410                 415

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
            420                 425                 430

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
        435                 440                 445

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    450                 455                 460

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
465                 470                 475                 480

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
                485                 490                 495

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            500                 505                 510
```

<210> 152
<211> 538
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> ABII407

<400> 152

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240
```

```
Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys
305                 310                 315                 320

Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
                325                 330                 335

Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr
            340                 345                 350

Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg
385                 390                 395                 400

Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
                405                 410                 415

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
            420                 425                 430

Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
        435                 440                 445

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
    450                 455                 460

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp
465                 470                 475                 480

Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
                485                 490                 495
```

```
Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
            500                 505                 510


Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
        515                 520                 525


Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    530                 535


<210>  153
<211>  16
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  JH5

<400>  153

Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1               5                   10                  15
```

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> POLIPÉPTIDOS DE UNIÓN A A-BETA

<130> P01-2596

<150> EP 10 155 339.4
<151> 2010-03-03

<160> 153

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 2
<211> 40
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Ala Glu Phe Gly His Asp Ser Gly Phe Glu Val Arg His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
1 5 10

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10 15

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador GS9, C5

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador GS25, C5

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 8
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador GS27, C14

<400> 8

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
20 25

<210> 9
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador GS35, C15

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 10
<211> 35
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> enlazador GS35, C5

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 11
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 11

Thr Asp Thr Met Gly
1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 12

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 13

His Arg Leu Val Val Gly Gly Thr Ser Val Gly Asp Trp Arg Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 14

Thr Asp Thr Met Gly
1 5

<210> 15
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 15

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 16

His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 17

Asn Tyr Asn Met Gly
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 18

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR

<400> 19

Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
1 5 10 15

<210> 20
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR1/1

<400> 20

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg
20 25

<210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR1/2

<400> 21

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn
20 25

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR2

<400> 22

Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
1 5 10

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR3/1

<400> 23

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR3/2

<400> 24

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
20 25 30

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> FR4

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 587
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión Fc

<400> 26

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg
145                 150                 155                 160

Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
        195                 200                 205

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val
225                 230                 235                 240
```

```
Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                245                 250                 255

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
            260                 265                 270

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
        275                 280                 285

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
    290                 295                 300

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
305                 310                 315                 320

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
                325                 330                 335

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
            340                 345                 350

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
        355                 360                 365

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
    370                 375                 380

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
385                 390                 395                 400

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
                405                 410                 415

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
            420                 425                 430

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
        435                 440                 445

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
    450                 455                 460

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
465                 470                 475                 480

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
```

485 490 495

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
500 505 510

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
515 520 525

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
530 535 540

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
545 550 555 560

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
565 570 575

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580 585

<210> 27
<211> 605
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión Fc

<400> 27

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

```
Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser
                165                 170                 175

Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg
        195                 200                 205

Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    210                 215                 220

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225                 230                 235                 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly
                245                 250                 255

Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        275                 280                 285

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    290                 295                 300

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
305                 310                 315                 320

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                325                 330                 335

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
```

```
            340                 345                 350

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        355                 360                 365

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    370                 375                 380

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
385                 390                 395                 400

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                405                 410                 415

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            420                 425                 430

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        435                 440                 445

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    450                 455                 460

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
465                 470                 475                 480

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                485                 490                 495

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            500                 505                 510

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        515                 520                 525

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    530                 535                 540

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
545                 550                 555                 560

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                565                 570                 575

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            580                 585                 590
```

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
595 600 605

<210> 28
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión Fc

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

```
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325                 330
```

<210> 29
<211> 330
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión Fc

<400> 29

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1               5                   10                  15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45
```

```
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165                 170                 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
            180                 185                 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
        195                 200                 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
            260                 265                 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
```

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 30
<211> 605
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión Fc

<400> 30

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
145 150 155 160

```
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser
                165                 170                 175

Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg
        195                 200                 205

Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    210                 215                 220

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225                 230                 235                 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly
                245                 250                 255

Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
        275                 280                 285

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    290                 295                 300

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
305                 310                 315                 320

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                325                 330                 335

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            340                 345                 350

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        355                 360                 365

Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    370                 375                 380

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
385                 390                 395                 400

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
```

```
                405                 410                 415

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            420                 425                 430

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        435                 440                 445

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    450                 455                 460

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
465                 470                 475                 480

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                485                 490                 495

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            500                 505                 510

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        515                 520                 525

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    530                 535                 540

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
545                 550                 555                 560

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                565                 570                 575

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            580                 585                 590

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        595                 600                 605
```

<210> 31
<211> 613
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de fusión Fc

<400> 31

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
```

```
                245                 250                 255

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
        275                 280                 285

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
    290                 295                 300

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
305                 310                 315                 320

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                325                 330                 335

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
            340                 345                 350

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
        355                 360                 365

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
    370                 375                 380

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
385                 390                 395                 400

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                405                 410                 415

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
            420                 425                 430

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
        435                 440                 445

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
    450                 455                 460

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
465                 470                 475                 480

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                485                 490                 495
```

```
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
            500                 505                 510

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
        515                 520                 525

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
    530                 535                 540

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
545                 550                 555                 560

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                565                 570                 575

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
            580                 585                 590

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
        595                 600                 605

Leu Ser Pro Gly Lys
    610
```

<210> 32
<211> 860
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> HSA fusion protein

<400> 32

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
```

```
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser
                165                 170                 175

Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            180                 185                 190

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg
        195                 200                 205

Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    210                 215                 220

Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
225                 230                 235                 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly
                245                 250                 255

Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            260                 265                 270

Val Ser Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp
        275                 280                 285

Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln
    290                 295                 300

Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu
305                 310                 315                 320
```

```
Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn
                325                 330                 335

Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val
            340                 345                 350

Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys
        355                 360                 365

Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn
    370                 375                 380

Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr
385                 390                 395                 400

Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu
                405                 410                 415

Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe
            420                 425                 430

Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp
        435                 440                 445

Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
    450                 455                 460

Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys
465                 470                 475                 480

Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln
                485                 490                 495

Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp
            500                 505                 510

Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys
        515                 520                 525

Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp
    530                 535                 540

Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu
545                 550                 555                 560
```

```
Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp
               565                 570                 575

Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys
            580                 585                 590

Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu
        595                 600                 605

Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu
    610                 615                 620

Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp
625                 630                 635                 640

Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val
               645                 650                 655

Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln
            660                 665                 670

Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys
        675                 680                 685

Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn
    690                 695                 700

Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg
705                 710                 715                 720

Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys
               725                 730                 735

Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys
            740                 745                 750

Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val
        755                 760                 765

Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe
    770                 775                 780

His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys
785                 790                 795                 800
```

Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys
805 810 815

Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys
820 825 830

Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys
835 840 845

Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
850 855 860

<210> 33
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína de unión a albúmina

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 381
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> ABII316

<400> 34

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220
```

```
Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr
        275                 280                 285

Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
            340                 345                 350

Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp
        355                 360                 365

Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    370                 375                 380


<210>  35
<211>  407
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII317

<400>  35

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
```

```
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285
```

```
Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305                 310                 315                 320

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            340                 345                 350

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
385                 390                 395                 400

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                405
```

<210> 36
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII318

<400> 36

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
```

```
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro
145                 150                 155                 160

Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
        195                 200                 205

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg
225                 230                 235                 240

Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                245                 250                 255

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
            260                 265                 270

Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys
        275                 280                 285

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg
    290                 295                 300

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser
305                 310                 315                 320
```

```
Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
                325                 330                 335

Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
            340                 345                 350

Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu
        355                 360                 365

Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    370                 375                 380
```

<210> 37
<211> 407
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII319

<400> 37

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
```

```
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305                 310                 315                 320

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            340                 345                 350

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380
```

```
Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
385                 390                 395                 400


Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                405
```

<210> 38
<211> 381
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII320

<400> 38

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125


Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140


Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160


Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
```

```
                165                 170                 175

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn
        275                 280                 285

Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
            340                 345                 350

Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr
        355                 360                 365

Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    370                 375                 380
```

<210> 39
<211> 380
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> ABII321

<400> 39

```
Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1               5                  10                  15

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            20                  25                  30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        35                  40                  45

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    130                 135                 140

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
145                 150                 155                 160

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                165                 170                 175

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            180                 185                 190

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        195                 200                 205

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    210                 215                 220

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
```

225 230 235 240

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
275 280 285

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
290 295 300

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
305 310 315 320

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
325 330 335

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
340 345 350

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
355 360 365

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375 380

<210> 40
<211> 274
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII322; PEGilado en Cys 137

<400> 40

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
20 25 30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
35 40 45

```
Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
145                 150                 155                 160

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly
                165                 170                 175

Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
            180                 185                 190

Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile
        195                 200                 205

Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    210                 215                 220

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
225                 230                 235                 240

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn
                245                 250                 255

Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            260                 265                 270

Ser Ser
```

<210> 41

<211> 282
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII323; PEGilado en Cys 138

<400> 41

```
Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
1               5                  10                  15


Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            20                  25                  30


Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        35                  40                  45


Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60


Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80


Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95


Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            100                 105                 110


Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125


Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    130                 135                 140


Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
145                 150                 155                 160


Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
                165                 170                 175


Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met
            180                 185                 190


Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala
        195                 200                 205
```

```
Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
    210                 215                 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
225                 230                 235                 240

Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
                245                 250                 255

His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp
            260                 265                 270

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        275                 280
```

<210> 42
<211> 283
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII305; PEGilado en Cys 129

<400> 42

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125
```

```
Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
                245                 250                 255

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        275                 280


<210>  43
<211>  257
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII306; PEGilado en Cys 129

<400>  43

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
```

```
Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Cys Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Leu Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro
145                 150                 155                 160

Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Glu Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr
        195                 200                 205

Arg Asn Ala Ala Tyr Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg
225                 230                 235                 240

Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser
                245                 250                 255

Ser
```

<210> 44
<211> 124
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> ABII035

<400> 44

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII059

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

```
Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 46
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> myc tag

<400> 46

```
Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
1               5                   10                  15

Ala
```

<210> 47
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP42D4

<400> 47

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
```

```
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Leu Val Val Gly Gly Thr Ser Val Gly Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 48
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111B4

<400> 48

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Trp Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Ser Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Gly Val Val Gly Gly Trp Val Val Val Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 49
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111E5c11

<400> 49

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Leu Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Arg Glu Val Gln Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111C6

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Trp Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

```
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Leu Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Gln Val Val Gly Gly Val Gln Val Leu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 51
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111F2

<400> 51

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala Asn Arg His Ser Val Gly Arg Leu Ser Val Gly Asp Trp Arg
            100                 105                 110
```

Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111E4

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala Ala Arg Leu Thr Val Gly Ser Leu Ser Val Gly Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111C4

<400> 53

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Leu Thr Asp

```
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Ser Val Val Gly Gly Val Gly Val Trp Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 54
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111B5

<400> 54

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Asn Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Thr Ala His Arg Leu Val Val Gly Gly Gly Gly Val Arg Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 55
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABIIPMP111B9

<400> 55

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Gly Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Gly Cys Val Lys Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 56
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_R30K

<400> 56

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
```

```
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Lys Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 57
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_R30W

<400> 57

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Trp Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  58
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII111B5_N106T

<400>  58

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Thr Met Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  59
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII111B5_N106V
```

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Val Met Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_F101W

<400> 60

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Trp Val Val Gly Gly Asn Met Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 61
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_M107E

<400> 61

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Glu Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 62
<211> 124
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_M107R = ABII002

<400> 62

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_E109W

<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

```
Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Trp Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 64
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII111B5_E109Q

<400> 64

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Met Val Gln Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 65
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII003

<400> 65

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII004

<400> 66

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

```
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 67
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII005

<400> 67

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110
```

```
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  68
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII006

<400>  68

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  69
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII007

<400>  69

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 70
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII008

<400> 70

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  71
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII009

<400>  71

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  72
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII010

<400>  72
```

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 73
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII011

<400> 73

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Leu Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 74
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII012

<400> 74

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 75
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> ABII013

<400> 75

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 76
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII014

<400> 76

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 77
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII015

<400> 77

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 78
<211> 124

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII016

<400> 78

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII017

<400> 79

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

```
Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 80
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII018

<400> 80

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 81
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII019

<400> 81

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 82
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII020

<400> 82

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

```
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 83
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII021

<400> 83

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110
```

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 84
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII022

<400> 84

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20   25   30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35   40   45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65   70   75   80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100   105   110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 85
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII023

<400> 85

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1   5   10   15

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 86
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII024

<400> 86

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  87
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII025

<400>  87

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  88
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII026

<400>  88
```

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 89
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII027

<400> 89

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 90
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII028

<400> 90

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 91
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII029

<400> 91

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 92
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII030

<400> 92

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 93
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII031

<400> 93

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 94

<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII032

<400> 94

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII033

<400> 95

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

```
Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 96
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII034

<400> 96

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
```

115 120

<210> 97
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII035

<400> 97

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 98
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII036

<400> 98

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
20 25 30

```
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 99
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII037

<400> 99

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
```

```
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  100
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII60A10 = ABII050

<400>  100

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  101
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII051

<400>  101

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 102
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII052

<400> 102

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
```

```
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  103
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII053

<400>  103

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  104
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII054
```

<400> 104

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 105
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII055

<400> 105

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 106
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII056

<400> 106

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 107
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII057

<400> 107

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 108
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII058

<400> 108

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  109
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII059

<400>  109

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 110
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII060

<400> 110

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 111
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII061

<400> 111

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val

```
        35                  40                  45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 112
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII1E11

<400> 112

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asp Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe His Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ile Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Thr Val Ser Val
    50                  55                  60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Asp
65                  70                  75                  80

Leu Glu Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Asn Ser Ala Gly Arg Ala Ile Asn Leu Pro Leu Tyr Lys Tyr
            100                 105                 110
```

```
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  113
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII14D4

<400>  113

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr
            20                  25                  30


Asn Met Ala Trp Phe Arg His Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Pro Arg Gly Arg Ser Ile Val Thr Thr Ala Thr Tyr Asp
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  114
<211>  123
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII5D2

<400>  114

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
```

```
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Thr Ile Ser Gln Ser Gly Gly Leu Arg Ser Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Pro Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Gln Ala Arg Ala Thr Ala Trp Ser Pro Gln Arg Val Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  115
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII35C7

<400>  115

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
                85                  90                  95
```

```
Ala Ala Ala Arg Phe Gly Thr Pro Ile Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Asp
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 116
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII35D2

<400> 116

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Leu Phe Gly Ser Ala Ile Asn Leu Leu Ser Glu Tyr Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 117
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII35G2

<400> 117

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
```

```
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Glu Asp Asp Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Arg Pro Ser Tyr Val Ala Val Asn Ile Ala Ala Ser Tyr Asn
            100                 105                 110

Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 118
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII42D4

<400> 118

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Leu Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Ser Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Thr Arg Asn Ala Ala Tyr
65                  70                  75                  80
```

```
Leu Gln Met Ser Gly Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Thr Ala His Arg Leu Val Val Gly Gly Thr Ser Val Gly Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  119
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII42B10

<400>  119

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Arg Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Leu
            20                  25                  30


Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Gln
        35                  40                  45


Ala Ala Ile Ser Arg Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Val Phe
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala Ala Ser Pro Gly Gly Pro Ile Asn Tyr Gly Arg Ala Tyr Asp
            100                 105                 110


Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  120
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII42F5
```

<400> 120

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Arg Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Ile Gly Trp Phe Cys Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Ala
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Ala Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Gln Arg Arg Leu Ala Val Asn Val Asp Thr Ser Tyr Asn
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 121
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII42E10

<400> 121

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Thr Leu Tyr
20 25 30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Ala Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

```
Lys Gly Arg Phe Ala Leu Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Phe
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Thr Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Glu Tyr Leu Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Phe Arg Gly Phe Ala Ile Asn Thr Pro Thr Ser Tyr Asn
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 122
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII42G10

<400> 122

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Phe Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Asn
            20                  25                  30

Gly Val Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Asn Trp Ser Gly Ser Lys Thr Asn Tyr Ala Glu Pro Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Tyr Arg Thr Ser Ile Ser Arg Tyr Glu Tyr Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 123
<211> 124
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> ABII60A10

<400> 123

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Asp
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 124
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII60G11

<400> 124

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Arg Ala Phe Ser Val Tyr
20 25 30

Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Thr Phe Val Ala Ala
35 40 45

```
Val Ala Trp Val Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly
    50                  55                  60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Phe Leu His
65                  70                  75                  80

Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Ala
                85                  90                  95

Arg Leu Tyr Gly Gly Arg Trp Tyr Asn Ser Pro Arg Val Asp Asp Phe
            100                 105                 110

Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 125
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII60D2

<400> 125

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Lys
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Thr Ser Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Thr Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95

Ala Arg Arg Pro Trp Pro Arg Ser Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Gln
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 126
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII60H5

<400> 126

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Val Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Asn Ile Gly Ser Ile Asn
20 25 30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ile Ile Thr Asn Ser Gly Ser Val Asn Tyr Gly Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gly Asp Asn Ala Lys Asn Arg Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Glu Ser Trp Gly Arg Ser Pro Leu Lys Tyr Leu Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 127
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII61F6

<400> 127

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Val Asn Ile Asn
20 25 30

```
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ile Ile Asn Lys Arg Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Thr Glu
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Arg Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
                85                  90                  95

Ala Val Val Gly Arg Tyr Gly Arg Thr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115


<210>  128
<211>  112
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  3D6 VL

<400>  128

Tyr Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1               5                   10                  15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
            20                  25                  30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Ile Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
                85                  90                  95

Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 129
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 3D6 VH

<400> 129

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> m266 VL

<400> 130

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile Tyr Ser
20 25 30

```
Asp Gly Asn Ala Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Thr Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
                85                  90                  95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 131
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> m266 VH

<400> 131

```
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
        35                  40                  45

Ala Gln Ile Asn Ser Val Gly Asn Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Tyr Thr Leu Ser
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Ser Gly Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
            100                 105                 110
```

<210> 132
<211> 124
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> 2D2

<400> 132

Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Ile
20 25 30

Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

Gly Ala Ile Ser Arg Ser Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Ala Ile Asn Ile Arg Arg Ser Tyr Asn
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 133
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 2G6

<400> 133

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```
Ser Thr Ile Ser Pro Arg Ala Ala Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Glu Pro Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Lys Ser Leu Arg Tyr Arg Asp Arg Pro Gln Ser Ser Asp Phe Leu
            100                 105                 110

Phe Trp Arg Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 134
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 3A

<400> 134

```
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Asp Gly Asp
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Gly Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ser Ala Pro Thr Arg Trp Val Pro Arg Asp Ser Arg Phe Tyr Asp
            100                 105                 110

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 135
<211> 124
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 1B

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
20 25 30

Ser Ile Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Tyr Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Gly Ile Arg Asp Trp Ala Thr Leu Arg Glu Tyr Glu Tyr Asp
100 105 110

Asp Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 136
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 11G

<400> 136

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Ile Asn
20 25 30

```
Thr Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val
        35                  40                  45

Ala Ala Ile Ile Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Leu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn
                85                  90                  95

Ala Ala Ile Arg Arg Ser Val Ile Asp Ala Trp Gly Ala Tyr Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  137
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  4D

<400>  137

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Thr Ile Arg Trp Asn Gly Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Asp Arg
    50                  55                  60

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Thr Val Phe Leu Gln Met
65                  70                  75                  80

Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg
                85                  90                  95

Leu Gly Pro Arg Thr Ser Gln Ala Ala Leu Tyr Arg Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
```

```
Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  138
<211>  124
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  8B

<400>  138

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Ile Gly Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ser Ala Pro Thr Arg Trp Val Pro Arg Asp Ser Arg Phe Tyr Asp
            100                 105                 110


Arg Trp Gly Gln Gly Thr Arg Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  139
<211>  123
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  31-1

<400>  139

Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly
1               5                   10                  15
```

```
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Gly Trp
            20                  25                  30

Ser Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Thr Asp Ser
    50                  55                  60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Ala Lys Asn Thr Leu
65                  70                  75                  80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
                85                  90                  95

Cys Asn Ala Asp Val Ser Thr Gly Phe Arg Tyr Gln Arg Lys Asp Tyr
            100                 105                 110

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 140
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> VH3-23 (DP-47)

<400> 140

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
```

Ala Lys

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 9GS

<400> 141

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 142
<211> 283
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII314, PEGilado en Cys 129

<400> 142

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
100 105 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

```
Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr
            180                 185                 190

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205

Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        275                 280


<210>  143
<211>  257
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII315, PEGilado en Cys 129

<400>  143

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
```

```
Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Cys Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro
145                 150                 155                 160

Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
        195                 200                 205

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg
225                 230                 235                 240

Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                245                 250                 255

Ser
```

<210> 144
<211> 403
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> His.Xa.Abeta1-28.GS

<400> 144

Met His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asp Ala Glu Phe Arg
1   5   10   15

His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala
            20   25   30

Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Glu Arg
        35   40   45

Pro Thr Phe Tyr Arg Gln Glu Leu Asn Lys Thr Ile Trp Glu Val Pro
    50   55   60

Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser Gly Ala Tyr Gly Ser
65   70   75   80

Val Cys Ala Ala Phe Asp Thr Lys Thr Gly His Arg Val Ala Val Lys
                85   90   95

Lys Leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Ile Ile His Ala Lys Arg Thr Tyr
            100   105   110

Arg Glu Leu Arg Leu Leu Lys His Met Lys His Glu Asn Val Ile Gly
        115   120   125

Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Arg Ser Leu Glu Glu Phe Asn Asp
    130   135   140

Val Tyr Leu Val Thr His Leu Met Gly Ala Asp Leu Asn Asn Ile Val
145   150   155   160

Lys Cys Gln Lys Leu Thr Asp Asp His Val Gln Phe Leu Ile Tyr Gln
                165   170   175

Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asp Ile Ile His Arg
            180   185   190

Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Ala Val Asn Glu Asp Cys Glu Leu Lys
        195   200   205

Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Thr Asp Asp Glu Met Thr Gly
    210   215   220

```
Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Met Leu Asn Trp
225                 230                 235                 240

Met His Tyr Asn Gln Thr Val Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Met
                245                 250                 255

Ala Glu Leu Leu Thr Gly Arg Thr Leu Phe Pro Gly Thr Asp His Ile
            260                 265                 270

Asp Gln Leu Lys Leu Ile Leu Arg Leu Val Gly Thr Pro Gly Ala Glu
        275                 280                 285

Leu Leu Lys Lys Ile Ser Ser Glu Ser Ala Arg Asn Tyr Ile Gln Ser
    290                 295                 300

Leu Ala Gln Met Pro Lys Met Asn Phe Ala Asn Val Phe Ile Gly Ala
305                 310                 315                 320

Asn Pro Leu Ala Val Asp Leu Leu Glu Lys Met Leu Val Leu Asp Ser
                325                 330                 335

Asp Lys Arg Ile Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ala His Ala Tyr Phe Ala
            340                 345                 350

Gln Tyr His Asp Pro Asp Asp Glu Pro Val Ala Asp Pro Tyr Asp Gln
        355                 360                 365

Ser Phe Glu Ser Arg Asp Leu Leu Ile Asp Glu Trp Lys Ser Leu Thr
    370                 375                 380

Tyr Asp Glu Val Ile Ser Phe Val Pro Pro Pro Leu Asp Gln Glu Glu
385                 390                 395                 400

Met Glu Ser
```

<210> 145
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII400

<400> 145

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15
```

```
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160

Lys Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Glu Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe
            180                 185                 190

Tyr Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu
225                 230                 235                 240

Arg Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly
                245                 250                 255
```

```
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
            260                 265                 270

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
        275                 280                 285

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala
    290                 295                 300

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser
305                 310                 315                 320

Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
                325                 330                 335

Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
            340                 345                 350

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg
        355                 360                 365

Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    370                 375                 380

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
385                 390                 395                 400

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr
                405                 410                 415

Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
            420                 425                 430

Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr
        435                 440                 445

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
    450                 455                 460

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
465                 470                 475                 480

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg
                485                 490                 495
```

```
Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            500                 505                 510


<210>  146
<211>  515
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII401

<400>  146

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125


Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140


Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160


Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175


Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190
```

```
Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg Thr Phe Ser Ile
        275                 280                 285

Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys Tyr Ala Asp Phe
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
            340                 345                 350

Cys Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala Leu Thr Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
385                 390                 395                 400

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                405                 410                 415

Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            420                 425                 430
```

```
Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser
        435                 440                 445

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    450                 455                 460

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
465                 470                 475                 480

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile
                485                 490                 495

Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            500                 505                 510

Val Ser Ser
        515
```

<210> 147
<211> 512
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII402

<400> 147

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110
```

```
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
145                 150                 155                 160

Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
                245                 250                 255

Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
            260                 265                 270

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn
        275                 280                 285

Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe
    290                 295                 300

Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
305                 310                 315                 320

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
                325                 330                 335

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
            340                 345                 350
```

```
Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr
        355                 360                 365

Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly
385                 390                 395                 400

Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
                405                 410                 415

Phe Lys Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
            420                 425                 430

Lys Glu Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr
        435                 440                 445

Phe Tyr Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
    450                 455                 460

Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
465                 470                 475                 480

Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro
                485                 490                 495

Leu Arg Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
            500                 505                 510


<210>  148
<211>  515
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII403

<400>  148

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
```

```
Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala Leu Thr Ser Gly Tyr
            100                 105                 110

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
    130                 135                 140

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly
145                 150                 155                 160

Pro Thr Phe Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
                165                 170                 175

Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile
            180                 185                 190

Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
        195                 200                 205

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
    210                 215                 220

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn
225                 230                 235                 240

Arg Val Glu Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val
            260                 265                 270

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser
        275                 280                 285
```

```
Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val
    290                 295                 300

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly
305                 310                 315                 320

Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
            340                 345                 350

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser
        355                 360                 365

Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
    370                 375                 380

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly
385                 390                 395                 400

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
                405                 410                 415

Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro
            420                 425                 430

Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser
        435                 440                 445

Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
    450                 455                 460

Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
465                 470                 475                 480

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile
                485                 490                 495

Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
            500                 505                 510

Val Ser Ser
        515
```

<210> 149

<211> 541
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII404

<400> 149

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125


Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140


Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160


Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175


Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            180                 185                 190


Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205
```

```
Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
305                 310                 315                 320

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
                325                 330                 335

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
            340                 345                 350

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
385                 390                 395                 400

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
                405                 410                 415

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
            420                 425                 430

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg Thr Phe Ser Ile Tyr
        435                 440                 445

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
```

```
    450                 455                 460

Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val
465                 470                 475                 480

Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Val Tyr
                485                 490                 495

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
            500                 505                 510

Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala Leu Thr Ser Gly Tyr
        515                 520                 525

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
    530                 535                 540


<210>  150
<211>  515
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII405

<400>  150

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30

Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110
```

```
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125

Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu
    130                 135                 140

Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Val Arg
145                 150                 155                 160

Thr Phe Ser Ile Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys
                165                 170                 175

Glu Arg Glu Phe Val Ala Gly Ile Asn Arg Ser Gly Asp Val Thr Lys
            180                 185                 190

Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala
        195                 200                 205

Lys Asn Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr
    210                 215                 220

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr Trp Ala Tyr Asp Thr Val Gly Ala
225                 230                 235                 240

Leu Thr Ser Gly Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
                245                 250                 255

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu
            260                 265                 270

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
        275                 280                 285

Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe
    290                 295                 300

Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg
305                 310                 315                 320

Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
                325                 330                 335

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser
            340                 345                 350

Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg
```

```
        355                 360                 365

Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly
    370                 375                 380

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
385                 390                 395                 400

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
                405                 410                 415

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
            420                 425                 430

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        435                 440                 445

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
    450                 455                 460

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr
465                 470                 475                 480

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                485                 490                 495

Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr
            500                 505                 510

Val Ser Ser
        515


<210>  151
<211>  512
<212>  PRT
<213>  Artificial

<220>
<223>  ABII406

<400>  151

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Ile Thr His Tyr
            20                  25                  30
```

```
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45

Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Ser Val
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Asp Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg Val Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
    130                 135                 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe
145                 150                 155                 160

Arg Thr Asp Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg
                165                 170                 175

Glu Phe Val Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala
            180                 185                 190

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
        195                 200                 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
    210                 215                 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu
225                 230                 235                 240

Asp Trp Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly
            260                 265                 270

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

```
        275                 280                 285

Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala
    290                 295                 300

Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala Ala Val Ser Arg Ser Gly Val
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
                325                 330                 335

Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
            340                 345                 350

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala
        355                 360                 365

Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
    370                 375                 380

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln
385                 390                 395                 400

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg
                405                 410                 415

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser
            420                 425                 430

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
        435                 440                 445

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
    450                 455                 460

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met
465                 470                 475                 480

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly
                485                 490                 495

Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
            500                 505                 510
```

<210> 152
<211> 538

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> ABII407

<400> 152

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15


Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val His Ser Gly Pro Thr Phe Arg Thr Asp
            20                  25                  30


Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45


Ala Ala Val Thr Trp Asn Ser Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60


Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Ala His Arg Phe Val Val Gly Gly Asn Arg Val Glu Asp Trp Arg
            100                 105                 110


Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125


Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
    130                 135                 140


Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
145                 150                 155                 160


Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
                165                 170                 175


Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Asn Asn Tyr Asn
            180                 185                 190


Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val Ala
        195                 200                 205


Ala Val Ser Arg Ser Gly Val Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
```

```
    210                 215                 220

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
225                 230                 235                 240

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                245                 250                 255

Ala Ala Tyr Arg Gly Thr Ala Ile Asn Val Arg Arg Ser Tyr Ser Ser
            260                 265                 270

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        275                 280                 285

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val
    290                 295                 300

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys
305                 310                 315                 320

Ile Thr His Tyr Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu
                325                 330                 335

Arg Glu Phe Val Ser Arg Ile Thr Trp Gly Gly Asp Asn Thr Phe Tyr
            340                 345                 350

Ser Asn Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
        355                 360                 365

Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala
    370                 375                 380

Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Pro Leu Arg
385                 390                 395                 400

Val Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
                405                 410                 415

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
            420                 425                 430

Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
        435                 440                 445

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
    450                 455                 460
```

```
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp
465                 470                 475                 480

Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
                485                 490                 495

Asn Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu
            500                 505                 510

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser
        515                 520                 525

Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    530                 535
```

<210> 153
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> JH5

<400> 153

```
Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1               5                   10                  15
```

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/EP2011/053090	02.03.2011	03.03.2010

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K16/18 C07K16/46 A61K39/395

Applicant
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Weikl, Martina Telephone No. +49 89 2399-7518

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2011/053090

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

      ☐ on paper

      ☒ in electronic form

   b. (time)

      ☒ in the international application as filed

      ☐ together with the international application in electronic form

      ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 13-15(completely); 16-28(partially)

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 13-15(completely); 16-28(partially)

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:

   ☐ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

   see separate sheet

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts.

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	4-12, 29-32(completely); 16-28(partially)
	No:	Claims	1-3
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

   see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item IV

Lack of unity of invention

This Authority considers that the application does not meet the requirements of unity of invention and that there are 2 inventions covered by the claims indicated as follows:

1. claims: 1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)

   Claims relating to biparatopic immunoglobulin constructs having two immunoglobulin domains binding to two different epitopes of the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptides, pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.

2. claims: 13-15(completely); 16-28(partially)

   Claims relating to polypeptides having one immunoglobulin domain binding to the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptides, pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.

The reasons for which the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows:

Article 3(4)(iii) in combination with Rule 13.1 PCT stipulates that the international application shall relate to one invention only or to a group so linked as to form a single general inventive concept. Rule 13.2 PCT stipulates that where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention shall be fulfilled only when there is a technical relationship among those Inventions involving one or more of the same or corresponding 'special technical features', i.e. technical features that define a novel and inventive contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The only common concept (technical relationship) linking the subject-matter of the different groups of inventions as set out above is that they relate to polypeptides comprising at least one immunoglobulin domain binding to the Abeta molecule.

However, this concept cannot be regarded as the 'single general inventive concept' required by Article 3(4)(iii) in combination with Rule 13.1 PCT because it is not novel. E.g. WO2006/040153 (cited in the international search report) already disclosed nanobodies (i.e. single immunoglobulin binding domains) binding to Abeta.

Since no other 'special technical feature' (Rule 13.2 PCT) could be identified to provide a linking concept between the different groups there is lack of unity and each group must be regarded as a separate group of inventions.

Applicant is further requested to note that due to the fact that Abeta binding nanobodies have been described in the art before (WO2006/040153; see above) the second group of inventions must in principle be further subdivided into subgroups (each subgroup relating to Abeta binding nanobodies sharing common novel structural features).

In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has not paid additional fees. The following examination report thus only relates to the invention first mentioned in the claims (i.e. group 1).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 **Subject-matter of the application**

The application relates to biparatopic immunoglobulin constructs comprising two immunoglobulin variable domains having affinities for two different epitopes of Abeta.

2 **Documents**

Reference is made to the following documents:

D1 WO 2009/149185 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; HAHN ALFRED [DE]; MUELLER BERNHARD) 10 December 2009 (2009-12-10)

D2 WO 2006/040153 A2 (ABLYNX NV [BE]; LAUWEREYS MARC [BE]; VAN LEUVEN FRED [BE]; VAN DER AUW) 20 April 2006 (2006-04-20)

D3 VAN BOCKSTAELE FEMKE ET AL: "The development of nanobodies for therapeutic applications.", CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS (LONDON, ENGLAND : 2000) NOV 2009 LNKD- PUBMED:19876789, vol. 10, no. 11, November 2009 (2009-11), pages 1212-1224, XP002587131, ISSN: 2040-3429

D4 JOSEFIN-BEATE HOLZ: "Developing Nanobodies; From Bench to Bedside",
, [Online] 24 June 2008 (2008-06-24), XP002587132,
PDA/EBE workshop
Retrieved from the Internet:
URL:http://www.pda.org/Presentation/2008PDAEBEDublin/holzjosefin.aspx[retrieved on 2010-06-14]

D5 ELS CONRATH K ET AL: "Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs",
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD- DOI:10.1074/JBC.M007734200,
vol. 276, no. 10, 9 March 2001 (2001-03-09), pages 7346-7350, XP002248402,
ISSN: 0021-9258

3 **Novelty (Article 33(2) PCT)**

Document D1 already disclosed a polypeptide chain comprising a first heavy chain variable domain VD1 and a second heavy chain variable domain VD2 covalently linked by a linker X1 wherein the polypeptide has two antigen binding sites for e.g. Abeta (claim 1). VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody and VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from an second parent antibody (see description on page 14, lines 19-23) and one particular embodiment describes that the parent antibodies bind two different epitopes on the same antigen (page 17, lines 17-18).

Hence, the subject-matter of claims 1-3 is not novel over the disclosure of D1.

4 **Inventive step (Article 33(3) PCT)**

4.1 Claim 1 relates to a biparatopic immunoglobulin construct having two different immunoglobulin domains wherein the two domains bind to two different epitopes on the Abeta molecule. Claim 3 further defines the immunoglobulin domains preferably as VHH domains. The constructs are claimed in the context of treatment of neurodegenerative diseases (e.g. claim 21, 22, 24 or 28).

The prior art had already disclosed single immunoglobulin domains binding to the Abeta molecule as therapeutic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases. E.g. document D2 disclosed nanobodies (single domain antibodies derived from camelid heavy chain variable domains (VHHs)) binding to Abeta for the treatment of e.g. Alzheimers disease (see abstract of D2).

The difference between the binding compounds of D2 and the currently claimed binding compounds is the presence of an additional Abeta binding immunoglobulin domain in the latter, rendering the currently claimed binding compounds **biparatopic**.

However, in the light of several documents (e.g. D3 and D4) it seems that no inventive step can be acknowledged for this difference. D3 already disclosed that biparatopic immunoglobulin constructs exhibit enhanced potency and selectivity for the target (D3: page 1216, right column, 4th paragraph). D4 equally disclosed that a biparatopic format dramatically enhances nanobody potency.

Hence, it must be assumed that the skilled person looking for alternative (improved) Abeta binding compounds for therapeutic application **would** have contemplated a biparatopic nanobody format based on a combination of e.g. the disclosures of D2 and D3 (or alternatively D4).

Hence, the subject-matter of claims 1-3 is not inventive.

4.2 Dependent claims 10, 11, 16-28 and 31 do not disclose additional features which are on their own sufficient to establish patentability of the claimed subject-matter.

4.3 With the provision of a biparatopic Abeta-specific nanobody construct lacking inventive step (see point 4.1 above) it follows that the determination of features of such an antibody (binding affinity, epitope and CDR sequences) are merely the result of routine laboratory experimentation lacking an inventive step as well (claims 4-9, 12, 29, 30 and 32).

5 **Sufficiency of Disclosure (Article 5 PCT)**

5.1 Claim 1 relates to a polypeptide comprising two single variable domains specifically binding to two different epitopes of the Abeta molecule **without limiting these domains to VHH domains**. The skilled person is however well aware of the fact that under normal circumstances only camelid VHH domains

have the ability to bind to antigen with sufficient affinity without a complementary light chain variable domain (see also D3; passage bridging pages 1212 and 1213).

Hence, claims which are not restricted to constructs comprising VHH domains do not seem to be enabled over their entire scope. This applies even more for claims wherein CDR sequences are defined which have been selected for in the structural framework of VHH domains.

5.2 In addition, it must be noted that the claimed technical effect can not credibly achieved by claims which define antibody CDR sequences with variabilities within the CDR sequences ('having up to three, preferably up to two and more preferably one amino acid difference'; see claim 7). It is common knowledge that the residues in the CDR regions are crucial for antigen binding and that substitution of a single residue can already significantly alter the binding behaviour of an antibody.

6 **Method of treatment**

The patentability of claim 24 can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment. Patentability, in particular novelty and inventive step, of claim 24 has been assessed on the basis of a purpose-limited product claim taking into account the alleged effects of the compound/composition.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

7 **Clarity (Article 6 PCT)**

7.1 The sequential order of the first and second immunoglobulin single variable domain within the polypeptide construct is not defined in the claims. Hence, it is redundant to specify that the first and second epitope can be SEQ ID Nos 3 and 4 respectively **or** SEQ ID Nos 4 and 3 respectively (claim 4).

A similar argumentation applies *mutatis mutandis* to claims 7-9, 29 and 30.

7.2 Claim 25 relates to a biparatopic polypeptide according to the invention **prepared for the administration in combination with** a selection of therapeutic compounds. Claim 26 relates to a selection of therapeutic compounds **prepared for the administration in combination with** a

biparatopic polypeptide according to the invention. The current wording is unclear and could be interpreted such that the claim is merely directed to biparatopic polypeptide according to the invention or a selection of therapeutic compounds prepared in such a way that they are **suitable** for combination with each other. In that case, the subject-matter of claim 25 would be redundant over preceeding claims 1, 15 and 19. More importantly, the subject-matter of current claim 26 would not be novel, since the claimed therapeutic compounds belong to the state of the art.

A similar argumentation applies to claim 23 ('prepared for being administered').

7.3 The applicant is furthermore requested to note that 'reduction of Abeta levels in a body fluid' is not considered as limiting and that claim 28 is hence redundant over claims 1-15.

7.4 In addition, claims 29-32 seem to be redundant over claims 8, 9, 11 and 12.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

\SDOCID: <XS_____200704010CK_I_>

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
P01-2596-WO		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/EP2011/053090	02/03/2011	03/03/2010
Applicant		
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   ☐ the text is approved as submitted by the applicant
   ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

   BIPARATOPIC ABETA BINDING POLYPEPTIDES

5. With regard to the **abstract,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      ☐ as suggested by the applicant
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/053090

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/053090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18 C07K16/46 A61K39/395
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/149185 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; HAHN ALFRED [DE]; MUELLER BERNHARD) 10 December 2009 (2009-12-10)	1-3
Y	page 14, lines 19-23 page 17, lines 18,19 claim 1	4-12, 16-32

Y	WO 2006/040153 A2 (ABLYNX NV [BE]; LAUWEREYS MARC [BE]; VAN LEUVEN FRED [BE]; VAN DER AUW) 20 April 2006 (2006-04-20) claims 1, 6, 7	1-12, 16-32

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 April 2011	18/07/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Weikl, Martina

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VAN BOCKSTAELE FEMKE ET AL: "The development of nanobodies for therapeutic applications.", CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS (LONDON, ENGLAND : 2000) NOV 2009 LNKD-PUBMED:19876789, vol. 10, no. 11, November 2009 (2009-11), pages 1212-1224, XP002587131, ISSN: 2040-3429 page 1216, column 2, paragraph 4 page 1218, column 2, paragraph 3	1-12, 16-32
Y	JOSEFIN-BEATE HOLZ: "Developing Nanobodies; From Bench to Bedside", , [Online] 24 June 2008 (2008-06-24), XP002587132, PDA/EBE workshop Retrieved from the Internet: URL:http://www.pda.org/Presentation/2008PDAEBEDublin/holzjosefin.aspx> [retrieved on 2010-06-14] pages 14-18	1-12, 16-32
A	ELS CONRATH K ET AL: "Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD-DOI:10.1074/JBC.M007734200, vol. 276, no. 10, 9 March 2001 (2001-03-09), pages 7346-7350, XP002248402, ISSN: 0021-9258 the whole document	1-12, 16-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/053090

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009149185 A2	10-12-2009	AR 072000 A1	28-07-2010
		AU 2009256246 A1	10-12-2009
		CA 2725666 A1	10-12-2009
		CN 102112494 A	29-06-2011
		EP 2297208 A2	23-03-2011
		KR 20110016959 A	18-02-2011
		PE 00542010 A1	03-03-2010
		US 2009304693 A1	10-12-2009
		UY 31861 A	05-01-2010
WO 2006040153 A2	20-04-2006	AU 2005293752 A1	20-04-2006
		BR PI0518151 A2	16-06-2009
		CA 2583017 A1	20-04-2006
		EP 1814917 A2	08-08-2007
		JP 2008515446 A	15-05-2008
		KR 20070084170 A	24-08-2007
		US 2008107601 A1	08-05-2008

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12, 29-32(completely); 16-28(partially)

   Claims relating to biparatopic immunoglobulin constructs having two immunoglobulin domains binding to two different epitopes of the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptides, pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.

   ---

2. claims: 13-15(completely); 16-28(partially)

   Claims relating to polypeptides having one immunoglobulin domain binding to the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptides, pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Nº de solicitud internacional
PCT/EP2011/053090

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
INV. C07K16/18 C07K16/46 A61K39/395
ADD.

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de la clasificación)
C07k

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
X Y	WO 2009/149185 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; HAHN ALFRED [DE]; MUELLER BERNHARD) 10 diciembre 2009 (10-12-2009) Página 14, líneas 19-23 Página 17, líneas 18,19 Reivindicación 1 ---	1-3 4-12, 16-32
X	WO 2006/040153 A2 (ABLYNX NV [BE]; LAUWEREYS MARC [BE]; VAN LEUVEN FRED [BE]; VAN DER AUW) 20 abril 2006 (20-04-2006) Reivindicaciones 1, 6, 7 --- -/--	1-12, 16-32

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos.

☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo.

* Categorías especiales de los documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
26 abril 2011	18/07/2011

Nombre y dirección postal de la ISA
Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HL Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Weikl, Martina

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
Y	VAN BOCKSTAELE FEMKE ET AL: "The Development of nanobodies for therapeutic Applications.", CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS (LONDON, ENGLAND : 2000) NOV 2009 LNKD-PUBMED:19876789, vol. 10, no. 11, November 2009 (11-2009), páginas 1212-1224, XP002587131, ISSN: 2040-3429 Página 1216, columna 2, párrafo 4 Página 1218, columna 2, párrafo 3	1-12, 16-32 1-12, 16-32

Y	JOSEFIN-BEATE HOLZ: "Developing Nanobodiies; From Bench to Bedside", , [Online] 24 junio 2008 (24-06-2008), XP002587132, PDA/EBE workshop Recuperado de internet: URL:http://www.pda.org/Presentation/2008PDAEBEDublin/holzjosefin.aspx> [Recuperado el 14-06-2010] páginas 14-18	

A	ELS CONRATH K ET AL: "Camel single-domain Antibodies as modular building units in Bispecific and bivalent antibody Constructs", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, US LNKD-DOI:10.1074/JBC.M007734200, Vol. 276, no. 10, 9 marzo 2001 (09-03-2001), páginas 7346-7350, XP002248402, ISSN: 0021-9258 El documento completo	1-12 16-32

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familia de patentes

Nº de solicitud internacional
PCT/EP2011/053090

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2009149185 A2	10-12-2009	AR 072000 A1	28-07-2010
		AU 2009256246 A1	10-12-2009
		CA 2725666 A1	10-12-2009
		CN 102112494 A	29-06-2011
		EP 2297208 A2	23-03-2011
		KR 20110016959 A	18-02-2011
		PE 00542010 A1	03-03-2010
		US 2009304693 A1	10-12-2009
		UY 31861 A	05-01-2010
WO 2006040153 A2	20-04-2006	AU 2005293752 A1	20-04-2006
		BR PI0518151 A2	16-06-2009
		CA 2583017 A1	20-04-2006
		EP 1814917 A2	08-08-2007
		JP 2008515446 A	15-05-2008
		KR 20070084170 A	24-08-2007
		US 2008107601 A1	08-05-2008

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Nº de solicitud internacional
PCT/EP2011/053090

Recuadro II Observaciones cuando se encontró que ciertas reivindicaciones eran inescrutables (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este Informe de Búsqueda no ha sido establecido en relación a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones Nos.:

debido a que se refieren a materia para la que no se requiere búsqueda por esta Administración, a saber:

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

debido a que se refieren a partes de la Solicitud internacional que no cumplen las condiciones prescritas para que pueda efectuarse una Búsqueda significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones Nos.:

debido a que son reivindicaciones dependientes y no están propuestas de acuerdo con la segunda y tercera sentencias de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando hay ausencia de unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

Esta Administración de Búsqueda Internacional encontró varias invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

Véase hoja adicional

1. ☐ Como todas las tasas requeridas de búsqueda adicional se pagaron en su momento por la solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de una Búsqueda.

2. ☐ Como se han podido efectuar sin esfuerzo particular que justifique una tasa adicional todas las Búsquedas sobre las reivindicaciones que se prestan a ello, la Administración no ha solicitado el pago de ninguna tasa de esta naturaleza..

3. ☐ Como solamente una parte de las tasas requeridas de búsqueda adicional se pagaron en su momento por la solicitante, el Informe de Búsqueda Internacional cubre solamente las reivindicaciones para las que se pagaron las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☒ Las tasas requeridas de búsqueda internacional no se pagaron en su momento por la solicitante. Consecuentemente, este Informe de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones, está cubierta por las reivindicaciones Nos.:

1-12, 29-32(completamente); 16-28(parcialmente

Observaciones sobre protesta

☐ Las tasas de Búsqueda adicional están acompañadas de una protesta de la solicitante y, si se aplica, el pago de una tasa de protesta

☐ Las tasas de Búsqueda adicional están acompañadas de una protesta de la solicitante pero la tasa de protesta aplicable no se pagó dentro del plazo especificado en la invitación

☐ No se acompaña protesta al pago de tasas de búsqueda adicional.

INFORMACIÓN ADICIONAL COMO CONTINUACIÓN DEL PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional ha encontrado múltiples (grupos de) invenciones es esta solicitud internacional, como se indica a continuación

1. reivindicaciones: 1-12, 29-32(completamente); 16-28 (parcialmente
Claims relating to biparatopic immunoglobulin constructs having two immunoglobulin domains binding to two different epitopes of the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptidesm pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.

---

2. reivindicaciones: 13-15(completamente); 16-28(parcialmente)
Claims relating to polypeptides having one immunoglobulin domain binding to the Abeta molecule. Nucleic acids encoding these polypeptides, pharmaceutical compositions comprising these polypeptides, methods of making these polypeptides and therapeutic applications of these peptides.