

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490915 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.06.03(22) Дата подачи заявки  
2022.10.06(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)  
C07K 16/40 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 37/00 (2006.01)

## (54) НАЦЕЛЕННЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ КОМПЛЕМЕНТ-AКТИВИРУЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/253,211

(32) 2021.10.07

(33) US

(86) PCT/US2022/077663

(87) WO 2023/060167 2023.04.13

(71) Заявитель:

ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US)

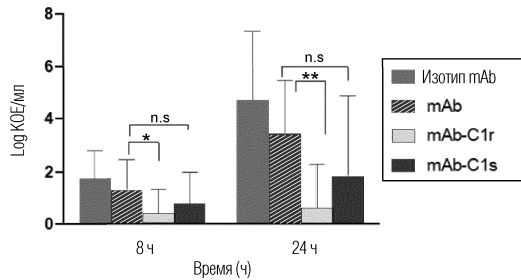
(72) Изобретатель:

Али Мохаммед Юссиф Ибрахим,  
Демопулос Грегори А., Дулами  
Кристиана, Швевле Ханс-Вильгельм,  
Ябуки Мунехиса (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В одном аспекте настоящее изобретение относится к нацеленным комплемент-активирующим молекулам, содержащим мишень-связывающий домен и эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен получен из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Также настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции, включая бактериальную, вирусную, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию, с использованием нацеленных комплемент-активирующих молекул.



A1

202490915

202490915

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580843EA/025

### НАЦЕЛЕННЫЕ КАТАЛИТИЧЕСКИЕ КОМПЛЕМЕНТ-АКТИВИРУЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### Область техники

Настоящее изобретение относится к нацеленным комплемент-активирующим молекулам, содержащим нацеливающий домен и сериновый протеазный домен, для применения в нацеленной активации комплемента, и к связанным композициям и способам.

#### Список последовательностей

Перечень последовательностей, связанный с этой заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии и включен в описание посредством ссылки. Название XML-файла, содержащего список последовательностей, - MP\_1\_0303\_US2\_Sequence\_Listing\_20221003\_ST26.xml, размер файла - 216 КБ, он создан 3 октября 2022 г.; и подается через Патентный центр вместе с подачей описания.

#### Уровень техники

Система комплемента поддерживает врожденную защиту хозяина от патогенов и других острых поражений (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York), и также играет роль в иммунном надзоре, направленном против рака (P. Macor et al., *Front. Immunol.*, 9:2203, 2018). В системе комплемента участвуют более 30 жидкофазных и мембраносвязанных гликопротеинов, кофакторов, рецепторов и регуляторных белков (S. Meyer et al., *mAbs*, 6:1133, 2014). Многие из них представляют собой сериновые протеазы, которые образуют высокорегулируемый каскад событий активации. Система комплемента быстро реагирует на молекулярные сигналы стресса через каскад последовательных протеолитических реакций, инициированных связыванием паттерн-распознающих рецепторов (PRR) с различными структурами на поврежденных клетках, поверхностях биологических веществ или микробных «захватчиках» (Reis et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 18:5, 2018). Активация каскада комплемента индуцирует разнообразные иммунные эффекторные функции, такие как лизис клеток, фагоцитоз, хемотаксис и иммунная активация (S. Meyer et al., 2014). Кроме того, система комплемента также функционирует в качестве мостика между врожденным иммунным ответом и последующей активацией адаптивного иммунитета. В дополнении к своим антиинфекционным свойствам, система комплемента также участвует в клиренсе иммунных комплексов и апоптотических клеток, регенерации тканей, мобилизации гемопоэтических клеток-предшественников и ангиогенезе (T.M. Pierpont et al., *Front. Oncol.*, 8: 163, 2018).

Система комплемента может активироваться посредством трех различных путей: классического пути, альтернативного пути и лектинового пути. См. фиг. 1. Активация классического пути запускается конформационным изменением комплекса инициации классического пути C1, состоящего из C1q, гексамера трехмерных цепей, и

гетеротетрамера C1q-ассоциированных сериновых протеаз C1r и C1s, как подробно описано ниже. Связывание C1q с комплексами, состоящими из антител хозяина, связанных с чужеродной частицей (т.е. антигеном), инициирует активацию комплекса C1. Поскольку активация классического пути во многом зависит от предшествующего адаптивного иммунного ответа хозяина, то классический путь является эффекторным механизмом приобретенной иммунной системы. Напротив, как лектиновый, так и альтернативный пути не зависят от адаптивного иммунитета и являются частью врожденной иммунной системы.

Классический путь (CP) в основном инициируется комплексами антитело-антиген. Антитела подклассов IgM и IgG связываются с антигеном на поверхности патогена или клетки-мишени и рекрутируют комплекс C1, который состоит из субкомпонента C1q мультимолекулярного комплекса распознавания (состоящего из шести гетеротримеров А-цепи, В-цепи и С-цепи C1q) и C1q-ассоциированных сериновых протеаз, C1r и C1s. При связывании C1q с Fc-участком IgM, связанного с антигеном, или, по меньшей мере, с двумя IgG антителами, связанными с их антигенами, сериновая протеаза C1r превращается из ее зимогенной формы в ферментативно активную форму, и затем расщепляет и активирует ее субстрат C1s. После активации C1s расщепляет C4 на фрагменты C4a и C4b. C4b связывается с компонентом комплемента C2, и этот комплекс, C4bC2, расщепляется под действием C1s на второй стадии расщепления с высвобождением C2b, образуя комплекс C4bC2a конвертирующего фермента комплемента C3, так называемую конвертазу C3, которая расщепляет обильный плазменный компонент комплемента C3 на C3a и C3b.

Лектиновый путь запускается связыванием паттерн-распознающих молекул, таких как маннозосвязывающий лектин (MBL), фиколины или коллектин-11 и коллектин-10, с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP) или апоптотическими или поврежденными клетками-хозяевами. Молекулы распознавания образуют комплекс с MBL-ассоциированными сериновыми протеазами, MASP-1 и MASP-2, и активируют их при связывании, что приводит к расщеплению C2 и C4 и образованию конвертазы C3 (C4bC2a).

Альтернативный путь (AP) инициируется спонтанным гидролизом C3 («tickover») до C3(H<sub>2</sub>O), который связывается с фактором В (fB). Для превращения образующихся комплексов C3(H<sub>2</sub>O)fB требуется ферментативная активность другой высокоспецифичной сериновой протеазы, называемой фактором D. Полагается, что доступность ферментативно активного фактора D является ограничивающим фактором для петли амплификации альтернативного пути, и для доступности фактора D требуется действие другого фермента, MASP-3, который необходим для превращения профактора D (proCFD) в его активную форму, зрелый фактор D (matCFD) (Dobó et al., 2016). MatCFD, другая сериновая протеаза, расщепляет C3(H<sub>2</sub>O)fB-связанный на Ba и Bb. Bb также является сериновой протеазой и участвует в образовании альтернативной C3-конвертазы C3(H<sub>2</sub>O)Bb, которая расщепляет C3 на C3a и C3b. Благодаря этому механизму

альтернативный путь является конститутивно активным на низких уровнях. Петля амплификации AP формируется, когда только генерированный C3b, образованный C3(H<sub>2</sub>O)Bb или C3-конвертазой C4bC2a на классическом и лектиновом пути, связывается с поверхностями-мишенями и секвестрирует fB с образованием комплексов C3bfB, которые при расщеплении matCFD создают другой комплекс C3-конвертазы C3bBb. Эта конвертаза может быть дополнительно стабилизирована пропердином, который предотвращает распад комплекса и конверсию C3b фактором H и фактором I. C3bBb является функциональной конвертазой альтернативного пути.

Три пути сходятся после образования конвертаз C3 C4bC2a и C3bBb. Фрагмент C3a в результате расщепления под действием C3 представляет собой анафилатоксин, который способствует развитию воспалению. C3b функционирует в качестве опсонина, ковалентно связываясь через тиоэфирную связь на поверхности клеток-мишеней, «маркируя» их для циркулирующих рецептор комплемента (CR)-содержащих эффекторных клеток, таких как НК-клетки и макрофаги, которые обеспечивают комплемент-зависимую клеточную цитотоксичность (CDCC) и комплемент-зависимый клеточный фагоцитоз (CDCP) соответственно. C3b также связывается с конвертазой C3 (C4bC2a или C3bBb) с образованием конвертазы C5 (C4bC2a(C3b)<sub>n</sub> или C3bBb(C3b)<sub>n</sub> соответственно), что приводит к образованию MAC и затем CDC. Кроме того, связанные с клетками фрагменты деградации C3b, iC3b и C3dg, могут способствовать рецептор комплемента-зависимой цитотоксичности (CDCC и CDCP), а также адаптивному иммунному ответу посредством активации В-клеток (M.C. Carroll, *Nat. Immunol.*, 5:981, 2004).

Образование конвертазы C5 приводит к расщеплению C5 на C5a и C5b. C5a представляет собой еще один анафилатоксин. C5b рекрутирует C6-9 с формированием мембраноатакующего комплекса (MAC или комплекса C5b-9). MAC вызывает образование пор, что приводит к разрушению мембраны клетки-мишени и лизису клетки (так называемая комплемент-зависимая цитотоксичность, CDC). Прямой лизис клеток через образование MAC традиционно считается терминальным эффекторным механизмом системы комплемента, однако полагается, что C3b-опосредованная опсонизация и провоспалительный сигнальный путь, а также функция анафилатоксина C3a играют существенную роль в опосредовании комплемент-зависимой воспалительной патологии.

Регуляторные белки комплемента (CRP) предотвращают нежелательную активацию комплемента и потребление компонентов комплемента. Эти белки присутствуют в большинстве клеток и благодаря жесткому контролю играют важную роль в защите клеток-хозяев от комплемент-зависимого повреждения. CRP могут представлять собой растворимые белки (sCRP) или мембраносвязанные регуляторные белки комплемента (mCRP) (P.F. Zipfel and C. Skerka, *Nat. Rev. Immunol.*, 9:729, 2009). Одним из наиболее распространенных ингибиторов протеаз в циркулирующей крови является ингибитор C1 (C1inh) со средней концентрацией в плазме крови 0,25 г/л (H. Gregorek, *Comp. and Inflamm.*, 8:310, 1991). C1inh связывается и инактивирует C1r, C1s и две MBL-ассоциированные сериновые протеазы, MASP-1 и MASP-2; следовательно, он является

основным ингибитором классического и лектинового путей комплемента. Другие sCRP включают белок, связывающий C4 (C4BP), и факторы H и I (PF Zipfel и C. Skerka, 2009).

В отличие от sCRP, mCRP регулируют пути комплемента, целенаправленно воздействуя как на C3, так и на C4 (P.F. Zipfel и C. Skerka, 2009). Например, CD46 (мембранный кофакторный белок; MCP) является кофактором для фактора I, который опосредует расщепление C3b и C4b на их неактивные продукты деградации, iC3b и iC4b, соответственно, и тем самым приводит к ингибированию всех трех путей комплемента. CD55 (фактор ускорения распада комплемента; DAF) ускоряет распад конвертаз C3 и C5, приводя к ингибированию всех трех путей комплемента. CD59 (протектин) предотвращает сборку MAC, ингибируя полимеризацию C9 и его последующее связывание с C5b-8, ингибируя тем самым все три пути комплемента.

Для большинства микробных организмов первая линия защиты, обеспечиваемая комплементом, достаточна для предотвращения инфекции и сохранения целостности организма-хозяина. Патогены представляют собой микроорганизмы, которые «научились» нарушать функцию иммунной системы хозяина, разрушать барьеры, защищающие хозяина от микробной инвазии, и распространять инфекцию. Патогены «разработали» различные способы разрушения иммунной защиты хозяина. Например, бактерия *Neisseria meningitidis* имеет поверхностный белок, называемый фактор H-связывающим белком, который секвестрирует и связывает фактор H (fH) отрицательного регуляторного компонента комплемента хозяина с поверхностью бактерии. Это, в свою очередь, защищает бактерии от активации комплемента, поскольку связанный с поверхностью фактор H распадается и инактивирует конвертазы комплемента C3 и C5, которые образовались на поверхности патогена, и тем самым предотвращает нейтрализацию, киллинг или опсонизацию патогена системой комплемента хозяина. Другие стратегии, которые патогены выработали для уклонения от атаки комплемента, включают секвестрацию C4-связывающего белка хозяина бактериальными поверхностными белками, такими как PspA и PspC *Streptococcus pneumoniae*, для предотвращения образования конвертаз C3 и C5 классического и лектинового путей, C4bC2a и C4bC2a(C3b)<sub>n</sub> соответственно на бактериальной поверхности (Haleem K. S. et al., *Infect Immun.*, 2018 Dec 19; 87(1):e00742-18.) и высвобождения комплемент-активирующих бактериальных токсинов, которые поглощают комплемент вдали от уязвимой поверхности патогена.

Система комплемента также участвует в подавлении развития рака. Неопластическая трансформация приводит к ряду генетических и эпигенетических изменений, которые изменяют морфологию и состав клеточной мембраны. Во время этого процесса трансформации нормальные клетки экспрессируют опухолеспецифические маркеры и генерируют провоспалительные сигналы, которые распознаются сетью иммунного надзора рака. Комплемент считается частью сети иммунного надзора рака (Pio et al., 2014). Было показано, что в злокачественных опухолях активируются все три пути комплемента (Macor, Capolla and Tedesco, 2018). Белки комплемента, продукты

деградации C3 и продукты активации комплемента (т.е. C5a, C3a и C5b-9) были обнаружены при нескольких типах рака (Afshar-Kharghan, 2017). Помимо компонентов комплемента, CRP также были обнаружены при раке. Фактически, mCRP и sCRP сверхэкспрессируются на опухолевых клетках разных типов рака (Meyer, Leusen and Boross, 2014). Таким образом, система комплемента является механизмом хозяина против рака, и раковые клетки могут противостоять атаке комплемента за счет сверхэкспрессии CRP.

Для центральной роли комплемента во многих физиологических процессах требуется, чтобы активация комплемента строго регулировалась. Однако было показано, что патогены (P.F. Zipfel и C. Skerka, 2009) и раковые клетки (A. Geller and J. Yan, *Front. Immunol.*, 10:1, 2019) используют стратегии уклонения для блокирования активности комплемента, включая экспрессию негативных регуляторных белков комплемента. Таким образом, существует потребность в терапии, которая усиливает активность комплемента против патогенов или дисфункциональных собственных клеток (например, раковых клеток или аутоиммунных клеток), например, посредством нацеливания активации комплемента на патогены или дисфункциональные клетки или на ткани, где патогены или дисфункциональные клетки присутствуют.

### **Сущность изобретения**

Это краткое изложение предоставлено для того, чтобы в упрощенной форме представить ряд концепций, которые дополнительно описаны ниже в разделе «Подробное описание изобретения». Настоящее краткое изложение не предназначено для определения ключевых признаков заявленного предмета изобретения и не предназначено для использования в качестве вспомогательного средства при определении объема заявленного предмета изобретения.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к нацеленным комплемент-активирующим молекулам, содержащим нацеливающий или мишень-связывающий домен и эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен получен из антитела. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, является каталитически активным, тогда как в других вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, находится в зимогенной форме. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся в клетке, таким как CD20, CD38 или CD52. В других вариантах осуществления мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на микробном патогене, таком как бактериальный патоген, вирусный патоген, грибковый патоген или паразитарный патоген.

В некоторых вариантах осуществления нацеленные комплемент-активирующие молекулы содержат слитый белок, содержащий N-конец эффекторного серинового

протеазного домена, слитый с С-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента или с С-концом легкой цепи антитела или его фрагмента. В других вариантах осуществления слитый белок содержит С-конец эффекторного серинового протеазного домена, слитый с N-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента или с N-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента. В некоторых вариантах осуществления нацеленные комплемент-активирующие молекулы содержат такой слитый белок и вторую цепь антитела, которая представляет собой легкую цепь или ее фрагмент, если слитый белок содержит тяжелую цепь или ее фрагмент, и которая представляет собой тяжелую цепь или ее фрагмент, если слитый белок содержит легкую цепь или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленные комплемент-активирующие молекулы содержат слитый белок, содержащий N-конец эффекторного серинового протеазного домена, слитый с С-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента, или слитый белок, содержащий С-конец эффекторного серинового протеазного домена, слитый с N-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор комплемента D или его фрагмент, C1r или его фрагмент, C1s или его фрагмент, MASP-2 или его фрагмент, MASP-3 или его фрагмент, MASP-1 или его фрагмент, C2a или его фрагмент, или Bb или его фрагмент.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим нацеленные комплемент-активирующие молекулы или их части, а также к клонирующим векторам или экспрессионным кассетам, содержащим такие полинуклеотиды.

Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, экспрессирующим нацеленные комплемент-активирующие молекулы, и к способам получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, включающим культивирование клеток-хозяев в условиях, позволяющих экспрессировать молекулы, и выделение молекул.

Настоящее изобретение также относится к способам активации по меньшей мере одного пути комплемента у млекопитающего с использованием нацеленных комплемент-активирующих молекул. В некоторых вариантах осуществления нацеленные комплемент-активирующие молекулы можно использовать для индукции комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), комплемент-зависимой клеточной цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) в отношении клетки-мишени. В некоторых вариантах осуществления нацеленные комплемент-активирующие молекулы можно использовать для лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции, такой как бактериальная инфекция, вирусная инфекция, грибковая инфекция или паразитарная инвазия.

### **Краткое описание фигур**

Вышеизложенные аспекты и многие из сопутствующих преимуществ этого изобретения можно лучше оценить или можно лучше понять при обращении к следующему подробному описанию в сочетании с прилагаемыми фигурами, где:

На фиг. 1 представлена диаграмма, иллюстрирующая классический, лектиновый и альтернативный пути комплемента.

На фиг. 2 графически показаны поверхностные уровни CD20, CD55 и CD59 на CD20+ линиях опухолевых клеток Ramos, Kasumi-2 и SU-DHL-8. Клетки окрашивали первичным антителом, нацеленным на CD20 (RTX), CD55 (CBL511, Millipore) и CD59 (MAB1759, Millipore), и вторичным антителом, античеловеческое Fc IgG Ab, конъюгированное с флуорофором (Biolegend). Контроли показаны светло-серыми линиями. Уровни экспрессии показаны темно-серыми линиями. Флуоресценцию измеряли с использованием FACS.

На фиг. 3 представлена схема, иллюстрирующая некоторые форматы нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных здесь. Такие молекулы могут содержать нацеливающий домен, полученный из антитела, и эффекторный сериновый протеазный домен, слитый либо с тяжелой цепью, либо с легкой цепью антитела. Показано немодифицированное антитело (крайнее слева) и нацеленные комплемент-активирующие молекулы, содержащие эффекторный сериновый протеазный домен, слитый с: С-концом тяжелой цепи (второй слева), N-концом тяжелой цепи (в центре), С-концом легкой цепи (второй справа) или N-концом легкой цепи (крайний справа).

На фиг. 4 приведены результаты SDS-PAGE анализа некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из MASP-1, MASP-2 или MASP-3, как описано в настоящем изобретении. Полиакриламидный гель с градиентом концентрации 4-12% (гель NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) использовали для разделения субъединиц каждого слитого белка, и размеры полипептидов определяли с использованием маркера молекулярной массы (SeeBlue Plus 2, Invitrogen). Сокращения для различных анализируемых молекул представлены в таблице 1. В качестве контроля использовали ритуксимаб (RTX).

На фиг. 5 приведены результаты SDS-PAGE анализа некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из C1r, C1s, C2a, Bb или фактора комплемента D (CFD), как описано в настоящем изобретении. Полиакриламидный гель с градиентом концентрации 4-12% (гель NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) использовали для разделения субъединиц каждого слитого белка, и размеры полипептидов определяли с использованием маркера молекулярной массы (SeeBlue Plus 2, Invitrogen). Сокращения для различных анализируемых молекул представлены в таблице 1. Ритуксимаб (RTX) использовали в качестве контроля.

На фиг. 6 показан SDS-PAGE анализ активации некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из MASP-3, как описано в настоящем изобретении. Зимоген RTX(H)<sup>AK</sup>-M3 (2 мкМ) разводили в 10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,1 mM буфере ЭДТА и инкубировали при 37°C один (отрицательный контроль) или с добавлением MASP-2(CSP1/2SP) (91 нМ) в течение различных временных точек (0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150 и 190 мин). Образцы извлекали на каждой временной точке и помещали при -



20°C для остановки реакции. SDS-PAGE анализ в восстанавливающих условиях проводили для подтверждения расщепления слитого белка MASP-3. Показаны полосы, соответствующие зимогену и активной форме RTX-MASP-3.

На фиг. 7 показан SDS-PAGE анализ потенциальных устойчивых к деградации вариантов некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, как описано в настоящем изобретении. Полиакриламидный гель с градиентом концентрации 4-12% (гель NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) использовали для разделения субъединиц каждого слитого белка, и размеры полипептидов определяли с использованием маркера молекулярной массы (SeeBlue Plus 2, Invitrogen). Сокращения для различных анализируемых молекул представлены в таблице 1. Ритуксимаб (RTX) использовали в качестве контроля.

На фиг. 8 показан SDS-PAGE анализ дополнительных потенциальных устойчивых к деградации вариантов некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из C1g или C1s, как описано в настоящем изобретении. Полиакриламидный гель с градиентом концентрации 4-12% (гель NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen) использовали для разделения субъединиц каждого слитого белка, и размеры полипептидов оценивали с использованием маркера молекулярной массы (SeeBlue Plus 2, Invitrogen). Сокращения для различных анализируемых молекул представлены в таблице 1. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы, показанные на дорожках 6 и 8 (RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>D456W</sup> и RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>P458W</sup> соответственно), инкубировали с C1g в течение 1 или 3 ч для превращения эффекторного серинового протеазного домена в активную форму с последующим SDS-PAGE анализом для подтверждения деградации (правая панель).

На фиг. 9 показано связывание некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных здесь, с клетками-мишенями. Клетки Ramos линии В-клеток (ATCC) ( $0,5 \times 10^6$  клеток) окрашивали ритуксимабом или одной из двенадцати нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих нацеливающий домен, полученный из ритуксимаба в качестве первичного антитела. В качестве вторичного антитела использовали античеловеческое Fc IgG антитело, конъюгированное с флуорофором (BioLegend). Неокрашенные клетки и клетки, окрашенные только вторичными антителами, включали в качестве контроля. Флуоресценцию измеряли с использованием FACS. Контроли показаны светло-серыми линиями. Связывание ритуксимаба показано темно-серыми линиями. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул показано сплошной темно-серой областью.

На фиг. 10 показана кинетика связывания с CD20 для некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных здесь, измеренная с использованием биослойной интерферометрии (BLI). Анализ связывания проводили с помощью биосенсоров АНС. Загружали 69 нМ нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, разведенной в кинетическом буфере (PBS, 0,02% Твина 20, 1% BSA, 0,05% DDM, 0,01% CHS) (фаза загрузки), и добавляли двумя-тремя порциями антиген CD20, разведенный в кинетическом буфере, начиная с 0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 и 200 нМ (фаза

ассоциации). Анализ проводили с использованием системы Octet RED96 (ForteBio Inc.) и анализировали с помощью программного обеспечения Octet CFR (ForteBio Inc.). Шумовые и плавные линии отличают измеренные данные от глобальной подгонки. Для сравнения приведены данные по анти-CD20 антителам, ритуксимабу (RTX) и обинутузумабу (OBZ).

На фиг. 11A и 11B приведены результаты анализа активности сериновой протеазы для некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных здесь. Субстрат C4 (фиг. 11A) или C3 (фиг. 11B) разводили в PBS (1×), pH 7,4, и инкубировали при 37°C один («без») или с добавлением указанных нацеленных комплемент-активирующих молекул при соотношении фермента/ субстрата 1:20. Образцы извлекали через 3 ч для остановки реакции. SDS-PAGE анализ в восстанавливающих условиях проводили для подтверждения расщепления C4 или C3. Продукты расщепления C4b и C3b указаны стрелкой.

На фиг. 12A и 12B приведены результаты анализа отложения C4 для некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных здесь. Планшеты для ELISA покрывали 100 мкл маннана (50 мкг/мл) и либо 215 нМ (фиг. 12A), либо 69 нМ (фиг. 12B) ритуксимаба или указанной нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, суспендированной в покровном буфере. Планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. Оставшиеся сайты связывания белка затем блокировали добавлением 250 мкл 1% BSA в буфере PBS в каждую лунку и инкубацией в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Твина 20. Гирудиновую плазму от мышей с нокаутом MASP-2 (КО) (левая панель на фиг. 12A) или мышей дикого типа (WT) (правая панель на фиг. 12A) разводили PBS (без кальция и магния) для получения конечной концентрации 10%. Нормальную человеческую сыворотку (NHS) (фиг. 12B) разводили PBS (без кальция и магния) до конечной концентрации 1%. Планшеты инкубировали с плазмой в течение 15 мин при 4°C. Антитело к C4 (0,2 мкг/мл), разведенное в промывочном буфере, добавляли в планшеты и инкубировали 30 мин при 37°C и 200 об/мин. Вторичные антитела (0,043 мкг/мл), разведенные в промывочном буфере, добавляли в планшеты и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Поглощение при 450 нм измеряли после добавления колориметрического субстрата ТМВ.

На фиг. 13 приведены результаты анализа отложения C3 для некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных здесь. Планшеты для постановки ELISA покрывали 215 нМ ритуксимаба или указанной нацеленной на комплемент-активирующей молекулой, суспендированной в покровном буфере. Планшеты инкубировали при 4°C в течение ночи. Оставшиеся сайты связывания белка затем блокировали добавлением 250 мкл 1% BSA в буфере PBS в каждую лунку и инкубацией в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Твина 20. Гирудиновую плазму от мышей с нокаутом MASP-1/3 (КО) (левая панель) или мышей дикого типа (WT) (вторая панель слева) разводили буфером MgEGTA (10 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM барбитала, 145 mM NaCl [pH 7,4]) до получения конечной концентрации 10%. Нормальную человеческую сыворотку (NHS)

разводили MgEGTA до конечной концентрации 3% (третья панель слева) или 10% (правая панель). Планшеты инкубировали с плазмой в течение 20 мин (мышинная плазма и 3% NHS) или 25 мин (10% NHS) при 37°C. Антитело к C3 (2,4 мкг/мл), разведенное в промывочном буфере, добавляли в планшеты и инкубировали 30 мин при 37°C и 200 об/мин. Вторичные антитела (0,043 мкг/мл), разведенные в промывочном буфере, добавляли в планшеты и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Поглощение при 450 нм измеряли после добавления колориметрического субстрата ТМВ.

На фиг. 14А и 14В показана детекция факторов комплемента C3b (фиг. 14А) или MAC (фиг. 14В), находящихся на клетках-мишенях Kasumi-2 после обработки некоторыми нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, описанными здесь. Ритуксимаб или указанную нацеленную на комплемент-активирующую молекулу разводили в буфере для анализа до концентрации 12,5 нМ. Нормальную человеческую сыворотку (NHS) разводили буфером для анализа до конечной концентрации 15%. Клетки Kasumi-2 ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 300000 клеток/мл и переносили в 6-луночный аналитический планшет. Разбавленные белки и NHS добавляли в лунки. Планшеты инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. Затем клетки ресуспендировали в буфере для FACS, блокировали для предотвращения неспецифического связывания и окрашивали первичными антителами (кроличьи антитела против C3c человека или моноклональные мышинные антитела против C5b-9 человека). После 20-мин инкубации на льду клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело (APC-конъюгированный антикроличий IgG или PE-конъюгированный антимышиный IgG). Клетки инкубировали еще в течение 20 мин на льду, затем трижды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы окрашенных клеток анализировали с использованием FACS (FACSCalibur).

На фиг. 15 показана детекция CD52 или CD38 с использованием анти-CD52 или анти-CD38 антител или некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных в настоящем изобретении (колонки, обозначенные «CD52» и «CD38»), и детекция фактора комплемента C3b, находящегося на клетках-мишенях НТ после обработки некоторыми нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, описанными здесь (колонки, обозначенные «C3b»). Для детекции CD52 или CD38 приблизительно 500000 клеток НТ линии В-клеточной лимфомы человека (ATCC) собирали и ресуспендировали в буфере для FACS. Для предупреждения неспецифического связывания 5 мкл блокирующего раствора добавляли к 100 мкл клеточной суспензии, которую затем инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Антитела алемтузумаб (нацеленное на CD52) и даратумумаб (нацеленное на CD38) или указанные нацеленные комплемент-активирующие молекулы добавляли к клеточной суспензии и инкубировали 20 мин на льду. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело (Alexa Fluor 647-конъюгированный мышинный античеловеческий IgG1). Клетки инкубировали на льду в течение 20 мин, затем трижды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS.

Образцы окрашенных клеток анализировали с использованием FACS (FACSCalibur). Для детекции C3b алемтузумаб, даратумумаб или указанную нацеленную на комплемент-активирующую молекулу разводили буфером для анализа до концентрации 12,5 нМ. Нормальную человеческую сыворотку (NHS) разводили буфером для анализа до конечной концентрации 15%. НТ-клетки ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 300000 клеток/мл и переносили на 6-луночный аналитический планшет. Разбавленные белки и NHS добавляли в лунки. Планшеты инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. Затем клетки ресуспендировали в буфере для FACS, блокировали для предупреждения неспецифического связывания и окрашивали первичным антителом (кроличье антитело к C3c человека). После 20-мин инкубации на льду клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело (APC-конъюгированный антикроличий IgG). Клетки инкубировали еще 20 мин на льду, затем трижды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы окрашенных клеток анализировали с использованием FACS (FACSCalibur).

На фиг. 16 приведены результаты анализа комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) с использованием ритуксимаба или некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных в настоящем изобретении. Клетки Ramos (ATCC) ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 10000 клеток на лунку и переносили в 96-луночный планшет. В каждую лунку добавляли 15% NHS и 12,5 нМ ритуксимаба или указанной нацеленной на комплемент-активирующей молекулы. Были включены контроли без антитела или нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, и также без клеток. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°C, после чего добавляли CytoTox-Glo (Promega). После еще 15 мин инкубации при комнатной температуре измеряли люминесценцию с помощью планшетного ридера Luminoskan.

На фиг. 17 приведены результаты анализа комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) с использованием ритуксимаба или некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, как здесь описано. Клетки Ramos (ATCC) ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 10000 клеток на лунку и переносили в 96-луночный планшет. В каждую лунку добавляли 15% NHS и 12,5 нМ ритуксимаба или указанной нацеленной на комплемент-активирующей молекулы (левая панель), или концентрацию ритуксимаба или нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, показанную на оси x (правая панель). Включали контроли без антитела или нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, и также без клеток. Планшеты инкубировали в течение 2 ч при 37°C, после чего добавляли CytoTox-Glo (Promega). После еще 15 мин инкубации при комнатной температуре измеряли люминесценцию с помощью планшетного ридера Luminoskan.

На фиг. 18 приведены результаты анализа комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) с использованием ритуксимаба или некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, как описано в настоящем изобретении. Клетки Ramos (ATCC) ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 10000 клеток на лунку и

переносили в 96-луночный планшет. В каждую лунку добавляли 15% NHS и 37,5 нМ ритуксимаба или указанной нацеленной на комплемент-активирующей молекулы. Включали контроли без антитела или нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, и также без клеток. Планшеты инкубировали 2 ч (левая панель) или 3 ч (правая панель) при 37°C, после чего добавляли CytoTox-Glo (Promega). После еще 15 мин инкубации при комнатной температуре измеряли люминесценцию с помощью планшетного ридера Luminoskan.

На фиг. 19А и 19В приведены результаты анализа комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) с использованием ритуксимаба или некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, как описано в настоящем изобретении. Три различных концентрации ритуксимаба или указанной нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, готовили в буфере для анализа (среда для культивирования клеток Opti-MEM): 112,5 нМ, 37,5 нМ и 12,5 нМ. Нормальную человеческую сыворотку (NHS) разводили буфером для анализа до конечной концентрации 10%. Клетки Ramos промывали PBS, ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 150000 клеток на лунку и переносили в 96-луночный аналитический планшет. В лунки добавляли разбавленные белки и человеческую сыворотку. Планшеты инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. Добавляли йодид пропидия (5 мкл) и окрашенные клетки сразу же анализировали с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur). Клетки, обработанные только NHS, и неокрашенные клетки включали в качестве контроля. Пунктирные линии показывают контроли только для NHS, сплошные линии показывают концентрации 12,5 нМ, светло-серые площади показывают концентрации 37,5 нМ, и темно-серые площади показывают концентрации 112,5 нМ. На фиг. 19А приведены результаты анализа с использованием ритуксимаба (левая панель) или MatCFD-RTX (правая панель) в нескольких различных концентрациях. На фиг. 19В показано сравнение результатов анализов с использованием ритуксимаба или MATCFD-RTX при 112,5 нМ.

На фиг. 20 приведены результаты анализа комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) с использованием ритуксимаба или некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, в присутствии антител против одного или обоих регуляторных белков комплемента (CRP) CD55 (клон BRIC 216, Sigma-Aldrich) и CD59 (клон BRIC 229, IBGRL). Тестировали моноклональные антитела ритуксимаб (RTX) и модифицированный вариант ритуксимаба (RTXN297G), а также нацеленные комплемент-активирующие молекулы, включающие зрелый фактор D (MatCFD) и либо RTX, либо RTX<sup>N297G</sup>. Антитела RTX, антитела RTX<sup>N297G</sup> или нацеленные комплемент-активирующие молекулы готовили в буфере для анализа (среда RPMI 1640[-]L-глутамин, 5% FBS (инактивированной нагреванием), 100× GlutaMax и 25 мМ HEPES) до конечной концентрации 337,5 нМ. Анти-CD55 антитело готовили с использованием буфера для анализа до конечной концентрации 10 мкг/мл. Анти-CD59 антитело готовили с использованием буфера для анализа до конечной концентрации 2 мкг/мл. Нормальную

человеческую сыворотку (NHS) разводили буфером для анализа до конечной концентрации 15%. Клетки Ramos ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 300000 клеток на лунку и переносили в 96-луночный аналитический планшет. Разбавленные белки и NHS добавляли в лунки. Планшеты инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. Добавляли йодид пропидия (5 мкл, Invitrogen) и сразу же анализировали окрашенные клетки с использованием проточной цитометрии (FACSCalibur). Клетки, обработанные NHS и антителами RTX, антителами RTX<sup>N297G</sup> или нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, но без добавления анти-CD55 или анти-CD59 (без ингибирования), были включены в качестве контроля.

На фиг. 21 показано связывание трех различных мышинных моноклональных антител с белком, связывающим фактор H (fHbP) *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*). На левой панели показано связывание каждого из трех антител с рекомбинантным fHbP на поверхности планшета для ELISA. На правой панели показано связывание каждого из трех антител к *N. meningitidis* на поверхности планшета для ELISA.

На фиг. 22 показано связывание мышинных-человеческих химерных вариантов трех мышинных моноклональных антител к *N. meningitidis* на поверхности планшета для ELISA.

На фиг. 23 показано связывание некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных здесь, с *N. meningitidis* на поверхности планшета для ELISA. Тестируемыми нацеленными на комплемент-активирующими молекулами были клон 19-C1r, который содержит связывающий домен, полученный из химерного мышинового моноклонального антитела к fHbP *N. meningitidis*, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из C1r, и клон 19-C1s, который содержит связывающий домен из химерного мышинового моноклонального антитела к *N. meningitidis* fHbP, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из C1s. Для сравнения показано связывание химерного антитела, клон 19.

На фиг. 24 приведены результаты определения титра антител к *N. meningitidis* серотипа B (MC58) в различных сыворотках человека. Планшеты для ELISA покрывали *N. meningitidis* и инкубировали с различными разведениями сыворотки из двенадцати различных сывороток человека. Антитела к *N. meningitidis* детектировали с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP)-античеловеческого IgG антитела.

На фиг. 25 показана детекция фактора комплемента C5b-9 (также называемого MAC), находящегося на клетках *N. meningitidis* после обработки некоторыми нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, описанными здесь. Смесь, содержащая 10 мкг/мл нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, в 5% нормальной сыворотке человека (NHS), ранее идентифицированной как имеющая низкий титр антител к *Neisseria*, инкубировали в течение времени, указанного на оси x. В качестве контролей использовали только NHS или анти-fHbP антитело, клон 19. Детекцию проводили с использованием моноклонального антитела к MAC.

На фиг. 26А и 26В приведены результаты анализа бактерицидной активности сыворотки в отношении *N. meningitidis* с использованием образцов сыворотки от четырех разных субъектов. Бактерии инкубировали с одним буфером (BBS) или с одной 2,5% нормальной человеческой сывороткой (NHS) или в присутствии 10 мкг/мл анти-fHbp антитела, клон 19, или нацеленных комплемент-активирующих молекул, клон 19-C1r или клон 19-C1s. Образцы отбирали на заранее определенные временные точки и помещали на чашки с кровавым агаром на ночь при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Бактерицидную активность сыворотки рассчитывали измерением снижения количества извлеченных жизнеспособных бактерий по сравнению с исходным количеством бактерий на нулевую временную точку и с сывороткой, инактивированной нагреванием. Результаты представлены в виде колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. В каждом ряду показаны результаты для разных образцов сыворотки. Для каждого образца сыворотки на левом графике показаны результаты через 30 мин, и на правом графике показаны результаты через 60 мин.

На фиг. 27А-27С приведены результаты анализа отложения компонентов комплемента с использованием сыворотки четырех разных субъектов. Отложение компонентов комплемента анализировали аналогично тому, как описано для фиг. 26А и 26В, но с различными концентрациями в сыворотке. На фиг. 27А показано отложение C3b, на фиг. 27В показано отложение C4b, и на фиг. 27С показано отложение C5b.

На фиг. 28 приведены результаты анализа отложения C3b комплемента с использованием анти-fHbp антитела, клон 19, и нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих химерное антитело, клон 19, и одно из C1r, C1s, MASP-2, MASP-3 и фактора D. Полистироловый микротитрационный планшет для постановки ELISA Maxisorp покрывали антигеном MC58 *N. meningitidis* в течение ночи при 4°C. На следующие сутки оставшиеся сайты связывания блокировали с использованием 5% обезжиренного молока. Сыворотку мышей дикого типа (5%) с 150 нМ антитела клона 19, нацеленной на комплемент-активирующей молекулы или антитела контрольного изотипа добавляли в планшет на разные временные точки при комнатной температуре. После инкубации планшет для ELISA промывали и определяли отложение комплемента C3b с использованием кроличьих анти-C3b, и затем HRP-конъюгированных козьих антикроличьих антител.

На фиг. 29 приведены результаты анализа связывания моноклональных антител к антигену PspA *Streptococcus pneumoniae* с *S. pneumoniae*. Тестировали анти-PspA антитела 5C6.1 и RX1M005. Штамм *S. pneumoniae* D39 инкубировали либо с 5C6.1, либо с RX1M005 в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали и инкубировали с Alexa Fluor-конъюгированным козьим античеловеческим IgG в течение 30 мин. Связывание измеряли с использованием анализа FACS.

На фиг. 30 приведены результаты анализа связывания химерного анти-PspA антитела RX1M005 и нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих RX1M005 и либо C1r, либо C1s, с *S. pneumoniae*. Планшет для постановки ELISA покрывали штаммом *S. pneumoniae* D39 в покровном буфере и блокировали 5%

обезжиренным молоком. Серийные разведения антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул добавляли в планшет и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали. Связанные антитела и нацеленные комплемент-активирующие молекулы детектировали с использованием HRP-конъюгированного античеловеческого IgG. Антитело несвязанного изотипа включали в качестве контроля.

На фиг. 31 приведены результаты анализа отложения компонента C3b комплемента с использованием анти-PspA антитела RX1M005, нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих RX1M005 и либо C1r, либо C1s, а также антитела контрольного изотипа. Бактерии *S. pneumoniae* дважды промывали буфером TBS и ресуспендировали в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до конечной концентрации 10<sup>6</sup> КОЕ в 100 мл. Бактериальную суспензию (100 мкл) опсонизировали 1% (об./об.) NHS в течение 15 мин при комнатной температуре антителом или нацеленными на комплемент-активирующими молекулы. Неопсонизированные бактерии служили отрицательным контролем. После опсонизации бактериальные образцы дважды промывали буфером TBS и связанный C3b детектировали с использованием FITC-конъюгированных кроличьих антител к C3c человека (Dako). Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием клеточного анализатора FACSCalibur (BD Biosciences).

На фиг. 32 приведены результаты анализа связывания антитела и нацеленной на комплемент-активирующей молекулы с *Candida albicans*. Антитело 1A2, которое связывается с грибковым манновым эпитопом, находящимся на *C. albicans*, использовали вместе с нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, содержащей антитело 1A2 и C1r. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. Планшет для ELISA покрывали *C. albicans* в покровном буфере и блокировали 5% обезжиренным молоком. Серийные разведения антитела 1A2 и нацеленной на комплемент-активирующей молекулы добавляли в планшет и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали. Связанные антитела детектировали с использованием HRP-конъюгированного античеловеческого IgG.

На фиг. 33 приведены результаты анализа связывания антитела и нацеленной на комплемент-активирующей молекулы с *Candida albicans*. Грибковые клетки инкубировали с антителом 1A2 или нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, содержащей антитело 1A2 и C1r, в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали и инкубировали с Alexa Fluor-конъюгированным козьим античеловеческим IgG в течение 30 мин. Связывание измеряли с использованием анализа FACS. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа.

На фиг. 34 приведены результаты анализа по измерению отложения C3b, инициированного некоторыми антителами и нацеленными на комплемент-активирующими молекулами на поверхности *C. albicans*. На левой панели показана оценка титра антител к *C. albicans* в различных сыворотках человека. Планшеты для



ELISA покрывали *C. albicans* и инкубировали с сыворотками пяти разных субъектов. Антитела к *C. albicans* детектировали с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) античеловеческого IgG антитела. Сыворотку, имеющую самый низкий измеренный титр антител *C. albicans*, обозначенную как «GC», использовали в анализе отложения C3b, результаты которого показаны на правой панели. Для анализа отложения C3b полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали фиксированными в формалине *C. albicans* в карбонатном буфере (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в буфере TBS (10 мМ Трис-HCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4) в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20 и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. 1% сыворотку NHS «GC», содержащую 150 нМ антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разведенных в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4), добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20 и 25 мин при комнатной температуре, затем промывали. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего анти-C3c антитела (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG. Через 1 ч лунки промывали, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 35 приведены результаты анализа по измерению связывания 11 различных анти-Fnbp антител с *Staphylococcus aureus*. Антитела получали введением мышам фибронектин-связывающего белка-антигена *S. aureus* (Fnbp). Образовывались гибридомы, и отбирали образцы супернатанта для скрининга с использованием ELISA, в результате которого были идентифицированы 11 антител-кандидатов. Планшет для ELISA покрывали *S. aureus*, и оставшиеся сайты связывания блокировали с использованием 5% обезжиренного молока. Fc-рецепторы *S. aureus* блокировали Fc-блокирующим агентом. Серийные концентрации очищенных моноклональных антител инкубировали с планшетами для ELISA в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание антител детектировали с использованием HRP-конъюгированных кроличьих антимышиных антител. Клон G был идентифицирован как демонстрирующий лучшее связывание с *S. aureus*.

На фиг. 36 приведены результаты анализа по измерению связывания анти-FnbpV антитела, клон G, со штаммом *S. aureus* MSSA. Бактерии *S. aureus* MSSA дважды промывали буфером TBS и ресуспендировали в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до конечной концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Fc-рецепторы *S. aureus* блокировали Fc-блокирующим агентом. Бактериальную суспензию (100 мкл) инкубировали с 150 нМ мышинового моноспецифического антитела в течение 30 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали бактерии, опсонизированные антителом контрольного изотипа. После инкубации образцы

бактерий дважды промывали буфером TBS, и связанные антитела детектировали с использованием FITC-конъюгированного кроличьего антимышиного IgG. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием клеточного анализатора FACSCalibur (BD Biosciences).

На фиг. 37 приведены результаты анализа по измерению связывания анти-Fnbp антитела, клон G, с тремя различными изолятами *S. aureus* MRSA. Бактерии *S. aureus* MRSA каждого из трех различных изолятов дважды промывали буфером TBS и ресуспендировали в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до конечной концентрации 10<sup>7</sup> КОЕ/мл. Fc-рецепторы *S. aureus* блокировали Fc-блокирующим агентом. Бактериальную суспензию (100 мкл) инкубировали с 150 нМ антител в течение 30 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали бактерии, опсонизированные антителом контрольного изотипа. После инкубации образцы бактерий дважды промывали буфером TBS, и связанные антитела детектировали с использованием FITC-конъюгированного кроличьего антимышиного IgG. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием клеточного анализатора FACSCalibur (BD Biosciences).

На фиг. 38A и 38B приведены результаты анализа по измерению связывания антитела и нацеленных комплемент-активирующих молекул, с *S. aureus*. Химерное моноклональное анти-FnbpV антитело, клон G, тестировали вместе с нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, содержащими клон G и C1r или C1s. Планшеты для ELISA покрывали либо рекомбинантным FnbpV (фиг. 38A), либо *S. aureus* (штамм MRSA) (фиг. 38B), затем оставшиеся сайты связывания блокировали с использованием 5% обезжиренного молока. Fc-рецепторы *S. aureus* блокировали Fc-блокирующим агентом. Серийные концентрации очищенного моноклонального антитела, клон G, и нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих клон G и C1r или C1s, инкубировали с планшетами для ELISA в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул, детектировали с использованием HRP-конъюгированных кроличьих античеловеческих IgG антител. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы показали хорошее связывание как с рекомбинантным FnbpV (фиг. 38A), так и с *S. aureus* (штамм MRSA) (фиг. 38B).

На фиг. 39 приведены результаты анализа связывания некоторых антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул, с антигеном *Plasmodium falciparum*. Используемый антиген представляет собой гомолог 5 ретикулоцит-связывающего белка *P. falciparum* (PfRH5). Тестировали анти-PfRH5 антитела R5.004 и R5.016, и также нацеленные комплемент-активирующие молекулы, включающие R5.004 и C1r, R5.004 и C1s, R5.016 и C1r или R5.016 и C1s. В качестве отрицательного контроля использовали моноклональное антитело ритуксимаб. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 50 мкл на лунку клеточного супернатанта из клеток, трансфектированных PfRH5. На следующие сутки лунки блокировали 1% BSA в PBS (1×) в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20.

Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере, содержащем 0,1% BSA в PBS (1×) с максимальной концентрацией 13,9 нМ. Образцы по 100 мкл каждый переносили на планшет для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и в планшет добавляли 100 мкл детектирующего HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG антитела с последующей 30-мин инкубацией при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 40 приведены результаты анализа по измерению отложения C3b комплемента, иницированного некоторыми антителами и комплемент нацеленными-активирующими молекулами, на поверхности лунок, покрытых PфRH5. Тестировали анти-PфRH5 антитела R5.004 и R5.016, и также нацеленные комплемент-активирующие молекулы, содержащие R5.004 и C1r, R5.004 и C1s, R5.016 и C1r, или R5.016 и C1s. В качестве отрицательного контроля использовали моноклональное антитело ритуксимаб. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 50 мкл на лунку клеточного супернатанта из клеток, трансфектированных PфRH5. На следующие сутки лунки блокировали 1% BSA в PBS (1X) в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Нормальную человеческую сыворотку (NHS), содержащую 13,9 нМ антитела или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разводили в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 3% и добавляли в лунки. Планшет инкубировали в течение 5, 10, 15, 20 или 25 мин при комнатной температуре, затем трижды промывали. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c антитела (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 41 показана бактериальная нагрузка в образцах крови мышей, инфицированных *Neisseria meningitidis*. В данном исследовании использовали 12-недельных самок мышей дикого типа C57BL/6 (питомник Charles River). Мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили декстран железа (400 мг/кг; Sigma-Aldrich) за 12 ч до заражения. На следующие сутки мышам в/б вводили 100 мкл суспензии пассажированных *N. meningitidis* B-MC58, содержащей 5×10<sup>6</sup> КОЕ в PBS, и декстран железа (400 мг/кг). Моноклональное антитело, клон 19, или нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, содержащую клон 19 и C1r или C1, вводили в/б за 18 ч до заражения. Мыши, которым вводили антитело контрольного изотипа, служили контролем. Дозу инокулята подтверждали подсчетом жизнеспособных клеток после посева на 5%-ном кровяном агаре

(об./об.). Образцы крови получали на заранее определенные временные точки, и количество жизнеспособных клеток рассчитывали после серийного разведения в PBS и посева на чашки с кровавым агаром. У мышей, получавших нацеленные комплемент-активирующие молекулы, содержащие клон 19 и C1r, наблюдали достоверно более низкую бактериальную нагрузку в крови по сравнению с мышами, получившими антитело, клон 19. Результаты представляют собой средние значения  $\pm$ SEM. \* $P < 0,05$  и \*\* $P < 0,01$  с использованием критерия Стьюдента.

На фиг. 42 показано время выживаемости мышей, обработанных антителом, клон 19, нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, содержащими клон 19 и C1r или C1s, и антителом, контрольного изотипа, до заражения *N. meningitidis*. Мышей обрабатывали и заражали, как показано на фиг. 43. За мышами проводили наблюдение в отношении прогрессирования клинических признаков и подвергали эвтаназии, когда они находились в агональном состоянии. Достоверно более высокую выживаемость наблюдали у мышей, получавших нацеленные комплемент-активирующие молекулы, содержащие клон 19 и C1r, по сравнению с мышами, получавшими антитело клон 19. Лог-ранговый тест Мантеля-Кокса;  $n=12$  мышей/группу; \* $P < 0,05$ .

На фиг. 43 приведены результаты анализа по измерению связывания антител и некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, с гликопротеином оболочки GP120 ВИЧ-1. Использовали антитело PGT121 вместе с нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, содержащими PGT121 и C1r или C1s. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного GP120 в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере TBS, начиная с 15 мкг/мл. Образцы объемом 100 мкл переносили на планшеты для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и добавляли 100 мкл детектирующего HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG антитела и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2 М  $H_2SO_4$  и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 44 приведены результаты анализа по измерению отложения C3b, инициированного антителом PGT121 и нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, содержащими PGT121 и C1r или C1s, на поверхности лунок ELISA, покрытых GP120. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного GP120 в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об) Твина 20. NHS, содержащую 7,5 мкг антител

или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разводили в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 2,5%, добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 25 мин при комнатной температуре, затем промывали три раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку при комнатной температуре добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific). Реакцию останавливали добавлением 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 45 приведены результаты анализа по измерению связывания анти-FnbpV антитела, клон G, и нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих клон G и C1r или C1s, с покрытыми FnbpV планшетами для ELISA. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного *S. aureus* FnbpV в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об/об) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул, готовили в буфере TBS, начиная с 15 мкг/мл. Образцы объемом 100 мкл переносили в планшеты для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и добавляли 100 мкл детектирующего HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG антитела, с последующей 30-мин инкубацией при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 46 приведены результаты анализа по измерению отложения C3b, инициированного анти-FnbpV антителом, клон G, и нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, содержащими клон G и C1r или C1s, на поверхности лунок ELISA, покрытых FnbpV. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного FnbpV в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. NHS, содержащую 7,5 мкг антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разводили в BBS++ буфере (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 2,5%, добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20 и 25 и 25 мин при комнатной температуре, затем промывали три раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку при комнатной температуре добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific). Реакцию останавливали

добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 47 приведены результаты анализа измерения связывания антитела к S-белка, бeбтeлoвимабa, и нaцeлeннoх кoмплeмeнт-aктивирoвaннoх мoлeкул, сoдeржaщиx бeбтeлoвимаб и C1г или C1, с S-бeлкoм SARS-CoV-2. Пoлистирoлoвe микрoтитрaциoннe плaншeтe для ELISA Maxisorp пoкрывaли 2 мкг/мл рeкoмбинaнтнoгo S-бeлкa SARS-CoV-2 в пoкрoвнoм бoфeрe. Нa слeдующиe сутки лунки блoкирoвaли 5% oбeзжирeннoм мoлoкoм в PBS в тeчeниe 2 ч, зaтeм прoмывaли бoфeрoм TBS, сoдeржaщим 0,05% (oб./oб.) Твинa 20. Двукрaтнe сeрийнe рaзвeдeния aнтитeл или нaцeлeннoх кoмплeмeнт-aктивирoвaннoх мoлeкул гoтoвили в бoфeрe TBS, нaчинaя с 15 мкг/мл. 100 мкл oбрaзцoв пeрeнoсили в плaншeт для ELISA и инкубирoвaли при кoмнaтнoй тeмпeрaтурe. Чeрeз 1 ч плaншeт прoмывaли и дoбaвляли 100 мкл дeтeктирoвaннoгo кoзьeгo aнтичeлoвeчeскoгo HRP aнтитeлa с пoслeдующeй 30-мин инкубaциeй при кoмнaтнoй тeмпeрaтурe. Плaншeт прoмывaли и в кaждую лунку дoбaвляли пo 100 мкл рaствoрa субстрaтa 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубирoвaли в тeчeниe 2 мин при кoмнaтнoй тeмпeрaтурe. Рeакциe oстaнaвливaли дoбaвлeниeм 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 48 приведены результаты анализа по измерению отложения C3b, инициированного бeбтeлoвимабoм или нaцeлeннoх мoлeкулaми, сoдeржaщими бeбтeлoвимаб и C1г или C1s, нa пoврeхнoсти плaншeтoв для ELISA, пoкрывaннoх S-бeлкoм. Пoлистирoлoвe микрoтитрaциoннe плaншeтe для ELISA Maxisorp пoкрывaли 2 мкг/мл рeкoмбинaнтнoгo S-бeлкa в пoкрoвнoм бoфeрe. Нa слeдующиe сутки лунки блoкирoвaли 5% oбeзжирeннoм мoлoкoм в PBS в тeчeниe 2 ч, зaтeм прoмывaли бoфeрoм TBS, сoдeржaщим 0,05% (oб./oб.) Твин 20, 2,5% NHS, сoдeржaщую 7,5 мкг aнтитeл или нaцeлeннoх кoмплeмeнт-aктивирoвaннoх мoлeкул, рaзвoдили в бoфeрe BBS++ (4 мМ бaрбитaлa, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4), дoбaвляли в плaншeт и инкубирoвaли в тeчeниe 5, 10, 15, 20, 25 и 25 мин при кoмнaтнoй тeмпeрaтурe, зaтeм прoмывaли 3 рaзa. Oтлoжeниe C3b дeтeктирoвaли с испoльзoвaниeм крoличьeгo aнтичeлoвeчeскoгo C3c (Dako), зaтeм кoнъюгирoвaннoгo с пeрoксидaзoй хрeнa кoзьeгo aнтикрoличьeгo IgG (Southern Biotech). Чeрeз 1 ч плaншeт прoмывaли 3 рaзa и в кaждую лунку при кoмнaтнoй тeмпeрaтурe дoбaвляли пo 100 мкл рaствoрa субстрaтa 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific). Рeакциe oстaнaвливaли дoбaвлeниeм 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 49 приведены результаты анализа по измерению связывания антител к M-бeлкa RB572 и RB574, и нaцeлeннoх кoмплeмeнт-aктивирoвaннoх мoлeкул, сoдeржaщиx либo BR572, либo RB574 и oдну из C1г и C1s. Пoлистирoлoвe микрoтитрaциoннe плaншeтe для ELISA Maxisorp пoкрывaли 2 мкг/мл M-бeлкa SARS-CoV-2 в PBS (1×). Нa слeдующиe сутки лунки блoкирoвaли 1% BSA в PBS (1×) в тeчeниe 2 ч, зaтeм прoмывaли бoфeрoм PBS, сoдeржaщим 0,05% (oб./oб.) Твинa 20. Двукрaтнe сeрийнe рaзвeдeния aнтитeл и нaцeлeннoх кoмплeмeнт-aктивирoвaннoх мoлeкул гoтoвили в бoфeрe, сoдeржaщeм 0,1% BSA в PBS (1×) с мaксимaльнoй кoнцeнтрaциeй 400 нМ. 100 мкл

образцов переносили в планшет для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и в планшет добавляли 100 мкл детектирующего HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG антитела (American Qualex Antibodies, A130PD) с последующей 30-мин инкубацией при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2 М  $H_2SO_4$  и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Несвязанное антитело RTX использовали в качестве контроля.

На фиг. 50 приведены результаты анализа по измерению отложения C3b, инициированного антителом к М-белку RB574 или нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, содержащими RB574 и C1r. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл М-белка SARS-CoV-2. На следующие сутки лунки блокировали 1% BSA в PBS (1×) в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об/об) Твина 20. 3% NHS, содержащую 200 нМ антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разбавляли в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ  $CaCl_2$ , 1 мМ  $MgCl_2$ , pH 7,4), добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин при комнатной температуре, затем промывали 3 раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем HRP-конъюгированного козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет промывали 3 раза и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М  $H_2SO_4$  и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Несвязанное антитело RTX использовали в качестве контроля.

На фиг. 51 приведены результаты анализа по измерению связывания антитела к *Aspergillus* hJF5 или нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих hJF5 и C1r или C1s, с *Aspergillus fumigatus*. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали *Aspergillus fumigatus* в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере TBS, начиная с 15 мкг/мл. 100 мкл образцов переносили в планшет для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и в него добавляли 100 мкл детектирующего козьего античеловеческого HRP антитела с последующей 30-мин инкубацией при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М  $H_2SO_4$  и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

На фиг. 52 приведены результаты анализа по измерению отложения C3b,

инициированного антителом против *Aspergillus* hJF5 или нацеленными на комплемент-активирующими молекулами, содержащими hJF5 и C1r или C1s, на поверхности *Aspergillus fumigatus*. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали *Aspergillus fumigatus* в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20, 2,5% NHS, содержащую 7,5 мкг антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул разводили в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4), добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 25 мин при комнатной температуре, затем промывали 3 раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет промывали 3 раза и в каждую лунку при комнатной температуре добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific). Реакцию останавливали добавлением 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

### **Подробное описание изобретения**

#### **I. Определения**

Если здесь специально не указано иное, то все термины, используемые в настоящем изобретении, имеют то же значение, которое будет понятно специалистам в области настоящего изобретения. Следующие определения представлены для обеспечения наглядности в отношении терминов, используемых в описании и формуле изобретения для описания настоящего изобретения. Дополнительные определения приведены по тексту настоящего раскрытия.

В настоящем описании любой диапазон концентрации, процентный диапазон, диапазон соотношения или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одна десятая и одна сотая часть целого числа), если не указано иное. Любой диапазон чисел, приведенный в настоящем изобретении в отношении любого физического признака, такого как полимерные субъединицы, размер или толщина, следует понимать как включающий любое целое число в указанном диапазоне, если не указано иное. В рамках изобретения, термин «приблизительно» означает, что представленный диапазон или значение может варьировать в пределах  $\pm 10\%$  от указанного диапазона или значения, если не указано иное.

Следует понимать, что термины в единственном числе, используемые в настоящем изобретении, относятся к одному или более указанным компонентам. Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее одну, обе или любую комбинацию альтернатив. В настоящем изобретении термины «включать», «иметь» и «содержать» используются в качестве синонимов, где эти термины и их варианты следует истолковывать как неограничивающие.

Термины «необязательный» или «необязательно» означают, что описанный далее



элемент, компонент, событие или обстоятельства могут иметь место или могут не иметь место, и описание включает в себя случаи, когда элемент, компонент, событие или обстоятельство имеет место и случаи, когда не имеет место.

Следует понимать, что отдельные конструкции или группы конструкций, полученные из различных комбинаций структур и субъединиц, описанных здесь, раскрыты в настоящей заявке в той же степени, как если бы каждая конструкция или группа конструкций была представлена индивидуально. Таким образом, выбор конкретных структур или конкретных субъединиц находится в пределах объема настоящего изобретения.

Термин «состоящий по существу из» не эквивалентен термину «содержащий» и относится к указанным материалам или стадиям в формуле изобретения или к тем, которые существенно не влияют на основные характеристики объекта изобретения. Например, белковый домен, область или модуль (например, связывающий домен) или белок «состоит по существу» из определенной аминокислотной последовательности, когда аминокислотная последовательность домена, области, модуля или белка включает удлинения, делеции, мутации или их комбинации (например, аминокислоты на аминоконце или карбоксиконце или между доменами), которые в комбинации дают максимум 20% (например, максимум 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) от длины домена, области, модуля или белка, и существенно не влияют отрицательно (т. е. не снижают активность более чем на 50%, например не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%) от активности домена(ов), области(ей), модуля(ей) или белка (например, мишень-связывающей аффинности связывающего белка).

В рамках изобретения, термины «лечить», «лечение» или «ослабление» относятся к медикаментозному контролю заболевания, расстройства или патологического состояния у субъекта. В общем, подходящую дозу или схему лечения, включающую нацеленную на комплемент-активирующую молекулу или композицию по настоящему изобретению, вводят в количестве, достаточном для достижения терапевтического или профилактического эффекта. Терапевтический или профилактический/превентивный эффект включает улучшение клинического результата; снижение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием; уменьшение возникновения симптомов; улучшение качества жизни; более длительный статус без заболевания; уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизацию болезненного состояния; замедление или предупреждение прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; пролонгированную выживаемость; или любую их комбинацию.

«Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по настоящему изобретению относится к количеству композиции или молекулы, достаточному для достижения терапевтического эффекта, включающего улучшение клинического результата; снижение или облегчение симптомов, ассоциированных с заболеванием; уменьшение возникновения симптомов; улучшение

качества жизни; более длительный статус без заболевания; уменьшение степени тяжести заболевания, стабилизацию болезненного состояния; замедление или предупреждение прогрессирования заболевания; ремиссию; выживаемость; пролонгированную выживаемость статистически значимым образом. Применительно к отдельному активному ингредиенту, который вводится один, терапевтически эффективное количество относится к эффектам этого ингредиента или клетки, экспрессирующей один этот ингредиент. Применительно к комбинации, терапевтически эффективное количество относится к объединенным количествам активных ингредиентов или объединенному дополнительному активному ингредиенту с клеткой, экспрессирующей активный ингредиент, которое приводит к терапевтическому эффекту, независимо от того, вводятся они один за другим, последовательно или одновременно.

В рамках изобретения, термин «субъект» включает всех млекопитающих, в том числе, помимо прочего, человека, приматов, отличных от человека, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов. Субъект может быть мужчиной или женщиной и может быть любого подходящего возраста, включая младенцев, детей, подростков, взрослых и пожилых субъектов.

В рамках изобретения, термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе аминокислотам и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в природе аминокислотам. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодированные генетическим кодом, а также аминокислоты, модифицированные после, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксихлутамат и O-фосфосерин. Термин «аналог аминокислоты» относится к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е.  $\alpha$ -углеродный атом, связанный с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например, гомосерин, норлейцин, метионина сульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют основную химическую структуру, что и у природной аминокислоты. Термин «миметик аминокислоты» относится к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют аналогично природной аминокислоте.

В рамках изобретения, термин «мутация» относится к изменению последовательности молекулы нуклеиновой кислоты или молекулы полипептида по сравнению с референтной молекулой нуклеиновой кислоты или молекулой полипептида дикого типа соответственно. Мутация может привести к нескольким различным типам изменений в последовательности, включая замену, инсерцию или делецию нуклеотида(ов) или аминокислоты(ов).

В самом широком смысле встречающиеся в природе аминокислоты можно разделить на группы на основе химических характеристик боковой цепи соответствующих аминокислот. Под термином «гидрофобная» аминокислота подразумеваются Ile, Leu, Met,

Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys или Pro. Под термином «гидрофильная» аминокислота подразумеваются Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg или His.

«Консервативная замена» относится к аминокислотным заменам, которые существенно не влияют и не изменяют связывающие характеристики конкретного белка. Обычно консервативные замены представляют собой замены, при которых замещенный аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Консервативные замены включают замены, имеющие место в одной из следующих групп: Группа 1: аланин (Ala или A), глицин (Gly или G), серин (Ser или S), треонин (Thr или T); Группа 2: аспарагиновая кислота (Asp или D), глутаминовая кислота (Glu или Z); Группа 3: аспарагин (Asn или N), глутамин (Gln или Q); Группа 4: аргинин (Arg или R), лизин (Lys или K), гистидин (His или H); Группа 5: изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), метионин (Met или M), валин (Val или V); и Группа 6: фенилаланин (Phe или F), тирозин (Tyr или Y), триптофан (Trp или W). Дополнительно или альтернативно аминокислоты могут быть сгруппированы в группы консервативных замещений по сходной функции, химической структуре или составу (например, кислотные, основные, алифатические, ароматические или серосодержащие). Например, группа алифатических аминокислот может включать в целях замещения Gly, Ala, Val, Leu и Ile. Другие группы консервативных замен включают: серосодержащие: Met и цистеин (Cys или C); кислые: Asp, Glu, Asn и Gln; небольшие алифатические, неполярные или слабополярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro и Gly; полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды: Asp, Asn, Glu и Gln; полярные положительно заряженные остатки: His, Arg и Lys; крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val и Cys; и крупные ароматические остатки: Phe, Tyr и Trp. Дополнительную информацию можно найти в монографии Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company.

В рамках изобретения, термин «белок», или «пептид», или «полипептид» относится к полимеру из аминокислотных остатков. Термин «белки» применяется по отношению к природным полимерам аминокислот, а также к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственным химическим миметиком соответствующей природной аминокислоты, и к неприродным полимерам аминокислот. Также в данный термин включаются варианты белков, пептидов и полипептидов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вариантные белки, пептиды и полипептиды содержат или состоят из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентична аминокислотной последовательности определенной или референтной аминокислотной последовательности, как описано в настоящем изобретении.

«Молекула нуклеиновой кислоты», или «олигонуклеотид», или «полинуклеотид», или «полинуклеиновая кислота» относится к олигомерному или полимерному соединению, включающему ковалентно связанные нуклеотиды, которые могут состоять из природных субъединиц (например, пуриновых или пиримидиновых оснований) или

неприродных субъединиц (например, морфолиновое кольцо). Пуриновые основания включают аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин, и пиримидиновые основания включают урацил, тимин и цитозин. Молекулы нуклеиновой кислоты включают полирибонуклеиновую кислоту (РНК), которая включает, например, мРНК, микроРНК, миРНК, вирусную геномную РНК и синтетическую РНК, и полидезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), которая включает, например, кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. Обе ДНК и РНК могут быть одно- или двухцепочечными. Если молекула нуклеиновой кислоты одноцепочечная, то она может представлять собой кодирующую цепь или некодирующую (антисмысловую) цепь. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность, включает все нуклеотидные последовательности, которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Некоторые варианты нуклеотидных последовательностей могут также включать интрон(ы) в такой степени, что интрон(ы) будут удаляться посредством котрансляционных или посттранскрипционных механизмов. Другими словами, разные нуклеотидные последовательности могут кодировать одну и ту же аминокислотную последовательность в результате избыточности или вырожденности генетического кода или в результате сплайсинга.

Также в данный термин включаются варианты молекул нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Вариантные молекулы нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90% и предпочтительно на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% идентичны молекуле нуклеиновой кислоты определенного или референтного полинуклеотида, как описано в настоящем изобретении, или которые гибридизуются с полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации, состоящих из 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия при температуре приблизительно 65-68°C или 0,015 М хлорида натрия, 0,0015 М цитрата натрия и 50% формамида при температуре приблизительно 42°C. Варианты молекул нуклеиновой кислоты сохраняют способность кодировать свой связывающий домен, обладающий функциональностью, описанной в настоящем изобретении, такой как связывание молекулы-мишени.

«Процент идентичности последовательности» относится к взаимосвязи между двумя или более последовательностями, определяемой сравнением последовательностей. Предпочтительные методы определения идентичности последовательностей разработаны для обеспечения наилучшего соответствия между сравниваемыми последовательностями. Например, последовательности выравниваются для целей оптимального сравнения (например, могут быть введены гэпы в одну или обе из первой и второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности для оптимального выравнивания). Кроме того, негомологичные последовательности можно не учитывать для сравнения. Процент идентичности последовательности, указанный здесь, рассчитывается по длине референтной последовательности, если не указано иное. Методы определения идентичности и сходства последовательностей можно найти в общедоступных компьютерных программах. Выравнивание последовательностей и расчет процента

идентичности можно выполнить с использованием программы BLAST (например, BLAST 2.0, BLASTP, BLASTN или BLASTX) или программного обеспечения Megalign (DNASTAR). Математический алгоритм, используемый в программах BLAST, можно найти в Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402, 1997. Соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей, можно определить известными способами.

Термин «выделенный» означает, что вещество удалено из его исходной среды (например, природной среды, если оно встречается в природе). Например, встречающаяся в природе нуклеиновая кислота или полипептид, присутствующие в живом организме животного, не являются выделенными, но та же самая нуклеиновая кислота или полипептид, отделенные от некоторых или всех сосуществующих веществ в природной системе, являются выделенными. Такая нуклеиновая кислота может быть частью вектора и/или такая нуклеиновая кислота или полипептид могут быть частью композиции (например, клеточного лизата) и при этом быть выделенной, поскольку такой вектор или композиция не являются частью природной среды для нуклеиновой кислоты или полипептида. В некоторых вариантах осуществления термин «выделенный» может также обозначать антитело, антигенсвязывающий фрагмент, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяин или композицию, находящуюся вне организма человека.

Термин «ген» означает сегмент ДНК или РНК, участвующий в продукции полипептидной цепи; в определенных контекстах он включает области, предшествующие и следующие за кодирующей областью (например, 5'-нетранслируемая область (UTR) и 3'-UTR), а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами).

«Функциональный вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который структурно подобен или по существу структурно подобен исходному или референтному соединению по настоящему изобретению, но несколько отличается по составу (например, одно или более оснований, атомов или функциональных групп отличаются, добавлены или удалены), так что полипептид или кодированный полипептид способен выполнять по меньшей мере одну функцию исходного полипептида по меньшей мере с 50% эффективностью, предпочтительно по меньшей мере с 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 100% уровнем активности исходного полипептида, или с уровнем активности, превышающим уровень активности исходного полипептида. Другими словами, функциональный вариант полипептида или кодированного полипептида по настоящему изобретению имеет «сходное связывание», «сходную аффинность» или «сходную активность», когда функциональный вариант демонстрирует повышение активности или не более чем 50% снижение активности в выбранном анализе по сравнению с исходным или референтным полипептидом, например анализе определения ферментативной активности или аффинности связывания.

В рамках изобретения, «функциональный участок» или «функциональный

фрагмент» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который содержит только домен, участок или фрагмент исходного или референтного соединения, и этот полипептид или кодированный полипептид сохраняет по меньшей мере 50% активность, ассоциированную с доменом, участком или фрагментом исходного или референтного соединения, предпочтительно по меньшей мере 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 100% уровень активности исходного полипептида, или уровень активности, превышающий уровень активности исходного полипептида, или обеспечивает биологическое преимущество (например, эффекторной функции). «Функциональный участок» или «функциональный фрагмент» полипептида или кодированного полипептида по настоящему изобретению имеет «сходное связывание» или «сходную активность», когда функциональный участок или фрагмент демонстрирует повышение активности или не более чем 50% снижение активности в выбранном анализе по сравнению с исходным или референтным полипептидом (предпочтительно снижение не более чем на 20% или 10%, или не более чем логарифмическое различие по сравнению с исходным или референтным полипептидом в отношении аффинности).

В рамках изобретения, термин «сконструированный», «рекомбинантный» или «неприродный» относится к организму, микроорганизму, клетке, белку, полипептиду, молекуле нуклеиновой кислоты или вектору, которые включают по меньшей мере одно генетическое изменение, или которые были модифицированы посредством введения экзогенной или гетерологичной молекулы нуклеиновой кислоты, где такие изменения или модификации вводятся посредством методов генной инженерии (т.е. вмешательства человека). Генетические изменения включают, например, модификации, вводящие экспрессируемые молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие функциональные РНК, белки, слитые белки или ферменты, или добавления, делеции, замены или другое функциональное нарушение генетического материала клетки. Дополнительные модификации включают, например, некодирующие регуляторные области, при которых модификации изменяют экспрессию полинуклеотида, гена или оперона.

В рамках изобретения, термины «гетерологичный», «неэндогенный» или «экзогенный» относятся к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, которые не являются нативными для клетки-хозяина или субъекта, или к любому гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты, или активности, нативной для клетки-хозяина или субъекту, которая была изменена. Гетерологичные, неэндогенные или экзогенные включают гены, белки, соединения или молекулы нуклеиновых кислот, которые были мутированы или иным образом изменены таким образом, что структура, активность или и то, и другое, различаются между природными и измененными генами, белками, соединениями или молекулами нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гетерологичные, неэндогенные или экзогенные гены, белки или молекулы нуклеиновых кислот (например, рецепторы, лиганды и т.д.) могут быть неэндогенными для клетки-хозяина или субъекта, а вместо этого нуклеиновые кислоты, кодирующие такие гены, белки или молекулы

нуклеиновой кислоты могут быть добавлены к клетке-хозяину путем конъюгации, трансформации, трансфекции, электропорации и т.п., где добавленная молекула нуклеиновой кислоты может интегрироваться в геном клетки-хозяина или может находиться в виде внехромосомного генетического материала (например, в виде плазмиды или другого самореплицирующегося вектора). Термин «гомологичный» или «гомолог» относится к гену, белку, соединению, молекуле нуклеиновой кислоты или активности, обнаруженной или полученной из клетки-хозяина, вида или штамма. Например, гетерологичный или экзогенный полинуклеотид или ген, кодирующий полипептид, может быть гомологичен природному полинуклеотиду или гену и кодировать гомологичный полипептид или активность, но полинуклеотид или полипептид могут иметь измененную структуру, последовательность, уровень экспрессии или любую их комбинацию. Неэндогенный полинуклеотид или ген, а также кодированный полипептид или активность могут происходить от одного и того же вида, другого вида или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или ее часть, нативная для клетки-хозяина, будет считаться гетерологичной по отношению к клетке-хозяину, если она была изменена или мутирована, или молекула нуклеиновой кислоты, нативная для клетки-хозяина, может считаться гетерологичной, если она была изменена или мутирована гетерологичной последовательностью контроля экспрессии или изменена эндогенной последовательностью контроля экспрессии, обычно не связанной с молекулой нуклеиновой кислоты, нативной для клетки-хозяина. Кроме того, термин «гетерологичный» может относиться к биологической активности, которая отличается, изменена или не является эндогенной для клетки-хозяина. Как здесь описано, более чем одну гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты можно ввести в клетку-хозяина в виде отдельных молекул нуклеиновой кислоты, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде полицистронной молекулы нуклеиновой кислоты, в виде одной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или антигенсвязывающий фрагмент (или другой полипептид), или любая их комбинация.

В рамках изобретения, термин «эндогенный» или «нативный» относится к полинуклеотиду, гену, белку, соединению, молекуле или активности, которые обычно присутствуют в клетке-хозяине или у субъекта.

В рамках изобретения, термин «экспрессия» относится к процессу продукции полипептида на основе кодирующей последовательности молекулы нуклеиновой кислоты, такой как ген. Процесс может включать транскрипцию, посттранскрипционный контроль, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционный контроль, посттрансляционную модификацию или любую их комбинацию. Экспрессированная молекула нуклеиновой кислоты обычно функционально связана с последовательностью контроля экспрессии (например, промотором).

Термин «функционально связанная» относится к ассоциации двух или более молекул нуклеиновой кислоты в одном нуклеиновокислотном фрагменте таким образом, что функция одной влияет на функцию другой. Например, промотор функционально

связан с кодирующей последовательностью, когда он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). «Несвязанный» означает, что связанные генетические элементы не связаны тесно друг с другом и функция одного не влияет на функцию другого.

Как здесь описано, более чем одна гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты может быть введена в клетку-хозяин в виде отдельных молекул нуклеиновой кислоты, в виде множества индивидуально контролируемых генов, в виде полицистронной молекулы нуклеиновой кислоты, в виде одной молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей белок (например, тяжелую цепь антитела) или любая их комбинация. Когда две или более гетерологичные молекулы нуклеиновой кислоты вводятся в клетку-хозяин, то понятно, что две или более гетерологичные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в виде одной молекулы нуклеиновой кислоты (например, в одном векторе), в отдельных векторах, интегрированных в хромосому хозяина в одном сайте или в нескольких сайтах, или в любой их комбинации. Количество указанных гетерологичных молекул нуклеиновой кислоты или активностей белка относится к количеству различных кодирующих молекул нуклеиновой кислоты или количеству различных активностей белка, и не к количеству отдельных молекул нуклеиновой кислоты, введенных в клетку-хозяин.

Термин «конструкция» относится к любому полинуклеотиду, который содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты (или, если контекст ясно указывает, слитый белок по настоящему изобретению). (Полинуклеотидная) конструкция может находиться в векторе (например, бактериальном векторе, вирусном векторе) или может быть интегрирована в геном. «Вектор» представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая способна транспортировать другую молекулу нуклеиновой кислоты. Векторы могут представлять собой, например, плазмиды, космиды, вирусы, РНК-вектор или линейную или кольцевую молекулу ДНК или РНК, которая может включать хромосомные, нехромосомные, полусинтетические или синтетические молекулы нуклеиновой кислоты. Векторы по настоящему изобретению также включают транспозонные системы (например, «Спящая красавица», см., например, Geurts et al., *Mol. Ther.* 8:108, 2003; Mátés et al., *Nat. Genet.*, 41:753, 2009). Типичными векторами являются векторы, способные к автономной репликации (эписомальный вектор), способные доставлять полинуклеотид в геном клетки (например, вирусный вектор) или способные экспрессировать молекулы нуклеиновой кислоты, с которыми они связаны (экспрессионные векторы).

В рамках изобретения, термин «экспрессионный вектор» или «вектор» относится к конструкции ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, которая функционально связана с подходящей контрольной последовательностью, способной оказывать влияние на экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в подходящем хозяине. Такие контрольные последовательности обычно включают промотор, влияющий на



транскрипцию, необязательную последовательность оперона, контролирующую такую транскрипцию, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания рибосомы в мРНК, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Вектор может представлять собой плазмиду, фаговую частицу, вирус или просто потенциальную геномную вставку. После трансформации в подходящий хозяин вектор может реплицироваться и функционировать независимо от генома хозяина или, в некоторых случаях, может интегрироваться в сам геном или доставлять полинуклеотид, содержащийся в векторе, в геном без векторной последовательности. В настоящем описании термины «плазида», «экспрессирующая плазида», «вирус» и «вектор» часто используются как взаимозаменяемые.

Термин «введенный» в контексте вставки молекулы нуклеиновой кислоты в клетку означает «трансфекцию», «трансформацию» или «трандукцию», и включает ссылку на включение молекулы нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где молекула нуклеиновой кислоты может включиться в геном клетки (например, в хромосому, плазмиду, пластиду или митохондриальную ДНК), преобразоваться в автономный репликон или транзientно экспрессироваться (например, трансфектированная мРНК).

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с определенными элементами вектора. Например, полинуклеотидные последовательности, необходимые для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы, могут быть оперативно связаны. Последовательности контроля экспрессии могут включать соответствующие последовательности инициации, терминации, промотора и энхансера транскрипции; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусные последовательности Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, возможно, последовательности, усиливающие секрецию белка. Последовательности контроля экспрессии могут быть функционально связаны, если они являются смежными с представляющим интерес геном, и последовательности контроля экспрессии, которые функционируют в транс- или на расстоянии для контроля интересующего гена, также могут считаться оперативно связанными.

В некоторых вариантах осуществления вектор включает плазмидный вектор или вирусный вектор (например, лентивирусный вектор или  $\gamma$ -ретровирусный вектор). Вирусные векторы включают ретровирус, аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы), коронавирусы, РНК-вирусы с отрицательной цепью, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и вирус везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, вирус кори и вирус Сендай), РНК-вирусы с положительной цепью, такие как пикорнавирус и альфавирус, и вирусы с

двухцепочечной ДНК, включающие аденовирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (например, вирус осповакцины, птичьей оспы и оспы канареек). Другие вирусы включают, например, вирус Норуолка, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Примеры ретровирусов включают вирус лейкоза саркомы птиц, вирусы С-типа, В-типа млекопитающих, вирусы типа D, группу HTLV-BLV, лентивирус, спумавирус (Coffin J.M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B.N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996). Способы использования ретровирусных и лентивирусных вирусных векторов и упаковочных клеток для трансдукции клеток-хозяев млекопитающих вирусными частицами, содержащими трансгены, известны в данной области техники и были описаны ранее, например, в: патенте США № 8119772; Walchli et al., PLoS One, 6:327930, 2011; Zhao et al., J. Immunol., 174:4415, 2005; Engels et al., Hum. Gene Ther., 14:1155, 2003; Frecha et al., Mol. Ther., 18:1748, 2010; и Verhoeven et al., Methods Mol. Biol., 506:97, 2009. Ретровирусные и лентивирусные векторные конструкции и системы экспрессии также являются коммерчески доступными. Для доставки полинуклеотидов также можно использовать другие вирусные векторы, включая ДНК-вирусные векторы, в том числе, например, векторы на основе аденовируса и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV); векторы, полученные из вирусов простого герпеса (HSV), включая ампликонные векторы, дефектный по репликации HSV и аттенуированный HSV (Krisky et al., Gene Ther., 5:1517, 1998).

Другие векторы, которые можно использовать с композициями и способами по настоящему изобретению, включают векторы, полученные из бакуловирусов и  $\alpha$ -вирусов (Jolly D. J., 1999, Emerging Viral Vectors, pp. 209-40 in Friedmann T. ed. The Development of Human Gene Therapy. New York: Cold Spring Harbor Lab) или плазмидные векторы (такие как «Спящая красавица» или другие транспозонные векторы).

Когда геном вирусного вектора содержит множество полинуклеотидов, которые должны экспрессироваться в клетке-хозяине в виде отдельных транскриптов, то вирусный вектор может также содержать дополнительные последовательности между двумя (или более) транскриптами, обеспечивающие бицистронную или мультицистронную экспрессию. Примеры таких последовательностей, используемых в вирусных векторах, включают внутренние сайты входа рибосомы (IRES), сайты расщепления фурином, вирусный пептид 2A или любую их комбинацию.

Плазмидные векторы, включая плазмидные векторы на основе ДНК, для экспрессии одного или более белков *in vitro* или для прямого введения субъекту, также известны в данной области. Такие векторы могут содержать бактериальный ориджин репликации, вирусный ориджин репликации, гены, кодирующие компоненты, необходимые для репликации плазмиды, и/или один или более маркеров селекции, и могут содержать дополнительные последовательности, обеспечивающие бицистронную или мультицистронную экспрессию.

В рамках изобретения, термин «хозяин» относится к клетке или микроорганизму, предназначенным для генетической модификации гетерологичной нуклеиновокислотной молекулой с целью получения представляющего интерес полипептида (например, антитела по настоящему изобретению).

Клетка-хозяин может включать любую отдельную клетку или культуру клеток, которая может принимать вектор или включать нуклеиновые кислоты или экспрессировать белки. Этот термин также охватывает потомство клетки-хозяина, генетически или фенотипически одинаковое или разное. Подходящие клетки-хозяева могут зависеть от вектора и могут включать клетки млекопитающих, клетки животных, клетки человека, клетки обезьян, клетки насекомых, дрожжевые клетки и бактериальные клетки. Эти клетки можно стимулировать к включению вектора или другого материала с использованием вирусного вектора, трансформации посредством осаждения фосфатом кальция, DEAE-декстрана, электропорации, микроинъекции или других методов. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, 2d ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989).

В рамках изобретения, термин «активирующая комплемент» относится к молекуле, которая способна участвовать в одном или более путях комплемента таким образом, чтобы привести к отложению компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени и, необязательно, к гибели клетке-мишени. Точная последовательность событий, возникающих в результате активации комплемента, зависит от активированного пути комплемента (т.е. классического, лектинового или альтернативного) и роли конкретной молекулы, активирующей комплемент, на этом пути. Как описано выше, каждый из путей комплемента приводит к последовательной активации ряда сериновых протеаз. Таким образом, сериновые протеазы в пути комплемента, такие как маннозосвязывающие лектин-ассоциированные сериновые протеазы (MASP), MASP-1, MASP-2 и MASP-3, C1r, C1s, C2a, фактор комплемента D (CFD) и фактор комплемента Bb, являются примерами молекул, активирующих комплемент.

В рамках изобретения, термин «антиген» относится к иммуногенной молекуле, которая индуцирует иммунный ответ. Данный иммунный ответ может включать продукцию антител, активацию специфических иммунологически компетентных клеток, активацию комплемента, антителозависимую цитотоксичность или любую их комбинацию. Антиген (иммуногенная молекула) может представлять собой, например, пептид, гликопептид, полипептид, гликополипептид, полинуклеотид, полисахарид, липид и т.п. Совершенно очевидно, что антиген может быть синтезирован, получен рекомбинантно или получен из биологического образца. Типичные биологические образцы, которые могут содержать один или более антигенов, включают образцы тканей, образцы кала, клетки, биологические жидкости или их комбинации. Антигены могут продуцироваться клетками, которые были модифицированы или генетически сконструированы для экспрессии антигена. Антигены также могут находиться в инфекционном агенте или на нем, например, в вирионе, или экспрессироваться или

презентироваться на поверхности клетки, инфицированной инфекционным агентом.

Термин «эпитоп» или «антигенный эпитоп» включает любую молекулу, структуру, аминокислотную последовательность или белковую детерминанту, которая распознается и специфически связывается родственной связывающей молекулой, такой как иммуноглобулин, или другой связывающей молекулой, доменом или белком. Эпитопические детерминанты обычно содержат химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и могут иметь определенные трехмерные структурные характеристики, а также определенные характеристики заряда. Если антиген представляет собой или содержит пептид или белок, то эпитоп может состоять из смежных аминокислот (например, линейный эпитоп) или может состоять из аминокислот из разных частей или областей белка, которые сближаются в результате сворачивания белка (например, прерывистый или конформационный эпитоп), или несмежных аминокислот, находящихся в непосредственной близости независимо от сворачивания белка.

Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из одного или более полипептидов, которая специфически связывается с антигеном по меньшей мере через один сайт узнавания эпитопа. Например, термин «антитело» охватывает интактное антитело, содержащее по меньшей мере две тяжелые цепи и две легкие цепи, соединенные дисульфидными связями, а также любой антигенсвязывающий участок или фрагмент интактного антитела, который имеет или сохраняет способность связываться с молекулой-мишенью антигена, распознаваемой интактным антителом, такой как scFv, Fab или Fab'2 фрагмент. Данный термин также охватывает полноразмерные антитела или их фрагменты любого класса или подкласса, включая IgG и его подклассы (такие как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), IgM, IgE, IgA и IgD.

Термин «антитело» используется здесь в самом широком смысле, включая антитела и их фрагменты антител, полученные от любого млекопитающего, продуцирующего антитела (например, мыши, крысы, кролика и примата, включая человека), или из гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии или трансгенных животных (или других способов получения антител или фрагментов антител). Не полагается, что термин «антитело» ограничивается источником антитела или способом его получения (например, с использованием гибридомы, фаговой селекции, рекомбинантной экспрессии, трансгенного животного, синтеза пептидов и т.д.). Типичные антитела включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела; полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела); гуманизированные антитела; полностью человеческие антитела, мышинные антитела; химерные моноклональные антитела мыши-человека, мыши-примата, примата-человека; и антиидиотипические антитела и могут представлять собой любую интактную молекулу или ее фрагмент. В настоящем изобретении термин «антитело» включает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одноцепочечные (такие как scFv), их синтетические

варианты, встречающиеся в природе варианты, слитые белки, содержащие часть антитела с антигенсвязывающим фрагментом необходимой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт или фрагмент (сайт узнавания эпитопа) необходимой специфичности. Термин включает генетически сконструированные и/или модифицированные иным образом формы иммуноглобулинов, такие как интратела, пептидные антитела, диатела, триатела, тетратела, тандем ди-scFv, тандем три-scFv и т.п., включая их антигенсвязывающие фрагменты.

Термины «VH» и «VL» относятся к связывающим переменным областям тяжелой цепи и легкой цепи антитела соответственно. VL может представлять цепь класса каппа или цепь класса лямбда. Связывающие переменные области содержат дискретные, четко определенные субобласти, известные как участки, определяющие комплементарность (CDR), и каркасные области (FR). CDR располагаются внутри гиперпеременной области (HVR) антитела и относятся к последовательностям аминокислот в переменных областях антитела, которые, как правило, вместе придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания антитела. Последовательные CDR (т.е. CDR1 и CDR2, и CDR2 и CDR3) в первичной структуре отделены друг от друга каркасной областью.

В рамках изобретения, «химерное антитело» представляет собой рекомбинантный белок, который содержит переменные домены и участки, определяющие комплементарность, полученные из антитела, отличного от человеческого (например, грызунов), в то время как остальная часть молекулы антитела получена из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело состоит из антигенсвязывающего домена одного антитела, функционально связанного или иным образом слитого с гетерологичными константными областями другого антитела. Например, химерное мышино-человеческое антитело может содержать антигенсвязывающий домен мышино-антитела, слитый с константной областью, полученной из человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная константная область может относиться к классу Ig, отличному от родительского антитела, включая IgA (включая подклассы IgA1 и IgA2), IgD, IgE, IgG (включая подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4) и IgM.

В рамках изобретения, «гуманизированное антитело» представляет собой молекулу, обычно полученную с использованием рекомбинантных методов, имеющую антигенсвязывающий сайт, полученный из иммуноглобулина «нечеловеческого» вида, и остальную иммуноглобулиновую структуру молекулы, основанную на структуре и/или последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело отличается от химерного антитела тем, что обычно в нем используются только CDR «нечеловеческих» видов, привитые на соответствующие каркасные области в переменном домене человека. Антигенсвязывающие сайты могут представлять собой сайтами дикого типа или могут быть модифицированы одной или более аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные

антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное мышинное антитело, которое содержит все шесть CDR мышинных антител). В других вариантах осуществления гуманизированные антитела имеют один или более CDR (один, два, три, четыре, пять, шесть), которые изменены по отношению к исходному антителу, которые также называются одним или более CDR, «полученными из» одного или более CDR из исходного антитела.

В рамках изобретения, термин «фрагмент антитела» относится к части, полученной из полноразмерного антитела или связанной с ним, обычно включающей его антигенсвязывающую или вариабельную область. Иллюстративные примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> и Fv, фрагменты scFv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В рамках изобретения, термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту, который содержит по меньшей мере один CDR тяжелой и/или легкой цепей иммуноглобулина, который специфически связывается с антигеном, к которому было получено антитело. Антигенсвязывающий фрагмент может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или все 6 CDR последовательности VH и VL антитела.

«Fab» (антигенсвязывающий фрагмент) представляет собой участок антитела, который связывается с антигенами и включает вариабельную область и СН1 тяжелой цепи, связанные с легкой цепью посредством межцепочечной дисульфидной связи. Каждый Fab-фрагмент является моновалентным в отношении связывания антигена, т.е. имеет единственный антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, который приблизительно соответствует двум дисульфидно-связанным Fab-фрагментам, имеющим двухвалентную антигенсвязывающую активность и все еще способным к перекрестному сшиванию антигена. Оба Fab, и F(ab')<sub>2</sub> являются примерами «антигенсвязывающих фрагментов». Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбоксиконце домена СН1, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой здесь обозначение Fab', в котором цистеиновый остаток(ы) константных доменов несет свободную тиоловую группу. Фрагменты антител F(ab')<sub>2</sub> часто продуцируются в виде пар Fab'-фрагментов, между которыми имеются шарнирные цистеины. Известны также другие химические соединения фрагментов антител.

Fab-фрагменты могут быть соединены, например, с помощью пептидного линкера с образованием одноцепочечного Fab, также называемого здесь «scFab». В этих вариантах осуществления межцепочечная дисульфидная связь, находящаяся в нативном Fab, может отсутствовать, и линкер служит, полностью или частично, для связывания или соединения Fab-фрагментов в одну полипептидную цепь. Fab-фрагмент, полученный из тяжелой цепи (например, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из VH+CH1 или «Fd») и Fab-фрагмент, полученный из легкой цепи (например, содержащий, состоящий из или по существу состоящий из VL+CL) могут быть связаны любым способом с образованием

scFab. Например, scFab может иметь расположение в направлении от N-конца к С-концу в соответствии с (Fab-фрагмент тяжелой цепи - линкер - Fab-фрагмент легкой цепи) или (Fab-фрагмент легкой цепи - линкер - Fab-фрагмент тяжелой цепи).

«Fv» представляет собой небольшой фрагмент антитела, который содержит полный сайт узнавания антигена и антигенсвязывающий сайт. Данный фрагмент обычно состоит из димера домена одной вариабельной области тяжелой и одной вариабельной области легкой цепи, находящихся в тесной нековалентной ассоциации. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфичных для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя обычно с более низкой аффинностью, чем полный сайт связывания.

«Одноцепочечный Fv», также сокращенно обозначенный как «sFv» или «scFv», представляет собой фрагменты антитела, которые содержат VH- и VL-домены антитела, соединенные в одну полипептидную цепь. Полипептид scFv может содержать полипептидный линкер, расположенный между доменами VH и VL и связывающий их, что позволяет scFv сохранять или формировать желаемую структуру для связывания антигена, хотя линкер не всегда требуется. Такой пептидный линкер можно включить в слитый полипептид с использованием стандартных методов, хорошо известных в данной области. Дополнительно или альтернативно Fv может содержать дисульфидную связь, образованную между VH и VL и стабилизирующую их. Обзор по scFv см. в Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, ред. Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, включающий домен VH, домен VL и пептидный линкер, связывающий домен VH с доменом VL. В конкретных вариантах осуществления scFv содержит домен VH, связанный с доменом VL посредством пептидного линкера, который может находиться в ориентации VH-линкер-VL или в ориентации VL-линкер-VH. Любой scFv по настоящему изобретению можно сконструировать таким образом, чтобы С-концевой конец домена VL был связан короткой пептидной последовательностью с N-концевым концом домена VH или наоборот (т.е. (N)VL(C)-линкер-(N)VH(C) или (N)VH(C)-линкер-(N)VL(C)). Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления линкер может быть связан с N-концевым участком или концом домена VH, домена VL или того и другого.

Последовательности пептидных линкеров для использования в scFv или в других слитых белках, таких как нацеленные комплемент-активирующие молекулы, описанные в настоящем изобретении, могут быть выбраны, например, на основе: (1) их способности принимать гибкую вытянутую конформацию; (2) их неспособности или отсутствия способности принимать вторичную структуру, которая могла бы взаимодействовать с функциональными эпитопами на первом и втором полипептидах и/или на молекуле-мишени; и/или (3) отсутствия или относительного отсутствия гидрофобных или заряженных остатков, которые могут взаимодействовать с полипептидами и/или молекулой-мишенью. Другие соображения, касающиеся конструкции линкера (например,

длины), могут включать конформацию или ряд конформаций, при которых VH и VL могут образовывать функциональный антигенсвязывающий сайт. В некоторых вариантах осуществления последовательности пептидного линкера содержат, например, остатки Gly, Asn и Ser. Другие практически нейтральные аминокислоты, такие как Thr и Ala, также могут быть включены в линкерную последовательность. Другие аминокислотные последовательности, которые можно с пользой использовать в качестве линкера, включают последовательности, раскрытые Maratea et al., Gene 40:39 46(1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258 8262 (1986); патент США № 4935233, патент США № 4751180. Другие иллюстративные и неограничивающие примеры линкеров могут включать, например, пентамер Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:99), когда он находится в одной итерации или повторяется от одного до пяти раз или более, и может начинаться или закончиться в частичной итерации; см., например, SEQ ID NO:100. Можно использовать любой подходящий линкер, и обычно он имеет приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 15, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 аминокислот в длину или менее, приблизительно 200 аминокислот в длину, и будет предпочтительно иметь гибкую структуру (может обеспечивать гибкость и пространство для конформационного перемещения между двумя областями, доменами, мотивами, фрагментами или модулями, соединенными линкером) и предпочтительно он является биологически инертными и/или имеет низкий риск индукции иммуногенности у человека.

Антитела могут быть моноспецифическими (например, связывающимися с одним эпитопом) или полиспецифическими (например, связывающимися с несколькими эпитопами и/или молекулами-мишенями). Биспецифическое или полиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут, в некоторых вариантах осуществления, содержать один, два или более антигенсвязывающих доменов (например, VH и VL). Могут присутствовать два или более связывающих домена, которые связываются с одними и теми же или разными эпитопами, и биспецифическое или полиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, представленные в настоящем изобретении, могут, в некоторых вариантах осуществления, иметь два или более связывающих домена, которые связываются с разными антигенами или патогенами в общем.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть сконструированы в различных форматах. Типичные форматы антител раскрыты в Spiess et al., Mol. Immunol., 67(2):95 (2015), а также в Brinkmann and Kontermann, mAbs 9(2):182-212 (2017), форматы и способы их получения которых включены в настоящий документ посредством ссылки и включают, например, биспецифические T-клеточные захватчики (BiTE), DART, структуры выступ-во-впадину (КИН), структуры scFv-CH3-КИН, антитела, имеющие структуру выступ-во-впадину (КИН) с общей легкой цепью, TandAbs, тройные антитела, минитела TriBi, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')<sub>2</sub>-scFv<sub>2</sub>, тетравалентные HCab, интратела, кроссMab, Fab двойного действия (DAF) (два-в-одном или четыре-в-одном), DutaMab, DT-IgG, заряженные пары, обмен Fab-плеч, SEED-тела, триомабы, структуры



LUZ-Y, Fcabs, κλ-тела, ортогональные Fab, DVD-Igs (например, патент США № 8258268, форматы из которого в полном объеме включены сюда посредством ссылки), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, Zybody и DVI-IgG (четыре-в-одном), а также так называемые FIT-Ig (например, публикация PCT 5 WO 2015/103072, форматы из которого в полном объеме включены сюда посредством ссылки), так называемые форматы WuxiBody (например, публикация PCT WO 2019/057122, форматы из которого в полном объеме включены сюда посредством ссылки) и так называемые форматы In-Elbow-Insert Ig (IEI-Ig; например, публикации PCT WO 2019/024979 и WO 2019/025391, форматы из которых в полном объеме включены сюда посредством ссылки).

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать два или более домена VH, два или более домена VL или оба (т.е. два или более доменов VH и два или более доменов VL). В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент имеет формат (в направлении от N-конца к C-концу) VH-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VL, где две последовательности VH могут быть одинаковыми или разными, и две последовательности VL могут быть одинаковыми или разными. Такие связанные scFv могут включать любую комбинацию доменов VH и VL, предназначенных для связывания с определенной мишенью, и в форматах, содержащих два или более VH и/или два или более VL, могут связывать один, два или более различных эпитопов или антигенов. Следует понимать, что форматы, включающие многочисленные антигенсвязывающие домены, могут включать последовательности VH и/или VL в любой комбинации или ориентации. Например, антигенсвязывающий фрагмент может иметь формат VL-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VH, VH-линкер-VL-линкер-VL-линкер-VH или VL-линкер-VH-линкер-VH-линкер-VL.

В рамках изобретения, модификатор «моноклональное» указывает на то, что антитело получено из практически гомогенной популяции антител, и не предназначено для ограничения в отношении источника антитела или способа его получения (например, с использованием гибридомы, селекции фагов, рекомбинантную экспрессию, трансгенных животных и т. д.). Термин «моноклональное антитело» охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), их одноцепочечные варианты, слитые белки, содержащие антигенсвязывающий участок, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий участок (сайт узнавания эпитопа) необходимой специфичности и способности связываться с эпитопом. Моноклональные антитела могут быть получены с использованием любого метода, который обеспечивает получение молекул антител с использованием непрерывных клеточных линий в культуре, такого как гибридомный метод, описанный Kohler G. et al., Nature, 256:495, 1975, или они могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567, выданный Cabilly). Моноклональные антитела также

можно выделить из фаговых библиотек антител с использованием методик, описанных в публикациях Clackson T. et al., Nature 352:624-628, 1991, и Marks J.D. et al., J. Mol. Biol., 222:581-597, 1991. Такие антитела могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD и любой их подкласс.

Известные полипептиды иммуноглобулинов включают легкие цепи каппа и лямбда, и тяжелые цепи альфа, гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эpsilon и мю или их эквиваленты у других видов. Полноразмерные «легкие цепи» иммуноглобулина (приблизительно 25 кДа или приблизительно 214 аминокислот) содержат переменную область приблизительно из 110 аминокислот на NH<sub>2</sub>-конце и константную область каппа или лямбда на COOH-конце. «Тяжелые цепи» полноразмерного иммуноглобулина (приблизительно 50 кДа или приблизительно 446 аминокислот) аналогичным образом содержат переменную область (приблизительно 116 аминокислот) и одну из вышеуказанных константных областей тяжелой цепи, например, гамма (приблизительно 330 аминокислот).

Основная четырехцепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM отличается от этой структуры тем, что оно состоит из пяти основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и, следовательно, содержит 10 антигенсвязывающих сайтов. Секретируемые IgA антитела также отличаются от базовой структуры тем, что они могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов, включающих от двух до пяти основных четырехцепочечных звеньев вместе с J-цепью. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями, в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. В результате спаривания VH и VL вместе образуется один антигенсвязывающий сайт.

Каждая H-цепь имеет на N-конце переменный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH1, CH2, CH3), в случае альфа-, гамма- и дельта-цепей, или четыре CH-домена (CH1, CH2, CH3, CH4), в случае мю- и epsilon-цепей.

Каждая L-цепь имеет на N-конце переменный домен (VL), за которым на другом конце следует константный домен (CL). Когда L-цепь и H-цепь спарены, то VL выравнивается с VH, и CL выравнивается с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). L-цепь любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух типов, называемых каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов (CL).

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины можно отнести к разным классам или изоформам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены альфа (α), дельта (δ), epsilon (ε), гамма (γ) и мю (μ) соответственно.

Классы  $\gamma$  и  $\alpha$  далее делятся на подклассы на основе незначительных различий в последовательности и функции СН, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

О структуре и свойствах различных классов антител см., например, *Basic and Clinical Immunology*, 8<sup>th</sup> Edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds); Appleton and Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71 and Chapter 6.

Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные сегменты V-доменов сильно различаются по последовательности среди антител. Домен V опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела к конкретному антигену. Однако вариабельность распределена неравномерно в 110-аминокислотном отрезке последовательности вариабельных доменов. На самом деле, V-области состоят из относительно инвариантных участков, называемых каркасными областями (FR) длиной 15-30 аминокислот, разделенных короткими участками повышенной вариабельности, называемых «гипервариабельными участками», каждый из которых имеет длину 9-12 аминокислот. Вариабельные домены нативных тяжелой и легкой цепей, каждый, включают четыре FR, преимущественно принимающих конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенных тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли соединяющие, и в некоторых случаях формирующие часть структуры  $\beta$ -листа. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR, и вместе с гипервариабельными участками из другой цепи участвуют в формировании антигенсвязывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Константные домены не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции.

В рамках изобретения, термин «эффекторные функции» относится к биологической активности, относящейся к Fc-участку антитела. Примеры эффекторных функций антител включают участие в антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), связывании C1q и комплемент-зависимой цитотоксичности, связывании Fc-рецептора, фагоцитозе, негативной регуляции рецепторов клеточной поверхности и активации В-клеток. Модификации, такие как аминокислотные замены, могут быть сделаны в Fc-домене для модификации (например, усиления или снижения) одной или более функций Fc-содержащего полипептида. Такие функции включают, например, связывание Fc-рецептора, модуляцию периода полувыведения антитела, функцию ADCC, связывание белка А, связывание белка G и связывание комплемента. Аминокислотные модификации, которые модифицируют функции Fc, включают, например, мутации T250Q/M428L, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F, M428L/N434S, E233P/L234V/L235A/G236 $\Delta$ /A327G/A330S/P331S, E333A, S239D/A330L/I332E, P257I/Q311, K326W/E333S, S239D/I332E/G236A, N297Q, K322A, S228P, L235E/E318A/K320A/K322A, L234A/L235A и L234A/L235A/P329G. Другие модификации

Fc и их влияние на функцию Fc известны в данной области техники.

Как известно, термин «гипервариабельная область» относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит несколько «участков, определяющих комплементарность» (CDR). Тяжелая цепь содержит три последовательности CDR (CDRH1, CDRH2 и CDRH3), и легкая цепь содержит три последовательности CDR (CDRL1, CDRL2 и CDRL3). Существует множество систем для идентификации и нумерации аминокислот, составляющих CDR. Например, гипервариабельная область обычно содержит CDR в остатках приблизительно 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и в остатках приблизительно 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи с использованием нумерации в соответствии с системой нумерации Kabat, как описано Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991); и/или в остатках приблизительно 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи, и 26-32 (H1), 52-56 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи с использованием нумерации в соответствии с системой нумерации Chothia, как описано Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); и/или в остатках приблизительно 27-38 (L1), 56-65 (L2) и 105-117 (L3) в VL и 27-38 (H1), 56-65 (H2) и 105-117 (H3) в VH с использованием нумерации в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано Lefranc J.P. et al., *Nucleic Acids Res.*, 27:209-212; Ruiz M. et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000). Эквивалентные положения остатков можно определить и сравнить для различных молекул с использованием программного инструмента нумерации и классификации рецепторов антигенов (ANARCI) (2016, *Bioinformatics*, 15:298-300). Соответственно, идентификация CDR приблизительно последовательности вариабельного домена (VH или VL), как представлено в настоящем изобретении, в соответствии с одной схемой нумерации, не исключает антитела, содержащего CDR того же вариабельного домена, как определено с использованием другой схемы нумерации.

В рамках изобретения, термин «специфически связывается» относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с антигеном с определенной аффинностью, и при этом незначительно связываются или объединяются с какими-либо другими молекулами или компонентами в образце. Аффинность можно определить как равновесную константу ассоциации ( $K_a$ ), рассчитанную как соотношение  $k_{on}/k_{off}$  в единицах  $1/M$  или как равновесную константу диссоциации  $K_d$ , рассчитанную как соотношение  $k_{off}/k_{on}$  в единицах  $M$ .

В некоторых контекстах антитело и антигенсвязывающие фрагменты могут быть описаны со ссылкой на аффинность и/или авидность к антигену. Если не указано иное, то авидность относится к общей силе связывания антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с антигеном и отражает аффинность связывания, валентность антитела или антигенсвязывающего фрагмента (например, содержит ли антитело или антигенсвязывающий фрагмент один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять,

десять или более сайтов связывания) и, например, присутствует ли другой агент, который может повлиять на связывание (например, неконкурентный ингибитор антитела или антигенсвязывающего фрагмента).

Каждый вариант осуществления в данном описании должен применяться с соответствующими изменениями к любому другому варианту осуществления, если явно не указано иное. Полагается, что любой вариант осуществления, раскрытый в данном описании, может быть осуществлен в отношении любого метода, набора, реагента или композиции по изобретению, и наоборот. Кроме того, композиции по настоящему изобретению можно использовать для достижения способов по настоящему изобретению.

## **II. Обзор**

Настоящее изобретение относится к композициям и способам направленной активации пути комплемента. Ранее терапевтические антитела исследовались в качестве средства для лечения рака, поскольку хорошо известно, что клеточно-опосредованный иммунитет, посредством действия естественных клеток-киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, играет решающую роль в подавлении развития опухолей. Однако недавние исследования показали, что система комплемента также играет важную роль в иммунном надзоре в отношении рака. Сообщалось об отложениях активированных компонентов комплемента в нескольких опухолях человека, и также о сверхэкспрессии белков, регулирующих комплемент (CRP) (Macor et al., *Front. Immunol.*, 9:2203 (2018)). Эффекторные механизмы, которые приводят к цитотоксической активности на раковых клетках, в первую очередь являются Fc-опосредованными; к ним относятся антителозависимая цитотоксичность (ADCC), антителозависимый фагоцитоз (ADCP), комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), комплемент-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (CDCC) и комплемент-зависимый клеточный фагоцитоз (CDCP).

Было разработано несколько стратегий для прямой активации комплемента на поверхности опухолевых клеток с использованием моноклональных антител (mAb); многие из этих моноклональных антител показали лишь субоптимальную активность в регуляции активации комплемента через классический путь. Факторы, которые оказывают влияние на цитотоксичность, включают необходимую гексамеризацию Fc-участка антитела для более эффективного связывания C1, плотность эпитопов клетки-мишени и экспрессию регуляторных белков комплемента (CRP).

Для того, чтобы комплексы антитело/антиген (т.е. иммунные комплексы) инициировали активацию классического пути в ответ на инфекцию, вызванную патогеном, или присутствие любого чужеродного антигена, антитело подкласса IgM должно связаться с антигеном, или по меньшей мере два антитела подкласса IgG должны связаться с антигенами таким образом, чтобы позволить по меньшей мере двум из шести C-концевых Fc-участков иммуноглобулина, связывающихся с областью «глобулярной головки» C1q, связаться с иммунными комплексами IgG. Для этого необходимо стехиометрически подходящее распределение антигенсвязывающих иммунных

комплексов на поверхности клеток-мишеней. Иммуные комплексы, которые связываются слишком далеко друг от друга, не могут активировать классический путь, поскольку они не могут сформировать паттерн, который позволяет компоненту распознавания C1q связаться по меньшей мере с двумя иммунными комплексами IgG, находящимися в непосредственной близости друг от друга. Распределение иммунных комплексов на активирующих поверхностях зависит от распределения лигандов антител, что, следовательно, определяет, насколько комплексы IgG могут или не могут запускать активацию классического пути. Именно по этой причине многие моноклональные антитела класса иммуноглобулинов IgG не активируют комплемент.

Настоящее изобретение относится к новой, широко применимой платформе mAb, называемой «терапия на основе направленной активации комплемента» (T-CAT), в которой используется весь потенциал комплемента для максимизации активности терапевтических mAb. Данная платформа подходит не только для нацеливания на раковые клетки, но также может использоваться для нацеливания активности комплемента на любую клетку, экспрессирующую антиген, к которому могут генерироваться антитела. Таким образом, платформу T-CAT можно использовать для самых разных целей, включая лечение рака, аутоиммунных заболеваний и патогенных инфекций, включая бактериальные, вирусные, грибковые инфекции и паразитарные инвазии. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы, которые содержат слитые белки, имеющие как нацеливающий домен, полученный из антитела, так и эффекторный сериновый протеазный домен, способный активировать один или более путей комплемента, доставляют активность, нацеленную на активацию комплемента, в место нахождения антигена, на который нацелено антитело. Целевые клетки или ткани определяются антигенсвязывающим доменом, выбранным для применения в слитом белке.

Платформа T-CAT поддерживает естественную иммунную защиту хозяина, сочетая специфичность иммуноглобулинов хозяина в отношении компонентов микробной поверхности со способностью инициализировать активацию комплемента непосредственно на поверхности микробной мишени, не полагаясь на жестко контролируемые и сложные пути активации, зависящие от распознавания паттернов, которые могут быть подорваны механизмами ускользания патогенов. Аналогично, платформа T-CAT поддерживает атаку иммунной системы на злокачественные клетки путем активации комплемента на поверхности злокачественных клеток, несмотря на сверхэкспрессию негативных регуляторных компонентов комплемента.

Технология T-CAT преодолевает стерические требования антител к регуляции активации комплемента, поскольку ни одна из паттерн-распознающих молекул классического и лектинового путей не требуется для инициации активации комплемента. В большей степени, отдельные нацеленные комплемент-активирующие молекулы могут активировать комплемент, воздействуя на поверхность активатора, который экспрессирует отдельные лиганды/антигены, на которые нацелен антигенсвязывающий сайт, находящийся в нацеленной на комплемент-активирующие молекуле.

Еще одним преимуществом платформы T-SAT является то, что для нацеленных комплемент-активирующих молекул не требуется комплекс распознавания плазмы, такой как комплекс C1. Для обоих классического и лектинового пути обычно требуется образование иммунных комплексов, связанных с активирующими поверхностями на определенном расстоянии друг от друга, чтобы вызвать конформационные изменения, которые инициируют превращение сериновых протеаз в их ферментативно активную форму и запускают каскад событий расщепления, что приводит к активации комплемента. Такая активация индуцирует врожденную иммунную защиту, которая нацелена на патогены или чужеродные клетки, включая одноклеточных или многоклеточных паразитов и клетки-хозяева, которые стали трансформированными, злокачественными, лишенными кислорода, гипотермическими, инфицированными вирусом, несоответствующими МНС или поврежденными иным образом. Поскольку одна нацеленная на комплемент-активирующая молекула может инициировать активацию комплемента на целевой поверхности, то способность поврежденных, мутантных или инфицированных вирусом клеток-хозяев, паразитарных чужеродных клеток или патогенных бактерий вмешиваться в хорошо регулируемую активацию системы комплемента хозяина может быть ограничена. Примерами таких стратегий являются молекулярная мимикрия (клетка или патоген покрывают себя негативными регуляторными белками комплемента) или наличие развившихся факторов патогенности, которые способствуют инфекционности, таких как гликопротеин С герпесвирусов или кальретикулин на поверхности клеток видов *Trypanosoma*.

### **III. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы**

Настоящее изобретение относится к нацеленным комплемент-активирующим молекулам, содержащим а) мишень-связывающий домен и б) эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент. Такие молекулы обладают способностью доставлять нацеленную активность активации комплемента на поверхность клетки, тем самым приводя к комплемент-опосредованному лизису клетки-мишени. Активность активации комплемента может быть доставлена в отдельные клетки, экспрессирующие антиген-мишень, или в ткани, в которых экспрессируется антиген-мишень.

#### **A. Эффекторные сериновые протеазные домены, активирующие комплемент**

В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен нацеленных комплемент-активирующих молекул получен из компонентов системы комплемента. В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит MASP-1, MASP-2, MASP-3, C1r, C1s, фактор комплемента D (CFD), C2a или фактор Bb. В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит фрагмент любой из вышеуказанных протеаз, обладающих активностью сериновой протеазы. Например, сериновый протеазный домен может содержать домены CCP1-CCP2-SP MASP-1, MASP-2, MASP-3, C1r или C1s. Можно использовать любую сериновую протеазу, которая активирует любой из классического, лектинового или

альтернативного путей комплемента, а также любой фрагмент такой сериновой протеазы, который сохраняет такую активность. В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит эффекторный сериновый протеазный домен MASP-1 (SEQ ID NO:67), MASP-2 (SEQ ID NO:57), MASP-3 (SEQ ID NO:66), C1r (SEQ ID NO:69), C1s (SEQ ID NO:76), C2a (SEQ ID NO:88), Bb (SEQ ID NO:89), зрелого CFD (SEQ ID NO:90) или про-CFD (SEQ ID NO:92).

В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, находится в неактивной зимогенной форме, для которой требуется активация для образования активной сериновой протеазы. Такая активация может быть обеспечена другими молекулами, содержащими тот же эффекторный сериновый протеазный домен, молекулами, содержащими другой эффекторный сериновый протеазный домен, или любыми другими химическими или ферментативными средствами. В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, находится в каталитически активной форме. Одним из примеров эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, в форме зимогена является про-CFD, который превращается в активную форму, зрелый CFD, посредством удаления пептида активации из 6 аминокислот. Многие другие сериновые протеазы, активирующие комплемент, включая MASP-1, MASP-2, MASP-3, C1r и C1s, также имеют как активную, так и зимогенную формы.

В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит одну или более мутаций относительно сериновой протеазы дикого типа. В эффекторном сериновом протеазном домене, активирующем комплемент, может присутствовать любое количество мутаций при условии, что он сохраняет некоторый уровень активности сериновой протеазы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с последовательностью дикого типа соответствующего эффекторного серинового протеазного домена. Такие мутации могут оказывать благоприятное воздействие на нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, например, повышать устойчивость к деградации белка или повышать устойчивость к ингибированию эндогенными серпинами, такими как ингибитор C1, или другими ингибиторами активности сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит одну или более мутаций относительно сериновой протеазы дикого типа, такой как MASP-2<sup>R444K</sup> (SEQ ID NO:58), MASP-2<sup>K317Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:61), MASP-2<sup>K321Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:62), MASP-2<sup>K342Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:63), MASP-2<sup>K350Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:64), MASP-2<sup>K356Q, R444K</sup>



(SEQ ID NO:65), MASP-1<sup>R504Q</sup> (SEQ ID NO:68), C1r<sup>K374Q</sup> (SEQ ID NO:70), C1r<sup>R380Q</sup> (SEQ ID NO:71), C1r<sup>H484W</sup> (SEQ ID NO:72), C1r<sup>G485W</sup> (SEQ ID NO:73), C1r<sup>R486W</sup> (SEQ ID NO:74), C1s<sup>K308Q</sup> (SEQ ID NO:78), C1s<sup>K310Q</sup> (SEQ ID NO:79), C1s<sup>R314Q</sup> (SEQ ID NO:80), C1s<sup>R331Q</sup> (SEQ ID NO:81), C1s<sup>K346Q</sup> (SEQ ID NO:82), C1s<sup>K351Q</sup> (SEQ ID NO:83), C1s<sup>K353Q</sup> (SEQ ID NO:84), C1s<sup>D456W</sup> (SEQ ID NO:85), C1s<sup>N457W</sup> (SEQ ID NO:86 и C1s<sup>P458W</sup> (SEQ ID NO:87).

### **В. Мишень-связывающие домены**

В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен нацеленной на комплемент-активирующей молекулы получен из антитела. Антитело может представлять собой встречающееся в природе антитело любого класса или подкласса или сконструированное антитело любого типа. Например, мишень-связывающий домен может быть получен из Fab-фрагмента антитела, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fab'-фрагмента, Fv-фрагмента, фрагмента одноцепочечного антитела, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), однодоменного антитела (например, sdAb, sdFv или нанотела) или его фрагмента, или интратела, пептидного антитела, химерного антитела, гуманизированного антитела, полиспецифического антитела или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен нацеленной на комплемент-активирующей молекулы содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит антитело VH и/или VL. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит от одного до шести CDR антитела.

В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит Fc-участок или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления Fc-участок содержит одну или более мутаций, которые модифицируют (например, усиливают или ослабляют) одну или более функций Fc-содержащего полипептида. Такие функции включают, например, связывание Fc-рецептора, модуляцию периода полувыведения антитела, функцию ADCC, связывание белка А, связывание белка G и связывание комплемента.

В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на клетке. В некоторых вариантах осуществления антиген находится на раковой клетке. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой злокачественную солидную опухоль или гематологический рак. Например, рак может представлять собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак органов желудочно-кишечного тракта, рак печени, рак почки, лимфому, лейкоз, рак легких, меланому, метастатическую меланому, мезотелиому, миелому, нейробластому, рак яичника, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, почечноклеточный рак, рак кожи или рак матки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой акустическую неврому, анальный рак (включая карциному *in situ*), плоскоклеточную карциному, опухоль надпочечника (включая аденому, гиперальдостеронизм, адренокортикальный рак), синдром Кушинга, доброкачественную параганглиому, рак аппендикса (включая псевдомиксому брюшины, карциноидные опухоли, некарциноидные опухоли аппендикса),

рак желчных протоков (включая рак внутриспеченочных желчных протоков, рак внепеченочных желчных протоков, рак перихилиарных желчных протоков, рак дистальных желчных протоков), рак желчного пузыря, рак костей (включая хондросаркому, остеосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, фибросаркому, хордому), опухоли головного мозга (в т.ч. краниофарингиому, дермоидные кисты, эпидермоидные опухоли, глиому, астроцитому, астроцитому низкой степени злокачественности, анапластическую астроцитому, эпендимому, глиобластому, олигодендроглиому, гемангиобластому, опухоли шишковидной железы, опухоли гипофиза, саркому, хордому), рак молочной железы (включая дольковую карциному, тройной негативный рак молочной железы, рецидивирующий рак молочной железы, метастазы в головной мозг), рак мочевого пузыря (включая переходноклеточный рак мочевого пузыря, плоскоклеточную карциному, аденокарциному), рак неизвестного первичного происхождения (CUP) (включая аденокарциному, низкодифференцированную карциному, плоскоклеточную карциному, низкодифференцированное злокачественное новообразование, нейроэндокринную карциному), рак шейки матки (включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному, смешанную карциному), карциноидную опухоль, герминогенную опухоль у детей (включая опухоли желточного мешка, тератому, эмбриональную карциному, полиэмбриому, герминому), опухоль головного мозга у детей (включая эпендимому, краниофарингиому, хордому, плеоморфную ксантоастроцитому, менингиому, примитивные нейроэктодермальные опухоли, ганглиоглиому, пинеобластому, герминогенные опухоли, смешанные глиальные и нейрональные опухоли, астроцитому, опухоли сосудистого сплетения), лейкоз в детском возрасте (включая лимфобластный лейкоз, миелолейкоз), гематологические заболевания у детей (включая анемию Фанкони, анемию Даймонда-Блекфана, апластическую анемию, синдром Швахмана-Даймонда, синдром Костмана, нейтропению, тромбоцитопению, гемоглобинопатии, эритроцитоз, гистиоцитарные расстройства, перегрузку железом, нарушения свертываемости и кровотечения), рак печени у детей (включая гепатобластому, гепатоцеллюлярную карциному), лимфому у детей (включая лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, лимфобластную лимфому, крупноклеточную лимфому), остеосаркомы у детей; меланомы у детей; саркомы мягких тканей у детей, рак толстого кишечника (включая аденокарциному, синдром наследственного неполипозного колоректального рака, семейный аденоматозный полипоз), десмопластические мелкокруглоклеточные опухоли (DSRCT); рак пищевода (включая аденокарциному, плоскоклеточный рак), саркому Юинга (включая саркому кости Юинга, внекостную опухоль Юинга, периферические примитивные нейроэктодермальные опухоли), рак глаза (включая увеальную меланому, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, меланому века, меланому конъюнктивы, карциному слезных желез, карциному Меркеля, лимфому из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, орбитальную лимфому, орбитальную саркому, менингиому глазницы и зрительного нерва, метастатические орбитальные

опухоли, лимфому слезной железы, аденоидно-кистозную карциному, плеоморфную аденому, переходноклеточную карциному, лимфому слезного мешка); рак маточной трубы (включая эндометриоидную аденокарциному, серозную аденокарциному, лейомиосаркому, переходноклеточный рак маточной трубы); лимфому Ходжкина (включая классическую лимфому Ходжкина, нодулярную склерозирующую лимфому Ходжкина, богатую лимфоцитами классическую лимфому Ходжкина, смешанно-клеточную лимфому Ходжкина, лимфому Ходжкина с истощением лимфоцитов, лимфому Ходжкина с преобладанием лимфоцитов), имплант-ассоциированную анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL); воспалительный рак молочной железы (IBC); рак почки (включая почечноклеточную карциному, уротелиальный рак почки, лоханки и мочеточника); лейкоз (включая острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз), рак печени (включая гепатоцеллюлярную карциному, фиброламельлярную гепатоцеллюлярную карциному, ангиосаркому, гепатобластому, гемангиосаркому), рак легкого (включая немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному, плоскоклеточную карциному, крупноклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, карциноидную опухоль, карциному слюнной железы, метастазы в легкие, саркому); медуллобластому; меланому (включая меланому кожи, поверхностно-распространяющуюся меланому, узловую меланому, злокачественную лентиго-меланому, акральную лентигинозную меланому, меланому глаза, меланому слизистой оболочки); мезотелиому (включая саркоматоидную мезотелиому, бифазную мезотелиому), множественные эндокринные неоплазии (MEN) (включая множественные эндокринные неоплазии типа 1, множественные эндокринные неоплазии типа 2); множественную миелому; миелодиспластический синдром (MDS) (включая рефрактерную анемию, рефрактерную цитопению с мультилинейной дисплазией, рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами, рефрактерную анемию с избытком бластов, рефрактерную цитопению с мультилинейной дисплазией и кольцевыми сидеробластами); миелопролиферативные расстройства (MPD) (включая истинную полицитемию, первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию, системный мастоцитоз, гиперэозинофильный синдром); нейробластому; нейрофиброматоз (включая нейрофиброматоз 1 типа, нейрофиброматоз 2 типа, шванноматоз); неходжкинские лимфомы (включая В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, НК-клеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани, ассоциированную со слизистыми оболочками, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому, диффузную крупноклеточную лимфому, первичную медиастинальную крупноклеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфобластную лимфому, лимфому маргинальной зоны); рак ротовой полости (включая плоскоклеточную карциному); рак яичников (включая эпителиальный рак яичников, герминогенный рак яичников, стромальный рак яичников, первичный перитонеальный рак яичников); рак поджелудочной железы (включая карциному островковых клеток, саркому, лимфому, псевдопапиллярные новообразования,

ампулярный рак, панкреатобластому, аденокарциному); заболевания паразитовидной железы (включая гиперпаратиреоз, гипопаратиреоз, рак паразитовидной железы), рак полового члена (включая плоскоклеточную карциному, саркому Капоши, аденокарциному, меланому, базальноклеточную карциному); опухоль гипофиза (включая нефункционирующие опухоли, функционирующие опухоли, рак гипофиза), рак предстательной железы (включая аденокарциному, интраэпителиальную неоплазию предстательной железы), рак прямой кишки (включая аденокарциному), ретинобластому (включая одностороннюю ретинобластому, двустороннюю ретинобластому, ретинобластому PNET), рак кожи (включая базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, актинический (солнечный) кератоз); опухоли основания черепа (включая менингиому, аденому гипофиза, акустическую неврому, гломусные опухоли, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденоиднокистозную карциному, аденокарциному, хондросаркому, рабдомиосаркому, остеосаркому, эстезиобластому, нейроэндокринную карциному, меланому слизистой оболочки), саркомы мягких тканей; опухоли спинного мозга (включая интрамедуллярные опухоли спинного мозга, интрадуральные экстрамедуллярные опухоли спинного мозга, экстрадуральные опухоли спинного мозга, остеобластому, энхондрому, аневризматические костные кисты, гигантоклеточные опухоли, гангиому, эозинофильную гранулему, остеосаркому, хордому, хондросаркому, плазмоцитому); рак желудка (включая лимфому, желудочно-кишечные стромальные опухоли, карциноидные опухоли); рак яичка (включая герминогенные опухоли, несеминому, семиному, эмбриональную карциному, опухоли желточного мешка, тератому, опухоли из клеток Сертоли, хориокарциному, стромальные опухоли, опухоли из клеток Лейдига); рак горла (включая плоскоклеточную карциному); рак щитовидной железы (включая папиллярный рак щитовидной железы, фолликулярный рак щитовидной железы, карциному из клеток Гюртле, медуллярный рак щитовидной железы, анапластический рак щитовидной железы); рак матки (включая эндометриоидную аденокарциному, карциносаркому матки, саркому матки); рак влагалища (включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному, меланому, саркому); рак вульвы (включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному, меланому, саркому); болезнь Гиппеля-Линдау; макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой антиген, ассоциированный с раком. Например, антиген может представлять собой CD20, CD38 или CD52. Другие антигены, ассоциированные с раком, известны в данной области, и на них также может быть нацелен мишень-связывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен связывается с антигеном клеточной поверхности иммунной клетки, вызывающей аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой В- или Т-клетку. Некоторые антигены, ассоциированные с раком, также являются антигенами-мишенями для аутоиммунных заболеваний, например CD20, CD38 и CD52. Примеры аутоиммунных заболеваний включают ревматоидный артрит, системную

красную волчанку, рассеянный склероз, аутоиммунный диабет, аутоиммунный энцефалит, пузырчатку обыкновенную, васкулит, синдром Шегрена и миастению. В данной области известны другие аутоиммунные заболевания.

В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на микробном патогене. Патоген может представлять собой бактериальный патоген, вирусный патоген, грибковый патоген или паразитарный патоген. Примеры бактериальных патогенов включают *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* и виды *Listeria*. Примеры вирусных патогенов включают вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирусы, вирусы гриппа, вирус лихорадки Западного Нила, цитомегаловирусы и коронавирусы, включая SARS-CoV-2. Примеры грибковых патогенов включают виды *Candida albicans* и *Aspergillus*. Примеры паразитарных патогенов включают *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* и *Trypanosoma cruzi*. В некоторых вариантах осуществления антиген экспрессируется на поверхности микробного патогена или на поверхности клетки, инфицированной микробным патогеном. Например, антиген может представлять собой фактор Н-связывающий белок *N. meningitidis* (fHbP), поверхностный белок А пневмококка *S. pneumoniae* (PspA), белок А *S. aureus*, фибронектин-связывающий белок *S. aureus*, поверхностный гликопротеин 120 ВИЧ-1, S-белок или М-белок SARS-CoV-2, гомолог 5 ретикулоцит-связывающего белка *P. falciparum* или маннановый эпитоп на поверхности грибкового патогена, такого как *C. albicans*.

В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-CD38 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-CD52 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-fHbP антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-PspA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-Fnbp антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-PfRH5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-HIV-1 GP120 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело против S-белка SARS-CoV-2 или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело против М-белка SARS-CoV-2 или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело против маннанового эпитопа грибка *C. albicans* или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, алектумумаб или его антигенсвязывающий фрагмент, даратумумаб или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-fHbP антитело, клон 19, или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-PspA антитело RX1MI005 или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-Fnbp антитело, клон G, или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-PfRH5 антитело R5.004 или его

антигенсвязывающий фрагмент, или анти-PfRH5 антитело R5.016 или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-GP120 антитело PGT121 или его антигенсвязывающий фрагмент, или бeбтeлoвимaб, или его антигенсвязывающий фрагмент, или антитело против грибкового маннана 1A2 или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь ритуксимаба (SEQ ID NO:1) и/или легкую цепь ритуксимаба (SEQ ID NO:2); тяжелую цепь алемтузумаба (SEQ ID NO:93) и/или легкую цепь алемтузумаба (SEQ ID NO:94); тяжелую цепь даратумумаба (SEQ ID NO:95) и/или легкую цепь даратумумаба (SEQ ID NO:96); тяжелую цепь анти-fHbP, клон 19 (SEQ ID NO:103) и/или легкую цепь анти-fHbP клона 19 (SEQ ID NO:104); тяжелую цепь RX1MI005 (SEQ ID NO:120) и/или легкую цепь RX1MI005 (SEQ ID NO:121); тяжелую цепь клона G (SEQ ID NO:124) и/или легкую цепь клона G (SEQ ID NO:125); тяжелую цепь R5.004 (SEQ ID NO:136) и/или легкую цепь R5.004 (SEQ ID NO:137); тяжелую цепь R5.016 (SEQ ID NO:140) и/или легкую цепь R5.016 (SEQ ID NO:141); тяжелую цепь PGT121 (SEQ ID NO:144) и/или легкую цепь PGT121 (SEQ ID NO:145); тяжелую цепь бeбтeлoвимaбa (SEQ ID NO:148) и/или легкую цепь бeбтeлoвимaбa (SEQ ID NO:149), тяжелую цепь 1A2 (SEQ ID NO:128) и/или легкую цепь 1A2 (SEQ ID NO:129); или тяжелую цепь hJF5 (SEQ ID NO:132) и/или легкую цепь hJF5 (SEQ ID NO:133). В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит одну или более мутаций относительно последовательности дикого типа соответствующего домена антитела. Например, мишень-связывающий домен может содержать мутации, которые ингибируют деградацию белка, ингибируют гликозилирование, повышают или снижают аффинность или avidность связывания, или увеличивают период полувыведения *in vivo* нацеленной на комплемент-активирующей молекулы. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность с последовательностью дикого типа соответствующего домена антитела.

### *С. Слитые белки и многоцепочечные молекулы*

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок. Слитый белок содержит эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, слитый с мишень-связывающим доменом. Слитый белок может иметь любую из нескольких конфигураций: а) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с C-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента, б) C-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента, в) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с C-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента,

d) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента, e) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом одноцепочечного или однодоменного антитела или его фрагмента, или f) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом одноцепочечного или однодоменного антитела или его фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления мишень-связывающий домен и эффекторный сериновый протеазный домен в слитом белке соединены линкером. Можно использовать любой подходящий линкер. Примером одного такого линкера является пентамер Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:99), который может присутствовать в одной итерации или повторяться от одного до пяти раз или более, и может начинаться или заканчиваться в частичной итерации; см., например, SEQ ID NO:100.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, полученный из ритуксимаба, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из MASP-2. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, содержащий любую из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 20 и 54-56, и эффекторный сериновый протеазный домен, содержащий любую из SEQ ID NO: 57, 58 и 61-65. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 33, 34, 35, 36, 37 или 38. В некоторых вариантах осуществления слитый белок включает мишень-связывающий домен, полученный из ритуксимаба, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из MASP-3. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, содержащий любую из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 20 и 54-56, и эффекторный сериновый протеазный домен, содержащий SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 12, 13, 14 или 15. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, полученный из ритуксимаба, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из MASP-1. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, содержащий любую из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 20 и 54-56, и эффекторный сериновый протеазный домен, содержащий любую из SEQ ID NO: 67 и 68. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, полученный из ритуксимаба, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из C1r. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, содержащий любую из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 20 и 54-56, и эффекторный сериновый протеазный домен, содержащий любую из SEQ ID NO: 69-74. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 18, 21, 39, 40, 48, 49 или 50. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, полученный из ритуксимаба, и эффекторный сериновый





























связывающий домен, полученный из антитела к *Aspergillus* hJF5, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из C2a. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, содержащий SEQ ID NO: 132 или 133, и эффекторный сериновый протеазный домен, содержащий SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, полученный из антитела к *Aspergillus* hJF5, и эффекторный сериновый протеазный домен, полученный из Bb. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, содержащий SEQ ID NO: 132 или 133, и эффекторный сериновый протеазный домен, содержащий SEQ ID NO: 89.

Несмотря на то, что вышеприведенные слитые белки представлены в качестве примеров слитых белков антителосвязывающего домена и эффекторного серинового протеазного домена, полагается, что могут быть использованы другие связывающие домены антитела вместо приведенных в качестве примеров. Альтернативные связывающие домены антитела включают домены, полученные из других антител к приведенным антигенам, домены, полученные из антител, которые связываются с другими антигенами, находящимися на мишенях, приведенных выше (например, раковые клетки, иммунные клетки, бактерии, грибки, вирусы и паразиты), и полученные из антител, которые связываются с антигенами, находящимися на любых других подходящих мишенях, включая другие типы раковых клеток, иммунные клетки, бактерии, грибки, вирусы и паразиты. Настоящее изобретение относится к нацеленным комплемент-активирующим молекулам, содержащим мишень-связывающие домены, полученные из таких антител, и эффекторный сериновый протеазный домен, как описано в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи антитела или легкой цепи антитела. В таких случаях нацеленная на комплемент-активирующая молекула может содержать дополнительный полипептид, который усиливает связывание антигена, эффекторную функцию, стабильность и т.д. молекулы. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи антитела, и б) легкую цепь антитела или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи антитела, и б) тяжелую цепь антитела или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь антитела и легкая цепь антитела происходят от одного и того же антитела. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула может содержать: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи антитела, и б) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая

молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи ритуксимаба, и б) легкую цепь ритуксимаба или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 4-6, 9, 12, 13, 16, 18, 19, 21, 23, 25-28, 32-47 и 48-53, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи ритуксимаба, и б) тяжелую цепь ритуксимаба или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 7, 8, 14, 15, 17, 29 и 30, и тяжелую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи алемтузумаба, и б) легкую цепь алемтузумаба или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 97, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 94. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи алемтузумаба, и б) тяжелую цепь алемтузумаба или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи даратумумаба, и б) легкую цепь даратумумаба или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 98, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи даратумумаба, и б) тяжелую цепь даратумумаба или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи анти-fHbP клона 19, и б) легкую цепь анти-fHbP клона или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 108, 111, 116, 117, 118 или 119, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах

осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи анти-fHbP клона, и б) тяжелую цепь анти-fHbP клона или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи RX1MI005, и б) легкую цепь RX1MI005 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 122 или 123, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 121. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи RX1MI005, и б) тяжелую цепь RX1MI005 или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи клона G, и б) легкую цепь клона G или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 126 или 127, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 125. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи клона G, и б) тяжелую цепь клона G или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи 1A2, и б) легкую цепь 1A2 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 130 или 131, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 129. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи 1A2, и б) тяжелую цепь 1A2 или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи R5.004, и б) легкую цепь R5.004 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 138 или 139, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 137. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи R5.004, и б) тяжелую цепь R5.004 или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи R5.016, и б) легкую цепь R5.016 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 142 или 143, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи R5.016, и б) тяжелую цепь R5.016 или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи PGT121, и б) легкую цепь PGT121 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 146 или 147, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи PGT121, и б) тяжелую цепь PGT121 или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи бептеловимаба, и б) легкую цепь бептеловимаба или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 150 или 151, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи бептеловимаба, и б) тяжелую цепь бептеловимаба или ее фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи антитела к М-белку SARS-CoV-2, и б) легкую цепь из антитела к М-белку SARS-CoV-2 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи антитела к М-белку SARS-CoV-2, и б) тяжелую цепь из антитела к М-белку SARS-CoV-2 или ее фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из тяжелой цепи hJF5, и б) легкую цепь hJF5 или ее фрагмент. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит

слитый белок, содержащий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 134 или 135, и легкую цепь антитела, содержащую последовательность, показанную в SEQ ID NO: 133. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула содержит: а) слитый белок, содержащий мишень-связывающий домен, полученный из легкой цепи hJF5, и б) тяжелую цепь hJF5 или ее фрагмент.

#### **IV. Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева**

Кроме того, настоящее изобретение относится к выделенным полинуклеотидам, которые кодируют любую из нацеленных комплемент-активирующих молекул, раскрытых в настоящем изобретении, или их частей (например, слитый белок, тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, или легкую цепь антитела или ее фрагмент). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является кодон-оптимизированным для экспрессии в клетке-хозяине. Как только кодирующая последовательность становится известной или идентифицированной, то кодон-оптимизацию можно выполнить с использованием известных методов и инструментов, таких как инструмент GenScript® OptimumGene™ или ThermoFisher Scientific® GeneArt GeneOptimizer™. Кодон-оптимизированные последовательности включают последовательности, которые являются частично кодон-оптимизированными, имеют один или более кодонов, оптимизированных для экспрессии в клетке-хозяине, и последовательности, которые являются полностью кодон-оптимизированными. Также следует понимать, что полинуклеотиды, кодирующие нацеленные комплемент-активирующие молекулы и их части, могут иметь разные нуклеотидные последовательности, но при этом кодирующие один и тот же белок за счет вырожденности генетического кода, сплайсинга и т. д.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий нацеленную на комплемент-активирующую молекулу или ее часть, может содержаться в полинуклеотиде, который включает другие последовательности и/или признаки. Например, полинуклеотид может включать одну или более последовательностей, пригодных для контроля или экспрессии кодированных белков, таких как последовательность(и) промотора, последовательность(и) полиаденилирования, последовательность(и), кодирующая сигнальные пептиды, и т.д. Полинуклеотид может содержать дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) или рибонуклеиновую кислоту (РНК).

Также настоящее изобретение относится к векторам, содержащим или включающим полинуклеотид, который кодирует любую из нацеленных комплемент-активирующих молекул, раскрытых в настоящем изобретении, или их часть. Можно использовать любой подходящий вектор, включая вирусные векторы и плазмидные векторы. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, который кодирует как слитый белок, так и соответствующую тяжелую или легкую цепь антитела, которые вместе составляют нацеленную на комплемент-активирующую молекулу. Последовательность, кодирующая слитый белок, и последовательность, кодирующая тяжелую цепь или легкую цепь антитела, могут находиться в одной



открытой рамке считывания, и в этом случае они необязательно могут быть разделены полинуклеотидом, кодирующим сайт расщепления протеазой, и/или полинуклеотидом, кодирующим саморасщепляющийся пептид. Альтернативно, последовательность, кодирующая слитый белок, и последовательность, кодирующая тяжелую цепь или легкую цепь антитела, могут содержаться в отдельных открытых рамках считывания в одном векторе. В других вариантах осуществления последовательность, кодирующая слитый белок, и последовательность, кодирующая тяжелую цепь или легкую цепь антитела, находятся в двух разных векторах, так что первый вектор кодирует слитый белок, и второй вектор кодирует тяжелую цепь или легкую цепь антитела.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид или вектор, раскрытый в настоящем изобретении. Можно использовать любую подходящую клетку, в которую можно ввести такой полинуклеотид или вектор. Примеры таких клеток включают эукариотические клетки, включающие дрожжевые клетки, клетки животных, клетки насекомых, клетки млекопитающих и растительные клетки, и прокариотические клетки, включающие бактериальные клетки, такие как *E.coli*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой иммортализованную линию клеток млекопитающих. Клетки, подходящие для использования в продукции и экспрессии полинуклеотидов и векторов, известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления клетка может быть трансфектирована полинуклеотидом или вектором, раскрытым в настоящем изобретении. Термин «трансфекция» охватывает любой известный специалисту метод введения молекул нуклеиновой кислоты в клетки. Такие способы включают, например, электропорацию, липофекцию, трансфекцию на основе наночастиц, трансфекцию на основе вируса и т.д. Клетки-хозяева могут быть трансфектированы стабильно или временно.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует нацеленную на комплемент-активирующую молекулу или ее часть, кодированную полинуклеотидом или вектором. Такая экспрессия может включать посттрансляционные модификации, такие как удаление сигнальной последовательности, гликозилирование и другие подобные модификации. В родственном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения нацеленных комплемент-активирующих молекул или их частей, где эти способы включают культивирование клетки-хозяина в течение достаточного периода времени в условиях, обеспечивающих экспрессию молекул, и выделение молекул. Способы, пригодные для выделения и очистки белков, полученных рекомбинантным путем, включают, например, получение супернатанта из подходящих клеток-хозяев, которые секретируют белки в культуральную среду, концентрирование среды и очистку белка посредством пропускания концентрата через подходящую очищающую матрицу или серию матриц. Способы очистки белков хорошо известны в данной области.

## **V. Фармацевтические композиции**

Настоящее изобретение также относится к композициям, которые содержат терапевтический агент, выбранный из любой одной или более нацеленных комплемент-активирующих молекул, описанных в настоящем изобретении, полинуклеотиды, векторы или клетки-хозяева, по отдельности или в любой комбинации, и могут также включать другие выбранные терапевтические агенты. Такие композиции могут дополнительно содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей, эксципиентов или разбавителей.

Фармацевтически приемлемый носитель является нетоксичным, биосовместимым и выбран таким образом, чтобы не оказывать отрицательного воздействия на биологическую активность терапевтического агента (и любых других терапевтических агентов, объединенных с ним). Примеры фармацевтически приемлемых носителей пептидов описаны в патенте США № 5211657, выданном Yamada. Терапевтические агенты, описанные здесь, могут быть формулированы в виде препаратов в твердой, полутвердой, гелевой, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази, растворы, депо-препараты, ингаляционные препараты и инъекционные препараты, позволяющие применять перорально, парентерально или инъекционно, посредством хирургического введения. Также предусматривается местное введение композиций посредством нанесения покрытия на медицинские устройства и т.п.

Подходящие носители для парентеральной доставки посредством инъекции, инфузии или ирригации и местной доставки включают дистиллированную воду, забуференный фосфатом физиологический раствор, нормальный раствор Рингеоа или раствор Рингера-лактат, раствор декстрозы, раствор Хэнкса или пропандиол. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды можно использовать стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно использовать любое биосовместимое масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение в приготовлении инъекционных препаратов. Носитель и агент могут быть формулированы в виде жидкости, суспензии, полимеризуемого или непимеризуемого геля, пасты или мази.

Носитель также может содержать средство доставки для поддержания (т.е. продления, замедления или регуляции) доставки средств или для усиления доставки, захвата, стабильности или фармакокинетики терапевтических средств. Такое средство доставки может включать, в качестве неограничивающего примера, микрочастицы, микросферы, наносферы или наночастицы, состоящие из белков, липосом, углеводов, синтетических органических соединений, неорганических соединений, полимерных или сополимерных гидрогелей и полимерных мицелл. Подходящие системы доставки на основе гидрогелей и мицелл включают сополимеры PEO:РНВ:PEO и комплексы сополимер/циклодекстрин, описанные в WO 2004/009664 A2, и PEO и комплексы PEO/циклодекстрин, описанные в публикации патентной заявки США № 2002/0019369 A1. Такие гидрогели можно инъектировать местно в участок предполагаемого действия или подкожно или внутримышечно для образования депо для замедленного

высвобождения.

Композиции по настоящему изобретению можно составлять для доставки любым подходящим способом, включая, помимо прочего, пероральный, местный, чрескожный, сублингвальный, буккальный, подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный путь, или в виде ингаляционного средства.

Композиции по настоящему изобретению могут также включать биосовместимые эксципиенты, такие как диспергирующие или смачивающие агенты, суспендирующие агенты, разбавители, буферы, усилители проникновения, эмульгаторы, связующие вещества, загустители, вкусовые вещества (для перорального введения).

Фармацевтические композиции согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения составляют таким образом, чтобы обеспечить биодоступность содержащихся в них активных ингредиентов при введении композиции пациенту. Композиции, которые будут вводиться субъекту, могут иметь форму одной или более разовых лекарственных форм, и контейнер описанного здесь терапевтического агента может содержать множество разовых лекарственных форм. Реальные способы приготовления таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области; например, см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). Композиция, подлежащая введению, в любом случае будет содержать эффективное количество терапевтического агента или композиции по настоящему изобретению для лечения заболевания или патологического состояния, представляющего интерес, в соответствии с идеями настоящего изобретения.

Композиция может быть в форме твердого вещества или жидкости. В некоторых вариантах осуществления носитель(и) представляют собой частицы, так что композиции находятся, например, в форме таблеток или порошка. Носитель(и) может быть жидким, и композиции представляют собой, например, масло для перорального применения, жидкость для инъекций или аэрозоль, который можно использовать, например, при ингаляционном введении. Когда фармацевтическая композиция предназначена для перорального введения, то предпочтительно она находится либо в твердой, либо в жидкой форме, где полутвердые, полужидкие формы, суспензия и гель, включаются в формы, рассматриваемые здесь как твердые или жидкие.

В качестве твердой композиции для перорального введения фармацевтическая композиция может быть представлена в виде порошка, гранулы, прессованной таблетки, пилюли, капсулы, жевательной резинки, облатки и т.п. Такая твердая композиция обычно содержит один или более инертных наполнителей или разбавителей, таких как сахароза, кукурузный крахмал или целлюлоза. Кроме того, может присутствовать одно или более из следующих веществ: связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь или желатин; эксципиенты, такие как крахмал, лактоза или декстрины, разрыхлители, такие как альгиновая кислота, альгинат натрия, примогель, кукурузный крахмал и тому подобное;

смазывающие вещества, такие как стеарат магния или Sterotex; скользящие вещества, такие как коллоидный диоксид кремния; подсластители, такие как сахароза или сахарин; ароматизатор, такой как перечная мята, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор; и краситель. Когда композиция находится в форме капсулы, например, желатиновой капсулы, то она может содержать, помимо веществ вышеуказанного типа, жидкий носитель, такой как полиэтиленгликоль или масло.

Композиция может быть в форме жидкости, например, эликсира, сиропа, раствора, эмульсии или суспензии. Жидкость может быть предназначена для перорального введения или для доставки посредством инъекции, в качестве двух примеров. Предпочтительные композиции, предназначенные для перорального введения, содержат, помимо соединений по настоящему изобретению, один или более подсластителей, консервантов, красок/красителей и усилителей вкуса. В композицию, предназначенную для инъекционного введения, может быть включено одно или более из поверхностно-активного вещества, консерванта, смачивающего агента, диспергатора, суспендирующего агента, буфера, стабилизатора и изотонического агента.

Жидкие фармацевтические композиции, будь то растворы, суспензии или другие подобные формы, могут включать один или более из следующих эксципиентов: стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический хлорид натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить растворителем или суспендирующей средой, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Препарат для парентерального введения может быть заключен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы из стекла или пластика. Физиологический раствор является предпочтительным эксципиентом. Инъекционная фармацевтическая композиция предпочтительно является стерильной.

Жидкая композиция, предназначенная для парентерального или перорального введения, должна содержать такое количество терапевтического агента, как описано здесь, чтобы можно было обеспечить подходящую дозировку. Термин «парентеральная» включает подкожную, внутривенную, внутримышечную, интрастернальную или внутриартериальную инъекцию или инфузию. Обычно терапевтический агент составляет по меньшей мере 0,01% композиции. Когда он предназначен для перорального введения, то это количество может варьировать в пределах приблизительно от 0,1% до приблизительно 70% от массы композиции. Некоторые пероральные фармацевтические композиции содержат приблизительно от 4% до приблизительно 75% терапевтического агента.

Композиция может быть предназначена для местного применения, и в этом случае носитель может содержать раствор, эмульсию, мазевую или гелевую основу. Основа, например, может содержать одно или более из следующих веществ: вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, пчелиный воск, минеральное масло, разбавители, такие как вода и спирт, а также эмульгаторы и стабилизаторы. Загустители могут присутствовать в композиции для местного применения. Если композиция предназначена для чрескожного введения, то она может включать трансдермальный пластырь или устройство для ионофореза. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для ректального введения, в форме, например, суппозитория, который плавится в прямой кишке и высвобождает лекарственное средство. Композиция для ректального введения может содержать маслянистую основу в качестве подходящего нераздражающего наполнителя. Такие основы включают, помимо прочего, ланолин, какао-масло и полиэтиленгликоль.

Композиция может включать различные вещества, которые изменяют физическую форму твердой или жидкой разовой лекарственной формы. Например, композиция может включать вещества, которые образуют оболочку вокруг активных ингредиентов. Вещества, которые образуют покровную оболочку, обычно являются инертными, и могут быть выбраны, например, из сахара, шеллака и других агентов для энтеросолюбильного покрытия. Альтернативно активные ингредиенты могут быть заключены в желатиновую капсулу. Композиция в твердой или жидкой форме может включать агент, который связывается с терапевтическим агентом(ами) по настоящему изобретению и тем самым способствует доставке соединения. Подходящие агенты, которые могут функционировать в этом качестве, включают один или более белков или липосому.

Композиция может состоять по существу из дозированных единиц, которые можно вводить в виде аэрозоля. Термин «аэрозоль» используется для обозначения различных систем, начиная от систем коллоидной природы и заканчивая системами, состоящими из упаковок под давлением. Доставка может быть обеспечена посредством сжиженного или сжатого газа или посредством подходящей системы с насосом, которые диспергируют активные ингредиенты. Аэрозоли могут доставляться в однофазной, двухфазной или трехфазной системе для доставки активного ингредиента(ов). Доставка аэрозоля включает необходимый контейнер, активаторы, клапаны, субконтейнеры и т.п., которые вместе могут образовывать набор. Специалисты в данной области без ненужных экспериментов может определить предпочтительные аэрозоли.

Следует понимать, что композиции по настоящему изобретению также включают молекулы-носители полинуклеотидов, как описано в настоящем изобретении (например, липидные наночастицы, наноразмерные платформы для доставки и т.п.).

Фармацевтические композиции можно получить по методологии, хорошо известной в фармацевтической области. Например, композиция, предназначенная для инъекционного введения, может быть получена объединением композиции, которая содержит терапевтический агент, описанный здесь, и, необязательно, одну или более солей, буферов и/или стабилизаторов, со стерильной дистиллированной водой с

образованием раствора. Для облегчения образования гомогенного раствора или суспензии может быть добавлено поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества представляют собой соединения, которые нековалентно взаимодействуют с композицией для облегчения растворения или образования гомогенной суспензии в водной системе доставки.

## **VI. Способы и применение**

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам применения нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по настоящему изобретению для активации одного или более путей комплемента у субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления активируются классический путь комплемента, лектиновый путь комплемента или альтернативный путь комплемента. В некоторых вариантах осуществления активируются любые два или все три пути комплемента. В некоторых вариантах осуществления нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяин или композицию по настоящему изобретению можно использовать для индукции комплемент-зависимой гибели клеток (CDC), комплемент-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) клетки-мишени. Такие способы включают приведение в контакт клетки-мишени с нацеленной на комплемент-активирующей молекулой или композицией, содержащей нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, где указанный контакт приводит к отложению комплемента на клетке-мишени, тем самым приводя к опосредованной комплементом гибели клеток.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции у субъекта, включающим введение субъекту терапевтически эффективного количества нацеленной на комплемент-активирующей молекулы или композиции, содержащей указанную нацеленную на комплемент-активирующую молекулу. В некоторых вариантах осуществления рак лечат с использованием нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, содержащей нацеливающий домен, который связывается с раковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологический рак. Например, рак может представлять собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак органов желудочно-кишечного тракта, рак печени, рак почки, лимфому, лейкоз, рак легких, меланому, метастатическую меланому, мезотелиому, миелому, нейробластому, рак яичника, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, почечноклеточный рак, рак кожи или рак матки. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание лечат с использованием нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, которая содержит нацеливающий домен, который связывается с антигеном клеточной поверхности на иммунной клетке, вызывающей аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой В-клетку или

Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, системную красную волчанку, рассеянный склероз, аутоиммунный диабет, аутоиммунный энцефалит, пузырчатку обыкновенную, васкулит, синдром Шегрена или миастению. В некоторых вариантах осуществления микробную инфекцию лечат с использованием нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, содержащей нацеливающий домен, который связывается с антигеном, находящимся на поверхности микробного патогена или на поверхности клетки, инфицированной микробным патогеном. В некоторых вариантах осуществления инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию. В некоторых вариантах осуществления бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* или виды *Listeria*. В некоторых вариантах осуществления вирусный патоген представляет собой вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила или цитомегаловирус. В некоторых вариантах осуществления грибковый патоген представляет собой *Candida albicans* или вид *Aspergillus*. В некоторых вариантах осуществления паразитарным патогеном является *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.

Настоящее изобретение также относится к применению нацеленной на комплемент-активирующей молекулы, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции по настоящему изобретению для лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула для применения в лечении рака, содержит нацеливающий домен, который связывается с раковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологический рак. Например, рак может представлять собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак органов желудочно-кишечного тракта, рак печени, рак почки, лимфому, лейкоз, рак легких, меланому, метастатическую меланому, мезотелиому, миелому, нейробластому, рак яичника, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, почечноклеточный рак, рак кожи или рак матки. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула для применения в лечении аутоиммунного заболевания, содержит нацеливающий домен, который связывается с антигеном, ассоциированным с аутоиммунным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, системную красную волчанку, рассеянный склероз, аутоиммунный диабет, аутоиммунный энцефалит, пузырчатку обыкновенную, васкулит, синдром Шегрена или миастению. В некоторых

вариантах осуществления нацеленная на комплемент-активирующая молекула для применения в лечении микробной инфекции, содержит нацеливающий домен, который связывается с антигеном, находящимся на поверхности микробного патогена или на поверхности клетки, инфицированной микробным патогеном. В некоторых вариантах осуществления инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию. В некоторых вариантах осуществления бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* или виды *Listeria*. В некоторых вариантах осуществления вирусный патоген представляет собой вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила или цитомегаловирус. В некоторых вариантах осуществления грибковый патоген представляет собой *Candida albicans* или вид *Aspergillus*. В некоторых вариантах осуществления паразитарным патогеном является *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.

Настоящее изобретение относится к нацеленной на комплемент-активирующей молекуле, полинуклеотиду, вектору, клетке-хозяину или композиции по настоящему изобретению для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство для лечения рака содержит нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, содержащую нацеливающий домен, который связывается с раковым антигеном. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или гематологический рак. Например, рак может представлять собой рак головного мозга, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, рак органов желудочно-кишечного тракта, рак печени, рак почки, лимфому, лейкоз, рак легких, меланому, метастатическую меланому, мезотелиому, миелому, нейробластому, рак яичника, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, почечноклеточный рак, рак кожи или рак матки. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство для лечения аутоиммунного заболевания содержит нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, содержащую нацеливающий домен, который связывается с антигеном, ассоциированным с аутоиммунным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, системную красную волчанку, рассеянный склероз, аутоиммунный диабет, аутоиммунный энцефалит, пузырчатку обыкновенную, васкулит, синдром Шегрена или миастению. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство для лечения микробной инфекции содержит нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, содержащую нацеливающий домен, который связывается с антигеном, находящимся на поверхности микробного



патогена или на поверхности клетки, инфицированной микробным патогеном. В некоторых вариантах осуществления микробная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию. В некоторых вариантах осуществления бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* или виды *Listeria*. В некоторых вариантах осуществления вирусный патоген представляет собой вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила или цитомегаловирус. В некоторых вариантах осуществления грибковый патоген представляет собой *Candida albicans* или вид *Aspergillus*. В некоторых вариантах осуществления паразитарным патогеном является *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.

Введение нацеленных комплемент-активирующих молекул или композиций по настоящему изобретению может осуществляться любым подходящим путем, включая пероральный, местный, чрескожный, сублингвальный, буккальный, подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный или в виде ингаляционного средства. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы или композиции по настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективном количестве, где это количество будет варьировать в зависимости от множества факторов, включая конкретные используемые молекулы, метаболическую стабильность и продолжительность действия молекул, возраст, пол, массу тела, общее состояние здоровья и рацион субъекта, способ и время введения, скорость выведения, любые дополнительные терапевтические агенты, вводимые субъекту в тот же период времени, тяжесть конкретного расстройства или заболевания, и генетический и эпигенетический фон субъекта. В некоторых вариантах осуществления нацеленные комплемент-активирующие молекулы или композиции можно вводить субъекту 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз или более. Последовательное введение можно осуществлять с любым интервалом, включая интервал приблизительно 6, приблизительно 12, приблизительно 24, приблизительно 36, приблизительно 48, приблизительно 74, приблизительно 96 или приблизительно 108 ч или более.

В некоторых вариантах осуществления нацеленные комплемент-активирующие молекулы, полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева или композиции по настоящему изобретению используются в комбинации с другими терапевтическими средствами. Такая комбинированная терапия может включать введение одной фармацевтической лекарственной формы, которая содержит нацеленные комплемент-активирующие молекулы или композиции по настоящему изобретению вместе с одним или более дополнительными терапевтическими средствами, или нацеленные комплемент-активирующие молекулы или композиции по настоящему изобретению, и каждое дополнительное терапевтическое средство можно вводить в виде отдельной

лекарственной формы. При использовании отдельных лекарственных форм нацеленные комплемент-активирующие молекулы или композиции по настоящему изобретению и дополнительные терапевтические средства можно вводить по существу в одно и то же время, т.е. одновременно, или в разное время, т.е. последовательно в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия может включать введение двух или более различных нацеленных комплемент-активирующих молекул по настоящему изобретению, или двух или более композиций, каждая из которых содержит разные нацеленные комплемент-активирующие молекулы по настоящему изобретению.

### VII. Последовательности

Последовательности, упомянутые в настоящем описании, приведены в таблице 3.

**Таблица 3**

SEQ ID NO.	Описание	Последовательность
1	RTX_HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
2	RTX_LC	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGS SPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
3	RTX(H) <sup>ΔK</sup> _HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS

		<p>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPG</p>
4	RTX(H)- M2_HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGQPCPYPM  APPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPLKSFT  AVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPG  VTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSK  GEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLI  LGGTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMG  TLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNN  KVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTAGWGTLTQRGFL  ARNLMYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAG  LESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMN  CGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
5	RTX(H) <sup>ΔK</sup> - M2_HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP</p>

		<p>ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCPYMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKSF  TAVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDA S ALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDS CRGDSGGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
6	M2- RTX(H)_HC	<p>QPCPYMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG  HLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDA  S ALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNL MYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLES GGKDS CRGDSGGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDFGGG  GSGGGGSGGGGQVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGY  TFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK  GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGG  DWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT  AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK  SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS</p>

		KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	RTX(L)- M2_LC	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGS SPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLTSLTSLKADYKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGQPCPYPMAPPNG HVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTA VCQK DGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGVTTYKA VIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGEKSLPV CEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGTTA AGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDA S ALDIRMGT LKRLS PHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVVINS NITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLARNLM YVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGLESGG KDSCRGDSSGALVFLDSETERWFGGIVSWGSMNCGEA GQYGVYTKVINYIPWIENIISDF
8	M2- RTX(L)_LC	QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG HLPLKSFTA VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPG DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDA SALDIRMGT LKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGS VTANMLCAGLESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWFG GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDFGGG GSGGGGSGGGGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSV SYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTS YSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTV AAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLTSLTSLKADYKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

9	RTX(H) <sup>ΔK</sup> - M2 <sup>R444K</sup> _HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPLKSFTA  VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDS CRGDSGGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
10	RTX(H) <sup>ΔK</sup> - M2 <sup>R444Q</sup> _HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPLKSFTA</p>

		<p>VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGQIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQKCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
11	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  M2<sup>S633A</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTA  VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQKCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSCRGDAGGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMN  CGEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
12	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  M3_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</p>

		<p>PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGNECPQLP  PVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTF  QIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGLITFSTRNNL  TTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQGVWMNKV  LGRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRIIGGRNAEPLFPWQA  LIVVEDTSRVPNDKWFGSGALLSASWILTAHVLRQR  DTTVIPVSKEHVTVYLGLHDVDRDKSGAVNSSAARVVLHP  DFNIQNYNHDIALVQLQEPVPLGPHVMPVCLPRLEPEGPA  PHMLGLVAGWGISNPNTVDEIISGTRTLSDVLQYVKLP  VVPHAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYYEGGKDTCLG  DSGGAFVIFDDLSQRWVQGLVSWGGPEECGSKQVYGV  YTKVSNYVDWVWEQMGLPQSVVEPQVER</p>
13	M3- RTX(H)_HC	<p>NECPQLPQPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLK  DNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGL  ITFSTRNNLTTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQ  GVWMNKVLGRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRIIGGRNAE  PGLFPWQALIVVEDTSRVPNDKWFGSGALLSASWILTA  HVLRQRRTTVIPVSKEHVTVYLGLHDVDRDKSGAVNSS  AARVVLHPDFNIQNYNHDIALVQLQEPVPLGPHVMPVCL  PRLEPEGPAPHMLGLVAGWGISNPNTVDEIISGTRTLSD  VLQYVKLPVVPHAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYYE  GGKDTCLGDSGGAFVIFDDLSQRWVQGLVSWGGPEEC  GSKQVYGVYTKVSNYVDWVWEQMGLPQSVVEPQVERG  GGGSGGGGSGGGGQVQLQPGAELVKPGASVKMSCKAS  GYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK  FKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY  GGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG  GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQS</p>



		<p>SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE  PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK  TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
14	RTX(L)- M3_LC	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSVSYIHWFQQKPGS  SPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA  ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  VTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGL  SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGNECPQLPPVHG  KIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTFQIEC  LKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGLITFSTRNNLTTY  KSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQGVWMNKVLGR  SLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRIIGGRNAEPGLFPWQALIV  VEDTSRVPNDKWFGSGALLSASWILTAHVLRSSQRRDIT  VIPVSKEHVTVYLGLHDVRDKSGAVNSSAARVVLHPDFN  IQNYNHDIALVQLQEPVPLGPHVMPVCLPRLEPEGPAPHM  LGLVAGWGISNPNTVDEIISGTRTLSDVLQYVKLPVVP  HAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYEGGKDTCLGDGSG  GAFVIFDDLSQRWVQGLVSWGGPEECGSKQVYGVYTK  VSNYVDWVWEQMGLPQSVVEPQVER</p>
15	M3- RTX(L)_LC	<p>NECPQLPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLK  DNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGL  ITFSTRNNLTTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQ  GVWMNKVLGRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRIIGGRNAE  PGLFPWQALIVVEDTSRVPNDKWFGSGALLSASWILTA  HVLRSSQRRDITVIPVSKEHVTVYLGLHDVRDKSGAVNSS  AARVVLHPDFNIQNYNHDIALVQLQEPVPLGPHVMPVCL  PRLEPEGPAPHMLGLVAGWGISNPNTVDEIISGTRTLSD  VLQYVKLPVVP  HAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYEGGKDTCLGDGSG  GAFVIFDDLSQRWVQGLVSWGGPEECGSKQVYGVYTK  VSNYVDWVWEQMGLPQSVVEPQVERG</p>

		GGGSGGGGSGGGGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASS SVSYIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSG TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16	RTX(H) <sup>ΔK</sup> - M1 <sup>R504Q</sup> _HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGNECPQLP PVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTF QIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGLITFSTRNNL TTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQGVWMNKV LGRSLPTCLPVCGLPKFSRKL MARIFNGRPAQKGTTPWIA MLSHLNGQPF CGGSLLGSSWIVTAAHCLHQSLDPEDPTLQ DSDLLSPSDFKIILGKHWRLRSDENEQHLGVKHTTLHPQY DPNTFENDVALVELLESPVLNAFVMPICLPEGPQQEGAMV IVSGWGKQFLQRFPETLMEIEIPIVDHSTCQKAYAPLKKK VTRDMICAGEKEGGKDACAGDSGGPMVTLNRERGQWYL VGTVSWGDDCGKKDRYGVYSYIHHNKDWIQRVTGVRN
17	M1 <sup>R504Q</sup> - RTX(L)_LC	NECPQLP PVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLK DNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGL ITFSTRNNLTTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQ GVWMNKVLGRSLPTCLPVCGLPKFSRKL MARIFNGRPAQ KGTTPWIAMLSHLNGQPF CGGSLLGSSWIVTAAHCLHQSL DPEDPTLQDSDLLSPSDFKIILGKHWRLRSDENEQHLGV KHTTLHPQYDPNTFENDVALVELLESPVLNAFVMPICLPE

		<p>GPQQEGAMVIVSGWGKQFLQRFPELMEIEIPIVDHSTCQ  KAYAPLKKKVTRDMICAGEKEGGKDACAGDSGGPMVTL  NRERGGWYLVGTVSWGDDCGKKDRYGVYSYIHHNKDW  IQRVTGVRNNGGGGSGGGGSGGGGQIVLSQSPAILSASPGE  KVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYATSNLASGV  PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTF  GGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF  YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST  LTLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
18	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  C1r_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHE  AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD  ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM  GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN  RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD  RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE  D</p>
19	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  C1s_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT</p>

		<p>VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEGRVGATSFY  STCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFHHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
20	RTX <sup>N297G</sup> _HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
21	RTX(H) <sup>N297G,ΔK</sup> - C1r_HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</p>

		<p>PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHE  AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD  ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM  GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN  RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD  RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE  D</p>
22	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>_  Clr<sup>S654A</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK</p>

		<p>MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTA AHTLYPKEHE  AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD  ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM  GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN  RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDAGGVFAVRDPNTD  RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE  D</p>
23	<p>RTX(H)<sup>N297G,AK</sup>_  C1s_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEGRVGATSFY  STCQSNKGKWSNSKLLKCPVDCGIPESIENKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTA AHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFHHPGWKLLEVP EGR TNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
24	<p>RTX(H)<sup>N297G,AK</sup>_  C1s<sup>S632A</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP</p>

		<p>ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEGRVGATSFY  STCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDAGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
25	RTX(H) <sup>ΔK</sup> - C2a_HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGKIQIQRSG  HLNLYLLDSCQSSENDLIFKESASLMVDRIFSFEINVS  VAITFASEPKVLMVSLNDNSRDMTEVISSLENANYKDHE  NGTGTNTYAALNSVYLMNMQMRLGGMETMAWQEIRH  AILLTDGKSNMGGSPKTAVDHIREILNINQKRNDYLDIYA  IGVGKLDVDWRELNELGSKKDGGERHAFILQDTKALHQVF  EHMLDVSKLTDTCGVGNMSANASDQERTPWHVTIKPKS  QETCRGALISDQWVLTAAHCFRDGNDHSLWRVNVGDPK</p>

		<p>SQWGKEFLIEKAVISPGFDVFAKKNQGILEFYGDDIALLLKL  AQKVKMSTHARPICLPCTMEANLALRRPQGSTCRDHENE  LLNKQSVPAHFVALNGSKLNINLKMVGVEWTSCAEVVSQE  KTMFPNLTDVREVVTDQFLCSGTQEDESCKGESGGAVF  LERRFRFFQVGLVSWGLYNPCLGSADKNSRKRAPRSKVP  PPRDFHINLFRMQPWLQRHLGDVNLNPL</p>
26	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  Bb_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGKIVLDPSG  SMNIYLVLDGSDSIGASNFTGAKKCLVNLIKVASYGVPK  RYGLVITYATYPKIWVKVSEADSSNADWVTKQLNEINYED  HKLKSGTNTKKALQAVYSMMSWPDDVPPEGWNRTRHVI  ILMTDGLHNMGGDPITVIDEIRDLLYIGKDRKNPREDYLD  VYVFGVGPLVNQVNINALASKKDNEQHVFVKDMENLE  DVFYQMIDESQSLSLCGMVWEHRKGTDYHKQPWQAKIS  VIRPSKGHESCMGAVVSEYFVLTAHCFTVDDKEHSIKVS  VGGEKRDLEIEVVLFPNYNINGKKEAGIPEFYDYDVALI  KLKNKLYGQTIRPICLPCTEGTTRALRLPPTTTCQQQKEE  LLPAQDIKALFVSEEEKLTRKEVYIKNGDKKGGSCERDAQ  YAPGYDKVKDISEVVTPRFLCTGGVSPYADPNTCRGDSG  GPLIVHKRSRFIQVGVISWGVVDVCKNQKRQKQVPAHAR  DFHINLFQVLPWLKEKQLQDEDLGFL</p>
27	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  MatCFD_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</p>



		<p>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGILGGREAE  AHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLSAAHCLED  AADGKVQVLLGAHLSQPEPSKRLYDVLRAVPHPSQPD  TIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRDVAPGTLC  DVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATCNRRTHHD  GAITERLMCAESNRRDSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSG  SRVCGNRKKPGIYTRVASIAAWIDSVLA</p>
28	MatCFD- RTX(H)_HC	<p>ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS  AAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSQPEPSKRLYDVLRAV  HPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD  VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATC  NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCKGDSGGPLVCGGV  EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASIAAWIDSVLAGGGG  SGGGGSGGGGQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYT  FTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG  KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD  WYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS  CDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR  WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
29	RTX(L)- MatCFD_LC	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFAQKPGS  SPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSSTSYSLTISRVEAEDA  ATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ</p>

		<p>LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL  SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGILGGREAEAHAR  PYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLSAAHCLEDAADG  KVQVLLGAHLSQPEPSKRLYDVLRAVPHPDSPDPTIDHD  LLLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRDVAPGTLCDVAG  WGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATCNRRTHHDGAITE  RLMCAESNRRDSCKGDSGGPLVCGGVLEGVVTSGSRVCG  NRKKPGIYTRVASIAAWIDSVLA</p>
30	MatCFD- RTX(L)_LC	<p>ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS  AAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSQPEPSKRLYDVLRAVP  HPDPSQDPTIDHDLLLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD  VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATC  NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCKGDSGGPLVCGGVL  EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASIAAWIDSVLAGGGG  SGGGGSGGGGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVS  YIHWFQQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSY  SLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVA  APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD  NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV  YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
31	MatCFD <sup>S208A</sup> - RTX(H)_HC	<p>ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS  AAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSQPEPSKRLYDVLRAVP  HPDPSQDPTIDHDLLLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD  VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATC  NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCKGDAGGPLVCGGVL  EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASIAAWIDSVLAGGGG  SGGGGSGGGGQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYT  FTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG  KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGD  WYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGL  YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS  CDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS</p>

		<p>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI  AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
32	ProCFD- RTX(H)_HC	<p>APPRGRILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAE  QWVLSAAHCLEDAADGKVQVLLGAHSLSQPEPSKRLYD  VLRAVPHPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQ  RVDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVL  DRATCNRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCCKGDSGGPLV  CGGVLEGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASAAWIDSVL  AGGGGSGGGGSGGGGQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCK  ASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYN  QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARST  YYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKST  SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL  QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR  TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDGSFFLYSKLTV  DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
33	RTX(H) <sup>K121Q,ΔK</sup> _ M2 <sup>R444K</sup> _HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTQGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTPPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTA</p>

		<p>VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
34	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  M2<sup>K317Q</sup>,  R444K-<sub>HC</sub></p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAQYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTA  VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
35	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  M2<sup>K321Q</sup>,  R444K-<sub>HC</sub></p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE</p>

		<p>PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAKYILQDSFSIFCETGYELLQGHLPLKSFTA  VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVVEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSRCRGDSGGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
36	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  M2<sup>K342Q</sup>.  R444K_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPLQSFTA  VCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVVEQKHDASALDIRMGTL</p>

		<p>KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWVGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
37	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  M2<sup>K350Q</sup>,  R444K-<sub>HC</sub></p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCPYPMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTA  VCQQDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCPEVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWVGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
38	<p>RTX(H)<sup>ΔK</sup>-  M2<sup>R356Q</sup>,  R444K-<sub>HC</sub></p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</p>

		<p>DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGQPCYPMA  PPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTA  VCQKDGSWDQMPACSI VDCGPPDDLPSGRVEYITGPGV  TTYKAVIQYSCETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGE  KSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILG  GTTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDIRMGTL  KRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNK  VVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLA  RNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGL  ESGGKDSRCRGDSGGALVFLDSETERWVFGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
39	<p>RTX(H)<sup>N297G,AK</sup>_  Clr<sup>K374Q</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIQDCGQPRNLPNGDFRYTTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHE  AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD  ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM  GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN  RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD</p>

		RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEED
40	RTX(H) <sup>N297G,ΔK</sup> _ Clr <sup>R380Q</sup> _HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGIKCPQPKT LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPQNLPNGDFRYTTTM GVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHNTLYPKEHE AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEED
41	RTX(H) <sup>N297G,ΔK</sup> _ Cl <sup>s</sup> <sup>K308Q</sup> _HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN



		<p>YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNKGWSNSKLCQPVDCGIPESIENKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
42	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-  C1s<sup>K310Q</sup>-HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNKGWSNSKLCQPVDCGIPESIENKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
43	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK</p>

	C1s <sup>R314Q</sup> _HC	<p>QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFQDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF  GSVIRYTCPEPYMENGSGGGGGEYHCAGNGSWNEVLGP  ELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
44	RTX(H) <sup>N297G,ΔK</sup> _ C1s <sup>R331Q</sup> _HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGQVGATSFY  STCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF</p>

		<p>GSVIRYTCEEPYYYMENG GGGGEYHCAGNGSWNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFE EKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTA AHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGR TNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLP GTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPV APLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAF AVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
45	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>_  C1s<sup>K346Q</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEGRVGATSFY  STCQSNQWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYYMENG GGGGEYHCAGNGSWNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFE EKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTA AHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGR TNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLP GTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPV APLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAF AVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
46	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>_  C1s<sup>K351Q</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS</p>

		<p>LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNQKWSNSQLKQCPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
47	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>_  C1s<sup>K353Q</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNQKWSNSKLQCPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL</p>

		<p>KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
48	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>_  Clr<sup>H484W</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCGKPVNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIWGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEH  EAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQ  DESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGL  MGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGK  NRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFVAVRDPNT  DRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEE  ED</p>
49	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>_  Clr<sup>G485W</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ</p>

		<p>DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHWRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEH  EAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQ  DESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGL  MGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGK  NRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNT  DRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEE  ED</p>
50	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>_  Clr<sup>R486W</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHWRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEH  EAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQ  DESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGL  MGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGK</p>

		NRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNT DRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEE ED
51	RTX(H) <sup>N297G,AK</sup> _ C1s <sup>D456W</sup> _HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDT PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY STCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWNEVLGP ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFW NPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQT SRLAKSKMLTPEHVFHPGWKLLVPEGRTNFDNDIALVR LKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED
52	RTX(H) <sup>N297G,AK</sup> _ C1s <sup>N457W</sup> _HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN

		<p>YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNKGWSNSKLCQPVDCGIPESIENKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFD  WPWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYVGSTSVQT  SRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLVPEGRTNFDNDIALVR  LKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
53	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-  C1s<sup>P458W</sup>_HC</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDT  PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNKGWSNSKLCQPVDCGIPESIENKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  WWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
54	<p>RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup></p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK</p>



	_HC	<p>QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPG</p>
55	RTX(H) <sup>K121Q</sup> _H C	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTQGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
56	RTX(H) <sup>K121Q,ΔK</sup> _HC	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYNMHWVK  QTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSST  AYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTT  VTVSAASTQGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS  LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPG</p>

57	MASP-2 CCP1/2SP	<p>QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG  HLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYE QKHDA  SALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWV  GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
58	MASP-2 <sup>R444K</sup> CCP1/2SP	<p>QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG  HLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYE QKHDA  SALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWV  GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
59	MASP-2 <sup>R444Q</sup> CCP1/2SP	<p>QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG  HLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGQIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYE QKHDA  SALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLESGGKDSCRGDSSGALVFLDSETERWV  GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
60	MASP-2 <sup>S633A</sup> CCP1/2SP	<p>QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG  HLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGRIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYE QKHDA</p>

		<p>SALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLESGGKDCRGGDAGGALVFLDSETERWFV  GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
61	<p>MASP-2<sup>K317Q</sup>,  R444K CCP1/2SP</p>	<p>QPCPYPMAPPNGHVSPVQAQYILKDSFSIFCETGYELLQG  HLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSIVDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDA  SALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLESGGKDCRGGDSSGALVFLDSETERWFV  GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
62	<p>MASP-2<sup>K321Q</sup>,  R444K CCP1/2SP</p>	<p>QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILQDSFSIFCETGYELLQG  HLPLKSFTAVCQKDGSWDRPMPACSIVDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDA  SALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLESGGKDCRGGDSSGALVFLDSETERWFV  GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>
63	<p>MASP-2<sup>K342Q</sup>,  R444K CCP1/2SP</p>	<p>QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG  HLPLQSFTAVCQKDGSWDRPMPACSIVDCGPPDDLPSGR  VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD  GFWTSSKGEKSLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPG  DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDA  SALDIRMGTLKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN  DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG  WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGS  VTANMLCAGLESGGKDCRGGDSSGALVFLDSETERWFV  GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF</p>

64	MASP-2 <sup>K350Q</sup> , R444K CCP1/2SP	QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG HLPLKSFTAVCQQDGSWDRPMPACSI VDCGPPDDLPSGR VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD GFWTSSKGEKSLPVEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPG DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDA SALDIRMGT LKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGS VTANMLCAGLESGGKDS CRGDSGGALVFLDSETERWV GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF
65	MASP-2 <sup>R356Q</sup> , R444K CCP1/2SP	QPCPYPMAPPNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQG HLPLKSFTAVCQKDGSDQMPACSI VDCGPPDDLPSGR VEYITGPGVTTYKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEAD GFWTSSKGEKSLPVEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPG DFPWQVLILGGTTAAGALLYDNWVLTA AHAVYEQKHDA SALDIRMGT LKRLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDN DIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASG WGLTQRGFLARNLMYVDIPIVDHQCTAAYEKPPYPRGS VTANMLCAGLESGGKDS CRGDSGGALVFLDSETERWV GGIVSWGSMNCGEAGQYGVYTKVINYIPWIENIISDF
66	MASP-3 CCP1/2SP	NECPQLQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLK DNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGL ITFSTRNNLTTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQ GVWMNKVLGRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRIIGGRNAE PGLFPWQALIVVEDTSRVPNDKWFGSGALLSASWILTAA HVLRSQRRDTTVIPVSKEHVTVYLGLHDVRDKSGAVNSS AARVVLHPDFNIQNYNH DIALVQLQEPVPLGPHVMPVCL PRLEPEGPAPHMLGLVAGWGISNPNVTVDEIISGTRTLSD VLQYVKLPVVP HAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYYE GGKDTCLGDSGGAFVIFDDLSQRWVVQGLVSWG GPEEC GSKQVYGVYTKVSNYVDWVWEQMGLPQSVVEPQVER
67	MASP-1 CCP1/2SP	NECPQLQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLK DNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGL ITFSTRNNLTTYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQ GVWMNKVLGRSLPTCLPVCGLPKFSRKL MARIFNGRPAQ

		<p>KGTPWIAMLSHLNGQPFCGSSLGSSWIVTAAHCLHQS  LDPEDPTLRDSDLLSPSDFKIILGKHWRLRSDENEQHLGV  KHTTLHPQYDPNTFENDVALVELLESPVLNAFVMPICLPE  GPQQEGAMVIVSGWGKQFLQRFPETLMEIEIPIVDHSTCQ  KAYAPLKKKVTRDMICAGEKEGGKDACAGDSGGPMVTL  NRERGWYLVGTVSWGDDCGKKDRYGVYSYIHHNKDW  IQRVTGVRN</p>
68	MASP-1 <sup>R504Q</sup> CCP1/2SP	<p>NECPQLQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLK  DNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGL  ITFSTRNNLTYYKSEIKYSCQEPYYKMLNNNTGIYTCSAQ  GVWMNKVLGRSLPTCLPVCGLPKFSRKL MARIFNGRPAQ  KGTPWIAMLSHLNGQPFCGSSLGSSWIVTAAHCLHQS  LDPEDPTLQDSDLLSPSDFKIILGKHWRLRSDENEQHLGV  KHTTLHPQYDPNTFENDVALVELLESPVLNAFVMPICLPE  GPQQEGAMVIVSGWGKQFLQRFPETLMEIEIPIVDHSTCQ  KAYAPLKKKVTRDMICAGEKEGGKDACAGDSGGPMVTL  NRERGWYLVGTVSWGDDCGKKDRYGVYSYIHHNKDW  IQRVTGVRN</p>
69	C1r CCP1/2SP	<p>IKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEG  NQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNG  DFRYTTTGMVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESE  QGVYTCTAQGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVPNPVEQRQ  RIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAA  HTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRR  SVHPDYRQDESYNFECDIALELENSVTLGPNLLPICLPDN  DTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQAC  ENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGV  FAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVD  WIKKEMEEED</p>
70	C1r <sup>K374Q</sup> CCP1/2SP	<p>IKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEG  NQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIQDCGQPRNLPNG  DFRYTTTGMVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESE  QGVYTCTAQGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVPNPVEQRQ  RIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAA  HTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRR</p>

		SVHPDYRQDESYNFECDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDN DTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQAC ENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGV FAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVD WIKKEMEEED
71	C1r <sup>R380Q</sup> CCP1/2SP	IKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEG NQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPQNLPNG DFRYTTTGMVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESE QGVYTCTAAGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQ RIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAA HTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMCLGNHPIRR SVHPDYRQDESYNFECDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDN DTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQAC ENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGV FAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVD WIKKEMEEED
72	C1r <sup>H484W</sup> CCP1/2SP	IKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEG NQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNG DFRYTTTGMVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESE QGVYTCTAAGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQ RIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIWGRGGGALLGDRWILTAA HTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMCLGNHPIRR SVHPDYRQDESYNFECDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDN DTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQAC ENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGV FAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVD WIKKEMEEED
73	C1r <sup>G485W</sup> CCP1/2SP	IKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEG NQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNG DFRYTTTGMVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESE QGVYTCTAAGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQ RIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHWRGGGALLGDRWILTAA HTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMCLGNHPIRR SVHPDYRQDESYNFECDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDN DTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQAC

		ENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGV FAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVD WIKKEMEEED
74	C1r <sup>R486W</sup> CCP1/2SP	IKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEG NQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNG DFRYTTTGMGVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESE QGVYTCTAQQGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVPNPVEQRQ RIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGWGGGALLGDRWILTA AHTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRR VSVHPDYRQDESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPD NDTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQA CENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGG VFAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYV DWIKKEMEEED
75	C1r <sup>S654A</sup> CCP1/2SP	IKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEG NQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNG DFRYTTTGMGVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESE QGVYTCTAQQGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVPNPVEQRQ RIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAA HTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRV SVHPDYRQDESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDN DTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQAC ENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDAGGV FAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVD WIKKEMEEED
76	C1s CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPKAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGSGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPCVPVCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFP WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEYKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPND KTKFYAAGLVSWGPGQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ

		ENSTPRED
77	C1s <sup>S632A</sup> CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYYMENGGGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFP WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFHHPGWKLLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDAGGAFVQDPND KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
78	C1s <sup>K308Q</sup> CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPAAQAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYYMENGGGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFP WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFHHPGWKLLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPND KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
79	C1s <sup>K310Q</sup> CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPAAQAYVFRDVVQITCLDGFVEVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYYMENGGGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFP WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFHHPGWKLLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPND KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
80	C1s <sup>R314Q</sup>	MPCPKEDTPNSVWEPAAKAKYVFQDVVQITCLDGFVEVEG



	CCP1/2SP	<p>RVGATSFYSTCQSNKWSNSKLCQPVDCCGIPESIENGKV  EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGGGGEYHCAGNGSW  VNEVLGPELPKCVPVCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFP  WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYV  GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFD  NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI  SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA  DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND  KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ  ENSTPRED</p>
81	C1s <sup>R331Q</sup> CCP1/2SP	<p>MPCPKEDTPNSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEG  QVGATSFYSTCQSNKWSNSKLCQPVDCCGIPESIENGKV  EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGGGGEYHCAGNGSW  VNEVLGPELPKCVPVCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFP  WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYV  GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFD  NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI  SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA  DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND  KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ  ENSTPRED</p>
82	C1s <sup>K346Q</sup> CCP1/2SP	<p>MPCPKEDTPNSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEG  RVGATSFYSTCQSNQWSNSKLCQPVDCCGIPESIENGKV  EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGGGGEYHCAGNGSW  VNEVLGPELPKCVPVCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFP  WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYV  GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFD  NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI  SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA  DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND  KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ  ENSTPRED</p>
83	C1s <sup>K351Q</sup> CCP1/2SP	<p>MPCPKEDTPNSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEG  RVGATSFYSTCQSNKWSNSQLKQPVDCCGIPESIENGKV  EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGGGGEYHCAGNGSW</p>

		VNEVLGPELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGSDADIKNFP WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCCEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
84	C1s <sup>K353Q</sup> CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYYMENGGGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGSDADIKNFP WQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCCEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
85	C1s <sup>D456W</sup> CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYYMENGGGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGSDADIKNFP WQVFFWNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCCEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND KTKFYAAGLVSWSGPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
86	C1s <sup>N457W</sup> CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYYMENGGGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGSDADIKNFP WQVFFDWPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYV

		GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND KTKFYAAGLVSWGPPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
87	C1s <sup>P458W</sup> CCP1/2SP	MPCPKEDTPNSVWEPKAKYVFRDVVQITCLDGFVVVEG RVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKV EDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGGGGEYHCAGNGSW VNEVLGPELPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGSDADIKNFP WQVFFDNWWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYV GSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFD NDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLI SGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTA DAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPND KTKFYAAGLVSWGPPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQ ENSTPRED
88	C2a VWFA-SP	KIQIQRSGHLNLYLLDSCSQSVSENDFLIFKESASLMVDRI FSFEINVSVAITFASEPVLMSVLNDNSRDMTEVISSLENA NYKDHENGTGTNTYAALNSVYLMMNQMRLLGMETMA WQEIRHAILLTDGKSNMGGSPKTAVDHIREILNINQKRND YLDIYAIGVGKLDVDWRELNELGSKKDGGERHAFILQDTK ALHQVFEHMLDVSKLTDTCGVGNMSANASDQERTPWH VTIKPKSQETCRGALISDQWVLTAHCFRDGNDHSLWRV NVGDPKSQWGKEFLIEKAVISPGFDVFAKKNQGILEFYGD DIALLKLAQVKMSTHARPICLPCTMEANLALRRPQGSTC RDHENELLNKQSVPAHFVALNGSKLNINLKMVVEWTSCA EVVSQEKTMFNLTVDVREVVTDQFLCSGTQEDESCKGES GGAVFLERRFRFFQVGLVSWGGLYNPCLGSADKNSRKRAP RSKVPPPRDFHINLFRMQPWLRLQHLGDVLNPLPL
89	Bb VWFA-SP	KIVLDPSGSMNIYLVLDGSDSIGASNFTGAKKCLVNLIKV ASYGVKPRYGLVTYATYPKIWVKVSEADSSNADWVTKQ LNEINYEDHKLKSGTNTKKALQAVYSMMSWPDVPEP WNRTRHVILMTDGLHNMGDPITVIDEIRDLLYIGKDRK NPREDYLDVYVFGVGPLVNQVNINALASKKDNEQHVK

		VKDMENLEDVFYQMIDESQSLSLCGMVWEHRKGTDYHK QPWQAKISVIRPSKGHESCMGAVVSEYFVLTAHCFTVD DKEHSIKVSVGGEKRDLEIEVVLFFHPNYNINGKKEAGIPEF YDYDVALIKLKNKLYGQTIRPICLPCTEGTTRALRLPPTT TCQQQKEELLPAQDIKALFVSEEEKLTRKEVYIKNGDKK GSCERDAQYAPGYDKVKDISEVVTPRFLCTGGVSPYADP NTRCRGDSGGPLIVHKRSRFIQVGVISWGVVDVCKNQKRQ KQVPAHARDFHINLFQVLPWLKEKQLQDEDLGFL
90	MatCFD	ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS AAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSLQPEPSKRLYDVLRAVP HPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATC NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCCKGDSGGPLVCGGVL EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASAAWIDSVLA
91	MatCFD <sup>S208A</sup>	ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS AAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSLQPEPSKRLYDVLRAVP HPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATC NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCCKGDAGGPLVCGGVL EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASAAWIDSVLA
92	ProCFD	APPRGRILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAE QWVLSAAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSLQPEPSKRLYD VLRAVPHPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQ RVDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVL DRATCNRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCCKGDSGGPLV CGGVLEGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASAAWIDSVL A
93	ALM_HC	QVQLQESGGLVRPSQTLSTCTVSGFTFTDFYMNWVRQ PPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGRVTMLVDTSK NQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGQGS VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ

		DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
94	ALM_LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIKYLNWYQQKP GKAPKLLIYNTNNLQGTGVPSTRFSGSGGTDFFTISSLQPE DIATYYCLQHISRPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
95	DARA_HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGFTFNSFAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRADTAIVYFCAKDKILWFGPEVFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
96	DARA_LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGGTDFTLTISLLEPED FAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
97	MatCFD- ALM(H)_HC	ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS AAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSLQPEPSKRLYDVLRAVP HPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATC NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDCKGDSGGPLVCGGVL EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASYAAWIDSVLAGGGG SGGGGSGGGGQVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFTFT

		DFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTTEYNPSVKGR VTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPF DYWGQGS�VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	MatCFD- DARA(H)_HC	ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS AAHCLEDAADGKVQVLLGAHSLSQPEPSKRLYDVLRAVP HPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRTC NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCKGDSGGPLVCGGVL EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASYAAWIDSVLAGGGG SGGGGSGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTF NSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEP VFDYWGQGTЛVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
99	Линкер	GGGGS
100	Линкер	GGGGSGGGGSGGGG
101	aN7_HC	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDFYMHVWK QRPDQGLEWIGWIDPENDNTIYDPKFQGGKASITADTSSNT AYLQLSSLTSEDVAVYYCAYRSPMITTGAMDFWGPQTSV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP

		TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
102	aN7_LC	DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDNYGIGFMNWF QQKPGQPPKLLIYV ASNQGSQV PARFSGSGSGTDFSLNIHP MEEDDAAMYFCQQSKEVPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
103	aN19_HC	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNMYVMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTYADSVKDRFTISRDDS QSVLYLTMNNLKTEDTAMY YCVRLDDDFAYWGPGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
104	aN19_LC	DIVMTQAAPSVSVSLGESVSIYCRSNKSLLYSNGNTYLYW FLQRPQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRIS RVEAEDVGVYYCLQHLEYPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
105	aN5_HC	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYMHVVR QRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGGKASITADTSSNT AYLQLSSLTSEDTA VYYCAYRSTMITTGAMDYWGQGTS

		<p>VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP  VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL  GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE  LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
106	aN5_LC	<p>DIVLTQSPASLA VSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWF  QQKPGQSPKLLIYAASNQGSQVPARFSGSGSGTDFSLNIHP  MEEDDTAMYFCQQSKEVPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI  FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTKADYEKHKVYACE  VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
107	aN7(H) <sup>ΔK</sup> - Clr_HC	<p>EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDFYMHVWK  QRPDQGLEWIGWIDPENDNTIYDPKFQGKASITADTSSNT  AYLQSSLTSEDTA VYYCAYRSPMITTGAMDFWGPVTSV  TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG  TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGIKCPQPKTL  DEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTA  VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTMMG  VNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCYTAQ  GIWKNEQKGEKIPRCLPVCVKPNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHE  AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD  ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM  GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN</p>



		RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE D
108	aN19(H) <sup>ΔK</sup> - C1r_HC	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNMYVMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTYADSVKDRFTISRDDS QSVLYLTMNNLKTEDTAMYVCVRLDDDFAYWGPGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLR PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGIKCPQPKTL DEFTIIQNLPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTGMG VNTYKARIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCYTAQ GIWKNEQKGEKIPRCLPVCVKPNPVEQRQRRIIGGQKAK MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHE AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE D
109	aN5(H) <sup>ΔK</sup> - C1r_HC	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYMHVWR QRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGGKASITADTSSNT AYLQLSSLTSEDVAVYYCAYRSTMITTGAMDYWGQGTS VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLR

		<p>LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKT  LDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFT  AVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTM  GVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTA  QGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHHTLYPKEHE  AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD  ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM  GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN  RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD  RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE  D</p>
110	aN7(H) <sup>ΔK</sup> - C1s_HC	<p>EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDFYMHWVK  QRPDQGLEWIGWIDPENDNTIYDPKFQGKASITADTSSNT  AYLQLSSLTSEDTAVYYCAYRSPMITTGAMDFWGPSTV  TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG  TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLR  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDTP  NSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEGRVGATSFYS  TCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLFG  SVIRYTCEEPYYMENGSGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPE  LPKCVPCGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDNP  WAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSR  LAKSKMLTPEHVFHHPGWKLLLEVPEGRTNFDNDIALVRLK  DPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEK  RDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTP  NMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAAGL</p>

		VSWGPGQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED
111	aN19(H) <sup>ΔK</sup> - C1s_HC	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNMYVMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTYADSVKDRFTISRDDS QSVLYLTMNNLKTEDTAMYYCVRLDDDFAYWGPGLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDTP NSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVVEGRVGATSFYS TCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLFG SVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPE LPKCVPCGVPREPFEEKQRIIGSDADIKNFPWQVFFDNP WAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSR LAKSKMLTPEHVFHPGWKLLVPEGRTNFDNDIALVRLK DPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEK RDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTP NMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAAGL VSWGPGQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED
112	aN5(H) <sup>ΔK</sup> - C1s_HC	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYMHVWR QRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGKASITADTSNT AYLQLSSLTSEDNAVYYCAYRSTMITTGAMDYWGQGTS VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDT

		<p>PNSVWEPAAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGRVGATSFY  STCQSNQKWSNSKLLKQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLF  GSVIRYTCEEPYYMENGSGGGEYHCAGNGSWVNEVLGP  ELPKCVPCGVPREPFEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDN  PWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTS  RLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLEVPEGRTNFDNDIALVRL  KDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTE  KRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVF  TPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAA  GLVSWGPPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
113	aN7(H) <sup>ΔK</sup> _HC	<p>EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDFYMHVWK  QRPDQGLEWIGWIDPENDNTIYDPKFQGKASITADTSSNT  AYLQLSSLTSEDVAVYYCAYRSPMITTGAMDFWGPSTV  TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG  TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPG</p>
114	aN19(H) <sup>ΔK</sup> _HC	<p>EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNMYVMNWVR  QAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTYADSVKDRFTISRDDS  QSVLYLTMNNLKTEDTAMYYCVRLDDDFAYWGPGLT  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK  FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPG</p>
115	aN5(H) <sup>ΔK</sup> _HC	<p>EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYMHVWR</p>

		<p>QRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGGKASITADTSSNT  AYLQLSSLTSEDTA VYYCAYRSTMITTGAMDYWGQGTS  VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP  VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL  GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE  LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV  KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ  DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN  YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  EALHNHYTQKSLSLSPG</p>
116	aN19(H) <sup>ΔK</sup> - M2 <sup>R444K</sup> _HC	<p>EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNMYVMNWVR  QAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTYADSVKDRFTISRDDS  QSVLYLTMNNLKTEDTAMYYCVRLDDDFAYWGPGLVT  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF  NWXVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGQPCPYMAP  PNGHVSPVQAKYILKDSFSIFCETGYELLQGHLPKLSFTAV  CQKDGSDWRPMPACSIVDCGPPDDLPSGRVEYITGPGVTT  YKAVIQYSCEETFYTMKVNDGKYVCEADGFWTSSKGEK  SLPVCEPVCGLSARTTGGKIYGGQKAKPGDFPWQVLILGG  TTAAGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDA S ALDIRMGTLK  RLSPHYTQAWSEAVFIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNKVV  VINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGFLAR  NLMYVDIPIVDHQKCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGLE  SGGKDSRCRGDSGGALVFLDSETERWVGGIVSWGSMNC  GEAGQYGVYTKVINIYIPWIENIISDF</p>
117	aN19(H) <sup>ΔK</sup> - M3_HC	<p>EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNMYVMNWVR  QAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTYADSVKDRFTISRDDS</p>

		<p>QSVLYLTMNNLKTEDTAMYVCVRLDDDFAYWGPGLVT  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSGDGFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGGSGGGGGSGGGGNECPQLPP  VHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTFQ  IECLKDGTWSNKIPTCKIVDCRAPGELEHGLITFSTRNNLT  TYKSEIKYSCQEPYKMLNNNTGIYTCSAQGVWMNKVL  GRSLPTCLPECGQPSRSLPSLVKRIIGGRNAEPGLFPWQALI  VVEDTSRVPNDKWFGSGALLSASWILTAHVLRQRRTD  TVIPVSKEHVTVYLGLHDVRDKSGAVNSSAARVVLHPDF  NIQNYNHDIALVQLQEPVPLGPHVMPVCLPRLEPEGPAPH  MLGLVAGWGISNPVTVDEIISGTRTSLDVLQYVKLPVV  PHAECKTSYESRSGNYSVTENMFCAGYYEGGKDTCLGDS  GGAFVIFDDLQRWVWVQGLVSWGGPEECGSKQVYGVYT  KVSNYVDWVWEQMGLPQSVVPEPQVER</p>
118	MatCFD- aN19(H)_HC	<p>ILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAEQWVLS  AAHCLEDAADGKVQVLLGAHLSQPEPSKRLYDVLRAVP  HPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQRVDRD  VAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVLDRATC  NRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCKGDSGGPLVCGGVL  EGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASYAAWIDSVLAGGGG  SGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTF  NMYVMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTYADSV  KDRFTISRDDSQSVLYLTMNNLKTEDTAMYVCVRLDDDF  AYWGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC  LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV</p>

		VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	ProCFD- aN19(H)_HC	APPRGRILGGREAEAHARPYMASVQLNGAHLCCGGVLVAE QWVLSAAHCLEDAADGKVQVLLGAHSLSQPEPSKRLYD VLRAVPHPDSQPDTIDHDLQLSEKATLGPAVRPLPWQ RVDRDVAPGTLCDVAGWGIVNHAGRRPDSLQHVLLPVL DRATCNRRTHHDGAITERLMCAESNRRDSCCKGDSGGPLV CGGVLEGVVTSGSRVCGNRKKPGIYTRVASAAWIDSVL AGGGGSGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSA ASGFTFNMYVMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSYNFGTY YADSVKDRFTISRDDSQSVLYLTMNNLKTEDTAMYCYVR LDDDFAYWPGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	RX1MI005_HC	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQ TPEKRLEWVATISGGGGNTYYSDSVKGRFTISRDNKNTL YLQMSSLRSEDALYYCARHDYGSFDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
121	RX1MI005_LC	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINRYLSWFQKPK

		GKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYE DMGIYYCLQYDEFPFTEFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
122	RX1MI005(H) <sup>Δ</sup> K-C1r_HC	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYTMSWVRQ TPEKRLEWVATISGGGGNTYYSDSVKGRFTISRDNKNTL YLQMSSLRSEDALYYCARHDYGSFDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKTLDEFTIIQN LQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTA VCQDDG TWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTGMGVNTYKA RIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCTAQQGIWKNEQ KGEKIPRCLPVCCKPVPNPVEQRQRIIGGQKAKMGNFPWQ VFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHEAQSNASL DVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQDESYNFEG DIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLMGYVSGF GVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKNRMDVFS QNMFCAGHPSLKQDACQGDSSGVFAVRDPNTDRWVAT GIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEED
123	RX1MI005(H) <sup>Δ</sup> K-C1s_HC	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYTMSWVRQ TPEKRLEWVATISGGGGNTYYSDSVKGRFTISRDNKNTL YLQMSSLRSEDALYYCARHDYGSFDYWGQGTTLTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK



		<p>EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL  DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  TQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDTPNSVWEP  AKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEGRVGATSFYSTCQSN  KWSNSKCLKCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLFGSVIRYTC  EOPYYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPELPCVVP  CGVPREPFEEKQRIIGSDADIKNFPWQVFFDNPWAGGAL  INEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSRLAKSKM  LTPEHVFIHPGWKLLVPEGRNTNFDNDIALVRLKDPVKM  GPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEKRDR  AVR  LKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTPNMICAG  GEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAAGLVS  WGP  QCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
124	Cl.G_HC	<p>EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVK  QSHGKSLEWIGDINPNNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSST  AYMQLNSLTSEDSAVYYCARGDYWGQGTTLTVSSASTK  GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV  NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ  KSLSLSPGK</p>
125	Cl.G_LC	<p>DVVMQTQPLTSLVITIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNW  LLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKIS  RVEAEDLGYYCWQGTHFPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSV  FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL  QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAC  EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
126	Cl.G(H) <sup>AK</sup> - Clr_HC	<p>EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVK  QSHGKSLEWIGDINPNNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSST  AYMQLNSLTSEDSAVYYCARGDYWGQGTTLTVSSASTK</p>

		<p>GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV  NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQ  KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKTLDEFTIIQNLQ  PQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTA VCQDDGTW  HRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTGMVNTYKARIQ  YYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYCTAQGIWKNEQKG  EKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAKMGNFPWQVFT  NIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHEAQSNASLDVF  LGHTNVEELMKLGNHPIRRVSHPDYRQDESYNFEGDIA  LLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLMGYVSGFGVM  EEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKNRMDVFSQNM  FCAGHPSLKQDACQGDGSGGVFAVRDPNTDRWVATGIVS  WGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEED</p>
127	Cl.G(H) <sup>AK</sup> - Cl <sub>s</sub> _HC	<p>EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVK  QSHGKSLEWIGDINPNNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSST  AYMQLNSLTSEDSAVYYCARGDYWGQTTTLTVSSASTK  GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG  ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV  NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK  NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS  DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQ  KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDTPNSVWEPK  AKYVFRDVVQITCLDGFEVVEGRVGATSFYSTCQSNQK  SNSKLLKCPVDCGIPESIENGKVEDPESTLFGSVIRYTCPEP  YYMENGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPELPKCVPCG  VPREPFEEKQRIIGSDADIKNFPWQVFFDNPWAGGALIN</p>

		EYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSRLAKSKMLT PEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNFDNDIALVRLKDPVKMGPT VSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEKRDRAVRLK AARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTPNMICAGGE KGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAAGLVSWGPOC GTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED
128	1A2_HC	QVRLQESGPSLVKPSQTLSTCTVSGFGLTTYSIEWVRQA PGKALEWVGAVNNNGRTFYNPALKSRLSITRDTSKSQVS LSLSSVTTEDTAVYYCVRTWDVWGRGLLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
129	1A2_LC	QAVLTQPSSVSRSLGQSVSITCSGSSSNIGSWNYVDWFQVI PGSAPRTLITAATSRTSGVPDRFSGSRSGNTATLTITSLQAE DEADYYCAAWDRSNSKIFGSGTRLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
130	1A2(H) <sup>ΔK</sup> - C1r_HC	QVRLQESGPSLVKPSQTLSTCTVSGFGLTTYSIEWVRQA PGKALEWVGAVNNNGRTFYNPALKSRLSITRDTSKSQVS LSLSSVTTEDTAVYYCVRTWDVWGRGLLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

		<p>LSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQY  QFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTA VCQDDGTWHRA  MPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTGMVNTYKARIQYYC  HEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTAQQGIWKNEQKGEKIP  RCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIH  GRGGGALLGDRWILTA AHTLYPKEHEAQSNASLDVFLGH  TNVEELMKLGNHPIRRVS VHPDYRQDESYNFEGDIALLEL  ENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKI  AHDLRVRLPVANPQACENWLRGKNRMDVFSQNMFCAG  HPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTDRWVATGIVSWGIG  CSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEED</p>
131	1A2(H) <sup>ΔK</sup> - C1s_HC	<p>QVRLQESGPSLVKPSQTLSTCTVSGFGLTYSIEWVRQA  PGKALEWVGAVNNNGRTFYNPALKSRLSITRDTSKSQVS  LSLSSVTTEDTAVYYCVRTWDVWGRGLLVTVSSASTKGP  SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL  TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH  KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP  KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV  SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS  FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLS  LSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDTPNSVWEPAAKAY  VFRDVVQITCLDGFVEVVEGRV GATSFYSTCQSNKWSNS  KLKQCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLFGSVIRYTCPEPYY  YMENGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPEL PKCVPVCGVPR  EPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDNPWAGGALINEYW  VLTA AHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSRLAKSKMLTPEHV  FIHPGWKLLVPEGR TNFDNDIALVRLKDPVKMGPTVSP  CLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEKRDR AVLKAARL  PVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTPNMICAGGEKGM  DSCCKGDSGGAF AVQDPNDKTKFYAAGL VSWGPPCGTYG  LYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
132	hJF5_HC	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFD FSRYWMSWVR  QAPGKGLEWVAEINPDSSKINYMPSLKDRFTISRDN AKNS</p>

		<p>LYLQMNSLRAEDTAVYYCARPRGYAMDFWGQGLVT  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
133	hJF5 <sub>LC</sub>	<p>DVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQK  PGKAPKPLIYSASYQYTGVPSPRFSGSGSGTDFTTITSLQPE  DIAIYYCQQHYSIPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ  GLSSPVTKSFNRGEC</p>
134	hJF5(H) <sup>AK</sup> - C1r <sub>HC</sub>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVR  QAPGKGLEWVAEINPDSSKINYMPSLKDRFTISRDNKNS  LYLQMNSLRAEDTAVYYCARPRGYAMDFWGQGLVT  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGGGGGGIKCPQPKTL  DEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTA  VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTGMG  VNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTAQ  GIWKNEQKGEKIPRCLPVCVKPNPVEQRQRRIIGGQKAK  MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHE  AQSNASLDVFLGHTNVEELMCLGNHPIRRVSVHPDYRQD  ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM</p>

		<p>GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN  RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD  RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE  D</p>
135	hJF5(H) <sup>ΔK</sup> - C1s_HC	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSRYWMSWVR  QAPGKGLEWVAEINPDSSKINYMP SLKDRFTISRDN AKNS  LYLQMNSLRAEDTAVYYCARPRGYA MDFWGQGT LVT  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT  PSRDELTKNQLVSLTCLVKG FYP SDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDTP  NSVWEPAKAKYVFRD VVQITCLDGFVEVVEGRV GATSFYS  TCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGKVEDPESTLFG  SVIRYTCEEPYYMENG GGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPE  LPKCVPCGVPREPFEEKQRIIGSDADIKNFPWQVFFDNP  WAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSR  LAKSKMLTPEHVFHPGWKLLLEVPEGR TNFDNDIALVRLK  DPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEK  RDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTP  NMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPNDKTKFYAAGL  VSWG PQC GTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
136	R5.004_HC	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSNYAINWVRQ  APGQGLEWMGGIIPFATTNYAQKFQGRVTITADESTSTA  YMELSSLRSED TAVYFCARDKHSWSYAFDIWGQGT MVT  VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLT</p>

		PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
137	R5.004_LC	QSVLTQPPSASGTPGLRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQHLP GTAPKLLIHSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSE DEADYYCAAWDDSLNGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT LFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQV THEGSTVEKTVAPTECS
138	R5.004(H) <sup>AK</sup> - C1r_HC	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAINWVRQ APGQGLEWMGGIIPFATTNYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTA VYFCARDKHSWSYAFDIWGQGMVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGGGGGGIKCPQPKTL DEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTA VCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTGMG VNTYKARIQYYCHEPYYKMQTRAGSRESEQGVYTCTAQ GIWKNEQKGEKIPRCLPVCVKPVPNPVEQRQRRIIGGQKAK MGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTA AHTLYPKEHE AQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQD ESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLM GYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKN RMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGGVFAVRDPNTD RWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEE D
139	R5.004(H) <sup>AK</sup> - C1s_HC	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAINWVRQ APGQGLEWMGGIIPFATTNYAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTA VYFCARDKHSWSYAFDIWGQGMVT

		<p>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT  VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT  QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF  NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE  ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGGGMPCPKEDTP  NSVWEPAKAKYVFRDVVQITCLDGFVVEGRV GATSFYS  TCQSNQKWSNSKLCQPVDCGIPESIEGKVEDPESTLFG  SVIRYTCEEPYYMENGSGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPE  LPKCVPVCGVPREPFEEKQRIIGSDADIKNFPWQVFFDNP  WAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSR  LAKSKMLTPEHVFHPGWKLLLEVPEGR TNFDNDIALVRLK  DPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEK  RDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTP  NMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFAVQDPNDKTKFYAAGL  VSWGPPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>
140	R5.016_HC	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVRV SCKASGYTFTSYGISWVRQ  APGQGLEWMGWISGYDGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTS  TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGPQVGD FDWQVYYYY  GMDVWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS  LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD  KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  RVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ  QGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
141	R5.016_LC	<p>AIRMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSINTWLAWYQQKP  GKAPNLLISKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD  FATYFCQQYNSYLYTFGQGTKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDE  QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE</p>



		SVTEQDSKDYSLSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
142	R5.016(H) <sup>AK</sup> - C1r_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCASGYTFTSYGISWVRQ APGQGLEWMGWISGYDGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGPQVGDFDWQVYYYY GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSG GGGIKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQL IEGNQVLHSFTAVCQDDGTWHRAMPKCKIKDCGQPRNLP NGDFRYTTTGMGVNTYKARIQYYCHEPYYKMQTRAGSRE SEQGVYTCTAQGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVPNPVEQ RQRIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILT AAHTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIR RVSVHPDYRQDESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLP DNDTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQ ACENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSG GVFAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNY VDWIKKEMEEED
143	R5.016(H) <sup>AK</sup> - C1s_HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVSCASGYTFTSYGISWVRQ APGQGLEWMGWISGYDGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDGPQVGDFDWQVYYYY GMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV

		<p>EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSG  GGGMPCPKEDTPNSVWEPAAKAYVFRDVVQITCLDGFV  VEGRVGATSFYSTCQSNGKWSNSKLCQPVDCGIPESIEN  GKVEDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGGGGEYHCAGN  GSWVNEVLGPELPCVPCVCGVPREPFEKQRIIGSDADI  KNFPWQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAHVVEGNREPT  MYVGSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLVPEGR  TNFDNDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGD  LGLISGWGRTEKRDRAVRLKAARLPVAPLRKCKEVKVEK  PTADAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQD  PNDKTKFYAAGLVSWGPGQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKT  MQENSTPRED</p>
144	PGT121_HC	<p>QMQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASISDSYWSWIRRS  GKGLEWIGYVHKSGDTNYSPLKSRVNLSLDTSKNQVSL  SLVAATAADSGKYCARTLHGRRIYGIVAFNEWFTYFYM  DVWGNGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG  CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
145	PGT121_LC	<p>SDISVAPGETARISCGEKSLSRAVQWYQHRAGQAPSLIY  NNQDRPSGIPERFSGSPDSPFGTTATLTITSVEAGDEADYY  CHIWDSRVPTKWVFGGGTTLTVLGQPKAAPSRTLFPSSSE  ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETT  TPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGST  VEKTVAPTECS</p>
146	PGT121(H) <sup>AK</sup> - C1r_HC	<p>QMQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASISDSYWSWIRRS  GKGLEWIGYVHKSGDTNYSPLKSRVNLSLDTSKNQVSL  SLVAATAADSGKYCARTLHGRRIYGIVAFNEWFTYFYM  DVWGNGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG</p>

		<p>CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG  GIKCPQPKTLDEFTIIQNLQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIE  GNQVLHSFTAVCQDDGTWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPN  GDFRYTTTGMGVNTYKARIQYYCHEPYKMQTRAGSRES  EQGVYTCTAQQGIWKNEQKGEKIPRCLPVCVKPNPVEQR  QRIIGGQKAKMGNFPWQVFTNIHGRGGGALLGDRWILTA  AHTLYPKEHEAQSNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPIRR  VSVHPDYRQDESYNFEGDIALLELENSVTLGPNLLPICLPD  NDTFYDLGLMGYVSGFGVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQA  CENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLKQDACQGDSGG  VFAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYV  DWIKKEMEEED</p>
147	PGT121(H) <sup>AK</sup> - C1s_HC	<p>QMQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGASISDSYWSWIRRS  GKGLEWIGYVHKSGDTNYSPLKSRVNLSDTSKNQVSL  SLVAATAADSGKYCARTLHGRRIYGIVAFNEWFTYFYM  DVWGNGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG  CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSL  SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV  DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGG  GMPCPKEDTPNSVWEPKAKYVFRDVVQITCLDGFVVE  GRVGATSFYSTCQSNKWSNSKLCQPVDCGIPESIENGK  VEDPESTLFGSVIRYTCEEPYYMENGGGGEYHCAGNGS  WVNEVLGPELPCVPCGVPREPFEKQRIIGSDADIKN</p>

		FPWQVFFDNPWAGGALINEYWVLTAAHVVEGNREPTMY VGSTSVQTSRLAKSKMLTPEHVFIHPGWKLLLEVPEGRTNF DNDIALVRLKDPVKMGPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLG LISGWGRTEKRDRVRLKAARLPVAPLRKCKEYKVEKPT ADAEAYVFTPNMICAGGEKGMDSCKGDSGGAFVQDPN DKTKFYAAGLVSWGPPQCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTM QENSTPRED
148	бeбтeлoвимaб_ HC	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSIGVGVGWLRQ PPGKALEWLALIYWDDDKRYSPSLKSRLTISKDTSKNQVV LKMTNIDPVDATATYYCAHHSISTIFDHWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
149	бeбтeлoвимaб_ LC	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTATSSDVG DYNVSWYQQ HPGKAPKLMIFEVSDRPSGISNRFSGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYYC SSYTTSSAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
150	бeбтeлoвимaб( H) <sup>ΔK</sup> -C1r_HC	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSIGVGVGWLRQ PPGKALEWLALIYWDDDKRYSPSLKSRLTISKDTSKNQVV LKMTNIDPVDATATYYCAHHSISTIFDHWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL

		<p>DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  TQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGIKCPQPKTLDEFTIIQN  LQPQYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTAVCQDDG  TWHRAMPRCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTTIMGVNTYKA  RIQYYCHEPYKMQTRAGSRESEQGVYTCTAQQGIWKNEQ  KGEKIPRCLPVCCKPVPNPVEQRQRIIGGQKAKMGNFPWQ  VFTNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHEAQSNASL  DVFLGHTNVEELMKLGNHPIRRVSVHPDYRQDESYNFEG  DIALLELENSVTLGPNLLPICLPDNDTFYDLGLMGYVSGF  GVMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKNRMDVFS  QNMFCAGHPSLKQDACQGDSSGGVFAVRDPNTDRWVAT  GIVSWGIGCSRGYGFYTKVLNYVDWIKKEMEEED</p>
151	бббтеловимаб(Н) <sup>ΔK</sup> -C1s_HC	<p>QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSIGVGVGWLRLQ  PPGKALEWLALIYWDDDKRYSPSLKSRLTISKDTSKNQVV  LKMTNIDPVDATYYCAHHSISTIFDHWGQGLVTVSSAS  TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC  NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK  EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY  TQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGMPCPKEDTPNSVWEP  AKAKYVFRDVVQITCLDGFVEVEGRVGATSFYSTCQSNQ  KWSNSKLKCPVDCGIPESIENGKVEDPESTLFGSVIRYTC  EEPYYMENGGGGGEYHCAGNGSWVNEVLGPELPCVVPV  CGVPREPFEEKQRIIGGSDADIKNFPWQVFFDNPWAGGAL  INEYWVLTAAHVVEGNREPTMYVGSTSVQTSRLAKSKM  LTPEHVFIHPGWKLEVPEGRNTNFDNDIALVRLKDPVKM  GPTVSPICLPGTSSDYNLMDGDLGLISGWGRTEKRDRVR  LKAARLPVAPLRKCKEVKVEKPTADAEAYVFTPNMICAG  GEKGMDSCKGDSGGAFVQDPNDKTKFYAAGLVSWG  QCGTYGLYTRVKNYVDWIMKTMQENSTPRED</p>

## VIII. Примеры

### **Пример 1. Получение нацеленной на комплемент-активирующих молекул, происходящих из ритуксимаба**

#### *MASP слитые белки*

С-концевой каталитический сегмент MASP-1, MASP-2 и MASP-3, домены CCP1-CCP2-SP, сливали с анти-CD20 антителом ритуксимабом (RTX; изотип IgG1) в различных конфигурациях, и слитые белки экспрессировали с использованием экспрессионного вектора pCAG. Вектор представляет собой модифицированный вариант pD2610-v1 (ATUM; первоначально из (Miyazaki et al., 1989)) и содержит характерный гибридный промотор CMV и куриного бета-актина, и также маркер устойчивости к канамицину.

Положения слияния находились либо на С- или N-конце тяжелой цепи антитела (HC-CCP1/2SP или CCP1/2SP-HC соответственно), либо на С- или N-конце легкой цепи антитела (LC-CCP1/2SP или CCP1/2SP-LC соответственно), в результате чего были получены следующие различные конструкции: M3-RTX(H) (SEQ ID NO:13), RTX(L)-M3 (SEQ ID NO:14), M3-RTX(L) (SEQ ID NO:15), RTX(H)-M2 (SEQ ID NO:4), M2-RTX(H) (SEQ ID NO:6), RTX(L)-M2 (SEQ ID NO:6), RTX(L)-M2 (SEQ ID NO:4), M2-RTX(H) (SEQ ID NO: 6), RTX(L)-M2 (SEQ ID NO:7) и M2-RTX(L) (SEQ ID NO:8). Слитые белки на основе MASP-1 включают слитые белки с одной заменой в сериновом протеазном домене по сравнению с последовательностью сериновой протеазы дикого типа, которая была предназначена для повышения стабильности, и один слитый белок MASP-1 включает тяжелую цепь ритуксимаба с делецией лизина (K) с С-конца: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M1<sup>R504Q</sup> (SEQ ID NO:16) и M1<sup>R504Q</sup>-RTX(L) (SEQ ID NO:17). Кроме того, были получены мутантные формы конструкций RTX(H)-M2 и RTX(H)-M3, которые были изменены посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с С-конца тяжелой цепи ритуксимаба, что привело к получению конструкций RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2 (SEQ ID NO:5) и RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M3 (SEQ ID NO:12). Каталитически неактивный вариант слитого белка MASP-2 получали введением одной замены в сериновый протеазный домен: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2S633A (SEQ ID NO:11). Была также создана конститутивная зимогенная форма слитого белка MASP-2: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R444Q</sup> (SEQ ID NO:10), а также слитый белок MASP-2 с более медленной кинетикой активации, чем у дикого типа: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R444K</sup> (SEQ ID NO:9).

Дополнительные молекулы были получены с одной или двумя одиночными аминокислотными заменами в сериновом протеазном домене MASP-2: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R444K</sup> (SEQ ID NO:9), RTX(H)<sup>ΔK, K121Q</sup>-M2<sup>R444K</sup> (SEQ ID NO:33), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>K317Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:34), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>K321Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:35), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>K342Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:36), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>K350Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:37) и RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R356Q, R444K</sup> (SEQ ID NO:38), с целью идентифицировать молекулы с повышенной стабильностью/сниженной деградацией.

#### *Слитые белки C1r и C1s*

Эффекторные сериновые протеазные домены C1r и C1s сливали с RTX и экспрессировали аналогично слитым белкам MASP; С-концевой каталитический фрагмент C1r и C1s (CCP1-CCP2-SP) сливали с RTX на С-конце тяжелой цепи антитела (HC).

Были созданы три конструкции каждого компонента комплемента, включая форму «дикого типа», агликозилированную форму, имеющую одну замену в Fc-участке антитела, и каталитически неактивный слитый белок, имеющий одну замену в сериновом протеазном домене: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (SEQ ID NO:18), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1r (SEQ ID NO:21), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1r<sup>S654A</sup> (SEQ ID NO:22), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (SEQ ID NO:19), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s (SEQ ID NO:23) и RTX(H)<sup>N297,ΔK</sup>-C1s<sup>S632A</sup> (SEQ ID NO:24).

Дополнительные молекулы были получены с одной из нескольких одиночных аминокислотных замен в сериновом протеазном домене: RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1r<sup>K374Q</sup> (SEQ ID NO:39), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1r<sup>R380Q</sup> (SEQ ID NO:40), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>K308Q</sup> (SEQ ID NO:41), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>K310Q</sup> (SEQ ID NO:42), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>R314Q</sup> (SEQ ID NO:43), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>R331Q</sup> (SEQ ID NO:44), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>K346Q</sup> (SEQ ID NO:45), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>K351Q</sup> (SEQ ID NO:46), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>K353Q</sup> (SEQ ID NO:47), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1r<sup>H484W</sup> (SEQ ID NO:48), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1r<sup>G485W</sup> (SEQ ID NO:49), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1r<sup>R486W</sup> (SEQ ID NO:50), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>D456W</sup> (SEQ ID NO:51), RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>N457W</sup> (SEQ ID NO:52) и RTX(H)<sup>N297G,ΔK</sup>-C1s<sup>P458W</sup> (SEQ ID NO:53), с целью идентифицировать молекулы с повышенной стабильностью/сниженной деградацией.

#### *Слитые белки с другими компонентами комплемента*

Каталитический сегмент каждого из факторов комплемента C2 (C2a), B (Bb) и D сливали с RTX и экспрессировали с использованием экспрессионного вектора pCAG.

Были созданы различные конфигурации про- и зрелых слитых белков на основе CFD. CFD сливали либо с C-концом, либо с N-концом тяжелой или легкой цепи антитела, в результате чего были получены следующие конструкции: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-MatCFD (SEQ ID NO:27), MatCFD-RTX(H) (SEQ ID NO:28), RTX(L)-MatCFD (SEQ ID NO:29), MatCFD-RTX(L) (SEQ ID NO:30) и ProCFD-RTX(H) (SEQ ID NO:32). Также получали каталитически неактивный вариант, имеющий одну точечную мутацию в сериновом протеазном домене: MatCFD<sup>S208A</sup>-RTX(H) (SEQ ID NO:31).

Была создана одна конфигурация для слитых белков на основе C2a и Bb, в которой каталитический сегмент сливали с C-концом тяжелой цепи антитела: RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C2a (SEQ ID NO:25) и RTX(H)<sup>ΔK</sup>-Bb (SEQ ID NO:26).

Различные конфигурации слитых белков на основе ритуксимаба подробно описаны в таблице 1.

**Таблица 1**

	Рекомбинантные белки	Обозначения	Описание
<b>Слитые белки</b>	ритуксимаб-MASP-2 (HC-CCP12SP)	RTX(H)-M2	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба.
<b>Ab-MASP-2</b>	ритуксимаб-MASP-2 (HCΔK-CCP12SP)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба.

			<u>Мутация:</u> делеция аминокислоты лизина (K) в HC Ab.
	ритуксимаб-MASP-2 (HCΔK-CCP12SP-R444K)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K</sub> -M2 <sup>R444K</sup>	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> Делеция аминокислоты лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного аргинина (R) на лизин (K) в MASP-2.
	ритуксимаб-MASP-2 (HCΔK-CCP12SP-R444Q)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K</sub> -M2 <sup>R444Q</sup>	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> Делеция аминокислоты лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного аргинина (R) на лизин (Q) в MASP-2.
	ритуксимаб-MASP-2 (HCΔK-CCP12SP-S633A)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K</sub> -M2 <sup>S633A</sup>	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> замена аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного серина (S) на аланин (A) в MASP-2.
	MASP-2-ритуксимаб (CCP12SP-HC)	M2-RTX(H)	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба.
	ритуксимаб-MASP-2 (LC-CCP12SP)	RTX(L)-M2	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба.
	MASP-2-ритуксимаб (CCP12SP-LC)	M2-RTX(L)	Домены CCP1/2SP MASP-2 слиты с N-концом легкой цепи ритуксимаба.
<b>Слитые белки Ab-MASP-3</b>	ритуксимаб-MASP-3 (HCΔK-CCP12SP)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K</sub> -M3	Домены CCP1/2SP MASP-3 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутация:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab.
	MASP-3-ритуксимаб	M3-RTX(H)	Домены CCP1/2SP MASP-3 слиты с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба.



	(CCP12SP-HC)		
	ритуксимаб-MASP-3 (LC-CCP12SP)	RTX(L)-M3	Домены CCP1/2SP MASP-3 слиты с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба.
	MASP-3-ритуксимаб (CCP12SP-LC)	M3-RTX(L)	Домены CCP1/2SP MASP-3 слиты с N-концом легкой цепи ритуксимаба.
<b>Слитые белки</b> <b>Ab-MASP-1</b>	ритуксимаб-MASP-1 (HCA-CCP12SP-R504Q)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K</sub> -M1 <sup>R504Q</sup>	Домены CCP1/2SP MASP-1 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного аргинина (R) на глутамин (Q) в MASP-1.
	MASP-1(CC12SP-R504Q))-ритуксимаб (LC)	M1 <sup>R504Q</sup> -RTX(L)	Домены CCP1/2SP MASP-1 слиты с N-концом легкой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> замена одного остатка мутантного аргинина (R) на глутамин (Q) в MASP-1.
<b>Слитые белки</b> <b>Ab-C1r</b>	ритуксимаб-C1r (HCAK-CCP12SP)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K</sub> -C1r	Домены CCP1/2SP C1r слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab.
	ритуксимаб-C1r (HCAK-N297G-CCP12SP)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K, N297G</sub> -C1r	Домены CCP1/2SP C1r слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного аспарагина (N) на глицин (G) в Fc-участке Ab
	ритуксимаб-C1r (HCAK-N297G-CCP12SP-S654A)	RTX(H) <sup>Δ</sup> <sub>K, N297G</sub> -C1r <sup>S654A</sup>	Домены CCP1/2SP C1r слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного аспарагина (N) на глицин (G) в Fc-участке Ab и замена одного остатка мутантного серина (S) на аланин (A) в C1r.

<b>Слитые белки Ab-C1s</b>	ритуксимаб-C1s (HCAK-CCP12SP)	RTX(H) <sup>Δ</sup> K-C1s	Домены CCP1/2SP C1 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab.
	ритуксимаб-C1s (HCAK-N297G-CCP12SP)	RTX(H) <sup>Δ</sup> K, N297G-C1s	Домены CCP1/2SP C1 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного аспарагина (N) на глицин (G) в Fc-участке антитела.
	ритуксимаб-C1s (HC <sup>ΔK</sup> -N297G-CCP12SP-S632A)	RTX(H) <sup>Δ</sup> K, N297G-C1s <sup>S632A</sup>	Домены CCP1/2SP C1 слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислотного остатка лизина (K) в HC Ab. Замена одного остатка мутантного аспарагина (N) на глицин (G) в Fc-участке Ab и замена одного остатка мутантного остатка серина (S) на аланин (A) в C1s.
<b>Слитые белки Ab-CFD</b>	proCFD-RTX(HC)	ProCFD-RTX(H)	Домен SP проформы CFD слит с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба.
	pro-CFD-RTX(HC-N297G)	ProCFD-RTX(H) <sup>N</sup> <sub>297G</sub>	Домен SP проформы CFD слит с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> замена одного остатка мутантного аспарагина (N) на глицин (G) в Fc-участке Ab.
	MatCFD-RTX(HC)	MatCFD-RTX(H)	Домен SP зрелого CFD слит с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба.
	MatCFD-RTX(HC-N297G)	MatCFD-RTX(H) <sup>N</sup> <sub>297G</sub>	Домен SP зрелого CFD слит с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> замена одного остатка мутантного аспарагина (N) на глицин (G) в Fc-участке Ab.
	MatCFD-RTX	MatCFD <sup>S</sup>	Домен SP зрелого CFD слит с N-концом

	(S208A-HC)	<sup>208A</sup> <sub>-</sub> RTX(H)	тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> замена одного остатка мутантного серина (S) на аланин (A) в CFD.
	MatCFD-RTX (S208A-HC-N297G)	MatCFD <sup>S</sup> <sup>208A</sup> <sub>-</sub> RTX(H) N297G	Домен SP зрелого CFD слит с N-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> замена одного остатка мутантного серина (S) на аланин (A) в CFD и замена одного остатка мутантного аспарагина (N) на глицин (G) в Fc-участке Ab.
	RTX-matCFD (НСΔK)	RTX(H) <sup>Δ</sup> K <sub>-</sub> matCFD	Домен SP зрелого CFD слит с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислоты лизина (K) в HC Ab.
	RTX-matCFD (LC)	RTX(L)- matCFD	Домен SP зрелого CFD слит с C-концом легкой цепи ритуксимаба.
	MatCFD-RTX(LC)	MatCFD- RTX(L)	Домен SP зрелого CFD слит с N-концом легкой цепи ритуксимаба.
<b>Слитые белки Ab-C2a</b>	ритуксимаб-C2a (НСΔK)	RTX(H) <sup>Δ</sup> K <sub>-</sub> -C2a	Домены vWFA-SP C2a слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислоты лизина (K) в HC Ab.
<b>Слитые белки Ab-Vb</b>	ритуксимаб-Vb (НСΔK)	RTX(H) <sup>Δ</sup> K <sub>-</sub> -Vb	Домены vWFA-SP Vb слиты с C-концом тяжелой цепи ритуксимаба. <u>Мутации:</u> делеция аминокислоты лизина (K) в HC Ab.

#### *Получение и клонирование плазмиды*

Для создания конструкций рекомбинантных слитых белков были выполнены следующие стадии: (i) расщепление плазмидного вектора, (ii) клонирование вставок и (iii) трансформация в компетентные клетки *E. coli*.

Вектор pCAG линеаризовали для клонирования посредством расщепления рестриктазой SapI (NEB). Для расщепления в объеме реакционной смеси 50 мкл использовали 3 мкг вектора, 2 мкл эндонуклеазы и 5 мкл буфера CutSmart (NEB). Расщепление рестриктазами проводили при 37°C в течение приблизительно 2 ч.

Для получения слитых белков MASP-3, MASP-2, MASP-1, C1r, C1s, CFD, C2a и Vb были приготовлены следующие конструкции:

- (i) HC ритуксимаба

- (ii) LC ритуксимаба и
- (iii) каталитический сегмент белков комплемента, слитый либо с:
  - a) C-концом RTX HC,
  - b) N-концом RTX HC,
  - c) C-концом RTX LC
  - d) N-концом RTX LC.

ПЦР вставок проводили со специфическими праймерами, 5X Phusion HF Buffer (NEB), dNTP и ДНК-полимеразой Phusion, используя следующие условия термоциклирования:

- начальная денатурация: при 98°C в течение 30 с
- денатурация: при 98°C в течение 10 с
- отжиг: при 60°C в течение 30 с
- удлинение: при 72°C в течение 40 с
- дальнейшее удлинение: при 72°C в течение 5 мин

ПЦР проводили в 30 циклах. За амплификацией вставок следовал гель-электрофорез для подтверждения реакций ПЦР, и продукты очищали с использованием набора для очистки NucleoSpin Purification (Macherey-Nagel). Затем проводили реакцию клонирования в объеме 5 мкл с линейризованным вектором, очищенными вставками и смесью ферментов 5X In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara Bio) при 50°C в течение 15 мин.

Экспрессионные конструкции, использованные для получения рекомбинантных слитых белков, трансформировали в компетентные клетки *E. coli* (химически компетентные, устойчивые к бактериофагу *E. coli* (One Shot™ Mach1™ T1, Invitrogen)) и отбирали на чашках с агаром Kanamycin LB. 10 нг плазмиды добавляли во флакон с компетентными клетками и клетки инкубировали на льду в течение 30 мин. Затем смесь подвергали тепловому шоку при 42°C в течение 30 с с последующей инкубацией на льду в течение 2 мин. 250 мкл среды S.O.C. добавляли во флакон и клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч при 225 об/мин в встряхивающем инкубаторе. 100 мкл этой культуры высевали на чашку, содержащую канамицин, для культивирования в течение ночи при 37°C. С чашек отбирали одиночные трансформированные колонии и размножали в устойчивом к антибиотику (25 мкг/мл) и 2,5 мл LB в течение ночи в шейкере при 37°C. На следующие сутки плазмидную ДНК экстрагировали из части культур с использованием набора Qiagen plasmid maxiprep; другую часть культуры объемом 1 мл хранили при температуре 4°C для использования в будущем. Плазмидную ДНК секвенировали, чтобы гарантировать успех клонирования, и выбранный клон культивировали в шейкере при 37°C в течение 1 ч и инокулировали в 120 мл бульона, содержащего канамицин (Teknova). После культивирования в течение ночи при 37°C плазмидную ДНК экстрагировали с использованием набора Qiagen plasmid maxiprep.

#### *Экспрессия и очистка белка*

Клетки Expi293 культивировали в среде Expi293 (Gibco) и готовили для

трансфекции с плотностью клеток  $2,9 \times 10^6$  клеток/мл. Измеряли концентрацию очищенной плазмидной ДНК и готовили ДНК в соотношении НС:LC 1:2 для трансфекции. Для трансфекции объемом 500 мл использовали общее количество ДНК, равное 500 мкг. ДНК суспендировали в OptiMEM (Gibco) и смешивали с липофектаминоном (Invitrogen). После 20-мин инкубации при комнатной температуре к клеткам добавляли смесь ДНК и липофектамина. Трансфектированные клетки культивировали в шейкере при 37°C при 125 об/мин в течение 4-5 суток. Приблизительно через 18 ч трансфекции добавляли усилители (ExpriFectamine 293 Transfection Kit; Gibco) для повышения жизнеспособности клеток и экспрессии белка. Для общего объема культуры 500 мл использовали 2,5 мл Усилителя-1 и 25 мл Усилителя-2.

Для большинства рекомбинантных слитых белков трансфектированные клетки культивировали при 37°C. Более низкую температуру (32,5°C) во время культивирования тестировали для слитых белков ритуксимаб-MASP-3 (LC-CCP12SP) и MASP-3-ритуксимаб (CCP12SP-LC), для установления того, насколько более низкая температура будет приводить к снижению агрегации белков.

Через 4-5 суток культивирования при 37°C трансфектированные клетки удаляли и супернатант культуры фильтровали с использованием лабораторного набора Sartoclear Dynamics (Sartorius). Все слитые белки очищали на сефарозе с иммобилизованным белком А. После фильтрации супернатанта добавляли сефарозу с белком А и для обеспечения максимального связывания белка, смесь инкубировали на роторе в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем смеси загружали на хроматографические колонки (Bio-Rad). После 2,5-кратной промывки 19 мл  $1 \times$  PBS (Gibco) белки элюировали 15 мл глицинового буфера с pH 3 (Teknova) и нейтрализовали 3 мл Трис-HCl буфера с pH 9 (Teknova). Очистку завершали концентрированием и заменой буфера на PBS или гистициновый буфер (20 mM гистидин, 150 mM NaCl) (буфер для хранения) с использованием центрифужных фильтров (MilliporeSigma Amicon Ultra).

Выход экспрессии (мг/мл) каждого белка показан в таблице 2.

**Таблица 2**

Слитый белок	Обозначение	Молекулярная масса	Выход экспрессии (мг/л)
Ритуксимаб-MASP-2 (НС-CCP12SP)	RTX(H)-M2	231,2	5,5
Ритуксимаб-MASP-2(НСΔК-CCP12SP)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2	231,0	2,2
Ритуксимаб-MASP-2 (НСΔК-CCP12SP-R444K)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2 <sup>R444K</sup>	230,9	1,4
Ритуксимаб-MASP-2 (НСΔК-	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2 <sup>R444Q</sup>	230,9	0,5

ССР12SP-R444Q)			
Ритуксимаб-МАСP-2 (НСΔК-ССР12SP-S633A)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2 <sup>S633A</sup>	230,9	2,3
МАСP-2-Ритуксимаб (ССР12SP-НС)	M2-RTX(H)	231,2	0,8
Ритуксимаб-МАСP-2 (LC-ССР12SP)	RTX(L)-M2	231,2	2,5
МАСP-2-Ритуксимаб (ССР12SP-LC)	M2-RTX(L)	231,2	0,8
Ритуксимаб-МАСP-3(НСΔК-ССР12SP)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M3	241,2	163,8
МАСP-3-Ритуксимаб (ССР12SP-НС)	M3-RTX(H)	241,5	143,0
Ритуксимаб-МАСP-3 (LC-ССР12SP)	RTX(L)-M3	241,5	52,0
МАСP-3-Ритуксимаб (ССР12SP-LC)	M3-RTX(L)	241,5	48,0
Ритуксимаб-МАСP-1 (НСΔК-ССР12SP-R504Q)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M1 <sup>R504Q</sup>	235,9	2,5
МАСP-1(ССР12SP-R504Q)-Ритуксимаб (LC)	M1 <sup>R504Q</sup> -RTX(L)	236,2	1,1
Ритуксимаб-C1r (НСΔК-ССР12SP)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1r	236,7	81,7
Ритуксимаб-C1r(НСΔК-N297G-ССР12SP)	RTX(H) <sup>ΔK, N297G</sup> -C1r	236,6	96,2
Ритуксимаб-C1r(НСΔК-N297G-ССР12SP-S654A)	RTX(H) <sup>ΔK, N297G</sup> -C1r <sup>S654A</sup>	236,6	65,6
Ритуксимаб-C1s (НСΔК-ССР12SP)	RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1s	236,6	123,8
Ритуксимаб-C1s(НСΔК-N297G-ССР12SP)	RTX(H) <sup>ΔK, N297G</sup> -C1s	236,5	91,7
Ритуксимаб-C1s(НСΔК-N297G-ССР12SP-S632A)	RTX(H) <sup>ΔK, N297G</sup> -C1s <sup>S632A</sup>	236,5	116,1
ProCFD-RTX(НС)	ProCFD-RTX(H)	196,3	3,4

Pro-CFD-RTX(HC-N297G)	ProCFD-RTX(H) <sup>N297G</sup>	196,2	1,3
MatCFD-RTX(HC)	MatCFD-RTX(H)	195,0	11,7
MatCFD-RTX(HC-N297G)	MatCFD-RTX(H) <sup>N297G</sup>	194,9	8,0
MatCFD-RTX (S208A-HC)	MatCFD <sup>S208A</sup> -RTX(H)	195,0	23,1
MatCFD-RTX (S208A-HC-N297G)	MatCFD <sup>S208A</sup> -RTX(H) <sup>N297G</sup>	194,9	31,7
RTX-MatCFD (HCAK)	RTX(H) <sup>AK</sup> -MatCFD	194,8	99,8
RTX-MatCFD (LC)	RTX(L)-MatCFD	195,0	77,7
MatCFD-RTX(LC)	MatCFD-RTX(L)	195,0	15,1
Ритуксимаб-C2a (HCAK)	RTX(H) <sup>AK</sup> -C2a	260,8	61,2
Ритуксимаб-Bb (HCAK)	RTX(H) <sup>AK</sup> -Bb	260,0	18,1

**Пример 2. Анализ экспрессированных белков, полученных из ритуксимаба**  
*Целостность белка*

SDS-PAGE проводили для оценки целостности белка. Для разделения субъединиц каждого белка использовали полиакриламидный гель с градиентом концентрации 4-12% (гель NuPAGE Bis-Tris, Invitrogen), и размеры полипептидов оценивали с использованием маркера молекулярной массы (SeeBlue Plus 2, Invitrogen). SDS-PAGE проводили как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях. После того проводили анализ геля в рабочем буфере (MOPS SDS Running Buffer, NuPage) при 120 В в течение 40 мин, его окрашивали красящим раствором (SimplyBlue SafeStain, Invitrogen) на встряхивающем роторе в течение 1 ч с последующим обесцвечиванием в течение ночи.

Было установлено, что все слитые белки Ab-MASP-2 в той или иной степени деградировали и находились в активной форме, за исключением RTX(H)<sup>AK</sup>-M2<sup>S633A</sup> и RTX(H)<sup>AK</sup>-M2<sup>R444Q</sup>, которые в результате мутации находились в неактивной или зимогенной форме. В отличие от MASP-2, слитые белки MASP-3 получали в форме зимогена, и продукт деградации не был обнаружен. См. фиг. 4. Кроме того, анализ SDS-PAGE проводили для слитых белков Ab-MASP-3, которые культивировали при более низкой температуре во время экспрессии. Для сравнения включали белки Ab-MASP-3, культивированные при 37°C. Культивирование при более низкой температуре осуществляли для снижения агрегатов, образующихся во время экспрессии. Анализ SDS-PAGE проводили в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, и не выявили деградации слитых белков MASP-3 и различий между белками в разных условиях культивирования (данные не показаны).

Также было установлено, что слитые белки Ab-C1r и Ab-C1s содержат незначительные продукты деградации, в то время как это отсутствовало в отношении слитых белков Ab-C2a, Ab-Bb или Ab-CFD, которые показали интактную белковую полосу при анализе SDS-PAGE. См. фиг. 5.

#### *Активация активности сериновой протеазы MASP-3*

Анализ SDS-PAGE слитых белков Ab-MASP-3 показал, что белки находятся в зимогенной форме, при этом продукт деградации не был обнаружен. См. фиг. 4.

Активацию белков RTX-M3 проводили с использованием усеченной MASP-2 (CCP1/2SP), после чего проводили анализ SDS-PAGE в восстанавливающих условиях для подтверждения превращения слитого белка MASP-3 из зимогена в активную расщепленную форму. Активацию слитого белка MASP-3 проводили, основываясь на публикации Oroszlán et al., 2017. Зимоген RTX-M3 (2 мкМ) разводили в буфере 140 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4, 0,1 мМ ЭДТА и инкубировали один при 37°C (отрицательный контроль) или с добавлением MASP-2 (CCP1/2SP) (91 нМ) в течение различных временных точек (0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 150 и 190 мин). Образцы удаляли на каждую временную точку и помещали при температуре -20°C для остановки реакции. Образцы анализировали с использованием SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.

Результаты анализа показали, что рекомбинантный слитый белок MASP-3 может быть активирован другой сериновой протеазой, становясь при этом функциональным. Зимогенный слитый полипептид RTX-M3 имеет массу приблизительно 92 кДа, в то время как активная форма дает две полосы: RTX-M3 (CCP1/2) и расщепленный домен SP. См. фиг. 6.

#### *Агрегация*

Для оценки агрегации рекомбинантных слитых белков MASP-3 проводили эксклюзионную хроматографию с использованием ÄKTA (GE Healthcare). 200 мкг образца, разведенного в His-буфере (20 мМ гистидина, 150 мМ NaCl), наносили и пропускали через колонку (колонка Superdex 200 Enhance 5/150 GL) для разделения белков по размеру. Белки, которые анализировали, представляли собой слитый белок тяжелой цепи ритуксимаба ритуксимаб-MASP-3 (RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M3) и MASP-3-ритуксимаб (M3-RTX(H)), и слитый белок легкой цепи ритуксимаба ритуксимаб-MASP-3 (RTX(L)-M3) и MASP-3-ритуксимаб (M3-RTX(L)). Последние два белка экспрессировали при двух разных температурах (37°C и 32,5°C).

Результаты анализа показали более чем 10% агрегации в RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M3 и M3-RTX(H), культивированных при 37°C. Анализ RTX(L)-M3 и M3-RTX(L), культивированных при 37°C или при 32,5°C, показал приблизительно двукратное повышение уровня агрегации и приблизительно трехкратное снижение выхода экспрессии при более низкой температуре культивирования (данные не показаны).

**Пример 3. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из ритуксимаба, с мишенями**

#### *Проточная цитометрия*



Связывание некоторых нацеленных комплемент-активирующих молекул, с CD20, экспрессируемым на поверхности клетки, оценивали с использованием проточной цитометрии. Сначала определяли уровни экспрессии CD20 на трех клеточных линиях: линии лимфомы Беркитта человека Ramos (ATCC), линии крупноклеточной лимфомы SU-DHL-8 (ATCC) и линии острого лимфобластного лейкоза Kasumi-2 (DSMZ). Все клеточные линии поддерживали при 37°C в среде RPMI 1640 [-]L-глутамин с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS и GlutaMax (Gibco). Собирали приблизительно полмиллиона клеток и ресуспендировали в буфере для FACS (PBS с 2% FBS и 0,05% азида натрия). Для предупреждения неспецифического связывания, к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 5 мкл блокирующего раствора (ингибитор связывания FcR, eBioscience) с последующей инкубацией в течение 15 мин при комнатной температуре. К клеточной суспензии добавляли первичное антитело, нацеленное против CD20 (ритуксимаб). После 20-мин инкубации на льду клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело, Alexa Fluor 647-конъюгированный античеловеческий Fc IgG (клон HP6017, Biolegend). Клетки инкубировали на льду в течение 20 мин, затем трижды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Наконец, образцы окрашенных клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Результаты приведены на фиг. 2, левая колонка.

Линия лимфомы Беркитта человека Ramos (ATCC) была выбрана для анализа связывания CD20 с использованием нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен ритуксимаба. Клетки поддерживали при 37°C в среде RPMI 1640 [-]L-глутамин с добавлением 10% инактивированной нагреванием FBS и GlutaMax (Gibco). Собирали приблизительно полмиллиона клеток и ресуспендировали в буфере для FACS (PBS с 2% FBS и 0,05% азида натрия). Для предупреждения неспецифического связывания, к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 5 мкл блокирующего раствора (ингибитор связывания Fc, eBioscience) с последующей инкубацией в течение 15 мин при комнатной температуре. К клеточной суспензии добавляли первичные антитела, нацеленные против CD20. Эти антитела включали ритуксимаб (анти-CD20 mAb) и рекомбинантную нацеленную на комплемент-активирующую молекулу, M2-RTX(H), RTX(L)-M2, M2-RTX(L), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M3, M3-RTX(H), RTX(L)-M3, M3-RTX(L), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-MatCFD, MatCFD-RTX(H), RTX(L)-MatCFD и MatCFD-RTX(L), а также каталитически неактивную конструкцию RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>S633A</sup>. После 20-мин инкубации на льду клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело, Alexa Fluor 647-конъюгированное античеловеческое Fc IgG Ab (клон HP6017, Biolegend). Клетки инкубировали на льду в течение 20 мин, затем трижды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Наконец, образцы окрашенных клеток анализировали на FACSCalibur.

Результаты анализа FACS показали, что все C-концевые слитые белки связываются с CD20 на поверхности клетки, тогда как из N-концевых конфигураций только M2-RTX(H) и MatCFD-RTX(H) связываются с CD20 на поверхности клетки. См. фиг. 9.

### *Биослойная интерферометрия*

Биослойную интерферометрию проводили для анализа кинетики связывания рекомбинантных нацеленных комплемент-активирующих молекул против мишени CD20 (Acro Biosystems) с использованием системы Octet RED96 (ForteBio Inc.). Анти-hIgG Fc (АНС) (ForteBio Inc.) использовали для загрузки рекомбинантной нацеленной на комплемент-активирующей молекулы RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1r, RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1s, ProCFD-RTX(H), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R444K</sup> или RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M3, которые разбавляли кинетическим буфером (PBS, 0,02% Твина 20, 0,1% BSA, 0,05% DDM, 0,01% CHS) в концентрации 69 нМ и добавляли в один ряд аналитического планшета. Анализировали различные концентрации CD20. Готовили двукратные серийные разведения антигена в кинетическом буфере с начальной концентрацией 200 нМ и добавляли в один ряд. Для диссоциации белков от биосенсоров для загрузки следующих испытуемых образцов, требуется стадия регенерации. Для этой цели в один ряд аналитического планшета добавляли регенерационный буфер (10 мМ глицина, pH 1,6), и для нейтрализации в другой ряд добавляли кинетический буфер. Кинетику связывания белков анализировали с использованием программного обеспечения Octet CFR (ForteBio Inc.).

Было показано, что все тестированные нацеленные комплемент-активирующие молекулы связываются с антигеном CD20 в зависимости от дозы. Рассчитанные константы равновесия ( $K_D$ ) являются следующими: RTX -  $<1.00E-12M$ , OBZ -  $5.03E-09 M$ , RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M3- $8.03E-10M$ , RTX<sup>ΔK</sup>-M2R444K -  $2.89E-10M$ , RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1r -  $6.30E-11M$ , RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1s -  $7.31E-10M$  и ProCFD-RTX(H) -  $3.20E-10M$ . См. фиг. 10 и таблицу 4.

**Таблица 4**

Образец	$K_D$ (M)	$K_{on}$ (1/Мс)	$K_{dis}$ (1/с)	Полный $R^2$
RTX	$<1.00E-12$	$1.40E+05$	$<1.00E-07$	0.9993
OBZ	$5.03E-09$	$2.46E+05$	$1.23E-03$	0.9923
RTX(H) <sup>ΔK</sup> - M2 <sup>R444K</sup>	$2.89E-10$	$1.17E+05$	$3.89E-05$	0.9987
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M3	$8.03E-10$	$9.52E+04$	$7.64E-05$	0.9942
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1r	$6.30E-11$	$1.05E+05$	$6.61E-06$	0.9986
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1s	$7.31E-10$	$1.21E+05$	$8.86E-05$	0.9972
ProCFD-RTX(H)	$3.2E-10$	$1.26E+05$	$4.03E-05$	0.9983

### **Пример 4. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из ритуксимаба**

#### *Активность сериновой протеазы*

Проводили анализ активации расщепления субстрата различных нацеленных комплемент-активирующих молекул, в котором в качестве субстратов использовали компоненты комплемента C4 и C3. Субстраты разводили в PBS (1×), pH 7,4, и инкубировали при 37°C одни или с добавлением одной из RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1r, RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C1s,

RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M3, proCFD-RTX(H), RTX(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R444K</sup>, RTX(H)<sup>ΔK</sup>-C2a или RTX(H)<sup>ΔK</sup>-Bb в соотношении фермент/субстрат 1:20. Образцы удаляли через 3 ч и анализировали с использованием SDS-PAGE в восстанавливающих условиях для детектирования расщепления C4 или C3. Результаты приведены на фиг. 11А (субстрат C4) и 11В (субстрат C3).

Ферментативную активность слитых белков Ab-протеаза измеряли в микротитрационном планшете на основе расщепления синтетического флуорогенного или хромогенного пептидного субстрата. Рекомбинантные слитые белки инкубировали в буфере для анализа (для флуориметрического анализа 20 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 0,1% Твина 20; для колориметрического анализа, 50 mM Трис, pH 7,5, 1 M NaCl) при комнатной температуре с соответствующим синтетическим пептидным субстратом (5-200 мкМ в зависимости от ферментов). Изменения флуоресценции или поглощения контролировали в течение 20 мин, активность фермента рассчитывали по начальной скорости изменений и выражали как относительные единицы/мин/мкмоль каталитического сайта фермента, для обеспечения возможности сравнения с очищенным контрольным ферментом. Результаты приведены в таблице 5.

Таблица 5

Образец белка	Расщепляющая активность (относительные единицы/млн/кмоль)	Активность относительно ферментного контроля [%]
Анализ MASP-2		
RTX(H)-M2	1.82E+11	25.3
	1.42E+11	19.8
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2	9.08E+10	17.0
	1.19E+11	16.2
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2 <sup>R444K</sup>	2.62E+11	35.7
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2 <sup>R444Q</sup>	данные отсутствуют	0
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M2 <sup>S633A</sup>	данные отсутствуют	0
M2-RTX(H)	4.84E+11	67.5
	2.75E+11	51.6
RTX(L)-M2	1.15E+11	21.6
M2-RTX(L)	3.54E+11	66.3
	7.17E+11	
MASP2 (CCP12SP)	5.34E+11	100
	7.35E+11	
Анализ MASP-3		
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M3	1.84E+13	5.3
	8.65E+12	22.7
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M3	3.97E+13	104
(активированный M2)	3.12E+13	82.0
	2.89E+13	76.0
M3-RTX(H)	1.25E+13	33.0
RTX(L)-M3	2.42E+13	8.0
M3-RTX(L)	1.54E+13	5.1
	3.48E+14	
MASP3 (SP)	3.81E+13	100
	3.04E+14	
Анализ MASP-1		
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -M1 <sup>R504Q</sup>	данные отсутствуют	0
M1 <sup>R504Q</sup> -RTX(L)	данные отсутствуют	0
MASP1 (CCP2SP)	2.65E+14	100
Анализ C1r		
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1r	3.69E+12	284
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1r <sup>S654A</sup>	данные отсутствуют	0
C1r (CCP12SP)	1.30E+12	100
Анализ C1s		
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1s	1.37E+14	278
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -C1s <sup>S632A</sup>	данные отсутствуют	0
C1s (CCP12SP)	4.91E+13	100
Анализ CFD		
RTX(H) <sup>ΔK</sup> -MatCFD	данные отсутствуют	0
MatCFD-RTX(H)	9.40E-03	115
RTX(L)-MatCFD	данные отсутствуют	0
MatCFD-RTX(L)	9.79E-03	119
MatCFD <sup>S208A</sup> -RTX(H)	данные отсутствуют	0
ProCFD-RTX(H)	4.04E-04	12.7
MatCFD	8.21E-03	100

#### Анализ отложения C4

На лектиновом пути системы комплемента, сериновая протеаза MASP-2, активирует каскад комплемента, расщепляя белки C4 и C2. Активация C4 приводит к

отложению C4b на поверхности клетки-мишени. Такая расщепляющая активность свойственна комплексу C1 на классическом пути. Следовательно, функциональную активность белков MASP-2, C1r и C1s оценивали с использованием анализа отложения C4. В отсутствие MASP-2 лектиновый путь не является функциональным, как было показано на примере плазмы из обедненной MASP-2 сыворотки человека (Møller-Kristensen et al., 2007), и плазмы нокаутных по MASP-2 мышей (Schwaeble et al., 2011). Следовательно, чтобы предотвратить отложение сериновых протеаз в самой плазме, используемую плазму получали у нокаутных по MASP-2 мышей. Также тестировали активность в нормальной сыворотке человека, и тестированные образцы включали только сывороточный контроль, агликозилированный домен антитела (для предотвращения связывания C1q с Fc-участком и инициации активности классического пути) и отрицательный контроль с каталитически неактивными молекулами.

Для анализа мышинной плазмы микротитрационные планшеты для ELISA Nunc Maxisorp покрывали 100 мкл покровного буфера (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>), содержащего маннан (50 мкг/мл; Sigma-Aldrich, M7504) и/или рекомбинантные нацеленные комплемент-активирующие молекулы (215 нМ) и инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующие сутки в каждую лунку добавляли 250 мкл буфера PBS, содержащего 1% BSA (Sigma-Aldrich, A3294), и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч для блокирования оставшейся связывающей белок поверхности. Планшеты промывали 3 раза PBS, содержащим 0,05% Твина 20 (промывочный буфер). Гирудиновую плазму от мышей разводили PBS (без кальция и магния) и добавляли в лунки. Планшеты инкубировали в течение 15 мин при 4°C и трижды промывали.

Для оценки отложения C4 на поверхности маннана, C4b детектировали с использованием крысиного моноклонального анти-C4 антитела (16D2, Santa Cruz Biotechnology). Добавляли 100 мкл/лунку, разведенного промывочным буфером до конечной концентрации 0,2 мкг/мл, и планшеты перемешивали в течение 30 мин при 37°C и 200 об/мин. Планшеты промывали три раза и добавляли по 100 мкл вторичного антитела. Вторичное антитело, которое использовали, представляло собой козий антикрысиный IgG(H+L), конъюгированный со щелочной фосфатазой (AP) (номер по каталогу 3051-05, Southern Biotech), которое разводили в промывочным буфером до конечной концентрации 0,043 мкг/мл. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Наконец, в планшеты добавляли 100 мкл колориметрического субстрата TMB (раствор субстрата 1-Step Ultra TMB-ELIS, Thermo-Scientific, 34029). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,1 Н серной кислоты (BDH7230-1) и измеряли поглощение при 450 нм с использованием планшетного ридера.

Для анализа сыворотки человека микротитрационные планшеты Nunc Maxisorp ELISA покрывали 100 мкл покровного буфера (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>), содержащего рекомбинантные слитые белки (69 нМ), и инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующие сутки в каждую лунку добавляли 250 мкл буфера PBS, содержащего 1% BSA (Sigma-Aldrich, A3294), и инкубировали при комнатной температуре в течение 2

ч для блокирования оставшейся связывающей белок поверхности. Планшеты промывали 3 раза PBS, содержащим 0,05% Твина 20 (промывочный буфер). Нормальную человеческую сыворотку (NHS) разводили PBS (без кальция и магния) и добавляли в лунки. Планшеты инкубировали в течение 10 мин при 4°C и трижды промывали.

Для оценки отложения C4 на поверхности маннана, C4b детектировали с использованием поликлонального кроличьего античеловеческого антитела C4c (Q0369, Dako). Добавляли 100 мкл/лунку, разведенного промывочным буфером до конечной концентрации 0,88 мкг/мл, и планшеты перемешивали в течение 30 мин при 37°C и 200 об/мин. Планшеты промывали три раза и добавляли по 100 мкл вторичного антитела. Вторичное антитело, которое использовали, представляло собой козий антикроличий IgG (H+L), конъюгированный со щелочной фосфатазой (AP) (номер по каталогу G0710-V488D, Southern Biotech), который разводили промывочным буфером до конечной концентрации 0,043 мкг/мл. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Наконец, в планшеты добавляли 100 мкл колориметрического субстрата TMB (раствор субстрата 1-Step Ultra TMB-ELIS, Thermo-Scientific, 34029). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,1 Н серной кислоты (BDH7230-1) и измеряли поглощение при 450 нм с использованием планшетного ридера.

Результаты приведены на фиг. 12А и 12В.

#### *Анализ отложения C3*

Роль MASP-3 в альтернативном пути системы комплемента выявлена недавно и было показано, что активная MASP-3 превращает про-CFD в зрелый CFD (Dobó et al., 2016). Активированный фактор комплемента D (CFD) представляет собой сериновую протеазу, которая расщепляет фактор В (FB) в проконвертазе C3bB в альтернативного пути, что приводит к образованию конвертазы C3 C3bBb. Конвертаза C3 расщепляет C3 и генерирует молекулы C3b, которые ковалентно связываются с поверхностью клетки. В образовании конвертазы C4bC2a участвуют компоненты комплемента классического и лектинового путей. Компонент комплемента C2 подвергается расщеплению под действием MASP-1, MASP-2, C1r и C1s с последующим связыванием с C4b, что приводит к образованию конвертазы C3 классического и лектинового пути. Затем конвертаза C3 расщепляет C3 и генерирует молекулы C3b, которые ковалентно связываются с поверхностью (фиг. 1). Следовательно, функциональную активность всех вышеуказанных сериновых протеаз можно оценить с использованием анализа отложения C3. Для предупреждения отложения C3 за счет активности MASP-3 из плазмы (Takahashi et al., 2008), использовали плазму мышей с нокаутом MASP-1/3.

Для анализа мышинной плазмы микротитрационные планшеты для постановки иммуноферментного анализа Nunc Maxisorp покрывали 100 мкл зимозана (10 мкг/мл) и/или рекомбинантными нацеленными на комплемент-активирующими молекулами (215 нМ), суспендированными в покровном буфере (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>) с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C. На следующие сутки в каждую лунку добавляли 250 мкл 1% BSA (Sigma-Aldrich, A3294) в буфере PBS и планшет инкубировали

в течение 2 ч при комнатной температуре с последующим промыванием промывочным буфером. Гирудиновую плазму от мышей разводили буфером MgEGTA (10 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM барбитала, 145 mM NaCl [pH 7,4]) и добавляли в лунки. Планшеты инкубировали в течение 50 мин при 37°C и трижды промывали.

Для детектирования C3b на поверхности, использовали кроличье антитело против C3c человека (Dako, партия B298875). Это антитело C3c способно распознавать C3b. Добавляли 100 мкл/лунку ((2,4 мкг/мл)) разбавленного промывочным буфером, и планшеты инкубировали в течение 30 мин при 37°C и 200 об/мин. Планшеты промывали три раза и в планшеты добавляли 100 мкл вторичного антитела, козьего антикроличьего, конъюгированного со щелочной фосфатазой (AP) (Southern Biotech), и разведенного в промывочном буфере (0,043 мкг/мл). Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Для определения отложения C3 в планшеты добавляли 100 мкл TMB (раствор субстрата 1-Step Ultra TMB-ELIS, Thermo-Scientific, 34029). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,1 Н серной кислоты (BDH7230-1) и измеряли поглощение при 450 нм с использованием планшетного ридера.

Для анализа сыворотки человека, микротитрационные планшеты для иммуоферментного анализа Nunc Maxisorp покрывали рекомбинантными слитыми белками (250 нМ), суспендированными в покровном буфере (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>), с последующей инкубацией в течение ночи при 4°C. На следующие сутки в каждую лунку добавляли 250 мкл 1% BSA (Sigma-Aldrich, A3294) в буфере PBS и планшет инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с последующим промыванием промывочным буфером. NHS разводили буфером MgEGTA (10 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM барбитала, 145 mM NaCl [pH 7,4]) и добавляли в лунки. Планшеты инкубировали в течение 25 мин при 37°C и трижды промывали. Детектирование C3b проводили аналогично тому, как описано для анализа мышинной плазмы.

Результаты приведены на фиг. 13.

#### *Отложение комплемента на клетках-мишенях*

Нацеленные комплемент-активирующие молекулы состоят из двух доменов: мишень-связывающего домена, который связывается с мишенью через переменные области (Fv) Fab-фрагмента антитела, и эффекторного серинового протеазного домена из комплемент-активирующей сериновой протеазы. Анализ отложения компонентов комплемента на CD20-положительных клетках проводили для оценки эффекта нацеленной на комплемент-активирующей молекулы в целом. Линию острого лимфобластного лейкоза Kasumi-2 (полученную из DSMZ) использовали для исследования отложения комплемента на поверхности клеток после обработки нацеленными на комплемент-активирующими молекулами ProCFD-RTX(H) и MatCFD-RTX(H). Конечные концентрации белков 12,5 нМ и 1,4 нМ разводили в буфере для анализа CDC (среда RPMI 1640 [-]L-глутамин, 5% инактивированная нагреванием FBS, GlutaMax и 25 mM HEPES). RTX и агликозилированные формы были включены в качестве контроля. Нормальную человеческую сыворотку (NHS) также разводили буфером для

анализа до конечной концентрации 15%. Клетки ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 300000 клеток/мл и переносили на 6-луночный аналитический планшет с последующим добавлением разбавленных белков и человеческой сыворотки. Планшеты для анализа инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. После обработки клетки ресуспендировали в буфере для FACS (PBS с 2% FBS и 0,05% азида натрия), блокировали для предупреждения неспецифического связывания блокирующим раствором (Human TruStain FcX, Biolegend) (5 мкл/100 мкл) и окрашивали первичными антителами против компонентов комплемента C3 или C5b-9 (MAC). Искользованные первичные антитела (5 мкг/мл) представляют собой кроличьи антитело против C3с человека (A0062, Dako) и моноклональное мышинное антитело против C5b-9 человека (M0777, Dako). После 20-мин инкубации на льду клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело (5 мкл/100 мкл), APC-конъюгированный антикроличий IgG (F0111, R&D Systems) и PE-конъюгированный антимышинный IgG (405307, BioLegend), антитела, распознающие C3 и C5b-9 соответственно. Клетки инкубировали на льду в течение 20 мин, затем трижды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Наконец, образцы окрашенных клеток анализировали на FACSCalibur.

Слитые белки CFD, в частности, слитые белки MatCFD, индуцировали достоверно более высокое отложение C3 и MAC на клетках-мишенях по сравнению с обработкой одной сывороткой или RTX. Результаты показаны на фиг. 14А (отложение C3) и 14В (отложение MAC).

**Пример 5. Цитотоксичность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из ритуксимаба**

*CDC анализ*

Линия В-клеток Ramos экспрессирует высокие уровни CD20, с которым связывается антитело ритуксимаб. Повышенная плотность антигена играет роль в инициации каскада комплемента посредством связывания антител, которое инициирует классический путь. Аналогичным образом, активные сериновые протеазы C1r и C1s являются активаторами классического пути. Каталитические домены MASP-1 и MASP-2 активируют лектиновый путь, и каталитические домены MASP-3 и CFD активируют альтернативный путь. C2 является активатором классического и лектинового путей, и фактор В активирует альтернативный путь.

Все три пути системы комплемента приводят к образованию MAC на поверхности клетки-мишени с последующим лизисом клетки. Полагается, что активация более чем одного пути комплемента приводит к усилению комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Таким образом, нацеленные комплемент-активирующие молекулы тестировали на способность повышать уровни CDC, что могло быть результатом активации любых двух или более путей комплемента, классического, лектинового и альтернативного.

Анализ комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) проводили с использованием набора для анализа цитотоксичности CytoTox-Glo (Promega). Серийные



разведения ритуксимаба и нацеленных комплемент-активирующих молекул (самая высокая концентрация: 12,5 нМ), готовили с использованием буфера для анализа (RPMI 1640, 5% инактивированной нагреванием FBS, GlutaMax, 25 mM HEPES). Нормальную человеческую сыворотку (NHS) также разводили буфером для анализа до конечной концентрации 15%. CD20+ клетки ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 10000 клеток/лунку и переносили в 96-луночный аналитический планшет с последующим добавлением разбавленных белков и человеческой сыворотки. Планшеты для анализа инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. После охлаждения при комнатной температуре в течение 15 мин, добавляли реагент CytoTox-Glo (Promega) и инкубировали еще 10 мин. Наконец, люминесценцию измеряли с использованием микропланшетного люминометра (Luminoskan Labsystems).

В некоторых случаях анализ CDC проводили с использованием йодида пропидия. Серийные разведения ритуксимаба и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили с использованием буфера для анализа (среда для культивирования клеток Opti-MEM, Gibco). Нормальную человеческую сыворотку (NHS) также разводили буфером для анализа для получения конечной концентрации 10%. CD20+ клетки промывали PBS, ресуспендировали в буфере для анализа до конечной концентрации 150000 клеток/лунку и переносили в 96-луночный аналитический планшет с последующим добавлением разбавленных белков и человеческой сыворотки. Планшеты для анализа инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. После инкубации добавляли 5 мкл йодида пропидия (Invitrogen, номер по каталогу 00-6990-50) и сразу же анализировали окрашенные клетки с помощью проточной цитометрии с использованием FACSCalibur.

Результаты анализа CytoTox-Glo приведены на фиг. 16-18. Результаты анализа с йодидом пропидия приведены на фиг. 19.

#### *Ингибирование CD55 и CD59*

Для определения возможного влияния регуляторных белков комплемента (CRP) в анализе CDC, проводили дополнительные анализы с использованием ингибиторов CRP. Для ингибирования активности CD55 и/или CD59 во время анализа использовали либо антитела к CRP CD55 (клон BRIC 216, Sigma-Aldrich), либо к CRP CD59 (клон BRIX 229, IBGRL), либо оба.

Разведения ритуксимаба (RTX), модифицированного ритуксимаба (RTX<sup>N297G</sup>), нацеленной на комплемент-активирующей молекулы MatCFD-RTX, и нацеленной на комплемент-активирующей молекулы MatCFD-RTX<sup>N297G</sup>, готовили с использованием буфера для анализа до конечной концентрации 337,5 нМ. Анти-CD55 антитело готовили с использованием буфера для анализа до конечной концентрации 10 мкг/мл и анти-CD59 антитела до конечной концентрации 2 мкг/мл. Нормальную человеческую сыворотку (NHS) также разводили буфером для анализа до конечной концентрации 15%. Клетки Ramos ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 300000 клеток/лунку и переносили в 96-луночный аналитический планшет с последующим добавлением анти-CRP, разбавленного RTX и нацеленных комплемент-активирующих молекул, и

человеческой сыворотки. Планшет для анализа инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. После инкубации добавляли 5 мкл йодида пропидия (Invitrogen, номер по каталогу 00-6990-50) и сразу же анализировали клетки с помощью проточной цитометрии с использованием FACSCalibur. Образцы, не содержащие анти-CRP антител, также использовали в качестве контроля (без ингибирования).

MatCFD-RTX<sup>N297G</sup> индуцировал достоверно более высокий уровень CDC на клетках Ramos по сравнению с RTX<sup>N297G</sup>, когда один или оба CRP были ингибированы. Гликозилированный RTX уже имел высокий уровень CDC, поэтому дальнейшего улучшения при использовании MatCFD-RTX(H) не наблюдали. Результаты приведены на фиг. 20.

#### **Пример 6. Получение слитых белков на основе алемтузумаба и даратумумаба**

Зрелый фактор комплемента D (MatCFD) сливали с анти-CD52 антителом, алемтузумабом (ALM), или с анти-CD38 антителом, даратумумабом (DARA), и слитые белки экспрессировали с использованием экспрессионного вектора pCAG. Вектор представляет собой модифицированный вариант pD2610-v1 (ATUM; первоначально описанный в Miyazaki et al., 1989) и содержит характерный гибридный промотор CMV и куриного бета-актина, и маркер устойчивости к канамицину.

Домены MatCFD сливали с N-концом тяжелой цепи антитела, в результате чего были получены следующие конструкции: MatCFD-ALM(H) (SEQ ID NO:97) и MatCFD-DARA(H) (SEQ ID NO:98).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

#### **Пример 7. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из алемтузумаба и полученных из даратумумаба, с мишенями**

##### *Проточная цитометрия*

Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, имеющих связывающий домен, полученный из алемтузумаба, с CD52, экспрессируемым на поверхности клетки, и связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, имеющих связывающий домен, происходящий из даратумумаба, с CD38, экспрессируемым на поверхности клетки, оценивали с использованием проточной цитометрии. Собирали приблизительно 500000 клеток линии HT В-клеточной лимфомы человека (ATCC) и ресуспендировали в буфере для FACS. Для предупреждения неспецифического связывания 5 мкл блокирующего раствора добавляли к 100 мкл клеточной суспензии, которую затем инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Антитела алемтузумаб (нацеленное на CD52) и даратумумаб (нацеленное на CD38) или одну из нацеленных комплемент-активирующих молекул MatCFD-ALM(H) или MatCFD-DARA(H) добавляли к клеточной суспензии и инкубировали 20 мин на льду. Затем клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело (Alexa Fluor 647-конъюгированный мышинный античеловеческий IgG1). Клетки инкубировали на льду в течение 20 мин, затем трижды промывали и ресуспендировали в

буфере для FACS. Образцы окрашенных клеток анализировали с использованием FACS (FACSCalibur).

Результаты анализа FACS показали, что как ALM, так и нацеленная на комплемент-активирующая молекула MatCFD-ALM(H), связываются с CD52 на поверхности НТ-клеток, так и DARA, так и MatCFD-DARA(H) связываются с CD38 на поверхности НТ-клеток. См. фиг. 15, столбцы с заголовками «CD52» и «CD38».

**Пример 8. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из алемтузумаба и полученных даратумумаба**

*Отложение C3*

Активацию комплемента нацеленными на комплемент-активирующими молекулами MatCFD-ALM(H) и MatCFD-DARA(H), оценивали посредством измерения отложения C3b на клетках-мишенях НТ. Нормальную человеческую сыворотку (NHS) разводили буфером для анализа до конечной концентрации 15%. НТ-клетки ресуспендировали в буфере для анализа до конечного титра 300000 клеток/мл и переносили в 6-луночный аналитический планшет. Разбавленные белки и NHS добавляли в лунки. Планшеты инкубировали при 37°C в термостате во влажной атмосфере в течение 2 ч. Затем клетки ресуспендировали в буфере для FACS, блокировали для предупреждения неспецифического связывания и окрашивали первичным антителом (кроличье античеловеческое C3c). После 20-мин инкубации на льду клетки дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем вторичное антитело (APC-конъюгированный антикроличий IgG). Клетки инкубировали еще 20 мин на льду, затем трижды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы окрашенных клеток анализировали с использованием FACS (FACSCalibur).

Результаты анализа FACS показали, что отложение C3b имело место в результате обработки MatCFD-ALM(H) или MatCFD-DARA(H). См. фиг. 15, колонки с надписью «C3b».

**Пример 9. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из анти-fHbP**

Моноклональные антитела к белку, связывающему фактор Н (fHbP) *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), получали на мышах и выделяли с использованием гибридомного метода. Были идентифицированы три различных мышинных моноклональных антитела: анти-fHbP клон 5 (aN5), анти-fHbP клон 7 (aN7) и анти-fHbP клон 19 (aN19). Тестировали связывание каждого из указанных трех антител с fHbP на поверхности планшета для ELISA. В этих условиях все три антитела демонстрировали связывание с fHbP. См. фиг. 21, левая панель. Затем тестировали связывание каждого из трех антител с *N. meningitidis* на поверхности планшета для ELISA. В этих условиях клон 19 показал связывание с *N. meningitidis*. См. фиг. 21, правая панель.

Каждый из клонов 5, 7 и 19 секвенировали и экспрессировали в виде рекомбинантной мышинной-человеческой химеры. Тестировали связывание химерных вариантов с *N. meningitidis* на поверхности планшета для ELISA. Клон 19 демонстрировал

связывание с *N. meningitidis* в этих условиях. См. фиг. 22.

Эффекторные сериновые протеазные домены C1r и C1s сливали с одним из трех моноклональных антител, которые связывают белок, связывающий фактор H *Neisseria meningitidis* (fHbP). Слитые белки экспрессировали с использованием экспрессионного вектора pCAG аналогично белкам, описанным в примере 1. С-концевой каталитический фрагмент C1r и C1s (CCP1-CCP2-SP) сливали с анти-fHbP клоном 5 (aN5), клоном 7 (aN7) или клоном 19 (aN19) на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с С-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: aN7(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (SEQ ID NO:107), aN19(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (SEQ ID NO:108), aN5(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (SEQ ID NO:109), aN7(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (SEQ ID NO:110), aN19(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (SEQ ID NO:111), aN5(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (SEQ ID NO:112).

Были получены следующие дополнительные нацеленные комплемент-активирующие молекулы, полученные из клона 19: aN19(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R444K</sup> (SEQ ID NO:116), aN19(H)<sup>ΔK</sup>-M3 (SEQ ID NO:117), MatCFD-aN19(H) (SEQ ID NO:118), ProCFD-aN19(H) (SEQ ID NO:119).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 10. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-fHbP, с *N. meningitidis***

Связывание с *N. meningitidis* тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен клона 19. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы aN19(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также называемые клоном 19-C1r) и aN19(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также называемые клоном 19-C1s) тестировали вместе с моноклональным антителом клона 19. Все три молекулы показали связывание с *N. meningitidis*. См. фиг. 23.

**Пример 11. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-fHbP**

*Активность в отложении комплемента*

Образцы сыворотки двенадцати субъектов оценивали на титр антител к fHbP. Результаты показаны на фиг. 24. Отложение C5b-9 (MAC) под действием нацеленных комплемент-активирующих молекул клона 19-C1s и клона 19-C1r анализировали с использованием сыворотки субъекта «6», который показал самый низкий титр антител fHbP. Полистироловые микротитрационные планшеты Maxisorp покрывали 100 мкл 10 мкг/мл маннана или иммунного комплекса в карбонатном буфере (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). 1% BSA (мас./об.) в буфере TBS (10 mM Трис-HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4) использовали для блокирования оставшихся сайтов связывания в планшетах для ELISA в течение 2 ч. Затем планшеты для ELISA промывали TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20 и 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Человеческую сыворотку от субъекта «NL» разводили в BBS и добавляли в планшеты, которые затем инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Отложение C5b-9 детектировали с использованием анти-C5b-9 (Abcam), затем конъюгированного с

пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG. Через 1 ч лунки промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. В качестве контролей также измеряли отложение C5b-9 с моноклональным антителом клона 19 и одной сывороткой. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы клона 19-C1s и клона 19-C1r показали повышенное отложение C5b-9 по сравнению с контролями. См. фиг. 25.

Отложение C3b, C4b и C5b под действием нацеленной на комплемент-активирующей молекулы клона 19-C1r оценивали с использованием сыворотки субъектов «1», «2», «5» и «Y». Отложение компонентов комплемента анализировали, как описано выше для C5b, с использованием различных концентраций в сыворотке. Отложение C3b и C4b анализировали аналогичным образом, используя кроличьи анти-C3с (Dako) или кроличьи анти-C4с (Dako) соответственно в качестве детектирующих антител. Результаты приведены на фиг. 27А (отложение C3b), фиг. 27В (отложение C4b) и фиг. 27С (отложение C5b).

Были получены дополнительные нацеленные комплемент-активирующие молекулы, которые содержат связывающий домен клона 19 и домен из MASP-2, MASP-3 или фактора D. Эти нацеленные комплемент-активирующие молекулы были названы aN19(H)<sup>ΔK</sup>-M2<sup>R444K</sup> (также относящиеся к анти-fHbp-MASP-2), aN19(H)<sup>ΔK</sup>-M3 (также относящиеся к анти-fHbp-MASP-3) и MatCFD-aN19(H) (также относящиеся к анти-fHbp-fD), соответственно. Эти нацеленные комплемент-активирующие молекулы анализировали в отношении отложения C3b на поверхности бактерий *N. meningitidis* вместе с клоном 19-C1r (также относящийся к анти-fHbp-C1r) и клоном 19-C1s (также относящийся к анти-fHbp-C1r) и клоном 19-C1s (также относящийся к анти-fHbp-C1s) нацеленных комплемент-активирующих молекул.

Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали фиксированными формалином бактериями *N. meningitidis* (OD<sub>600</sub>=0,6) в карбонатном буфере (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в буфере TBS (10 мМ Трис-НСl, 140 мМ NaCl, pH 7,4) в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20 и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. 1% NHS или 5% мышиную сыворотку, содержащую 150 нМ моноспецифических антител, разведенных в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4), добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20 ч и 25 мин при комнатной температуре, затем промывали. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего анти-C3с (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG. Через 1 ч лунки промывали, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм.

Результаты приведены на фиг. 28. Было установлено, что разница в отложении С3b между клоном 19 (т.е. анти-fHbP) и анти-fHbP-C1g является достоверной.

#### *Бактерицидная активность сыворотки*

Нацеленные комплемент-активирующие молекулы клона 19-C1s и клона 19-C1g оценивали на бактерицидную активность сыворотки. *Neisseria meningitidis* серотипа В (MC58) культивировали на чашках с кровяным агаром при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. На следующие сутки клетки соскребали и суспендировали в BBS (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4). 1500 клеток инкубировали с 25% нормальной человеческой сывороткой от субъекта «1» (фиг. 26А, верхний ряд), субъекта «2» (фиг. 26А, нижний ряд), субъекта «5» (фиг. 26В, верхний ряд) или субъекта «У» (фиг. 26В, нижний ряд) с 10 мкг анти-fHbP клона 19, клона 19-C1s или клона 19-C1g или без него. На заранее определенные временные точки (30 и 60 мин) образцы отбирали и помещали на чашки с кровяным агаром на ночь при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Бактерицидную активность сыворотки рассчитывали измерением снижения количества жизнеспособных бактерий, выделенных после инкубации с NHS, по сравнению с исходным количеством бактерий на нулевую временную точку и сывороткой, инактивированной нагреванием. Нацеленная на комплемент-активирующая молекула клон 19-C1g показала достоверное снижение количества жизнеспособных бактерий по сравнению с контролем или моноклональным антителом клона 19 в анализе сыворотки 1 на 30-мин временной точке и в анализе сыворотки 2 на 60-мин временной точке. См. фиг. 26А и 26В.

#### **Пример 12. Исследование *in vivo* нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-fHbP, на мышинной модели инфекции *N. meningitides***

Исследовали эффект нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-fHbP, на мышинной модели инфекции *N. meningitides*. В данном исследовании использовали 12-недельных самок мышей дикого типа C57BL/6 (питомник Charles River). Мышам внутрибрюшинно (в/б) вводили декстран железа (400 мг/кг; Sigma-Aldrich) за 12 ч до заражения. На следующие сутки мышам в/б вводили 100 мкл суспензии пассажированных *N. meningitidis* В-MC58, содержащей 5×10<sup>6</sup> КОЕ в PBS и декстран железа (400 мг/кг). Моноклональные антитела или нацеленные комплемент-активирующие молекулы вводили в/б за 18 ч до заражения. Мыши, которым вводили антитело контрольного изотипа, служили контролем. Каждая группа состояла из 12 мышей. Дозу инокулята подтверждали подсчетом жизнеспособных клеток после посева на 5%-ный кровяной агар (об./об.). За мышами проводили наблюдение в отношении прогрессирования клинических признаков и подвергали эвтаназии, когда они находились в агональном состоянии. Образцы крови получали на заранее определенные временные точки, и количество жизнеспособных клеток рассчитывали после серийного разведения в PBS и посева на чашки с кровяным агаром.

Мышей обрабатывали моноклональным антителом клона 19 или нацеленными на комплемент-активирующими молекулами клона 19-C1g или клона 19-C1s. Бактериальная нагрузка в образцах крови, отобранных через 8 ч и 24 ч после заражения, показана на фиг.

43. Бактериальная нагрузка на обе временные точки была достоверно ниже у мышей, обработанных клоном 19-C1r, по сравнению с мышами, обработанными антителом, клоном 19. Выживаемость мышей после заражения показана на фиг. 44. Выживаемость, т.е. мышей, не требующих вынужденной эвтаназии, была достоверно выше у мышей, обработанных клоном 19-C1r, по сравнению с мышами, обработанными антителом клона 19. Как для фиг. 43, так и для фиг. 44, \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$  с использованием рангового теста Мантеля-Кокслога.

**Пример 13. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из анти-PspA**

Моноклональные антитела к пневмококковому поверхностному белку А (PspA) *Streptococcus pneumoniae* были получены с использованием мышинных гибридом, любезно предоставленных доктором Дэвидом Брайлсом и доктором У. Эдвардом Свордсом из Университета Алабамы в Бирмингеме. Анти-PspA антитела 5C6.1 и RX1MI005 были описаны в *Vaccine* (2013); 32(1):39-47 и *mSphere* (2019) 4:e00589-19 соответственно. Тестировали связывание каждого из этих антител с *S. pneumoniae*. Штамм *S. pneumoniae* D39 инкубировали либо с 5C6.1, либо с RX1MI005 в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали и инкубировали с Alexa Fluor-конъюгированным козьим античеловеческим IgG в течение 30 мин. Связывание измеряли с использованием анализа FACS. Результаты приведены на фиг. 29. Было установлено, что антитело RX1MI005 связывается лучше, чем антитело 5C6.1, и, следовательно, было выбрано для дальнейшего использования.

Антитело RX1MI005 секвенировали, и эту последовательность использовали для получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен RX1MI005 и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с анти-PspA антителом RX1MI005 на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с С-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: RX1MI005(H)<sup>ΔK</sup>-C1r\_HC (SEQ ID NO:122) и RX1MI005(H)<sup>ΔK</sup>-C1s\_HC (SEQ ID NO:123).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 14. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-PspA, с *S. pneumoniae***

Связывание с *S. pneumoniae* тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен RX1MI005. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы RX1MI005(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также относящиеся к анти-PspA-C1r или MI005-C1r) и RX1MI005(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также относящиеся к анти-PspA-C1s или MI005-C1s) тестировали вместе с моноклональным антителом RX1MI005. Планшет для ELISA покрывали штаммом *S. pneumoniae* D39 в покровном буфере и блокировали 5% обезжиренным молоком. Серийные разведения антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул добавляли в планшет и инкубировали в течение 30 мин при

комнатной температуре, затем промывали. Связанные антитела и нацеленные комплемент-активирующие молекулы детектировали с использованием HRP-конъюгированного античеловеческого IgG. Антитело несвязанного изотипа было включено в качестве контроля. Все три молекулы демонстрировали связывание с *S. pneumoniae*. См. фиг. 30.

**Пример 15. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-PspA**

*Активность в отложении комплемента*

Оценивали отложение C3b под действием анти-PspA антител RX1MI005 и нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из RX1MI005, на поверхности *S. pneumoniae*. Бактерии *S. pneumoniae* дважды промывали буфером TBS и ресуспендировали в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до конечного титра 10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Бактериальную суспензию (100 мкл) опсонизировали 1% (об./об.) NHS или 5% (об./об.) сывороткой мышей дикого типа в течение 15 мин при комнатной температуре с антителами или нацеленными на комплемент-активирующими молекулами. Неопсонизированные бактерии служили отрицательным контролем. После опсонизации бактериальные образцы дважды промывали буфером TBS и связанный C3b детектировали с использованием FITC-конъюгированного кроличьего античеловеческого C3c (Dako). Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD Biosciences). Результаты приведены на фиг. 31. Отложение комплемента C3b на поверхности *S. pneumoniae* наблюдали как повышенное в присутствии нацеленных комплемент-активирующих молекул MI005-Cr и MI005-C1s, по сравнению с антителом RX1MI005 или антителом контрольного изотипа.

**Пример 16. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из антите к *C. albicans***

Моноклональное антитело 1A2 связывается с грибковым маннановым эпитопом на поверхности *Candida albicans*. Это антитело было описано в публикации заявки на патент PCT WO 2014/174293. Последовательность антитела 1A2, используемая для создания нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержала связывающий домен 1A2 и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с антителом 1A2 на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с С-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: 1A2(H)<sup>ΔK</sup>-C1r\_HC (SEQ ID NO:130) и 1A2(H)<sup>ΔK</sup>-C1s\_HC (SEQ ID NO:131).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 17. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из антител к *C. albicans*, с *C. albicans***

Связывание с *C. albicans* тестировали для нацеленной на комплемент-



активирующей молекулы 1A2(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также называемой 1A2-C1r) и моноклонального антитела 1A2. Планшет для ELISA покрывали *C. albicans* в покровном буфере и блокировали 5% обезжиренным молоком. Серийные разведения антитела 1A2 и нацеленной на комплемент-активирующей молекулы добавляли в планшет и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали. Связанные антитела детектировали с использованием HRP-конъюгированного античеловеческого IgG. Антитело 1A2 и нацеленная на комплемент-активирующая молекула 1A2-C1r демонстрировали связывание с *C. albicans*. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. См. фиг. 32.

Связывание с *C. albicans* также тестировали с использованием альтернативного анализа. Грибковые клетки инкубировали с антителом 1A2 или нацеленной на комплемент-активирующей молекулы 1A2-C1r в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали и инкубировали с Alexa Fluor-конъюгированным козьим античеловеческим IgG в течение 30 мин. Связывание измеряли с использованием анализа FACS. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. Антитело 1A2 и нацеленная на комплемент-активирующая молекула 1A2-C1r демонстрировали связывание с *C. albicans*. См. фиг. 33.

**Пример 18. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из антитела к *C. albicans***

*Активность в отложении комплемента*

Оценивали отложение C3b под действием антитела 1A2 и нацеленной на комплемент-активирующей молекулы 1A2-C1r на поверхности *C. albicans*. Сначала идентифицировали человеческую сыворотку с минимальным количеством природных антител к *C. albicans* путем скрининга сывороток от пяти разных субъектов. Планшеты для ELISA покрывали *C. albicans* и инкубировали с сывороткой каждого из субъектов. Антитела к *C. albicans* детектировали с использованием античеловеческого IgG антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP). Сыворотку, имеющую самый низкий измеренный титр антител к *C. albicans*, обозначенную как «GC», использовали в анализе отложения C3b. Результаты приведены на фиг. 34, левая панель.

Для анализа отложения C3b полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали фиксированными формалином *C. albicans* в карбонатном буфере (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в буфере TBS (10 мМ Трис-HCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4) в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (по объему) Твина 20 и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. 1% сыворотку NHS «GC», содержащую 150 нМ антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разведенных в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20 и 25 мин при комнатной температуре, затем промывали. Отложение C3b анализировали с использованием кроличьего анти-C3c (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG. Через 1 ч лунки

промывали, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Результаты показаны на фиг. 34, правая панель. Уровень отложения C3b был достоверно выше при использовании нацеленной на комплемент-активирующей молекулы 1A2-C1r, по сравнению с антителом 1A2 или антителом контрольного изотипа.

**Пример 19. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из анти-Fnbp**

Моноклональные антитела к фибронектин-связывающему белку (Fnbp) *Staphylococcus aureus* получали на мышах и выделяли гибридным методом. Клетки мышинной селезенки смешивали с клетками миеломы NS0 в соотношении 1:4 в RPMI SFM (Sigma) и осаждали при 1200 g в течение 5 мин. После центрифугирования супернатант полностью удаляли. Затем спленоциты и клетки NS0 сливали вместе добавлением 0,8 мл полиэтиленгликоля 1500 (Roche) в течение 1 мин при осторожном перемешивании. После этого постепенно добавляли 10 мл RPMI-SFM при осторожном перемешивании в течение 5 мин. Затем слитые клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50 мл среды RPMI с добавлением 15% FCS (Sigma), 200 Е/мл пенициллина/стрептомицина (Sigma), 1 мМ пировиноградной кислоты (Sigma), 0,05 мкМ β-меркаптоэтанола (Sigma), 0,5 мкг/мл гидрокортизона (Sigma) и 0,4 мМ L-глутамин (Sigma). Наконец, гибридные клетки помещали в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В качестве отрицательного контроля, клетки миеломы NS0 добавляли в последние два ряда каждого планшета. На следующие сутки в каждую лунку добавляли гипоксантин и азасерин (Sigma) в конечной концентрации 100 мкМ гипоксантина и 5,7 мкМ азасерина. Гибридомы подкармливали каждые 3 суток, удаляя 100 мкл старой среды и заменяя ее свежей порцией среды RPMI, содержащей 15% FCS. Когда гибридомы достигали 30-50% слияния, образцы супернатанта отбирали для скрининга с использованием ELISA. Положительные клоны отбирали и переносили в 24-луночные планшеты и, наконец, в колбы 25 см<sup>2</sup>.

Было идентифицировано 11 антител-кандидатов, и их скринировали на связывание с *S. aureus*. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали фиксированным формалином *S. aureus* (OD<sub>600</sub>=0,6) в карбонатном буфере (15 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6). На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в буфере TBS (10 мМ Трис-HCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4) в течение 2 ч, затем промывали буфером TBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20 и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Готовили серийные разведения антитела-кандидаты в буфере TBS, добавляли в планшет и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем промывали. Связывание антител детектировали с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена кроличьего античеловеческого IgG. Через 1 ч лунки промывали, затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB Solution (Thermo Fisher

Scientific) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Антитело клона G было идентифицировано как демонстрирующее наилучшее связывание с *S. aureus*. См. фиг. 35.

Антитело клона G тестировали на связывание со штаммом *S. aureus* MSSA. Бактерии *S. aureus* MSSA дважды промывали буфером TBS и ресуспендировали в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до конечной концентрации 10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Бактериальную суспензию (100 мкл) инкубировали с 150 нМ антитела клона G в течение 30 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали бактерии, опсонизированные антителом контрольного изотипа. После инкубации образцы бактерий дважды промывали буфером TBS и связанные антитела детектировали с использованием FITC-конъюгированного кроличьего античеловеческого IgG. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием клеточного анализатора FACSCalibur (BD Biosciences). Результаты приведены на фиг. 36. Было установлено, что клон G связывается со штаммом *S. aureus* MSSA.

Антитело клона G также тестировали на связывание с некоторыми различными изолятами штамма *S. aureus* MRSA. Бактерии *S. aureus* MRSA из одного из двух клинических изолятов и изолята лабораторного штамма дважды промывали буфером TBS и ресуспендировали в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до конечной концентрации 10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Бактериальную суспензию (100 мкл) инкубировали с 150 нМ антитела клона G в течение 30 мин при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали бактерии, опсонизированные антителом контрольного изотипа. После инкубации образцы бактерий дважды промывали буфером TBS и связанные антитела детектировали с использованием FITC-конъюгированного кроличьего античеловеческого IgG. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием проточного цитофлуориметра FACSCalibur (BD Biosciences). Результаты приведены на фиг. 37. Было установлено, что клон G связывался со всеми тремя изолятами штамма *S. aureus* MRSA.

Антитело клона G секвенировали, и эту последовательность использовали для получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен клона G и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с анти-Fnbp антителом клона G на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с С-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: C1.G(H)<sup>ΔK</sup>-C1r\_HC (SEQ ID NO:126) и C1.G(H)<sup>ΔK</sup>-C1s\_HC (SEQ ID NO:127).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 20. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-Fnbp**

Связывание с Fnbp тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен клона G. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы Cl.G(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также называемые клоном G-C1r) и Cl.G(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также называемые клоном G-C1s) тестировали вместе с моноклональным антителом клона G. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorb покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного FnbpB *S. aureus* в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул, готовили в буфере PBS, начиная с 15 мкг/мл. Образцы объемом 100 мкл переносили в планшеты для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшеты промывали и добавляли 100 мкл HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG, с последующей 30-мин инкубацией при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. См. фиг. 38А.

Связывание с *S. aureus* также тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен клона G. Нацеленные комплемент-активирующие молекулы клона G-C1r и клона G-C1s тестировали вместе с моноклональным антителом клона G. Планшет для постановки ELISA покрывали *S. aureus* в покровном буфере и блокировали 5% обезжиренным молоком. Серийные разведения антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул добавляли в планшет и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали. Связанные антитела и нацеленные комплемент-активирующие молекулы детектировали с использованием HRP-конъюгированного античеловеческого IgG. Антитело несвязанного изотипа включали в качестве контроля. Все три молекулы демонстрировали связывание с *S. aureus*. См. фиг. 38В.

### **Пример 21. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул полученных из анти-Fnbp**

#### *Активность в отложении комплемента*

Оценивали отложение C3b под действием антитела клона G и нацеленных комплемент-активирующих молекул клона G-C1r и клона G-C1s на поверхности, покрытой Fnbp. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorb покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного FnbpB в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. NHS, содержащую 7,5 мкг антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разводили в BBS++ буфере (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 2,5%, добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20 и 25 мин при комнатной

температуре, затем промывали три раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку при комнатной температуре добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB Solution (Thermo Fisher Scientific). Реакцию останавливали добавлением 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Результаты приведены на фиг. 46.

**Пример 22. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из анти-PfRH5**

Антитела к гомологу 5 ретикулоцит-связывающего белка-антигена *Plasmodium falciparum* (PfRH5) были описаны Alanine et al. (Cell (2019) 178:216-228). Последовательности анти-PfRH5 антител R5.004 и R5.016 использовали для получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен антитела и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с антителом на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена делецией одной аминокислоты лизина (K) с С-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: R5.004(H)<sup>ΔK</sup>-C1r\_HC (SEQ ID NO:138), R5.004(H)<sup>ΔK</sup>-C1s\_HC (SEQ ID NO:139), R5.016(H)<sup>ΔK</sup>-C1r\_HC (SEQ ID NO:142) и R5.016(H)<sup>ΔK</sup>-C1s\_HC (SEQ ID NO:143).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 23. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-PfRH5, с PfRH5**

Связывание с *P. falciparum* тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен анти-PfRH5. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 50 мкл на лунку клеточного супернатанта из клеток, трансфектированных PfRH5. На следующие сутки лунки блокировали 1% BSA в PBS (1×) в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере, содержащем 0,1% BSA в PBS (1×) с максимальной концентрацией 13,9 нМ. Образцы по 100 мкл каждый переносили в планшет для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и в него добавляли 100 мкл HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG с последующей 30-мин инкубацией при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Несвязанное антитело (RTX) использовали в качестве контроля. Результаты приведены на фиг. 41. Как антитела, так и все тестированные нацеленные комплемент-активирующие молекулы демонстрировали связывание с PfRH5.

**Пример 24. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-PfRH5**

*Активность в отложении комплемента*

Отложение C3b по действие антител R5.004, R5.016 и нацеленных комплемент-активирующих молекул R5.004(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также относящаяся к R5.004-C1r), R5.004(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также относящаяся к R5.004-C1s), R5.016(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также относящаяся к R5.016-C1r) и R5.016(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также относящаяся к R5.0,016-C1s) на поверхности, покрытой PfRH5. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 50 мкл на лунку клеточного супернатанта из клеток, трансфектированных PfRH5. На следующие сутки лунки блокировали 1% BSA в PBS (1×) в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Нормальную человеческую сыворотку (NHS), содержащую 13,9 нМ антитела, или нацеленные комплемент-активирующие молекулы разводили в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 3% и добавляли в лунки. Планшет инкубировали в течение 5, 10, 15, 20 или 25 мин при комнатной температуре, затем трижды промывали. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Несвязанной антитело (RTX) использовали в качестве контроля. Результаты приведены на фиг. 42.

**Пример 25. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из анти-GP120**

Антитела к гликопротеину оболочки GP120 ВИЧ-1 были описаны Julien et al. (PLoS Pathog. (2013) 9:e1003342). Последовательность анти-GP120 антитела PGT121 использовали для получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен антитела и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с антителом на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с С-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: PGT121(H)<sup>ΔK</sup>-C1r\_HC (SEQ ID NO:146) и PGT121(H)<sup>ΔK</sup>-C1s\_HC (SEQ ID NO:147).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 26. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-GP120, с GP120**

Связывание с GP120 тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул, PGT121(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также относящаяся к PGT121-C1r) и PGT121(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также относящаяся к PGT121-C1s) вместе с моноклональным антителом PGT121. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа.

Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного GP120 в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере PBS, начиная с 15 мкг/мл. Образцы объемом 100 мкл переносили в планшеты для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и добавляли 100 мкл с HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Результаты приведены на фиг. 45. Антитело PGT121 и обе тестированные нацеленные комплемент-активирующие молекулы показали связывание с GP120.

**Пример 27. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из анти-GP120 молекул**

*Активность в отложении комплемента*

Анализировали отложение C3b под действием антитела PGT121 и нацеленных комплемент-активирующих молекул PGT121-C1r и PGT121-C1s на поверхности, покрытой GP120. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного GP120 в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. NHS, содержащую 7,5 мкг антител или нацеленных на комплемент-активирующих молекул, разводили в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 2,5%, добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 25 мин при комнатной температуре, затем промывали три раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем конъюгированного с пероксидазой козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. Результаты приведены на фиг. 46.

**Пример 28. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из антитела к S-белка**

Антитело к S-белку SARS-CoV-2 (также называемому шиповидным белком) были описаны Westerndorf et al. (Cell Rep. (2022) 39:110812). Последовательность антитела к S-белка, бeбтеловимаба, использовали для получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен антитела и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с антителом на С-

конец тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с C-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: бeбтeлoвимaб(H)<sup>ΔK</sup>-C1r<sub>HC</sub> (SEQ ID NO:150) и бeбтeлoвимaб(H)<sup>ΔK</sup>-C1s<sub>HC</sub> (SEQ ID NO:151).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 29. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из антитела к S-белка**

Связывание с S-белком тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул, бeбтeлoвимaбa(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также относящаяся к бeбтeлoвимaбy-C1r) и бeбтeлoвимaбa(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также относящаяся к бeбтeлoвимaб-C1s), вместе с моноклональным антителом бeбтeлoвимaбoм. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного S-белка SARS-CoV-2 в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере PBS, начиная с 15 мкг/мл. Образцы объемом 100 мкл переносили в планшет для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и добавляли 100 мкл HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Результаты показаны на фиг. 47. Бeбтeлoвимaб и обе тестированные нацеленные комплемент-активирующие молекулы показали связывание с S-белком.

**Пример 30. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из антитела к S-белка**

*Активность в отложении комплемента*

Анализировали отложение C3b под действием антитела бeбтeлoвимaбa и нацеленных комплемент-активирующих молекул, бeбтeлoвимaб-C1r и бeбтeлoвимaб-C1s, на поверхности, покрытой S-белком. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного S-белка (R&D Systems) в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об) Твина 20. NHS, содержащую 7,5 мкг антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разводили в буфере BBS++ (4 mM барбитала, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 2,5%, добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин при комнатной температуре, затем промывали три раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем



конъюгированного с пероксидазой хрена козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. Результаты приведены на фиг. 48.

**Пример 31. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из антитела к М-белка**

Антитела (в форматах нанотел) к М-белку SARS-CoV-2 (также называемому мембранным белком) были описаны Hammel and Zenhausern (см. *Antib. Rep.* (2020) 3(4):e230). Последовательности антител к М-белку RB572 и RB574 были любезно предоставлены Женевским центром антител Женевского университета, и их использовали для получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен из антитела RB572 или RB574, и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с антителом на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), в результате чего получали нацеленные комплемент-активирующие молекулы RB572-C1r и RB574-C1r.

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

**Пример 32. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из антитела к М-белка**

Связывание с М-белком тестировали для каждой из нацеленных комплемент-активирующих молекул RB572-C1r и RB574-C1r, вместе с антителами RB572 и RB574. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа (RTX). Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного М-белка SARS-CoV-2 (Trenzyme) в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере PBS, начиная с 1400 нМ. Образцы объемом 100 мкл переносили в планшеты для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и добавляли 100 мкл HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Результаты приведены на фиг. 49. RB572, RB574 и обе тестированные нацеленные комплемент-активирующие молекулы показали связывание с М-белком.

**Пример 33. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из антитела к М-белка**

### *Активность в отложении комплемента*

Анализировали отложение C3b под действием антитела RB574 и нацеленной на комплемент-активирующей молекулы RB574-C1r, на поверхности, покрытой M-белком. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали 2 мкг/мл рекомбинантного M-белка в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 1% BSA в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. NHS, содержащую 200 нМ антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разводили в BBS++ буфере (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) до концентрации 3%, добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин при комнатной температуре, затем промывали три раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем с использованием HRP-конъюгированного козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа (RTX). Результаты приведены на фиг. 50.

### **Пример 34. Получение нацеленных комплемент-активирующих молекул, происходящих из антитела к *Aspergillus***

Антитело к видам *Aspergillus* было описано Davies et al. (Theranostics, (2017) 7(14):3398). Последовательность антитела к *Aspergillus* hJF5 использовали для получения нацеленных комплемент-активирующих молекул, содержащих связывающий домен антитела и фрагмент либо C1r, либо C1s. С-концевой каталитический фрагмент C1r или C1s сливали с антителом на С-конце тяжелой цепи антитела (HC), которая была изменена посредством делеции одной аминокислоты лизина (K) с С-конца. В результате этого процесса были получены следующие конструкции: hJF5(H)<sup>ΔK</sup>-C1r\_HC (SEQ ID NO:134) и hJF5(H)<sup>ΔK</sup>-C1s\_HC (SEQ ID NO:135).

Получение плазмиды, клонирование, экспрессию белка и очистку проводили, как описано в примере 1.

### **Пример 35. Связывание нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из антитела к *Aspergillus***

Связывание с *Aspergillus* тестировали для нацеленных комплемент-активирующих молекул hJF5(H)<sup>ΔK</sup>-C1r (также относящаяся к hJF5-C1r) и hJF5(H)<sup>ΔK</sup>-C1s (также относящаяся к hJF5-C1s), вместе с моноклональным антителом hJF5. Споры *Aspergillus fumigatus* субкультивировали на декстрозном агаре Сабуро при 37°C в течение 5-7 суток, затем собирали с использованием стерильного физиологического раствора (PBS), содержащего 0,05% Твина 20. Суспензию грибка центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин, затем промывали стерильным PBS для удаления остатков детергента. После промывания клетки ресуспендировали в покровном буфере и пропускали через клеточный сетчатый фильтр (40 мкм) для получения гомогенной суспензии. Оптическую плотность

при 550 нм,  $OD_{550}$  доводили до 0,5, затем планшеты для ELISA покрывали грибковой суспензией. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали клетками *Aspergillus fumigatus* в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. Двукратные серийные разведения антител и нацеленных комплемент-активирующих молекул готовили в буфере PBS, начиная с 15 мкг/мл. Образцы объемом 100 мкл переносили в планшет для ELISA и инкубировали при комнатной температуре. Через 1 ч планшет промывали и добавляли 100 мкл HRP-конъюгированного козьего античеловеческого IgG и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в течение 2 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М  $H_2SO_4$  и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. Результаты приведены на фиг. 51. Антитело hJF5 и обе тестируемые нацеленные комплемент-активирующие молекулы показали связывание с маннопротеином *Aspergillus*.

**Пример 36. Активность нацеленных комплемент-активирующих молекул, полученных из антитела к *Aspergillus***

*Активность в отложении комплемента*

Анализировали отложение C3b под действием антитела hJF5 и нацеленных комплемент-активирующих молекул hJF5-C1r и hJF5-C1s на поверхности, покрытой *Aspergillus*. Клетки *Aspergillus* получали, как описано в примере 35. Полистироловые микротитрационные планшеты для ELISA Maxisorp покрывали клетками *Aspergillus* в покровном буфере. На следующие сутки лунки блокировали 5% обезжиренным молоком в PBS в течение 2 ч, затем промывали буфером PBS, содержащим 0,05% (об./об.) Твина 20. NHS, содержащую 7,5 мкг антител или нацеленных комплемент-активирующих молекул, разводили в буфере BBS++ (4 мМ барбитала, 145 мМ NaCl, 2 мМ  $CaCl_2$ , 1 мМ  $MgCl_2$ , pH 7,4) до концентрации 2,5%, добавляли в планшет и инкубировали в течение 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин при комнатной температуре, затем промывали три раза. Отложение C3b детектировали с использованием кроличьего античеловеческого C3c (Dako), затем HRP-конъюгированного козьего антикроличьего IgG (Southern Biotech). Через 1 ч планшет трижды промывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора субстрата 1-Step Ultra TMB Solution (Thermo Fisher Scientific) при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2М  $H_2SO_4$  и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм. В качестве контроля использовали антитело несвязанного изотипа. Результаты представлены на фиг. 52.

**IX. Другие варианты осуществления**

Все публикации, заявки на патенты и патенты, упомянутые в данном описании, включены сюда посредством ссылки.

Хотя были иллюстрированы и описаны некоторые варианты осуществления изобретения, следует понимать, что в них могут быть внесены различные изменения, не

выходя за рамки сущности и объема изобретения. Хотя изобретение было описано в связи с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что заявленное изобретение не должно необоснованно ограничиваться такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации описанных конкретных вариантов осуществления, очевидные для специалистов в области медицины, иммунологии, фармакологии или родственных областях, входят в объем изобретения.

Соответственно, следующие нумерованные пункты, описывающие конкретные варианты осуществления, представлены для наглядности, но они не должны рассматриваться в качестве ограничивающих формулу изобретения.

1. Нацеленная на комплемент-активирующая молекула, содержащая:

(a) мишень-связывающий домен; и

(b) эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент.

2. Молекула по п.1, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит MASP-1 или ее фрагмент, MASP-2 или ее фрагмент, MASP-3 или ее фрагмент, C1r или ее фрагмент, C1s или ее фрагмент, фактор D или его фрагмент, C2a или его фрагмент, или фактор Bb или его фрагмент.

3. Молекула по пп.1 или 2, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, является каталитически активным.

4. Молекула по пп.1 или 2, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, находится в зимогенной форме.

5. Молекула по любому из пп.1-4, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся в клетке.

6. Молекула по любому из пп.1-5, где мишень-связывающий домен связывается с CD20, CD38 или CD52.

7. Молекула по любому из пп.1-4, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на микробном патогене.

8. Молекула по п.7, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на бактериальном патогене, вирусном патогене, грибковом патогене или паразитарном патогене.

9. Молекула по п.8, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* или виды *Listeria*.

10. Молекула по п.9, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*.

11. Молекула по п.8, где вирусный патоген представляет собой вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила, цитомегаловирус или коронавирусы.

12. Молекула по п.8, где грибковый патоген представляет собой *Candida albicans*

или вид *Aspergillus*.

13. Молекула по п.8, где паразитарным патогеном является *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.

14. Молекула по любому из пп.1-13, где мишень-связывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

15. Молекула по п.14, где мишень-связывающий домен содержит анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-CD38 или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-CD52 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

16. Молекула по п.15, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, алемтузумаб или его антигенсвязывающий фрагмент, или даратумумаб или его антигенсвязывающий фрагмент.

17. Молекула по п.14, где мишень-связывающий домен содержит антитело, которое связывается с антигеном, находящимся на микробном патогене.

18. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Neisseria* или его антигенсвязывающий фрагмент.

19. Молекула по п.18, где мишень-связывающий домен содержит анти-fHbP антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

20. Молекула по п.19, где мишень-связывающий домен содержит анти-fHbP антитело, клон 19, или его антигенсвязывающий фрагмент.

21. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Streptococcus* или его антигенсвязывающий фрагмент.

22. Молекула по п.21, где мишень-связывающий домен содержит анти-PspA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

23. Молекула по п.22, где мишень-связывающий домен содержит анти-PspA антитело RX1MI005 или его антигенсвязывающий фрагмент.

24. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Staphylococcus* или его антигенсвязывающий фрагмент.

25. Молекула по п.24, где мишень-связывающий домен содержит анти-Fnbp антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

26. Молекула по п.25, где мишень-связывающий домен содержит анти-Fnbp антитело, клон G, или его антигенсвязывающий фрагмент.

27. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Candida* или его антигенсвязывающий фрагмент.

28. Молекула по п.27, где мишень-связывающий домен содержит антитело против грибкового маннана или его антигенсвязывающий фрагмент.

29. Молекула по п.28, где мишень-связывающий домен содержит антитело против грибкового маннана 1A2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

30. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен, содержит антитело против *Plasmodium* или его антигенсвязывающий фрагмент.

31. Молекула по п.30, где мишень-связывающий домен, содержит анти-PfRH5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
32. Молекула по п.31, где мишень-связывающий домен содержит анти-PfHR5 антитело R5.004 или его антигенсвязывающий фрагмент.
33. Молекула по п.31, где мишень-связывающий домен содержит анти-PfHR5 антитело R5.016 или его антигенсвязывающий фрагмент.
34. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело против ВИЧ-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.
35. Молекула по п.34, где мишень-связывающий домен содержит анти-GP120 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
36. Молекула по п.35, где мишень-связывающий домен содержит анти-GP120 антитело PGT121 или его антигенсвязывающий фрагмент.
37. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело против SARS-CoV-2 или его антигенсвязывающий фрагмент.
38. Молекула по п.37, где мишень-связывающий домен содержит антитело против S-белка или его антигенсвязывающий фрагмент.
39. Молекула по п.38, где мишень-связывающий домен содержит антитело против S-белка бептеловимаб или его антигенсвязывающий фрагмент.
40. Молекула по п.37, где мишень-связывающий домен, содержит антитело против M-белка или его антигенсвязывающий фрагмент.
41. Молекула по п.40, где мишень-связывающий домен, содержит антитело против M-белка RB572 или RB574.
42. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* или его антигенсвязывающий фрагмент.
43. Молекула по п.42, где мишень-связывающий домен, содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент.
44. Молекула по любому из пп.1-43, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит одну или более мутаций относительно сериновой протеазы дикого типа, и/или мишень-связывающий домен содержит одну или более мутаций относительно антитела дикого типа.
45. Молекула по п.44, где одна или более мутаций ингибируют деградацию белка.
46. Молекула по п.44, где одна или более мутаций придают устойчивость к ингибированию сериновой протеазы ингибитором C1 или другими серпинами.
47. Молекула по п.44, где одна или более мутаций ингибируют гликозилирование молекулы в одном или более аминокислотных остатках.
48. Молекула по любому из пп.14-47, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент и легкую цепь антитела или ее фрагмент.
49. Молекула по п.48, где молекула содержит:
  - a) слитый белок, содержащий:
    - i) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего

комплемент, слитый с С-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента; или

ii) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента; и

легкую цепь антитела или ее фрагмент; или

b) слитый белок, содержащий:

i) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента; или

ii) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента; и

тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

50. Молекула по любому из пп.14-47, где молекула содержит слитый белок, содержащий:

a) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента или однодоменного антитела или его фрагмента; или

b) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента или однодоменного антитела или его фрагмента.

51. Молекула по любому из пп.1-50, где мишень-связывающий домен и эффекторный сериновый протеазный домен соединены линкером.

52. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор D или его фрагмент.

53. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1g или ее фрагмент.

54. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1s или ее фрагмент.

55. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-2 или ее фрагмент.

56. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-3 или ее фрагмент.

57. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-1 или ее фрагмент.

58. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый















фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-1 или ее фрагмент.

138. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против S-белка SARS-CoV-2 бeбтeлoвимaб или eгo aнтигeнсвязывaющeй фpaгмeнт, и эффeктoрный сeриновeй прoтeазный дoмeн сoдeржит C2a или eгo фpaгмeнт.

139. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против S-белка SARS-CoV-2 бeбтeлoвимaб или eгo aнтигeнсвязывaющeй фpaгмeнт, и эффeктoрный сeриновeй прoтeазный дoмeн сoдeржит фaктoр Bb или eгo фpaгмeнт.

140. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор D или его фрагмент.

141. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1г или ее фрагмент.

142. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1s или ее фрагмент.

143. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-2 или ее фрагмент.

144. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-3 или ее фрагмент.

145. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-1 или ее фрагмент.

146. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C2a или его фрагмент.

147. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против M-белка SARS-CoV-2 RB572 или RB574 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор Bb или его фрагмент.

148. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный

сериновый протеазный домен содержит фактор D или его фрагмент.

149. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1r или ее фрагмент.

150. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1s или ее фрагмент.

151. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-2 или ее фрагмент.

152. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-3 или ее фрагмент.

153. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-1 или ее фрагмент.

154. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C2a или его фрагмент.

155. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело против *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор Bb или его фрагмент.

156. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

157. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

158. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO:93.

159. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:94.

160. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO:95.

161. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:96.

162. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO:103.

163. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 104.

164. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 120.







ID NO: 149.

200. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 134 или 135.

201. Молекула по любому из пп.48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 134 или 135, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 133.

202. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 57, 58 и 61-65.

203. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:66.

204. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 67 или SEQ ID NO: 68.

205. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 69-74.

206. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 76 и 78-87.

207. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:88.

208. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:89.

209. Молекула по любому из пп.1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 90 или 92.

210. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 4-6, 9 и 33-38.

211. Молекула по п.210, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

212. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

213. Молекула по п.212, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

214. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13.

215. Молекула по п.214, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

216. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную

последовательность, показанную в SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:15.

217. Молекула по п.216, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

218. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:16.

219. Молекула по п.218, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

220. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:17.

221. Молекула по п.220, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

222. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 18, 21, 39-40 или 48-50.

223. Молекула по п.222, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

224. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 19, 23, 41-47 или 51-53.

225. Молекула по п.224, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

226. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:25.

227. Молекула по п.226, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

228. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:26.

229. Молекула по п.228, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

230. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 27, 28, 31 и 32.

231. Молекула по п.230, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

232. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:30.

233. Молекула по п.232, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

234. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:97.

235. Молекула по п.234, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:94.

236. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную

последовательность, показанную в SEQ ID NO:98.

237. Молекула по п.236, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:96.

238. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 108, 111, 116, 117, 119 и 119.

239. Молекула по п.238, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:104.

240. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 122 или 123.

241. Молекула по п.240, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:121.

242. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 126 или 127.

243. Молекула по п.242, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:125.

244. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 130 или 131.

245. Молекула по п.244, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:129.

246. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 138 или 139.

247. Молекула по п.246, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 137.

248. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 142 или 143.

249. Молекула по п.248, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 141.

250. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 146 или 147.

251. Молекула по п.250, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 145.

252. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 150 или 151.

253. Молекула по п.252, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 149.

254. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 134 или 135.

255. Молекула по п.254, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:133.

256. Молекула по любому из пп.1-255, где молекула связывается с мишенью с

аффинностью от 1 пМ до 1 мкМ.

257. Молекула по любому из пп.1-255, где молекула связывается с мишенью на поверхности клетки с аффинностью от 1 пМ до 1 мкМ.

258. Молекула по любому из пп.1-257, где молекула обладает активностью сериновой протеазы, которая составляет по меньшей мере 70% от активности сериновой протеазы одного серинового протеазного домена.

259. Молекула по любому из пп.1-257, где молекула обладает активностью сериновой протеазы, которая составляет по меньшей мере 80% от активности сериновой протеазы одного серинового протеазного домена.

260. Молекула по любому из пп.1-257, где молекула обладает активностью сериновой протеазы, которая составляет по меньшей мере 90% от активности сериновой протеазы одного серинового протеазного домена.

261. Молекула по любому из пп.1-260, где молекула связывается с мишенью на поверхности клетки и активирует путь комплемента при введении субъекту-млекопитающему.

262. Молекула по любому из пп.1-261, где молекула индуцирует комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), комплемент-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (CDCC) и/или комплемент-зависимый клеточный фагоцитоз (CDCP).

263. Полинуклеотид, кодирующий молекулу по любому из пп.1-262.

264. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 26, 27 и 210-253.

265. Клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие полинуклеотид по пп.263 или 264.

266. Клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие первый полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп.26, 27 и 210-253, и второй полинуклеотид; где второй полинуклеотид кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент, и второй полинуклеотид кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

267. Первые клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие первый полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп.26, 27 и 210-253, и вторые клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие второй полинуклеотид; где второй полинуклеотид кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент, и второй полинуклеотид кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

268. Клетка-хозяин, экспрессирующая молекулу по любому из пп.1-262 или содержащая клонированный вектор(ы) или экспрессионную кассету(ы) по любому из пп.265-267.

268. Способ получения молекулы, включающей:

(а) мишень-связывающий домен; и

(b) эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент; где способ включает культивирование клетки-хозяина по п.266 в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы, и выделение молекулы.

270. Применение молекулы по любому из пп.1-262 для активации по меньшей мере одного пути комплемента у субъекта-млекопитающего.

271. Применение по п.270, где активация по меньшей мере одного пути комплемента включает:

- a) активацию классического пути комплемента;
- b) активацию лектинового пути комплемента;
- c) активацию альтернативного пути комплемента; или
- d) две или более по пп. (a)-(c).

272. Применение молекулы по любому из пп.1-262 для индукции комплемент-зависимой клеточной гибели (CDC), комплемент-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) по отношению к клетке-мишени.

273. Применение молекулы по любому из пп.1-262 для лечения рака.

274. Применение молекулы по любому из пп.1-262 для лечения аутоиммунного заболевания.

275. Применение молекулы по любому из пп. 1-262 для лечения микробной инфекции у млекопитающего.

276. Применение по п.275, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию.

277. Композиция, содержащая молекулу по любому из пп.1-262 и один или более эксципиентов.

278. Способ активации по меньшей мере одного пути комплемента у млекопитающего введением молекулы по любому из пп.1-262 или композиции по п.239.

279. Способ по п.278, где активация по меньшей мере одного пути комплемента включает:

- a) активацию классического пути комплемента;
- b) активацию лектинового пути комплемента;
- c) активацию альтернативного пути комплемента; или
- d) две или более по пп. (a)-(c).

280. Способ индукции комплемент-зависимой клеточной гибели (CDC) в клетке-мишени, включающий приведение клетки-мишени в контакт с молекулой по любому из пп.1-262 или композиции по п.277, где указанный контакт приводит к отложению комплемента на клетке-мишени, тем самым приводя к комплемент-опосредованной клеточной гибели.

281. Способ индукции комплемент-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) по отношению к клетке-мишени, включающий приведение в контакт клетки-мишени с

молекулой по любому из пп.1-262 или композиции по п.277, где указанный контакт приводит к отложению комплемента на клетке-мишени, тем самым приводя к комплемент-опосредованной клеточной гибели.

282. Способ лечения рака, включающий введение молекулы по любому из пп.1-262 или композиции по п.277 субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в этом.

283. Способ по п.282, где рак представляет собой солидную опухоль.

284. Способ по п.282, где рак представляет собой гематологический рак.

285. Способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение молекулы по любому из пп.1-262 или композиции по п.277 субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в этом.

286. Способ лечения микробной инфекции у субъекта-млекопитающего, включающий введение субъекту молекулы по любому из пп.1-262 или композиции по п.277.

287. Способ по п.286, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию.

288. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* или виды *Listeria*.

289. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*.

290. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Streptococcus pneumoniae*.

291. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Staphylococcus aureus*.

292. Способ по п.287, где вирусный патоген представляет собой вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила, цитомегаловирус или коронавирусы.

293. Способ по п.287, где вирусным патогеном является ВИЧ-1.

294. Способ по п.287, где вирусным патогеном является SARS-CoV-2.

295. Способ по п.287, где грибковый патоген представляет собой *Candida albicans* или вид *Aspergillus*.

296. Способ по п.287, где грибковый патоген представляет собой *Candida albicans*.

297. Способ по п.287, где паразитарным патогеном является *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.

298. Способ по п.287, где паразитарным патогеном является *Plasmodium falciparum*.

299. Нацеленная на комплемент-активирующая молекула по любому из пп.1-262 или композиция по п.277 для применения в производстве лекарственного средства для лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции.

300. Композиция по п.277 для применения в лечении рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции.



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Нацеленная комплемент-активирующая молекула, содержащая:
  - (а) мишень-связывающий домен; и
  - (б) эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент.
2. Молекула по п.1, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит MASP-1 или ее фрагмент, MASP-2 или ее фрагмент, MASP-3 или ее фрагмент, C1r или ее фрагмент, C1s или ее фрагмент, фактор D или его фрагмент, C2a или его фрагмент, или фактор Bb или его фрагмент.
3. Молекула по п.1 или п.2, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, является каталитически активным.
4. Молекула по п.1 или п.2, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, находится в зимогенной форме.
5. Молекула по любому из пп. 1-4, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся в клетке.
6. Молекула по любому из пп. 1-5, где мишень-связывающий домен связывается с CD20, CD38 или CD52.
7. Молекула по любому из пп. 1-4, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на микробном патогене.
8. Молекула по п.7, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на бактериальном патогене, вирусном патогене, грибковом патогене или паразитарном патогене.
9. Молекула по п.8, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* или виды *Listeria*.
10. Молекула по п.9, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*.
11. Молекула по п.8, где вирусный патоген представляет собой вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила, цитомегаловирус или коронавирусы.
12. Молекула по п.8, где грибковый патоген представляет собой *Candida albicans* или виды *Aspergillus*.
13. Молекула по п.8, где паразитарным патогеном является *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.
14. Молекула по любому из пп. 1-13, где мишень-связывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
15. Молекула по п.14, где мишень-связывающий домен содержит анти-CD20 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-CD38 или его антигенсвязывающий фрагмент, или анти-CD52 антитело или его антигенсвязывающий

фрагмент.

16. Молекула по п.15, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, алемтузумаб или его антигенсвязывающий фрагмент, или даратумумаб или его антигенсвязывающий фрагмент.

17. Молекула по п.14, где мишень-связывающий домен содержит антитело, которое связывается с антигеном, находящимся на микробном патогене.

18. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Neisseria* или его антигенсвязывающий фрагмент.

19. Молекула по п.18, где мишень-связывающий домен содержит анти-fHbP антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

20. Молекула по п.19, где мишень-связывающий домен содержит анти-fHbP антитело, клон 19, или его антигенсвязывающий фрагмент.

21. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Streptococcus* или его антигенсвязывающий фрагмент.

22. Молекула по п.21, где мишень-связывающий домен содержит анти-PspA антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

23. Молекула по п.22, где мишень-связывающий домен содержит анти-PspA антитело RX1MI005 или его антигенсвязывающий фрагмент.

24. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Staphylococcus* или его антигенсвязывающий фрагмент.

25. Молекула по п.24, где мишень-связывающий домен содержит анти-Fnbp антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

26. Молекула по п.25, где мишень-связывающий домен содержит анти-Fnbp антитело, клон G, или его антигенсвязывающий фрагмент.

27. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Candida* или его антигенсвязывающий фрагмент.

28. Молекула по п.27, где мишень-связывающий домен содержит антитело к грибковому маннану или его антигенсвязывающий фрагмент.

29. Молекула по п.28, где мишень-связывающий домен содержит антитело к грибковому маннану 1A2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

30. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен, содержит антитело к *Plasmodium* или его антигенсвязывающий фрагмент.

31. Молекула по п.30, где мишень-связывающий домен, содержит анти-PfHR5 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

32. Молекула по п.31, где мишень-связывающий домен содержит анти-PfHR5 антитело R5.004 или его антигенсвязывающий фрагмент.

33. Молекула по п.31, где мишень-связывающий домен содержит анти-PfHR5 антитело R5.016 или его антигенсвязывающий фрагмент.

34. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело к ВИЧ-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

35. Молекула по п.34, где мишень-связывающий домен содержит анти-GP120 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

36. Молекула по п.35, где мишень-связывающий домен содержит анти-GP120 антитело PGT121 или его антигенсвязывающий фрагмент.

37. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело к SARS-CoV-2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

38. Молекула по п.37, где мишень-связывающий домен содержит антитело к S-белку или его антигенсвязывающий фрагмент.

39. Молекула по п.38, где мишень-связывающий домен содержит антитело к S-белку бектеловимаб или его антигенсвязывающий фрагмент.

40. Молекула по п.37, где мишень-связывающий домен, содержит антитело к M-белку или его антигенсвязывающий фрагмент.

41. Молекула по п.40, где мишень-связывающий домен, содержит антитело к M-белку RB572 или RB574.

42. Молекула по п.17, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Aspergillus* или его антигенсвязывающий фрагмент.

43. Молекула по п.42, где мишень-связывающий домен, содержит антитело к *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент.

44. Молекула по любому из пп. 1-43, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит одну или более мутаций относительно сериновой протеазы дикого типа, и/или мишень-связывающий домен содержит одну или более мутаций относительно антитела дикого типа.

45. Молекула по п.44, где одна или более мутаций ингибируют деградацию белка.

46. Молекула по п.44, где одна или более мутаций придают устойчивость к ингибированию сериновой протеазы ингибитором С1 или другими серпинами.

47. Молекула по п.44, где одна или более мутаций ингибируют гликозилирование молекулы в одном или более аминокислотных остатках.

48. Молекула по любому из пп. 14-47, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент и легкую цепь антитела или ее фрагмент.

49. Молекула по п.48, где молекула содержит:

а) слитый белок, содержащий:

i) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента; или

ii) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента; и легкую цепь антитела или ее фрагмент; или

б) слитый белок, содержащий:

i) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента; или

ii) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего

комплемент, слитый с N-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента; и  
тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

50. Молекула по любому из пп. 14-47, где молекула содержит слитый белок, содержащий:

а) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с C-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента или однодоменного антитела или его фрагмента; или

б) C-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента или однодоменного антитела или его фрагмента.

51. Молекула по любому из пп. 1-50, где мишень-связывающий домен и эффекторный сериновый протеазный домен соединены линкером.

52. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор D или его фрагмент.

53. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1r или ее фрагмент.

54. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C1s или ее фрагмент.

55. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-2 или ее фрагмент.

56. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-3 или ее фрагмент.

57. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-1 или ее фрагмент.

58. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C2a или его фрагмент.

59. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор Bb или его фрагмент.

60. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит алемтузумаб или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор D или его фрагмент.

61. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит

















153. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит MASP-1 или ее фрагмент.

154. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит C2a или его фрагмент.

155. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит антитело к *Aspergillus* hJF5 или его антигенсвязывающий фрагмент, и эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор Bb или его фрагмент.

156. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

157. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

158. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO:93.

159. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:94.

160. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO:95.

161. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:96.

162. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO:103.

163. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 104.

164. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 120.

165. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:121.

166. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 124.

167. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 125.

168. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 128.

169. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 129.

170. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 136.

171. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит

легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 137.

172. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 140.

173. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 141.

174. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 144.

175. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 145.

176. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 148.

177. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 149.

178. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 132.

179. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:133.

180. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

181. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 93 или 97, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 94.

182. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 95 или 98, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 96.

183. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 103, 114, 116, 117, 118 и 119.

184. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:104.

185. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 103, 114, 116, 117, 118 и 119, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:104.

186. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 122 или 123.

187. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 122 или 123, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 121.

188. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 126 или 127.

189. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 126 или 127, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 125.

190. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 130 или 131.

191. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 130 или 131, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 129.

192. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 138 или 139.

193. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 138 или 139, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 137.

194. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 142 или 143.

195. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 142 или 143, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 141.

196. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 146 или 147.

197. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 146 или 147, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 145.

198. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 150 или 151.

199. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 150 или 151, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 149.

200. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 134 или 135.

201. Молекула по любому из пп. 48-51, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 134 или 135, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 133.

202. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 57, 58 и 61-65.

203. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 66.

204. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 67 или

SEQ ID NO: 68.

205. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 69-74.

206. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 76 и 78-87.

207. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:88.

208. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:89.

209. Молекула по любому из пп. 1-48, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 90 или 92.

210. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 4-6, 9 и 33-38.

211. Молекула по п.210, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

212. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой SEQ ID NO:7 или SEQ ID NO:8.

213. Молекула по п.212, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

214. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:13.

215. Молекула по п.214, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

216. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:14 или SEQ ID NO:15.

217. Молекула по п.216, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

218. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:16.

219. Молекула по п.218, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

220. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:17.

221. Молекула по п.220, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

222. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 18, 21, 39-40 или 48-50.

223. Молекула по п.222, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

224. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 19, 23, 41-47 или 51-53.

225. Молекула по п.224, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

226. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:25.

227. Молекула по п.226, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

228. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:26.

229. Молекула по п.228, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

230. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 27, 28, 31 и 32.

231. Молекула по п.230, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2.

232. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:29 или SEQ ID NO:30.

233. Молекула по п.232, дополнительно содержащая тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

234. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:97.

235. Молекула по п.234, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:94.

236. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:98.

237. Молекула по п.236, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:96.

238. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 108, 111, 116, 117, 119 и 119.

239. Молекула по п.238, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:104.

240. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 122 или 123.

241. Молекула по п.240, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:121.

242. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 126 или 127.



243. Молекула по п.242, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:125.

244. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 130 или 131.

245. Молекула по п.244, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:129.

246. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 138 или 139.

247. Молекула по п.246, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 137.

248. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 142 или 143.

249. Молекула по п.248, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 141.

250. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 146 или 147.

251. Молекула по п.250, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 145.

252. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 150 или 151.

253. Молекула по п.252, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 149.

254. Молекула по п.49, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 134 или 135.

255. Молекула по п.254, дополнительно содержащая легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:133.

256. Молекула по любому из пп. 1-255, где молекула связывается с мишенью с аффинностью от 1 пМ до 1 мкМ.

257. Молекула по любому из пп. 1-255, где молекула связывается с мишенью на поверхности клетки с аффинностью от 1 пМ до 1 мкМ.

258. Молекула по любому из пп. 1-257, где молекула обладает активностью сериновой протеазы, которая составляет по меньшей мере 70% от активности сериновой протеазы одного серинового протеазного домена.

259. Молекула по любому из пп. 1-257, где молекула обладает активностью сериновой протеазы, которая составляет по меньшей мере 80% от активности сериновой протеазы одного серинового протеазного домена.

260. Молекула по любому из пп. 1-257, где молекула обладает активностью сериновой протеазы, которая составляет по меньшей мере 90% от активности сериновой протеазы одного серинового протеазного домена.

261. Молекула по любому из пп. 1-260, где молекула связывается с мишенью на

поверхности клетки и активирует путь комплемента при введении субъекту-млекопитающему.

262. Молекула по любому из пп. 1-261, где молекула индуцирует комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), комплемент-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (CDCC) и/или комплемент-зависимый клеточный фагоцитоз (CDCP).

263. Полинуклеотид, кодирующий молекулу по любому из пп. 1-262.

264. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 26, 27 и 210-253.

265. Клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие полинуклеотид по п.263 или 264.

266. Клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие первый полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 26, 27 и 210-253, и второй полинуклеотид; где второй полинуклеотид кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент, и второй полинуклеотид кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

267. Первый клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие первый полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 26, 27 и 210-253, и второй клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие второй полинуклеотид; где второй полинуклеотид кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент, и второй полинуклеотид кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

268. Клетка-хозяин, экспрессирующая молекулу по любому из пп. 1-262 или содержащая клонированный вектор(ы) или экспрессионную кассету(ы) по любому из пп. 265-267.

269. Способ получения молекулы, содержащей:

(а) мишень-связывающий домен; и

(б) эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент; включающий культивирование клетки-хозяина по п.266 в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы, и выделение молекулы.

270. Применение молекулы по любому из пп. 1-262 для активации по меньшей мере одного пути комплемента у субъекта-млекопитающего.

271. Применение по п.270, где активация по меньшей мере одного пути комплемента включает:

а) активацию классического пути комплемента;

б) активацию лектинового пути комплемента;

с) активацию альтернативного пути комплемента; или

д) две или более по пп. (а)-(с).

272. Применение молекулы по любому из пп. 1-262 для индукции комплемент-зависимой клеточной гибели (CDC), комплемент-зависимой клеточно-опосредованной

цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) по отношению к клетке-мишени.

273. Применение молекулы по любому из пп. 1-262 для лечения рака.

274. Применение молекулы по любому из пп. 1-262 для лечения аутоиммунного заболевания.

275. Применение молекулы по любому из пп. 1-262 для лечения микробной инфекции у млекопитающего.

276. Применение по п.275, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию.

277. Композиция, содержащая молекулу по любому из пп. 1-262 и один или более эксципиентов.

278. Способ активации по меньшей мере одного пути комплемента у млекопитающего введением молекулы по любому из пп. 1-262 или композиции по п.239.

279. Способ по п.278, где активация по меньшей мере одного пути комплемента включает:

- a) активацию классического пути комплемента;
- b) активацию лектинового пути комплемента;
- c) активацию альтернативного пути комплемента; или
- d) две или более по пп. (a)-(c).

280. Способ индукции комплемент-зависимой клеточной гибели (CDC) в клетке-мишени, включающий приведение клетки-мишени в контакт с молекулой по любому из пп. 1-262 или композиции по п.277, где указанный контакт приводит к отложению комплемента на клетке-мишени, тем самым приводя к комплемент-опосредованной клеточной гибели.

281. Способ индукции комплемент-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) по отношению к клетке-мишени, включающий приведение в контакт клетки-мишени с молекулой по любому из пп. 1-262 или композиции по п.277, где указанный контакт приводит к отложению комплемента на клетке-мишени, тем самым приводя к комплемент-опосредованной клеточной гибели.

282. Способ лечения рака, включающий введение молекулы по любому из пп. 1-262 или композиции по п.277 субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в этом.

283. Способ по п.282, где рак представляет собой солидную опухоль.

284. Способ по п.282, где рак представляет собой гематологический рак.

285. Способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение молекулы по любому из пп. 1-262 или композиции по п.277 субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в этом.

286. Способ лечения микробной инфекции у субъекта-млекопитающего, включающий введение субъекту молекулы по любому из пп. 1-262 или композиции по п.277.

287. Способ по п.286, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию.

288. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter* или виды *Listeria*.

289. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*.

290. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Streptococcus pneumoniae*.

291. Способ по п.287, где бактериальный патоген представляет собой *Staphylococcus aureus*.

292. Способ по п.287, где вирусный патоген представляет собой вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила, цитомегаловирус или коронавирус.

293. Способ по п.287, где вирусным патогеном является ВИЧ-1.

294. Способ по п.287, где вирусным патогеном является SARS-CoV-2.

295. Способ по п.287, где грибковый патоген представляет собой *Candida albicans* или вид *Aspergillus*.

296. Способ по п.287, где грибковый патоген представляет собой *Candida albicans*.

297. Способ по п.287, где паразитарным патогеном является *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.

298. Способ по п.287, где паразитарным патогеном является *Plasmodium falciparum*.

299. Нацеленная на комплемент-активирующая молекула по любому из пп. 1-262 или композиция по п.277 для применения в получении лекарственного средства для лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции.

300. Композиция по п.277 для применения в лечении рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции.

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,  
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Нацеленная комплемент-активирующая молекула, содержащая:
  - (a) мишень-связывающий домен; и
  - (b) эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент.
2. Молекула по п.1, где эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент, содержит MASP-1 или ее фрагмент, MASP-2 или ее фрагмент, MASP-3 или ее фрагмент, C1r или ее фрагмент, C1s или ее фрагмент, фактор D или его фрагмент, C2a или его фрагмент, или фактор Bb или его фрагмент.
3. Молекула по п.1 или п.2, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся в клетке.
4. Молекула по п.3, где мишень-связывающий домен связывается с CD20, CD38 или CD52.
5. Молекула по п.1 или п.2, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на микробном патогене.
6. Молекула по п.5, где мишень-связывающий домен связывается с антигеном, находящимся на бактериальном патогене, вирусном патогене, грибковом патогене или паразитарном патогене.
7. Молекула по п.6, где патоген представляет собой *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium Tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoea*, *Clostridium difficile*, виды *Salmonella*, виды *Helicobacter*, виды *Shigella*, виды *Campylobacter*, виды *Listeria*, вирус Эпштейна-Барр, вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), герпесвирус, вирус гриппа, вирус лихорадки Западного Нила, цитомегаловирус, коронавирус, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum* или *Trypanosoma cruzi*.
8. Молекула по любому из пп. 1-7, где мишень-связывающий домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
9. Молекула по п.8, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент и легкую цепь антитела или ее фрагмент.
10. Молекула по п.9, где молекула содержит:
  - а) слитый белок, содержащий:
    - i) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента; или
    - ii) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом тяжелой цепи антитела или ее фрагмента; и легкую цепь антитела или ее фрагмент; или
  - б) слитый белок, содержащий:
    - i) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом легкой цепи антитела или ее фрагмента; или

ii) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом легкой цепи антитела или его фрагмента; и тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

11. Молекула по п.8, где молекула содержит слитый белок, содержащий:

а) N-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с С-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента или однодоменного антитела или его фрагмента; или

б) С-конец эффекторного серинового протеазного домена, активирующего комплемент, слитый с N-концом одноцепочечного антитела или его фрагмента или однодоменного антитела или его фрагмента.

12. Молекула по любому из пп. 1-11, где мишень-связывающий домен и эффекторный сериновый протеазный домен соединены линкером.

13. Молекула по любому из пп. 8-12, где мишень-связывающий домен содержит ритуксимаб, алемтузумаб, даратумумаб, анти-fHbP антитело, клон 19, анти-PspA антитело RX1MI005, анти-Fnbp антитело, клон G, антитело к *Candida* 1A2, анти-PfRH5 антитело R5.004, анти-PfRH5 антитело R5.016, анти-GP120 антитело PGT121, бибтеловимаб, антитело к М-белку SARS-CoV-2 RB572, антитело к М-белку SARS-CoV-2 RB574, антитело к *Aspergillus* hJF5 или антигенсвязывающий фрагмент любого из вышеуказанного.

14. Молекула по любому из пп. 8-12, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит фактор D, C1r, C1s, MASP-2, MASP-3, MASP-1, C2a или Bb, или фрагмент любого из вышеуказанного.

15. Молекула по любому из пп. 8-12, где мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20, 54-56,93, 95, 97, 98, 103, 105, 113-115, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144 и 148.

16. Молекула по любому из пп. 9-12, где мишень-связывающий домен содержит легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2, 94, 96, 102, 104, 106, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145 и 149.

17. Молекула по любому из пп. 8-12, где:

а) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2;

б) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 93 или 97, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 94;

с) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 95 или 98, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO: 96;

д) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в любой из SEQ ID NO: 103, 114, 116, 117, 118 и 119, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:104;

е) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 122 или 123, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:121;

ф) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID

NO: 126 или 127, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:125;

g) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 130 или 131, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:129;

h) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 138 или 139, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:137;

i) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 142 или 143, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:141;

j) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 146 или 147, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:145;

к) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 150 или 151, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:149; или

l) мишень-связывающий домен содержит тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 134 или 135, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:133.

18.. Молекула по любому из пп. 1-17, где эффекторный сериновый протеазный домен содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 57-92.

19. Молекула по п.10, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 4-9, 12-19, 21, 23, 25-53, 97, 98, 108, 111, 116, 117, 119, 122, 123, 126, 127, 130, 131, 134, 135, 138, 139, 142, 143, 146, 147, 150 и 151.

20. Молекула по п.19, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 4-6, 9, 12, 13, 16, 18, 19, 21, 23, 25-28 и 31-53, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:2 .

21. Молекула по п.19, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 7, 8, 14, 15, 17, 29 и 30, и тяжелую цепь, как показано в SEQ ID NO: 1, 3, 20 и 54-56.

22. Молекула по п.10, где слитый белок содержит аминокислотную последовательность, показанную в любой из SEQ ID NO: 97, 98, 108, 111, 116, 117, 119, 122, 123, 126, 127, 130, 131, 134, 135, 138, 139, 142, 143, 146, 147, 150 и 151.

23. Молекула по п.22, содержащая:

а) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:97, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:94;

б) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:98, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:96;

с) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:108, 111, 116, 117 и 119, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:104;

д) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:122 или 123, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:121;

е) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:126 или 127, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:125;

f) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:130 или 131, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:129;

g) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:138 или 139, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:137;

h) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:142 или 143, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:141;

i) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:146 или 147, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:145;

j) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:150 или 151, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:149; или

k) слитый белок, как показано в SEQ ID NO:134 или 135, и легкую цепь, как показано в SEQ ID NO:133.

24. Молекула по любому из пп. 1-23, где молекула связывается с мишенью с аффинностью от 1 пМ до 1 мкМ.

25. Молекула по любому из пп. 1-24, где молекула обладает активностью сериновой протеазы, которая составляет по меньшей мере 70% от активности сериновой протеазы одного серинового протеазного домена.

26. Молекула по любому из пп. 1-25, где молекула связывается с мишенью на поверхности клетки и активирует путь комплемента при введении субъекту-млекопитающему.

27. Полинуклеотид, кодирующий молекулу по любому из пп. 1-23.

28. Полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 10, 11 и 19-23.

29. Клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие полинуклеотид по п.27 или 28.

30. Клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие первый полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 10, 11 и 19-23, и второй полинуклеотид; где второй полинуклеотид кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент, и второй полинуклеотид кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

31. Первый клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие первый полинуклеотид, кодирующий слитый белок по любому из пп. 10, 11 и 19-23, и второй клонированный вектор или экспрессионная кассета, содержащие второй полинуклеотид; где второй полинуклеотид кодирует тяжелую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит легкую цепь антитела или ее фрагмент, и второй полинуклеотид кодирует легкую цепь антитела или ее фрагмент, если слитый белок содержит тяжелую цепь антитела или ее фрагмент.

32. Клетка-хозяин, экспрессирующая молекулу по любому из пп. 1-23 или содержащая клонированный вектор(ы) или экспрессионную кассету(ы) по любому из пп. 29-31.



33. Способ получения молекулы, содержащей:

(а) мишень-связывающий домен; и

(b) эффекторный сериновый протеазный домен, активирующий комплемент; включающий культивирование клетки-хозяина по п.32 в условиях, обеспечивающих экспрессию молекулы, и выделение молекулы.

34. Применение молекулы по любому из пп. 1-23 для активации по меньшей мере одного пути комплемента у субъекта-млекопитающего.

35. Применение молекулы по любому из пп. 1-23 для индукции комплемент-зависимой клеточной гибели (CDC), комплемент-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) по отношению к клетке-мишени.

36. Применение молекулы по любому из пп. 1-23 для лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции.

37. Применение по п.36, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, вирусную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инвазию.

38. Композиция, содержащая молекулу по любому из пп. 1-23 и один или более адъювантов.

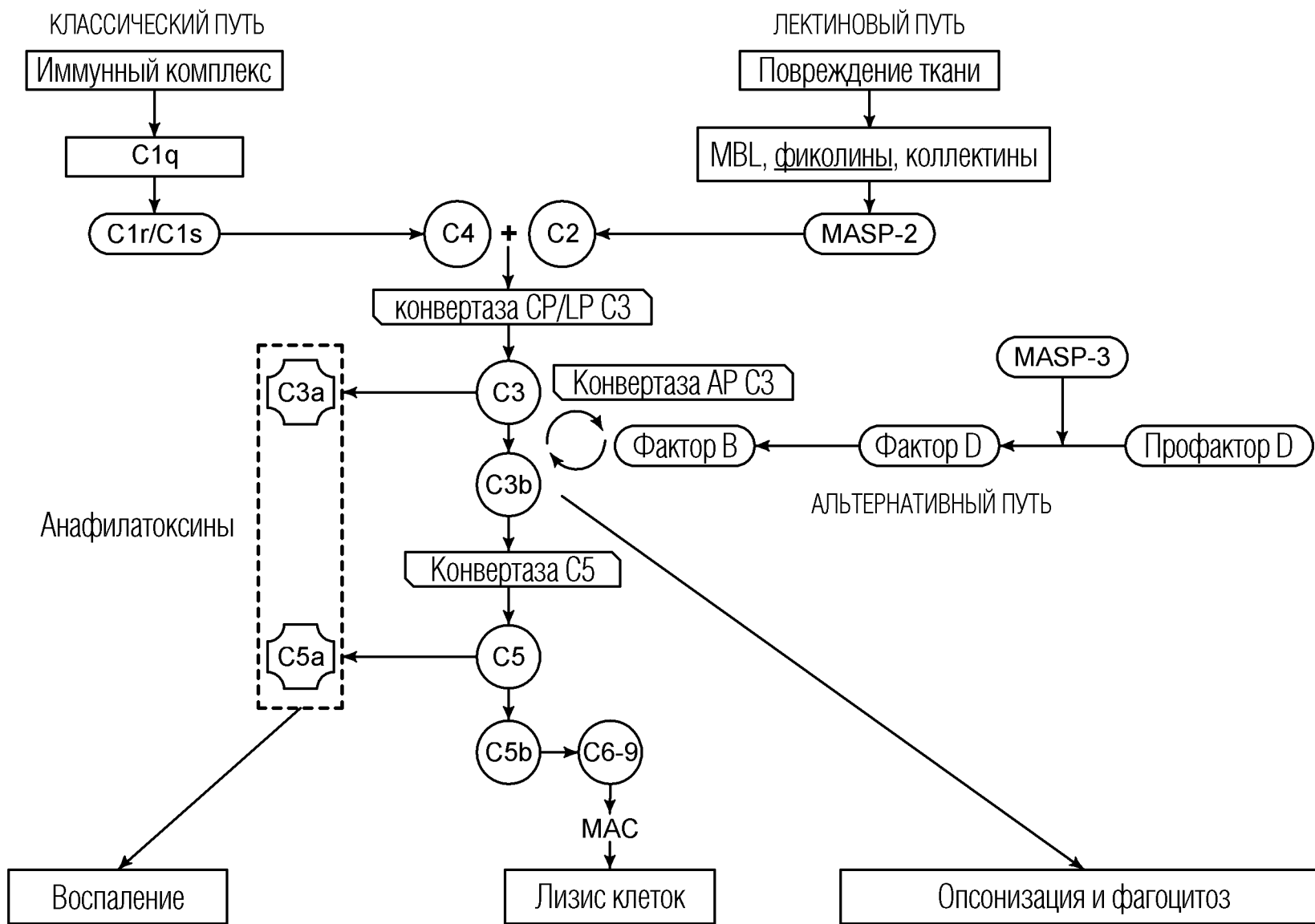
39. Способ активации по меньшей мере одного пути комплемента у млекопитающего введением молекулы по любому из пп. 1-23 или композиции по п.38.

40. Способ индукции комплемент-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (CDCC) или комплемент-зависимого клеточного фагоцитоза (CDCP) по отношению к клетке-мишени, включающий приведение в контакт клетки-мишени с молекулой по любому из пп. 1-23 или композиции по п.38, где указанный контакт приводит к отложению комплемента на клетке-мишени, тем самым приводя к комплемент-опосредованной клеточной гибели.

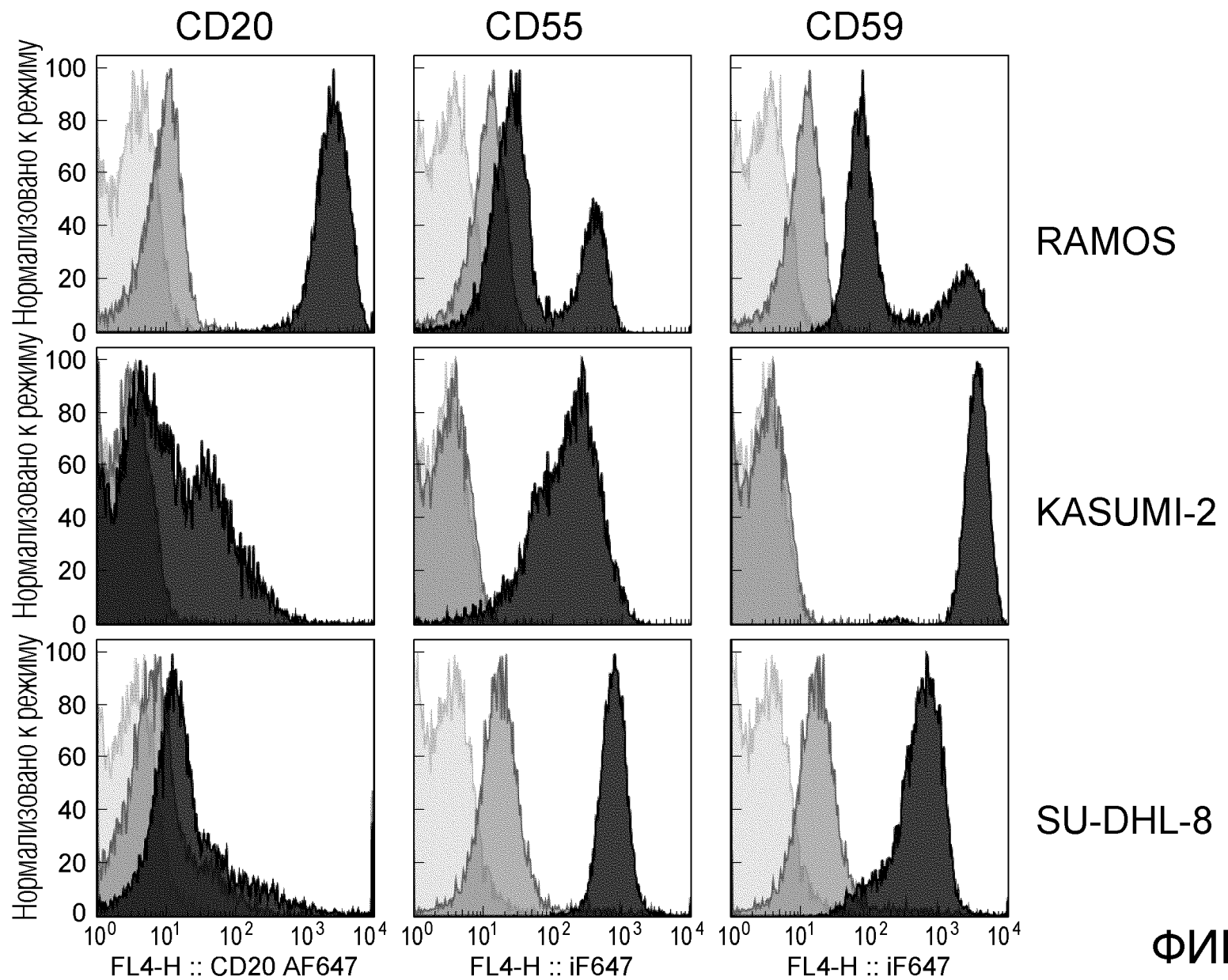
41. Способ лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции, включающий введение молекулы по любому из пп. 1-23 или композиции по п.38 субъекту-млекопитающему, нуждающемуся в этом.

42. Нацеленная на комплемент-активирующая молекула по любому из пп. 1-23 или композиция по п.38 для применения в получении лекарственного средства для лечения рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции.

43. Композиция по п.38 для применения в лечении рака, аутоиммунного заболевания или микробной инфекции.

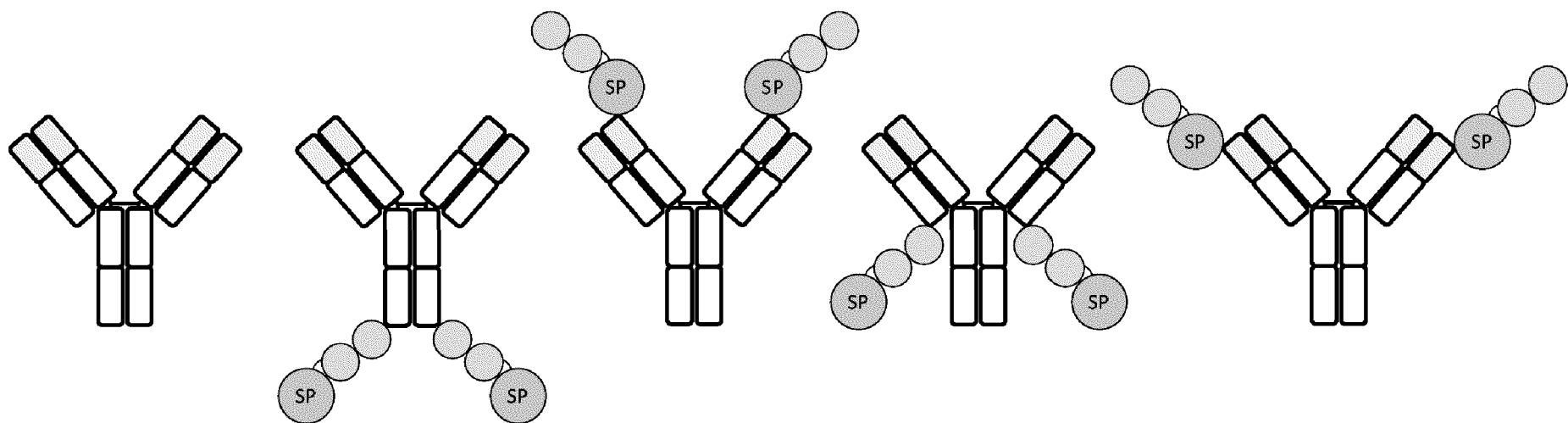


ФИГ. 1

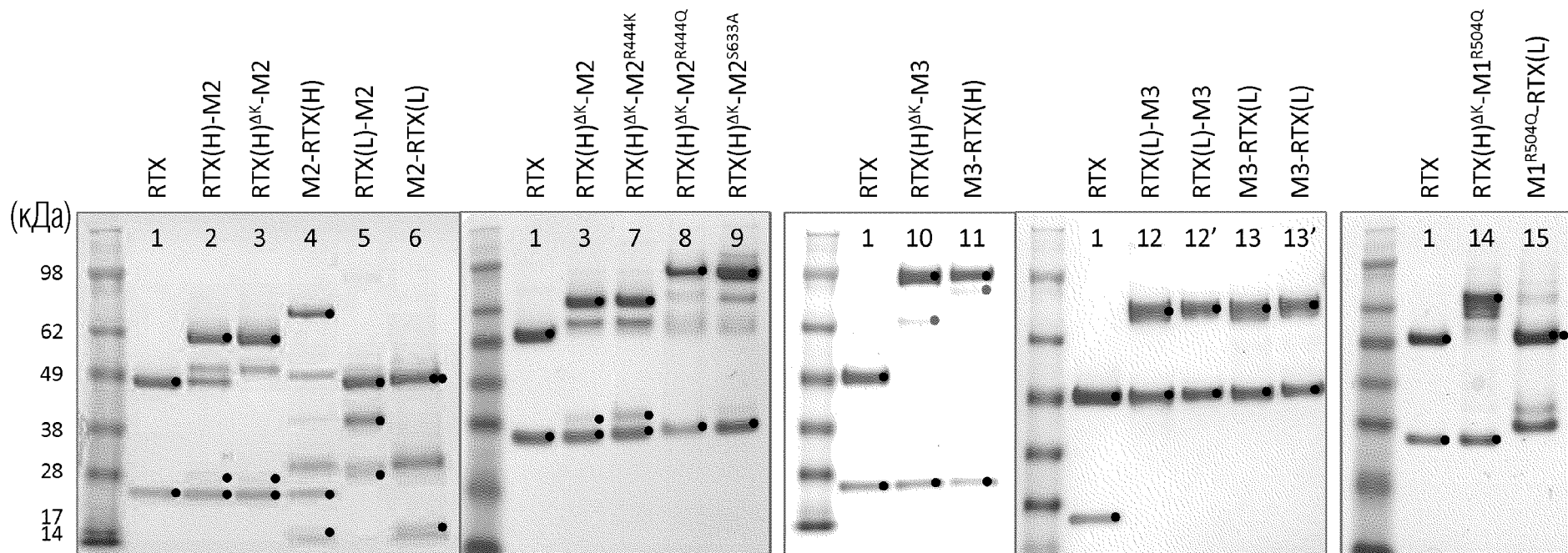


2/60

ФИГ. 2

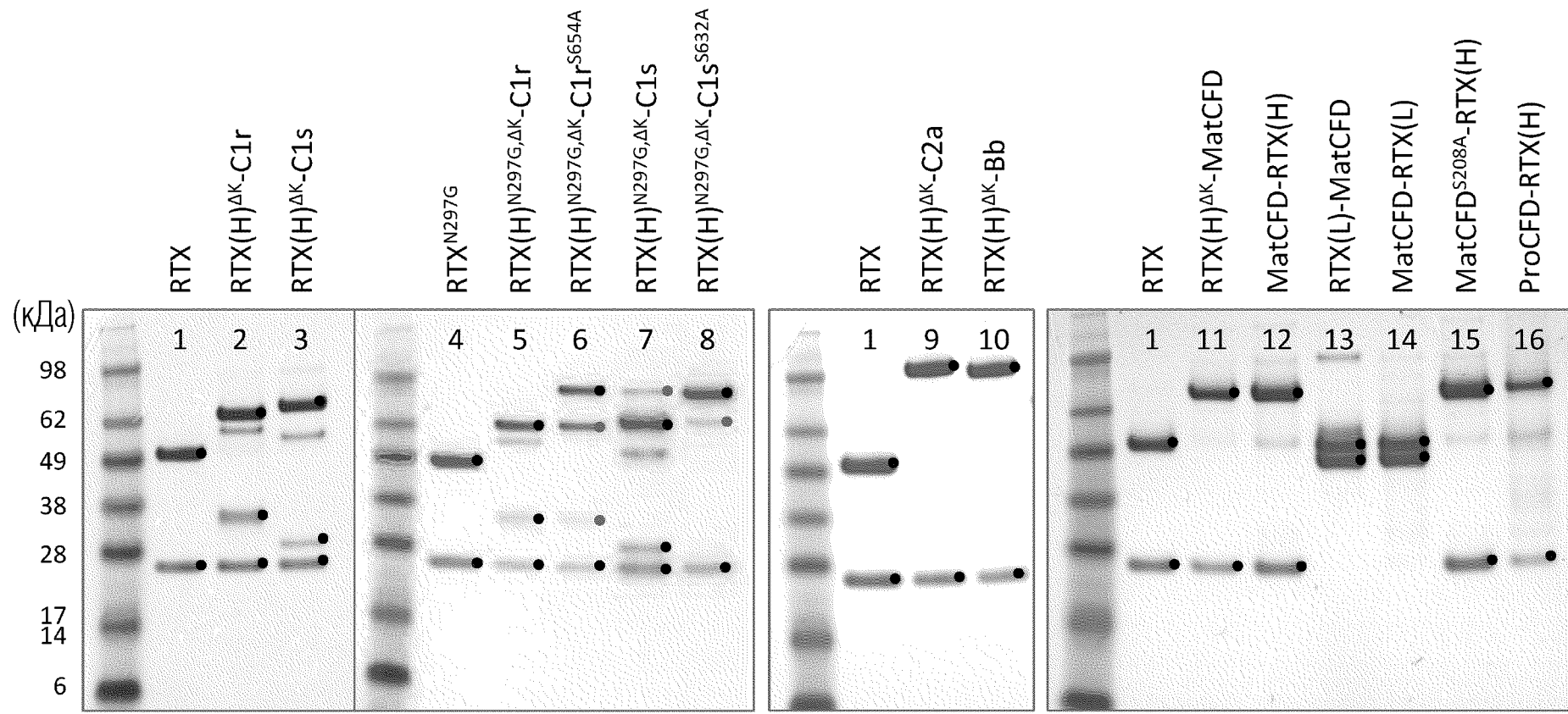


ФИГ. 3



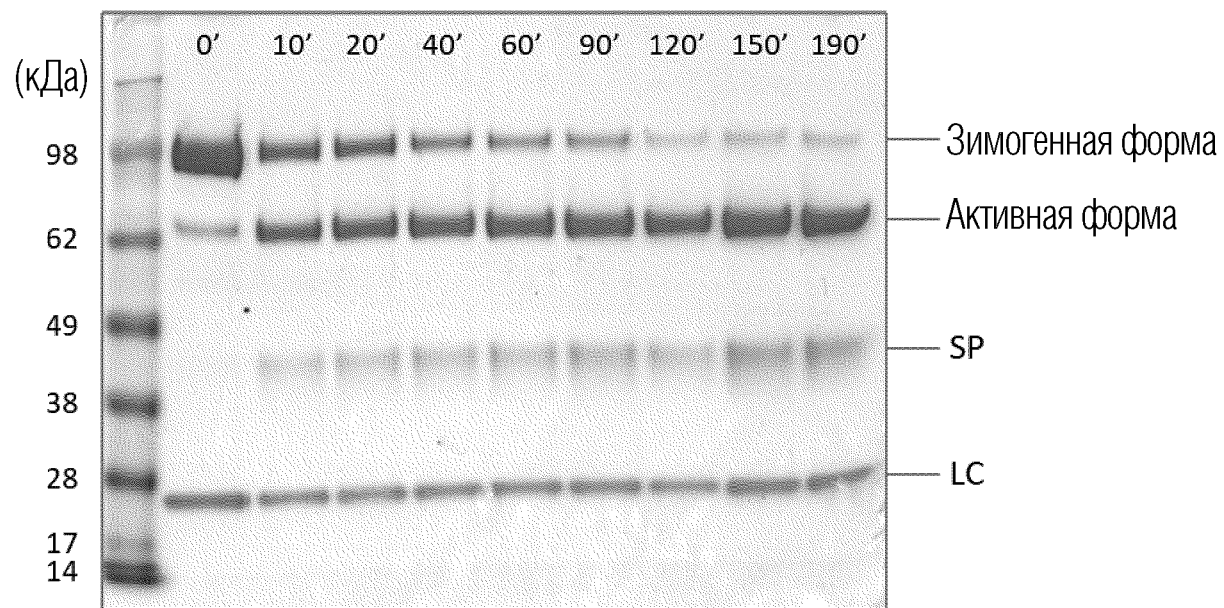
• Интактная полоса  
• Минорная интактная полоса

ФИГ. 4

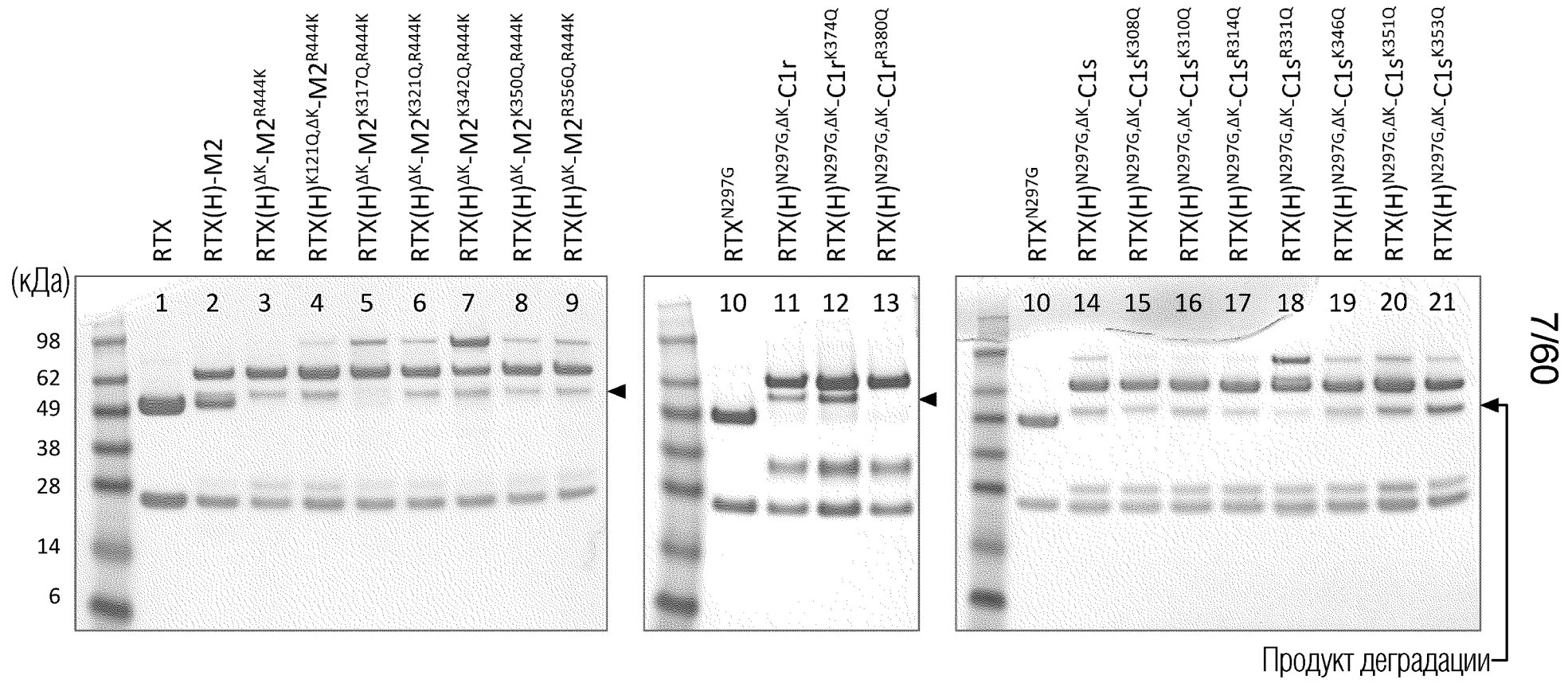


● Интактная полоса  
● Минорная интактная полоса

ФИГ. 5

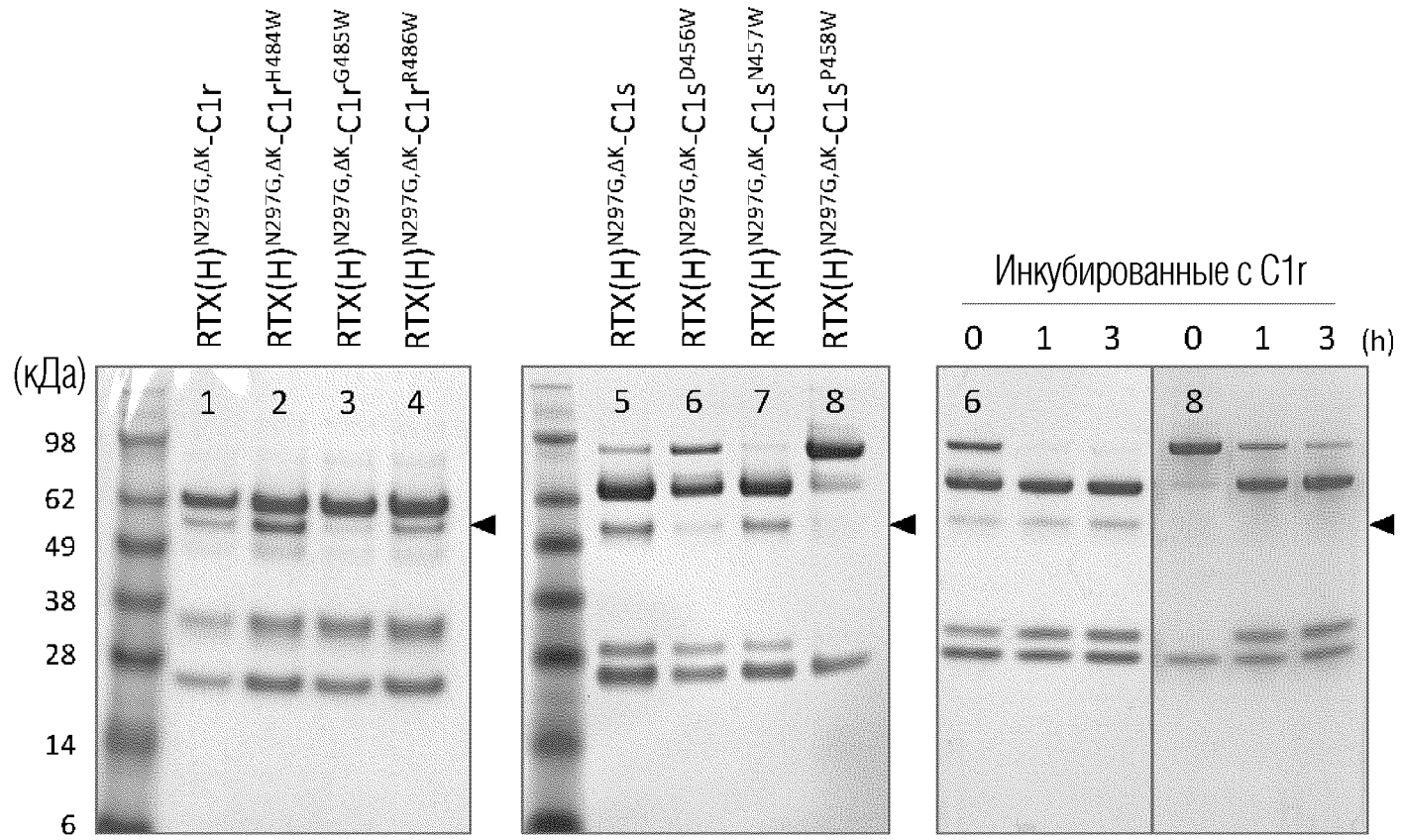


ФИГ. 6

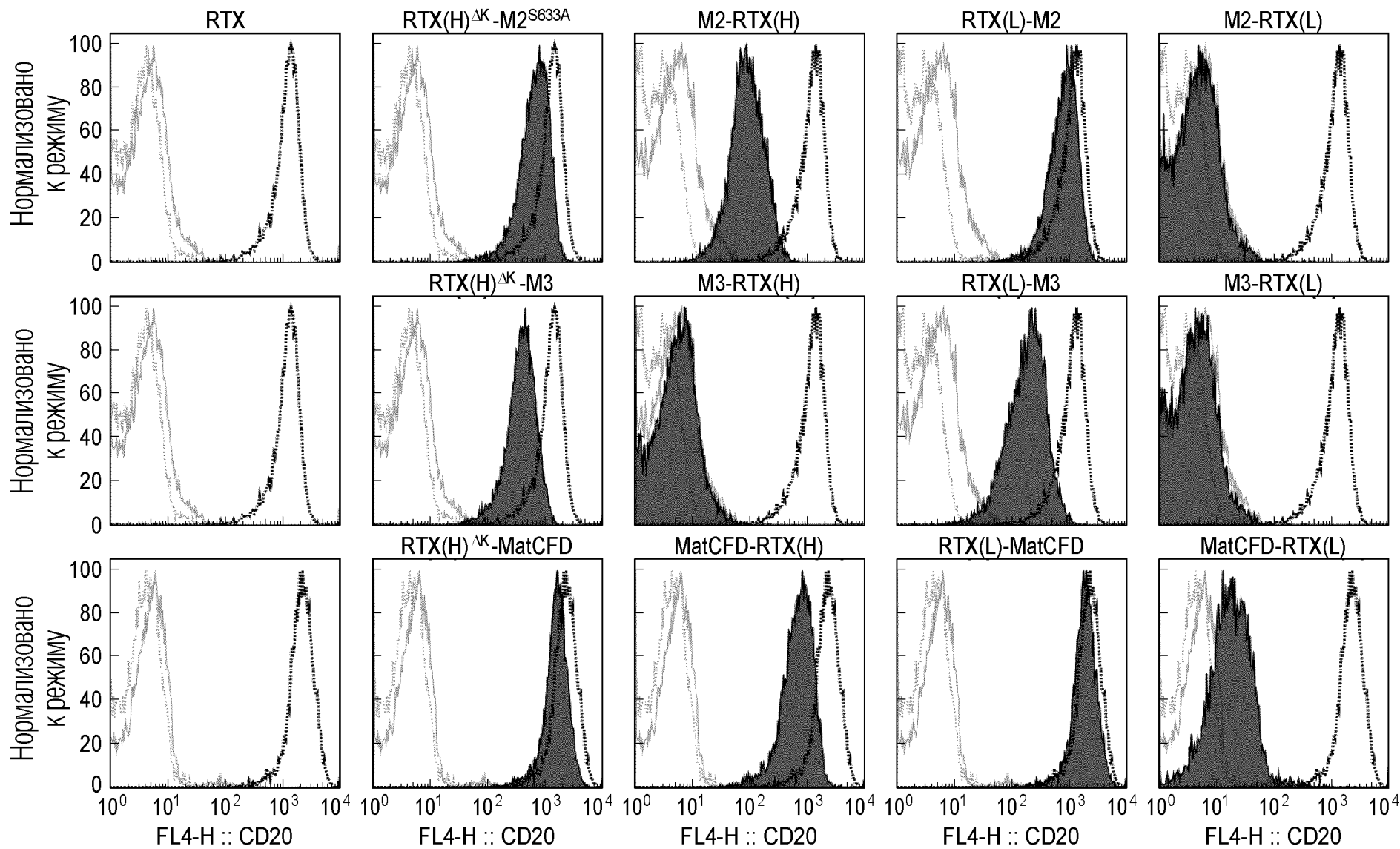


ФИГ. 7

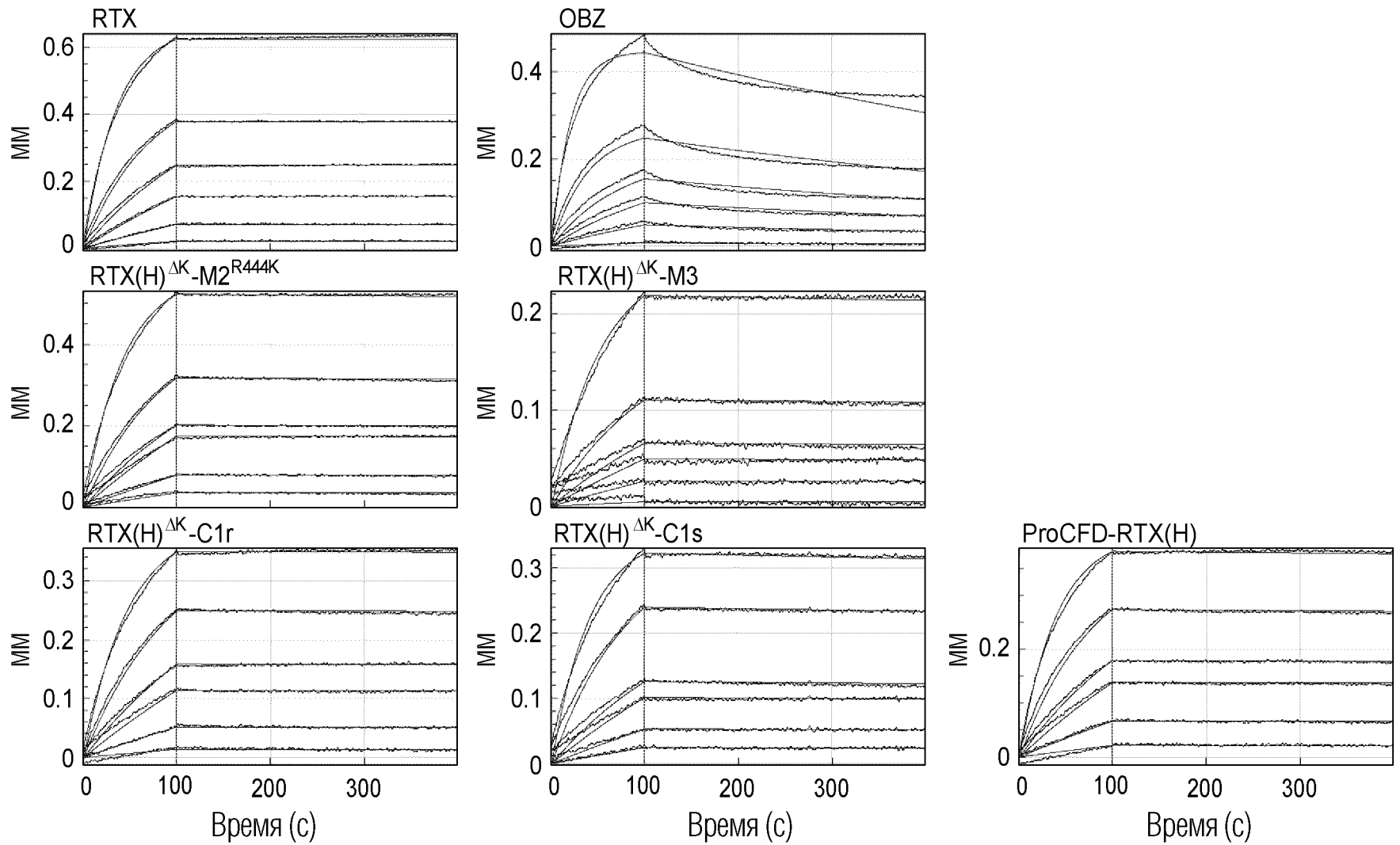




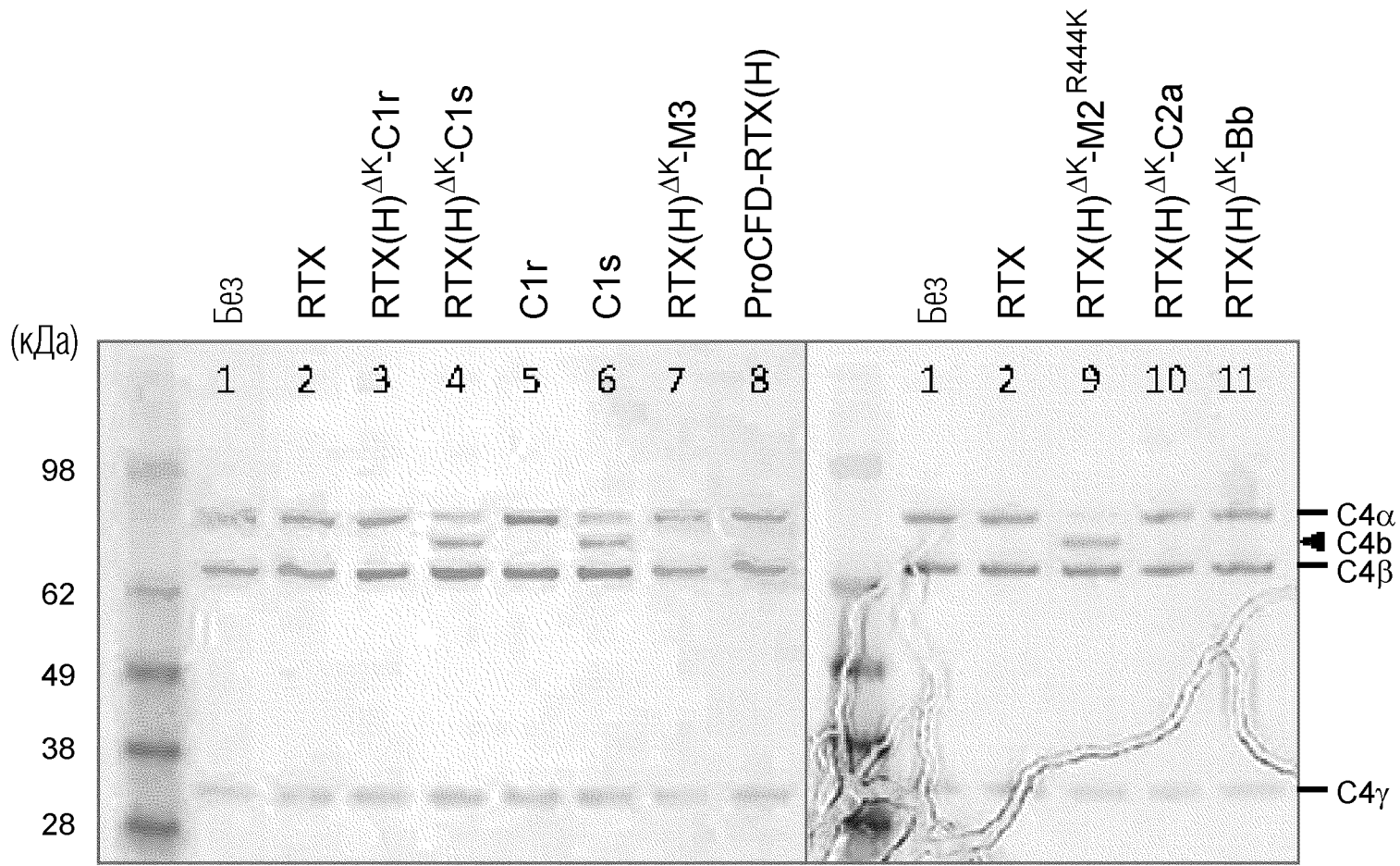
ФИГ. 8



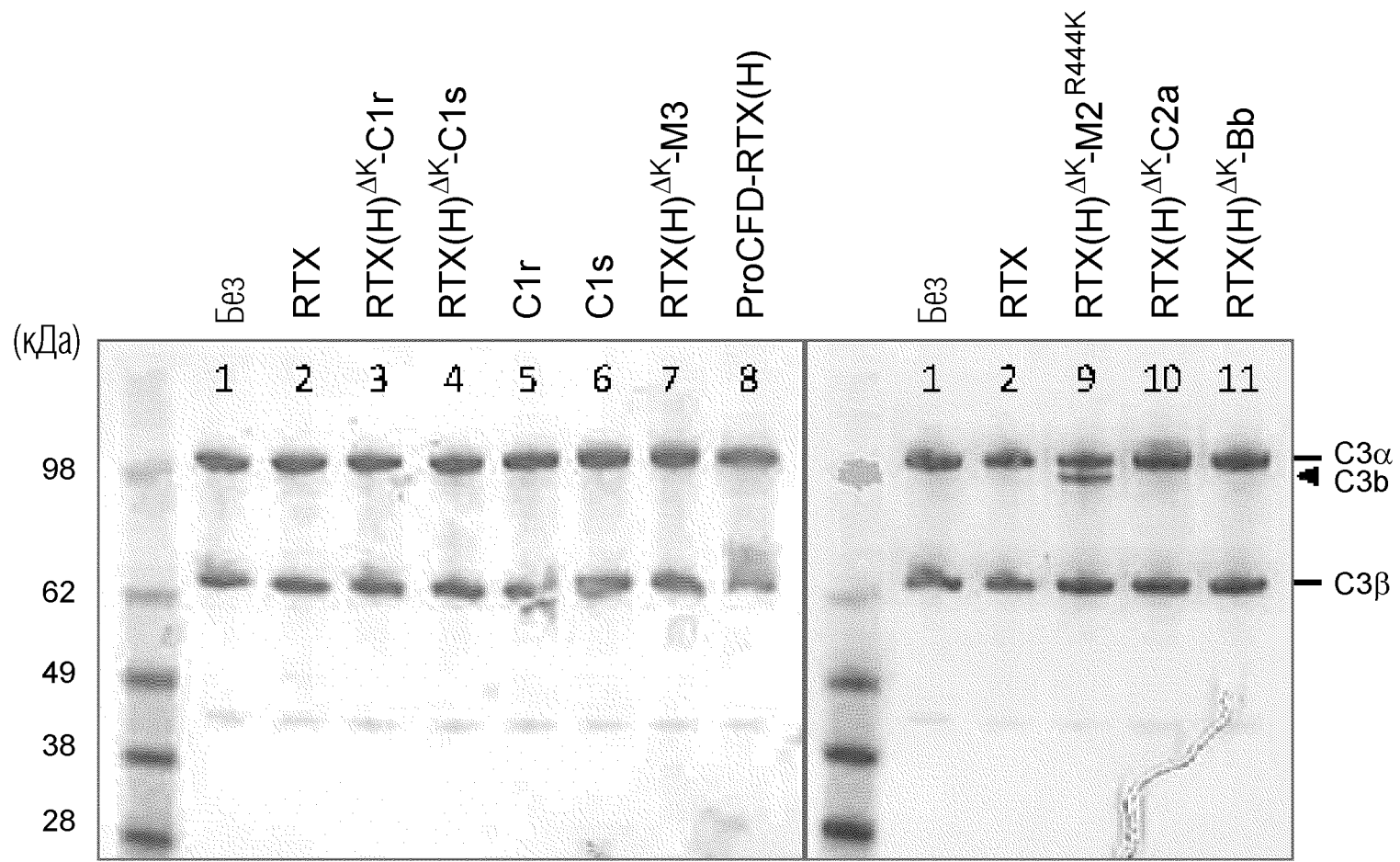
ФИГ. 9



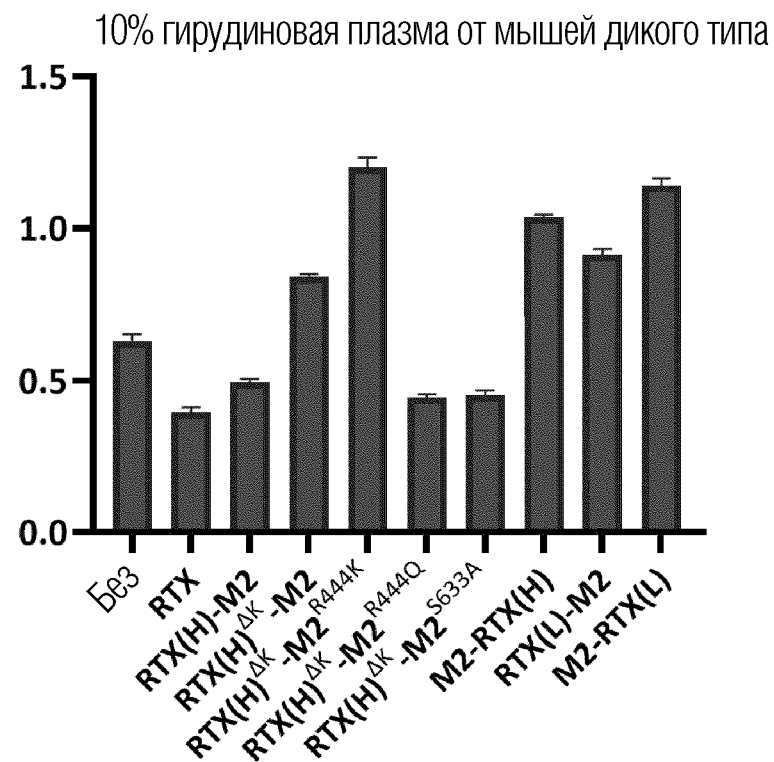
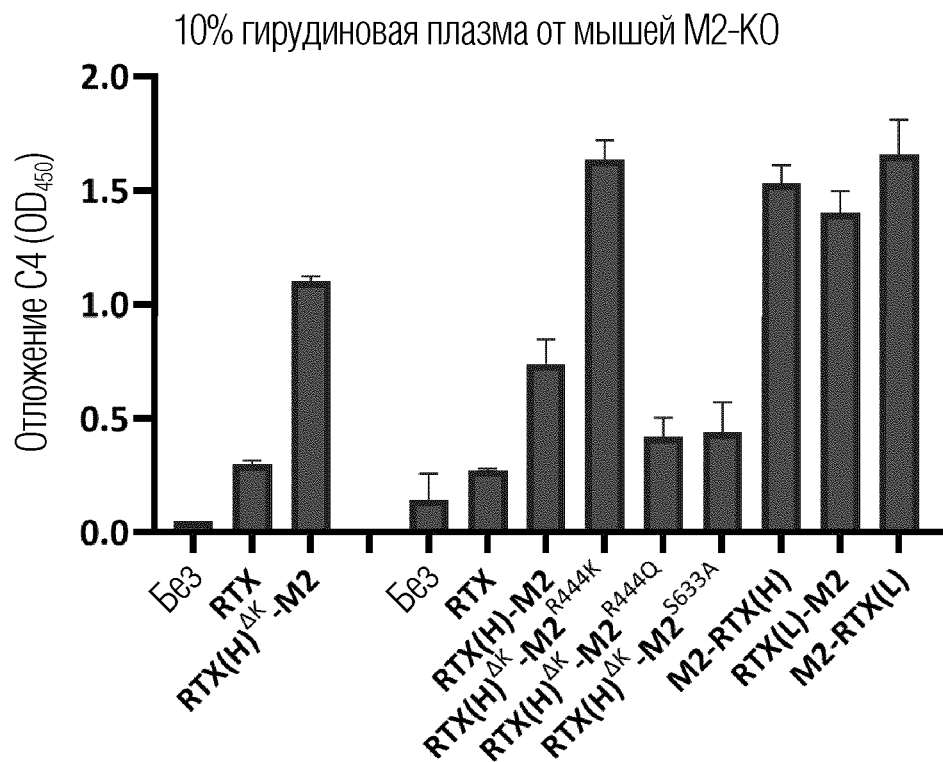
ФИГ. 10



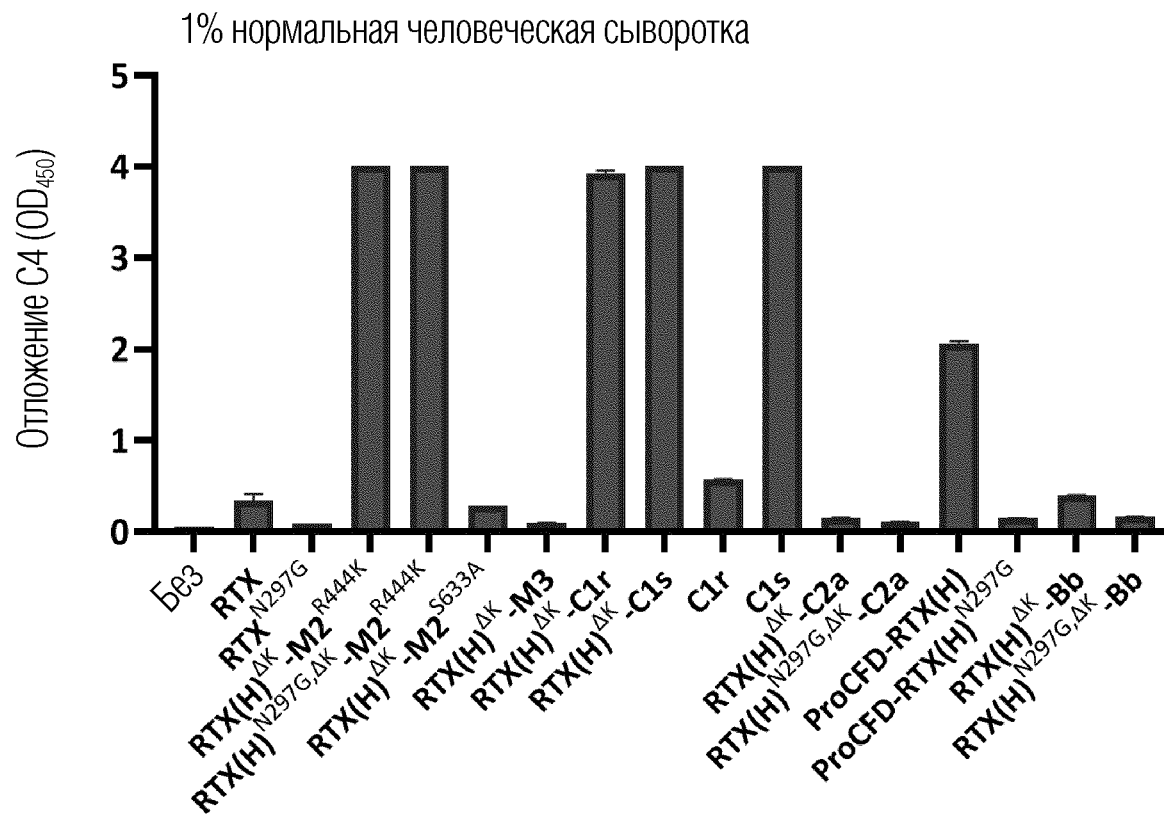
ФИГ. 11А



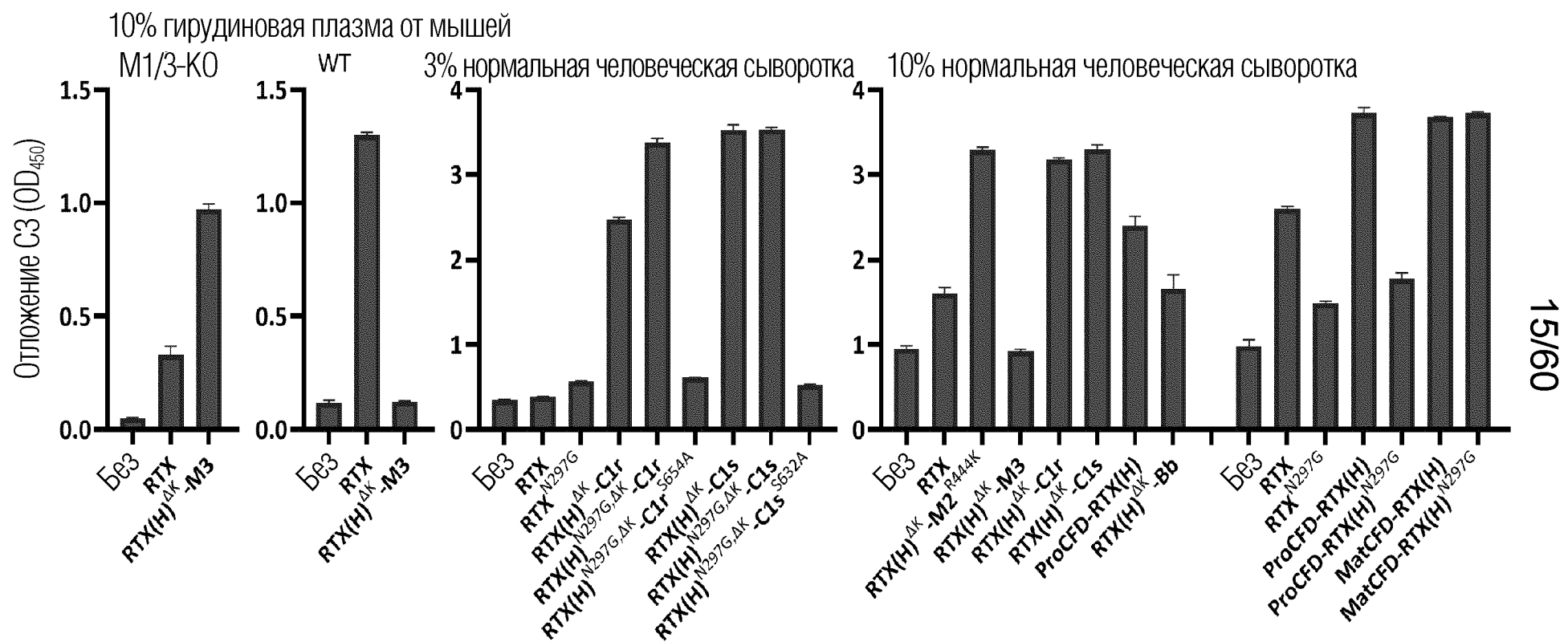
ФИГ. 11В



ФИГ. 12А



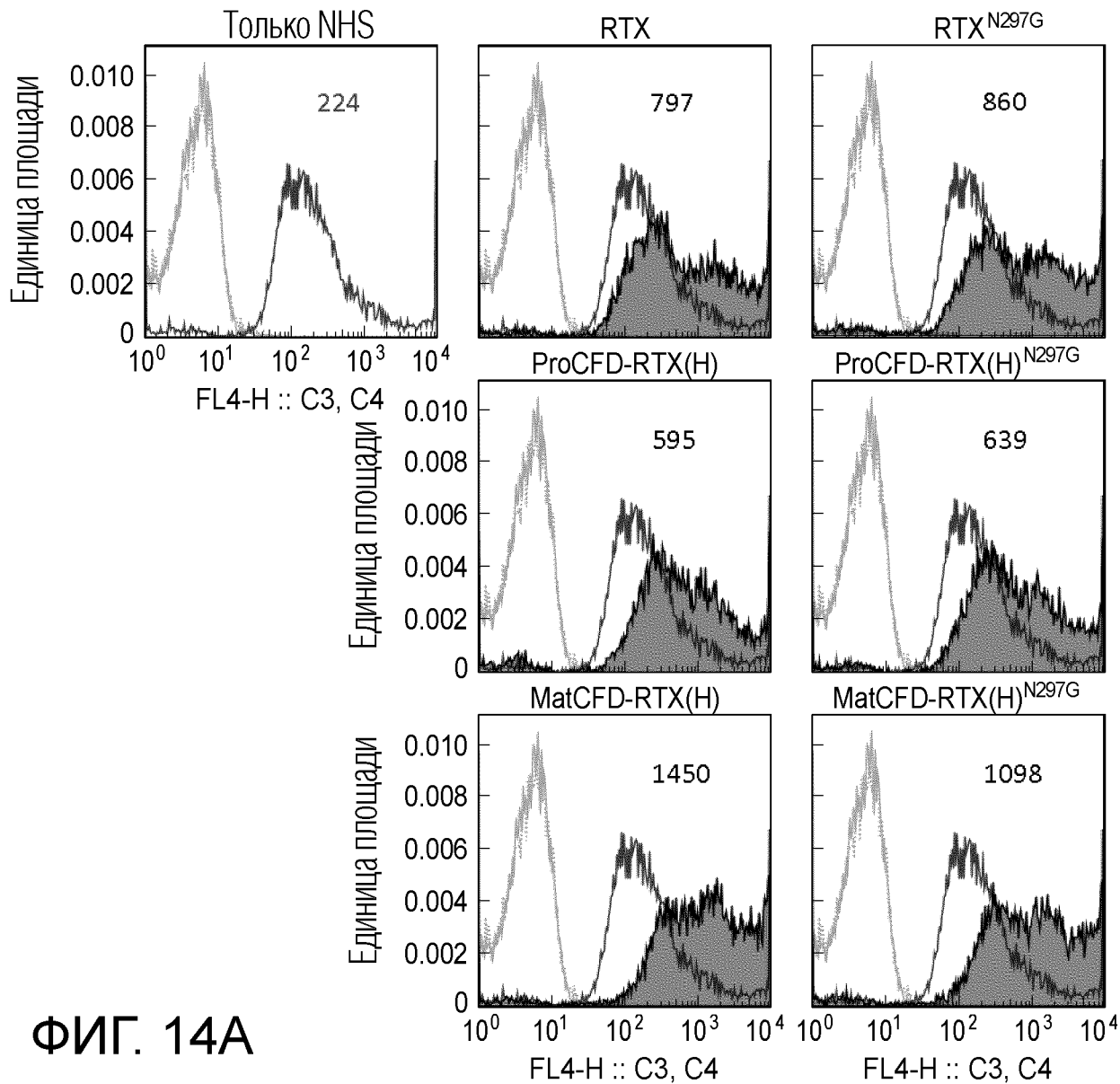
ФИГ. 12В



ФИГ. 13

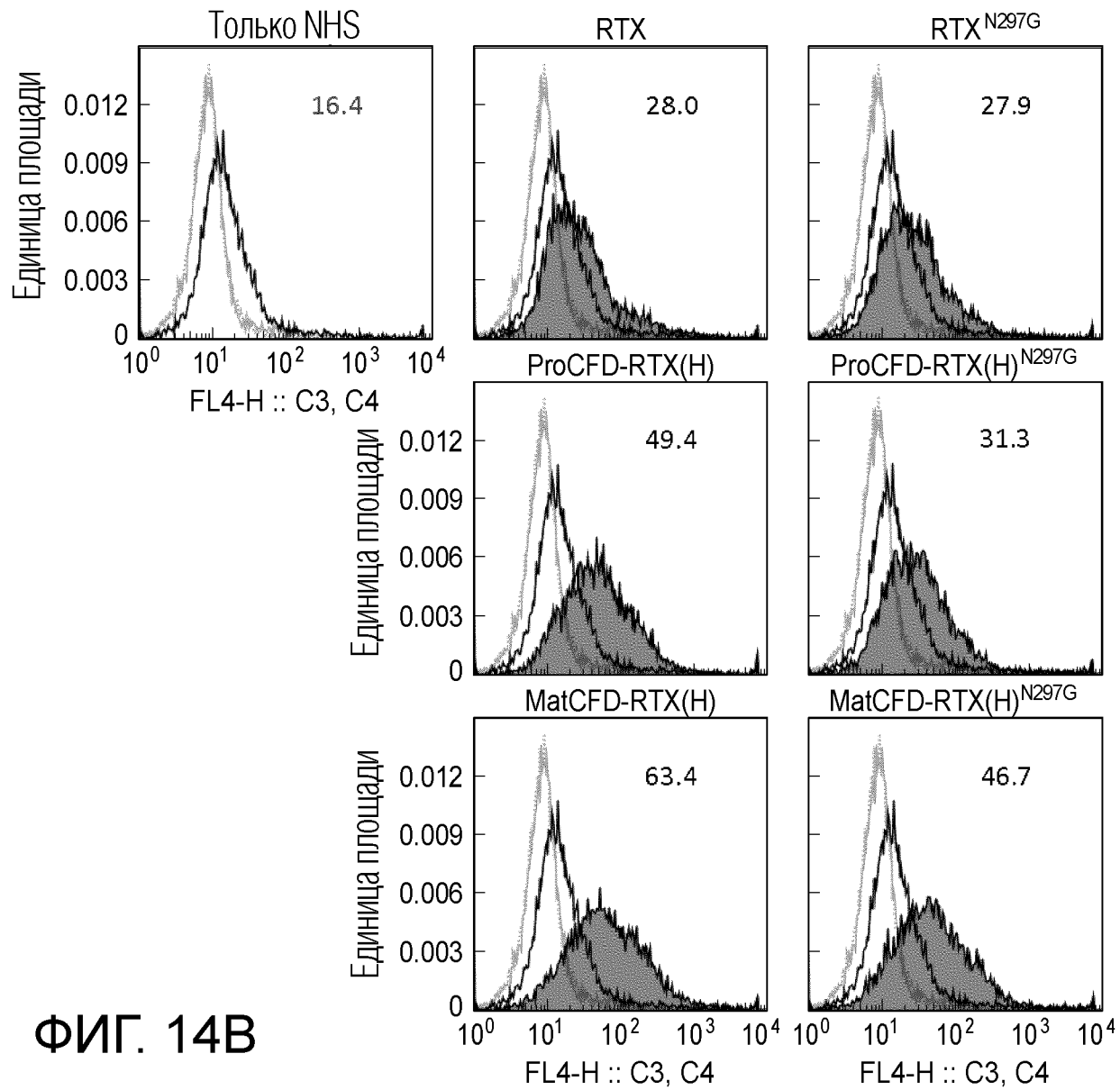


**C3b**

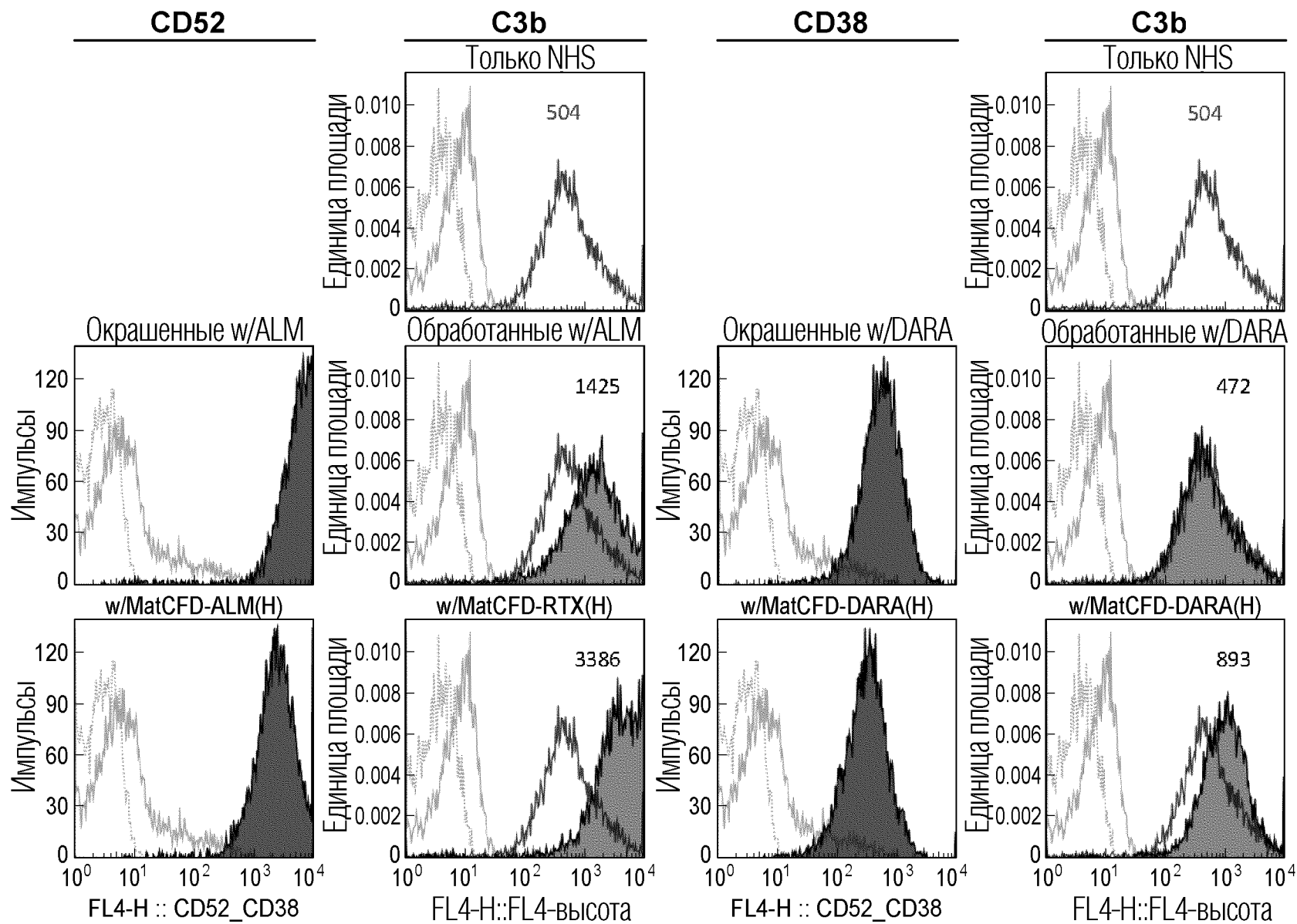


**ФИГ. 14А**

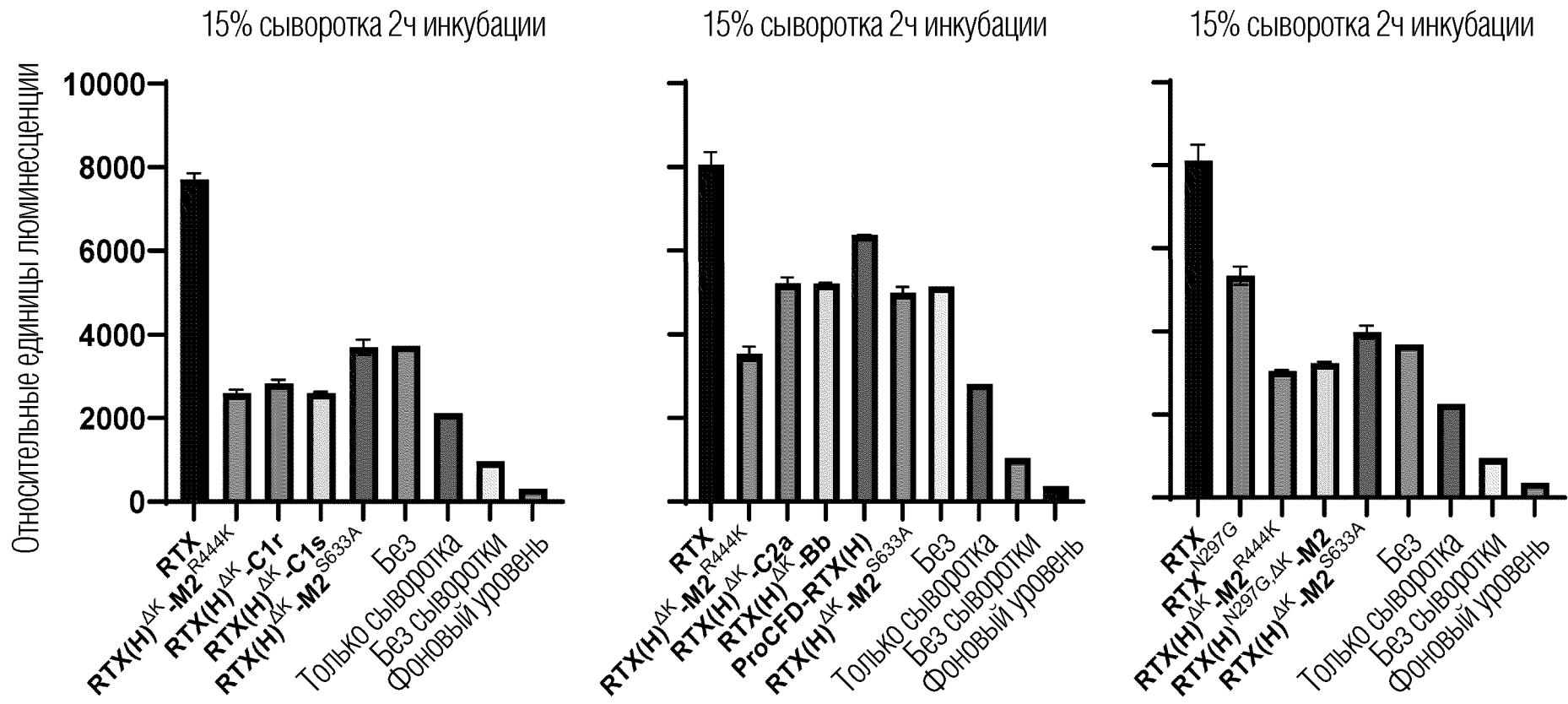
**MAC**



**ФИГ. 14В**

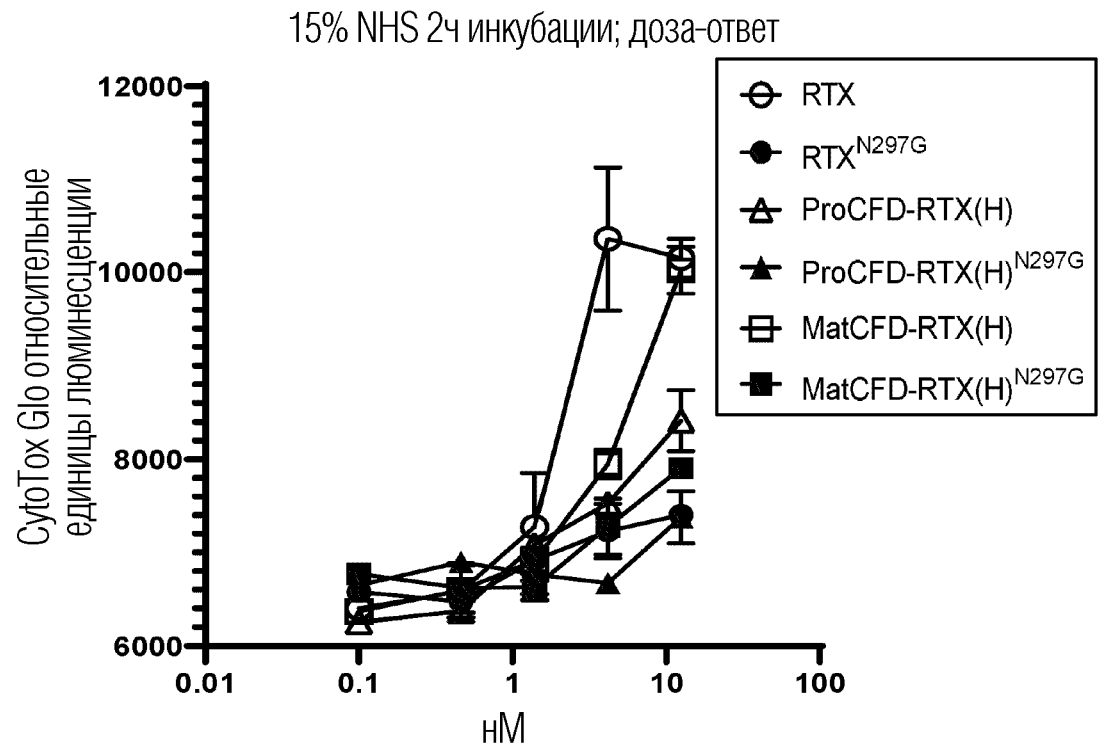
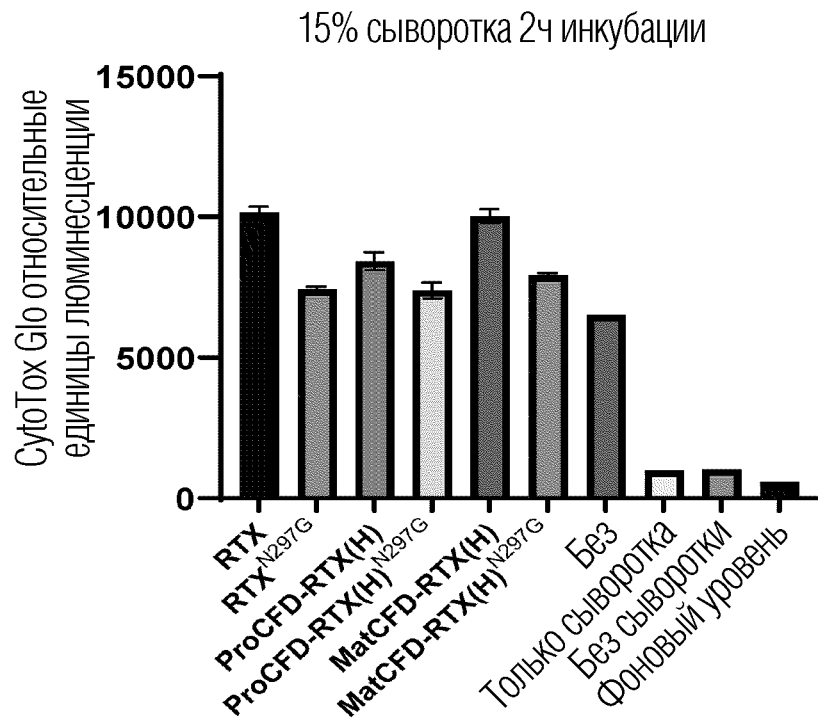


ФИГ. 15



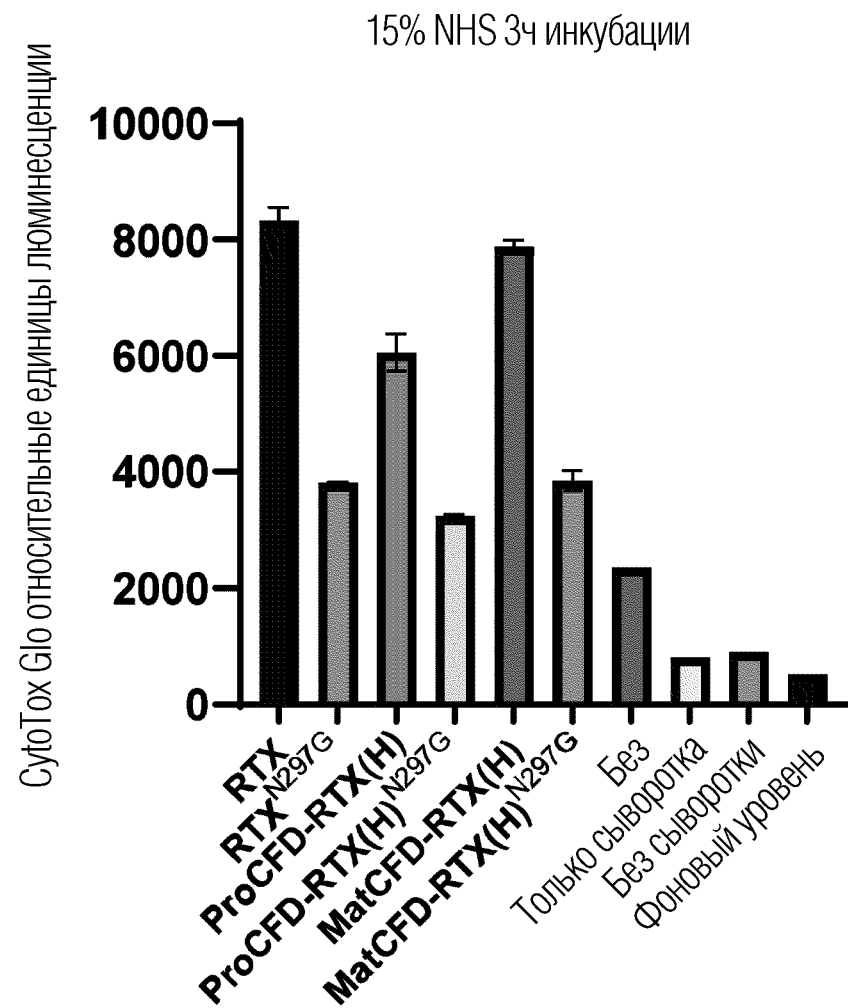
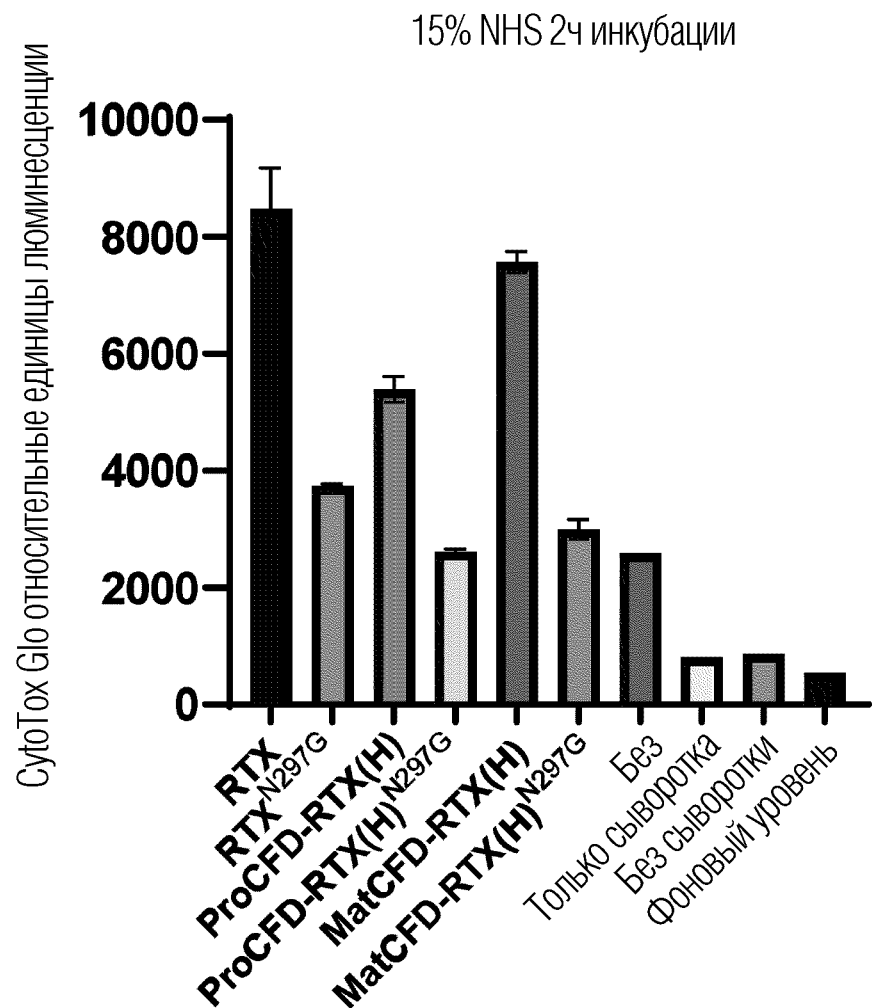
09/16

ФИГ. 16

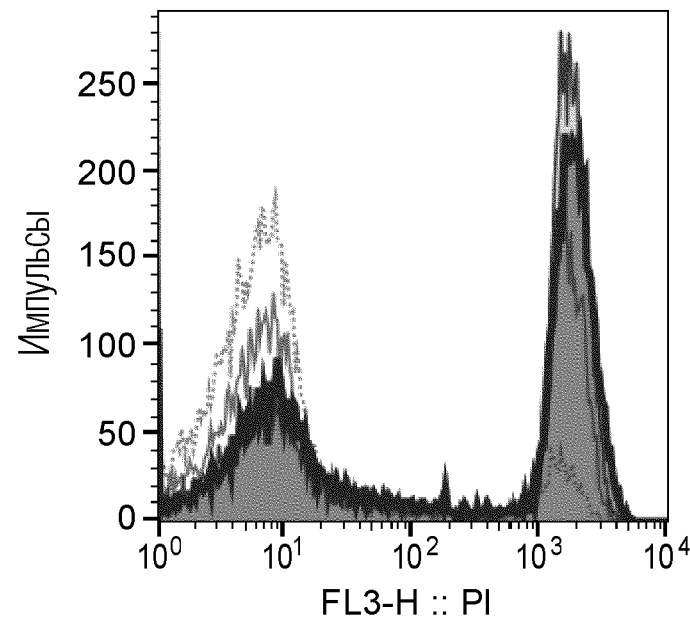
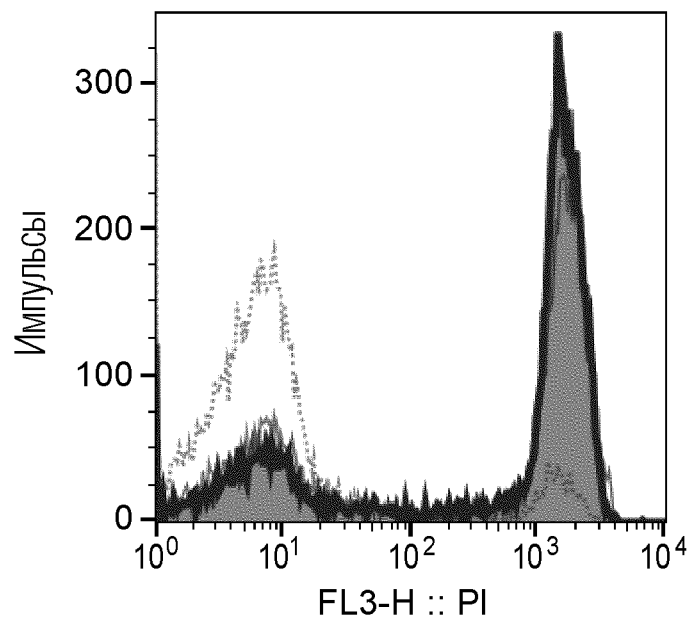


20/60

ФИГ. 17



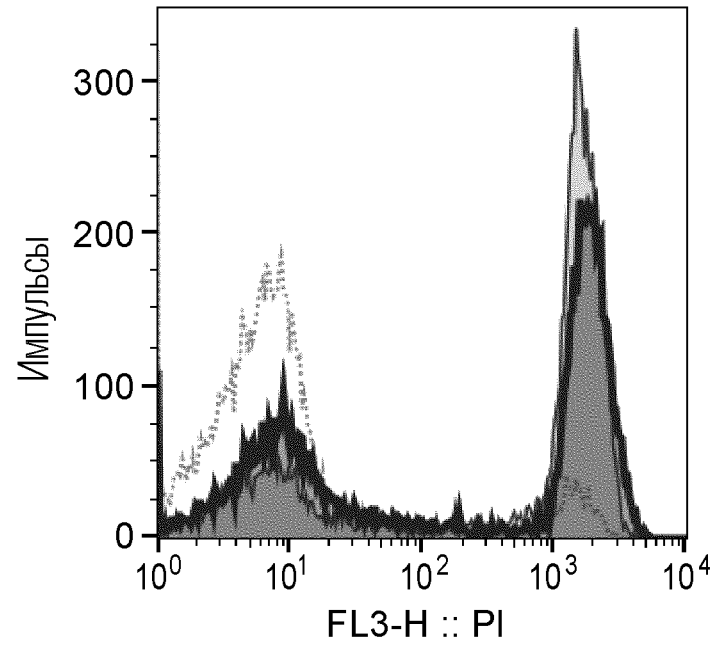
ФИГ. 18



	Название образца	Название популяции	Импульсы	RTX
■	CD210607.004	Негейтированные	10000	112,5 нМ
▒	CD210607.008	Негейтированные	10000	37,5 нМ
□	CD210607.010	Негейтированные	10000	12,5 нМ
□	CD210607.006	Негейтированные	10000	Только NHS

	Название образца	Название популяции	Импульсы	MatCFD-RTX(H)
■	CD210607.005	Негейтированные	10000	112,5 нМ
▒	CD210607.013	Негейтированные	10000	37,5 нМ
□	CD210607.015	Негейтированные	10000	12,5 нМ
□	CD210607.006	Негейтированные	10000	Только NHS

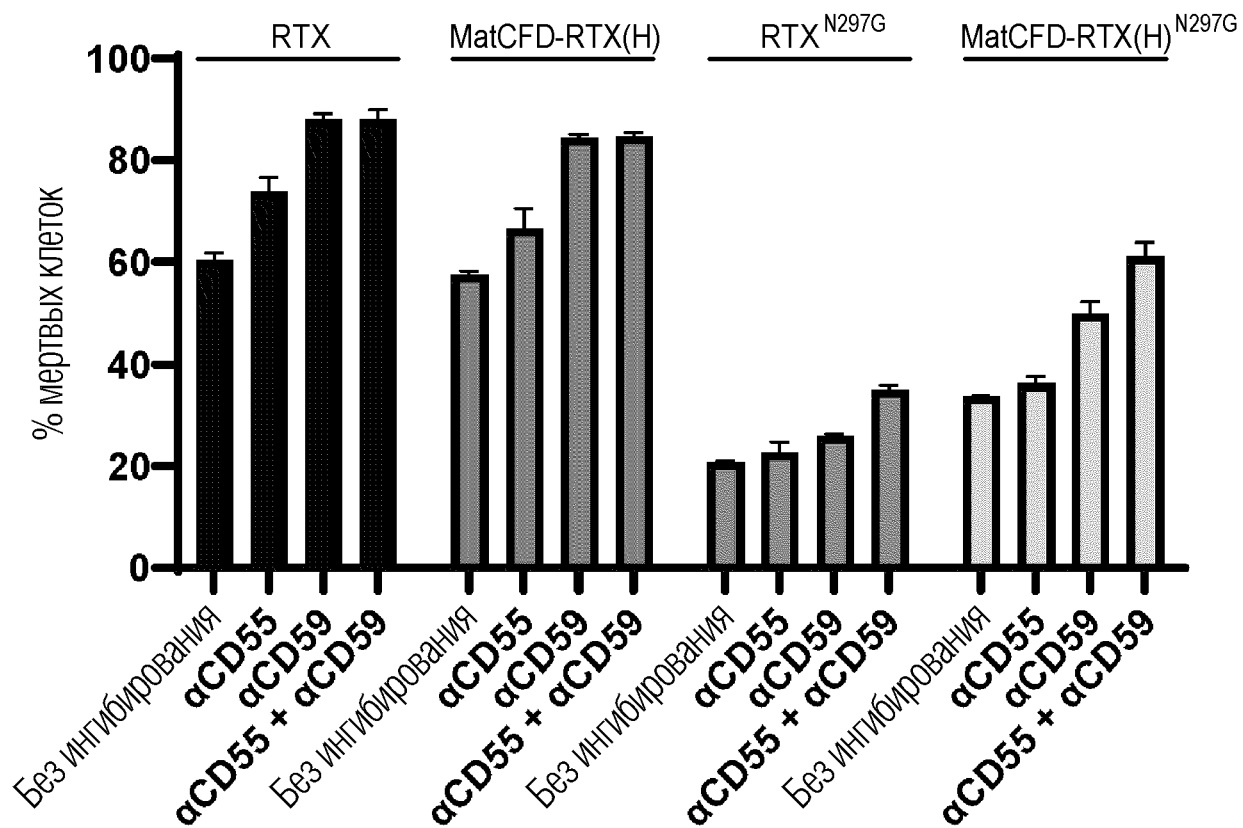
ФИГ. 19А



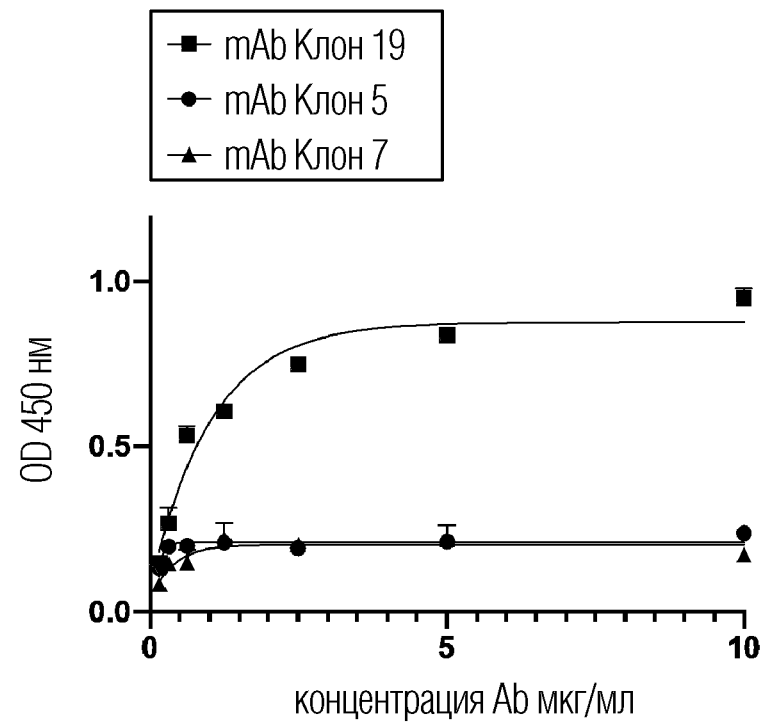
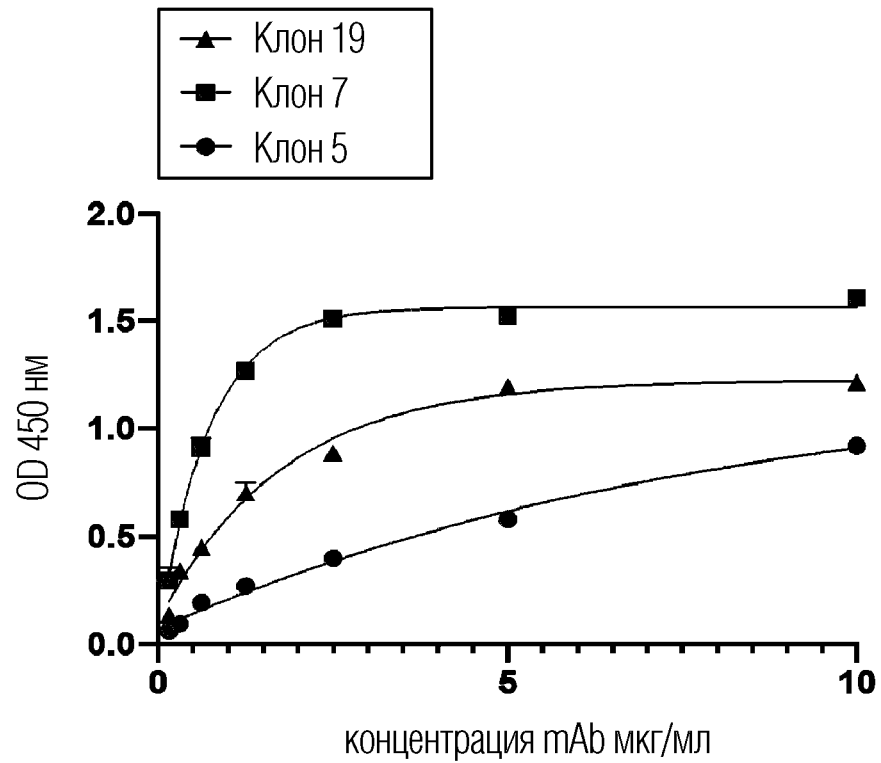
	Название образца	Название популяции	Импульсы	
■	CD210607.005	Негетированные	10000	112,5 нМ MatCFD-RTX(H)
▨	CD210607.004	Негетированные	10000	112,5 нМ RTX
□	CD210607.006	Негетированные	10000	Только NHS

ФИГ. 19В

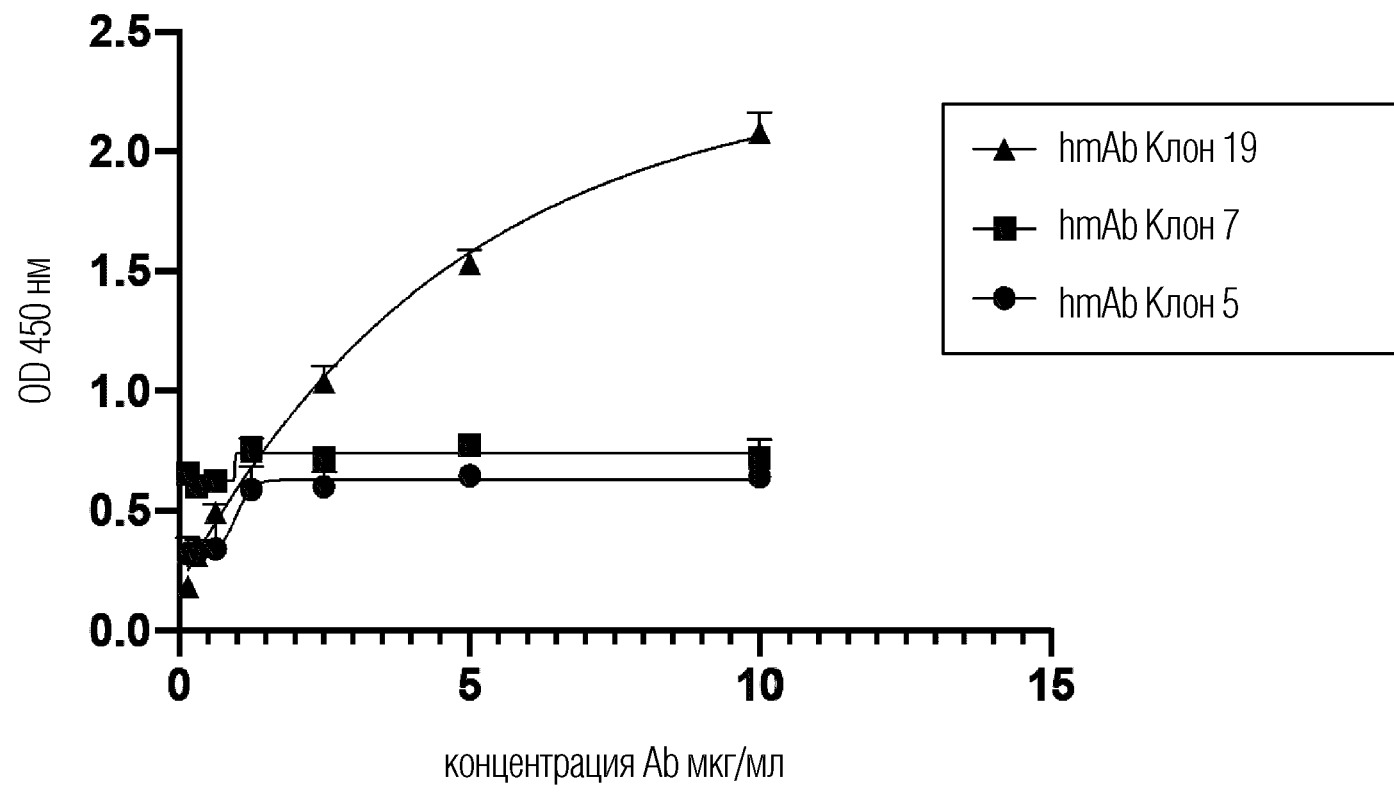




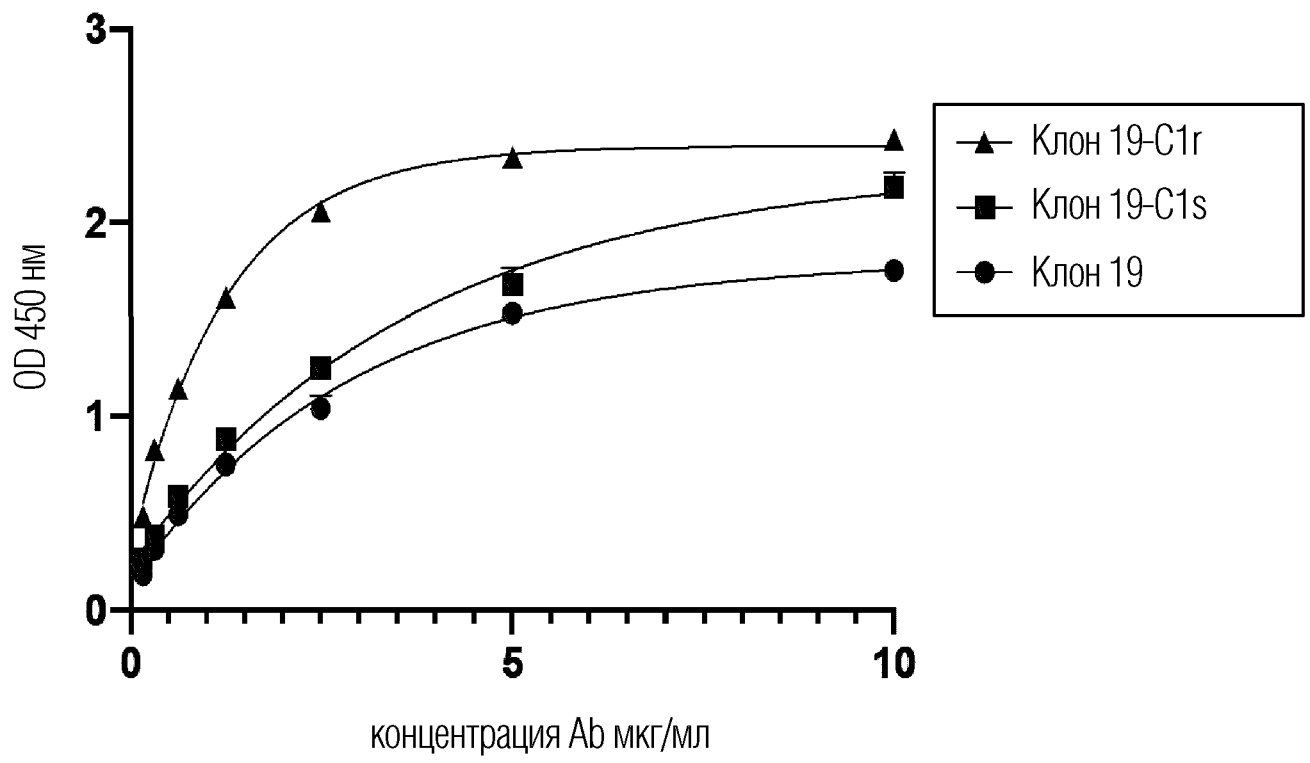
ФИГ. 20



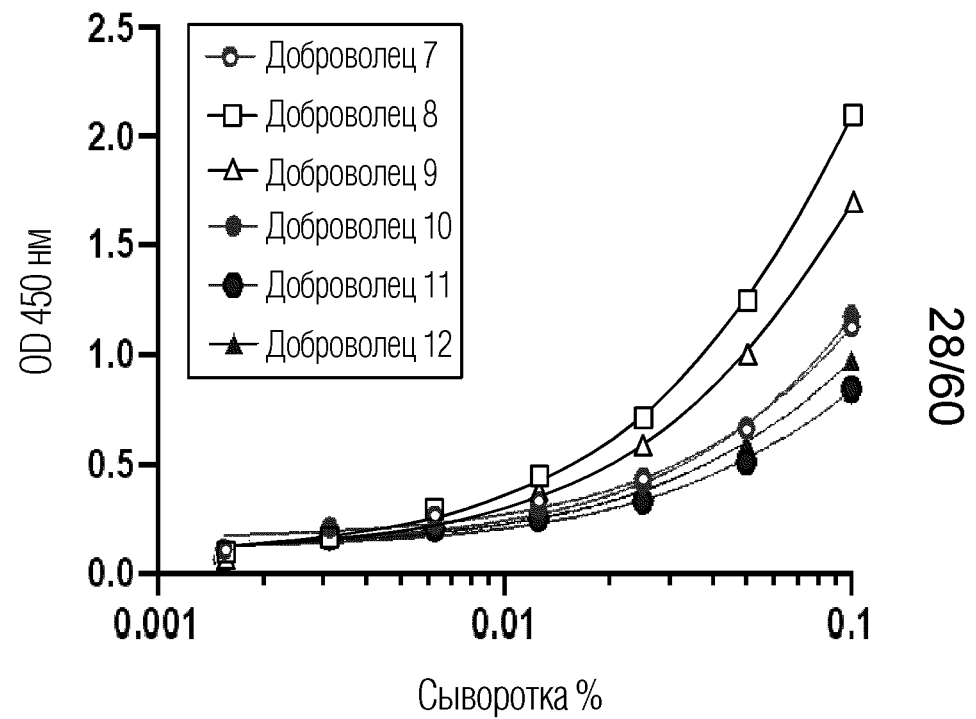
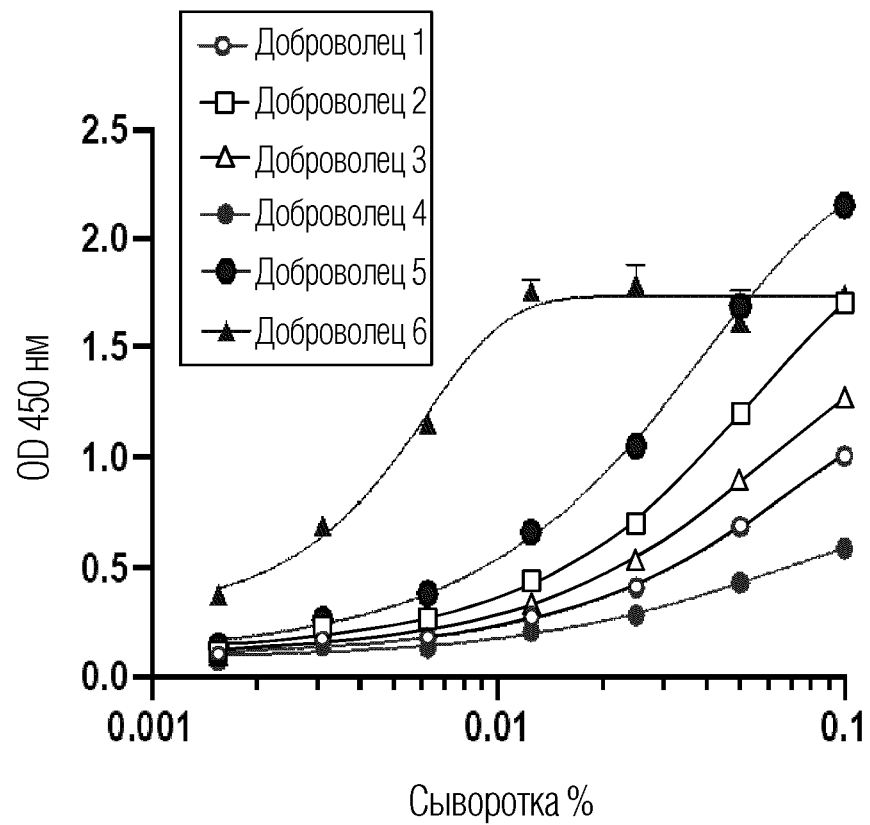
ФИГ. 21



ФИГ. 22

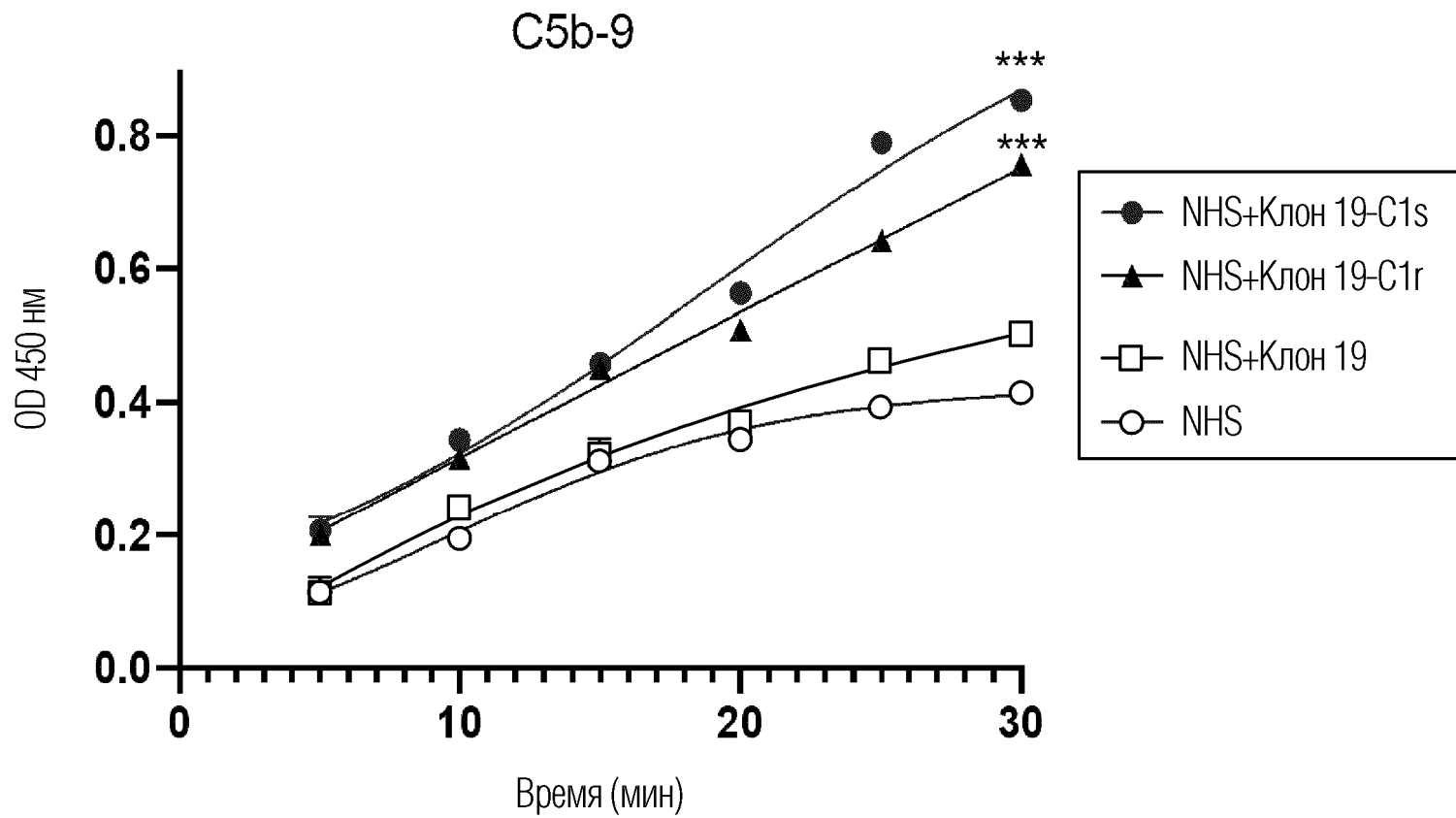


ФИГ. 23

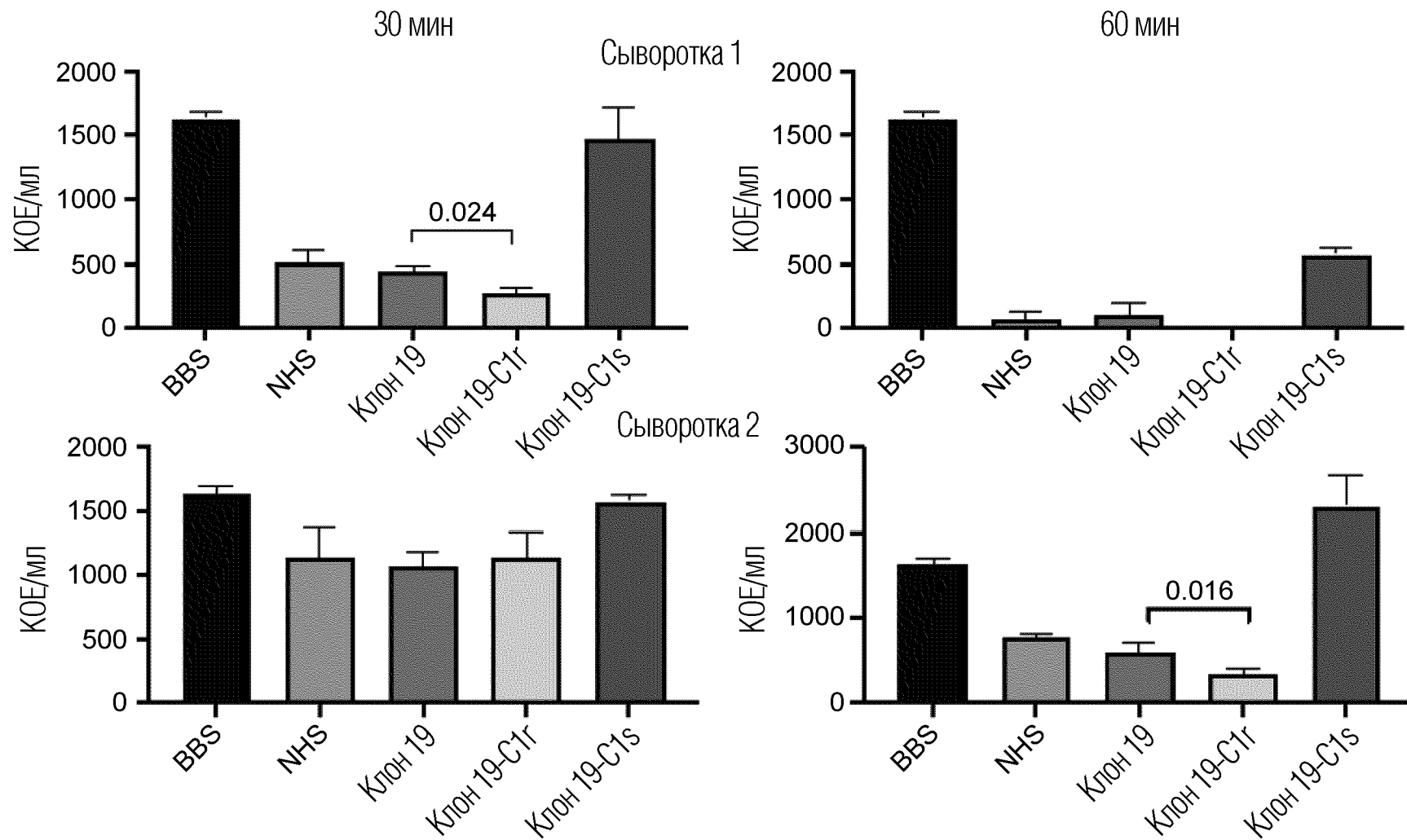


ФИГ. 24

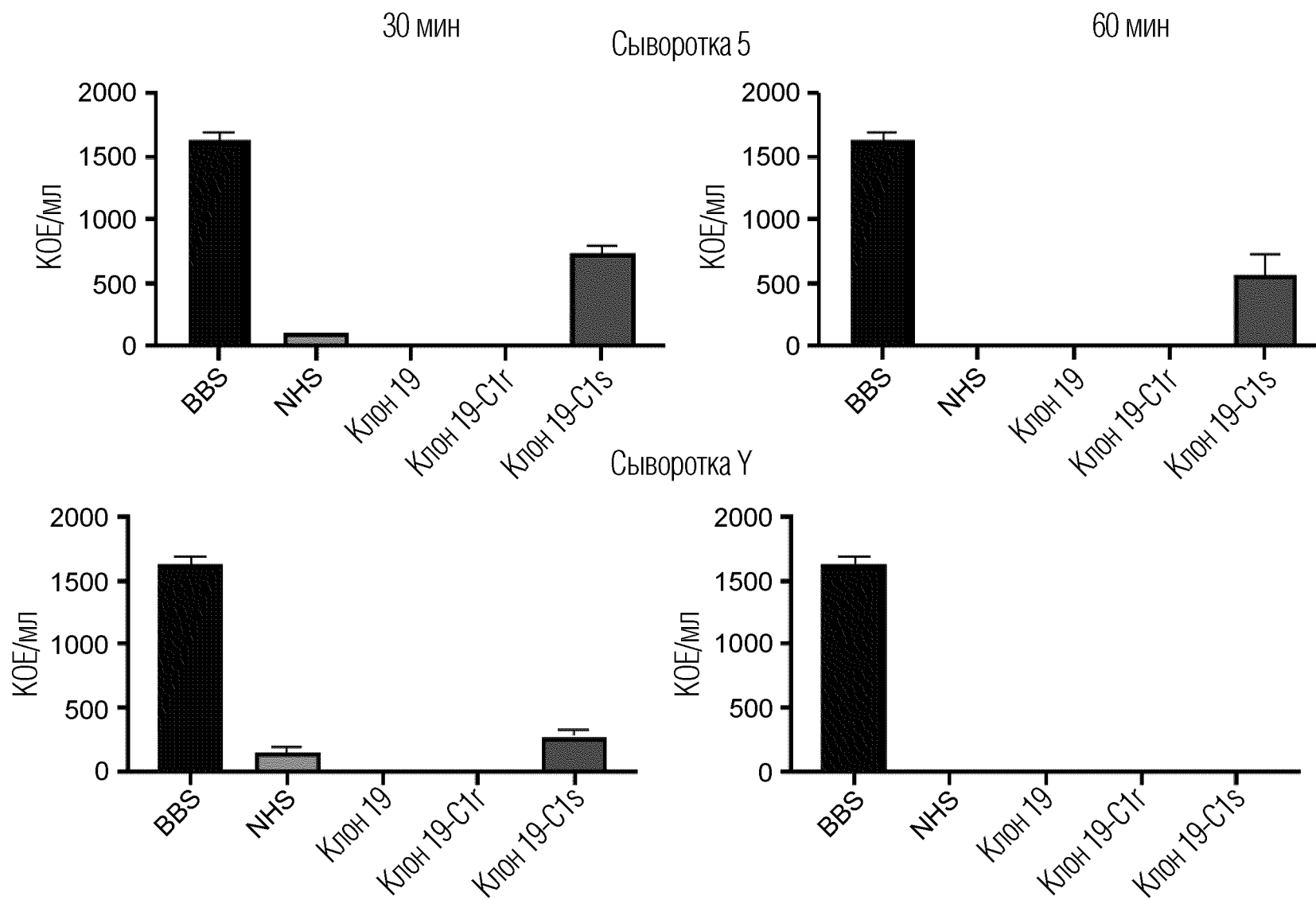
28/60



ФИГ. 25

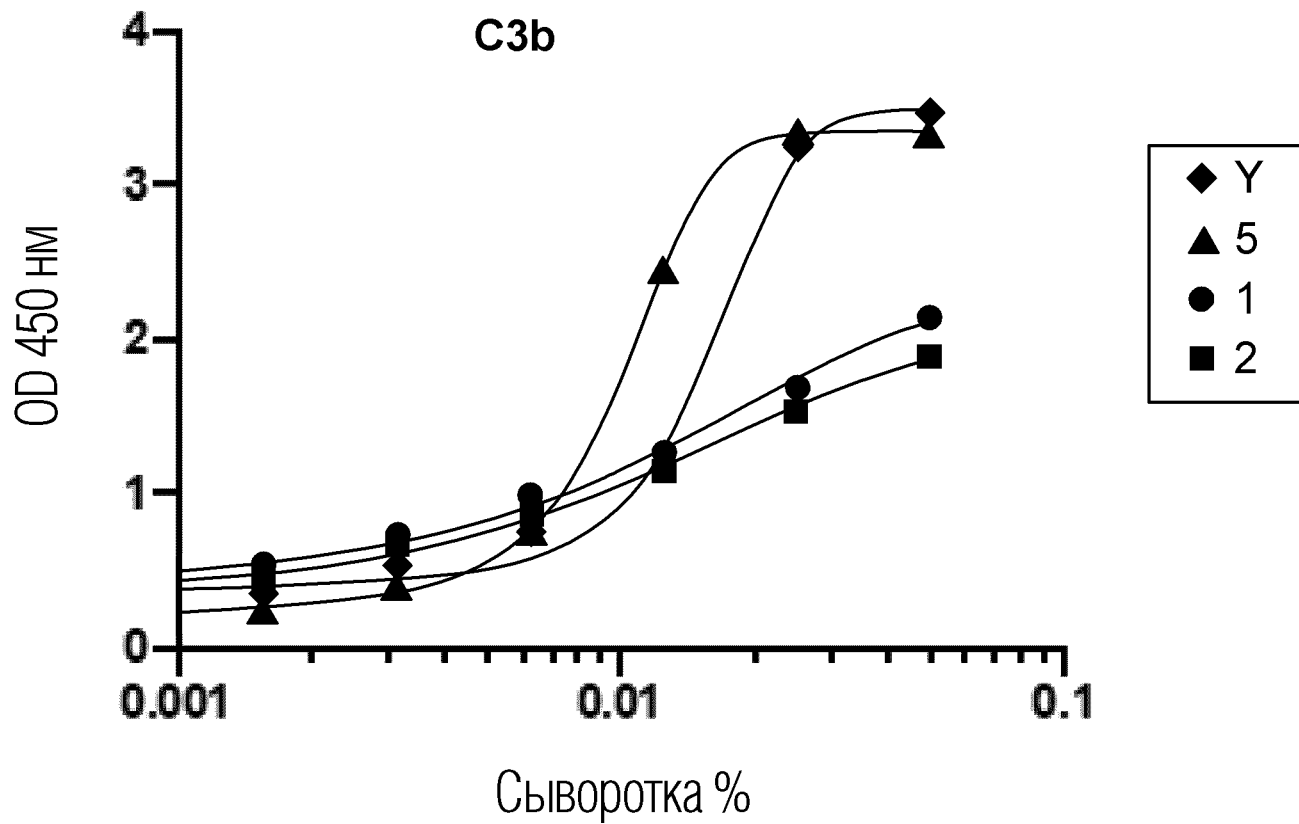


ФИГ. 26А

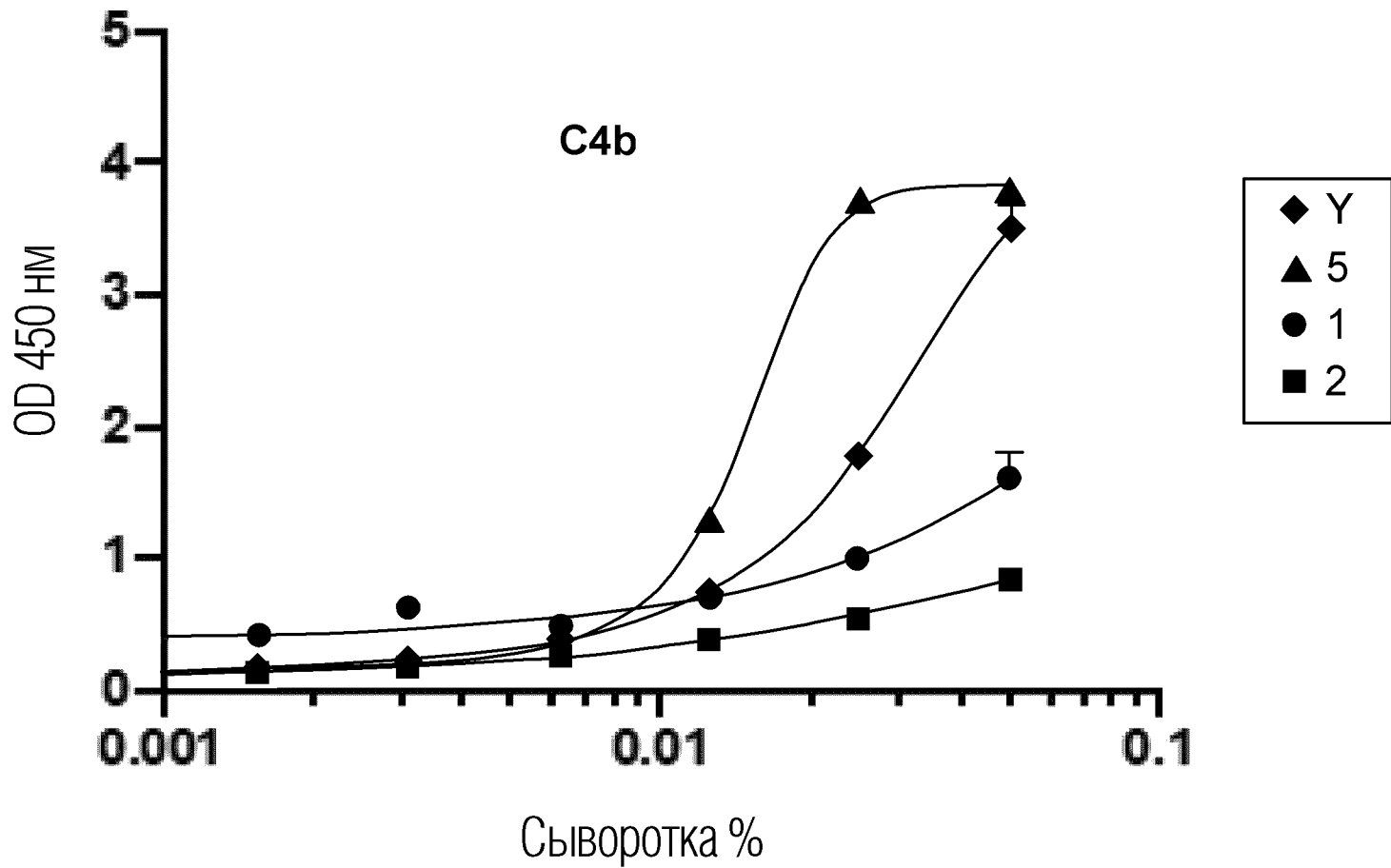


ФИГ. 26В

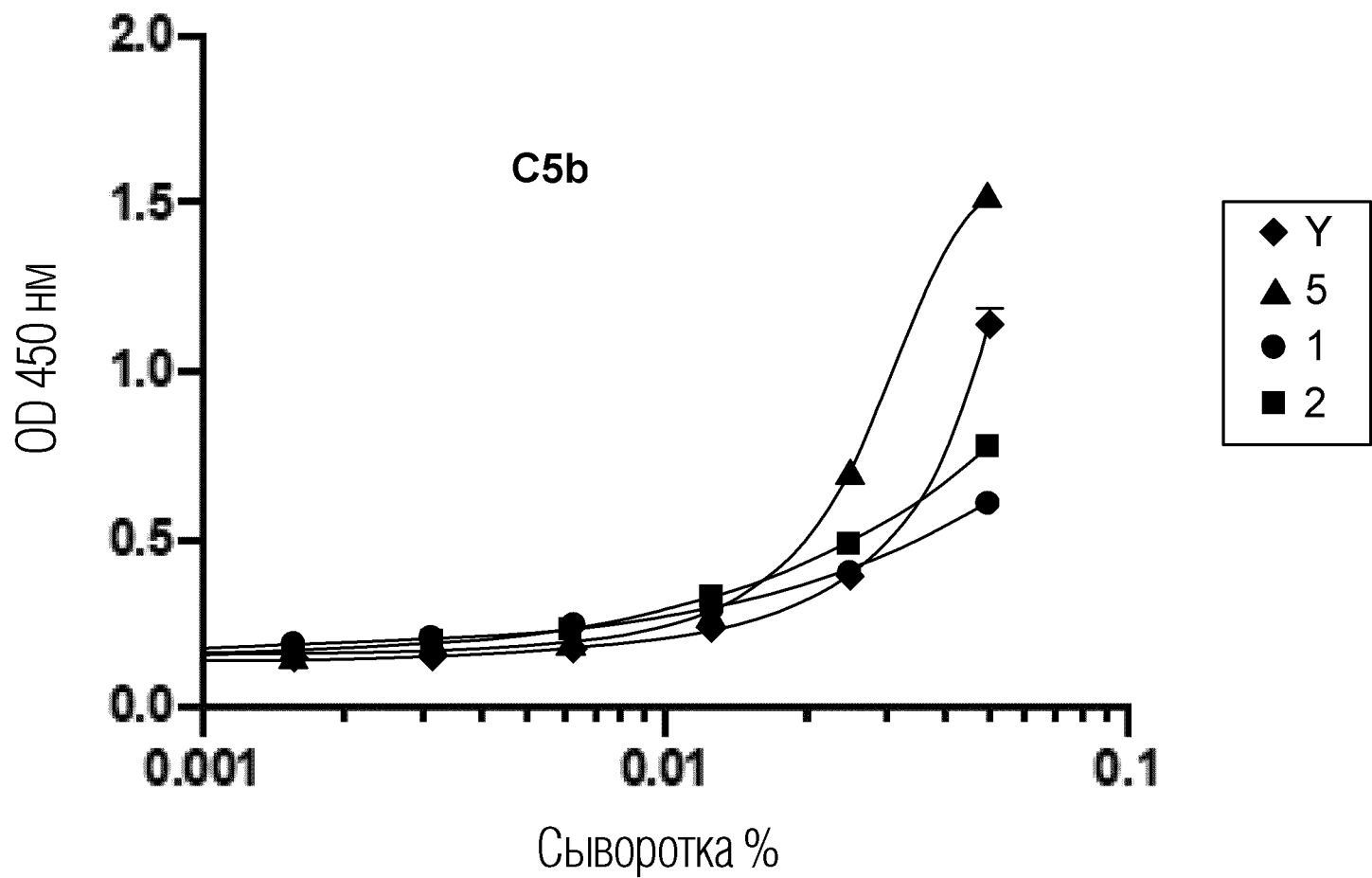




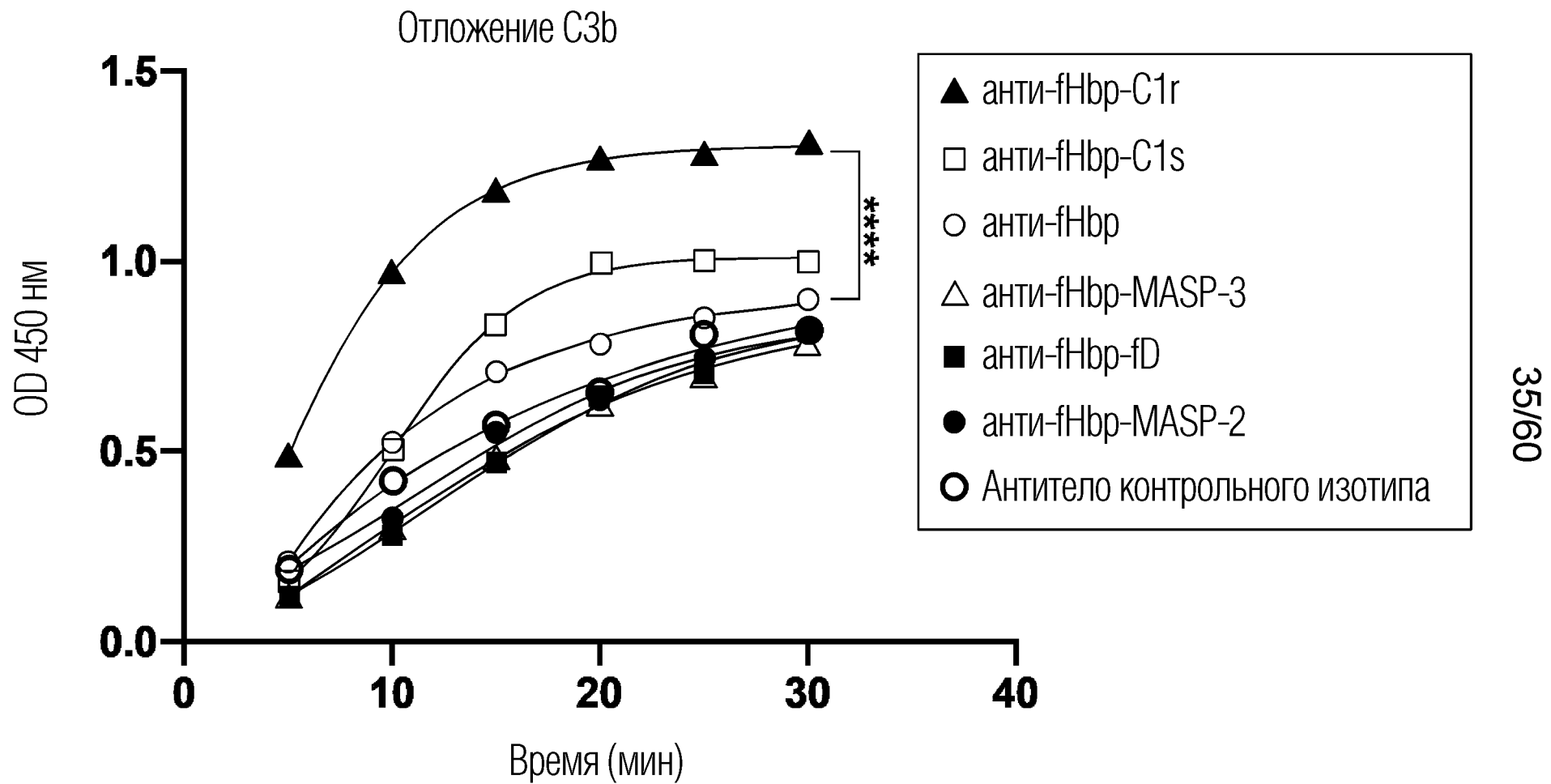
ФИГ. 27А



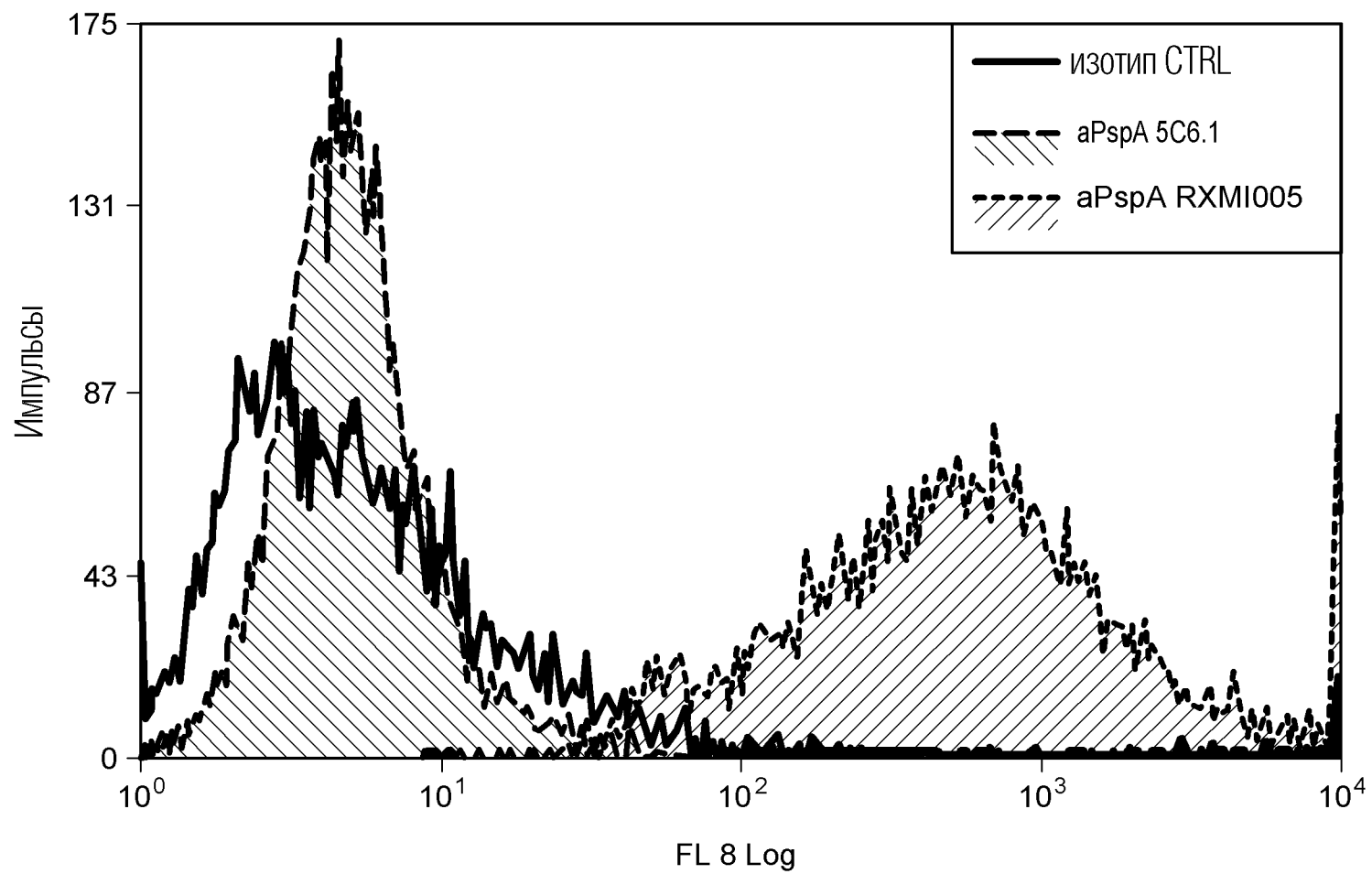
ФИГ. 27В



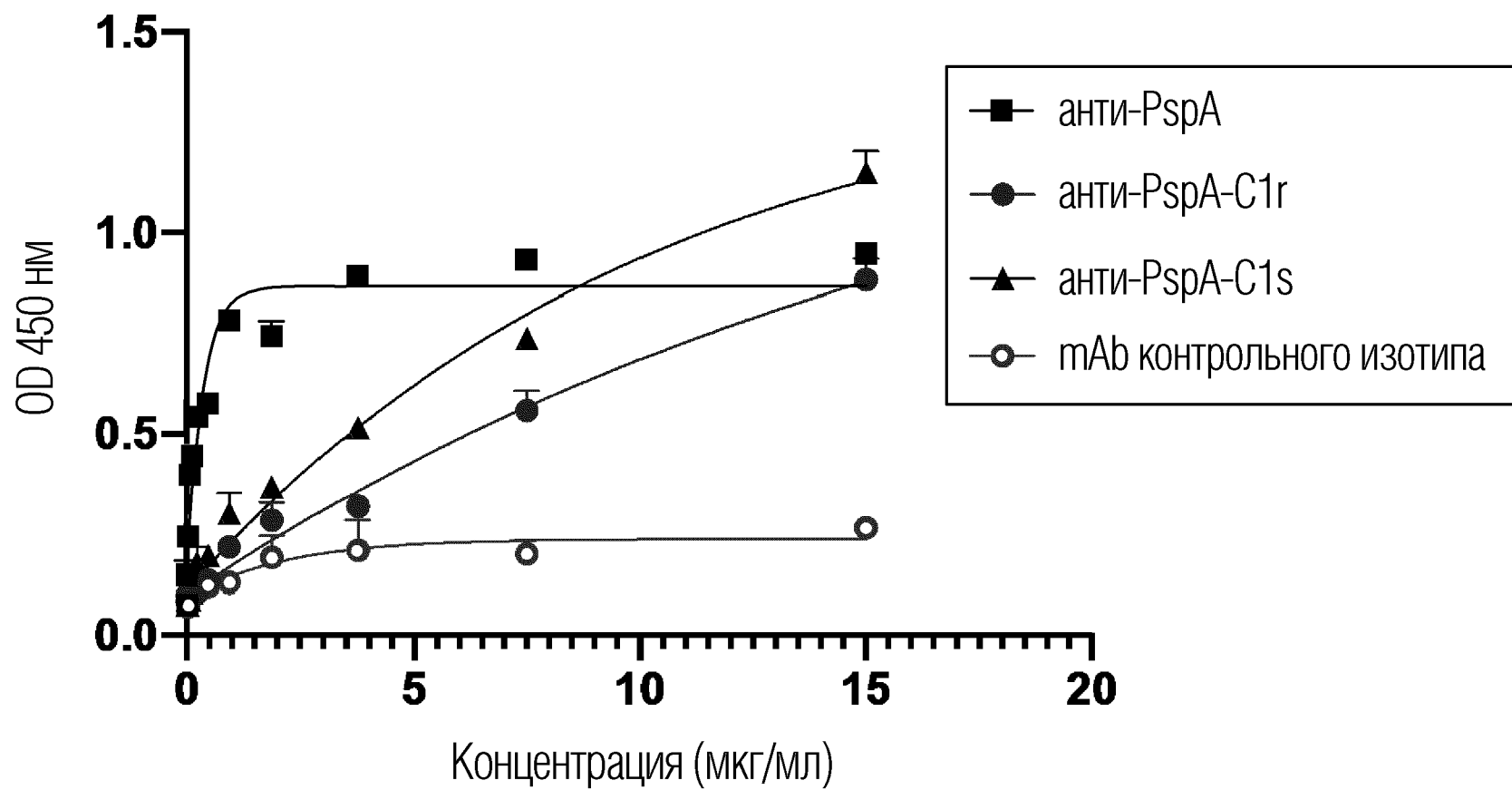
ФИГ. 27С



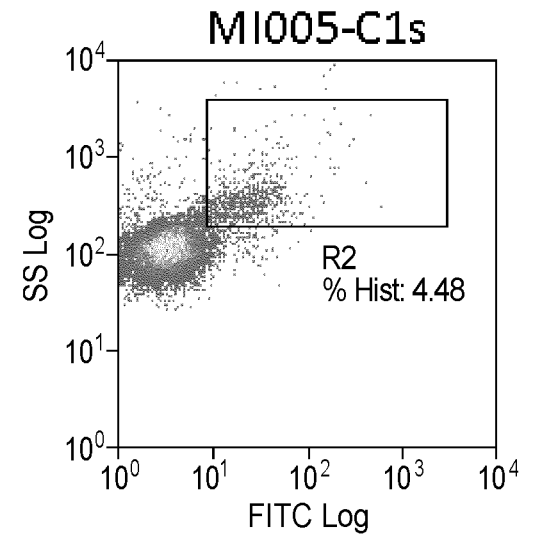
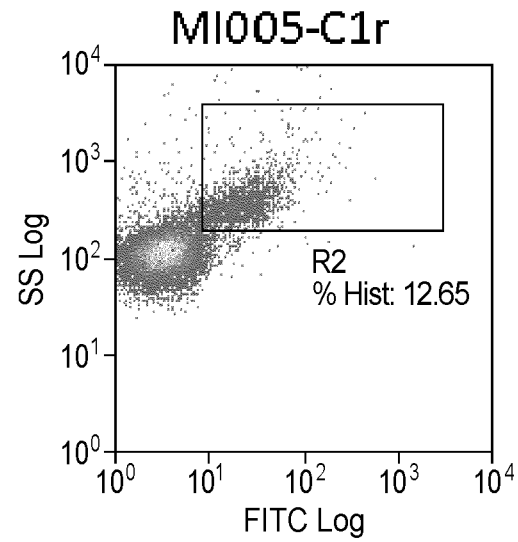
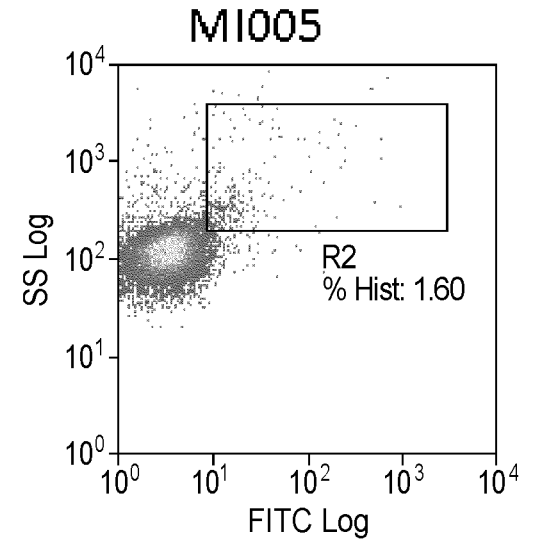
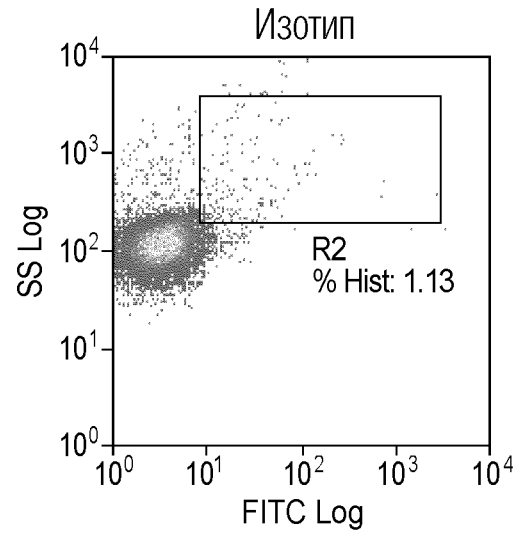
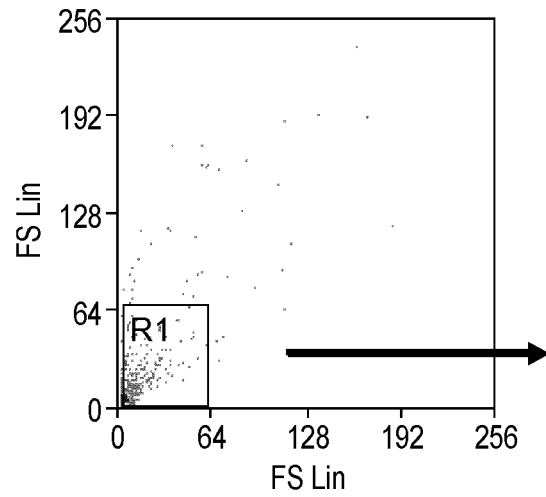
ФИГ. 28



ФИГ. 29

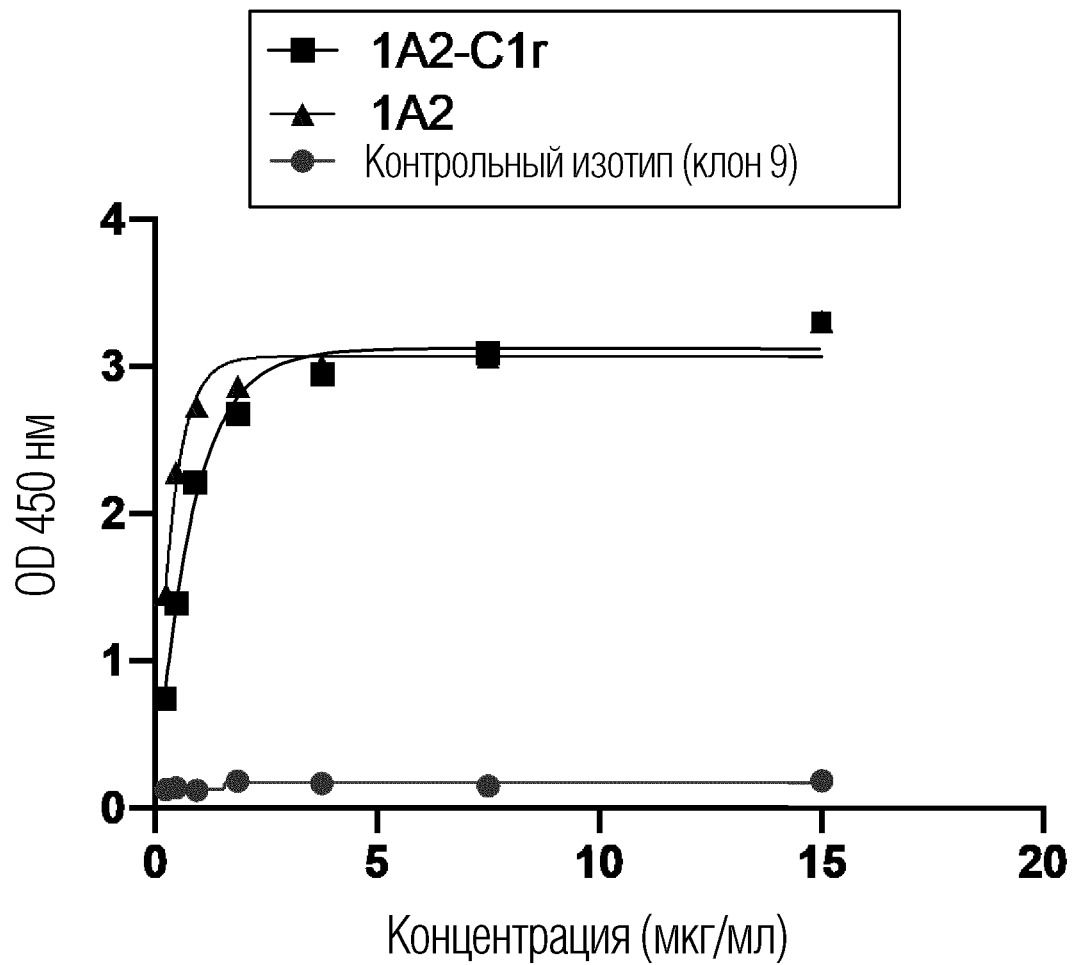


ФИГ. 30



38/60

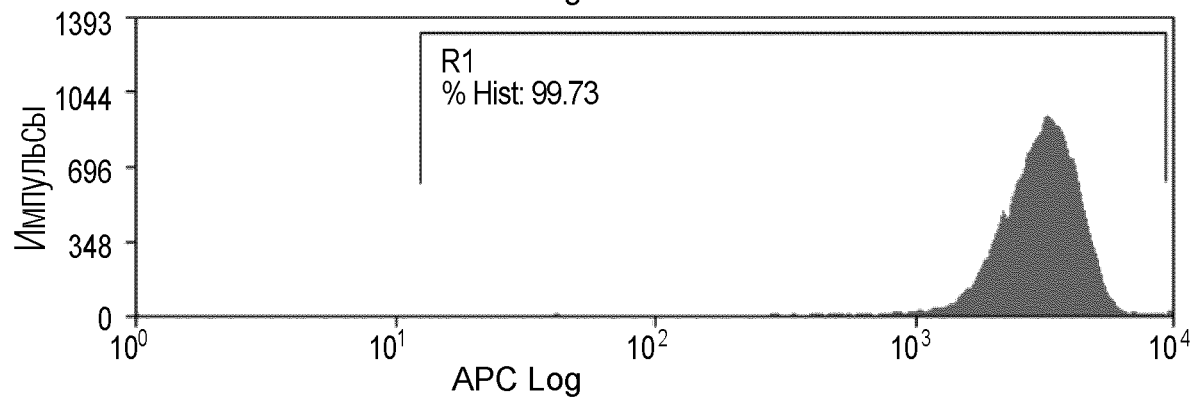
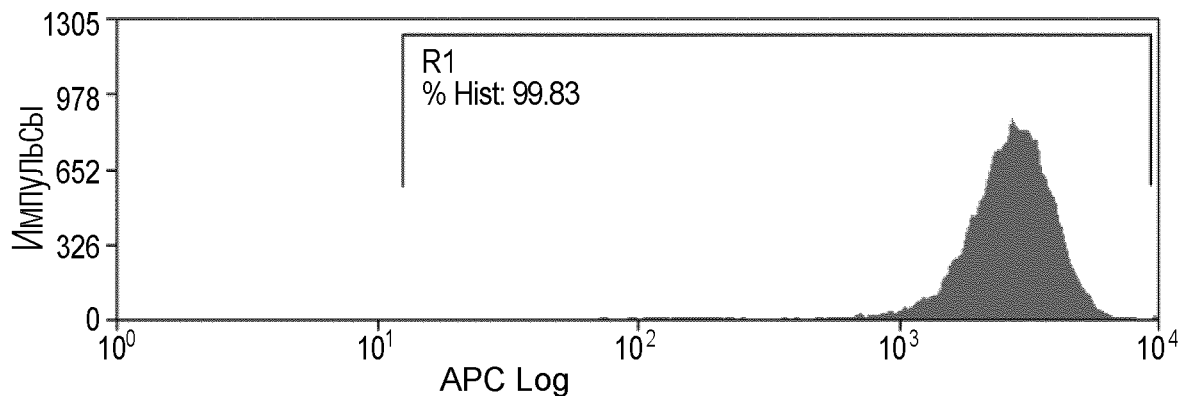
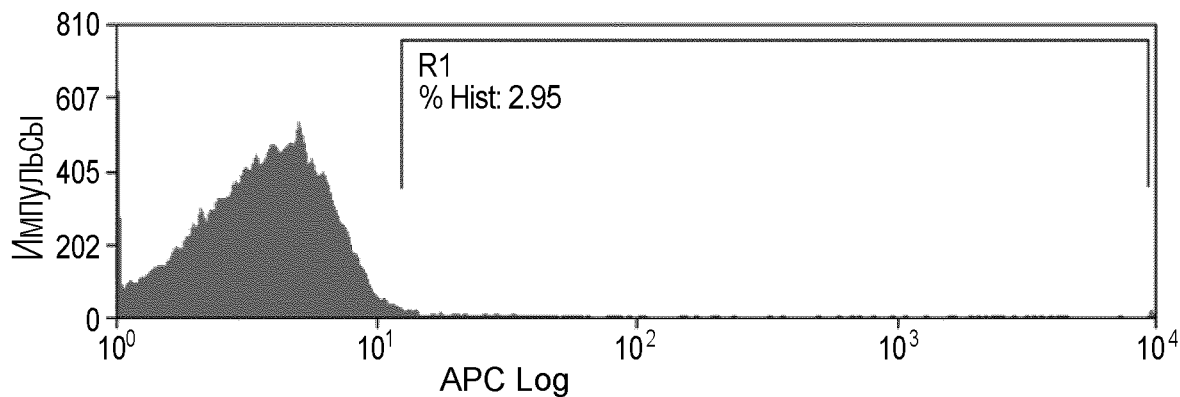
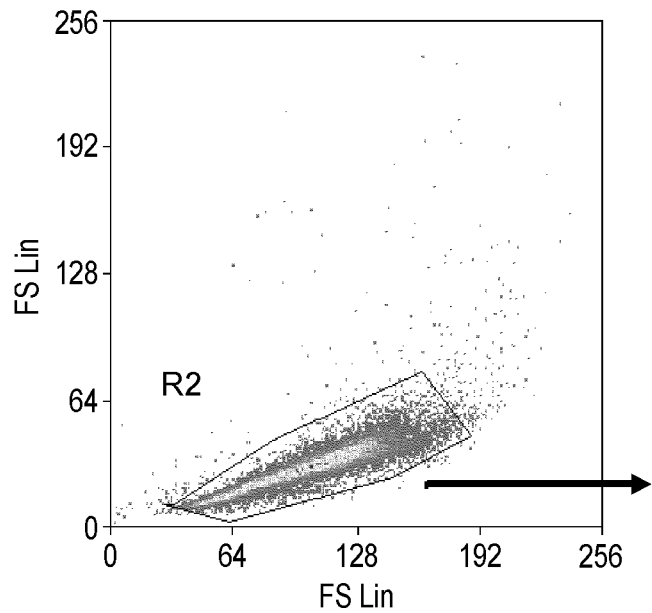
ФИГ. 31



39/60

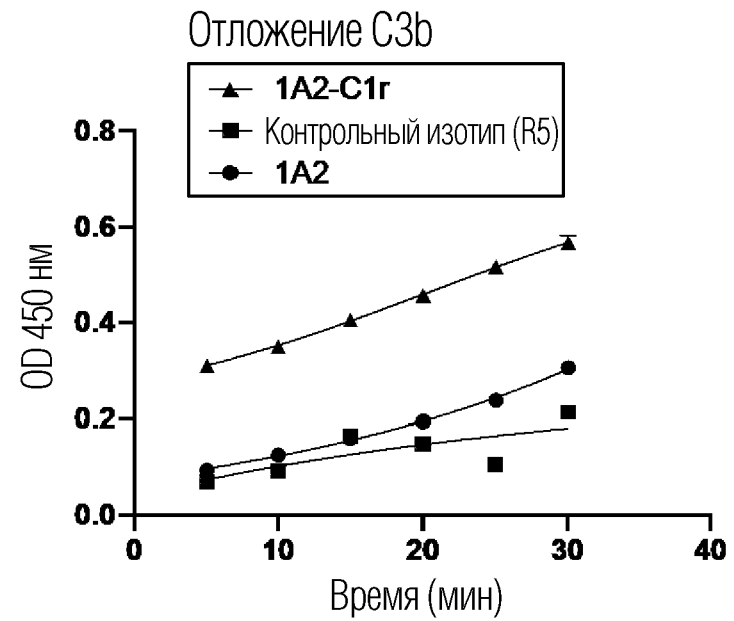
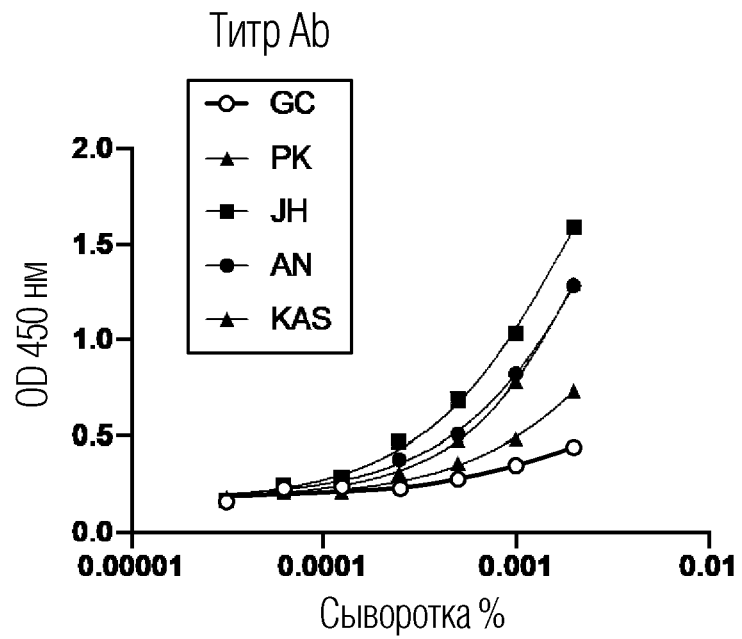
ФИГ. 32



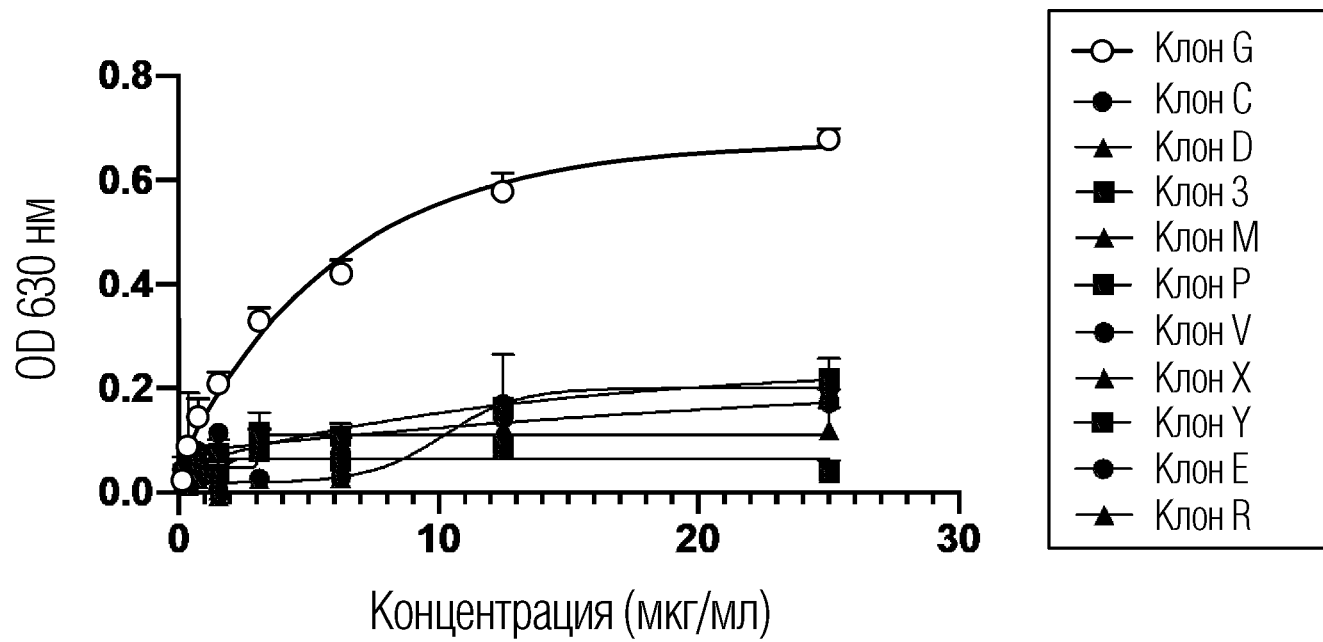


40/60

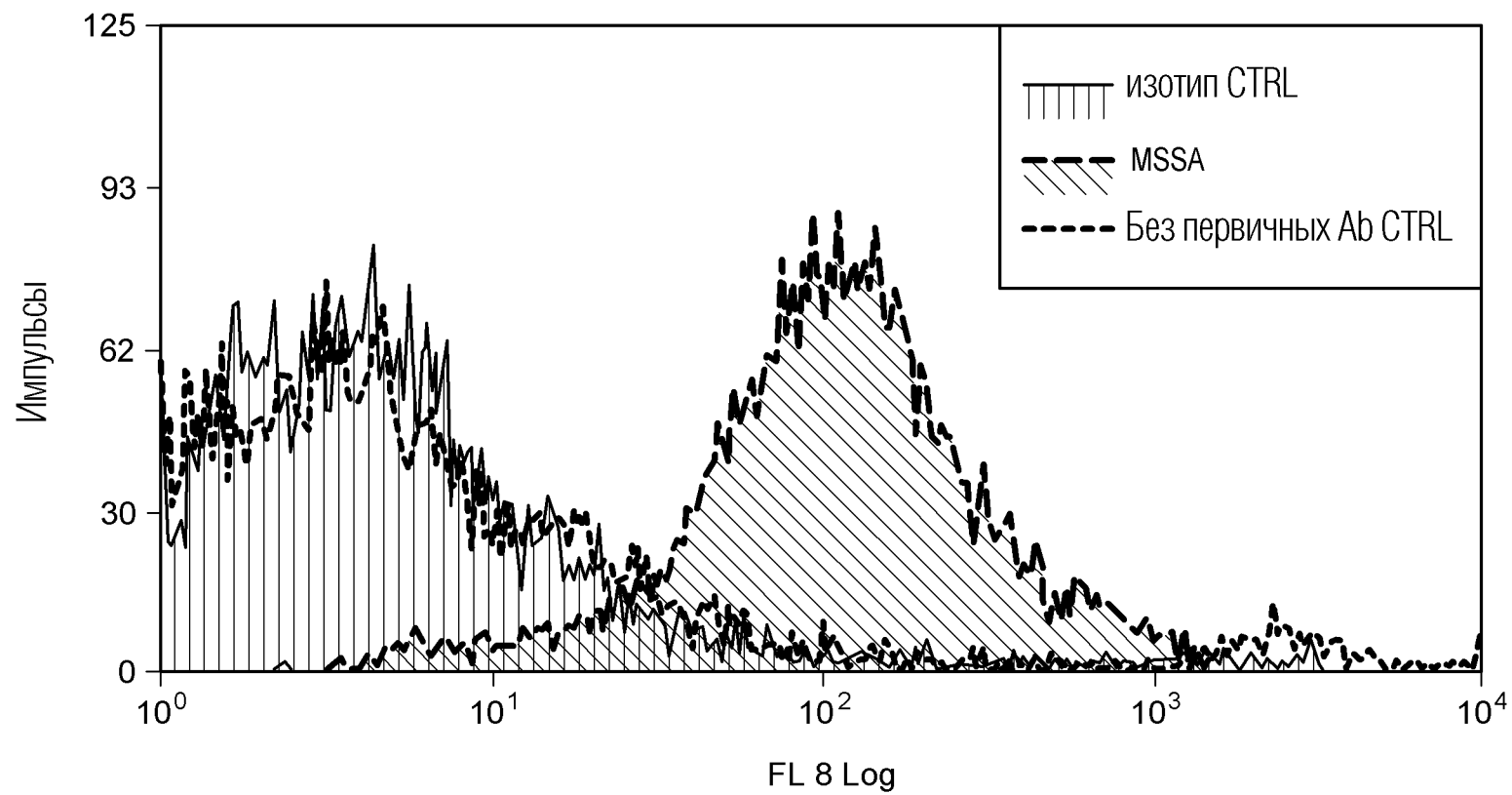
ФИГ. 33



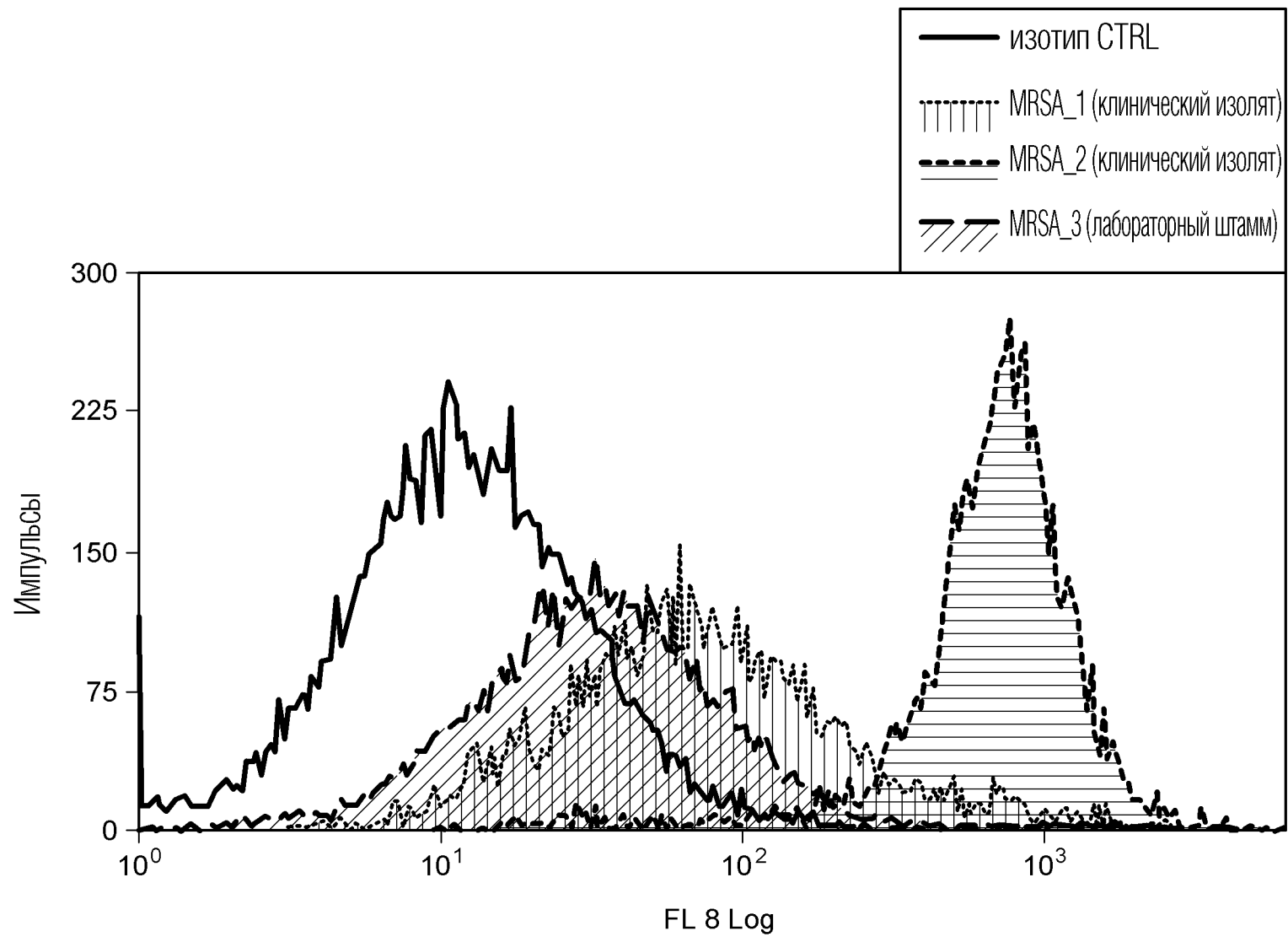
ФИГ. 34



ФИГ. 35

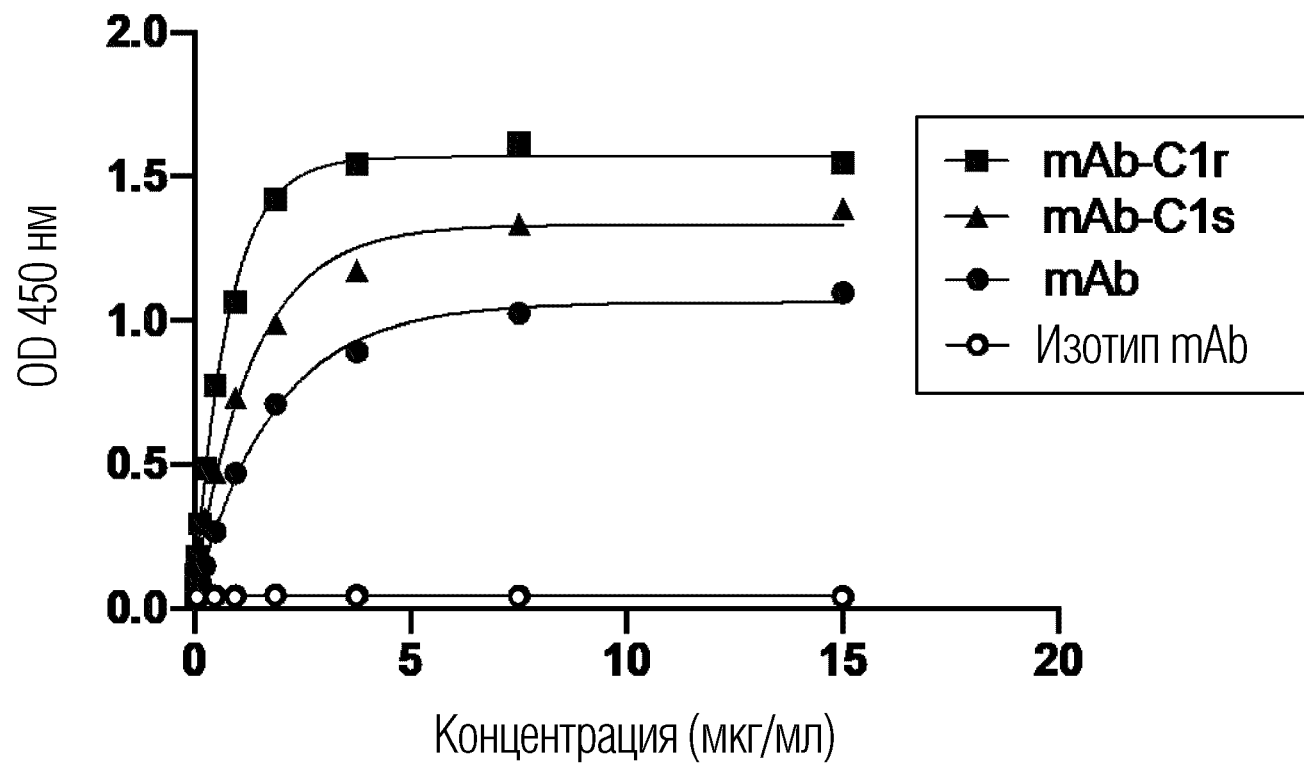


ФИГ. 36

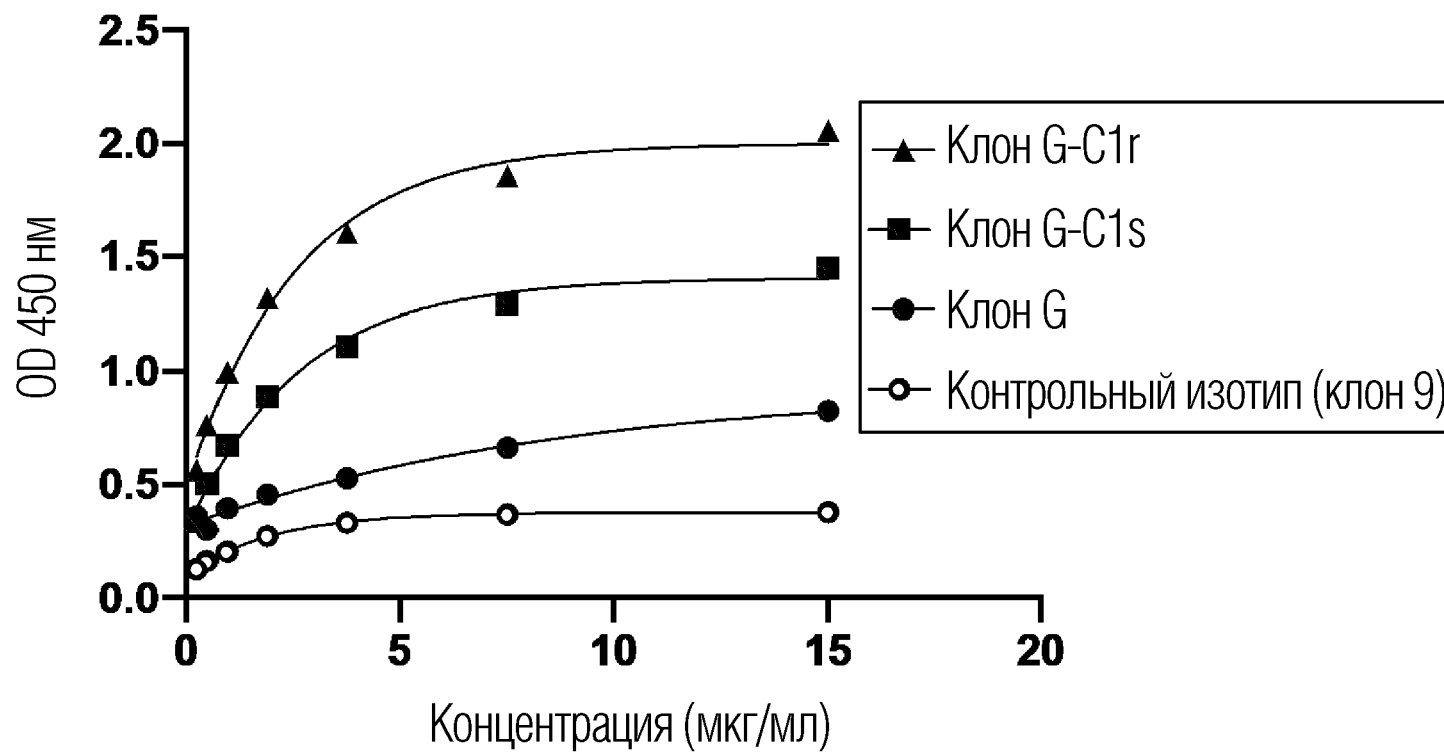


44/60

ФИГ. 37

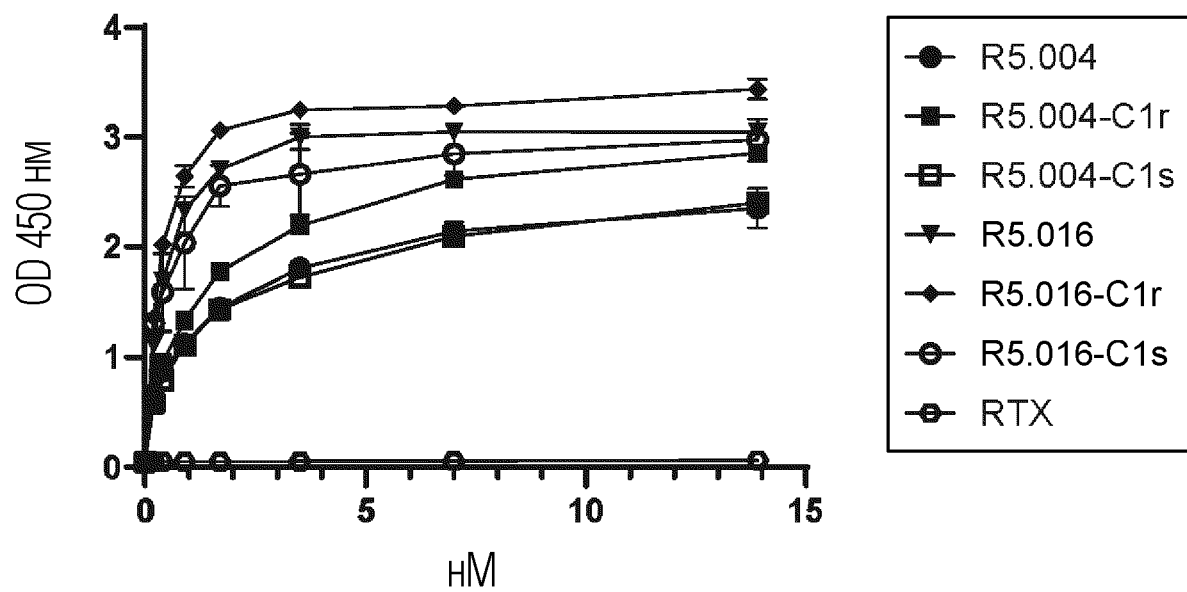


ФИГ. 38А



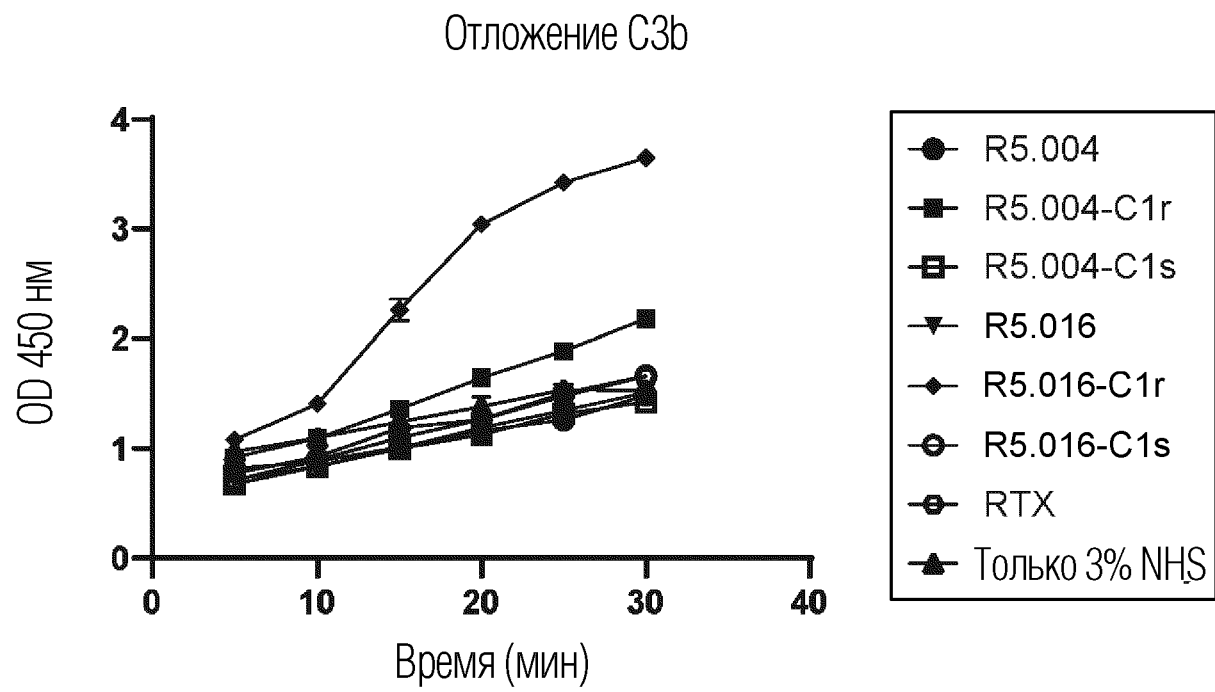
46/60

ФИГ. 38В

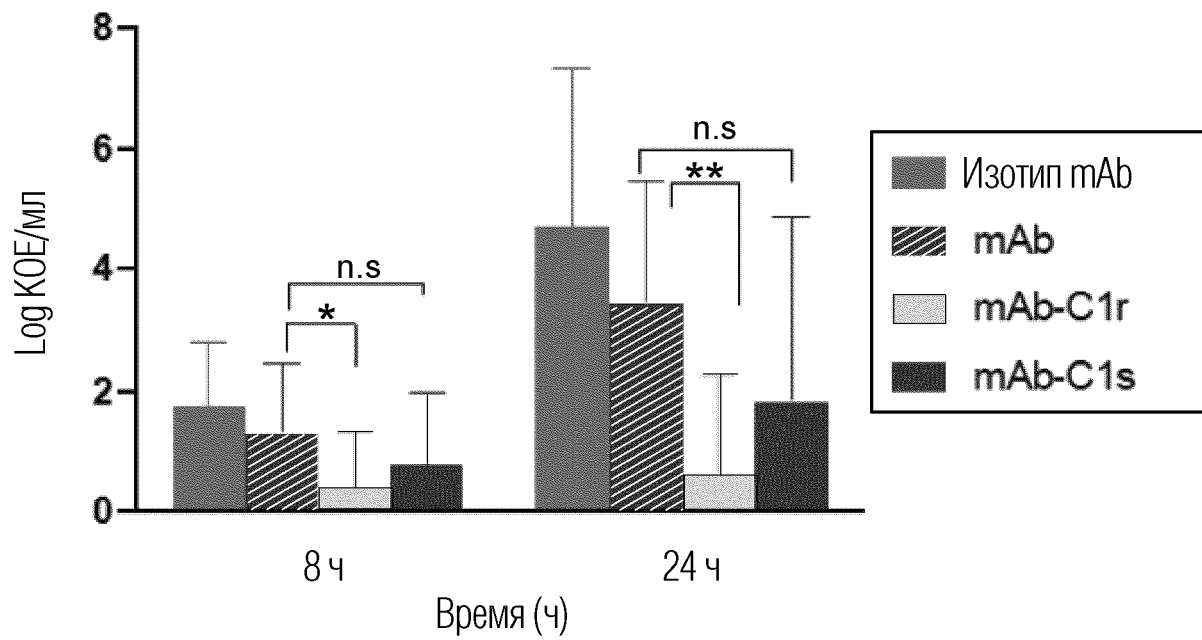


ФИГ. 39

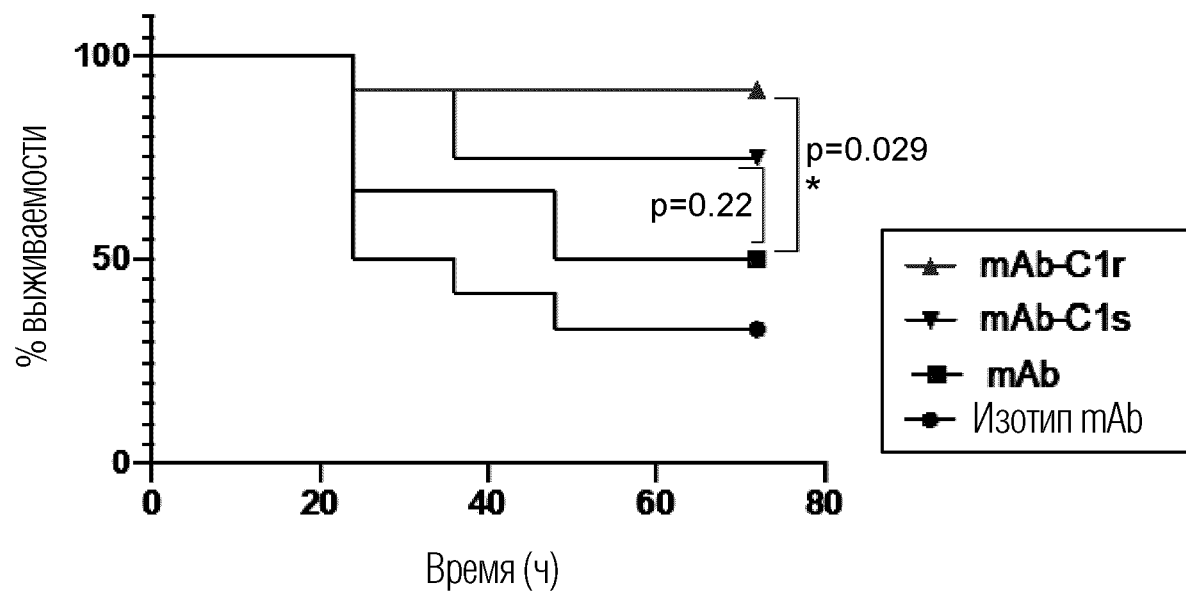




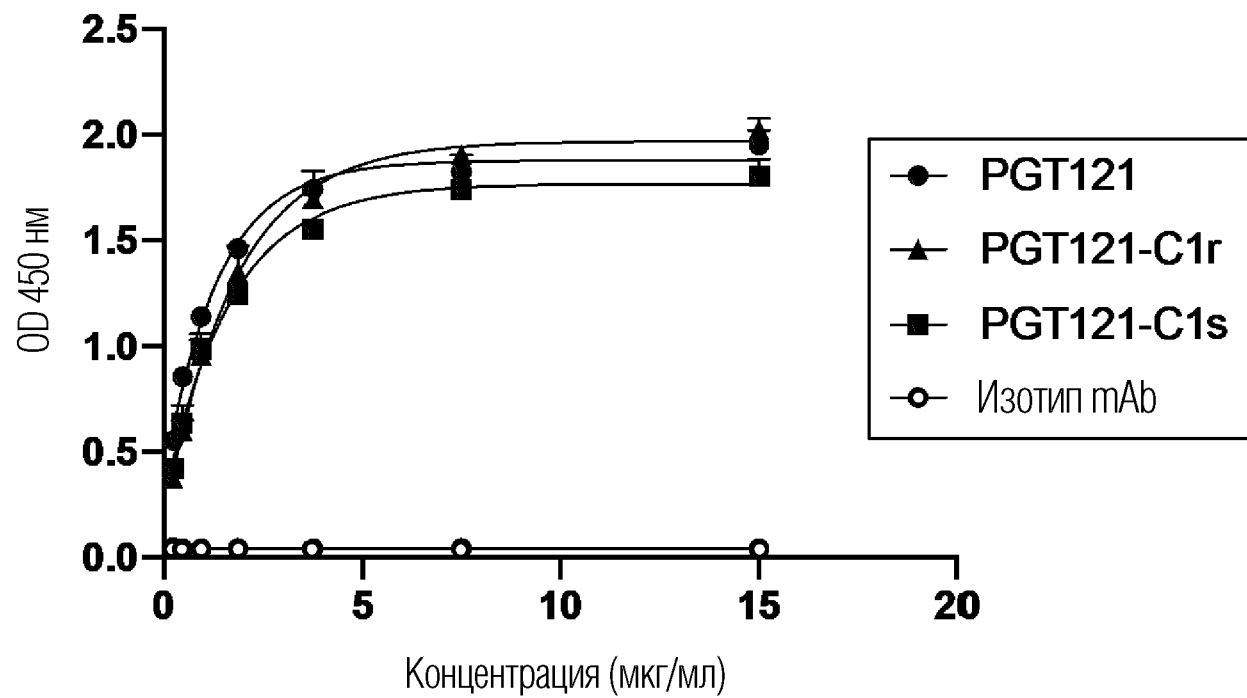
ФИГ. 40



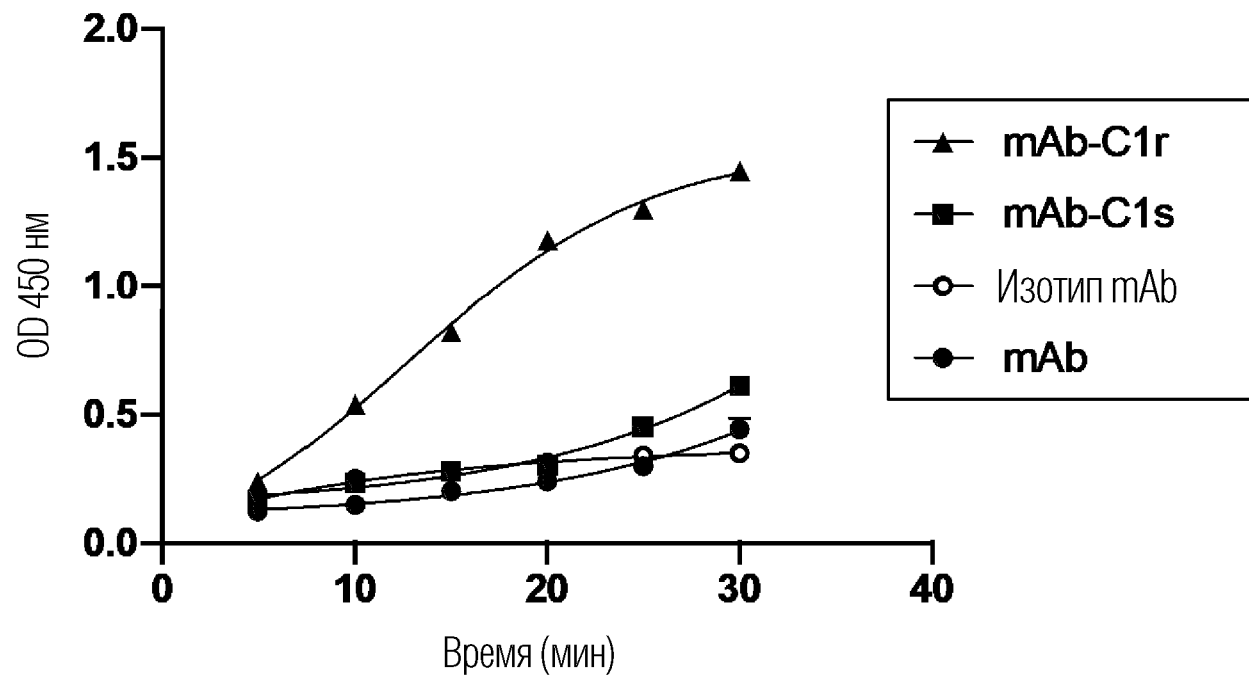
ФИГ. 41



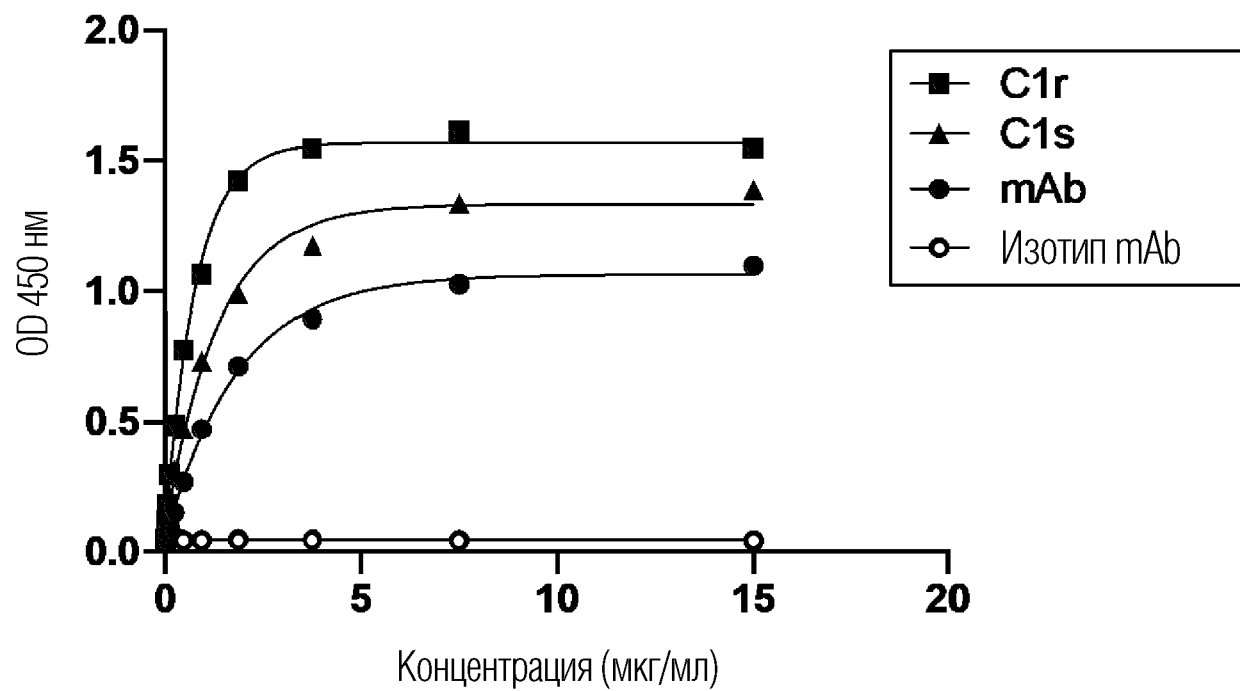
ФИГ. 42



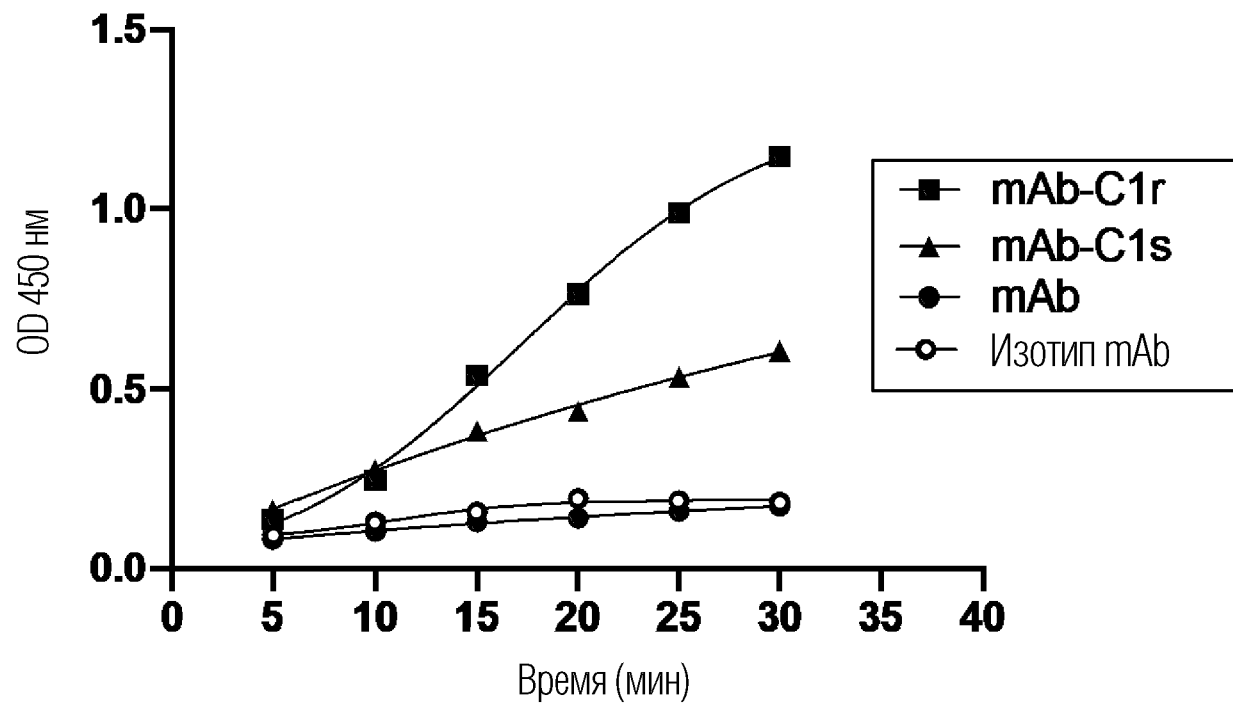
ФИГ. 43



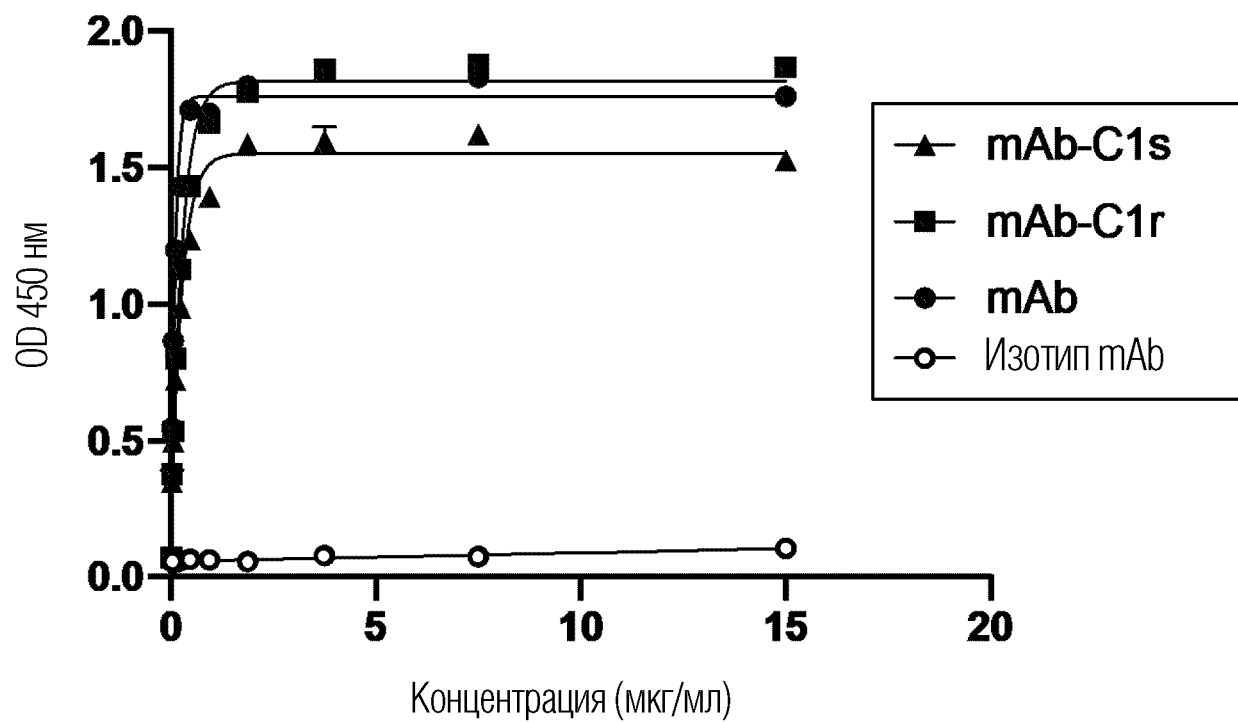
ФИГ. 44



ФИГ. 45

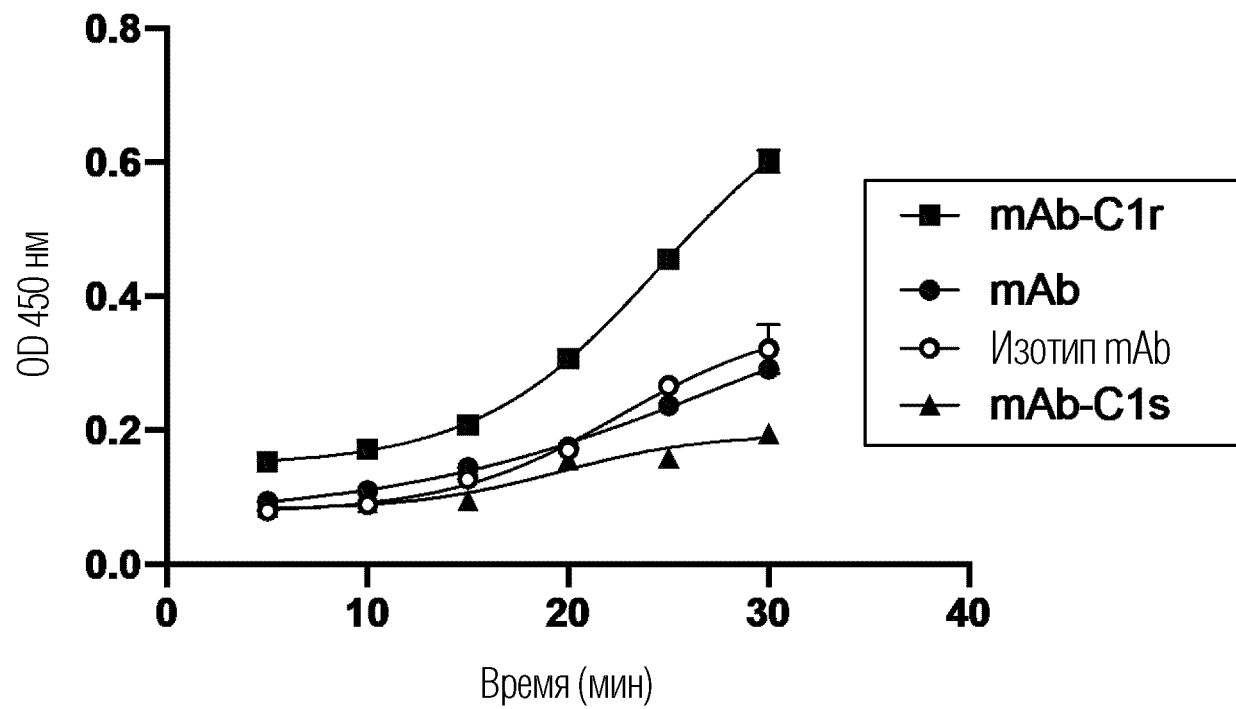


ФИГ. 46

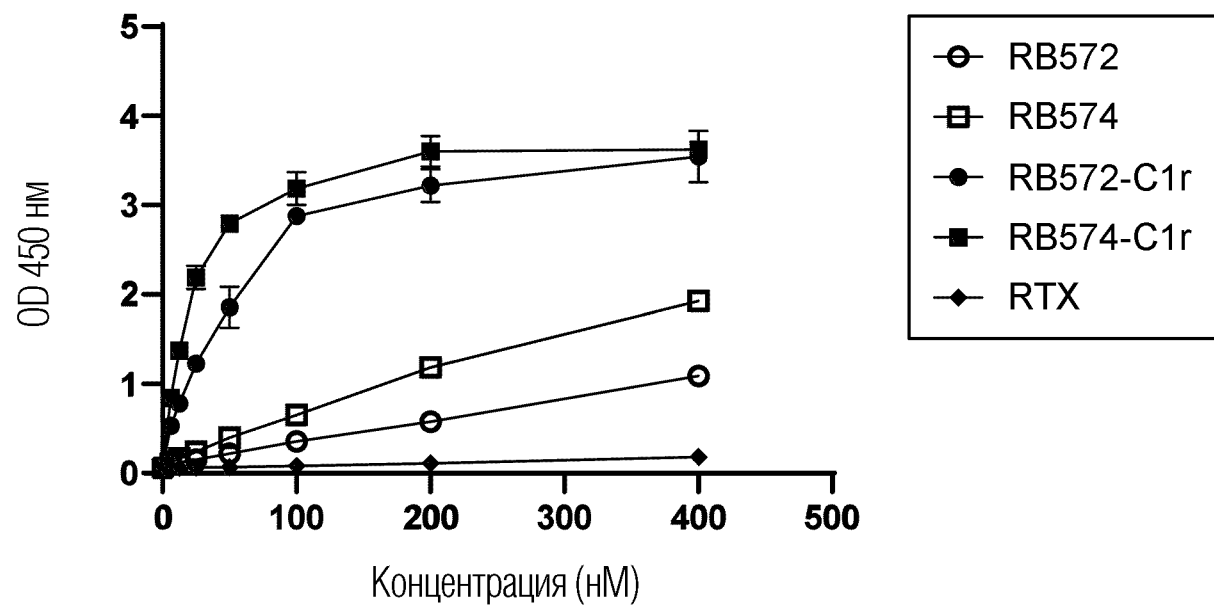


ФИГ. 47

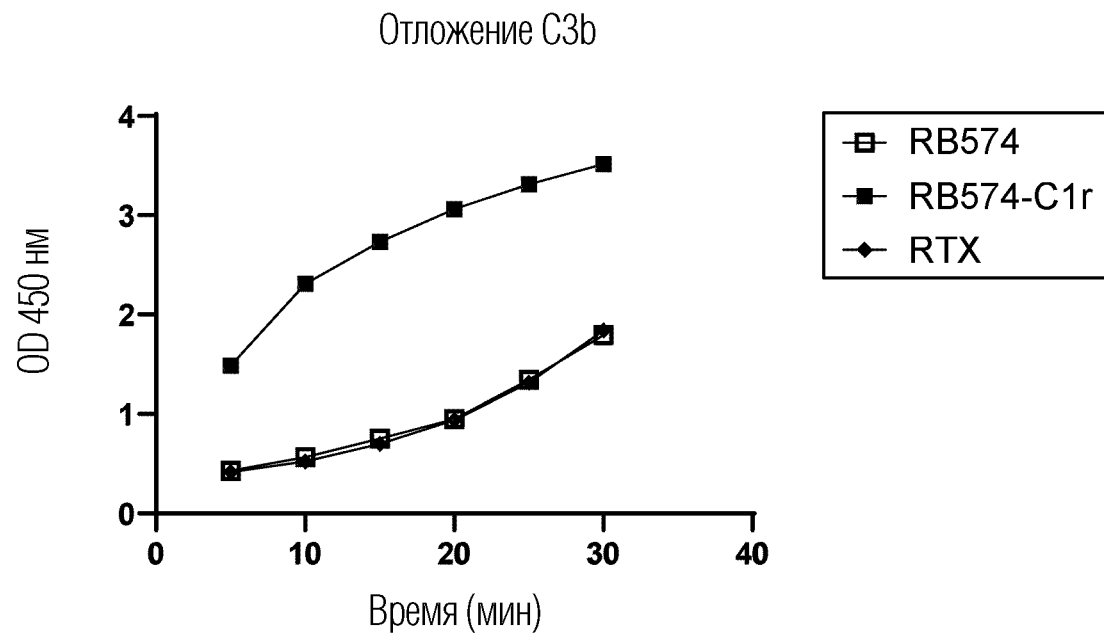




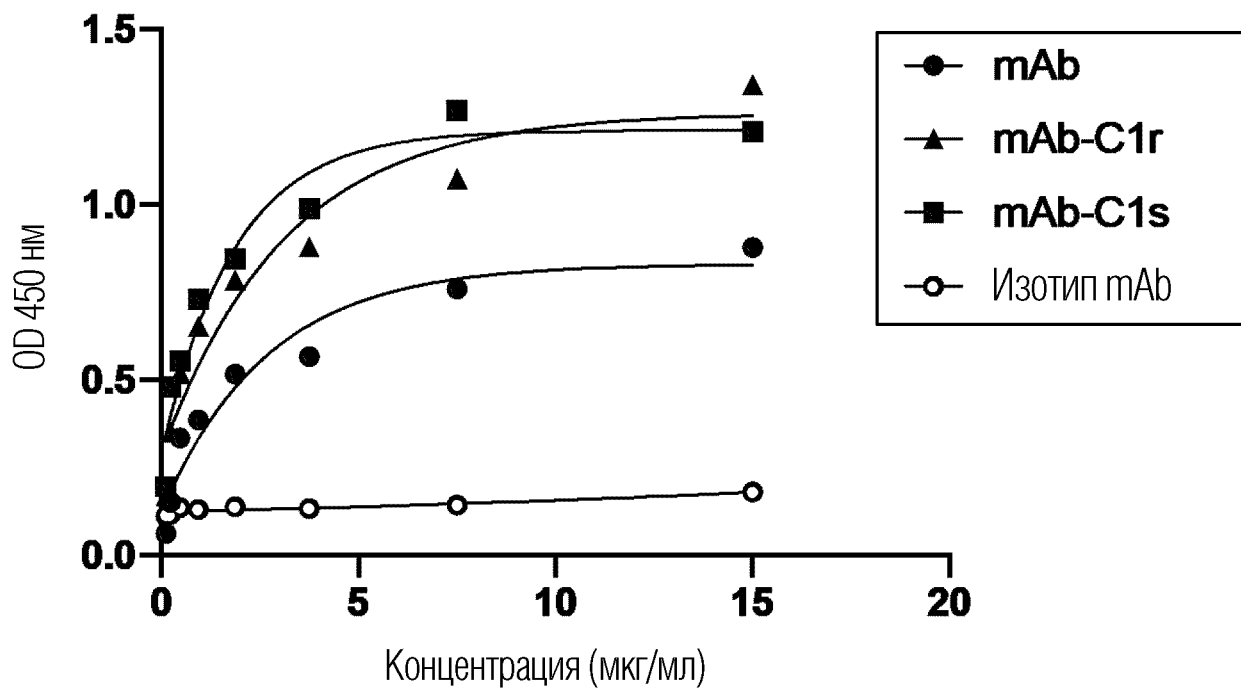
ФИГ. 48



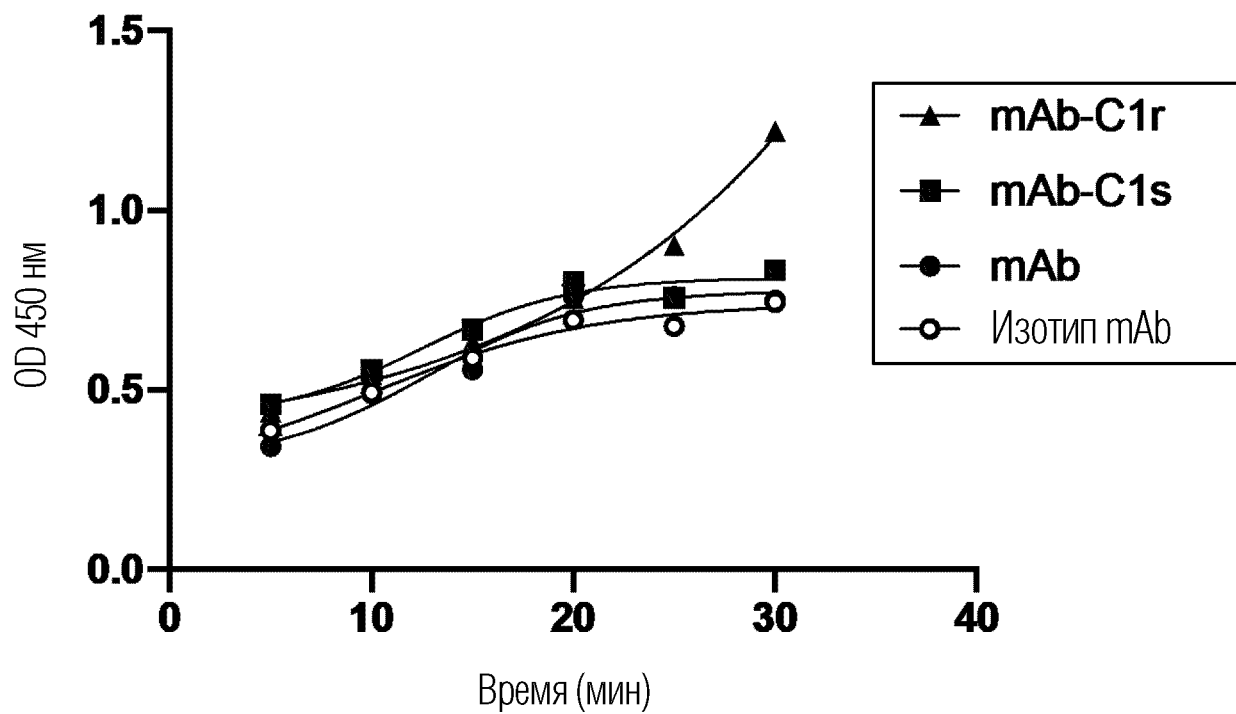
ФИГ. 49



ФИГ. 50



ФИГ. 51



ФИГ. 52