(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108341868 B
(45)授权公告日 2022.06.07

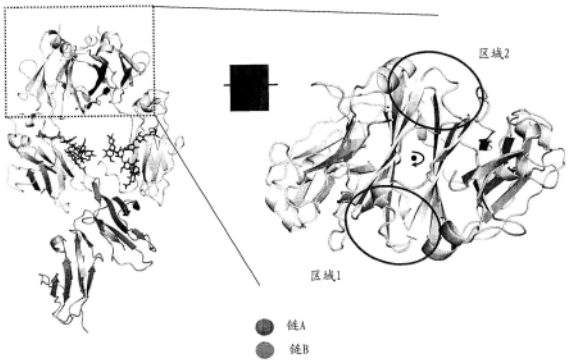
(21)申请号 201810134850.9
(22)申请日 2011.11.04
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108341868 A
(43)申请公布日 2018.07.31
(30)优先权数据
61/410,746 2010.11.05 US
61/425,375 2010.12.21 US
61/439,341 2011.02.03 US
61/475,614 2011.04.14 US
61/491,846 2011.05.31 US
61/497,861 2011.06.16 US
(62)分案原申请数据
201180064119.X 2011.11.04
(73)专利权人 酵活有限公司
地址 加拿大不列颠哥伦比亚省
(72)发明人 E·E·卡雷拉
T·S·冯克罗伊登施泰因
S·B·迪克西特 P·I·拉里奥
D·K·Y·潘 I·E·P·德安吉洛
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 侯宝光
(51)Int.Cl.
C07K 16/00(2006.01)
C07K 16/32(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
(56)对比文件
CN 103429620 B,2013.12.04
CN 1176659 A,1998.03.18
WO 2009089004 A1,2009.07.16
Kannan Gunasekaran等.Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG.《Journal of Biological Chemistry》.2010,第285卷(第25期),19637-19646.
Merchant AM等.An efficient route to human bispecific IgG.《Nature Biotechnology》.1998,第16卷(第7期),677-681.
(续)
审查员 周韵品
权利要求书2页 说明书81页
序列表9页 附图86页

(54)发明名称

在Fc结构域中具有突变的稳定异源二聚的抗体设计

(57)摘要

提供的支架具有在各个结构域(例如CH2和CH3)不对称的重链,来实现超越用天然同源二聚体(对称)Fc分子的参与调节效应功能的各种Fc受体之间的选择性,和获得的变体Fc同源二聚体的增加的稳定性和纯度。这些新分子包含设计用于改变抗体起作用和其在治疗剂中找到用途的天然方式的异质组分的复合物。



CN 108341868 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Davis Jonathan H等.SEEDbodies: fusion proteins based on strand-exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies.《Protein engineering, design & selection》.2010,第23卷(第4期),195-202.

Atwell S等.Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library.《Journal of molecular biology》.1997,第270卷26-35.

Ridgway JB等.‘Knobs-into-holes″ engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization.《Protein engineering》.1996,第9卷(第7期),617-621.

1.分离的异源多聚体，其包含异源二聚体Fc区，其中所述异源二聚体Fc区包含含有促进形成异源二聚体Fc区的氨基酸突变的变体CH3结构域，并且所述变体CH3结构域具有70℃或更高的熔解温度(Tm)，其中所述异源二聚体Fc

a)相对于对应的野生型Fc区在所述变体CH3结构域中不包含额外的二硫键，或

b)相对于对应的野生型Fc区在所述变体CH3结构域中包含额外的二硫键，条件是70℃或更高的熔解温度(Tm)是在额外的二硫键不存在的情况下，

其中所述变体CH3结构域包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，

其中：

所述异源二聚体Fc区具有大于95％的纯度，所述第一CH3结构域多肽包含F405和Y407位的氨基酸突变，且所述第二CH3结构域多肽包含T366和T394位的氨基酸突变，并且其中：

(a)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366I和T394W，且进一步包含氨基酸突变K392M；或

(b)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366L和T394W，且进一步包含氨基酸突变K392M；或

(c)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366I和T394W，且进一步包含氨基酸突变K392L；或

(d)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366L和T394W，且进一步包含氨基酸突变K392L；或

(e)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y和S400E，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366I和T394W，且进一步包含氨基酸突变N390R和K392M；或

(f)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y和S400E，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366L和T394W，且进一步包含氨基酸突变N390R和K392M；或

(g)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y和S400E，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366I和T394W，且进一步包含氨基酸突变N390R和K392L；或

(h)所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸突变F405A和Y407V，且进一步包含氨基酸突变L351Y和S400E，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸突变T366L和T394W，且进一步包含氨基酸突变N390R和K392L；

其中所述异源二聚体Fc区基于人IgG1 Fc区、IgG2 Fc区或IgG4 Fc区，

并且其中氨基酸残基的编号依据Kabat中的EU索引。

2.根据权利要求1所述的分离的异源多聚体，其中所述Tm为74℃或更高。

3.根据权利要求1所述的分离的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区基于人IgG1 Fc区。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的分离的异源多聚体，其中所述异源多聚体是抗体。

5.根据权利要求4所述的分离的异源多聚体，其中所述异源多聚体是双特异性或多特异性抗体。

6.根据权利要求4所述的分离的异源多聚体，其中所述抗体结合至少一种癌抗原。

7.根据权利要求4所述的分离的异源多聚体，其中所述抗体与治疗剂缀合。

8.组合物，其包含根据权利要求1至7中任一项所述的分离的异源多聚体和药学上可接受的载体。

9.在哺乳动物细胞中表达根据权利要求1-6中任一项所述的分离的异源多聚体的方法，所述方法包括：

(a)用编码权利要求1至6中任一项所述的异源多聚体的一种或多种多聚核苷酸转染至少一种哺乳动物细胞以生产至少一种瞬时地或稳定地转染的哺乳动物细胞，和

(b)在适合于表达所述分离的异源多聚体的条件下培养所述至少一种瞬时地或稳定地转染的哺乳动物细胞。

10.分离的多核苷酸，其编码根据权利要求1至6中任一项所述的分离的异源多聚体。

在Fc结构域中具有突变的稳定异源二聚的抗体设计

[0001] 本申请为国际申请PCT/CA2011/001238进入中国国家阶段的中国专利申请(申请号为201180064119.X,申请日为2011年11月4日,发明名称为“在Fc结构域中具有突变的稳定异源二聚的抗体设计”)的分案申请。

[0002] 1.介绍

[0003] 1.1交叉引用相关申请

[0004] 本申请根据美国法典第35篇第1 19(e)条要求2010年11月5日提交的美国临时专利申请号61/410,746;2010年12月21日提交的美国临时专利申请号61/425,375;2011年2月3日提交的美国临时专利申请号61/439,341;2011年4月14日提交的美国临时专利申请号61/475,614;2011年5月31日提交的美国临时专利申请号61/491,846和2011年6月16日提交的美国临时专利申请号61/497,861的权益,所述申请中每一个都通过引用完整地并入本文。

[0005] 1.2关于序列表的声明

[0006] 本申请通过引用并入与本申请一起提交的序列表,所述序列表作为2011年11月4日创建的文本文件Zymeworks V84467WO.txt,其大小为15千字节。

1.3.发明领域

[0007] 本发明一般提供多肽异源二聚体、其组合物、以及制备和使用所述多肽异源二聚体的方法。更具体而言,本发明涉及热稳定的多特异性抗体,包括双特异性抗体,其包含异源二聚的Fc结构域。

[0008] 1.4发明背景

[0009] 双特异性抗体是基于抗体的分子,其可以同时结合两个分离且不同的抗原(或相同抗原的不同表位)。双特异性抗体的一个用途是重新引导细胞毒性免疫效应细胞,例如通过抗体依赖细胞毒性(ADCC)以增强对肿瘤细胞的杀伤。在这种背景下,双特异性抗体的一个臂结合肿瘤细胞上的抗原,并且另一个臂结合效应细胞上表达的决定簇。通过交联肿瘤和效应细胞,所述双特异性抗体不仅在肿瘤细胞周围引入效应细胞,而且也同时引起其活化,造成有效杀死肿瘤细胞。双特异性抗体已经用于在肿瘤组织富集化学或放射治疗剂以最小化对正常组织的有害作用。这种情况下,双特异性抗体的一个臂与要破坏的靶向细胞上表达的抗原相结合,另一个臂递送化疗药物、放射性同位素或毒素。

[0010] 通常开发双特异性抗体的一个主要障碍是难于为临床前和临床研究生产足够质量和数

[0011] 量的材料。

[0012] 全长双特异性抗体的传统生产方法是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中这两条链具有不同特异性(Millstein等人,1983,Nature,305:537-539)。抗体分子的Fc部分二聚化的内在趋势导致形成最高达10个不同的由重链和轻链的各种组合组成的IgG分子的复杂混合物,其中只有一个具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤纯化正确分子,亲和层析相当烦琐,且产率较低。WO93/08829和Traunecker等人,1991,EMBO J.,10:3655-3659公开了相似程序。因此,使用传统的杂交瘤技术产生具有选择用于结合两

个不同目标的两个Fab臂的双特异性抗体分子是具有挑战性的[Segal DM等人.(2001)J Immunol Methods.248,1-6.]。三功能抗体Catumaxomab是源自大鼠/小鼠四价杂交瘤(quadroma)的双特异性mAb,且在基于蛋白A柱的层析分离中基于pH依赖性洗脱实现该分子的纯化[Lindhofer H.等人.(1995)J Immunol 155,219-225]。

[0013] 另一个双特异性抗体生产的传统方法是将不同特异性的两种抗体或其片段进行化学缀合。然而,该方法也复杂,并且化学修饰过程可以使抗体失活或促进聚集。因为难以从不需要的产物中进行纯化,所得双特异性抗体的低产率和差质量使得所述过程不适合用于临床开发所需的大规模生产。此外,这些分子不可以维持常规的抗体构型。

[0014] 近期,多种异源二聚化技术已经用于提高双特异性抗体的生产。然而,单个异源二聚化结构域如Jun/Fos卷曲螺旋与scFv结构域的融合产生同或异源二聚体的混合物且需要通过重新折叠而装配(de Kruif和Logtenberg,J.Biol.Chem.271:7630-4,1996)。scFv片段与全抗体的融合也用作二聚化方式(Coloma和Morrison,Nat.Biotechnol.15:159-63,1997)。然而,所述融合得到的大分子的实体组织穿透能力差。两个scFv片段融合在一起已经用于产生双特异性蛋白(如Micromet Inc.,Bethesda,MD的BITE®抗体,美国专利号7,635,472)。然而,所述蛋白不含Fc区,并且因此无法通过Fc区操作它们的活性。另外,这些蛋白较小(～55kDa)并且因此在血清中有相对短的半衰期。

[0015] 在其他异源二聚化技术中,双特异性抗体由在一条臂中具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链和在另一条臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。已发现,此种不对称结构有助于分离所需的双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链的组合,因为免疫球蛋白轻链仅存在于一半双特异性分子中提供了一种容易的分离方案。这种方法参见WO94/04690。产生双特异性抗体的进一步详情参见例如,Suresh等人,1986,Methods in Enzymology,121:210。

[0016] 根据WO96/27011所述的另一种方法,可以工程改造一对抗体分子,以最大程度提高由重组细胞培养物回收的异源二聚体的百分比。在这种方法中,用较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)取代第一抗体分子CH3接口上的一个或多个较小氨基酸侧链。通过用较小氨基酸侧链(如丙氨酸或苏氨酸)取代较大氨基酸侧链,在第二抗体分子接口上产生与较大侧链相同或相似大小的补偿性“腔”。这提供了提高异源二聚体相对于其他不良终产物如同源二聚体的产率的机制[US005731168A,US007183076B2,Ridgway JB,Presta LG,Carter P.Protein Eng 1996Jul;9(7):617-21;Atwell S,Ridgway JB,Wells JA,Carter P.J Mol Biol 1997Jul 4;270(1):26-35.]。Gunasekaran及其同事[Gunasekaran K.等人.(2010)J Biol Chem.285,19637-46]最近已经采用了互补静电设计策略来实现选择性异源二聚化目标。Davis及其同事[Davis,JH.等人.(2010)Prot Eng Des Sel;23(4):195-202]已经使用链交换工程改造的结构域(SEED)设计CH3结构域,其由交替的人IgA和IgG CH3序列的区段构成,且这些优先以异源二聚体形式结合。然而,所有这些技术产生的包含异源二聚体Fc区的抗体比亲本或野生型分子稳定明显更差。

[0017] 因此,在本领域中仍然存在对于替代的多特异性变体Fc异源二聚体、特别是变体CH3结构域的需要,其已经进行修饰以选择具有增加的稳定性和纯度的异源二聚体。

[0018] 2.发明概述

[0019] 根据本发明的一个方面,提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体,其中

所述异源二聚体Fc区包含变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述异源二聚体Fc区进一步包含变体CH2结构域，所述变体CH2结构域包含促进FcγR受体的选择性结合的不对称氨基酸修饰。在一个实施方案中，与野生型CH2结构域相比，变体CH2结构域选择性结合FcγIIIa受体。在一个实施方案中，变体CH3结构域具有约70℃或更高的熔解温度(Tm)。

[0020] 在另一个方面，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约70℃或更高的熔解温度(Tm)。在一个实施方案中，相对于野生型Fc区，异源二聚体Fc区在CH3结构域中不包含额外的二硫键，更具体地，相对于野生型Fc区，异源二聚体Fc区在CH3结构域中不包含额外的二硫键。在可替代的实施方案中，相对于野生型Fc区，异源二聚体Fc区在变体CH3结构域中包含额外的二硫键，条件是约70℃或更高的熔解温度(Tm)是在额外的二硫键不存在的情况下。在又另一个实施方案中，相对于野生型Fc区，异源二聚体Fc区在变体CH3结构域中包含额外的二硫键，且其中所述变体CH3结构域具有约77.5℃或更高的熔解温度(Tm)。

[0021] 在一个实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约70℃或更高的熔解温度(Tm)且所述异源二聚体Fc区具有高于约90％的纯度，或者所述异源二聚体Fc区具有约95％或更高的纯度，或者所述异源二聚体Fc区具有高于约98％或更高的纯度。

[0022] 在一个实施方案中，也提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约70℃或更高的熔解温度(Tm)或者Tm是约71℃或更高或者Tm是约74℃或更高。在另一个实施方案中，异源二聚体Fc区具有约98％或更高的纯度且Tm是约73℃或者其中所述异源二聚体Fc区具有约90％或更高的纯度且Tm是约75℃。

[0023] 在某些实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。在一个方面，第一CH3结构域多肽或第二CH3结构域多肽包含T411、D399、S400、F405、N390或K392位的进一步氨基酸修饰。T411位的氨基酸修饰选自T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。D399位的氨基酸修饰选自D399R、D399W、D399Y或D399K。S400位的氨基酸修饰选自S400E、S400D、S400R或S400K。F405位的氨基酸修饰选自F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W。N390位的氨基酸修饰选自N390R、N390K或N390D。K392位的氨基酸修饰选自K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。

[0024] 在某些实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366V和K409F。

[0025] 在另一个实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多

肽包含氨基酸修饰Y407A，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。在一个方面，第一CH3结构域多肽或第二CH3结构域多肽包含进一步氨基酸修饰K392E、T411E、D399R和S400R。在另一个方面，第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰D399R、S400R和Y407A且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A、K409F、K392E和T411E。在进一步实施方案中，变体CH3结构域具有约74℃或更高的熔解温度(Tm)且异源二聚体具有约95％或更高的纯度。

[0026] 在另一个实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含L351位的氨基酸修饰和氨基酸修饰Y407A，所述第二CH3结构域多肽包含T366位的氨基酸修饰和氨基酸修饰K409F。在一个方面，L351位的氨基酸修饰选自L351Y、L351I、L351D、L351R或L351F。在另一个方面，Y407位的氨基酸修饰选自Y407A、Y407V或Y407S。在又另一个方面，T366位的氨基酸修饰选自T366A、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。在一个实施方案中，变体CH3结构域具有约75℃或更高的熔解温度(Tm)且异源二聚体具有约90％或更高的纯度。

[0027] 在另一个实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含F405位的氨基酸修饰和氨基酸修饰L351Y和Y407V，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T394W。在一个方面，第一CH3结构域多肽或第二CH3结构域多肽包含K392、T411、T366、L368或S400位的氨基酸修饰。F405位的氨基酸修饰是F405A、F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W。K392位的氨基酸修饰是K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。T411位的氨基酸修饰是T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。S400位的氨基酸修饰是S400E、S400D、S400R或S400K。T366位的氨基酸修饰是T366A、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。L368位的氨基酸修饰是L368D、L368R、L368T、L368M、L368V、L368F、L368S和L368A。

[0028] 在另一个实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T394W。在一个方面，第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L或T366I。

[0029] 在又另一个实施方案中提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366I、K392M和T394W。

[0030] 在某些实施方案中提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L、K392M和T394W。

[0031] 在另一个实施方案中提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L和T394W。

[0032] 在另一个实施方案中提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述

异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽，所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366I和T394W。

[0033] 在异源多聚体的某些实施方案中，提供了双特异性抗体或多特异性抗体。

[0034] 在另一个实施方案中，提供了包含本发明的异源多聚体和药学可接受载体的组合物。

[0035] 在另一个实施方案中，提供了包含编码本发明的异源多聚体的核酸的宿主细胞。

[0036] 在某些实施方案中，提供了异源多聚体，其中所述异源多聚体包含至少一种治疗性抗体。在一个方面，所述治疗性抗体选自阿巴伏单抗(abagovomab)、阿达木单抗(adalimumab)、阿伦珠单抗、aurograb、巴匹珠单抗、巴利昔单抗、贝利木单抗(belimumab)、贝伐珠单抗、briakinumab、卡那单抗(canakinumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、塞舍珠单抗(certolizumab pegol)、西妥昔单抗、达克珠单抗、地舒单抗(denosumab)、依法珠单抗、加利昔单抗(galiximab)、吉妥珠单抗奥佐米星、戈利木单抗(golimumab)、替伊莫单抗、英利昔单抗、伊匹木单抗、鲁昔单抗、美泊利单抗、莫他珠单抗、莫罗单抗、mycograb、那他珠单抗、尼妥珠单抗、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、培妥珠单抗、雷珠单抗、瑞利珠单抗、利妥昔单抗、替利珠单抗(teplizumab)、托珠单抗/atlizumab、托西莫单抗、曲妥珠单抗、ProxiniumTM、RencarexTM、优特克单抗和扎芦木单抗(zalutumumab)。

[0037] 在本发明的异源多聚体的另一个实施方案中，提供了在患有由癌抗原表征的癌症的患者中治疗癌症的方法，所述方法包括将治疗有效量的异源多聚体施用于所述患者。

[0038] 在本发明的异源多聚体的另一个实施方案中，提供了在患有由免疫抗原表征的免疫病症的患者中治疗免疫病症的方法，所述方法包括将治疗有效量的异源多聚体施用于所述患者。

[0039] 在又另一个实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，并且其中所述变体CH3结构域选自表1、表6和表7中所列变体。

[0040] 3.附图概述

[0041] 图1是显示CH3(顶部)、CH2(中部)和受体区域的野生型抗体的图示3-D结构。在左手侧上的虚线矩形扩展至右手侧，其显示CH3的靶区的两个区域，区域1和区域2；

[0042] 图2是显示368位的野生型残基的图示3-D代表；

[0043] 图3是显示突变的368位的区域1的图示3-D代表；

[0044] 图4是显示区域2中额外突变的图示3-D代表；

[0045] 图5是对于前三种变体AZ1、AZ2和AZ3的碰撞评分、接口面积差异、包装差异、静电能差异和整体“亲和力评分”的计算机芯片上计算值的表格；

[0046] 图6是显示“构建在”变体AZ1上的变体AZ2和AZ3的图示3-D图像；

[0047] 图7显示AZ2和AZ3变体的图示3-D代表；

[0048] 图8显示如图5中但对于AZ1、AZ2和AZ3异源二聚体和同源二聚体的表格。亲和力评分对于同源二聚体是不相关的，所以没有显示关于同源二聚体的该方面的评分；

[0049] 图9是野生型(左)和突变的AZ4(右)的3-D代表的图示；

[0050] 图10显示如图5且显示对于AZ4异源二聚体和同源二聚体的计算机上芯片计算值的表格；

[0051] 图11是CH3变体AZ5(左)和AZ6(右)的图示；

[0052] 图12如图5所述且显示对于AZ4、AZ5和AZ6的计算机上芯片数据的表格；

[0053] 图13是抗体在左侧的图示3-D代表，具有使用异源二聚方法在受体区域的结合特征的可能性的绘图；

[0054] 图14是IgG分子的图示；

[0055] 图15显示Fcγ受体的多重序列比对。Genebank/Uniprot序列ID:FcγRIIA(sp P12318)、FcγRIIB(sp P31994)、FcγRIIC(gi 126116592)、FcγRIIIA(sp P08637)、FcγRIIIB(sp 075015)；

[0056] 图16是Fc-FcγRIIIb复合物的晶体结构的图示[PDB ID:1T83,Radaev&Sun]。Fc和Fcγ受体的1:1复合物观察到在Fc和FcγR的两条链之间具有不对称接触；

[0057] 图17显示基于不对称Fc支架的替代多功能分子的图示：不对称Fc支架和不对称Fc单体IgG臂；

[0058] 图18显示基于不对称Fc支架的替代多功能分子的图示：不对称Fc单特异性IgG臂和不对称Fc双特异性IgG臂(共用轻链)；

[0059] 图19显示基于不对称Fc支架的替代多功能分子的图示。不对称Fc双特异性IgG臂和功能分子如毒素；

[0060] 图20显示基于不对称Fc支架的替代多功能分子：不对称Fc单一scFv臂和不对称Fc双特异性scFv臂；

[0061] 图21显示基于不对称Fc支架的替代多功能分子：不对称Fc三特异性scFv臂和不对称Fc四特异性scFv臂。

[0062] 图22显示了为了更好的FcγR选择性在Fc的一面不对称设计突变引入了用于FcγR相互作用的产生侧面和具有野生型样相互作用的非产生面。可以引入Fc的非产生面上的突变以阻断与FcR的相互作用和Fc偏好极性，以便只在产生面上相互作用。

[0063] 图23显示了野生型人lgG1的氨基酸序列。

[0064] 图24显示Fc异源二聚体设计的迭代过程，其组合如下详述的阳性和阴性设计策略。

[0065] 图25显示用来确定异源二聚体纯度的体外测定。该测定基于具有不同分子量的两条Fc重链的全长单特异性抗体支架；重链A具有C-末端His标记(His)且重链B具有C末端可裂解的mRFP标记(RFP)。两条重链A(His)和B(RFP)连同固定量的轻链以不同的相对比率进行表达，产生具有不同分子量的3种可能的二聚体种类：a)同源二聚体链A(His)/链A(His)(～150kDa)；b)异源二聚体链A(His)/链B(RFP)(～175kDa)；c)同源二聚体链B(RFP)/链B(RFP)(～200kDa)。表达后，如实施例2中所述，通过非还原性SDS-PAGE确定异源二聚体相比于两种同源二聚体的比例，其允许通过分子量分开3种二聚体种类。用考马斯亮蓝染色SDS-PAGE凝胶。

[0066] 图25A.测试的变体是仅WT链A(His)；仅WT链B(RFP)；WT链A(His)加链B(RFP)；对照1链A(His)加链B(RFP)，其具有>95％的报道的异源二聚体纯度。用针对如上所述针对IgG-Fc(抗Fc)、mRFP Tag(抗mRFP)和HisTag(抗His)的抗体通过Western印迹验证二聚体条带的

组成。SDS-PAGE显示对于His/His同源二聚体的单一条带，对于His/RFP异源二聚体的双条带和对于RFP同源二聚体的多条带。多条带是mRFP标记的人工产物且已被证实不影响Fc异源二聚体的物理特性。

[0067] 图25B.以公开的Fc异源二聚体变体对照1-4作为对照验证SDS-PAGE测定，参见表A。以不同的链A(His)vs链B(RFP)的相对比例表达变体：具体而言，分别地，比例1:3等于25％、10％、65％的LC、HC_His、HC_mRFP比例；比例1:1等于25％、20％、55％的LC、HC_His、HC_mRFP比例且比例3:1等于25％、40％、35％的LC、HC_His、HC_mRFP比例(链A(His)与链B(RFP)的表观1:1表达对于WT Fc已经确定为接近20％/55％(His/RFP))。

[0068] 图25C.显示非还原SDS-PAGE测定以确定支架1变体的异源二聚体纯度。以不同的链A(His)vs链B(RFP)的相对比例表达Fc变体，且如图2中所述通过非还原SDS-PAGE进行分析。具体而言，分别地，比例1:3等于25％、10％、65％的LC、HC_His、HC_mRFP比例；比例1:1等于25％、20％、55％的LC、HC_His、HC_mRFP比例且比例3:1等于25％、40％、35％的LC、HC_His、HC_mRFP比例(链A(His)与链B(RFP)的表观1:1表达对于WTFc已经确定为接近20％/55％(His/RFP))。

[0069] 图26显示以链A(His)vs链B(RFP)的特定比例表达Fc的异源二聚体变体(参见表2)，通过蛋白A亲和层析纯化且如图25中所述通过非还原SDS-PAGE进行分析。

[0070] 图26A说明如何基于目视检查SDS-PAGE结果而将不同的变体分级为纯度分类中。为了比较，将等量的蛋白A纯化的产物上样至凝胶上。已经通过对选择的变体的LC/MS验证了该基于非还原SDS-PAGE的纯度的定义(参见图28)。

[0071] 图26B支架1和2(AZ94、AZ86、AZ70、AZ33和AZ34)的选择的蛋白A纯化的异源二聚体变体的实施例SDS-PAGE结果。

[0072] 图27说明用来测定CH3-CH3结构域的熔解温度的DSC分析，其中使用了两种独立方法。

[0073] 图27A.将热谱图拟合至4次独立的Non-2-State-转换且进行优化以产生接近于Herceptin的报道文献值～72℃(CH2)和～82℃(Fab)的CH2和Fab转换值。

[0074] 图27B.将异源二聚体变体的均一和基线校正的热谱图从WT中减去，以产生仅对于CH3转换的正负差峰值。

[0075] 图28说明如实施例2中所述的实例变体AZ70的LC/MS分析。注明了糖基化异源二聚体和同源二聚体的预期(计算的平均值)质量。与异源二聚体质量一致的区域含有对应于损失甘氨酸(-57Da)和添加1个或2个已糖(分别为+162Da和+324Da)的主峰。如果没有对应于任一种同源二聚体的明显峰，那么异源二聚体纯度被归类为>90％。

[0076] 图29显示图29AWT Fc；图29BAZ6；图29C AZ33；图29DAZ19的CH3接口。如详述部分所述的计算机芯片上的综合分析和变体与WT的比较表明，初始AZ33异源二聚体的稳定性低于WT稳定性的原因之一是Y407和T366的核心相互作用/包装的损失。初始AZ33显示如图29B所示的在该疏水核心处的非最佳包装，表明该区域、尤其是T366位的优化可以改进AZ33的稳定性。这一点在图29C和图29D中以T366I与T366L进行说明。实验数据与这种结构分析相关且显示T366L给出了Tm的最大改进。参见，实施例5。

[0077] 图30说明在初始支架1变体AZ8例举的构象动力学分析的实用性和重要性。在计算机芯片上诱变后的结构(接近WT的骨架构型)与50ns分子动力学模拟分析的代表性结构相

叠加。该图突出了AZ8变体相比于WT的环区域D399-S400的较大构象差异，其进而将疏水核心暴露于溶剂且引起AZ8异源二聚体的稳定性降低。

[0078] 图31说明来自计算机芯片上综合分析和MD模拟的信息如何用于所述阳性设计策略。如图30中所示，AZ8稳定性低于WT稳定性的原因之一是环399-400与409的减弱的相互作用，这主要是由于F405包装相互作用的损失(参见图31A(WT)vs Fig31B(AZ8)的比较)。阳性设计策略之一是优化区域的疏水性包装以稳定399-400环构象。这通过图31C中所示的K392M突变而实现。图31C代表异源二聚体AZ33，其具有74°的Tm，相比之下，初始阴性设计变体AZ8具有68°的Tm。

[0079] 图32说明使用分子动力学轨迹的主成分分析观察到的Fc分子的动力学。图32A显示作为参考的Fc结构的骨架轨迹。图32B和C代表沿Fc结构中顶部2种主要运动方式观察到的动力学重叠。链A和B的CH2结构域表现出相对于彼此明显的开/关运动，而CH3结构域是相对刚性的。CH3接口处的突变影响CH2结构域中这种开/关运动的相对灵活性和动力学。

[0080] 图33说明两个支架2变体相比于WT的疏水核心包装。图33A WT Fc；图33BAZ63；和图33CAZ70。初始支架2变体的计算机芯片上的综合分析表明，Y407-T366核心WT相互作用的损失是初始支架2变体的稳定性低于WT稳定性的原因之一。Y407-T366的损失被突变K409F部分补偿，但如图33B中所示，特别地T366A突变留下疏水核心中的腔，这使变体相比于WT不稳定。如图33C中的Fc变体AZ70所示，由额外突变T366V_L351Y靶向该疏水核心证明是成功的；AZ70具有75.5℃的实验确定的Tm。参见，表4和实施例6。

[0081] 图34说明两个支架2变体相比于WT的环399-400的相互作用：图34AWT Fc；图34B AZ63；和图34CAZ94。初始支架2变体的计算机芯片上的综合分析表明，由于突变K409F的WT盐桥K409-D399的损失(图34A)和因此不满意D399(图34B)引起399-400环的更加'开放的'构象。这进而导致疏水核心的更大的溶剂暴露和变体相比于WT的进一步的不稳定。用于稳定399-400环且补偿K409-D399相互作用损失的策略之一是设计如图34C对于变体AZ94所示的额外的盐桥D399R-T411E和S400R-K392E。实验数据显示>95％的纯度和74℃的Tm。参见，表4和实施例6。此外，尽管AZ94与初始支架2变体(纯度<90％，Tm 71℃)相比具有相当高的纯度和稳定性，但是与AZ70变体中鉴定的“最佳”疏水核心突变相比，AZ94的疏水核心突变是次优选的(图33)。由于AZ70中疏水核心的突变(T366V_L351Y)在环399-400处的AZ94的盐桥突变的远端，所以预期AZ70氨基酸突变和额外的AZ94突变的组合具有比AZ70或AZ94更高的熔解温度。可以如实施例1-4中所述测试该组合。

[0082] 图35说明同源二聚的IgG1Fc、异源二聚的变体het1(对照1)：A:Y349C_T366S_L368A_Y407V/B:S354C_T366W和het2(对照4)：A:K409D_K392D/B:D399K_D356K与六种Fcγ受体结合的结合常数(Ka(M^{-1}))。与野生型lgG1Fc相比，异源二聚的Fc变体趋向于显示与Fcγ受体结合的轻微改变。参见，实施例7。

[0083] 图36A显示基于野生型结合强度作为参考，野生型IgG1Fc和它的各种同源二聚体和不对称突变体形式与IIbF、IIBY和IIaR受体的相对结合强度。(Homo Fc+S267D)是指同源二聚的Fc与两条链上的S267D突变的结合强度。(Het Fc+asym S267D)是指同源二聚的Fc与Fc中两条链之一中引入S267D突变的结合强度。报道了通过在两条Fc链中任一条上引入突变而获得的结合强度的平均值。在一条链上引入该突变将结合强度降低至对于同源二聚形式中相同突变观察到强度的约一半。(Het Fc+asym S267D+asym E269K)是指同源二聚的Fc

与两条Fc链之一上以不对称方式中引入S267D和E269K突变的结合强度。E269K突变阻断了FcGR与Fc的一个面的相互作用，且能够将结合强度降低对于不对称S267D变体(Het Fc+S267D)本身所观察到的结合强度的约一半。此处的Het Fc是由图35中对于变体het2(对照4)所指出的CH3突变构成。

[0084] 图36B显示各种Fc及其变体与多种FcgRIIa、FcgRIIb和FcgRIIIa同种异型的结合常数(Ka(M^{-1}))。野生型IgG1Fc对于各种Fcg受体的Ka以具有水平阴影的柱表示。具有垂直阴影的条(同源二聚体基础2)代表异源二聚体Fc与突变S239D/D265S/I332E/S298A的Ka。具有倾斜阴影的柱代表同源二聚体Fc与CH2结构域中不对称突变A:S239D/D265S/I332E/E269K和B:S239D/D265S/S298A的Ka。不对称突变的引入能够实现IIIa和IIa/IIb受体之间的增加的选择性。此处的异源二聚体Fc是由图35中对于变体het2(对照4)所指出的CH3突变构成。

[0085] 图36C显示野生型IgG1和Fc区的CH2结构域中涉及同源二聚或不对称突变的三种其他变体的结合常数(Ka(M^{-1}))。野生型IgG1的Ka以网格阴影的柱表示。Fc变体与在Fc的两条链上以同源二聚方式(同源二聚体基础1)中引入的基础突变S239D/K326E/A330L/I332E/S298A的Ka以倾斜模式的柱显示。在异源二聚的Fc(异源二聚基础1)的链A和B中以不对称方式引入相关突变以水平线显示。具有垂直阴影线的柱代表包括E269K突变的不对称变体(异源基础1+PD)。此处的异源二聚体Fc是由图35中对于变体het2(对照4)所指出的CH3突变构成。

[0086] 图37-表6是基于如实施例5中对于支架1所述的第三设计阶段的变体CH3结构域的列表。

[0087] 图38-表7是基于如实施例6中对于支架2所述的第三设计阶段的变体CH3结构域的列表。

[0088] 4.详述

[0089] 本发明提供了包含促进异源二聚体形成的特定氨基酸修饰的修饰的CH3结构域。在一个实施方案中，修饰的CH3结构域包含促进异源二聚体形成的特定氨基酸修饰(参见，例如表1)。在另一个实施方案中，修饰的CH3结构域包含具有增加稳定性的促进异源二聚体形成的特定氨基酸修饰(参见，例如表4、表6和表7)。将稳定性测量作为CH3结构域的熔解温度(Tm)，并且增加的稳定性是指约70℃或更高的Tm。CH3结构域形成异源多聚体或双特异性抗体的Fc区的部分。因此，在一个实施方案中，本文提供了包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含修饰的或变体CH3结构域，所述修饰的或变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域选自表1所列变体。在第二个实施方案中，提供了包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约70℃或更高的熔解温度(Tm)。

[0090] 可以用来生成修饰的CH3结构域的氨基酸修饰包括，但不限于，氨基酸插入、缺失、取代、和重排。CH3结构域的修饰和修饰的CH3结构域在本文中被统称为“CH3修饰”、“修饰的CH3结构域”、“变体CH3结构域”或“CH3变体”。可以将这些修饰的CH3结构域并入选择的分子。相应地，在一个实施方案中，提供了分子，特别是多肽，更具体地免疫球蛋白(例如，抗体)和其他结合蛋白，其包含并入修饰的CH3结构域的Fc区(如本文所使用的“Fc区”和类似术语包括包含CH3结构域的至少部分的任何重链恒定区结构域)。包含含有修饰的CH3结构

域(例如,包含一个或多个氨基酸插入、缺失、取代、或重排的CH3结构域)的Fc区的分子在本文被称为“Fc变体”、“异源二聚体”或“异源多聚体”。本Fc变体包含已经不对称修饰的CH3结构域以产生异源二聚体Fc变体或区域。Fc区是由两个重链恒定结构域多肽-链A和链B-构成,所述链A和链B可以交换使用,条件是每个Fc区包含一个链A和一个链B多肽。将氨基酸修饰以不对称方式引入CH3,当两个修饰的CH3结构域形成Fc变体时导致异源二聚体(见,例如,表1)。如本文所使用的,不对称的氨基酸修饰是其中在一种多肽(例如,“链A”)上特定位置的氨基酸不同于异源二聚体或Fc变体的相同位置的第二种多肽(例如,“链B”)上的氨基酸的任何修饰。这可以是来自对Fc变体的链A和链B的两个不同氨基酸的两个氨基酸中仅一个的修饰或两个氨基酸的修饰的结果。可以理解的是,变体CH3结构域包含一个或多个不对称的氨基酸修饰。

[0091] 除非另有说明,在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数值,适当时也包括其分数值(如整数的十分之一和百分之一)。除非另有说明,本文所使用的“约”指所述范围、数值、序列或结构的±10%。应理解,除非另有说明或上下文注明,本文所用术语“一个”和“一种”指“一个或多个”所列举的组分。替代物的使用(例如“或”)应理解为所述替代物中的一个、两个或其任何组合。本文所使用术语“包括”和“包含”可以作为同义词使用。此外,应理解衍生自本文所述结构和取代物(如变体CH3结构域)的各种组合的单个单链多肽或异源二聚体就好像各单链多肽或异源二聚体单独列出那样相同的程度被本申请所公开。因此,特定组分形成单个单链多肽或异源二聚体的选择属于本发明范围内。

[0092] “第一多肽”是与第二多肽结合的任何多肽,在本文中也称为“链A”。第一和第二多肽在“接口”处相遇。“第二多肽”是经由“接口”与第一多肽结合的任何多肽,在本文中也称为“链B”。“接口”包含在第一多肽中与第二多肽的接口中的一个或多个“接触”氨基酸残基相互作用的那些“接触”氨基酸残基。如本文所使用的,接口包含Fc区的CH3结构域,其优选源自IgG抗体,最优选人IgG_1抗体。

[0093] 如本文所使用,“分离的”异源多聚体意味着已经鉴定和从其天然细胞培养环境的组分中分离和/或回收的异源多聚体。其天然环境的污染组分是可干扰所述异源多聚体的诊断或治疗性用途的物质,可以包括酶、激素和其他蛋白或非蛋白溶质。

[0094] 变体Fc异源二聚体一般纯化至基本上同质性。短语“基本上同质”、“基本上同质形式”和“基本上同质性”用来表明产物基本上没有源自不需要的多肽组合的副产物(例如,同源二聚体)。在纯度的方面表示,基本上同质性是指副产物的量不超过10%,优选为低于5%,更优选低于1%,最优选低于0.5%,其中所述百分比以重量计。

[0095] 抗体技术领域技术人员理解的术语各自具有所述领域获得的含义,除非本文作明确的不同定义。已知抗体具有变体区、铰链区和恒定结构域。有关免疫球蛋白结构和功能的综述参见例如Harlow等人编,Antibodies:A Laboratory Manual,第14章Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,1988)。

[0096] 在通过平衡稳定性相比于特异性的蛋白工程改造的背景中通过阳性和阴性设计的概念显示从野生型同源二聚体设计变体Fc异源二聚体,其中以当多肽在细胞培养条件中表达时驱动异源二聚体形成超过同源二聚体形成为目标引入突变。通过在一条链引入大侧链且在另一条链引入小侧链,例如Genentech开发的把手进孔(Knobs-into-holes)策略

(Ridgway JB,Presta LG,Carter P.'Knobs-into-holes'engineering of antibody CH3domains for heavy chain heterodimerization.Protein Eng.1996Jul;9(7):617-21;Atwell S,Ridgway JB,Wells JA,Carter P.Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library.J Mol Biol.270(1):26-35(1997))),或通过导致排斥同源二聚体形成的静电工程改造,例如Amgen开发的静电转向策略(Gunaskekaran K,等人.Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects:applications to bispecific molecules and monovalent IgG.JBC 285(25):19637-19646(2010))阴性设计策略使对同源二聚体形成不利的相互作用最大化。在这两个实例中,将阴性设计不对称点突变引入野生型CH3结构域以驱动异源二聚体形成。迄今为止,只有阴性设计策略已经用于开发Fc异源二聚体。公开的结果显示,仅使用阴性设计方法设计的异源二聚体导致具有>95%异源二聚体的高特异性,但是使复合物相当不稳定(同上)。这些阴性设计异源二聚体具有69℃或更低的修饰的CH3结构域的熔解温度,与野生型相比,不存在额外的二硫键。参见下面的表A。

[0097] 表A:公开的Fc异源二聚体抗体

[0098]

	链	工程改造方法	来源	纯度	Tm ℃
野生型	-				81-83
	-				
对照4	Y349C_T366S_L368A_Y407V	把手进孔加二硫键	Genentech (Merchant等人)	95%	>77**
	S354C_T366W				
对照3	K409D_K392D	静电转向	Amgen (Gunaskekaran等人)	<80%	NP
	D399K				
对照2	T366S_L368A_Y407V	把手进孔	Genentech (Atwell等人)	95%	69
	T366W				
对照1	K409D_K392D	静电转向	Amgen (Gunaskekaran等人)	100%*	67
	D399K_E356K				
对照5	IgG-IgA 嵌合体	链交换	EMD Serono (Muda等人)	>90%	68

[0099] *我们在我们的测定系统观察到对照1的>90%的纯度,但不是如以前在文献中报道的100%。

[0100] *我们在我们的测定系统观察到对照4的高于77℃的Tm;对于这种变体的Tm在文献中还没有公开。

[0101] NP-对于对照3的Tm还没有公开,并且它在我们的测定系统中没有进行测试。

[0102] 野生型IgG1的熔解温度显示为81-83的范围,因为文献中的值取决于使用的测定系统而变化,我们在我们的测定系统中报告了81.5℃的值。

[0103] 在阴性设计相比,用于工程改造蛋白的一般概念是阳性设计。在这种情况下,将氨基酸修饰引入多肽以使蛋白内或蛋白之间的有利相互作用最大化。这种策略假设,当引入多个特异性稳定期望的异源二聚体的突变而同时忽略对同源二聚体的影响时,净效果将是对于期望的异源二聚体相互作用相比于同源二聚体的更好的特异性,和因此更高的异源二

聚体特异性。在蛋白工程改造的背景下可以理解的是，阳性设计策略优化了期望的蛋白相互作用的稳定性，但很少达到>90％特异性(Havranek JJ&Harbury PB.Automated design of specificity in molecular recognition.Nat Struct Biol.10(1):45-52(2003);Bolon DN,Grant RA,Baker TA,Sauer RT.Specificity versus stability in computational protein design.Proc Natl Acad Sci U S A.6;102(36):12724-9(2005);Huang PS,Love JJ,Mayo SL.A de novo designed protein protein interface Protein Sci.16(12):2770-4(2007))。因此，迄今为止，阳性设计策略没有用于设计Fc异源二聚体，因为对于治疗性抗体的制备和开发而言特异性比稳定性更重要。此外，有利的阳性设计突变难以预测。用于改进稳定性的其他方法，诸如额外的二硫键，已经进行尝试以改进Fc异源二聚体的稳定性，但是对于分子的改进的成功有限。(参见，表A)这可能是因为所有工程改造的Fc CH3结构域二硫键是溶剂暴露的，这导致二硫键的较短生命周期，和因此对异源二聚体的长期稳定性的显著影响-特别是当工程改造的CH3结构域在没有额外二硫键的情况下具有小于70℃的Tm(如对照4，其在没有额外二硫键的情况下具有69℃的Tm(参见对照2)。可以考虑，改进稳定性的其他方法，诸如二硫键，也可以与本发明的Fc变体使用，条件是CH3结构域在没有二硫键的情况下的内在稳定性(作为熔解温度来测量)为70℃或更高，特别是当CH3结构域在没有二硫键的情况下的内在稳定性(作为熔解温度来测量)为72℃或更高。

[0104] 因此，我们在本文中公开用于设计Fc异源二聚体的新方法，其导致稳定且高特异性异源二聚体形成。这种设计方法组合阴性和阳性设计策略连同结构和计算模型引导的蛋白工程改造技术。这种功能强大的方法已经允许我们设计在IgG1CH3结构域中新的突变组合，其中仅使用标准细胞培养条件形成异源二聚体，与同源二聚体相比其具有超过90％的纯度，并且获得的异源二聚体具有70℃或更高的熔解温度。在示例性实施方案中，Fc变体异源二聚体具有73℃或更高的熔解温度和高于98％的纯度。在其他示例性实施方案中，Fc变体异源二聚体具有75℃或更高的熔解温度和高于90％的纯度。

[0105] 在某些实施方案中，提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有70℃或更高的熔解温度(Tm)。如本文所使用的，“增加的稳定性”或“稳定的异源二聚体”是指在异源二聚体形成中的变体CH3结构域，其具有约70℃或更高的熔解温度。此外，可以理解的是，术语“促进异源二聚体形成”在本文中是指CH3结构域中的氨基酸突变，其导致与同源二聚体形成相比的高于90％的异源二聚体形成。

[0106] 在进一步实施方案中，这种增加的稳定性是在额外的二硫键不存在的情况下。具体而言，增加的稳定性是在CH3结构域中额外的二硫键不存在的情况下。在一个实施方案中，与野生型CH3结构域相比，变体CH3结构域不包含额外的二硫键。在可替代的实施方案中，与野生型CH3结构域相比，变体CH3包含至少一个二硫键，条件是所述变体CH3在二硫键不存在的情况下具有70℃或更高的熔解温度。在一个实施方案中，与野生型CH3结构域相比，变体CH3结构域包含至少一个二硫键，并且变体CH3结构域具有约77.5℃或更高的熔解温度(Tm)。在一个实施方案中，与野生型CH3结构域相比，变体CH3结构域包含至少一个二硫键，并且变体CH3结构域具有约78℃或更高的熔解温度(Tm)。在另一个实施方案中，与野生

型CH3结构域相比，变体CH3结构域包含至少一个二硫键，并且变体CH3结构域具有下列熔解温度(Tm)：高于约78℃、或高于约78.5℃、或高于约79℃、或高于约79.5℃、或高于约80℃、或高于约80.5℃、或高于约81℃。

[0107] 在一个实施方案中，变体CH3结构域具有下列熔解温度：高于约70℃、或高于约70.5℃、或高于约71℃、或高于约71.5℃、或高于约72℃、或高于约72.5℃、或高于约73℃、或高于约73.5℃、或高于约74℃、或高于约74.5℃、或高于约75℃、或高于约75.5℃、或高于约76℃、或高于约76.5℃、或高于约77℃、或高于约77.5℃、或高于约78℃、或高于约78.5℃、或高于约79℃、或高于约79.5℃、或高于约80℃、或高于约80.5℃、或高于约81℃。在另一个实施方案中，变体CH3结构域具有下列熔解温度：约70℃、或约70.5℃、或约71℃、或约71.5℃、或约72℃、或约72.5℃、或约73℃、或约73.5℃、或约74℃、或约74.5℃、或约75℃、或约75.5℃、或约76℃、或约76.5℃、或约77℃、或约77.5℃、或约78℃、或约78.5℃、或约79℃、或约79.5℃、或约80℃、或约80.5℃、或约81℃。在又另一个实施方案中，变体CH3结构域具有下列熔解温度：约70℃至约81℃、或约70.5℃至约81℃、或约71℃至约81℃、或约71.5℃至约81℃、或约72℃至约81℃、或约72.5℃至约81℃、或约73℃至约81℃、或约73.5℃至约81℃、或约74℃至约81℃、或约74.5℃至约81℃、或约75℃至约81℃、或约75.5℃至约81℃、或76℃至约81℃、或约76.5℃至约81℃、或约77℃至约81℃、或约77.5℃至约81℃、或约78℃至约81℃、或约78.5℃至约81℃、或约79℃至约81℃。在又另一个实施方案中，变体CH3结构域具有下列熔解温度：约71℃至约76℃、或约72℃至约76℃、或约73℃至约76℃、或约74℃至约76℃。

[0108] 除增加的稳定性以外，异源二聚体Fc区包含变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变。可以理解的是，这些促进异源二聚体形成的氨基酸突变是与同源二聚体形成相比的。与同源二聚体形成相比的这种异源二聚体形成在本文中统称为“纯度”或“特异性”或“异源二聚体纯度”或“异源二聚体特异性”。可以理解的是，异源二聚体纯度是指在选择性纯化同源二聚体种类之前在标准细胞培养条件下在溶液中形成的所需异源二聚体与形成的同源二聚体种类相比的百分比。例如，90％的异源二聚体纯度表明溶液中的90％二聚体种类是所需异源二聚体。在一个实施方案中，Fc变体异源二聚体具有下列纯度：高于约90％、或高于约91％、或高于约92％、或高于约93％、或高于约94％、或高于约95％、或高于约96％、或高于约97％、或高于约98％、或高于约99％。在另一个实施方案中，Fc变体异源二聚体具有下列纯度：约90％、或约91％、或约92％、或约93％、或约94％、或约95％、或约96％、或约97％、或约98％、或约99％、或约100％。

[0109] 在特定的实施方案中，分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有70℃或更高的熔解温度(Tm)并且获得的异源二聚体具有高于90％的纯度。在一个方面，获得的Fc变体异源二聚体具有高于90％的纯度，并且变体CH3结构域具有下列熔解温度：高于约70℃、或高于约71℃、或高于约72℃、或高于约73℃、或高于约74℃、或高于约75℃、或高于约76℃、或高于约77℃、或高于约78℃、或高于约79℃、或高于约80℃或高于约81℃。在进一步的方面，变体CH3结构域具有70℃或更高的熔解温度并且获得的Fc变体异源二聚体具有下列纯度：高于约90％、或高于约91％、或高于约92％、或高于约93％、或高于约94％、或高于约95％、或高于约96％、或高于

约97％、或高于约98％、或高于约99％。

[0110] 为了设计这些具有改进的稳定性和纯度的Fc变体，我们采用了计算设计和实验筛选的迭代过程来选择阳性和阴性设计策略的最成功组合(参见，图24)。

[0111] 具体而言，在初始设计阶段，如实施例1-3中所述制备不同的阴性设计Fc变体异源二聚体且测试表达和稳定性。初始设计阶段包括Fc变体异源二聚体AZ1-AZ16(参见，表1)。从阴性设计Fc变体异源二聚体的该初始组(预期其具有较低稳定性(例如，小于71℃的Tm))，选择具有大于90％纯度和约68℃或更高的熔解温度的Fc变体异源二聚体用于进一步开发。这包括Fc变体异源二聚体AZ6、AZ8和AZ15。在第二个设计阶段，使用阳性设计策略遵循详细的计算和结构分析将那些选择的Fc变体异源二聚体进行进一步修饰以驱动稳定性和纯度。用计算方法和全面结构功能分析各自分析选择的Fc变体异源二聚体(AZ6、AZ8、和AZ15)，以鉴定这些Fc变体具有比野生型Fc同源二聚体(其对于IgG1为81℃)更低稳定性的结构原因。对于Fc变体异源二聚体和Tm值的列表，参见表4。

[0112] 在某些实施方案中，变体CH3结构域选自AZ1、或AZ2、或AZ3、或AZ4、或AZ5、或AZ6、或AZ7、或AZ8、或AZ9、或AZ10、或AZ11、或AZ12、或AZ13、或AZ14、或AZ15、或AZ16。在选择的实施方案中，变体CH3结构域是AZ6、或AZ8或AZ15。

[0113] 计算机工具和结构-功能分析包括，但不限于分子动力学分析(MD)、侧链/骨架重新包装、知识库潜力(Knowledge Base Potential，KBP)、腔和(疏水)包装分析(LJ、CCSD、SASA、dSASA(碳/全原子))、静电-GB计算、和偶联分析。(对于计算策略的综述，参见图24)

[0114] 我们的蛋白工程改造方法的一个方面依赖于源自X射线晶体学的Fc IgG蛋白的结构信息和CH3结构域的野生型和变体形式的计算建模和模拟相组合。这使我们获得关于单个氨基酸的潜在作用和它们的协同作用的新的结构和物理化学见解。从多个变体CH3结构域获得的这些结构和物理化学见解，连同获得的有关它们的稳定性和纯度的经验数据帮助我们开发且理解与Fc同源二聚体相比的Fc异源二聚体的纯度和稳定性之间的关系和模拟的结构模型。为了进行我们的模拟，我们通过构建完整和现实的模型和完善lgG1抗体的野生型Fc结构质量来开始。源自X-射线晶体学的蛋白结构缺乏关于在生理条件下在水介质中蛋白的某些特征的细节，我们的完善程序解决了这些限制。这些包括构建蛋白结构的缺失区域(往往是蛋白的柔性部分如环和一些残基侧链)，评价和定义中性和带电荷残基的质子状态和与蛋白相关的潜在功能相关水分子的放置。

[0115] 分子动力学(MD)算法是我们使用的一种工具，其通过模拟蛋白结构来评价在含水环境中的Fc同源二聚体和变体CH3结构域的内在动力学性质。分子动力学模拟追踪由蛋白中的所有原子实体和其局部环境之间的相互作用和力作用产生的运动导致的分子的动力学轨道，在这种情况下，原子构成Fc和其周围水分子。分子动力学模拟后，分析轨道的各方面来获得对Fc同源二聚体和变体Fc异源二聚体的结构和动力学特征的见解，我们使用其来鉴定特定的氨基酸突变来改进分子的纯度和稳定性。

[0116] 因此，使用方法来研究生成的MD轨迹，所述方法如主要组分分析以显示在Fc结构中的固有频率低的运动模式。这提供了对于蛋白的潜在构象亚状态的见解(参见，图32)。尽管Fc区中的链A和B之间的关键蛋白-蛋白相互作用发生在CH3结构域的接口处，但是我们的模拟表明，该接口在运动中充当铰链，其涉及CH2结构域的N末端相对于彼此的“开放”与“闭合”。如图16中可见，CH2结构域与FcgR在其末端相互作用。因此，尽管不希望被理论所束缚，

似乎在CH3接口处引入氨基酸突变赋予在Fc的N末端处的开放/闭合运动的量级和性质，和因此Fc与FcgR如何相互作用。参见，实施例4和表5。

[0117] 还研究生成的MD轨迹来基于分析它们的柔韧性概况和分析它们的环境来确定Fc结构中特定氨基酸残基位置的易变性。该算法使我们鉴定不能影响蛋白结构和功能的残基，提供了对于变体CH3结构域的后续设计阶段的残基特征和易变性的独特见解。该分析还使我们能够比较多种模拟，且在分析概况后基于异常值评价易变性。

[0118] 还研究生成的MD轨迹来确定蛋白中的相关残基运动和由它们之间的偶联导致的残基网络的形成。发现Fc结构中的动力学相关性和残基网络在理解蛋白作为动力学实体和用于发展在远端位点处的突变的影响的见解中是关键步骤。参见，例如实施例6

[0119] 因此，我们详细研究了突变对突变位点的局部环境的影响。A和B链之间的CH3的接口处的包装良好的核心的形成对于稳定的Fc结构中两条链的自发配对是关键的。良好包装是相互作用分子伴侣之间的强结构互补性连同接触基团之间的有利相互作用的结果。有利的相互作用由良好去除溶剂暴露的掩埋的疏水性接触和/或亲水性极性基团之间的互补性静电接触的形成导致的。这些疏水性和亲水性接触对CH3接口处的二聚体形成的自由能具有熵和焓的贡献。我们采用了多种算法来精确地模拟A和B链之间的CH3接口处的包装，且随后通过对一些相关物理化学特性进行评分而评价接口的热力学特性。

[0120] 我们采用了一些蛋白包装方法，包括柔韧的骨架来优化且制备用于我们计算筛选的大量变体的模型结构。包装之后，我们评价了许多项目，包括接触密度、碰撞评分、氢键、疏水性和静电。使用溶剂化模型使我们能够更准确地在蛋白中的特定位置突变为替代残基类型之后解决溶剂环境的影响和对比自由能差异。接触密度和碰撞评分提供了互补性(有效蛋白包装的关键方面)的量度。这些筛选程序基于基于知识的潜力或偶联分析方案的应用，其依赖于成对残基相互作用能和熵计算。

[0121] 这种全面的计算机芯片上分析提供了关于连接热点、不对称位点、腔和较差包装区、个别位点的结构动力学和局部解折叠位点与野生型相比的每个Fc变体的差异的更详细理解。所述计算分析的这些组合结果鉴定了没有优化和组合负责更低稳定性(例如，68℃的Tm)和/或<90％纯度的更低特异性的特定残基、序列/结构基序和腔。在第二个设计阶段，我们使用靶向的阳性设计来通过额外的点突变来专门解决这些假设，且使用上述方法和分析通过计算机芯片上工程改造来测试这些(参见，图24)。如实施例1-4中所述，实验验证在第二阶段中对于每种靶向设计进行设计以改进稳定性和纯度的Fc变体异源二聚体(Fc变体异源二聚体AZ17-AZ101)的表达和稳定性。

[0122] 在某些实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域是AZ17、或AZ18、或AZ19、或AZ20、或AZ21、或AZ22、或AZ23、或AZ24、或AZ25、或AZ26、或AZ27、或AZ28、或AZ29、或AZ30、或AZ21、或AZ32、或AZ33、或AZ34、或AZ35、或AZ36、或AZ37、或AZ38、或AZ39、或AZ40、或AZ41、或AZ42、或AZ43、或AZ44、或AZ45、或AZ46、或AZ47、或AZ48、或AZ49、或AZ50、或AZ51、或AZ52、或AZ53、或AZ54、或AZ55、或AZ56、或AZ57、或AZ58、或AZ59、或AZ60、或AZ61、或AZ62、或AZ63、或AZ64、或AZ65、或AZ66，或AZ67、或AZ68、或AZ69、或AZ70、或AZ71、或AZ72、或AZ73、或AZ74、或AZ75、或AZ76、或AZ77、或AZ78、或AZ79、或AZ80、或AZ81、或AZ82、或AZ83、或AZ84、或AZ85、或AZ86、

或AZ87、或AZ88、或AZ89、或AZ90、或AZ91、或AZ92、或AZ93、或AZ94、或AZ95、或AZ96、或AZ97、或AZ98、或AZ99、或AZ100、或AZ101。在一个示例性实施方案中，变体CH3结构域是AZ17、或AZ18、或AZ19、或AZ20、或AZ21、或AZ22、或AZ23、或AZ24、或AZ25、或AZ26、或AZ27、或AZ28、或AZ29、或AZ30、或AZ21、或AZ32、或AZ33、或AZ34、或AZ38、或AZ42、或AZ43、或AZ 44、或AZ45、或AZ46、或AZ47、或AZ48、或AZ49、或AZ50、或AZ52、或AZ53、或AZ54、或AZ58、或AZ59、或AZ60、或AZ61、或AZ62、或AZ63、或AZ64、或AZ65、或AZ66、或AZ67、或AZ68、或AZ69、或AZ70、或AZ71、或AZ72、或AZ73、或AZ74、或AZ75、或AZ76、或AZ77、或AZ78、或AZ79、或AZ81、或AZ82、或AZ83、或AZ84、或AZ85、或AZ86、或AZ87、或AZ88、或AZ89、或AZ91、或AZ92、或AZ93、或AZ94、或AZ95、或AZ98、或AZ99、或AZ100、或AZ101。在一个特定的实施方案中，变体CH3结构域是AZ33或AZ34。在另一个实施方案中，变体CH3结构域是AZ70或AZ90。

[0123] 在一个示例性实施方案中，CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，且其中第二多肽包含氨基酸修饰T366I、K392M和T394W。在另一个实施方案中，第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、S400E、F405A和Y407V且第二多肽包含氨基酸修饰T366I、N390R、K392M和T394W。

[0124] 在后续设计阶段中使用计算结构-功能分析、靶向工程改造和实验验证的这种迭代过程来设计表1中列出的剩余Fc变体，且导致具有高于90％纯度和具有大于70℃的CH3结构域熔解温度的增加稳定性的Fc变体异源二聚体。在某些实施方案中，Fc变体包含选自AZ1至AZ 136的氨基酸突变。在进一步实施方案中，Fc变体包含选自表4中列出的Fc变体的氨基酸突变。

[0125] 从第一和第二设计阶段鉴定了两个核心支架，支架1和支架2，其中将额外的氨基酸修饰引入这些支架以微调Fc变体异源二聚体的纯度和稳定性。对于开发支架1包括AZ8、AZ17-62和表6中列出的变体的详细描述，请参见实施例5。对于开发支架2包括AZ15和AZ63-101和表7中列出的变体的详细描述，请参见实施例6。

[0126] 支架1的核心突变包含L351Y_F405A_Y407V/T394W。支架1a包含氨基酸突变T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V且支架1b包含氨基酸突变T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V。参见，实施例5。

[0127] 在某些实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T394W。在一个方面，变体CH3结构域进一步包含F405和/或K392位的点突变。K392位的这些突变包括但不限于K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。F405位的这些突变包括但不限于F405I、F405M、F405S、F405S、F405V或F405W。在另一个方面，变体CH3结构域进一步包含T411和/或S400位的点突变。T411位的这些突变包括但不限于T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。S400位的这些突变包括但不限于S400E、S400D、S400R或S400K。在又另一个实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T394W，其中所述第一和/或第二多肽包含T366和/或L368位的进一步氨基酸修饰。T366位的这些突变包括但不限于T366A、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。在一个示例性实施方案中，T366位的氨基酸突变是T366I。在另一个示例性实施方案中，T366位的氨基酸突变是T366L。L368位的突变是L368D、L368R、L368T、L368M、L368V、L368F、L368S和L368A。

[0128] 在某些实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366L和T394W。在另一个实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366I和T394W。

[0129] 在某些其他实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366L、K392M和T394W。在另一个实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366I、K392M和T394W。

[0130] 在又另一个实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366L、K392M和T394W。在另一个实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽，其中第一多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366I、K392M和T394W。

[0131] 在某些实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366L和T394W。在另一个实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽，其中第一多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V，且第二多肽包含氨基酸修饰T366I和T394W。

[0132] 在示例性实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约74℃或更高的熔解温度(Tm)。在另一个实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约74℃或更高的熔解温度(Tm)并且异源二聚体具有约98％或更高的纯度。

[0133] 在某些实施方案中，分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有高于70℃的熔解温度(Tm)并且变体CH3结构域选自表6。

[0134] 支架2的核心突变包含L351Y_Y407A/T366A_K409F。支架2a包含氨基酸突变L351Y_Y407A/T366V_K409F并且支架2b包含氨基酸突变Y407A/T366A_K409F。参见实施例6。

[0135] 在某些实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A，且第二多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。在一个方面，变体CH3结构域进一步包含T366、L351和Y407位的点突变。T366位的这些突变包括但不限于T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。在一个特定的实施方案中，T366位的突变是T366V。L351位的突变包括但不限于L351I、L351D、L351R或L351F。Y407位的突变包括但不限于Y407V或Y407S。参见，表1和表4和实施例6中的CH3变体AZ63-AZ70。

[0136] 在示例性实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A，且第二多肽包含氨基酸修饰T366V和

K409F。

[0137] 在示例性实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约75.5℃或更高的熔解温度(Tm)。在另一个实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约75℃或更高的熔解温度(Tm)并且异源二聚体具有约90％或更高的纯度。

[0138] 在其他某些实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A，且第二多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F，其中变体CH3结构域包含T411、D399、S400、F405、N390、和/或K392位的一个或多个氨基酸修饰。D399位的这些突变包括但不限于D399R、D399W、D399Y或D399K。T411位的突变包括但不限于T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。S400位的突变包括但不限于S400E、S400D、S400R或S400K。F405位的突变包括但不限于F405I、F405M、F405S、F405S、F405V或F405W。N390位的突变包括但不限于N390R、N390K或N390D。K392位的突变包括但不限于K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。参见，表1和表4和实施例6中的CH3变体AZ71-101。

[0139] 在示例性实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽(本文也称为链A和链B)，其中第一多肽包含氨基酸修饰Y407A，且第二多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。在一个方面，该变体CH3结构域进一步包含氨基酸修饰K392E、T411E、D399R和S400R。在进一步实施方案中，变体CH3结构域包含第一和第二多肽，其中第一多肽包含氨基酸修饰D399R、S400R和Y407A，且第二多肽包含氨基酸修饰T366A、K409F、K392E和T411E。

[0140] 在示例性实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约74℃或更高的熔解温度(Tm)。在另一个实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有约74℃或更高的熔解温度(Tm)并且异源二聚体具有约95％或更高的纯度。

[0141] 在某些实施方案中，本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体，其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有高于70℃的熔解温度(Tm)并且变体CH3结构域选自表7。

[0142] 此外，设计具有改进的稳定性和纯度的Fc变体异源二聚体的这种新方法可以应用于Fc区的其他类型和同种型。在某些实施方案中，Fc区是人IgG Fc区。在进一步实施方案中，人IgG Fc区是人IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4Fc区。在一些实施方案中，Fc区来自选自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的免疫球蛋白。在一些实施方案中，IgG是选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgG4的亚型。

[0143]

表 1：用于生成Fc变体异源二聚体的CH3结构域氨基酸修饰。

	变体	链	Fc突变						
野生型 IgG1		A	-	-	-	-	-	-	-
		B	-	-	-	-	-	-	-
CH3变体	AZ1	A	L368D	K370Q	-	-	-	-	-
		B	E357R	L368R	-	-	-	-	-
	AZ2	A	L3511I	L368D	K370Q	-	-	-	-
		B	E357R	L368R	-	-	-	-	-
	AZ3	A	L351D	L368D	K370Q	-	-	-	-
		B	E357R	L368R		-	-	-	-
	AZ4	A	L368D	K370E	-	-	-	-	-
		B	E357R	L368R	-	-	-	-	-
	AZ5	A	L368D	K370E	-	-	-	-	-
		B	E357K	L368R	-	-	-	-	-
	AZ6	A	V397S	F405A	Y407V	-	-	-	-
		B	K392V	T394W	-	-	-	-	-

[0144]

AZ7	A	L351R	V397S	F405A	Y407V	-	-	-
	B	K392V	T394W	-	-	-	-	-
AZ8	A	L351Y	V397S	F405A	Y407V	-	-	-
	B	K392V	T394W	-	-	-	-	-
AZ9	A	V397S	F405A	Y407V	-	-	-	-
	B	L368R	K392V	T394W	-	-	-	-
AZ10	A	V397T	F405I	-	-	-	-	-
	B	K392V	T394H	-	-	-	-	-
AZ11	A	E357W	S364F	-	-	-	-	-
	B	Y349A	L351Y	K370I	-	-	-	-
AZ12	A	E357H	S364F	-	-	-	-	-
	B	L351Y	K370I	-	-	-	-	-
AZ13	A	E357W	S364F	-	-	-	-	-
	B	Y349A	L351Y	K370F	-	-	-	-
AZ14	A	E357H	S364F	-	-	-	-	-
	B	L351Y	K370F	-	-	-	-	-
AZ15	A	E357L	T366A	K409F	T411N	-	-	-
	B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-
AZ16	A	E357L	T366A	K409Y	T411N	-	-	-
	B	L351Y	L368T	Y407A	-	-	-	-
AZ17	A	L351Y	F405A	Y407V	-	-	-	-

[0145]

	B	T366I	T394W	-	-	-	-	-
AZ18	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366I	T394W	-	-	-	-	-
AZ19	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366L	T394W	-	-	-	-	-
AZ20	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366M	T394W	-	-	-	-	-
AZ21	A	L351Y	L368M	V397T	F405I	Y407V	-	-
	B	T366L	T394W	-	-	-	-	-
AZ22	A	L351Y	L368M	V397T	F405I	Y407V	-	-
	B	T366M	T394W	-	-	-	-	-
AZ23	A	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	L351I	T366I	T394W		-	-	-
AZ24	A	L351Y	V397T	L398D	F405M	Y407V	-	-
	B	S354E	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ25	A	L351Y	V397T	L398D	S400E	F405M	Y407V	-
	B	T366I	N390R	T394W	-	-	-	-
AZ26	A	R344H	L351Y	V397T	S400E	F405M	Y407V	-
	B	Q362R	T366I	T394W	-	-	-	-
AZ27	A	R344H	L351Y	V397T	D401E	F405M	Y407V	-
	B	Q362R	T366I	T394W	-	-	-	-

[0146]

AZ28	A	Q347R	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	S354E	K360E	T366I	T394W	-	-	-
AZ29	A	Q347R	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	S354N	K360E	T366I	T394W	-	-	-
AZ30	A	T350V	L351Y	V397T	S400E	F405M	Y407V	-
	B	T350V	T366I	T394W	T411R	-	-	-
AZ31	A	R344H	L351Y	V397T	L398D	F405M	Y407V	-
	B	T366I	T394W	T411R	-	-	-	-
AZ32	A	Q347R	T350V	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-
	B	T350V	K360E	T366I	T394W	T411R	-	-
AZ33	A	L351Y	F405A	Y407V	-	-	-	-
	B	T366I	K392M	T394W	-	-	-	-
AZ34	A	L351Y	S400E	F405A	Y407V	-	-	-
	B	T366I	N390R	K392M	T394W	-	-	-
AZ35	A	L351Y	K370Q	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409R	T411Q	-	-
AZ36	A	L351Y	K370Q	G371D	F405S	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409R	T411Q	-	-
AZ37	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	L398D	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	T394W	K409R	T411Q	-	-
AZ38	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	S400E	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	N390R	T394W	K409R	T411Q	-

[0147]

AZ39	A	L351Y	K370Q	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	T366I	T394W	T411R	-	-	-	-
AZ40	A	L351Y	K370Q	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	T366I	T394W	K409M	T411R	-	-	-
AZ41	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	L398D	F405M	Y407V
	B	T366I	T394W	K409M	T411R	-	-	-
AZ42	A	R344H	L351Y	K370Q	G371D	S400E	F405M	Y407V
	B	T366I	N390R	T394W	K409M	T411R	-	-
AZ43	A	L351Y	K370T	G371D	F405I	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364R	T394W	-	-	-	-
AZ44	A	L351Y	K370T	G371D	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364R	T394W	K409I	-	-	-
AZ45	A	R344H	L351Y	K370T	G371D	S400E	F405M	Y407V
	B	E357Q	S364R	T366I	N390R	T394W	K409I	-
AZ46	A	R344H	L351Y	K370T	G371D	F405M	Y407V	-
	B	E357Q	S364R	T366I	T394W	K409I	T411R	-
AZ47	A	L351Y	K370A	G371S	D399R	F405S	Y407V	-
	B	E357Q	Q362R	T364Y	T366I	T394W	K409S	-
AZ48	A	L351Y	V397S	D399W	F405M	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409M	-	-	-
AZ49	A	L351Y	V397S	D399Y	F405M	Y407V	-	-
	B	Q362R	T366I	T394W	K409I	-	-	-

[0148]

AZ50	A	R344H	L351Y	V397T	L398D	D399W	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	T394W	K409M	-	-	-
AZ51	A	R344H	L351Y	V397T	D399W	S400E	F405M	Y407V
	B	Q362R	T366I	T394W	K409M	-	-	-
AZ52	A	L368V	K370F	F405I	Y407V	-	-	-
	B	E357Q	S364Y	T366I	T394W	-	-	-
AZ53	A	L368V	K370Y	F405I	Y407V	-	-	-
	B	E357Q	S364Y	T394W	-	-	-	-
AZ54	A	R344H	L368V	K370Y	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	Q362R	S364Y	T394W	-	-	-
AZ55	A	L368V	K370Y	S400E	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364Y	N390R	T394W	-	-	-
AZ56	A	L368V	K370Y	L398D	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	S364Y	T394W	T411R	-	-	-
AZ57	A	R344H	L351Y	K370Y	F405M	Y407V	-	-
	B	E357Q	Q362R	T364T	T366I	T394W	-	-
AZ58	A	L368V	V397T	F405M	Y407V	-	-	-
	B	T366Y	T394W	-	-	-	-	-
AZ59	A	L368V	K370Q	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	T366Y	T394W	-	-	-	-	-
AZ60	A	R344H	L368V	V397T	S400E	F405M	Y407V	-
	B	Q362R	T366Y	T394W	-	-	-	-

[0149]

AZ61	A	L368V	V397T	S400E	F405M	Y407V	-	-
	B	T366Y	N390R	T394W	-	-	-	-
AZ62	A	L368V	V397T	L398D	F405M	Y407V	-	-
	B	T366Y	T394W	T411R	-	-	-	-
AZ63	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ64	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-
AZ65	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	L351F	Y407A	-	-	-	-	-
AZ66	A	T366S	K409F	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ67	A	T366C	K409F	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ68	A	T366L	K409F	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ69	A	T366M	K409F	-	-	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ70	A	T366V	K409F	-	-	-	-	-
	B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-
AZ71	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	L351I	T366S	L368F	Y407A	-	-	-

[0150]

AZ72	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	D399W	Y407A	-	-	-	-	-
AZ73	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	D399W	S400D	Y407A	-	-	-	-
AZ74	A	T366A	K409F	-	-	-	-	-
	B	D399W	S400E	Y407A	-	-	-	-
AZ75	A	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-
	B	D399W	S400D	Y407A	-	-	-	-
AZ76	A	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-
	B	G371D	D399W	Y407A	-	-	-	-
AZ77	A	T366A	K409F	T411R	-	-	-	-
	B	K370Q	G371D	D399W	Y407A	-	-	-
AZ78	A	T366A	N390R	K409F	-	-	-	-
	B	D399Y	S400D	Y407A	-	-	-	-
AZ79	A	Q362R	T366A	K409F	T411K	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ80	A	Q362R	T366A	K409F	T411R	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ81	A	Q362K	T366A	K409F	T411R	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ82	A	T366A	N390K	K392R	K409F	T411R	-	-
	B	S400E	Y407A	-	-	-	-	-
AZ83	A	T366A	N390K	K392R	K409F	T411K	-	-
	B	S400E	Y407A	-	-	-	-	-
AZ84	A	T366A	N390K	K409F	T411R	-	-	-
	B	S400D	Y407A	-	-	-	-	-
AZ85	A	T366A	K392L	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ86	A	T366A	K392L	K409F	T411E	-	-	-

[0151]

	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ87	A	T366A	K392L	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399K	Y407A	-	-	-	-	-
AZ88	A	T366A	K392L	K409F	T411E	-	-	-
	B	D399K	Y407A	-	-	-	-	-
AZ89	A	T366A	K392M	K409F	T411E	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ90	A	T366A	K392M	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ91	A	T366A	K392F	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	F405V	Y407A	-	-	-	-
AZ92	A	T366A	K409F	T411E	-	-	-	-
	B	D399R	S400E	Y407A	-	-	-	-
AZ93	A	T366A	K409F	T411E	-	-	-	-
	B	D399R	S400D	Y407A	-	-	-	-
AZ94	A	T366A	K392E	K409F	T411E	-	-	-
	B	D399R	S400R	Y407A	-	-	-	-
AZ95	A	T366A	K392E	K409F	T411D	-	-	-
	B	D399R	S400R	Y407A	-	-	-	-
AZ96	A	Q362E	T366A	K409F	T411W	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ97	A	Q362D	T366A	K409F	T411W	-	-	-
	B	D399R	Y407A	-	-	-	-	-
AZ98	A	S364Y	T366A	K409F	T411R	-	-	-
	B	Y407A	-	-	-	-	-	-
AZ99	A	T366V	K409W	-	-	-	-	-
	B	L368V	Y407S	-	-	-	-	-
AZ100	A	T366V	K409W	-	-	-	-	-
	B	L351Y	L368S	Y407A	-	-	-	-

[0152]

AZ101	A	T366V	K409W	-	-	-	-	-
	B	L351Y	Y407A	-	-	-	-	-
AZ102	A	E357Q	S364F	K392E	-	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400R	-	-	-	-
AZ103	A	E357Q	S364F	K392E	V397E	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400R	-	-	-	-
AZ104	A	E357Q	S364F	N390D	K392E	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400K	-	-	-	-
AZ105	A	E357Q	S364F	K370E	G371W	-	-	-
	B	E357Q	K360R	S364N	K370F	-	-	-
AZ106	A	S354R	D356K	E357Q	S364F	-	-	-
	B	S354E	K370F	K439E	-	-	-	-
AZ107	A	Q347R	E357Q	S364F	-	-	-	-
	B	Q347E	K360E	K370F	-	-	-	-
AZ108	A	E357Q	S364F	K370E	-	-	-	-
	B	E357R	K370F	-	-	-	-	-
AZ109	A	E357Q	S364F	L368D	K370E	-	-	-
	B	E357R	K370F	-	-	-	-	-
AZ110	A	E357Q	S364F	K370T	G371D	-	-	-
	B	E357Q	S364R	K370F	-	-	-	-
AZ111	A	E357Q	S364Y	K392E	-	-	-	-
	B	K370F	V397R	S400K	-	-	-	-
AZ112	A	E357Q	S364Y	K392E	-	-	-	-
	B	L368A	K370F	V397R	S400K	-	-	-
AZ113	A	K409F	T411E	-	-	-	-	-
	B	L368V	D399R	S400D	-	-	-	-
AZ114	A	K409F	T411E	-	-	-	-	-
	B	L368V	D399K	S400D	-	-	-	-
AZ115	A	K409F	-	-	-	-	-	-

[0153]

	B	L368V	D399Y	-	-	-	-	-
AZ116	A	E357Q	K409F	T411R	-	-	-	-
	B	L368A	K370F	-	-	-	-	-
AZ117	A	S354R	D356K	K409F	T411R	-	-	-
	B	S354E	L368V	S400E	K439E	-	-	-
AZ118	A	K360E	K370E	-	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	-	-	-	-	-
AZ119	A	K360E	K370E	-	-	-	-	-
	B	Y349K	E357R	-	-	-	-	-
AZ120	A	S354E	K360E	K370E	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	-	-	-	-	-
AZ121	A	K360E	L368D	K370E	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	-	-	-	-	-
AZ122	A	K360E	L368D	K370E	-	-	-	-
	B	Y349R	E357R	T411R	-	-	-	-
AZ123	A	K360E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	Y349R	E357Q	S364R	-	-	-	-
AZ124	A	K360E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	Y349R	E357Q	S364K	-	-	-	-
AZ125	A	S364E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	E357Q	S364R	G371R	-	-	-	-
AZ126	A	S364E	K370T	G371D	-	-	-	-
	B	E357Q	S364R	G371K	-	-	-	-
AZ127	A	G371D	T411E	-	-	-	-	-
	B	G371R	T411R	-	-	-	-	-
AZ128	A	G371D	T411E	-	-	-	-	-
	B	G371K	T411R	-	-	-	-	-
AZ129	A	Y349C	L351Y	V397T	F405M	Y407V	-	-
	B	S354C	T366I	T394W	-	-	-	-

[0154]

AZ130	A	L351Y	S354C	V397T	F405M	Y407V	-
	B	Y349C	T366I	T394W	-	-	-
AZ132	A	L368A	F405W	Y407V	-	-	-
	B	T366W	-	-	-	-	-

[0155] 本文描述的Fc区包含CH3结构域或其片段，并且可以额外地包含一个或多个额外的恒定区结构域或其片段，包括铰链、CH1或CH2。将被理解的是，Fc氨基酸残基的编号是如Kabat等人，1991，NIH Publication 91-3242，National Technical Information Service，Springfield，Va中的EU索引的编号。如“Kabat中所述的EU索引”是指人IgG1Kabat抗体的EU索引编号。为了方便，表B提供了来自人lgG1的CH2和CH3结构域的根据Kabat中所述的EU索引编号的氨基酸。

[0156] 表B

[0157]

CH2 结构域							CH3 结构域					
EU No.	氨基酸	EU No.	氨基酸	EU No.	氨基酸		EU No.	氨基酸	EU No.	氨基酸	EU No.	氨基酸
231	A	271	P	311	Q		341	G	381	W	421	N
232	P	272	E	312	D		342	Q	382	E	422	V
233	E	273	V	313	W		343	P	383	S	423	F
234	L	274	K	314	L		344	R	384	N	424	S
235	L	275	F	315	N		345	E	385	G	425	C
236	G	276	N	316	G		346	P	386	Q	426	S
237	G	277	W	317	K		347	Q	387	P	427	V
238	P	278	Y	318	E		348	V	388	E	428	M
239	S	279	V	319	Y		349	Y	389	N	429	H
240	V	280	D	320	K		350	T	390	N	430	E
241	F	281	G	321	C		351	L	391	Y	431	A
242	L	282	V	322	K		352	P	392	K	432	L
243	F	283	E	323	V		353	P	393	T	433	H
244	P	284	V	324	S		354	S	394	T	434	N
245	P	285	H	325	N		355	R	395	P	435	H
246	K	286	N	326	K		356	D	396	P	436	Y
247	P	287	A	327	A		357	E	397	V	437	T
248	K	288	K	328	L		358	L	398	L	438	Q
249	D	289	T	329	P		359	T	399	D	439	K
250	T	290	K	330	A		360	K	400	S	440	S
251	L	291	P	331	P		361	N	401	D	441	L
252	M	292	R	332	I		362	Q	402	G	442	S
253	I	293	E	333	E		363	V	403	S	443	L
254	S	294	E	334	K		364	S	404	F	444	S
255	R	295	Q	335	T		365	L	405	F	445	P
256	T	296	Y	336	I		366	T	406	L	446	G
257	P	297	N	337	S		367	C	407	Y	447	K
258	E	298	S	338	K		368	L	408	S		
259	V	299	T	339	A		369	V	409	K		
260	T	300	Y	340	K		370	K	410	L		
261	C	301	R				371	G	411	T		
262	V	302	V				372	F	412	V		
263	V	303	V				373	Y	413	D		
264	V	304	S				374	P	414	K		
265	D	305	V				375	S	415	S		
266	V	306	L				376	D	416	R		
267	S	307	T				377	I	417	W		
268	H	308	V				378	A	418	Q		
269	E	309	L				379	V	419	Q		
270	D	310	H				380	E	420	G		

。

[0158] 在某些实施方案中，Fc变体包含CH2结构域。在一些实施方案中，CH2结构域是变体CH2结构域。在一些实施方案中，变体CH2结构域在第一和/或第二多肽链中包含不对称氨基酸取代。在一些实施方案中，异源多聚体在CH2结构域中包含不对称氨基酸取代，使得所述异源多聚体的一条链选择性结合Fc受体。

[0159] 在某些实施方案中，异源多聚体选择性结合Fc受体。在一些实施方案中，Fc受体是Fcγ受体家族的成员。在一些实施方案中，受体选自FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIa和FcγRIIIb。在一个实施方案中，CH2结构域包含促进与Fcγ受体的选择性结合的不对称氨基酸修饰。

[0160] 在一些实施方案中，异源多聚体与FcγRIIIa选择性结合。在一些实施方案中，异源多聚体包含选自S267D、K392D和K409D的不对称氨基酸取代。在一些实施方案中，异源多聚体与FcγRIIa选择性结合。在一些实施方案中，异源多聚体包含选自S239D、K326E、A330L

和I332E的不对称氨基酸取代。在一些实施方案中，异源多聚体与FcγRIIb选择性结合。在一些实施方案中，异源多聚体包含选自S239D、D265S、E269K和I332E的不对称氨基酸取代。在一些实施方案中，异源多聚体与FcγRIIIa和FcγRIIa选择性结合。在一些实施方案中，异源多聚体包含选自S239D、D265S和S298A的不对称氨基酸取代。在一些实施方案中，异源多聚体与FcγRIIIa和FcγRIIb选择性结合。在一些实施方案中，异源多聚体包含选自S239D、S298A、K326E、A330L和I332E的不对称氨基酸取代。在一些实施方案中，异源多聚体与FcγRIIa和FcγRIIb选择性结合。在一些实施方案中，异源多聚体包含选自S239D、D265S、S298A和I332E的不对称氨基酸取代。

[0161] 在某些实施方案中是设计包含本文所述的异源多聚体的多功能治疗剂的方法。在一些实施方案中是设计包含变体Fc异源二聚体的双功能治疗剂的方法。在一些实施方案中是用于设计用CH2结构域中的突变衍生的变体Fc异源二聚体的CH3结构域中的不对称突变的方法。在一些实施方案中是基于不对称Fc中的突变设计对于不同FcγR受体的选择性的方法。在某些实施方案中是设计偏爱FcγR受体与Fc分子的一面结合的突变的方法。在某些实施方案中是设计偏爱FcγR受体与本文所述异源多聚体的不对称Fc支架的仅一面相互作用的极性驱动者的方法。

[0162] 在一些实施方案中，提供了包含不对称Fc的CH2结构域中的突变的多肽，所述突变导致优先的FcγR受体选择性概况。在一些实施方案中，CH3结构域中的突变导致异源二聚的Fc的优先形成。在某些实施方案中是基于本文所述不对称Fc设计双特异性治疗实体的方法。在某些实施方案中是基于本文所述不对称Fc设计多特异性治疗实体的方法。

[0163] 单克隆抗体如IgG是由两条等同重多肽链和两条轻多肽链构成的对称分子(图14)，每条包含多个免疫球蛋白(Ig)结构域。mAb的IgG类存在于四种同种型(lgG1、lgG2、lgG3、或lgG4)之一中。分别地，重链由四个Ig结构域(VH、CH1、CH2和CH3)构成，且轻链由两个(VL和CL)Ig结构域构成。来自每个重链的VH和CH1结构域与轻链的VL和CL结构域组合以形成mAb的两个Fab(“片段抗原结合”)臂。两条重链的CH3和CH2结构域经由跨CH3结构域的蛋白-蛋白接触和CH2结构域中的糖基化相互作用，以形成同源二聚的Fc(“可结晶的片段”)区。抗体的CH1和CH2结构域之间的接头区构成抗体分子的铰链区。除连接mAb的Fab和Fc区以外，铰链也保持跨越两条重链的二硫键链接，且使它们保持在一起。铰链区中的氨基酸和二硫化连接的数量在IgG的四种同种型之间是显著不同的。IgG分子中的糖基化模式可以是显著不同的，在IgG分子中已经观察到约30个不同的碳水化合物部分[Arnold J.N.;Wormald M.R.;Sim R.B.;Rudd P.M.和Dwek R.A.(2007)Annual Reviews of Immunology 25,21-50]。

[0164] 单克隆抗体结构的对称性质导致两条Fab臂都具有成熟以识别相同表位的抗原结合能力亲和力。在另一末端，抗体分子的Fc部分参与与免疫或“效应”细胞上的各种受体分子的相互作用，且这些相互作用中的一些负责介导效应功能如抗体依赖的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)和补体活化。通常，效应功能涉及免疫应答，其导致病原体或毒素中和和消除、补体活化、和来自体液免疫系统的吞噬应答。效应细胞上的FcγR受体(FcγR)分子接触参与完整抗原-抗体免疫复合物的活化的IgG抗体的Fc，以介导和调节效应应答。优化基于单克隆抗体的蛋白治疗剂与这些FcγR受体的相互作用可以导致改进这些药物候选的效力。

[0165] 在人中，有三种已知种类的FcγR，每一类内具有进一步的多态类型。已知lgG1分子中的Fc以纳摩尔范围内的解离常数结合FcγRI(CD64)，而FcγRII(CD32)和fcγRIII(CD16)结合以微摩尔范围发生[Bruhns P.;Iannascoli B.;England P.;Mancardi D.A.;Fernandez N.;Jorieux S.和Daeron M.(2009)Blood 113:3716-25]。高亲和力FcγRI受体可以结合单体形式的IgG，而低亲和力FcγRII和FcγRIII受体由于抗体亲抗原性效应仅可以结合抗原-抗体免疫复合物或IgG聚集体。不同IgG形式对于不同FcγR具有不同的亲和力；具体而言，IgG1和IgG3表现出更强的活性。Fcγ受体是跨膜蛋白的胞外结构域，且具有参与调节细胞内的信号传递途径的胞质结构域。当与抗体介导的免疫复合物结合后聚集在免疫细胞表面上时，根据与这些细胞表面受体的胞质端上的FcγR连接的信号传递单元的性质，这些分子调节效应应答[Nimmerjahn F.和Ravetch J.V.(2008)Nature Immu Rev 8(1):34-47]。

[0166] 在人染色体水平，三个基因编码FcγRI(FcγRIA、FcγRIB、FcγRIC)和FcγRII(FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIC)且两个基因编码FcγRIII(FcγRIIIA、FcγRIIIB)。在结合IgG的人Fcγ受体中，已经显示FcγRIA、FcγRIC和FcγRIIIA类型与共同γ-链信号衔接蛋白膜相关，其含有基于细胞质免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)，所述活化基序导致效应功能的活化。FcγRIIA和FcγRIIC还包含细胞质ITAM，但没有共同γ-链信号衔接蛋白。同时，FcγRIIB连接至基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。导致ITIM磷酸化的FcγRIIB活化导致活化信号传递级联的抑制。FcγRIIIB，尽管缺乏基于酪氨酸的免疫调节细胞质尾部，但是具有GPI(糖基-磷脂酰-肌醇)锚，且已经显示有助于在FcγRIIA存在的情况下活化一些粒细胞。

[0167] 表C:Fcγ受体特征

[0168]

受体	等位基因	信号传递基序	功能	IgG 结合亲和力
FcγRI (CD64)		ITAM	活化	IgG1 ≈ IgG3 > IgG4
FcγRIIa (CD32a)	131(H/R)	ITAM	活化	IgG1 > IgG3 > IgG2 > IgG4
FcγRIIb (CD32b)	232(I/T)	ITIM	抑制	IgG3 ≈ IgG1 ≈ IgG4 > IgG2
FcγRIIc (CD32c)	57(Q/截短)	ITAM	活化	IgG3 ≈ IgG1 ≈ IgG4 > IgG2
FcγRIIIa (CD16a)	158(V/F)	ITAM	活化	IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2
FcγRIIIb (CD16b)	NA1/2 SH/78(A/D)	GPI	活化	IgG3 > IgG1

。

[0169] ITAM:基于免疫受体酪氨酸的活化基序；ITIM:基于免疫受体酪氨酸的抑制基序；GPI糖基磷脂酰肌醇

[0170] 尽管ITAM和ITIM基序和相关受体分子的功能作用是已知的，但是组合的信号传递的调节的性质和机制还没有完全理解，特别是当与参与信号转导的许多其他免疫细胞表面受体和衔接分子(例如BCR、CD22、CD45等)的活性相组合时。在该背景下，设计可以以精细的选择性概况与这些Fcγ受体相互作用的Fc样分子在去卷积和调节这种具有精细调节活性的受体分子的作用的任何尝试中是有价值的支架。

[0171] 在设计可以区分FcγR的抗体分子的背景中，下列事实使努力变得复杂：FcγRII和FcγRIII受体类型的细胞外Fc结合部分表现出高度序列相似性(图15)，这可以至少部分归因为祖传区段性重复。FcγRII受体两个主要类型A和B具有69％序列同一性，而FcγRIIA和FcγRIIIA表现出约44％序列同一性。FcγRIIB和FcγRIIC的差异仅在于胞外区的2个残基，尽管它们的胞内区显著不同，显著之处在于分别存在ITIM和ITAM基序。因此，可以预期的是，需要结合一种受体的治疗性抗体分子也可能与其他受体类型结合，可能导致不希望的治疗效果。

[0172] 进一步使问题复杂化的是，每个受体类型呈现多个单核苷酸多态性(SNP)和拷贝数变化(CNV)。获得的受体多样性差异地影响其与IgG的亲和力和其作用机制。这些遗传变化可以影响特定IgG亚类对于FcγR受体的亲和力，改变下游效应事件或影响改变受体表达水平的机制，导致功能相关的表型、非功能性或功能未知的受体变体(Bournazos S.;Woof J.M.;Hart S.P.和Dransfield I.(2009)Clinical and Experimental Immunology 157(2):244-54)。它们可能导致复杂效果，改变活化和抑制受体信号传递之间的平衡，导致疾病易患表型的生成。

[0173] 这些等位基因变化中的一些列举在表C中。值得注意的是，FcγRIIa中的R131变体是用lgG1的高响应者，而可替代的H131变体显示出与IgG2和IgG3的更有效相互作用。在FcγRIIIa的情况下，对于158位V纯合的供体表现出与纯合F/F158个体相比增加的NK细胞活性，这是由于前者同种异型对于人lgG1、lgG3和lgG4的更高亲和力。FcγRIIIb的等位基因变体NA1和NA2是四氨基酸取代的结果，其依次导致受体糖基化的差异。NA1等位基因呈现出由中性粒细胞的免疫复合物的增强的结合和吞噬作用。FcγRIIB具有两种已知的等位基因变体232I和232T。已知232T变体的阴性调节活性强烈受损。已经报道了FcγR多态性的频率和其与对感染或疾病状况的易感性的差异响应的关联，所述疾病状况如系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、血管炎、免疫介导的血小板紫癜(ITP)、重症肌无力、多发性硬化症(MS)、和免疫神经病变(吉兰-巴雷综合征(GBS))。

[0174] 已经表明了FcγR基因、特别是对于FcγRIIIB、FcγRIIc和FcγRIIIA的基因座中拷贝数变化，且已经注意到这些差异与这些受体的细胞表面表达的进一步关联。相比之下，FcγRIIa和FcγRIIb没有显示基因拷贝数变化。事实上，FcγRIIIb的低拷贝数已经与自身免疫性疾病系统性红斑狼疮(SLE)中的肾小球肾炎相关[Aitman TJ等人.(2006)Nature16;439(7078):851-5]。鉴于非信号传递GPI模块锚定FcγRIIIb受体的事实，这是特别有趣的。可以推测这些FcγRIIIb受体的存在可以潜在地充当Fc与其他信号传递FcγR的相互作用的竞争性抑制剂。FcγRIIc中的拷贝数变化的影响也是特别有趣的。FcγRIIc中202位处的C/T SNP将谷氨酰胺残基转换为终止密码子，防止了功能蛋白的生成。FcγRIIc的功能开放阅读框在9％的健康个体(白人群体)中表达，且在ITP群体中该等位基因有显著过高比例的呈现(19％)，暗示这些表型对于ITP的倾向[Breunis WB等人.(2008)Blood111(3):1029-38]。已经表明，在NK细胞上表达功能FcγRIIc的个体中，这些受体以比FcγRIIIa更大的程度介导实现的ADCC。这样的与这些多态性和遗传变化相关的复杂性突出了个性化治疗策略的需要，要求高度定制的治疗剂。

[0175] 各种效应细胞在这些FcγR受体以及在它们的体液和组织分布中不同，因此有助于它们的活化和作用机制中的变化[表D]。调谐治疗性抗体对识别特定FcγR类型的选择性和

调节某些类别的效应细胞的影响，导致对于特定疾病状况的效应机制的优化。根据所治疗的疾病状况，这意在选择性活化或抑制特定效应物形式。

[0176] 表D：FcγR的细胞分布

[0177]

	FcγRI (CD64)	FcγRIIa (CD32a)	FcγRIIb (CD32b)	FcγRIIc (CD32c)	FcγRIIIa (CD16a)	FcγRIIIb (CD16b)	分布
淋巴样							
B细胞			✓				血液
浆细胞			✓				组织
NK细胞				✓	✓		血液
骨髓样							
单核细胞	✓	✓	✓		✓		血液
树突状细胞	✓	✓	✓		✓		组织
血小板		✓					血液
巨噬细胞	✓	✓	✓		✓		组织
中性粒细胞	✓		✓			✓	血液
嗜伊红细胞	✓					✓	血液
嗜碱细胞			✓				血液
肥大细胞			✓			✓	组织

。

[0178] 此外，FcγR也由滤泡树突状细胞、内皮细胞、小胶质细胞、破骨细胞和系膜细胞表达。目前，这些其他细胞上FcγR表达的功能意义是未知的。

[0179] 高亲和力FcγRI由三个C型免疫球蛋白超家族(IgSF)结构域构成，而低亲和力FcγRII和FcγRIII各自由两个C型IgSF结构域构成。已经通过晶体学解析了FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa和FcγRIIIb受体蛋白的结构。在这些结构中的两个IgSF结构域相对于彼此50-55度定位，且通过铰链连接。

[0180] Fc-FcγR共复合物的公开可获得的结构是Fc-FcγRIIIb系统的结构，且复合物中的FcγR几何学保持与蛋白的apo状态中观察到的非常接近[Sondermann P.;Huber R.;Oosthuizen V.和Jacob U.(2000)Nature 406,267-273.;Radaev S.;Motyaka S.;Fridman W.;Sautes-Fridman C.和Sun P.D.(2001)J Biol Chem 276,16469-16477;Sondermann P.等人.Biochem Soc Trans.2002Aug;30(4):481-6;Sondermann P,Oosthuizen V.Immunol Lett.2002Jun 3;82(1-2):51-6;Radaev S,Sun P.Mol Immunol.2002May;38(14):1073-83.][图16]。受体之间的强序列和结构相似性形成了与其他受体结合的Fc的比较模型的基础。另一方面，这些受体分子之间的序列和结构相似性也使设计在受体和其不同同种型之间具有精细选择性的Fc变得具有挑战性。

[0181] 在基于晶体学评价Fc-FcγR复合物的结构之前，存在如下问题：Fc分子中的2倍对称轴是否意味着对于Fc-FcγR结合的两个潜在结合位点和有效的2:1化学计量比。Fc-FcγR相互作用的基于核磁共振(NMR)的结构研究表明，Fc与在分子的一个面上的一个FcγR的结合诱导了构象变化，所述构象变化排除了第二个FcγR分子与相同抗体分子的Fc的结合[Kato K.等人(2000)J Mol Biol.295(2):213-24]。Fc-FcγRIIIb的可获得的共晶体复合

物的几何学验证了以1:1化学计量的不对称取向的FcγR与Fc的结合。如图16中所示,FcγR结合至马蹄形Fc分子的一个末端上的裂口,且与来自两条链的CH2结构域接触。

[0182] 丙氨酸扫描诱变[Shields RL等人.(2001)JBC 276(9):6591-604]提供了关于Fc与不同受体类型相互连接且因此参与Fc-FcγR相互作用和识别的残基的见解。传统上,已经将治疗性抗体的优化聚焦在表现出与活化受体FcγRIII结合增加[美国专利号6,737,056]或与FcγRIIb亲和力降低[US2009/0010920A1]的突变。在所有这些可替代的变体中,同时在两条链中引入突变。

[0183] 单克隆抗体经常通过诱导靶标和效应免疫细胞的空间定位而表现出它们的治疗活性。天然抗体通过与使用其Fab结构域的靶标和使用Fc结构域的效应细胞相互作用而介导这个。它们能够面对面并置免疫复合物和效应细胞,使得可以诱导细胞介导的应答。对于FcγR信号传递所需的抗体亲抗原性(其起源于免疫复合物的形成,所述形成涉及多个抗体分子靶向单个靶标)是免疫作用的时空组织的重要性的另一个实例。

[0184] 对于作为mAb分子的效应活性的部分诱导的细胞信号传递还存在时空方面。细胞信号传递如基于FcγR分子活化的那些涉及相关受体分子在被称为脂质筏的膜结构域区域内的定位。脂质筏富含鞘糖脂和胆固醇和几类上游信号转导分子,包括Src家族激酶。细胞刺激之后,招募各种信号分子、衔接蛋白和信号传递激酶以及磷酸酶。脂质筏处的分子组装对于信号转导是重要的。

[0185] 非天然设计策略,组合不同的抗原特异性和增加的亲和力以提供更好的结合特性是双特异性治疗剂设计的基础。设计双特异性抗体或其他形式的双功能或多功能蛋白治疗剂以介导靶标和各种效应细胞之间的相互作用[Müller&Kontermann(2010)BioDrugs 24(2):89-98]。将多特异性治疗分子工程改造以便使辅助性T细胞或其他免疫效应细胞重新针对特定靶细胞。

[0186] 在另一个实施方案中,本发明涉及基于与FcγRIIa、FcγRIIb和/或FcγRIIIa的计算的结合亲和力在计算机芯片上鉴定Fc变体多肽的方法。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括在计算机芯片上计算所述Fc变体多肽的静电、溶剂化作用、包装、包装密度、氢结合和熵效应。在又另一个实施方案中,本发明的方法进一步包括构建Fc变体多肽和在哺乳动物细胞中表达治疗性抗体背景中的所述多肽且进一步表达所述抗体。在又另一个实施方案中,本发明的方法包括:通过位点定向诱变、基于PCR的诱变、盒式诱变或从头合成而构建在计算机芯片上鉴定的Fc变体多肽。

[0187] 在合成Fc支架的设计中考虑的因素包括在计算机芯片上计算立体排斥、埋藏的接口区域的改变、相对接触密度、相对溶剂化作用和静电影响。所有这些基质用来达到亲和力评分。

[0188] 在一个方面,本申请描述了经由设计建立在异源二聚体Fc上的不对称支架而实现精细的FcγR选择性概况的分子设计。该支架允许CH2结构域中的不对称突变以实现多种新的选择性概况。此外,支架具有用于工程改造多功能(双、三、四或五功能)治疗分子的固有特征。

[0189] 可以对于对新生Fc受体(FcRn)的pH依赖性结合特性将不对称支架进行优化,从而能够更好地再循环分子且增强其半衰期和相关的药代动力学特性。

[0190] 可以对于与功能相关的FcγRI受体同种异型的结合将不对称支架进行优化。Fcγ

RI是参与慢性炎性病症的巨噬细胞上的主要标记，所述慢性炎性病症如类风湿关节炎、特应性皮炎、银屑癣和多种肺病。

[0191] 可以对于蛋白A结合对不对称支架进行优化。蛋白A结合经常用于分离和纯化抗体分子。可以将突变引入不对称支架以避免治疗剂在储存过程中的聚集。

[0192] 因此，特别考虑本发明的Fc变体可以尤其含有一种或多种额外的氨基酸残基取代、突变和/或修饰，其导致具有优选特征的抗体，所述特征包括但不限于：增加的血清半衰期、增加结合亲和力、降低的免疫原性、增加的产量、增强或降低的ADCC和CDC活性、改变的糖基化和/或二硫键和修饰的结合特异性。

[0193] 可以考虑，本发明的Fc变体可以具有相对于可比较的分子的其他改变的特性，包括在哺乳动物、特别是人中增加的体内半衰期(例如，血清半衰期)，在体内(例如，血清半衰期)和/或在体外(例如，保质期)增加的稳定性和/或增加的熔解温度(Tm)。在一个实施方案中，本发明的Fc变体具有下列的体内半衰期：大于15天、大于20天、大于25天、大于30天、大于35天、大于40天、大于45天、大于2个月、大于3个月、大于4个月、或大于5个月。在另一个实施方案中，本发明的Fc变体具有下列的体外半衰期(例如，液体或粉末制剂)：大于15天、大于30天、大于2个月、大于3个月、大于6个月、或大于12个月、或大于24个月、或大于36个月、或大于60个月。

[0194] 本领域技术人员还将理解的是，本发明的Fc变体当施用于受试者时可以具有改变的免疫原性。相应地，可以考虑使Fc变体的免疫原性的最小化的变体CH3结构域通常对于治疗应用是更期望的。

[0195] 本发明的Fc变体可以与其他Fc修饰组合，包括但不限于改变效应物功能的修饰。本发明包括组合本发明的Fc变体与其他Fc修饰来提供抗体或Fc融合蛋白中累加的、协同的或新的特性。这种修饰可以是在铰链、CH1、或CH2、(或CH3，条件是它没有阴性改变本发明的变体CH3结构域的稳定性和纯度特性)结构域或它们的组合中。考虑到，本发明的Fc变体增强与它们相组合的修饰的特征。例如，如果本发明的Fc变体与突变体组合(已知所述突变体以比包含野生型Fc区的可比较分子更高的亲合力结合FcγRIIIA)；那么与本发明的突变体的组合导致FcγRIIIA亲合力方面更高倍数的增强。

[0196] 在一个实施方案中，本发明Fc变体可以与其他已知的Fc变体组合，其他已知的Fc变体如下列参考文献中公开的那些：Duncan等人，1988，Nature 332:563-564；Lund等人，1991，J Immunol 147:2657-2662；Lund等人，1992，Mol Immunol 29:53-59；Alegre等人，1994，Transplantation 57:1537-1543；Hutchins等人，1995，Proc Natl.Acad Sci USA 92:11980-11984；Jefferis等人，1995，Immunol Lett.44:111-117；Lund等人，1995，Faseb J 9:115-119；Jefferis等人，1996，Immunol Lett 54:101-104；Lund等人，1996，Immunol 157:4963-4969；Armour等人，1999，Eur J Immunol 29:2613-2624；Idusogie等人，2000，J Immunol 164:4178-4184；Reddy等人，2000，J Immunol 164:1925-1933；Xu等人，2000，Cell Immunol 200:16-26；Idusogie等人，2001，J Immunol 166:2571-2575；Shields等人，2001，J Biol Chem 276:6591-6604；Jefferis等人，2002，Immunol Lett 82:57-65；Presta等人，2002，Biochem Soc Trans 30:487-490)；美国专利号5,624,821；5,885,573；6,194,551；美国专利公开号60/601,634和60/608,852；PCT公开号WO00/42072和WO99/58572。

[0197] 本领域技术人员将理解，本发明的Fc变体可以具有改变的Fc的配体(例如，FcγR，

C1q)结合特性(结合特性的实例包括但不限于:结合特异性、平衡解离常数(K_D)、解离和结合速率(分别是K_{off}和K_{on})、结合亲和力和/或抗体亲抗原性),并且某些改变或多或少是期望的。本领域中众所周知的是,平衡解离常数(K_D)被定义为k_{off}/k_{on}。通常应理解,具有低K_D的结合分子(例如,和抗体)比具有高K_D的结合分子(例如,和抗体)更优选。然而,在一些情况下,K_{on}或K_{off}值可能比K_D值更相关。本领域技术人员可以确定对给定抗体应用而言哪一个动力学参数最重要。例如,增强Fc与一种或多种阳性调节物(例如,FcγRIIIA)的结合同时未改变或甚至降低Fc与阴性调节物FcγRIIB的结合的修饰的CH3和/或CH2对于增强ADCC活性将是更有利的。可替代地,降低与一种或多种阳性调节物的结合和/或增强与FcγRIIB的结合的修饰的CH3和/或CH2对于降低ADCC活性将是有利的。相应地,结合亲和力的比值(例如,平衡解离常数(K_D))可以表明Fc变体的ADCC活性是否增强或降低。例如,FcγRIIIA/FcγRIIB平衡解离常数的比值(K_D)的降低将与改进的ADCC活性相关,而比值的增加将与ADCC活性的下降相关。

[0198] 作为Fc变体的表征的部分,测试它们与FcγRIIIA(CD16a)和FcγRIIB(CD32b)的结合亲和力,其报告为与野生型lgG1相比的比值。(参见实施例4和表5)在这样的情况下,可能评价CH3结合域突变对与这些激活和抑制Fc受体的结合的影响。在一个实施方案中,本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体,其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域,所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变,其中所述变体CH3结构域具有高于70℃的熔解温度(Tm),其中与野生型同源二聚体相比,异源二聚体与CD16a的结合约相同。在某些实施方案中,与野生型同源二聚体相比,异源二聚体与CD16a的结合是增加的。在可替代的实施方案中,与野生型同源二聚体相比,异源二聚体与CD16a的结合是减少的。

[0199] 在某些实施方案中,本文提供了分离的包含异源二聚体Fc区的异源多聚体,其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域,所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变,其中所述变体CH3结构域具有高于70℃的熔解温度(Tm),其中与野生型同源二聚体相比,异源二聚体与CD32b的结合约相同。在某些实施方案中,与野生型同源二聚体相比,异源二聚体与CD32b的结合是增加的。在可替代的实施方案中,与野生型同源二聚体相比,异源二聚体与CD32b的结合是减少的。

[0200] 本领域技术人员将理解,可以将K_D报道作为Fc变体与CD16a的结合和Fc变体与CD32b的结合的比值(数据未显示),而不是报道结合CD16a和CD32b的K_D作为Fc变体与野生型同源二聚体的比值。该比值可以提供与野生型相比变体CH3结构域突变对ADCC或不变、或增加或降低的指示,如下面更详细地描述的。

[0201] 本发明的Fc变体对FcγR的亲和力和结合性质最初使用本领域已知用于测定Fc-FcγR相互作用,即,Fc区与FcγR的特异性结合的体外测定(基于生物化学或免疫学的测定)来测定,包括但不限于ELISA测定、表面等离子共振测定、免疫沉淀测定(参见下面题为“表征和功能测定”的部分)和其他方法如间接结合测定、竞争性抑制测定、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和层析法(例如凝胶过滤)。这些和其他方法可利用所检测的一种或多种组分上的标记和/或利用各种检测方法,包括但不限于发色、荧光、发光或同位素标记。有关结合亲和力和动力学的详细描述可参见Paul,W.E.编,Fundamental Immunology,第4版,Lippincott-Raven,Philadelphia(1999),其关注于抗体-免疫原相互作用。

[0202] 考虑到，本发明的分子的结合性质也通过用于测定一种或多种FcγR介体效应细胞功能的体外功能性测定来表征(参见下面题为“表征和功能测定”的部分)。在某些实施方案中，本发明的分子在体内模型(例如，本文中描述和公开的那些)中具有与基于体外的测定的那些所类似的结合性质。然而，本发明不排除在基于体外的测定中不展现期望的表型、但在体内展现期望的表型的本发明的分子。

[0203] 本发明涵盖相对于可比较的分子以增加的亲和力结合FcγRIIIA(CD16a)的Fc变体。在特定的实施方案中，相对于可比较的分子，本发明的Fc变体以增加的亲和力结合FcγRIIIA且以不变或降低的结合亲和力结合FcγRIIB(CD32b)。在又另一实施方案中，相对于可比较的分子，本发明的Fc变体具有降低的FcγRIIIA/FcγRIIB平衡解离常数(K_D)的比值。

[0204] 本发明还考虑了相对于可比较的分子以降低的亲和力结合FcγRIIIA(CD16a)的Fc变体。在特定的实施方案中，相对于可比较的分子，本发明的Fc变体以降低的亲和力结合FcγRIIIA，且相对于可比较的分子，以不变或增加的结合亲和力结合FcγRIIB。

[0205] 在一个实施方案中，Fc变体以增加的亲和力与FcγRIIIA结合。在特定的实施方案中，所述Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力比可比较分子的高至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少30倍、或至少40倍、或至少50倍、或至少60倍、或至少70倍、或至少80倍、或至少90倍、或至少100倍、或至少200倍。在其他实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力增加至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0206] 在另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于Fc配体(例如，FcγR、C1q)的平衡解离常数(K_D)降低约2倍和10倍之间、或约5倍和50倍之间、或约25倍和250倍之间、或约100倍和500倍之间、或约250倍和1000倍之间。

[0207] 在另一个实施方案中，相对于可比较的分子，所述Fc变体对于FcγRIIIA的平衡解离常数(K_D)降低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少30倍、或至少40倍、或至少50倍、或至少60倍、或至少70倍、或至少80倍、或至少90倍、或至少100倍、或至少200倍、或至少400倍、或至少600倍。在另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIIA的平衡解离常数(K_D)降低至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0208] 在一个实施方案中，Fc变体以不变或降低的亲和力与FcγRIIB结合。在特定实施方案中，相对于可比较的分子，所述Fc变体对于FcγRIIB的亲和力不变或降低至少1倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在其他实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIB的亲和力不变或降低至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0209] 在另一个实施方案中，相对于可比较的分子，所述Fc变体对于FcγRIIB的平衡解离常数(K_D)不变或增加至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少30倍、或至少40倍、或至少50倍、或至少60倍、或至少70倍、或至少80倍、或至少90

倍、或至少100倍、或至少200倍。在另一个特定实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIB的平衡解离常数(K_D)不变或增加至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0210] 在又另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体以增加的亲和力结合FcγRIIIA，且相对于可比较的分子，以不变或降低的结合亲和力结合FcγRIIB。在特定实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力增加至少1倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在另一个特定实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIB的亲和力或不变或降低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在其他实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力增加至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％并且相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIB的亲和力或不变或增加至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0211] 在又另一个实施方案中，Fc变体相对于可比较的分子的FcγRIIIA/FcγRIIB平衡解离常数(K_D)的比值降低。在特定实施方案中，Fc变体相对于可比较的分子的FcγRIIIA/FcγRIIB平衡解离常数(K_D)的比值降低至少1倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在另一个特定实施方案中，Fc变体相对于可比较的分子的FcγRIIIA/FcγRIIB平衡解离常数(K_D)的比值降低至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0212] 在另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体以降低的亲和力结合FcγRIIIA。在特定实施方案中，相对于可比较的分子，所述Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力降低至少1倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在其他实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力降低至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0213] 在又另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体以降低的亲和力结合FcγRIIIA，且以不变或增加的亲和力结合FcγRIIB。在特定实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力降低至少1倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在另一个特定实施方案中，Fc变体对于FcγRIIB的亲和力比可比较的分子高至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在其他实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIIA的亲和力降低至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％并且相对于可比较的分子，Fc变体对于FcγRIIB的亲和力增加至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。

[0214] 在又另一个实施方案中，当与可比较的分子比较时，Fc变体对于FcγRIIIA的平衡解离常数(K_D)增加至少1倍、或至少3倍、或至少5倍或至少10倍或至少20倍、或至少50倍。在特定实施方案中，相对于可比较的分子，所述Fc变体对于FcγRIIB的平衡解离常数(K_D)降低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍或至少100倍。

[0215] 对于FcγR选择性的CH2变化

[0216] 该复合物中Fc-FcγR蛋白-蛋白相互作用表明Fc分子中的两条链与FcγR分子上的两个不同位点相互作用。尽管天然Fc分子中的两条重链中存在对称性，但是一条链上的残基附近的局部FcγR环境不同于在相对Fc链上相同残基位置周围的FcγR残基。两个对称相关位置与FcγR残基的不同选择相互作用。

[0217] 鉴于Fc与FcγR结合中的不对称性，Fc分子的链A和B中的同时突变不会以对称的方式影响与FcγR的相互作用。当引入突变以优化Fc的一条链上与其局部FcγR环境的相互作用时，在同源二聚体Fc结构中，第二条链中的对应突变对于所需的FcγR结合和选择性概况可以是有利的、不利或没有帮助的。

[0218] 使用结构和计算引导的方法，将不对称突变在Fc的两条链中进行工程改造以克服传统Fc工程改造策略的这些限制，所述传统Fc工程改造策略在Fc的两条链上引入相同的突变。如果对于与受体分子的其对应面的增强的结合将Fc的两条链独立地进行优化，那么可以获得受体之间更好的结合选择性。

[0219] 例如，可以设计Fc的一条链上特定位置处的突变以增强对特定残基的选择性，这是阳性设计努力，同时可以将相同的残基位置突变以便与可替代的FcγR受体类型中的其局部环境不利地相互作用，这是阴性设计努力，从而实现两种受体之间更好的选择性。在某些实施方案中，提供了用于在CH2结构域中设计不对称氨基酸修饰的方法，其与不同的FcγR受体相比，选择性结合一种FcγR受体(例如选择性结合FcgRIIIa而非FcgRIIb)。在其他某些实施方案中，提供了用于在变体Fc异源二聚体的CH2结构域中设计不对称氨基酸修饰的方法，其包含CH3结构域中的氨基酸修饰以促进异源二聚体形成。在另一个实施方案中，提供了基于变体Fc异源二聚体设计对于不同FcγR受体的选择性的方法，所述变体Fc异源二聚体包含CH2结构域中的不对称氨基酸修饰。在又另一个实施方案中，提供了用于设计偏爱FcγR受体与Fc分子的一面结合的不对称氨基酸修饰的方法。在其他某些实施方案中，提供了用于设计偏爱FcγR受体以便与变体Fc异源二聚体的仅一面相互作用的极性驱动者的方法，所述变体Fc异源二聚体包含CH2结构域中的不对称氨基酸修饰。

[0220] 可以定制CH2结构域中的突变的不对称设计以识别Fc分子的一面上的FcγR。这构成了不对称Fc支架的产生面，而相对面呈现野生型样相互作用倾向型，而没有设计的选择性概况，且可以视为非产生面。可以采用阴性设计策略以便在非产生面上引入突变以阻断FcγR与不对称Fc支架的该面的相互作用，在那里通过迫使FcγR受体具有期望的相互作用倾向。

[0221] 表E:Fc对于不同FcγR受体的可能有趣的选择性概况

[0222]

变体选择性	受体结合		
	FcγRIIIa F/V	FcγRIIa H/R	FcγRIIb F/Y
	↑/-	×	×
	×	↑/-	×
	×	×	↑/-
	↑/-	↑/-	×
	↑/-	×	↑/-
	×	↑/-	↑/-

[0223] (↑/-)表明表现出与特定受体类型或其同种异型之一的增加的或野生型样结合的变体。(×)表明与受体或子集同种异型没有明显的结合。

[0224] 本发明还涉及融合多肽，其包含与Fc区融合的结合结构域，其中所述Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有高于70℃的熔解温度(Tm)。特别考虑的是，可以通过本领域技术人员众所周知的方法生成包含含有变体CH3结构域的异源二聚体的分子。简而言之，这些方法包括但不限于将具有期望特异性的可变区或结合结构域(例如，从噬菌体展示或表达文库分离的，或者源自受体的人或非人抗体或结合结构域的可变区)与变体Fc异源二聚体相组合。可替代地，本领域技术人员可以通过修饰包含Fc区的分子(例如抗体)的Fc区中的CH3结构域而生成变体Fc异源二聚体。

[0225] 在一个实施方案中，Fc变体是抗体或Fc融合蛋白。在特定的实施方案中，本发明提供了包含Fc区的抗体，所述Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域，所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变，其中所述变体CH3结构域具有高于70℃的熔解温度(Tm)。这样的抗体包括，可以进行修饰以生成Fc变体的天然包含含有CH3结构域的Fc区的IgG分子，或已经工程改造以含有包含变体CH3结构域的Fc区的抗体衍生物。本发明的Fc变体包括任何抗体分子，所述抗体分子结合，优选地，特异性结合(即，通过本领域众所周知用于测定特异性抗原-抗体结合的免疫测定法测定的、竞争排除非特异性结合)抗原，所述抗原包含并入变体CH3结构域的Fc区。这种抗体包括但不限于，多克隆的、单克隆的、单特异性的、双特异性的、多特异性的、人类的、人源化的、嵌合的抗体、单链抗体、Fab片段、$F(ab')_2$片段、二硫化物连接的Fvs、以及含有VL或VH结构域甚至特异性结合抗原的互补决定区(CDR)、在某些情况下进行工程改造以含有或融合到变体Fc异源二聚体的片段。

[0226] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指分泌的抗体结合于某些细胞毒性细胞(如天然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)，使得这些细胞毒性效应细胞特异性结合于携带抗原(antigen-healing)的靶细胞，随后用细胞毒素杀死该靶细胞的细胞毒性形式。靶向靶细胞表面的特异性高亲和力IgG抗体将细胞毒性细胞“武装”起来，是进行这种杀伤作用绝对需要的。靶细胞裂解是细胞内过程，需要直接的细胞间接触，并且不涉及补体。

[0227] 可以测定任何具体抗体通过ADCC介导靶细胞裂解的能力。为了评价ADCC活性，将感兴趣的抗体和免疫效应细胞一起加到靶细胞中，通过抗原抗体复合物可以激活该效应细胞，进而导致该靶细胞的细胞裂解。通常通过裂解细胞释放标记(如放射性底物、荧光染料或天然的细胞内蛋白质)来检测细胞裂解。可以用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。体外ADCC测定的具体实例参见Wisecarver等人，1985，79:277;Bruggemann等人，1987，J Exp Med 166:1351;Wilkinson等人，2001，J Immunol Methods 258:183;Patel等人，1995J Immunol Methods 184:29和本文所述(参见下面题为“表征和功能测定”的部分)。或者或此外，可以在体内评价感兴趣的抗体的ADCC活性，例如在如Clynes等人，1998，PNAS USA 95:652所述的动物模型中评价。

[0228] 考虑本发明的Fc变体通过用于测定一种或多种FcγR介体效应细胞功能的体外功能性测定来表征。在特定的实施方案中，本发明的分子在体内模型(例如，本文中描述和公开的那些)中具有与基于体外的测定的那些所类似的结合性质和效应细胞功能。然而，本发明不排除在基于体外的测定中不展现期望的表型、但在体内展现期望的表型的本发明的分子。

[0229] 本发明进一步提供了具有增强的CDC功能的Fc变体。在一个实施方案中，Fc变体具有增加的CDC活性。在一个实施方案中，Fc变体的CDC活性比可比较的分子高至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少50倍、或至少100倍。在另一个实施方案中，Fc变体结合C1q的亲和力比可比较的分子高至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少7倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在又另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体的CDC活性增加至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。在特定的实施方案中，本发明的Fc变体以增加的亲和力结合C1q;具有增强的CDC活性且与至少一种抗原特异性结合。

[0230] 本发明还提供了具有降低的CDC功能的Fc变体。在一个实施方案中，Fc变体具有降低的CDC活性。在一个实施方案中，Fc变体的CDC活性比可比较的分子低至少2倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少50倍或至少100倍。在另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体结合C1q的亲和力降低至少1倍、或至少3倍、或至少5倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少50倍、或至少100倍。在另一个实施方案中，相对于可比较的分子，Fc变体的CDC活性降低至少10％、或至少20％、或至少30％、或至少40％、或至少50％、或至少60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％、或至少100％、或至少150％、或至少200％。在特定的实施方案中，Fc变体以降低的亲和力结合C1q，具有降低的CDC活性且与至少一种抗原特异性结合。

[0231] 在一些实施方案中，Fc变体包含一种或多种工程改造的糖形式，即共价连接于含有Fc区的分子的糖组成。工程改造的糖形式可以用于各种目的，包括但不限于提高或降低效应物功能。可以通过本领域技术人员已知的任何方法产生工程改造的糖形式，例如，采用工程改造或变体表达株，通过与一种或多种酶如β(1,4)-N-乙酰葡糖胺基转移酶III(GnTI11)共同表达，通过在各种生物体或来自各种生物体的细胞系中表达含有Fc区的分子，或者通过在含有Fc区的分子表达后修饰碳水化合物。产生工程改造的糖形式的方法是本领域已知的，包括但不限于Umana等人，1999，Nat.Biotechnol 17:176-180;Davies等人，

20017Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields等人,2002,J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa等人,2003,J Biol Chem 278:3466-3473);美国专利号6,602,684;美国序列号10/277,370;美国序列号10/113,929;PCT WO 00/61739A1;PCT WO 01/292246A1;PCT WO 02/311140A1;PCT WO 02/30954A1所述的方法;Potillegent™技术(Biowa,Inc.Princeton,N.J.);GlycoMAb™糖基化工程改造技术(GLYCART biotechnology AG,Zurich,Switzerland)。参见例如WO 00061739;EA01229125;US 20030115614;Okazaki等人,2004,JMB,336:1239-49。

[0232] 考虑Fc变体包括包含可变区和异源二聚体Fc区的抗体,其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域,所述CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变,其中所述变体CH3结构域具有高于70℃的熔解温度(Tm)。是抗体的Fc变体可以通过将特异性结合至少一种抗原的其片段的可变结构域与包含变体CH3结构域的异源二聚体Fc区相组合而“重新”产生。可替代地,可以通过修饰结合抗原的含有Fc区的抗体的CH3结构域而产生异源二聚体Fc变体。

[0233] 本发明的抗体可以包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、胞内抗体、单特异性抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、合成抗体、单链FvFc(scFvFc)、单链Fv(scFv)和抗-独特型(抗-Id)抗体。具体而言,用于本发明方法中的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分。本发明免疫球蛋白分子可以是任何类型(如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2)或亚类的免疫球蛋白分子。

[0234] 本发明的抗体可以来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物(如人、鼠、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡)。在一个特定的实施方案中,该抗体是人或人源化单克隆抗体,特别地双特异单克隆抗体。本文所使用的“人”抗体包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体,并且包括由人免疫球蛋白文库或由人基因表达抗体的小鼠分离的抗体。

[0235] 抗体如所有多肽都具有等电点(pI),等电点(pI)通常定义为多肽不带净电荷时的pH。本领域已知一般当溶液的pH等于该蛋白的等电点(pI)时该蛋白的溶解度最低。可能通过改变抗体中可电离残基的数量和位置以调节pI,从而优化溶解度。例如,可通过进行适当的氨基酸取代(例如用带电氨基酸如赖氨酸取代不带电残基如丙氨酸)操纵多肽的pI。不受任何具体理论的束缚,导致所述抗体pI改变的抗体的氨基酸取代可提高该抗体的溶解度和/或稳定性。本领域技术人员可以理解何种氨基酸取代最适合特定抗体获得所需pI。可以通过各种方法测定蛋白质的pI,这些方法包括但不限于:等电聚焦和各种计算机算法(参见例如,Bjellqvist等人,1993,Electrophoresis 14:1023)。在一个实施方案中,本发明Fc变体PI是介于pH 6.2和pH 8.0之间。在另一个实施方案中,本发明抗体PI是介于pH 6.8和pH 7.4之间。在一个实施方案中,导致本发明Fc变体pI改变的取代将不会显著降低它与抗原的结合亲和力。可以考虑,具有增加稳定性的变体CH3结构域也可以导致pI的变化。在一个实施方案中,特异性选择变体Fc异源二聚体以影响增加稳定性和纯度和,任何期望的pI变化。

[0236] 本发明的抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性或具有更多特异性的。多特异性抗体可以特异性结合于所需靶分子的不同表位,或者可以特异性结合于靶分子和异源表位,如异源多肽或固体支持物。参见例如国际公开号WO 94/04690、WO 93/17715、WO 92/08802、WO91/00360和WO 92/05793;Tutt等人,1991,J.Immunol.147:60-69;美国专利号4,

474,893、4,714,681、4,925,648、5,573,920和5,601,819;以及Kostelny等人,1992,J.Immunol.148:1547)。

[0237] 可以基于如图20中所示的这种不对称支架设计多功能靶向分子的各种实施方案。

[0238] 多特异性抗体对至少两种不同抗原具有结合特异性。虽然这类分子通常只结合两种抗原(即双特异性抗体,BsAb),但本发明也包括具有额外的特异性的抗体如三特异性抗体。BsAb的实例包括但不限于一个臂针对肿瘤细胞抗原且另一个臂针对细胞毒性分子,或两个臂针对两个不同的肿瘤细胞抗原,或两个臂针对两种不同的可溶性配体,或一个臂针对可溶性配体且另一臂针对细胞表面受体,或两个臂针对两种不同的细胞表面受体的那些。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。

[0239] 根据不同方法,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原组合位点)融合于免疫球蛋白恒定结构域序列。可以与含有铰链、CH2和CH3区的至少部分的免疫球蛋白重链恒定区融合。考虑含有结合轻链所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)存在于至少一种融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物,如果需要,还有免疫球蛋白轻链的DNA,插入分开的表达载体中,共同转染到合适的宿主生物体中。在当用于构建的三条多肽链的不等比例提供了最佳产量的实施方案中,这为调整所述三个多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。参见,实施例1和表2。然而,当表达比例相同的至少两种多肽链导致高产率或该比例不是特别重要时,可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0240] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合”的抗体。例如,异源缀合物中的一种抗体可以偶联于抗生物素蛋白,另一种抗体缀合于生物素。提议用这类抗体(例如)使免疫系统细胞靶向不良细胞(美国专利号4,676,980),并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。可以采用任何常规的交联方法制备异源缀合物抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的,参见美国专利号4,676,980以及许多交联技术。

[0241] 考虑具有多于两价且并入变体CH3结构域和获得的本发明的Fc异源二聚体的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。参见例如Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)。

[0242] 本发明的抗体也包括在哺乳动物(如人)中的半衰期(如血清半衰期)大于15天、大于20天、大于25天、大于30天、大于35天、大于40天、大于45天、大于2个月、大于3个月、大于4个月或大于5个月的抗体。本发明的抗体在哺乳动物(如人)中的半衰期延长导致所述抗体或抗体片段在该哺乳动物中的血清滴度较高,因此降低施用所述抗体或抗体片段的频率和/或降低施用所述抗体或抗体片段的浓度。可以通过本领域技术人员已知的技术产生体外半衰期延长的抗体。例如,可通过修饰(如取代、缺失或加入)经鉴定参与Fc结构域和FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基,产生体内半衰期延长的抗体(参见例如,国际公开号WO 97/34631;WO 04/029207;美国专利号6,737,056和美国专利公开号2003/0190311)。

[0243] 在一个特定实施方案中,包含CH3结构域的变体Fc异源二聚体是多特异性抗体(本文中被称为本发明的抗体),本发明的抗体与感兴趣的抗原特异性结合。具体而言,本发明的抗体是双特异性抗体。在一个实施方案中,本发明的抗体特异性结合多肽抗原。在另一个实施方案中,本发明的抗体特异性结合非多肽抗原。在又另一个实施方案中,将本发明的抗体施用于患有疾病或病症的哺乳动物可以导致在该哺乳动物中的治疗益处。

[0244] 基本上任何分子都可以被变体Fc异源二聚体蛋白靶向和/或并入变体Fc异源二聚体蛋白中,所述变体Fc异源二聚体蛋白(例如抗体、Fc融合蛋白)包括但不限于以下蛋白质

列表以及属于以下蛋白质列表的亚基、结构域、基序和表位：肾素；生长激素，包括人生长激素和牛生长激素；生长激素释放因子；甲状旁腺激素；促甲状腺激素；脂蛋白；α-1-抗胰蛋白酶；胰岛素A-链；胰岛素B-链；胰岛素原；促卵泡激素；降钙素；黄体生成素；胰高血糖素；凝集因子如因子VII、因子VIIIC、因子IX、组织因子(TF)和冯维勒布兰德因子；抗凝因子如蛋白C；心钠素；肺表面活性剂；纤溶酶原激活物，如尿激酶或人尿或组织类型纤溶酶原激活物(t-PA)；铃蟾肽；凝血酶；造血生长因子；肿瘤坏死因子-α和-β；脑啡肽酶；RANTES(活化后可调节的、通常T细胞表达和分泌的)；人巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1-α)；血清白蛋白如人血清白蛋白；苗勒管(Muellerian)-抑制物；松弛素A-链；松弛素B-链；松弛素原；小鼠促性腺素-相关肽；微生物蛋白质，如β-内酰胺酶；DNA酶；IgE；细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原(CTLA)，如CTLA-4；抑制素；活化素；血管内皮生长因子(VEGF)；激素或生长因子的受体，例如，EGFR、VEGFR；干扰素，如α干扰素(α-IFN)、β干扰素(β-IFN)和γ干扰素(γ-IFN)；蛋白A或D；类风湿性因子；神经营养因子如骨源性的神经营养因子(BDNF)，神经营养因子-3、-4、-5或-6(NT-3、NT-4、NT-5或NT-6)或神经生长因子；血小板源性生长因子(PDGF)；成纤维细胞生长因子，如AFGF和PFGF；表皮生长因子(EGF)；转化生长因子(TGF)如TGF-α和TGF-β，包括TGF-1、TGF-2、TGF-3、TGF-4或TGF-5；胰岛素样生长因子-I和-II(IGF-I和IGF-II)；des(1-3)-IGF-I(脑IGF-I)、胰岛素样生长因子结合蛋白；CD蛋白，如CD2、CD3、CD4、CD8、CD11a、CD14、CD18、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD33、CD34、CD40、CD40L、CD52、CD63、CD64、CD80和CD147；红细胞生成素；成骨诱导因子；免疫毒素；骨形态发生蛋白(BMP)；干扰素如干扰素-α、β和γ；集落刺激因子(CSF)，如M-CSF、GM-CSF和G-CSF；白介素(IL)，如IL-1至IL-13；TNFα，超氧化物歧化酶；T细胞受体；表面膜蛋白；衰变加速因子；病毒抗原，例如AIDS包膜的一部分，如gp120；转移蛋白；归巢受体；地址素；调控蛋白；细胞粘附分子如LFA-1、Mac1、p150.95、VLA-4、ICAM-1、ICAM-3和VCAM、a4/p7整联蛋白和Xv/p3整联蛋白包括任一种或其亚基，整联蛋白α亚基，如CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、α7、α8、α9、αD、CD11a、CD11b、CD51、CD11c、CD41、αIIb、αIELb；整联蛋白β亚基，如CD29、CD18、CD61、CD104、β5、β6、β7和β8；整联蛋白亚基组合，包括但不限于：αVβ3、αVβ5和α4β7；凋亡途径成员；IgE；血型抗原；flk2/flt3受体；肥胖(OB)受体；mp1受体；CTLA-4；蛋白C；Eph受体如EphA2、EphA4、EphB2等；人白细胞抗原(HLA)如HLA-DR；补体蛋白如补体受体CR1、C1Rq和其他补体因子如C3和C5；糖蛋白受体如GpIbα、GPIIb/IIIa和CD200；以及任何上述多肽的片段。

[0245] 还考虑特异性结合癌抗原的本发明的抗体，所述癌抗原包括但不限于：ALK受体(多效营养因子受体)、多效营养因子、KS1/4泛癌抗原；卵巢癌抗原(CA125)；前列腺酸磷酸酯；前列腺特异性抗原(PSA)；黑色素瘤-相关抗原p97；黑色素瘤抗原gp75；高分子量黑色素瘤抗原(HMW-MAA)；前列腺特异性膜抗原；癌胚抗原(CEA)；多形上皮粘蛋白抗原；人乳脂球抗原；结直肠肿瘤相关抗原，如：CEA、TAG-72、CO17-1A、GICA19-9、CTA-1和LEA；伯基特淋巴瘤抗原-38.13；CD19；人B-淋巴瘤抗原-CD20；CD33；黑色素瘤特异性抗原如神经节苷脂GD2、神经节苷脂GD3、神经节苷脂GM2和神经节苷脂GM3；肿瘤特异性移植类型细胞表面抗原(TSTA)；病毒诱导的肿瘤抗原，包括T-抗原、DNA肿瘤病毒和RNA肿瘤病毒的包膜抗原；癌胚抗原-甲胎蛋白如结肠的CEA、5T4癌胚滋养层糖蛋白和膀胱肿瘤癌胚抗原；分化抗原，如人肺癌抗原L6和L20；纤维肉瘤抗原；人白血病T细胞抗原-Gp37；新糖蛋白(neoglycoprotein)；鞘脂；乳腺癌抗原如EGFR(表皮生长因子受体)；NY-BR-16；NY-BR-16和

HER2抗原(p185HER2)；多形性上皮粘蛋白(PEM)；恶性人淋巴细胞抗原-APO-1；分化抗原，如胎儿红细胞中发现的I抗原；成年人红细胞中发现的原内胚层I抗原；着床前胚胎；胃腺癌中发现的I(Ma)；乳腺上皮中发现的M18、M39；骨髓细胞中发现的SSEA-1；VEP8；VEP9；Myl；Va4-D5；结直肠癌中发现的$D_1$56-22；TRA-1-85(血型H)；睾丸和卵巢癌中发现的SCP-1；结肠腺癌中发现的C14；肺腺癌中发现的F3；胃癌中发现的AH6；Y半抗原；胚胎癌细胞中发现的Ley；TL5(血型A)；A431细胞中发现的EGF受体；胰腺癌中发现的E_1系列(血型B)；胚胎癌细胞中发现的FC10.2；胃腺癌抗原；腺癌中发现的CO-514(血型Lea)；腺癌中发现的NS-10；CO-43(血型Leb)；A431细胞EGF受体中发现的G49；结肠腺癌中发现的MH2(血型ALeb/Ley)；结肠癌中发现的19.9；胃癌粘蛋白；骨髓细胞中发现的T_5A_7；黑色素瘤中发现的R_{24}；胚胎癌细胞中发现的4.2、G_{D3}、D1.1、OFA-1、G_{M2}、OFA-2、G_{D2}和M1:22:25:8以及4-8细胞期胚胎中发现的SSEA-3和SSEA-4；皮肤T细胞淋巴瘤抗原；MART-1抗原；唾液酸Tn(STn)抗原；结肠癌抗原NY-CO-45；肺癌抗原NY-LU-12变体A；腺癌抗原ART1；副肿瘤性相关性脑-睾丸-癌症抗原(癌神经元抗原MA2；副肿瘤性神经元抗原)；神经肿瘤腹侧抗原2(NOVA2)；肝细胞癌抗原基因520；肿瘤相关抗原CO-029；肿瘤相关抗原MAGE-C1(癌症/睾丸抗原CT7)、MAGE-B1(MAGE-XP抗原)、MAGE-B2(DAM6)、MAGE-2、MAGE-4-a、MAGE-4-b和MAGE-X2；癌症-睾丸抗原(NY-EOS-1)以及任何上述多肽的片段。

[0246] 在某些实施方案中，本文所述的异源多聚体包含至少一种治疗性抗体。在一些实施方案中，治疗性抗体结合癌靶抗原。在一个实施方案中，治疗性抗体可以是选自下列中的一种：阿巴伏单抗(abagovomab)、阿达木单抗(adalimumab)、阿伦珠单抗、aurograb、巴匹珠单抗、巴利昔单抗、贝利木单抗(belimumab)、贝伐珠单抗、briakinumab、卡那单抗(canakinumab)、卡妥索单抗(catumaxomab)、塞舍珠单抗(certolizumab pegol)、西妥昔单抗、达克珠单抗、地舒单抗(denosumab)、依法珠单抗、加利昔单抗(galiximab)、吉妥珠单抗奥佐米星、戈利木单抗(golimumab)、替伊莫单抗、英利昔单抗、伊匹木单抗、鲁昔单抗、美泊利单抗、莫他珠单抗、莫罗单抗、mycograb、那他珠单抗、尼妥珠单抗、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥法木单抗(ofatumumab)、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、培妥珠单抗、雷珠单抗、瑞利珠单抗、利妥昔单抗、替利珠单抗(teplizumab)、托珠单抗/atlizumab、托西莫单抗、曲妥珠单抗、ProxiniumTM、RencarexTM、优特克单抗、扎芦木单抗(zalutumumab)和任何其他抗体。

[0247] 本发明的抗体包括修饰的衍生物(即，通过将任何类型的分子共价结合到抗体上，从而共价结合)。例如但不限于，抗体衍生物包括通过，例如糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白水解切割、连接于细胞配体或其他蛋白质等方法修饰的抗体。可以通过已知技术进行任何许多化学修饰，这些技术包括但不限于：特定化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外，该衍生物可以含有一个或多个非经典氨基酸。

[0248] 可以通过将聚合物分子如高分子量聚乙二醇(PEG)连接到抗体或抗体片段，产生体内半衰期延长的抗体或其片段。可以通过PEG与所述抗体或抗体片段的N末端或C末端的位点特异性缀合，或通过赖氨酸残基上存在的ε-氨基、利用或不利用多功能接头，将PEG连接于抗体或抗体片段。可以利用导致生物活性损失最小的直链或支链聚合物衍生化。通过SDS-PAGE和质谱密切监测缀合程度，以保证PEG分子适当地缀合于所述抗体。可以通过，例

如大小排阻或离子交换层析将未反应的PEG与抗体-PEG缀合物分离开。

[0249] 另外，可以将抗体缀合于白蛋白，以制备体内更稳定且具有更长的体内半衰期的抗体或抗体片段。本领域众所周知这些技术，参见例如国际公开号WO 93/15199、WO 93/15200和WO 01/77137；和欧洲专利号EP 413,622。本发明涵盖与一个或多个部分融合或缀合的抗体或其片段的用途，所述部分包括但不限于：肽、多肽、蛋白质、融合蛋白、核酸分子、小分子、模拟剂、合成药物、无机分子和有机分子。

[0250] 本发明涵盖与异源蛋白或多肽(或其部分，例如，至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100个氨基酸的多肽)重组地融合或化学地缀合(包括共价和非共价缀合)的抗体或其片段以产生融合蛋白的用途。融合不一定需要直接融合，但可以通过接头序列进行。例如，可以采用抗体，通过将抗体融合或缀合于特定细胞表面受体的特异性抗体，使异源多肽在体外或体内靶向至特定细胞类型。也可以将融合或缀合于异源多肽的抗体用于使用本领域已知方法的体外免疫测定和纯化方法。参见例如，国际公开号WO 93/21232；欧洲专利号EP 439,095；Naramura等人，1994，Immunol.Lett.39:91-99；美国专利号5,474,981；Gillies等人，1992，PNAS 89:1428-1432；和Fell等人，1991，J.Immunol.146:2446-2452。

[0251] 本发明进一步包括包含与抗体片段融合或缀合的异源蛋白、肽或多肽的组合物。例如，可以将异源多肽融合或缀合于Fab片段、Fd片段、Fv片段、$F(ab)_2$片段、VH结构域、VL结构域、VH CDR、VL CDR或其片段。本领域众所周知融合或缀合多肽到抗体部分的方法。参见例如，美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851和5,112,946；欧洲专利号EP 307,434和EP 367,166；国际公开号WO 96/04388和WO 91/06570；Ashkenazi等人，1991，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539；Zheng等人，1995，J.Immunol.154:5590-5600；和Vil等人，1992，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:11337-11341。

[0252] 通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(共同称为“DNA改组”)的技术，可以产生其他的融合蛋白，如，特异性结合抗原(如，同上)的抗体。可以采用DNA改组来改变本发明抗体或其片段的活性(例如，具有更高亲和力和更低离解速率的抗体或其片段)。参见，一般地，美国专利号5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252和5,837,458，和Patten等人，1997，Curr.Opinion Biotechnol.8:724-33；Harayama，1998，Trends Biotechnol.16(2):76-82；Hansson等人，1999，J.Mol.Biol.287:265-76；以及Lorenzo和Blasco，1998，BioTechniques24(2):308-313。可以在重组之前通过易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法经历随机诱变来改变抗体或其片段、或编码的抗体或其片段。编码其部分特异性结合抗原的抗体或抗体片段的多核苷酸的一个或多个部分可以与一种或多种异源分子的一个或多个成分、基序、段、部分、结构域、片段等等重组。

[0253] 本发明还包括缀合于治疗剂的变体Fc异源二聚体或其片段的用途。

[0254] 可以将抗体或其片段缀合于治疗部分，例如细胞毒素，如细胞抑制剂或杀细胞剂、治疗剂或放射性金属离子，如α-发射体。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何试剂。实例包括核糖核酸酶、monomethylauristatin E和F、紫杉醇、松胞菌素B、短杆菌肽D、溴乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、道诺霉素、二羟炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素类、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星和环磷酰胺和它

们的类似物或同系物。治疗剂包括但不限于抗代谢剂(如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺)、烷化剂(如双氯乙基甲胺、塞替派(thioepa)苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BCNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(如道诺霉素和多柔比星)、抗生素(如放线菌素D(以前为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和氨茴霉素(AMC))和抗-有丝分裂剂(如长春新碱和长春碱)。更详细的治疗剂列表可参见PCT公开WO 03/075957。

[0255] 另外,可将抗体及其片段缀合于改变给定生物应答的治疗剂或药物部分。治疗剂或药物部分不应解释为仅限于经典化疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物学活性的蛋白质或多肽。这类蛋白质可以包括,例如,毒素,如相思豆毒蛋白,蓖麻毒蛋白A,昂科酶(Onconase)(或另一种细胞毒性RNA酶),假单胞菌外毒素,霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质如肿瘤坏死因子,α-干扰素,β-干扰素,神经生长因子,血小板源性生长因子,组织纤溶酶原激活物,凋亡剂,如TNF-α、TNF-β、AIM I(参见国际公开号WO 97/33899)、AIM II(参见国际公开号WO 97/34911)、Fas配体(Takahashi等人,1994,J.Immunol.,6:1567)和VEGI(参见国际公开号WO 99/23105),血栓形成剂(thrombotic agent)或抗-血管生成剂,如血管抑制素或内皮抑制素;或者,生物应答改变剂,例如,淋巴因子(如白介素-1(“IL-1”)、白介素-2(“IL-2”)、白介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)和粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”))或生长因子(如生长激素(“GH”))。

[0256] 而且,可以将抗体缀合于治疗部分如放射性物质或用于缀合放射性金属离子的大环螯合剂(参见上述放射性物质的实例)。在某些实施方案中,大环螯合剂是可以通过接头分子连接于抗体的1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N’,N”,N”-四乙酸(DOTA)。本领域通常已知这类接头分子,参见Denardo等人,1998,Clin Cancer Res.4:2483;Peterson等人,1999,Bioconjug.Chem.10:553;和Zimmerman等人,1999,Nucl.Med.Biol.26:943。

[0257] 本领域已知将抗体融合或缀合于多肽部分的方法。参见例如,美国专利号5,336,603;5,622,929;5,359,046;5,349,053;5,447,851和5,112,946;EP 307,434;EP 367,166;PCT公开WO 96/04388和WO 9I/06570;Ashkenazi等人,1991,PNAS USA 88:10535;Zheng等人,1995,J Immunol 154:5590;和Vil等人,1992,PNAS USA 89:11337。抗体与部分的融合不一定需要直接融合,但可通过接头序列融合。本领域通常知道这类接头分子,参见Denardo等人,1998,Clin Cancer Res 4:2483;Peterson等人,1999,Bioconjug Chem 10:553;Zimmerman等人,1999,Nucl Med Biol 26:943;Garnett,2002,Adv Drug Deliv Rev 53:171。

[0258] Fc变体、其衍生物、类似物或片段(如本发明的抗体或融合蛋白)的重组表达需要构建含有编码Fc变体(如抗体或融合蛋白)的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码Fc变体(如抗体或融合蛋白)的多核苷酸,可以利用本领域众所周知技术通过重组DNA技术产生用于产生Fc变体(如抗体或融合蛋白)的载体。因此,本文描述了通过表达含有Fc变体(如抗体或融合蛋白)编码核苷酸序列的多核苷酸制备蛋白质的方法。可以利用本领域技术人员众所周知的方法构建含有Fc变体(如抗体或融合蛋白)编码序列和合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如,体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。因此,本发明提供包含可操作连接于启动子的编码本发明Fc变体的核苷酸序列的可复制载体。这类

载体可以包括编码抗体分子恒定区(参见例如国际公开号WO 86/05807;国际公开号WO 89/01036;和美国专利号5,122,464)和抗体可变区的核苷酸序列,或者可以将产生Fc变体的多肽克隆到这类载体中,用于表达全长抗体链(如重链或轻链),或者含有非抗体衍生多肽和并入至少变体CH3结构域的Fc区的融合物的完整Fc变体。

[0259] 通过常规技术将该表达载体转移到宿主细胞中,然后通过常规技术培养该转染细胞,产生本发明的Fc变体。因此,本发明包括含有可操作连接于异源启动子的编码本发明的Fc变体的多核苷酸的宿主细胞。在特定的实施方案中,为了表达含有双链抗体的Fc变体,可以在宿主细胞中共同表达编码重链和轻链的载体,以表达整个免疫球蛋白分子,如下所详述。

[0260] 可以利用各种宿主表达载体系统来表达本发明的Fc变体(如抗体或融合蛋白分子)(参见例如,美国专利号5,807,715)。这类宿主表达系统代表可以产生并随后纯化感兴趣编码序列的载体,但也代表用合适的核苷酸编码序列转化或转染时,可以原位表达本发明的Fc变体的细胞。这些包括但不限于微生物,例如用含有Fc变体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(如大肠杆菌(E.coli)和枯草芽孢杆菌(B.subtilis));用含有Fc变体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(如毕赤酵母(Saccharomyces Pichia));用含有Fc变体编码序列的重组病毒表达载体(如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含有Fc变体编码序列的重组病毒表达载体(如花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的或用含有Fc变体编码序列的重组质粒表达载体(如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或者哺乳动物细胞系统(如COS、CHO、BHK、293、NSO和3T3细胞),其携带含有衍生自哺乳动物细胞基因组(如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(如腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的启动子的重组表达构建体。在某些实施方案中,利用细菌细胞如大肠杆菌,或真核细胞来表达作为重组抗体或融合蛋白分子的Fc变体。例如,哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)与载体如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件的组合,是抗体的有效表达系统(Foecking等人,1986,Gene 45:101;和Cockett等人,1990,Bio/Technology 8:2)。在一个特定实施方案中,编码本发明的Fc变体(如抗体或融合蛋白)的核苷酸序列的表达受到组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子的调节。

[0261] 在细菌系统中,可以根据所表达Fc变体(如抗体或融合蛋白)的所需用途有利地选择许多表达载体。例如,当待产生大量这类蛋白质而用于产生Fc变体药物组合物时,可能需要指导表达容易纯化的高水平融合蛋白产物的载体。这类载体包括但不限于,大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,1983,EMBO 12:1791),其中Fc变体编码序列可以单独连接到载体中,其与lac Z编码区同框,以便产生lac Z-融合蛋白;pIN载体(Inouye和Inouye,1985,Nucleic Acids Res.13:3101-3109;Van Heeke和Schuster,1989,J.Biol.Chem.24:5503-5509);等等。也可以采用pGEX载体表达外来多肽与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白。这种融合蛋白一般是可溶性的,通过与基质谷胱甘肽-琼脂糖珠吸附和结合然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱而容易地从裂解的细胞中纯化。设计pGEX载体以包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,以便可以由GST部分释放克隆的靶基因产物。

[0262] 在昆虫系统中,苜蓿银纹夜蛾(Autographa californica)核多面体病病毒(AcNPV)用作表达外来基因的载体。该病毒在草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞中

生长。可将Fc变体(如抗体或融合蛋白)编码序列单独克隆到病毒的非必需区(如多角体蛋白基因)中,并置于AcNPV启动子(如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0263] 在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,可以将感兴趣的Fc变体(如抗体或融合蛋白)编码序列连接于腺病毒转录/翻译控制复合物,例如晚期启动子和三联前导序列。然后,可以通过体外或体内重组将该嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入病毒基因组的非必需区(如E1或E3区)将产生活的且能够在感染宿主中表达Fc变体(如抗体或融合蛋白)的重组病毒(参见例如Logan和Shenk,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:355-359)。插入的抗体编码序列的有效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG启动密码子和相邻序列。另外,该启动密码子必须与所需编码序列的阅读框同相,以保证完整插入物的翻译。这些外源性翻译控制信号和启动密码子可以来自各种来源,包括天然的和合成的。可以通过包括合适的转录增强子元件、转录终止子等提高表达效率(参见例如Bittner等人,1987,Methods in Enzymol.153:516-544)。

[0264] 可以通过本领域已知的任何启动子或增强子元件控制Fc变体(如抗体或融合蛋白)的表达。可以用于控制编码Fc变体(如抗体或融合蛋白)的基因表达的启动子包括但不限于:SV40早期启动子区(Bernoist和Chambon,1981,Nature 290:304-310)、劳氏肉瘤病毒3'长末端重复中含有的启动子(Yamamoto等人,1980,Cell 22:787-797)、疱疹胸苷激酶启动子(Wagner等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445)、金属硫蛋白基因的调控序列(Brinster等人,1982,Nature 296:39-42)、四环素(Tet)启动子(Gossen等人,1995,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 89:5547-5551);原核表达载体如β-内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff等人,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.75:3727-3731),或tac启动子(DeBoer等人,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.80:21-25;也参见"Useful proteins from recombinant bacteria",刊于Scientific American,1980,242:74-94);含有胭脂碱合成酶启动子区的植物表达载体(Herrera-Estrella等人,Nature 303:209-213)或花椰菜花叶病毒35S RNA启动子(Gardner等人,1981,Nucl.Acids Res.9:2871)和光合作用酶二磷酸核酮糖羧化酶的启动子(Herrera-Estrella等人,1984,Nature310:115-120);来自酵母或其他真菌的启动子元件如Gal 4启动子、ADC(醇脱氢酶)启动子、PGK(磷酸甘油激酶)启动子、碱性磷酸酶启动子和以下动物转录控制区,它们表现出组织特异性并被用于转基因动物:在胰腺腺细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区(Swift等人,1984,Cell 38:639-646;Ornitz等人,1986,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.50:399-409;MacDonald,1987,Hepatology 7:425-515);在胰腺β细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan,1985,Nature 315:115-122),在淋巴细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl等人,1984,Cell 38:647-658;Adames等人,1985,Nature 318:533-538;Alexander等人,1987,Mol.Cell.Biol.7:1436-1444),在睾丸、乳腺、淋巴和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区(Leder等人,1986,Cell 45:485-495),在肝中有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert等人,1987,Genes and Devel.1:268-276),在肝中有活性的甲胎蛋白基因控制区(Krumlauf等人,1985,Mol.Cell.Biol.5:1639-1648;Hammer等人,1987,Science 235:53-58;在肝中有活性的α1-抗胰蛋白酶基因控制区(Kelsey等人,1987,Genes and Devel.1:161-171),在骨髓细胞中有活性的β-珠蛋白基因控制区(Mogram等人,1985,Nature 315:338-340;Kollias等人,1986,Cell 46:89-94;在脑的少突胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性

蛋白基因控制区(Readhead等人,1987,Cell 48:703-712);在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区(Sani,1985,Nature 314:283-286);在神经元细胞中有活性的神经元特异性烯醇酶(NSE)(Morelli等人,1999,Gen.Virol.80:571-83);在神经元细胞中有活性的脑源性神经营养因子(BDNF)基因控制区(Tabuchi等人,1998,Biochem.Biophysic.Res.Com.253:818-823);在星形细胞中有活性的胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)启动子(Gomes等人,1999,Braz J Med Biol Res 32(5):619-631;Morelli等人,1999,Gen.Virol.80:571-83)和在下丘脑中有活性的促性腺释放激素基因控制区(Mason等人,1986,Science 234:1372-1378)。

[0265] 可以通过三种通用方法鉴定含有编码本发明Fc变体(如抗体或融合蛋白)的基因插入物的表达载体:(a)核酸杂交,(b)是否存在“标记”基因功能,和(c)插入序列的表达。在第一种方法中,可以通过核酸杂交利用含有分别与编码肽、多肽、蛋白质或融合蛋白的插入基因同源的序列的探针,来检测表达载体中是否存在编码肽、多肽、蛋白质或融合蛋白的基因。在第二种方法中,可以根据是否存在因载体中插入编码抗体或融合蛋白的核苷酸序列所致的某些“标记”基因功能(如胸苷激酶活性、抗生素抗性、转化表型、杆状病毒中形成包涵体等),来鉴定和选择重组载体/宿主系统。例如,如果编码Fc变体(如抗体或融合蛋白)的核苷酸序列被插入载体的标记基因序列中,那么可以通过不存在标记基因功能来鉴定含有编码抗体或融合蛋白插入物的基因的重组体。在第三种方法中,可以通过测定该重组体表达的基因产物(如抗体或融合蛋白)来鉴定重组表达载体。这类测定可以基于(例如)该融合蛋白在体外测定系统(如与抗-生物活性分子抗体的结合)中的物理或功能特性。

[0266] 此外,可以选择以期望的特定形式调节插入序列表达或修饰并加工基因产物的宿主细胞品系。可以在某些诱导物的存在下提高某些启动子引起的表达;因此,可以控制遗传工程改造的融合蛋白的表达。而且,不同宿主细胞的翻译和翻译后加工和修饰具有特征性和特定的机制(如蛋白质的糖基化、磷酸化)。可以选择合适的细胞系或宿主系统,以保证对所表达的外来蛋白进行所需的修饰和加工。例如,在细菌系统中表达将产生无糖基化的产物,在酵母中表达将产生糖基化产物。可以采用包含具有合适地加工基因产物的初始转录物(如糖基化和磷酸化)的细胞机制的真核宿主细胞。这类哺乳动物宿主细胞包括但不限于:CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、WI38、NSO,具体而言,神经元细胞系,例如SK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZ人神经母细胞瘤(Sugimoto等人,1984,J.Natl.Cancer Inst.73:51-57)、SK-N-SH人神经母细胞瘤(Biochim.Biophys.Acta,1982,704:450-460)、Daoy人小脑髓母细胞瘤(He等人,1992,Cancer Res.52:1144-1148)、DBTRG-05MG胶质母细胞瘤细胞(Kruse等人,1992,In vitro Cell.Dev.Biol.28A:609-614)、IMR-32人神经母细胞瘤(Cancer Res.,1970,30:2110-2118)、1321N1人星形细胞瘤(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1977,74:4816)、MOG-G-CCM人星形细胞瘤(Br.J.Cancer,1984,49:269)、U87MG人胶质母细胞瘤-星形细胞瘤(Acta Pathol.Microbiol.Scand.,1968,74:465-486)、A172人胶质母细胞瘤(Olopade等人,1992,Cancer Res.52:2523-2529)、C6大鼠胶质瘤细胞(Benda等人,1968,Science 161:370-371)、Neuro-2a小鼠神经母细胞瘤(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1970,65:129-136)、NB41A3小鼠神经母细胞瘤(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1962,48:1184-1190)、SCP绵羊脉络丛(Bolin等人,1994,J.Virol.Methods 48:211-221)、G355-5,PG-4猫正常星形细胞(Haapala等人,1985,J.Virol.53:827-833)、Mpf白鼬脑(Trowbridge等人,

1982,In Vitro 18:952-960)和正常细胞系,例如,CTX TNA2大鼠正常脑皮层(Radany等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:6467-6471),如CRL7030和Hs578Bst。另外,不同载体/宿主表达系统可以不同程度地影响加工反应。

[0267] 为了长期、高产率地生产重组蛋白,常常优选稳定的表达。例如,可以工程改造稳定表达本发明的Fc变体(如抗体或融合蛋白)的细胞系。与其使用含有病毒复制起点的表达载体,不如用合适表达控制元件(如启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)控制的DNA和选择性标记来转化宿主细胞。引入外来DNA后,使工程改造细胞在富营养培养基中生长1-2天,然后换到选择性培养基中。重组质粒中的选择性标记对选择赋予抗性,使得细胞能够将该质粒稳定整合到其染色体中,生长形成细胞灶,进而可克隆并扩增成细胞系。这种方法可以有利地用于工程改造表达特异性结合抗原的Fc变体的细胞系。这类工程改造的细胞系在筛选和评估影响特异性结合抗原的Fc变体(如多肽或融合蛋白)活性的化合物中特别有用。

[0268] 可以采用许多选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,1977,Cell 11:223)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska和Szybalski,1962,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:2026)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy等人,1980,Cell 22:817)基因,它们分别可用于tk-、hgprt-或aprt-细胞。另外,抗代谢物抗性可用作选择dhfr、gpt、neo和hygro基因的基础,dhfr赋予甲氨蝶呤抗性(Wigler等人,1980,Natl.Acad.Sci.USA 77:3567;O'Hare等人,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527);gpt赋予霉酚酸抗性(Mulligan和Berg,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072);neo赋予氨基糖苷G-418抗性(Colberre-Garapin等人,1981,J.Mol.Biol.150:1);hygro赋予潮霉素抗性(Santerre等人,1984,Gene 30:147)。

[0269] 一旦通过重组表达产生Fc变体(如抗体或融合蛋白)后,可通过本领域已知的任何蛋白质纯化方法进行纯化,例如层析(如离子交换层析、亲和力层析、特别是使用蛋白A后对特定抗原的亲和力层析,以及大小柱层析)、离心、差异溶解度或任何其他标准蛋白质纯化技术。

[0270] Fc变体一般作为分泌的多肽从培养基中回收,尽管当没有分泌信号直接产生时它也可以从宿主细胞裂解物中回收。如果Fc变体是膜结合的,它可以用合适的去污剂溶液(例如,Triton-X 100)从膜中释放。

[0271] 当Fc变体在除一种人来源以外的重组细胞中产生时,它完全不含人来源的蛋白或多肽。然而,有必要从重组细胞蛋白或多肽纯化Fc变体,以获得对于Fc变体基本上同质的制剂。作为第一个步骤,通常将培养基或裂解物离心以除去颗粒细胞碎片。

[0272] 可以通过羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲和层析(亲和层析是优选的纯化技术)方便地纯化具有抗体恒定区的Fc异源二聚体。根据待回收的多肽,也可使用其他蛋白纯化技术诸如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅上的层析、肝素琼脂糖上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。蛋白A作为亲和配体的适用性取决于使用的免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化免疫球蛋白Fc区,其基于人γ1、γ2、或γ4重链(Lindmark等人,J.Immunol.Meth.62:1-13(1983))。推荐G蛋白用于所有小鼠亚型和用于人γ3(Guss等人,EMBO J.5:15671575(1986))。亲和配体所结合的基质最常用的是琼脂糖,但是可使用其他

基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能获得比琼脂糖更快的流速和更短的处理时间。用于将免疫粘附分子与蛋白A或G亲和柱结合的条件完全取决于Fc结构域的特征;即其种类和同种型。通常,当选择适当配体时,从无条件的培养液直接发生有效结合。可以在酸性pH(3.0或3.0以上),或在含有温和离液序列高的盐的中性pH缓冲液中有效地洗脱结合的变体Fc异源二聚体。这种亲和层析步骤可以导致>95%纯的变体Fc异源二聚体制剂。

[0273] 可通过载体扩增提高Fc变体(如抗体或融合蛋白)的表达水平(综述参见Bebbington和Hentschel,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,第3卷(Academic Press,New York,1987))。例如,当表达抗体或融合蛋白的载体系统中的标记扩增时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平提高将提高标记基因的拷贝数。由于扩增区域与抗体基因相连,所以也将提高抗体或融合蛋白的产量(Crouse等人,1983,Mol.Cell.Biol.3:257)。

[0274] 可利用两种本发明表达载体共转染宿主细胞。例如,第一种载体编码重链衍生的多肽,第二种载体编码轻链衍生的多肽。这两种载体可含有相同的选择性标记,使得能够等同地表达重链和轻链多肽。或者可采用编码并能够表达融合蛋白或者重链与轻链多肽的单一载体。融合蛋白或重链与轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA。

[0275] 表征和功能测定

[0276] 可以以各种方式表征本发明的Fc变体(例如,抗体或融合蛋白)。在一个实施方案中,使用本领域众所周知的技术评估变体Fc异源二聚体的纯度,所述技术包括但不限于SDS-PAGE凝胶、western印迹、密度测定法或质谱法。可以使用一系列技术表征蛋白稳定性,所述技术不限于,大小排阻层析法、UV可见和CD光谱法、质谱法、差示光散射、台式稳定性测定、冻融加上其他表征技术、差示扫描量热法、差示扫描荧光测定法、疏水相互作用层析法、等电聚焦、受体结合测定或相对蛋白表达水平。在一个示例性实施方案中,使用本领域众所周知的技术诸如差示扫描量热法或差示扫描荧光测定法,与野生型CH3结构域相比,通过变体Fc异源二聚体的熔解温度评估变体CH3结构域的稳定性。

[0277] 也可以测定本发明的Fc变体的特异性结合配体(例如,FcγRIIIA、FcγRIIB、C1q)的能力。这样的测定可以在溶液中(例如,Houghten,Bio/Techniques,13:412-421,1992)、珠粒上(Lam,Nature,354:82-84,1991、芯片上(Fodor,Nature,364:555-556,1993)、细菌上(美国专利号5,223,409)、质粒上(Cull等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:1865-1869,1992)、或噬菌体上(Scott和Smith,Science,249:386-390,1990;Devlin,Science,249:404-406,1990;Cwirla等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:6378-6382,1990;和Felici,J.Mol.Biol.,222:301-310,1991)进行。然后可以测定已经鉴定特异性结合配体(例如,FcγRIIIA、FcγRIIB、C1q或抗原)的分子的对于配体的亲和力。

[0278] 可以通过本领域已知的任何方法测定本发明的Fc变体与分子如抗原(例如,癌抗原和与其他抗原的交叉反应性)或配体(例如,FcγR)的特异性结合。可用于分析特异性结合和交叉反应性的免疫测定包括但不限于使用下列技术的竞争性和非竞争性测定系统:如western印迹、放射性免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体-固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白A免疫测定、仅举几个实例。这些测定是常规的和本领域众所周知

的(参见例如,Ausubel等人编辑,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第一版,John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0279] 可以通过竞争性结合测定来确定本发明的Fc变体与分子,如抗原或配体(例如FcγR)的结合亲和力和相互作用的解离速率。竞争性结合测定的一个实例是放射免疫测定法,其包括在渐增量的未标记配体如FcγR存在的情况下将标记的配体如FcγR(例如3H或125I)与感兴趣的分子(例如,本发明的Fc变体)孵育,且检测与标记的配体结合的分子。可以通过scatchard分析从饱和数据确定本发明的分子与配体的亲和力和结合解离速率。

[0280] 也可以使用本领域已知的任何基于表面等离子共振(SPR)的测定(例如,BIAcore动力学分析)来确定Fc变体的动力学参数。基于SPR技术的综述参见Mullet等人,2000,Methods 22:77-91;Dong等人,2002,Review in Mol.Biotech.,82:303-23;Fivash等人,1998,Current Opinion in Biotechnology 9:97-101;Rich等人,2000,Current Opinion in Biotechnology 11:54-61。此外,在美国专利号6,373,577;6,289,286;5,322,798;5,341,215;6,268,125中描述用于测量蛋白-蛋白相互作用的任何SPR仪器和基于SPR的方法涵盖在本发明的方法中。

[0281] 使用本领域技术人员已知的任何技术的荧光活化的细胞分选(FACS),可以用于表征Fc变体与细胞表面上表达的分子(例如,FcγRIIIA,FcγRIIB)的结合。流式分选仪能够快速地检查大量的含有文库插入物的单独的细胞(例如,10-10000万个细胞/每小时)(Shapiro等人,Practical Flow,Cytometry,1995)。用于分选和检查生物细胞的流式细胞仪是本领域众所周知的。例如,在美国专利号4,347,935、5,464,581、5,483,469、5,602,039、5,643,796和6,211,477中描述了已知的流式细胞仪。其他已知的流式细胞仪是Becton Dickinson and Company制造的FACS Vantage™系统,和Union Biometrica制造的COPAS™系统。

[0282] 可以通过本发明的Fc变体介导FcγR介导的效应细胞功能来表征本发明的Fc变体。可以测定的效应细胞功能的实例包括但不限于,抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、吞噬作用、调理作用、调理吞噬作用(opsonophagocytosis)、C1q结合以及补体依赖性细胞介导的细胞毒性(CDC)。可以使用本领域技术人员已知用于确定效应细胞功能活性的任何基于细胞的或无细胞的测定(对于效应细胞测定,参见Perussia等人,2000,Methods Mol.Biol.121:179-92;Baggiolini等人,1998Experientia,44(10):841-8;Lehmann等人,2000J.Immunol.Methods,243(1-2):229-42;Brown E J.1994,Methods Cell Biol.,45:147-64;Munn等人,1990J.Exp.Med.,172:231-237,Abdul-Majid等人,2002Scand.J.Immunol.55:70-81;Ding等人,1998,Immunity 8:403-411)。

[0283] 具体而言,可以使用本领域技术人员已知的任何标准方法,在效应细胞(如天然杀伤细胞)中测定本发明的Fc变体的FcγR介导的ADCC活性(参见例如,Perussia等人,2000,Methods Mol.Biol.121:179-92)。确定本发明的分子的ADCC活性的示例性测定基于51Cr释放测定,包括:用[51Cr]Na_2CrO_4(这种细胞膜可透过的分子一般被用于标记,因为它结合胞浆蛋白,虽然以缓慢动力学从细胞自发释放,但是在靶细胞坏死之后大量地释放)标记靶细胞;用本发明的Fc变体调理靶细胞;在微量滴定板上以合适的靶细胞对效应细胞比例来组合调理的放射性标记的靶细胞和效应细胞;在37℃培养细胞的混合物16-18小时;收集上清液;并分析放射性。随后可以确定本发明的分子的细胞毒性,例如,使用以下公式:裂解%=

(实验的cpm-靶渗漏cpm)/(去污剂裂解cpm-靶渗漏cpm)x100%。可替代的,裂解%=(ADCC-AICC)/(最大释放-自发释放)。特异性裂解可以使用以下公式计算:特异性裂解=本发明的分子的裂解%-不存在本发明分子时的裂解%。通过改变靶细胞:效应细胞比例或抗体浓度,可以产生图表。

[0284] 表征Fc变体结合C1q和介导补体依赖的细胞毒性(CDC)的能力的方法是本领域中众所周知的。例如,为了确定C1q结合,可以进行C1q结合ELISA。示例性的测定可以包含以下:在包被缓冲液中用多肽变体或起始多肽(对照)在4C过夜包被测定板。然后可以洗涤和封闭平板。在洗涤之后,将人C1q的等分试样添加到每个孔,在室温下孵育2小时。进一步的洗涤之后,可以将100uL绵羊抗补体C1q过氧化物酶缀合的抗体添加到每个孔,在室温下孵育1小时。可以再次用洗涤缓冲液洗涤平板,将含有OPD(O-苯二胺二氢氯化物(Sigma))的100uL底物缓冲液添加到每个孔中。可以容许通过黄色的出现观察到的氧化反应进行30分钟,并且通过添加100ul 4.5NH2SO4来停止。然后可以在(492-405)nm读取吸光度。

[0285] 为了评估补体活化,可以进行补体依赖性细胞毒性(CDC)测定(例如Gazzano-Santoro等人,1996,J.Immunol.Methods 202:163中所描述)。简而言之,可以用缓冲液稀释各种浓度的Fc变体和人补体。表达Fc变体所结合的抗原的细胞可以被稀释到约1×106细胞/ml的密度。Fc变体、稀释的人补体和表达抗原的细胞的混合物可以添加到平底组织培养96孔平板上,容许在37℃、5%CO_2下孵育2小时以促进补体介导的细胞裂解。然后可以向每个孔添加50uL的阿尔玛蓝(Accumed International),并在37℃孵育过夜。用530nm的激发和590nm的发射,使用96孔荧光计测量吸光度。结果可以相对荧光单位(RFU)表示。可以从标准曲线计算样品浓度,对于感兴趣的Fc变体报告相对于可比较分子(即,包含具有未修饰或野生型CH3结构域的Fc区的分子)的百分比活性。

[0286] 可以用豚鼠、兔或人血清进行补体测定。可以通过监测细胞内的酶诸如乳酸脱氢酶(LDH)来检测靶细胞的补体裂解,如描述于Korzeniewski等人,1983,Immunol.Methods 64(3):313-20;和Decker等人.,1988,J.Immunol Methods 115(1):61-9;或其中靶细胞标记的细胞内标记如铬、铬51或铟111的释放。

[0287] 方法

[0288] 本发明包括将一种或多种本发明的Fc变体(如抗体)施用于动物,特别是哺乳动物,特别是人,以预防、治疗或改善与疾病、病症或感染相关的一种或多种症状。本发明的Fc变体尤其可用于治疗或预防需要改变效应细胞功能功效(如ADCC、CDC)的疾病或病症。Fc变体及其组合物特别可用于治疗或预防原发性或转移性肿瘤疾病(即癌症)和感染性疾病。本发明的分子可以提供于本领域已知的或如本文所述的药学可接受的组合物中。如下所详述,本发明分子可用于治疗或预防癌症(特别是被动免疫治疗)、自身免疫病、炎性病症或感染性疾病的方法中。

[0289] 本发明Fc变体也可以有利地与本领域已知的其他治疗剂联用,以治疗或预防癌症、自身免疫病、炎性病症或感染性疾病。在一个特定实施方案中,本发明Fc变体可以与单克隆或嵌合抗体、淋巴因子或造血生长因子(如IL-2、IL-3和IL-7)联用,以提高与该分子相互作用的效应细胞的数量或活性并提高免疫应答。本发明Fc变体也可以有利地与治疗疾病、病症或感染的一种或多种药物联用,这些药物包括例如抗癌药、抗炎药或抗病毒药。

[0290] 相应地,本发明提供了用于通过施用本发明的一种或多种Fc变体而预防、治疗或

改善与癌症和相关状况相关的一种或多种症状的方法。尽管不期望被任何作用机制所束缚，本发明的Fc变体(其以高于可比较分子的亲和力结合FcγRIIIA和/或FcγRIIA，且进一步以低于可比较分子的亲和力结合FcγRIIB，和/或所述Fc变体具有增强的效应功能，例如，ADCC、CDC、吞噬作用、调理作用等)将导致癌细胞的选择性靶向和有效破坏。

[0291] 本发明还包括将本发明一种或多种Fc变体与本领域技术人员已知的其他疗法联合施用，以治疗或预防癌症，这些疗法包括但不限于：目前标准和实验性的化疗、激素治疗、生物治疗、免疫治疗、放疗或手术。在一些实施方案中，本发明分子可与治疗或预防有效量的一种或多种抗癌药、治疗性抗体或本领域技术人员已知用于治疗和/或预防癌症的其他药物联合施用。可以与本发明Fc变体联用的给药方案和治疗的实例是本领域众所周知的，详见其他文献(参见例如，PCT公开WO 02/070007和WO 03/075957)。

[0292] 可用本发明方法和组合物治疗或预防的癌症和相关病症包括但不限于：白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨和结缔组织肉瘤、脑瘤、乳腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、垂体癌、眼癌、阴道癌、外阴癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、食道癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、肺癌、睾丸癌、前列腺癌、阴茎癌(penal cancer)；口腔癌、唾液腺癌、咽喉癌、皮肤癌、肾癌、膀胱癌(这些病症的综述参见Fishman等人，1985，Medicine，第2版，J.B.Lippincott Co.，Philadelphia和Murphy等人，1997，Informed Decisions：The Complete Book of Cancer Diagnosis，Treatment，and Recovery，Viking Penguin，Penguin Books U.S.A.，Inc.，United States of America)。

[0293] 本发明进一步考虑了工程改造本领域已知的任何抗体而用于治疗和/或预防癌症和相关病症，使得该抗体包含并入本发明的变体CH3结构域的Fc区。

[0294] 在一个特定实施方案中，与不存在本发明所述分子时原发性肿瘤的生长或转移相比，本发明分子(如含有变体Fc异源二聚体)将原发性肿瘤的生长或癌细胞的转移抑制或降低至少99％、至少95％、至少90％、至少85％、至少80％、至少75％、至少70％、至少60％、至少50％、至少45％、至少40％、至少45％、至少35％、至少30％、至少25％、至少20％或至少10％。

[0295] 本发明包括一种或多种本发明Fc变体用于预防、治疗或控制受试者中与炎性病症相关的一种或多种症状的用途。尽管不期望受任何作用机制所束缚，但是对于FcγRIIB具有增强亲和力的Fc变体将导致活化受体的抑制和因此免疫应答的抑制，且对于治疗和/或预防自身免疫性病症具有治疗效力。此外，结合多于一个与炎症病症相关的目标的抗体，如包含变体Fc异源二聚体的双特异性抗体，可以提供相对于单价治疗的增效剂效果。

[0296] 本发明还包括将本发明Fc变体与治疗或预防有效量的一种或多种抗炎药联合施用。本发明也提供预防、治疗或控制与自身免疫病有关的一种或多种症状的方法，还包括将本发明Fc变体与治疗或预防有效量的一种或多种免疫调节剂联合施用于所述受试者。可通过施用本发明Fc变体治疗的自身免疫病的实例包括但不限于：斑秃、强直性脊柱炎、抗磷脂综合征、自身免疫性阿狄森病、肾上腺的自身免疫性贫血、自身免疫性溶血性、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少、贝切特病、大泡性类天疱疮、心肌病、脂肪便症-皮炎、慢性疲劳免疫机能障碍综合征(CFIDS)、慢性炎性脱髓鞘性多神经病、丘-施综合征、疤痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合型冷球蛋白血症、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格雷夫斯病、格-巴综合征

(Guillain-Barre)、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA神经病、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、梅尼尔病、混合型结缔组织病、多发性硬化、1型或免疫介导的糖尿病、重症肌无力、寻常天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、雷诺现象(Raynauld′s phenomenon)、莱特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、斯耶格伦综合征、全身肌强直综合征、系统性红斑狼疮、红斑狼疮、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎如疱疹样皮炎血管炎、白癜风和韦格纳肉芽肿病。炎性病症的实例包括但不限于:哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病(COPD)、变应性病症、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病、未分化关节病、关节炎、炎性骨质溶解和慢性病毒或细菌感染所致的慢性炎症。一些自身免疫性病症与炎性疾病有关,因此,所认为的自身免疫性病症和炎性病症有重叠。因此,一些自身免疫性病症可被表征为炎性病症。可按照本发明方法预防、治疗或控制的炎性病症的实例包括但不限于:哮喘、脑炎、炎性肠病、慢性阻塞性肺病(COPD)、变应性病症、感染性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病、未分化关节病、关节炎、炎性骨质溶解和慢性病毒或细菌感染所致的慢性炎症。

[0297] 也可以利用本发明Fc变体减轻患有炎性病症的动物,特别是哺乳动物的炎症。在一个特定实施方案中,与未施用所述分子的动物的炎症相比,本发明Fc能将动物的炎症减轻至少99%、至少95%、至少90%、至少85%、至少80%、至少75%、至少70%、至少60%、至少50%、至少45%、至少40%、至少45%、至少35%、至少30%、至少25%、至少20%或至少10%。

[0298] 本发明进一步考虑了工程改造本领域已知的任何抗体而用于治疗和/或预防自身免疫性疾病或炎性病症,使得该抗体包含本发明的变体Fc异源二聚体。

[0299] 本发明也包括治疗或预防受试者的感染性疾病的方法,所述方法包括施用治疗或预防有效量的本发明一种或多种Fc变体。可用本发明Fc变体治疗或预防的感染性疾病是包括但不限于病毒、细菌、真菌、原生动物和病毒等感染物引起的。

[0300] 可用本发明Fc变体与本发明方法一起治疗或预防的病毒性疾病包括但不限于以下所致的疾病:甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、流感病毒、水痘病毒、腺病毒、I型单纯疱疹病毒(HSV-I)、II型单纯疱疹病毒(HSV-II)、牛疫病毒、鼻病毒、艾柯病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒、巨细胞病毒、棘状病毒、虫媒病毒、汉他病毒(hunta virus)、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、天花病毒、EB病毒、I型人体免疫缺陷病毒病毒(HIV-I)、II型人体免疫缺陷病毒病毒(HIV-II)以及病毒性疾病如病毒性脑膜炎、脑炎、登革热或天花的病原体。

[0301] 可用本发明Fc变体和本发明方法一起治疗或预防的细菌所致的细菌性疾病包括但不限于:分枝杆菌立克次体病、支原体病、奈瑟菌病、肺炎链球菌(S.pneumonia)病、布氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)病(莱姆病)、炭疽杆菌(Bacillus antracis)病(炭疽)、破伤风、链球菌病、葡萄球菌病、分支杆菌病、破伤风、百日咳、霍乱、鼠疫、白喉、衣原体病、金黄色葡萄球菌(S.aureus)病和军团菌病。可用本发明分子和本发明方法一起治疗或预防的原生动物所致的原生动物病包括但不限于:利什曼原虫病、克氏原虫病(kokzidioa)、锥虫病或疟疾。可用本发明分子和本发明方法一起治疗或预防的寄生虫所致的寄生虫疾病包

括但不限于：衣原体病和立克次体病。

[0302] 在一些实施方案中，本发明Fc变体可与治疗或预防有效量的一种或多种本领域技术人员已知用于治疗和/或预防感染性疾病的其他治疗剂联合施用。本发明考虑将本发明分子与本领域技术人员已知用于治疗和/或预防感染性疾病的其他分子联用，所述其他分子包括但不限于抗生素、抗真菌剂和抗病毒剂。

[0303] 本发明提供了方法和药物组合物，所述组合物包含本发明的Fc变体(例如抗体、多肽)。本发明还提供了通过将有效量的至少一种本发明的Fc变体，或包含至少一种本发明的Fc变体的药物组合物施用于受试者而治疗、预防和改善一种或多种与疾病、病症或感染相关的症状的方法。一方面，该Fc变体是基本纯化的(即基本不含限制其作用或产生不良副作用的物质，这包括同源二聚体和其他细胞材料)。在一个特定实施方案中，受试者是动物，如哺乳动物，包括非灵长动物(如牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)和灵长动物(例如猴，如猕猴和人)。在一个特定实施方案中，受试者是人。在又另一个特定实施方案中，本发明抗体是来自与受试者相同的物种。

[0304] 组合物的施用途径取决于所治疗的疾病。例如，静脉内注射可优选用于治疗全身性病症，如淋巴癌或已经转移的肿瘤。技术人员无需过多实验，结合标准的剂量反应研究，即可确定该组合物的施用剂量。在作出那些确定中考虑的相关环境因素包括所治疗的疾病，所施用组合物的选择，患者个体的年龄、体重和反应，以及患者症状的严重性。根据状况，可通过口服、肠胃外、鼻内、阴道、直肠、舌、舌下、含服、颊内和/或透皮途径将该组合物施用于患者。

[0305] 因此，无需过多实验，可以通过本领域众所周知方式将组合物设计成口服、舌、舌下、含服或颊内施用的形式，例如用惰性稀释剂或用可食用载体。该组合物可以包封在明胶胶囊中，或者压成片剂。出于口服治疗性施用的目的，本发明的药物组合物可掺入赋形剂，以片剂、含片、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆剂、薄片、咀嚼剂等形式使用。

[0306] 片剂、丸剂、胶囊剂、含片等也可含有粘合剂、接受剂(recipient)、崩解剂、润滑剂、甜味剂和/或调味剂。粘合剂的一些实例包括微晶纤维素、黄蓍胶和明胶。赋形剂的实例包括淀粉和乳糖。崩解剂的一些实例包括海藻酸、玉米淀粉等。润滑剂的实例包括硬脂酸镁和硬脂酸钾。助流剂的实例是胶体二氧化硅。甜味剂的一些实例包括蔗糖、糖精等。调味剂的实例包括薄荷、水杨酸甲酯、橙调味剂等。用于制备这些各种组合物的材料应该是药物纯的，且在所用含量下无毒的。

[0307] 可以通过肠胃外途径，如静脉内、肌肉内、鞘内和/或皮下注射施用本发明的药物组合物。可以通过将本发明组合物掺入溶液或悬浮液中进行肠胃外施用。这类溶液或悬浮液还可包含无菌稀释剂，如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇和/或其他合成溶剂。肠胃外制剂还可包含抗菌剂如苄醇和/或对羟基苯甲酸甲酯，解毒剂如抗坏血酸和/或亚硫酸氢钠，以及螯合剂如EDTA。也可添加缓冲剂，如乙酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐，以及涨度调节剂，如氯化钠和右旋糖。肠胃外制剂可封装在安瓿、一次性注射器和/或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。直肠施用包括将该组合物施用于直肠和/或大肠。可使用栓剂和/或灌肠剂来实现这种施用。可用本领域已知方法制备栓剂。透皮施用包括通过皮肤经皮吸收该组合物。透皮制剂包括贴剂、油膏剂、乳膏剂、凝胶剂、软膏剂等。本发明组合物可经鼻施用于患者。如本文所使用，经鼻施用或鼻施用包括将该组合物施用于患者鼻孔和/或鼻

腔的粘膜。

[0308] 可以根据本发明的方法使用本发明的药物组合物而用于预防、治疗或改善一种或多种与疾病、病症或感染相关的症状。可以考虑，本发明的药物组合物是无菌的，且是用于施用于受试者的合适形式。

[0309] 在一个实施方案中，本发明组合物是基本不含内毒素和/或相关热原物质的无热原制剂。内毒素包括限定在微生物内并且在微生物破坏或死亡时释放的毒素。热原物质也包括来自细菌和其他微生物外膜的诱导发热的热稳定性物质(糖蛋白)。如果施用于人，这些物质都可以引起发热、低血压和休克。由于潜在的有害作用，从静脉内施用的药物溶液中除去即使很少量的内毒素，也是有利的。食品药品管理局("FDA")已经规定，在静脉内施用应用中，每小时上限是5内毒素单位(EU)/剂量/千克体重(The United States Pharmacopeial Convention,Pharmacopeial Forum 26(1):223(2000))。当治疗性蛋白质施用量为几百或几千毫克/千克体重时，正如单克隆抗体的情况，除去甚至痕量的内毒素也是有利的。在特定的实施方案中，该组合物中的内毒素和热原水平小于10EU/mg，或小于5EU/mg，或小于1EU/mg，或小于0.1EU/mg，或小于0.01EU/mg，或小于0.001EU/mg。

[0310] 本发明提供预防、治疗或改善与疾病、病症或感染有关的一种或多种症状的方法，所述方法包括：(a)将一个剂量的预防或治疗有效量的含有一种或多种Fc变体的组合物施用于需要其的受试者，和(b)随后施用一个或多个剂量的所述Fc变体，以将Fc变体的血浆浓度维持在所需水平(如约0.1-100μg/ml)，它连续结合抗原。在一个特定实施方案中，将Fc变体的血浆浓度维持在10μg/ml、15μg/ml、20μg/ml、25μg/ml、30μg/ml、35μg/ml、40μg/ml、45μg/ml或50μg/ml。在一个特定实施方案中，所述待施用Fc变体的有效量为每剂量至少1mg/kg至8mg/kg。在另一个特定实施方案中，所述待施用Fc变体的有效量为每剂量至少4mg/kg至5mg/kg。在又另一个特定实施方案中，所述待施用Fc变体的有效量为每剂量50mg至250mg。在仍另一个特定实施方案中，所述待施用Fc变体的有效量为每剂量100mg至200mg。

[0311] 本发明也包括预防、治疗或改善与疾病、病症或感染有关的一种或多种症状的方案，其中将Fc变体与Fc变体和/或变体融合蛋白以外的治疗(如预防或治疗剂)联用。本发明部分基于下列认识：本发明Fc变体能加强其他癌症治疗(包括现有的标准治疗和实验性化疗)的作用、与其协同作用、提高其有效性、提高其耐受性和/或降低其副作用。本发明联合疗法具有累加效力、累加治疗作用或协同作用。本发明联合疗法使得能够与Fc变体联合采用低剂量治疗(如预防或治疗剂)来预防、治疗或改善与疾病、病症或感染有关的一种或多种症状，和/或以较低频率将这类预防或治疗剂施用于患有疾病、病症或感染的受试者，以提高所述受试者的生活质量和/或实现预防或治疗作用。另外，本发明的联合疗法降低或避免与施用现有单一药物治疗和/或现有联合治疗有关的不良或有害的副作用，进而提高患者对该治疗方案的顺应性。可与本发明Fc变体联用的许多分子是本领域众所周知的。参见例如，PCT公开WO 02/070007、WO 03/075957和美国专利公开2005/064514。

[0312] 本发明提供了试剂盒，所述试剂盒在一个或多个容器中包含一种或多种Fc变体，所述Fc变体具有改变的与FcγR和/或C1q的结合亲和力和改变的特异性结合抗原的ADCC和/或CDC活性，所述Fc变体与可检测试剂、治疗剂或药物缀合或融合，其用于监测、诊断、预防、治疗或改善一种或多种与疾病、病症、或感染相关的症状。

[0313] 仅仅出于举例的目的，本发明包括但不限于如下技术方案：

[0314] 技术方案1.分离的异源多聚体,其包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域,所述CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变,其中所述变体CH3结构域具有约70℃或更高的熔解温度(Tm)。

[0315] 技术方案2.分离的异源多聚体,其包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含变体CH3结构域,所述CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变,其中所述异源二聚体Fc区进一步包含变体CH2结构域,所述变体CH2结构域包含不对称氨基酸修饰以促进FcγIIIa受体的选择性结合。

[0316] 技术方案3.根据技术方案2所述的分离的异源多聚体,其中与野生型CH2结构域相比,所述变体CH2结构域选择性结合FcγIIIa受体。

[0317] 技术方案4.根据技术方案2或技术方案3所述的分离的异源多聚体,其中所述变体CH3结构域具有约70℃或更高的熔解温度(Tm)。

[0318] 技术方案5.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中相对于野生型Fc区,所述异源二聚体Fc区在CH3结构域中不包含额外二硫键。

[0319] 技术方案6.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中相对于野生型Fc区,所述异源二聚体Fc区在变体CH3结构域中包含额外二硫键,条件是所述约70℃或更高的熔解温度(Tm)是在不存在额外二硫键的情况下。

[0320] 技术方案7.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中相对于野生型Fc区,所述异源二聚体Fc区在变体CH3结构域中包含额外二硫键,且其中所述变体CH3结构域具有约77.5℃或更高的熔解温度(Tm)。

[0321] 技术方案8.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述异源二聚体Fc区具有大于约90%的纯度。

[0322] 技术方案9.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述异源二聚体Fc区具有约95%或更高的纯度。

[0323] 技术方案10.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述异源二聚体Fc区具有约98%或更高的纯度。

[0324] 技术方案11.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述Tm为约71℃或更高。

[0325] 技术方案12.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述Tm为约74℃或更高。

[0326] 技术方案13.根据技术方案1-3中任一项所述的异源多聚体,其中所述异源二聚体Fc区具有约98%或更高的纯度,且所述Tm为约73℃。

[0327] 技术方案14.根据技术方案1-3中任一项所述的异源多聚体,其中所述异源二聚体Fc区具有约90%或更高的纯度,且所述Tm为约75℃。

[0328] 技术方案15.根据技术方案1所述的分离的异源多聚体,其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。

[0329] 技术方案16.根据技术方案15所述的分离的异源多聚体,其中所述第一CH3结构域多肽或所述第二CH3结构域多肽在位置T411、D399、S400、F405、N390、或K392包含进一步氨基酸修饰。

[0330] 技术方案17.根据技术方案16所述的分离的异源多聚体,其中所述T411位的氨基

酸修饰选自T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。

[0331] 技术方案18.根据技术方案16所述的分离的异源多聚体，其中所述D399位的氨基酸修饰选自D399R、D399W、D399Y或D399K。

[0332] 技术方案19.根据技术方案16所述的分离的异源多聚体，其中所述S400位的氨基酸修饰选自S400E、S400D、S400R、或S400K。

[0333] 技术方案20.根据技术方案16所述的分离的异源多聚体，其中所述F405位的氨基酸修饰选自F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W。

[0334] 技术方案21.根据技术方案16所述的分离的异源多聚体，其中所述N390位的氨基酸修饰选自N390R、N390K或N390D。

[0335] 技术方案22.根据技术方案16所述的分离的异源多聚体，其中所述K392位的氨基酸修饰选自K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。

[0336] 技术方案23.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体，其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366V和K409F。

[0337] 技术方案24.根据技术方案1中任一项所述的分离的异源多聚体，其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰Y407A且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。

[0338] 技术方案25.根据技术方案24所述的分离的异源多聚体，其中所述第一CH3结构域多肽或所述第二CH3结构域多肽包含进一步氨基酸修饰K392E、T411E、D399R和S400R。

[0339] 技术方案26.根据技术方案24所述的分离的异源多聚体，其中所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰D399R、S400R和Y407A且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A、K409F、K392E和T411E。

[0340] 技术方案27.根据技术方案24-26中任一项所述的分离的异源多聚体，其中所述变体CH3结构域具有约74℃或更高的熔解温度(Tm)且所述异源二聚体具有约95％或更高的纯度。

[0341] 技术方案28.根据技术方案1所述的分离的异源多聚体，其中第一CH3结构域多肽在L351和Y407位包含氨基酸修饰且第二CH3结构域多肽包含T366位的氨基酸修饰和氨基酸修饰K409F。

[0342] 技术方案29.根据技术方案28所述的分离的异源多聚体，其中所述L351位的氨基酸修饰选自L351Y、L351I、L351D、L351R或L351F。

[0343] 技术方案30.根据技术方案28所述的分离的异源多聚体，其中所述Y407位的氨基酸修饰选自Y407A、Y407V或Y407S。

[0344] 技术方案31.根据技术方案28所述的分离的异源多聚体，其中所述T366位的氨基酸修饰选自T366A、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。

[0345] 技术方案32.根据技术方案28-31中任一项所述的分离的异源多聚体，其中所述变体CH3结构域具有约75℃或更高的熔解温度(Tm)且所述异源二聚体具有约90％或更高的纯度。

[0346] 技术方案33.根据技术方案1所述的分离的异源多聚体，其中第一CH3结构域多肽包含F405位的氨基酸修饰和氨基酸修饰L351Y和Y407V且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T394W。

[0347] 技术方案34.根据技术方案33所述的分离的异源多聚体,其中所述第一CH3结构域多肽或所述第二CH3结构域多肽在位置K392、T411、T366、L368或S400包含氨基酸修饰。

[0348] 技术方案35.根据技术方案33所述的分离的异源多聚体,其中所述F405位的氨基酸修饰是F405A、F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W。

[0349] 技术方案36.根据技术方案34所述的分离的异源多聚体,其中所述K392位的氨基酸修饰是K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。

[0350] 技术方案37.根据技术方案34所述的分离的异源多聚体,其中所述T411位的氨基酸修饰是T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。

[0351] 技术方案38.根据技术方案34所述的分离的异源多聚体,其中所述S400位的氨基酸修饰是S400E、S400D、S400R、或S400K。

[0352] 技术方案39.根据技术方案34所述的分离的异源多聚体,其中所述T366位的氨基酸修饰是T366A、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。

[0353] 技术方案40.根据技术方案34所述的分离的异源多聚体,其中所述L368位的氨基酸修饰是L368D、L368R、L368T、L368M、L368V、L368F、L368S和L368A。

[0354] 技术方案41.根据技术方案1所述的分离的异源多聚体,其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T394W。

[0355] 技术方案42.根据技术方案41所述的分离的异源多聚体,其中所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L或T366I。

[0356] 技术方案43.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366I、K392M和T394W。

[0357] 技术方案44.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L、K392M和T394W。

[0358] 技术方案45.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L和T394W。

[0359] 技术方案46.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366I和T394W。

[0360] 技术方案47.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中变体CH3结构域包含选自表4中所列变体的氨基酸突变。

[0361] 技术方案48.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中变体CH3结构域包含选自表6中所列变体的氨基酸突变。

[0362] 技术方案49.根据技术方案1-3中任一项所述的分离的异源多聚体,其中变体CH3结构域包含选自表7中所列变体的氨基酸突变。

[0363] 技术方案50.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。

[0364] 技术方案51.根据技术方案50所述的分离的异源多聚体,其中所述第一CH3结构域多肽或所述第二CH3结构域多肽在位置T411、D399、S400、F405、N390、或K392包含进一步氨基酸修饰。

[0365] 技术方案52.根据技术方案51所述的分离的异源多聚体,其中所述T411位的氨基酸修饰选自T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。

[0366] 技术方案53.根据技术方案51所述的分离的异源多聚体,其中所述D399位的氨基酸修饰选自D399R、D399W、D399Y或D399K。

[0367] 技术方案54.根据技术方案51所述的分离的异源多聚体,其中所述S400位的氨基酸修饰选自S400E、S400D、S400R、或S400K。

[0368] 技术方案55.根据技术方案51所述的分离的异源多聚体,其中所述F405位的氨基酸修饰选自F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W。

[0369] 技术方案56.根据技术方案51所述的分离的异源多聚体,其中所述N390位的氨基酸修饰选自N390R、N390K或N390D。

[0370] 技术方案57.根据技术方案51所述的分离的异源多聚体,其中所述K392位的氨基酸修饰选自K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。

[0371] 技术方案58.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y和Y407A且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366V和K409F。

[0372] 技术方案59.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰Y407A且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A和K409F。

[0373] 技术方案60.根据技术方案59所述的分离的异源多聚体,其中所述第一CH3结构域多肽或所述第二CH3结构域多肽包含进一步氨基酸修饰K392E、T411E、D399R和S400R。

[0374] 技术方案61.根据技术方案59所述的分离的异源多聚体,其中所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰D399R、S400R和Y407A且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366A、K409F、K392E和T411E。

[0375] 技术方案62.根据技术方案59-61中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述变体CH3结构域具有约74℃或更高的熔解温度(Tm)且所述异源二聚体具有约95%或更高的纯度。

[0376] 技术方案63.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含L351位的氨基酸修饰和氨基酸修饰Y407A且所述第二CH3结构域多肽包含T366位的氨基酸修饰和氨基酸修饰K409F。

[0377] 技术方案64.根据技术方案63所述的分离的异源多聚体,其中所述L351位的氨基酸修饰选自L351Y、L351I、L351D、L351R或L351F。

[0378] 技术方案65.根据技术方案63所述的分离的异源多聚体,其中所述Y407位的氨基酸修饰选自Y407A、Y407V或Y407S。

[0379] 技术方案66.根据技术方案63所述的分离的异源多聚体,其中所述T366位的氨基酸修饰选自T366A、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。

[0380] 技术方案67.根据技术方案63-66中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述变体CH3结构域具有约75℃或更高的熔解温度(Tm)且所述异源二聚体具有约90%或更高的纯度。

[0381] 技术方案68.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含F405位的氨基酸修饰和氨基酸修饰L351Y和Y407V且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T394W。

[0382] 技术方案69.根据技术方案68所述的分离的异源多聚体,其中所述第一CH3结构域多肽或所述第二CH3结构域多肽在位置K392、T411、T366、L368或S400包含氨基酸修饰。

[0383] 技术方案70.根据技术方案68所述的分离的异源多聚体,其中所述F405位的氨基酸修饰是F405A、F405I、F405M、F405T、F405S、F405V或F405W。

[0384] 技术方案71.根据技术方案69所述的分离的异源多聚体,其中所述K392位的氨基酸修饰是K392V、K392M、K392R、K392L、K392F或K392E。

[0385] 技术方案72.根据技术方案69所述的分离的异源多聚体,其中所述T411位的氨基酸修饰是T411N、T411R、T411Q、T411K、T411D、T411E或T411W。

[0386] 技术方案73.根据技术方案69所述的分离的异源多聚体,其中所述S400位的氨基酸修饰是S400E、S400D、S400R、或S400K。

[0387] 技术方案74.根据技术方案69所述的分离的异源多聚体,其中所述T366位的氨基酸修饰是T366A、T366I、T366L、T366M、T366Y、T366S、T366C、T366V或T366W。

[0388] 技术方案75.根据技术方案69所述的分离的异源多聚体,其中所述L368位的氨基酸修饰是L368D、L368R、L368T、L368M、L368V、L368F、L368S和L368A。

[0389] 技术方案76.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰L351Y、F405A和Y407V且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T394W。

[0390] 技术方案77.根据技术方案76所述的分离的异源多聚体,其中所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L或T366I。

[0391] 技术方案78.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366I、K392M和T394W。

[0392] 技术方案79.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L、K392M和T394W。

[0393] 技术方案80.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366L和T394W。

[0394] 技术方案81.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含第一CH3结构域多肽和第二CH3结构域多肽,所述第一CH3结构域多肽包含氨基酸修饰F405A和Y407V且所述第二CH3结构域多肽包含氨基酸修饰T366I和T394W。

[0395] 技术方案82.根据技术方案1-3、50、58、59、63、68、76、78、79、80或81中任一项所述的异源多聚体,其中所述异源多聚体是双特异性抗体。

[0396] 技术方案83.根据技术方案1-3、50、58、59、63、68、76、78、79、80或81中任一项所述的异源多聚体,其中所述异源多聚体是多特异性抗体。

[0397] 技术方案84.组合物,包含根据技术方案1-3、50、58、59、63、68、76、78、79、80或81中任一项所述的异源多聚体和药学可接受的载体。

[0398] 技术方案85.宿主细胞,包含编码根据技术方案1-3、50、58、59、63、68、76、78、79、80或81中任一项所述的异源多聚体的核酸。

[0399] 技术方案86.根据技术方案1-3、50、58、59、63、68、76、78、79、80或81中任一项所述的分离的异源多聚体,其中所述异源多聚体包含至少一种治疗性抗体。

[0400] 技术方案87.根据技术方案1所述的分离的异源多聚体,其中所述异源多聚体包含至少一种选自下列的治疗性抗体:阿巴伏单抗、阿达木单抗、阿伦珠单抗、aurograb、巴匹珠单抗、巴利昔单抗、贝利木单抗、贝伐珠单抗、briakinumab、卡那单抗、卡妥索单抗、塞舍珠单抗、西妥昔单抗、达克珠单抗、地舒单抗、依法珠单抗、加利昔单抗、吉妥珠单抗奥佐米星、戈利木单抗、替伊莫单抗、英利昔单抗、伊匹木单抗、鲁昔单抗、美泊利单抗、莫他珠单抗、莫罗单抗、mycograb、那他珠单抗、尼妥珠单抗、奥瑞珠单抗、奥法木单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕尼单抗、培妥珠单抗、雷珠单抗、瑞利珠单抗、利妥昔单抗、替利珠单抗、托珠单抗/atlizumab、托西莫单抗、曲妥珠单抗、ProxiniumTM、RencarexTM、优特克单抗和扎芦木单抗。

[0401] 技术方案88.治疗患有由癌抗原表征的癌症的患者中的癌症的方法,所述方法包括将治疗有效量的技术方案86的异源多聚体施用于所述患者。

[0402] 技术方案89.治疗患有由免疫抗原表征的免疫病症的患者中的免疫病症的方法,所述方法包括将治疗有效量的技术方案86的异源多聚体施用于所述患者。

[0403] 技术方案90.分离的异源多聚体,包含异源二聚体Fc区,其中所述异源二聚体Fc区包含具有增加稳定性的变体CH3结构域,所述变体CH3结构域包含促进异源二聚体形成的氨基酸突变,且其中所述变体CH3结构域选自表1、表6或表7中所列的变体。

5.实施例

[0404] 给出下列实施例用来说明本发明的实施。它们不是用来限制或定义本发明的整个范围。

[0405] 实施例1:具有异源二聚体Fc结构域的二价单特异性抗体的产生。

[0406] 使用针对人/哺乳动物表达优化的密码子经由基因合成构建编码抗体重链和轻链的基因。从已知Her2/neu结合Ab生成Fab序列(Carter P.等人(1992)Humanization of an anti P185Her2antibody for human cancer therapy.Proc Natl Acad Sci 89,4285.)且Fc是IgG1同种型(SEQ ID NO:1)。将最终基因产物亚克隆到哺乳动物表达载体pTT5中(NRC-BRI,Canada)(Durocher,Y.,Perret,S.&Kamen,A.High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human HEK293-EBNA1cells.Nucleic acids research 30,E9(2002))。经由pTT5模板载体的位点定向诱变引入CH3结构域中的突变。对于进行的变体CH3结构域突变的列表,参见表1和表6和表7。

[0407] 为了估计异源二聚体的形成和确定同源二聚体相比于异源二聚体的比例,设计了两条具有不同大小的C-末端延伸的异源二聚体重链(具体地,具有C-末端的His标记的A链

和具有C-末端mRFP加StrepTagII的B链)。该分子量的差异使在非还原性SDS-PAGE中同源二聚体相比于异源二聚体存在差异,如图25A中所示。

[0408] 用1mg/mL 25kDa聚乙烯亚胺(PEI,Polysciences)以2.5:1的PEI:DNA比例在指数生长期(1.5至2百万个细胞/mL)转染HEK293细胞。(Raymond C.等人.A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications.Methods.55(1):44-51(2011))。为了确定用于形成异源二聚体的最佳浓度范围,以三个不同比例的两条重链转染DNA。例如,以2ml培养体积和转染DNA进行该步骤,所述转染DNA由下列构成:5%GFP、45%鲑精DNA、25%轻链和25%总重链,其中以10%/65%;20%/55%;40%/35%的3个不同相对比例(链_A(His)/链_B(mRFP))取样重链A质粒(具有C末端His标记)和重链B质粒(具有C-末端StrepTagII加RFP)以65%/55%/35%或10%/20%/40%)(确定WT_His/WT_mRFP异源二聚体的表观1:1表达比例接近于DNA比例20%/55%)。在转染后4至48小时,在F17无血清培养基(Gibco)中,添加TN1蛋白胨至0.5%的终浓度。通过SDS-PAGE分析表达的抗体,以确定用于形成最佳异源二聚体的重链和轻链的最佳比例(参见图25B和C)。

[0409] 如上所述选择的DNA比例,例如AZ33和AZ34的50%轻链质粒、25%重链A质粒、25%重链B,与5%GFP以及45%鲑精DNA,用于转染150mL细胞培养物。5-6天后收获转染的细胞,以4000rpm离心后收集培养液且用0.45μm滤器澄清。对于用于进一步分析生成的具有CH3突变的每种抗体,对于在按比例放大转染测定中使用的轻和重链A和B质粒的百分比列表,包括纯度和熔解温度的测定值,参见下表2。

[0410]

表 2：

变体	LC/HCA/HCB	变体	LC/HCA/HCB	变体	LC/HCA/HCB	变体	LC/HCA/HCB
野生型	50%,50%	AZ47	50%,25%,25%	AZ77	40%,20%,40%	AZ98	50%,20%,30%
AZ12	50%,25%,25%	AZ48	40%,25%,35%	AZ78	50%,20%,30%	AZ100	50%,20%,30%
AZ14	50%,25%,25%	AZ49	50%,25%,25%	AZ79	25%,35%,40%	AZ101	50%,20%,30%
AZ15	50%,25%,25%	AZ63	50%,20%,30%	AZ81	25%,35%,40%	AZ106	25%,35%,40%
AZ17	50%,25%,25%	AZ64	50%,20%,30%	AZ82	50%,20%,30%	AZ114	25%,20%,55%
AZ19	50%,25%,25%	AZ65	50%,20%,30%	AZ83	50%,20%,30%	AZ115	25%,20%,55%
AZ20	50%,25%,25%	AZ66	50%,20%,30%	AZ84	50%,20%,30%	AZ122	25%,20%,55%
AZ21	50%,25%,25%	AZ67	50%,20%,30%	AZ85	50%,25%,25%	AZ123	40%,20%,40%
AZ25	50%,25%,25%	AZ68	50%,20%,30%	AZ86	40%,15%,45%	AZ124	40%,20%,40%
AZ29	50%,25%,25%	AZ69	50%,20%,30%	AZ87	50%,25%,25%	AZ129	40%,30%,30%
AZ30	50%,25%,25%	AZ70	50%,20%,30%	AZ88	50%,25%,25%	AZ130	40%,30%,30%
AZ32	50%,25%,25%	AZ71	40%,20%,40%	AZ89	40%,15%,45%		
AZ33	50%,25%,25%	AZ72	40%,20%,40%	AZ91	50%,25%,25%		

[0411]

AZ34	50%,25%,25%	AZ73	40%,20%,40%	AZ92	40%,20%,40%
AZ42	50%,25%,25%	AZ74	40%,20%,40%	AZ93	40%,20%,40%
AZ44	50%,25%,25%	AZ75	40%,20%,40%	AZ94	50%,25%,25%
AZ46	50%,25%,25%	AZ76	40%,20%,40%	AZ95	50%,20%,30%

[0412] 实施例2:具有异源二聚体Fc结构域的二价单特异性抗体的纯化。

[0413] 将澄清的培养液上样到MabSelect SuRe(GE Healthcare)蛋白A柱上,且用10倍柱体积的PBS缓冲液pH 7.2进行洗涤。用10倍柱体积的柠檬酸盐缓冲液pH 3.6洗脱抗体,合并的级分含有用pH 11的TRIS中和的抗体。最后使用Econo-Pac 10DG柱(Bio-Rad)将蛋白脱盐。通过在25℃在PBS中以1:10,000的比例将抗体与肠激酶(NEB)孵育过夜而去除在重链B上的C末端mRFP标记。通过凝胶过滤从混合物纯化抗体。对于凝胶过滤,将3.5mg抗体混合物浓缩至1.5ml,且以1mL/min的流速经由AKTA Express FPLC上样至Sephadex 200 HiLoad 16/600 200pg柱(GE Healthcare)。以1mL/min的流速使用pH 7.4的PBS缓冲液。收集对应于纯化抗体的级分,浓缩至～1mg/mL且储存于-80℃。

[0414] 使用非还原性SDS-PAGE和质谱测定与同源二聚体相比异源二聚体的形成。在肠激酶(EK)处理前,在4-12％梯度SDS-PAGE、非还原凝胶上运行蛋白A纯化的抗体,以确定形成

的异源二聚体的百分比(参见图26)。对于质谱,在与Waters Q-TOF2质谱仪连接的Agilent 1100 HPLC系统上进行所有Trap LC/MS(ESI-TOF)实验。将5μg凝胶过滤纯化的抗体注射到蛋白MicroTrap(1.0X 8.0mm)中,用1%乙腈洗涤8分钟,1至20%乙腈/0.1%甲酸的梯度2分钟,然后用20至60%乙腈/0.1%甲酸的梯度洗脱20分钟。将洗脱物(30-50μL/min)引导至光谱仪,每秒获得谱(m/z 800至4,000)。(参见图28)。除了AZ12和AZ14(其中每种具有大于85%异源二聚体形成),选择具有大于90%异源二聚体的变体用于进一步分析。

[0415] 实施例3:使用差示扫描量热法(DSC)确定具有异源二聚体Fc结构域的二价单特异性抗体的稳定性。

[0416] 使用GE VP-毛细管仪器进行所有DSC实验。将蛋白缓冲交换至PBS(pH 7.4)中,且稀释至0.4至0.5mg/m,将0.137ml上样至样品室,且用1℃/min的扫描速率20至100℃测量。使用Origin软件(GE Healthcare)分析数据,减去PBS缓冲液背景。(参见图27)。对于测试的变体和确定的熔解温度的列表,参见表3。对于具有70℃和以上的熔解温度的变体和对于每种变体的特定Tm的列表,参见表4。

[0417]

表 3：与同源二聚体形成相比具有90%或更多异源二聚体形成的lgG1抗体中变体CH3结构域的熔解温度测量值

变体	Tm °C	变体	Tm °C	变体	Tm °C	变体	Tm °C
野生型	81	AZ29	70	AZ63	71.5	AZ87	71
对照1	69	AZ30	71	AZ64	74	AZ88	72
对照2	69	AZ31	68	AZ65	73	AZ89	72.5
AZ3	65	AZ32	71.5	AZ66	72.5	AZ91	71.5
AZ6	68	AZ33	74	AZ67	72	AZ92	71.5
AZ8	68	AZ34	73.5	AZ68	72	AZ93	71.5
AZ12	77	AZ38	69	AZ69	71	AZ94	73.5
AZ14	77	AZ42	70	AZ70	75.5	AZ95	72
AZ15	71.5	AZ43	67	AZ71	71	AZ98	70
AZ16	68.5	AZ44	71.5	AZ72	70.5	AZ99	69
AZ17	71	AZ46	70.5	AZ73	71	AZ100	71.5
AZ18	69.5	AZ47	70.5	AZ74	71	AZ101	74

[0418]

AZ19	70.5	AZ48	70.5	AZ75	70	AZ106	74				
AZ20	70	AZ49	71	AZ76	71.5	AZ114	71				
AZ21	70	AZ50	69	AZ77	71	AZ115	70				
AZ22	69	AZ52	68	AZ78	70	AZ117	69.5				
AZ23	69	AZ53	68	AZ79	70	AZ122	71				
AZ24	69.5	AZ54	67	AZ81	70.5	AZ123	70				
AZ25	70.5	AZ58	69	AZ82	71	AZ124	70				
AZ26	69	AZ59	69	AZ83	71	AZ125	69				
AZ27	68	AZ60	67	AZ84	71.5	AZ126	69				
AZ28	69.5	AZ61	69	AZ85	71.5	AZ129	70.5				
		AZ62	68	AZ86	72.5	AZ130	71				

[0419]

表 4：IgG1抗体中选择“变体”CH3结构域的熔解温度测量值

变体	Tm °C	变体	Tm °C	变体	Tm °C	变体	Tm °C
野生型	81.5	AZ42	70	AZ73	71	AZ91	71.5
对照1	69	AZ44	71.5	AZ74	71	AZ92	71.5
对照2	69	AZ46	70.5	AZ75	70	AZ93	71.5
AZ12	>77	AZ47	70.5	AZ76	71.5	AZ94	73.5
AZ14	>77	AZ48	70.5	AZ77	71	AZ95	72
AZ15	71.5	AZ49	71	AZ78	70	AZ98	70
AZ17	71	AZ63	71.5	AZ79	70	AZ100	71.5
AZ19	70.5	AZ64	74	AZ81	70.5	AZ101	74
AZ20	70	AZ65	73	AZ82	71	AZ106	74
AZ21	70	AZ66	72.5	AZ83	71	AZ114	71
AZ25	70.5	AZ67	72	AZ84	71.5	AZ115	70
AZ29	70	AZ68	72	AZ85	71.5	AZ122	71

[0420]

AZ30	71	AZ69	71	AZ86	72.5	AZ123	70
AZ32	71.5	AZ70	75.5	AZ87	71	AZ124	70
AZ33	74	AZ71	71	AZ88	72	AZ129	70.5
AZ34	73.5	AZ72	70.5	AZ89	72.5	AZ130	71

[0421] 实施例4:使用表面等离子共振评价FcγR结合

[0422] 使用BioRad ProteOn XPR36仪器在25℃用10mM HEPES,150mM NaCl,3.4mM EDTA,和0.05%Tween 20pH 7.4进行所有结合实验。通过以25μL/min将4.0μg/mL注入10mM NaOAc(pH 4.5)中而将重组HER-2/neu(p185,ErbB-2(eBiosciences,Inc.))捕获在活化的GLM传感芯片上,直到固定约3000共振单位(RU),猝灭剩余的活性基团。通过在注射缓冲液以建立

稳定基线后当以25μL/min注射240s(导致约500RU)时结合Her-2/neu蛋白而将40μg/mL纯化的包含变体CH3结构域的抗HER-2/neu抗体间接捕获在传感芯片上。以60μL/min注射FcγR(CD16a(f同种异型)和CD32b)浓度(6000、2000、667、222、和74.0nM)持续120s,和180s解离相,以获得一组结合传感图。使用平衡拟合模型从结合等温线确定获得的K_D值,报告值作为三次独立运行的平均值。用野生型IgG1Fc结构域进行比较,且结合表示为WT kD与变体kD的比值(参见,表5)。

[0423] 表5:不依赖于CD16a和CD32b的野生型lgG1与变体CH3结构域抗体结合的kD比值

[0424]

变体	CD16a 比值 WT/变体	CD32b 比值 WT/变体	变体	CD16a 比值 WT/变体	CD32b 比值 WT/变体
对照1	1.28	1.68	AZ64	0.95	0.9
对照2	1.1	1.13	AZ65	0.93	0.9
AZ3	1.75	1.87	AZ66	1.26	1.19
AZ6	1.38	1	AZ67	1.21	1.13
AZ8	1.75	1.64	AZ68	1.02	1.1

[0425]

AZ12	N/A	N/A	AZ69	0.96	1.05
AZ14	N/A	N/A	AZ70	1.06	1.11
AZ15	0.72	0.59	AZ71	0.89	0.95
AZ16	0.95	0.64	AZ72	1.04	1.02
AZ17	2.28	2.37	AZ73	1.09	1.07
AZ18	1.53	1.7	AZ74	1.25	1.17
AZ19	1.55	1.89	AZ75	1.34	1.22
AZ20	2.56	1.93	AZ76	0.99	1
AZ21	2.41	3.28	AZ77	1	1.08
AZ22	2.02	2.37	AZ78	0.9	1
AZ23	1	2.16	AZ79	1.01	0.8
AZ24	1.79	2.26	AZ81	1.01	0.84
AZ25	2.02	2.37	AZ82	0.97	0.94
AZ26	2.38	2.59	AZ83	0.94	0.94
AZ27	2.27	2.38	AZ84	0.93	1
AZ28	1.45	2.15	AZ85	1.01	1.14
AZ29	1.62	2.13	AZ86	1.22	1.18
AZ30	1.61	2.38	AZ87	1.03	1.1
AZ31	1.63	2.29	AZ88	1.11	1.15
AZ32	1.82	2.48	AZ89	1.12	1.24

[0426]

AZ33	1.91	1.89	AZ91	1.11	1.11
AZ34	1.88	1.88	AZ92	1.21	1.24
AZ38	1.78	1.44	AZ93	1.21	1.18
AZ42	1.28	1.09	AZ94	1.17	1.19
AZ43	1.63	1.73	AZ95	0.86	0.96
AZ44	2.76	3.07	AZ98	0.79	0.82
AZ46	2.16	2.66	AZ99	1.16	1.15
AZ47	1.76	2.12	AZ100	1.13	1.12
AZ48	2.02	1.59	AZ101	1.24	1.23
AZ49	2.09	2.9	AZ106	0.76	0.64
AZ50	2.33	1.86	AZ114	1.3	0.84
AZ52	1.55	1.5	AZ115	1.13	0.82
AZ53	1.87	1.27	AZ117	0.89	1
AZ54	1.36	1.64	AZ122	0.89	0.92
AZ58	2.33	1.48	AZ123	0.85	0.92
AZ59	1.18	1.57	AZ124	0.99	1.09
AZ60	1.51	1.23	AZ125	1	1
AZ61	1.41	1.75	AZ126	0.86	0.9
AZ62	1.53	1.88	AZ129	1.91	2.57
AZ63	0.9	0.95	AZ130	1.91	2.54

。

[0427] 实施例5:使用Fc_CH3工程改造-支架1(1a和1b)合理设计Fc变体且开发AZ17-62和AZ133-AZ2438

[0428] 为了改进最初的阴性设计Fc变体AZ8的稳定性和纯度,采用了上述结构和计算策略。(参见图24)。例如,AZ8的深入结构-功能分析提供了对于与野生型人IgG1相比AZ8,L351Y_V397S_F405A_Y407V/K392V_T394W的每个引入突变的详细理解,且表明重要的核心异源二聚体突变是L351Y_F405A_Y407V/T394W,而V397S,K392V对于异源二聚体形成是无关的。核心突变(L351Y_F405A_Y407V/T394W)在本文中被称为“支架1”突变。此外,分析显示,

相对于野生型(WT)同源二聚体形成丢失的重要接口热点是WT-F405-K409、Y407-T366的相互作用和Y407-Y407和-F405的包装(参见图29)。这反映在包装、腔和MD分析中,其显示在环区D399-S400-D401(参见图30)和在K370的相关的β-折叠中的较大构象差异。这导致K409-D399的链间相互作用的损失(参见图30)和K370与E357强氢键的减弱(K370不再与S364和E357直接接触,但完全是溶剂暴露的)。在WT IgG1CH3结构域中,这些区域拴系在边缘处的接口,保护核心相互作用免于大量溶剂竞争,且增加有利的疏水性范德华相互作用的动态发生。其结果是与WT相比AZ8的更低埋藏的表面区域和疏水核心的更高的溶剂可接近性。这表明对于AZ8相比于WT稳定性的更低稳定性的最重要因素是a)WT-F405-K409相互作用和F405的包装的损失,和b)Y407-Y407和Y407-T366的强包装相互作用的损失。参见,图29。

[0429] 因此,我们鉴定了负责AZ8相比于WT的低稳定性的关键残基/序列基序。为了改进AZ8的稳定性和异源二聚体特异性,因此将随后的阳性设计工程改造努力专注于将399-401位的环构象稳定在更'封闭'-WT样构象中(参见图30)且对于在T366和L368位的疏水核心的总体稍微减少的(更松散的)包装进行补偿(参见图29)。

[0430] 为了实现399-401位的环构象的这种稳定性,使用所述计算方法来评价不同的靶向设计思路。具体而言,分析对于Fc变体AZ8的3种不同的独立选择,以优化鉴定的关键区域用于改进稳定性。首先,评价K409和F405A位附近的腔的更好的疏水性包装以便既保护疏水核心又稳定399-400的环构象(参见图30)。这些包括但不限于F405和K392位的额外点突变。其次,评价用于改进399-409位的静电相互作用的选择,以稳定399-400的环构象且保护疏水核心。这包括但不限于T411和S400位的额外点突变。第三,评价在T366、T394W和L368核心包装位置的腔以改进核心疏水包装(参见图29)。这些包括但不限于T366和L368位的额外点突变。在计算机芯片上测试不同独立的阳性设计思路,且实验验证使用计算工具的排序最佳的变体(AZ17-AZ62),用于如实施例1-4中所述的表达和稳定性。对于来自该设计阶段的具有70℃或更高的熔解温度的Fc变体的列表,参见表4。

[0431] Fc变体AZ33是开发Fc变体的实例,其中支架1进行修饰,导致支架1a突变以改进稳定性和纯度。基于AZ8设计该Fc变体,其目标在于改进392-394-409和366位的疏水包装以便既保护疏水核心又稳定399-400的环构象。该Fc变体AZ33异源二聚体具有两个不同于核心突变AZ8、K392M和T366I的额外点突变。突变T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V在本文中被称为"支架1a"突变。设计突变K392M以改进K409和F405A位附近的腔的包装以便保护疏水核心且稳定399-400的环构象(参见图31)。设计T366I以改进核心疏水包装且消除T394W链的同源二聚体的形成(参见图29)。对于AZ33的实验数据显示相对于初始阴性设计Fc变体AZ8(Tm 68℃)的显著改进的稳定性,其中AZ33具有74℃的Tm和>98%的异源二聚体含量。(参见,图25C)。

[0432] 在Fc变体异源二聚体的第三阶段设计中使用支架1突变开发Fc变体

[0433] 尽管AZ33提供了相对于初始起始变体AZ8的显著的稳定性和特异性(或纯度)改进,但是我们的分析表明,可以用进一步氨基酸修饰且使用AZ33的实验数据和上述设计方法进行对Fc变体异源二聚体的稳定性的进一步改进。已经独立地测试了不同设计思路的表达和稳定性,但是独立的设计思路是可转移的,且最成功的异源二聚体将含有不同设计的组合。具体而言,为了优化AZ8包装,已经不依赖于优化残基L366T-L368处的核心包装的突变而评价K409-F405A-K392附近的腔处的突变。这两个区域366-368和409-405-392相互远

离，且被认为是独立的。例如，已经关于在409-405-392、但不是在366-368处的包装对Fc变体AZ33进行优化，因为这些优化突变是分开评价的。366-368突变的比较表明，相比于T366和还有T366I(在Fc变体AZ33的开发中使用的点突变)，T366L具有改进的稳定性。因此，提出的实验数据立即表明通过引入T366L而非T366I(例如)的AZ33的进一步优化。因此，CH3结构域中的氨基酸突变T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V在本文中被称为“支架1b”突变。

[0434] 以类似的方式，已经分析了完整的实验数据以鉴定可以用于进一步改进目前的Fc变体异源二聚体AZ33的点突变。通过上述计算方法对这些鉴定的突变进行分析，且排序以产生基于AZ33的额外Fc变体异源二聚体的列表，如表6中所示。

[0435] 实施例6：使用Fc_CH3工程改造-支架2(a和b)合理设计Fc变体且开发AZ63-101和AZ2199-AZ2524

[0436] 为了改进初始阴性设计阶段Fc变体AZ15的稳定性和纯度，采用了上述结构和计算策略(参见，图24)。例如，Fc变体AZ15的深入结构-功能分析提供了对于与野生型(WT)人lgG1相比AZ15,L351Y_Y407A/E357L_T366A_K409F_T411N的每个引入突变的详细理解，且表明重要的核心异源二聚体突变是L351Y_Y407A/T366A_K409F，而E357L,T411N对于异源二聚体形成和稳定性不是直接相关的。核心突变(L351Y_Y407A/T366A_K409F)在本文中被称为“支架2”突变。此外，分析显示，相对于野生型(WT)同源二聚体形成丢失的重要接口热点是盐桥D399-K409、氢键Y407-T366和包装Y407-Y407。下面提供的我们的详细分析描述了我们如何改进我们的初始Fc变体AZ15和获得这些改进稳定性的Fc变体进行的位置和氨基酸修饰。

[0437] 使用支架2突变开发Fc变体和进一步开发支架2a突变

[0438] 我们的计算机芯片上分析表明，由于WT-Y407-Y407相互作用的损失，Fc变体AZ15突变K409F_T366A_Y407A的非最佳包装和疏水核心的总体减少的包装。在后续的工程改造阶段的阳性设计努力集中在点突变以补偿初始Fc变体AZ15中的这些包装缺陷。靶向的残基包括T366、L351、和Y407位。在计算机芯片上测试这些的不同组合，且关于表达和稳定性实验验证使用计算工具的排序最佳的Fc变体(AZ63-AZ70)，如实施例1-4中所述。

[0439] Fc变体AZ70是开发Fc变体的实例，其中支架2进行修饰，导致支架2a突变以改进稳定性和纯度。基于AZ15设计该Fc变体，其目标实现如上所述的疏水核心的更好包装。Fc变体AZ70具有与上述相同的支架2核心突变(L351Y_Y407A/T366A_K409F)，除了将T366突变为T366V而非T366A(图33)。L351Y突变将366A_409F/407A变体熔解温度从71.5℃改进至74℃，且366A至366V的额外改变将Tm改进至75.5℃。(参见，表4中的AZ63、AZ64和AZ70，其分别具有71.5℃、74℃和75.5℃的Tm)。核心突变(L351Y_Y407A/T366V_K409F)在本文中被称为“支架2a”突变。对于Fc变体AZ70的实验数据显示相比于初始阴性设计Fc变体AZ15(Tm 71℃)的显著改进的稳定性，其中AZ70具有75.5℃的Tm和>90％的异源二聚体含量(图33和27)。

[0440] 使用支架2突变开发Fc变体和进一步开发支架2b突变。

[0441] 分子动力学模拟(Molecular Dynamics simulation,MD)和包装分析显示环399-400的优选的更’开放’构象，这可能是由于WT盐桥K409-D399的损失。这也导致不满意的D399，这依次优选与K392的补偿性相互作用，且诱导环的更’开放’构象。这种更’开放’环构象导致核心CH3结构域接口残基的总体下降的包装和更高的溶剂可接近性，这依次使异源二聚体的稳定性显著下降。因此，针对性的阳性设计努力之一是通过补偿D399-K409盐桥和

K409的包装相互作用的损失的额外点突变而将该环拴系在更'封闭的'WT样构象中。靶向残基包括T411、D399、S400、F405、N390、K392以及它们的组合。在计算机芯片上针对上述位置测试不同包装、疏水性和静电阳性工程改造策略，且关于表达和稳定性实验验证使用计算工具测定的排序最佳的Fc变体(AZ71-AZ101)，如实施例1-4中所述。

[0442] Fc变体AZ94是开发Fc变体的实例，其中支架2进行修饰，导致支架2b突变连同额外的点突变以改进稳定性和纯度。基于AZ15设计该Fc变体，目标是将环399-400拴系在更'封闭的'WT样构象中且补偿如上所述的D399-K409盐桥的损失。Fc变体AZ94具有对于支架2的4个额外点突变(L351Y_Y407A/T366A_K409F)，且将L351Y回复为野生型L351，留下(Y407A/T366A_K409F)作为用于该Fc变体的核心突变。核心突变Y407A/T366A_K409F在本文中被称为“支架2b”突变。AZ94的四个额外点突变是K392E_T411E/D399R_S400R。将突变T411E/D399R工程改造以形成额外的盐桥且弥补K409/D399相互作用的损失(图34)。此外，设计这种盐桥以通过排除两个潜在同源二聚体中的电荷-电荷相互作用以防止同源二聚体形成。额外突变K392E/S400R意在形成另一种盐桥，且因此进一步将399_400环拴系在更“封闭”的WT样构象中(图34)。对于AZ94的实验数据显示相对于初始阴性设计Fc变体AZ15(Tm 71℃，>90％纯度)的改进的稳定性和纯度，其中Fc变体AZ94具有74℃的Tm和>95％的异源二聚体含量或纯度。

[0443] 在Fc变体异源二聚体的第三阶段设计中使用支架2突变开发Fc变体

[0444] Fc变体AZ70和AZ94提供了相对于初始阴性设计Fc变体AZ15的稳定性和纯度的显著改进，但是我们的分析和AZ70和AZ94的比较直接表明，可以用进一步氨基酸修饰进行对Fc变体异源二聚体的稳定性的进一步改进。例如，设计Fc变体AZ70和AZ94靶向初始变体AZ15中的两个不同的非优化区域，这是通过改进疏水核心的包装和在核心接口残基的外部进行突变来完成的，导致额外的盐桥和氢键键合来使399-401位的环构象稳定。Fc变体AZ70和AZ94的额外点突变相互远离，且因此对于设计在相同支架2核心突变(包括2a和2b突变)附近设计的其他Fc变体是独立的且是可转移的。具体而言，AZ70只携带优化的核心突变L351Y_Y407A/T366A_K409F，但没有额外的盐桥，而AZ94包含四个额外静电突变(K392E_T411E/D399R_S400R)，但在疏水核心接口中少一个突变(Y407A/T366A_K409F)。这些支架2b突变比AZ70稳定性更差(参见，例如AZ63，其具有和AZ94等同的核心突变和72℃的Tm)，但是通过添加K392E_T411E/D399R_S400R突变而补偿。提供的实验稳定性和纯度数据表明，结合AZ70的突变(其优化了AZ94的疏水核心和静电突变)应当进一步改进Fc变体异源二聚体的稳定性和纯度。以类似的方式，已经分析了支架2Fc变体(AZ63-101)完整的实验数据以鉴定可以用于进一步改进Fc变体异源二聚体AZ70和AZ94的点突变。通过上述计算方法对这些鉴定的突变进行进一步分析，且排序以产生基于AZ70和AZ94的额外Fc变体异源二聚体的列表，如表7中所示。

[0445] 实施例7：异源二聚体CH3对FcgR结合的影响

[0446] 作为异源二聚体Fc与FcgR的活性的典型实例，我们已经如实施例4中对于FcgR结合所述在SPR测定中测试了两种具有含有Her2结合Fab臂的异源二聚体Fc区A的变体抗体A:K409D_K392D/B:D399K_D356K(对照1(图35中的het 1))和A:Y349C_T366S_L368A_Y407V/B:S354C_T366W(对照4(图35中的het 2))。如图35中所示，我们观察到，两种异源二聚体Fc区都以与野生型IgG1Fc区相同的相对强度结合不同的Fcγ受体，但是总体而言，异源二聚体

Fc区与每种FcgR的结合略优于野生型抗体。这表明,Fc的CH3接口处的突变可以影响Fc区横跨CH2结构域对于FcγR受体的结合强度,正如分子动力学模拟和分析中观察到的。

[0447] 实施例8:异源二聚体Fc的CH2中的不对称突变对FcgR结合的影响

[0448] 已知Fc区的CH2结构域中267位的丝氨酸突变为天冬氨酸(S267D)当以同源二聚的方式引入CH2结构域的两条链中时增强与FcγIIbF、IIbY&IIaR受体的结合。可以将这种突变引入异源二聚体Fc分子的仅一个CH2结构域中以获得相对于当这种突变引入同源二聚体CH2Fc时约一半的结合强度的改进,如在图36A中提供的数据所表明的。另一方面,Fc的同源二聚体CH2结构域中的E269K突变防止了Fc区与FcgR的结合。我们提出了通过在Fc的CH2结构域中的两条链之一上不对称引入这些有利和不利突变而增强操作Fc区对于Fcg受体的结合强度的方案。以不对称方式将E269K突变引入异源二聚体Fc的一条CH2链上通过阻断FcGR在其存在的面处的结合、同时使Fc的另一面与FcgR以正常方式相互作用而充当极性驱动者。来自这些实验的结果提供在图36A中。经由Fc的两条链以独立方式选择性改变结合强度的机会提供了操作Fc和Fcg受体之间的结合强度和选择性的增加的机会。因此,CH2结构域中突变的这种不对称设计使我们能够引入阳性和阴性设计策略以支持或不支持某些结合模型,提供了引入选择性的更多的机会。

[0449] 在随后的实验中,我们已经改变了基础Fc突变体S239D_D265S_I332E_S298A的选择性概况,其显示与FcγIIIaF和IIIaV受体的增加的结合强度,同时继续表现出与FcγIIaR、IIbF和IIbY受体更弱的结合。这显示在图36B中显示的结合概况中。通过在链A中引入不对称突变E269K和在链B中避免I332E突变,我们能够生成新的FcgR结合概况,其进一步减弱IIa和IIb受体结合,且使Fc对于IIIa受体结合更加特异性。

[0450] 在图36C中显示的另一个实例中,突出了相对于同源二聚体Fc的不对称突变,其涉及CH2结构域中的突变S239D/K326E/A330L/I332E/S298A。相对于野生型IgG1Fc,这种变体显示了与IIIa受体结合的增加,但也比野生型Fc略强地结合IIa和IIb受体。以不对称方式A:S239D/K326E/A330L/I332E和B:S298A引入这些突变、同时降低IIIa结合,也增加了IIa/IIb受体结合,在这个过程中失去了选择性。通过在这种异源二聚体变体中引入不对称E269K突变(即A:S239D/K326E/A330L/I332E/E269K和B:S298A),我们能够将IIa/IIb结合降回至野生型水平。这突出了如下事实:在Fc的CH2结构域中使用不对称突变能够提供设计改进的FcγR选择性的重要机会。

[0451] 实施例中采用的试剂是商业上可获得的,或者可以使用商业上可获得的仪器、方法、或本领域已知的试剂来制备。上述实施例说明了本发明的各个方面和本发明的方法的实施。实施例并不意在提供本发明的许多不同实施方案的详尽描述。因此,尽管为了理解清晰,已借助例证和实例相当详细地描述了上述发明,对本领域普通技术人员而言容易理解的是,在没有背离所附的权利要求的精神和范围的情况下,可以对本发明做一些改变和修饰。

[0452] 本说明书中所提到的所有出版物、专利以及专利申请都如同每篇出版物、专利或专利申请被特别且单独指出通过引用并入本文一样的程度通过引用并入本说明书。

<110> 酵活有限公司

CABRERA, Eric

von KREUDENSTEIN, Thomas

DIXIT, Surjit

LARIO, Paula

POON, David

D'ANGELO, Igor

<120> 在 Fc 结构域中具有突变的稳定异源二聚的抗体设计

<130> V84467WO

<150> US 61/410,746

<151> 2010-11-05

[0001] <150> US 61/425,375

<151> 2010-12-21

<150> US 61/439,341

<151> 2011-02-03

<150> US 61/475,614

<151> 2011-04-14

<150> US 61/491,846

<151> 2011-05-31

<150> US 61/497,861

<151> 2011-06-16

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

[0002]

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
1 5 10 15
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
20 25 30
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
35 40 45
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
50 55 60
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
65 70 75 80
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
85 90 95
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
100 105 110
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
115 120 125
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
130 135 140
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
145 150 155 160
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
165 170 175
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
180 185 190
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

195 200 205

Ser Pro Gly Lys

210

<210> 2

<211> 317

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

[0003]

Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu

1 5 10 15

Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp

20 25 30

Ser Gln Ala Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro

35 40 45

Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly

50 55 60

Ala Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn

65 70 75 80

Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn

85 90 95

Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser

100 105 110

Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr

115 120 125

Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His

130 135 140

Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly

145 150 155 160

Lys Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln

165 170 175

Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly

180 185 190

Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro
195 200 205
Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile Ile Val Ala Val Val Ile
210 215 220
Ala Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr
225 230 235 240
Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala
245 250 255
Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg
260 265 270
Gln Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr
275 280 285
Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr
290 295 300
Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn
305 310 315

[0004]

<210> 3
<211> 310
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
1 5 10 15
Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
20 25 30
Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
35 40 45
Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
50 55 60
Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
65 70 75 80
Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln

85 90 95

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr

100 105 110

Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val

115 120 125

Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu

130 135 140

Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu

145 150 155 160

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg

165 170 175

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly

180 185 190

Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys

195 200 205

Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile

[0005] 210 215 220

Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala

225 230 235 240

Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Leu Pro

245 250 255

Gly Tyr Pro Glu Cys Arg Glu Met Gly Glu Thr Leu Pro Glu Lys Pro

260 265 270

Ala Asn Pro Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn

275 280 285

Thr Ile Thr Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro

290 295 300

Asp Asp Gln Asn Arg Ile

305 310

<210> 4

<211> 323

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

[0006]

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
1 5 10 15
Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
20 25 30
Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
35 40 45
Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
50 55 60
Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
65 70 75 80
Ser Ile Pro Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
85 90 95
Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
100 105 110
Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
115 120 125
Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
130 135 140
Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
145 150 155 160
Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
165 170 175
Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
180 185 190
Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
195 200 205
Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile
210 215 220
Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
225 230 235 240
Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser
245 250 255

Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met
260 265 270
Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln Pro Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu
275 280 285
Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp
290 295 300
Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn
305 310 315 320
Ser Asn Asn

<210> 5
<211> 254
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

[0007]
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15
Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30
Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45
Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60
Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80
Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
85 90 95
Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro

145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe

165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln

180 185 190

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

195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp

225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys

245 250

[0008]

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala

1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro

20 25 30

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln

35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu

50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr

65 70 75 80

Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu

85 90 95

[0009]

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110
Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125
His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140
Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
145 150 155 160
Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
165 170 175
Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190
Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
195 200 205
Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225 230

图1

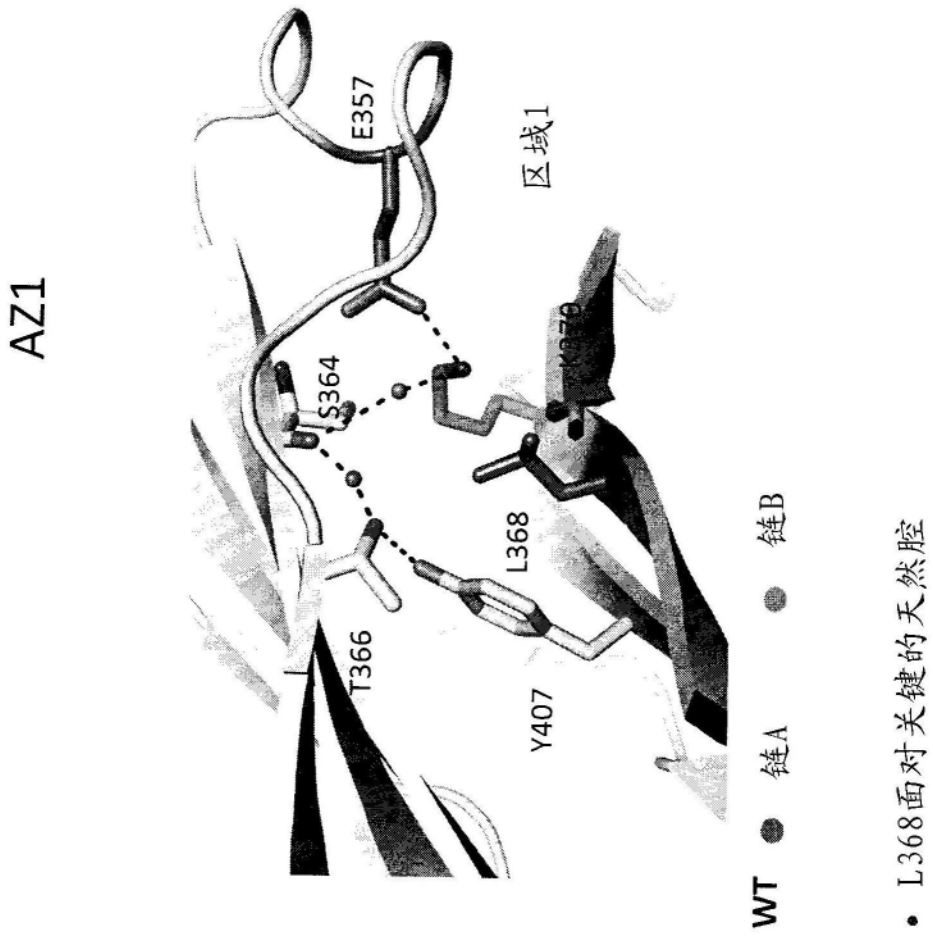
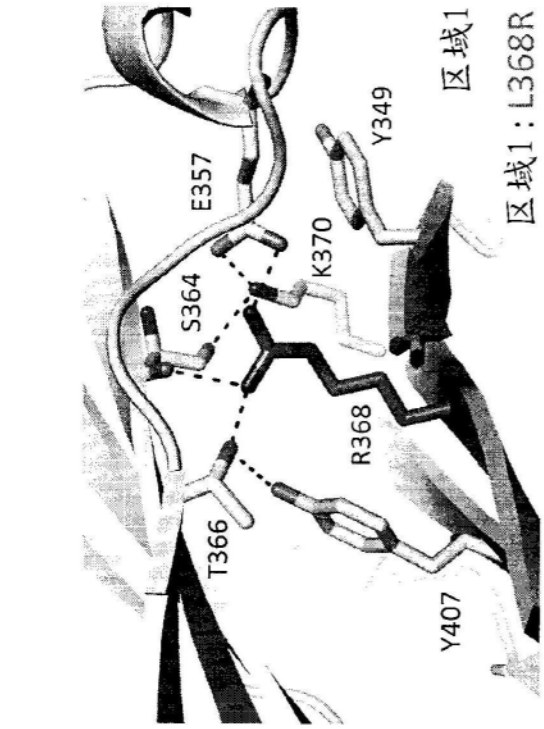
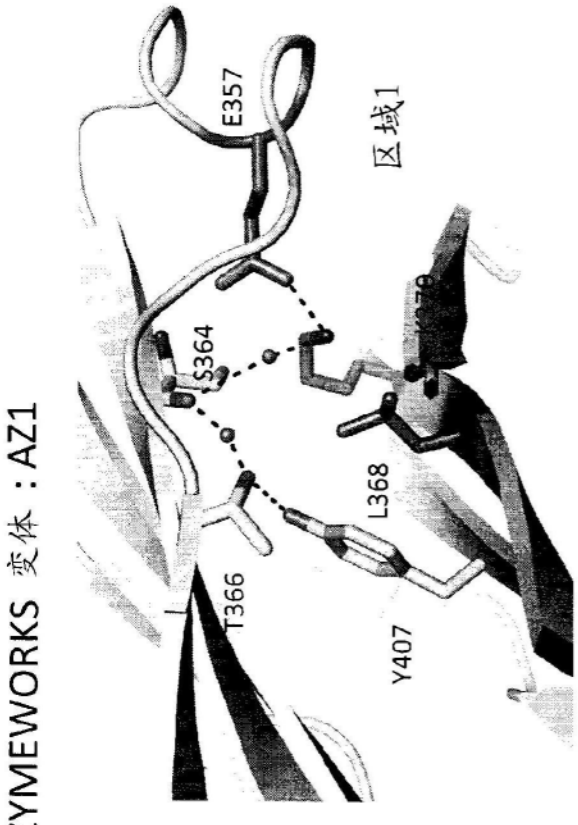


图2





- L368面对关键的天然腔
- L368R通过改进区域1中的包装而增加稳定性

图3

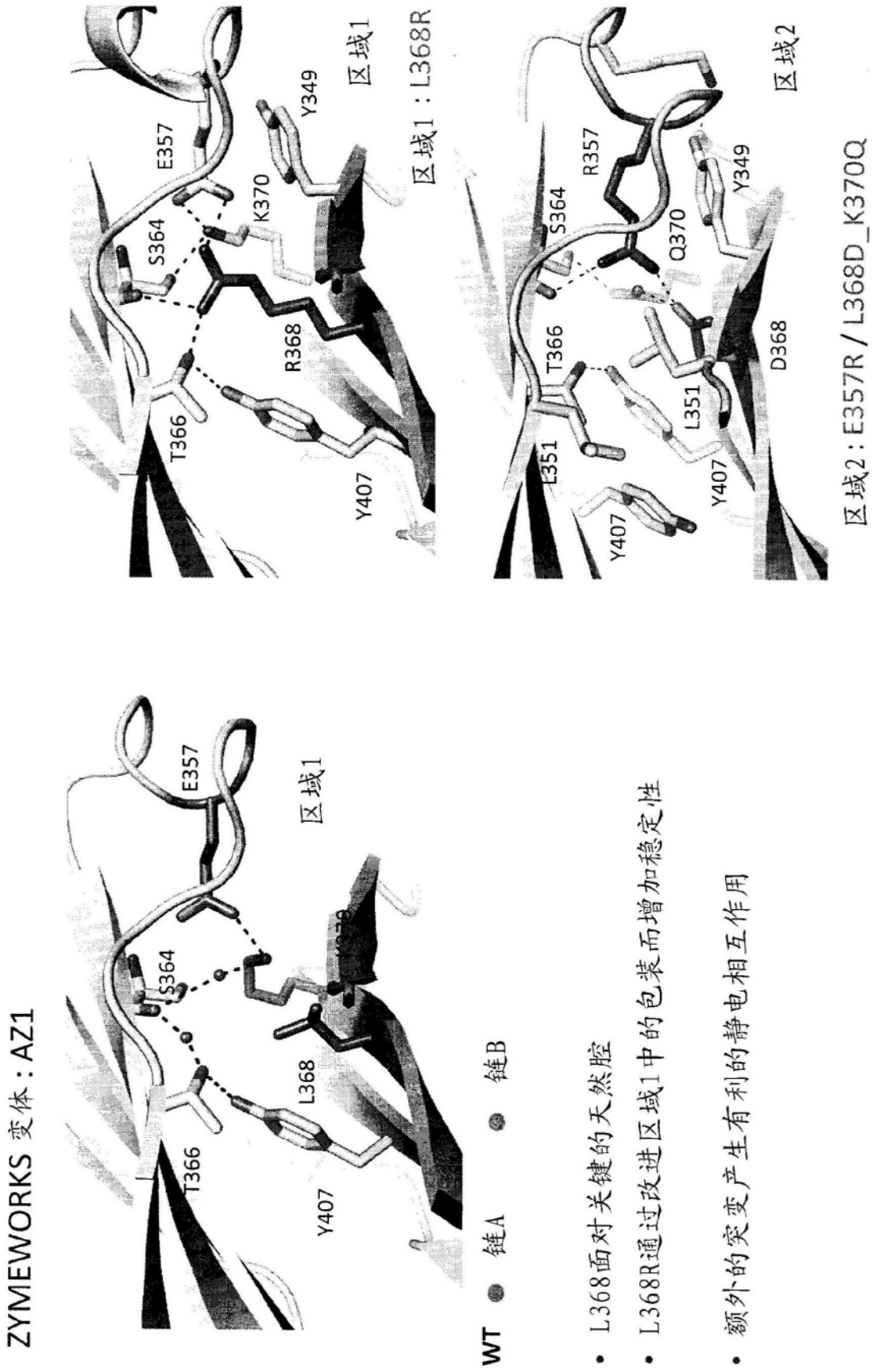

ZYMEWORKS 变体：AZ1
E357
区域1
S364
T366
L368
Y407
WT
链A
链B
• L368面对关键的天然腔
• L368R通过改进区域1中的包装而增加稳定性
• 额外的突变产生有利的静电相互作用
E357
区域1
S364
K370
Y349
区域1：L368R
T366
R368
Y407
R357
区域2
S364
Y349
Q370
T366
D368
L351
L351
Y407
Y407
区域2：E357R / L368D_K370Q

图4

ZYMEWORKS 变体：AZ1

		碰撞评分 (kcal/mol) - wt +	Δ接口面积 (A²) - wt +	Δ包装 (sd) - wt +	Δ静电 (kcal/mol) - wt +	亲和力评分 - wt +
单源二聚体	对照1	-26.2	-46.0	-0.4	12.3	2.1
	AZ1	-14.6	9.9	0.1	-12.3	-0.4
双源二聚体	对照（链A）	-33.6	9.3	-0.5	94.4	N/A
	对照（链B）	-11.5	-77.9	-0.1	69.5	N/A
	AZ1 （链A）	-36.6	23.1	-0.2	87.3	N/A
	AZ1 （链B）	-21.3	-50.8	-0.1	30.8	N/A

黑色 有利的
不利的

图5

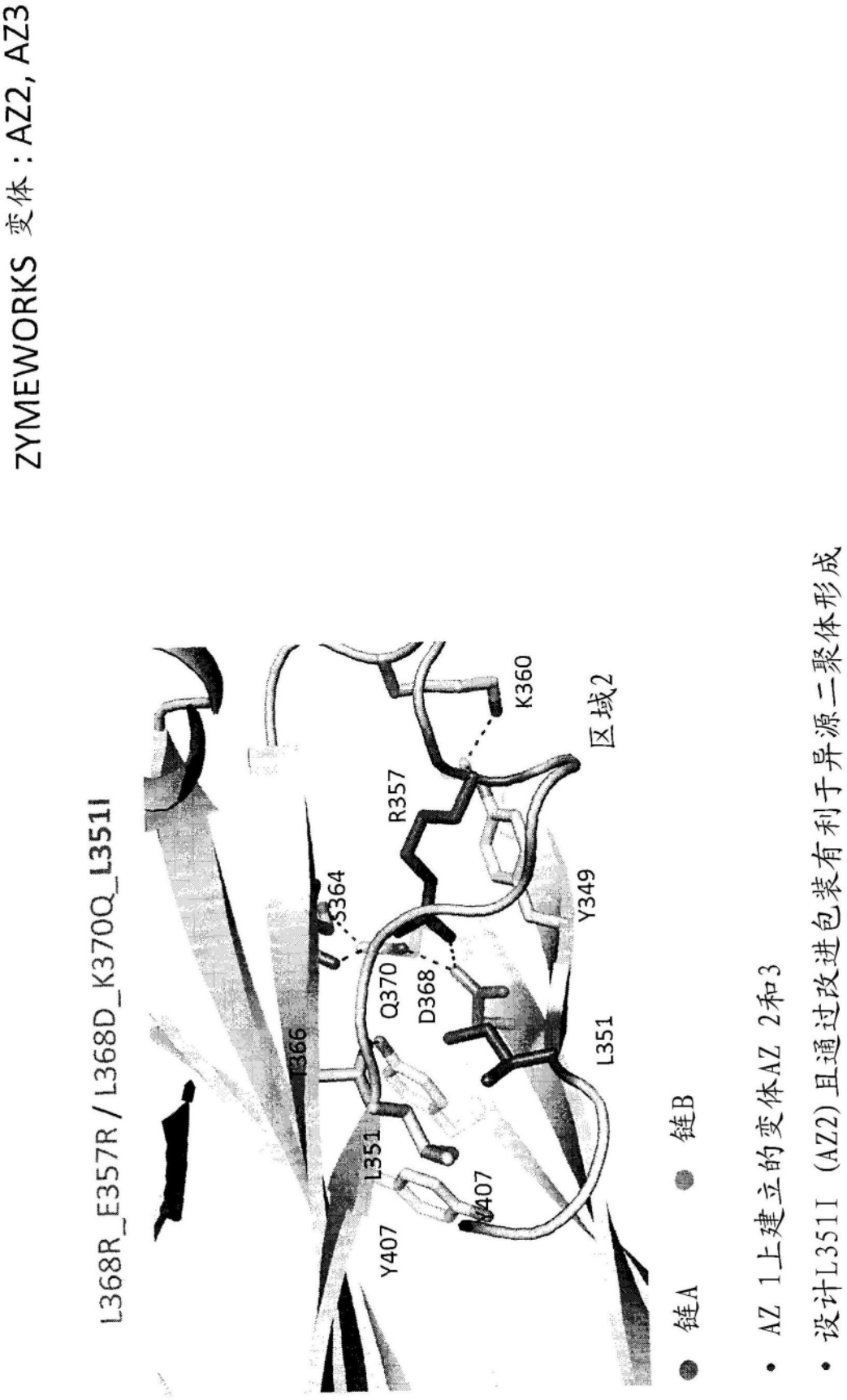

ZYMEWORKS 变体：AZ2, AZ3
L368R_E357R / L368D_K370Q_L351I
L366
S364
Q370
D368
R357
K360
区域2
Y349
L351
Y407
L351
Y407
链A
链B
• AZ 1上建立的变体AZ 2和3
• 设计L351I (AZ2) 且通过改进包装有利于异源二聚体形成

图6

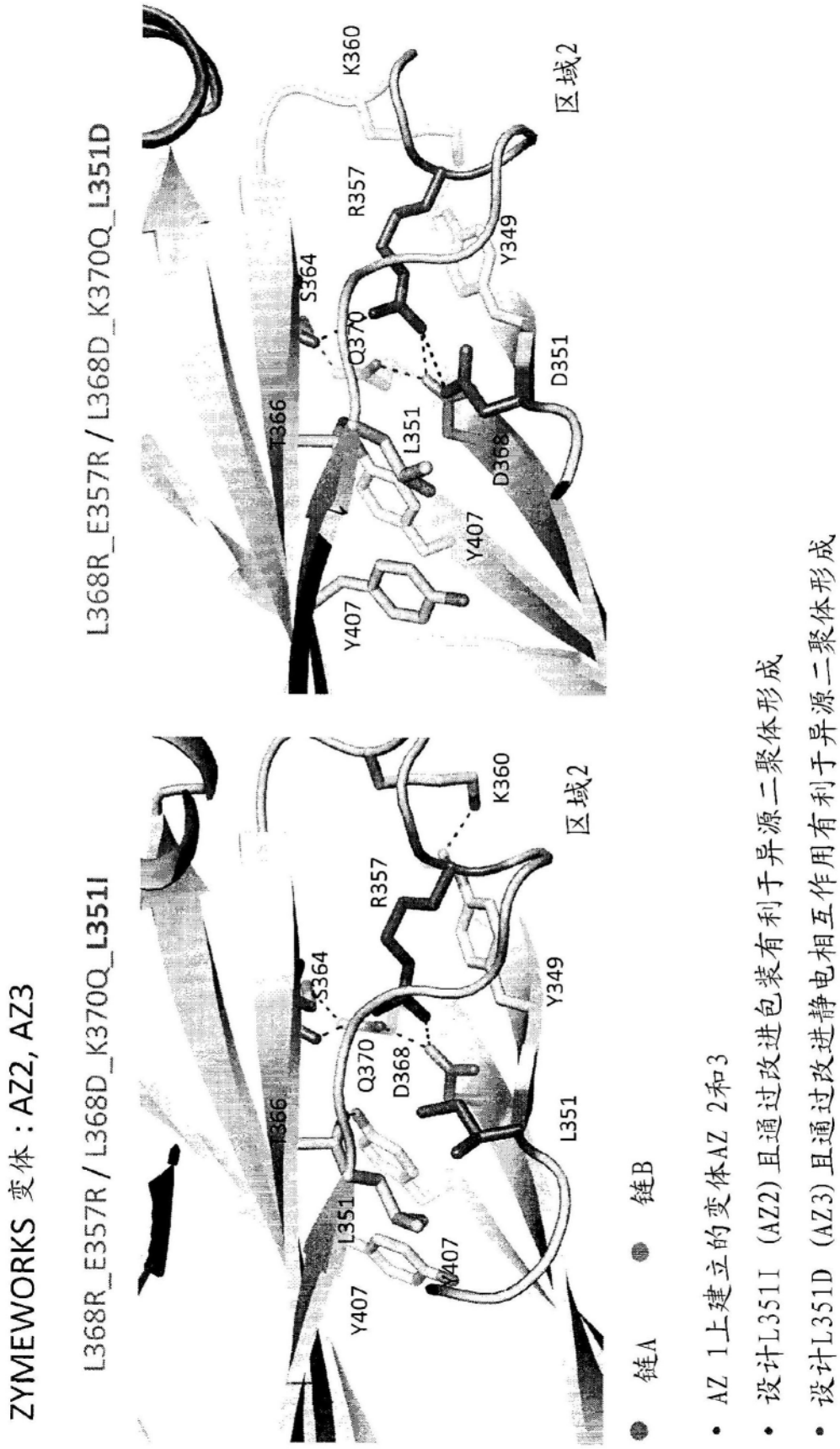

ZYMEWORKS 变体：AZ2, AZ3
L368R_E357R / L368D_K370Q_L351I
L368R_E357R / L368D_K370Q_L351D
L366
S364
Q370
D368
R357
K360
Y349
L351
Y407
区域2
D351
链A
链B
• AZ 1上建立的变体AZ 2和3
• 设计L351I (AZ2)且通过改进包装有利于异源二聚体形成
• 设计L351D (AZ3)且通过改进静电相互作用有利于异源二聚体形成

图7

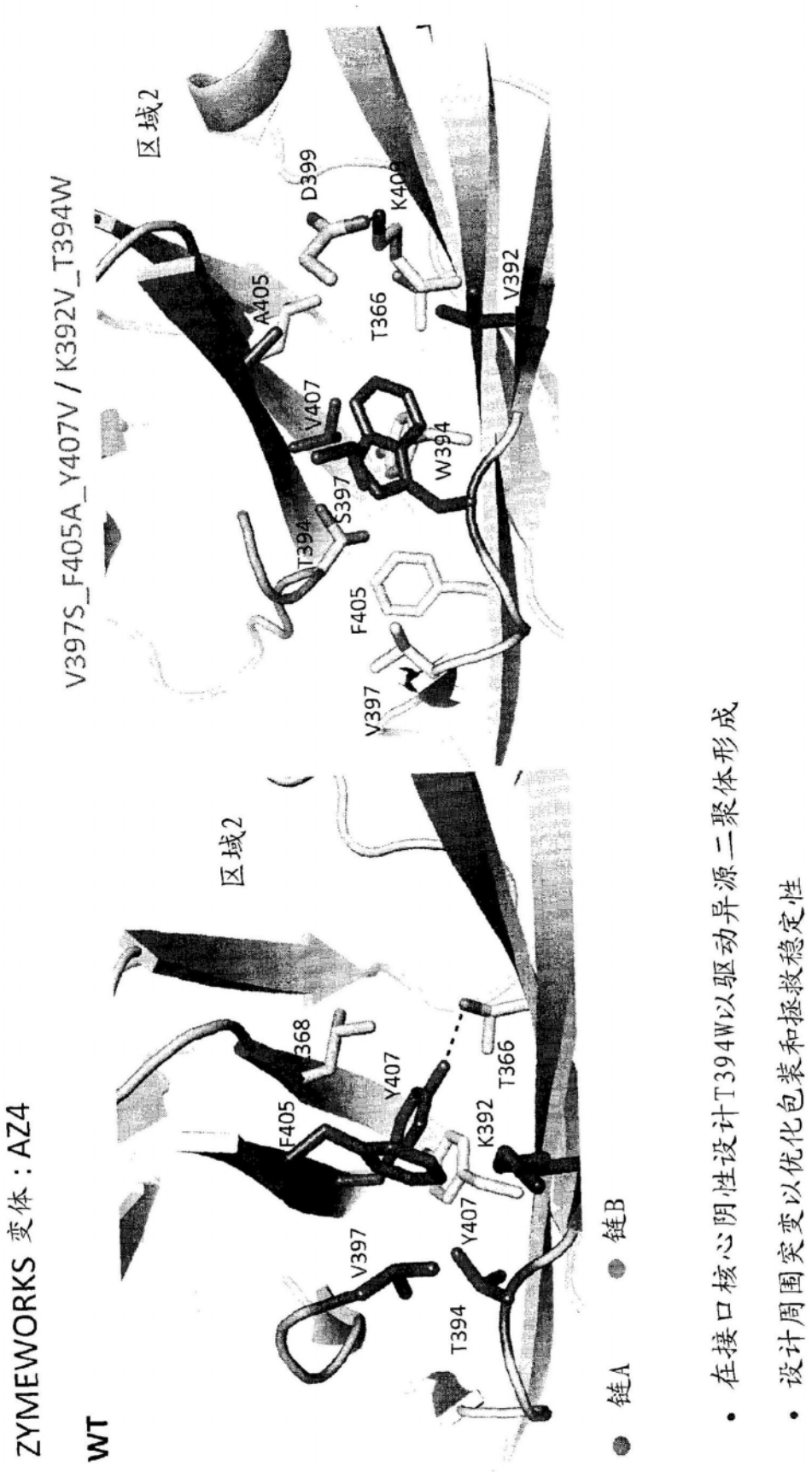
ZYMEWORKS 变体：AZ1, AZ2, AZ3

		碰撞评分 (kcal/mol) - wt +	Δ接口面积 (A²) - wt +	Δ包装 (sd) - wt +	Δ静电 (kcal/mol) - wt +	亲和力评分 - wt +
单源二聚体	对照1	-26.2	-46.0	-0.4	12.3	2.1
	AZ1	-14.6	9.9	0.1	-12.3	-0.4
	AZ2	-3.1	0.7	0.0	-17.2	-0.4
	AZ3	-12.1	-16.1	0.1	-6.4	-0.4
同源二聚体	对照（链A）	-33.6	9.3	-0.5	94.4	N/A
	对照（链B）	-11.5	-77.9	-0.1	69.5	N/A
	AZ1（链 A）	-36.6	23.1	-0.2	87.3	N/A
	AZ1（链 B）	-21.3	-50.8	-0.1	30.8	N/A
	AZ2（链 B）	76.4	-123.5	-0.3	52.2	N/A
	AZ3（链 B）	-16.8	-80.2	-0.4	60.6	N/A

黑色 有利的

不利的

图8



• 在接口核心阴性设计T394W以驱动异源二聚体形成

• 设计周围突变以优化包装和拯救稳定性

图9

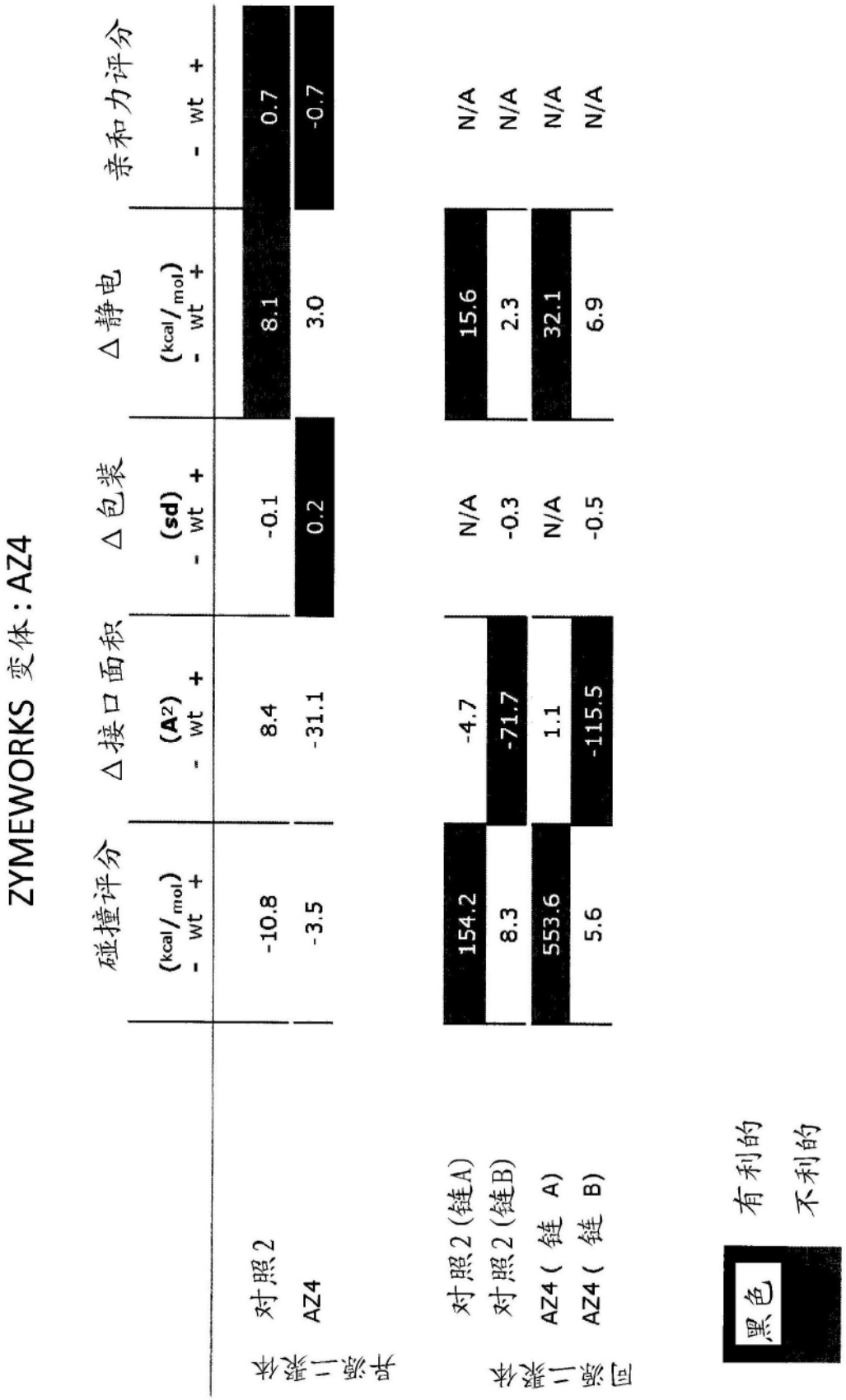
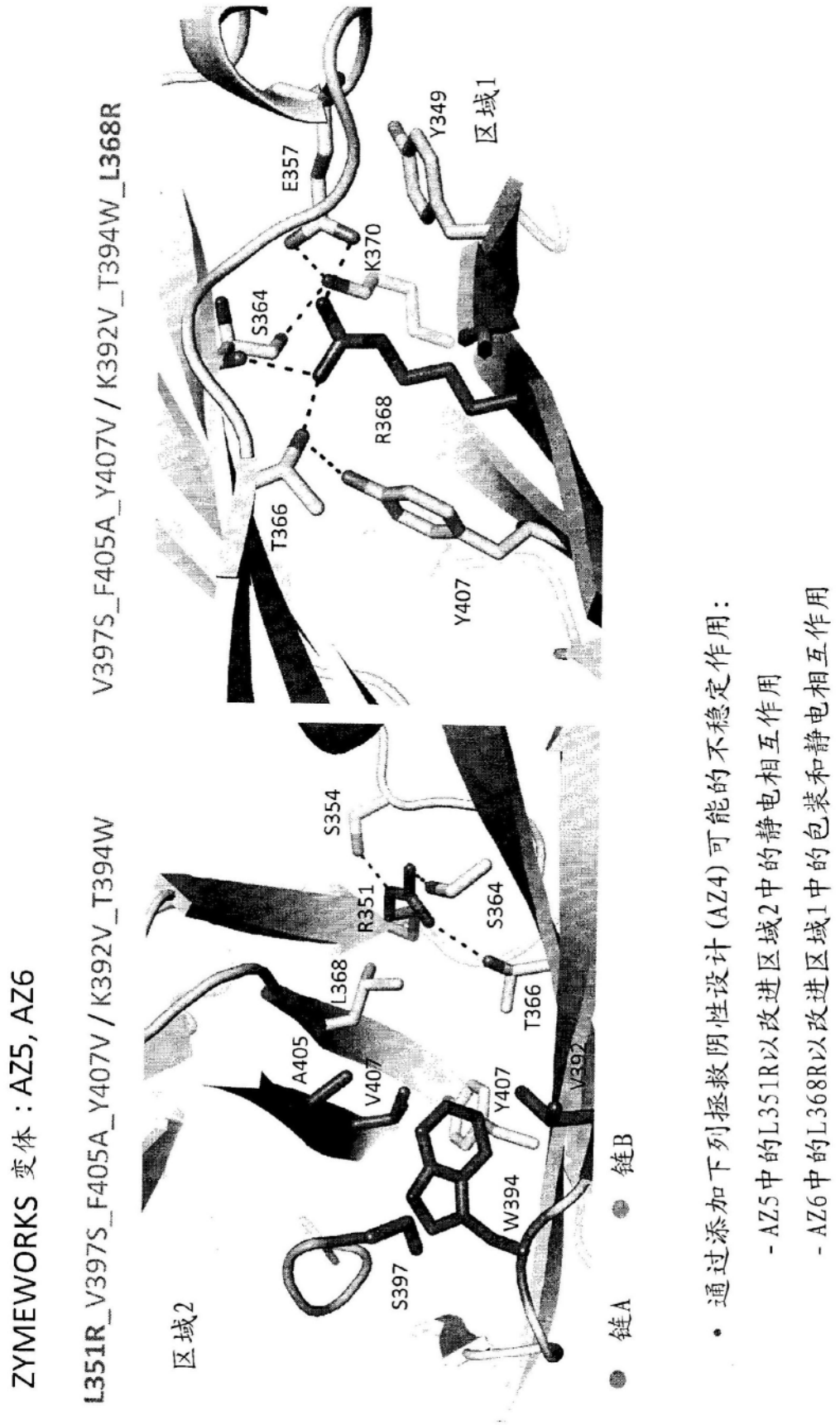

ZYMEWORKS 变体：AZ4
碰撞评分
(kcal/mol)
- wt +
Δ接口面积
(A²)
- wt +
Δ包装
(sd)
- wt +
Δ静电
(kcal/mol)
- wt +
亲和力评分
- wt +
纯源二聚体
对照2
-10.8
8.4
-0.1
8.1
0.7
AZ4
-3.5
-31.1
0.2
3.0
-0.7
异源二聚体
对照2(链A)
154.2
-4.7
N/A
15.6
N/A
对照2(链B)
8.3
-71.7
-0.3
2.3
N/A
AZ4(链 A)
553.6
1.1
N/A
32.1
N/A
AZ4(链 B)
5.6
-115.5
-0.5
6.9
N/A
黑色
有利的
不利的

图10



• 通过添加下列拯救阴性设计(AZ4)可能的不稳定作用：

- AZ5中的L351R以改进区域2中的静电相互作用
- AZ6中的L368R以改进区域1中的包装和静电相互作用

图11

ZYMEWORKS 变体：AZ4, AZ5, AZ6

		碰撞评分 (kcal/mol) - wt +	Δ接口面积 (A²) - wt +	Δ包装 (sd) - wt +	Δ静电 (kcal/mol) - wt +	亲和力评分 - wt +
单一链体	对照2	-10.8	8.4	-0.1	8.1	0.7
	AZ4	-3.5	-31.1	0.2	3.0	-0.7
	AZ5	-5.1	-25.1	0.2	-5.5	-0.8
	AZ6	-13.8	-32.5	0.0	-11.7	-0.3
双一链体	对照2 (链A)	154.2	-4.7	N/A	15.6	N/A
	对照2 (链B)	8.3	-71.7	-0.3	2.3	N/A
	AZ4 (链 A)	553.6	1.1	N/A	32.1	N/A
	AZ4 (链 B)	5.6	-115.5	-0.5	6.9	N/A
	AZ5 (链 A)	274.9	-44.3	N/A	35.5	N/A
	AZ6 (链 B)	25.2	-100.9	-0.3	-16.1	N/A

黑色 有利的
不利的

图12

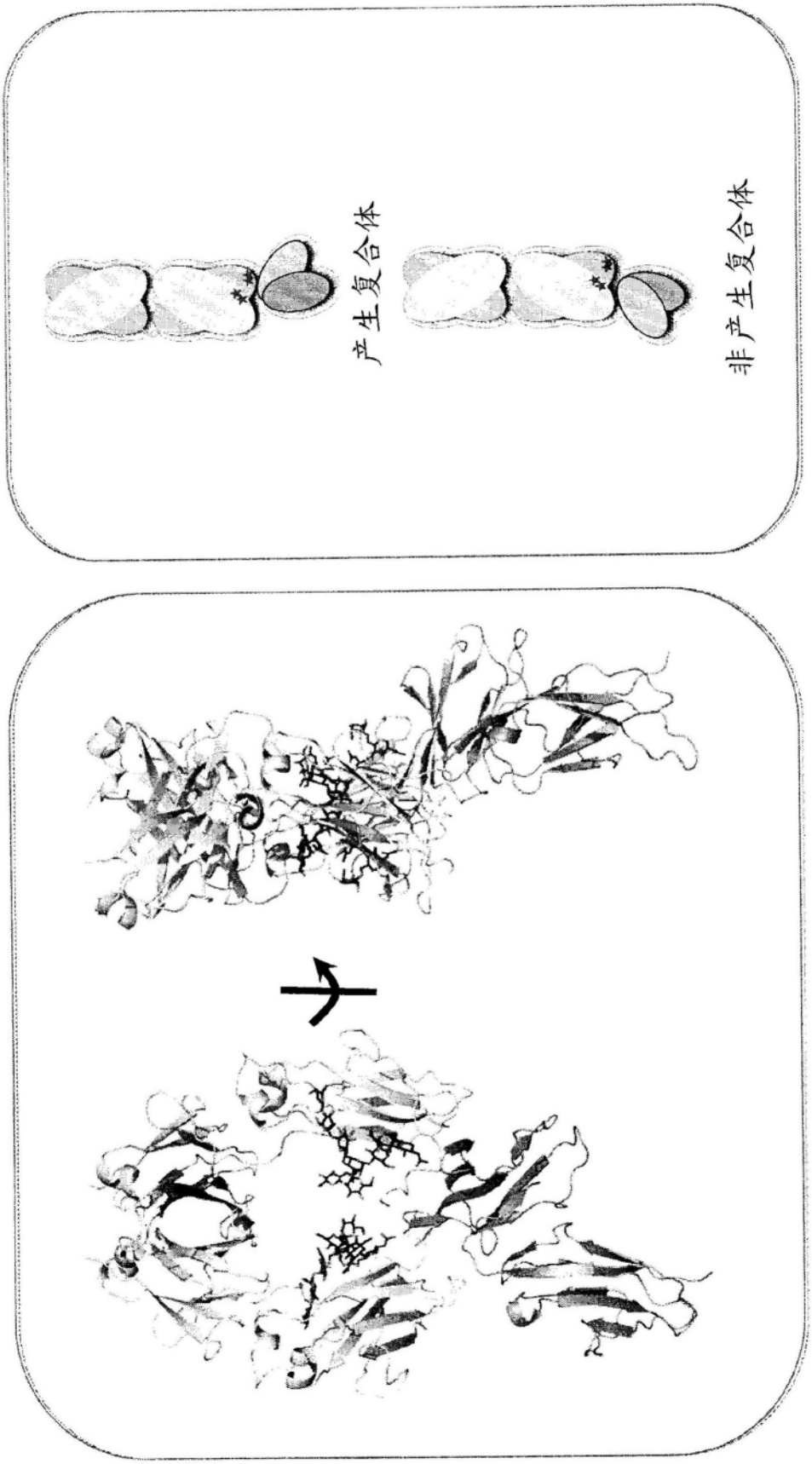


图13

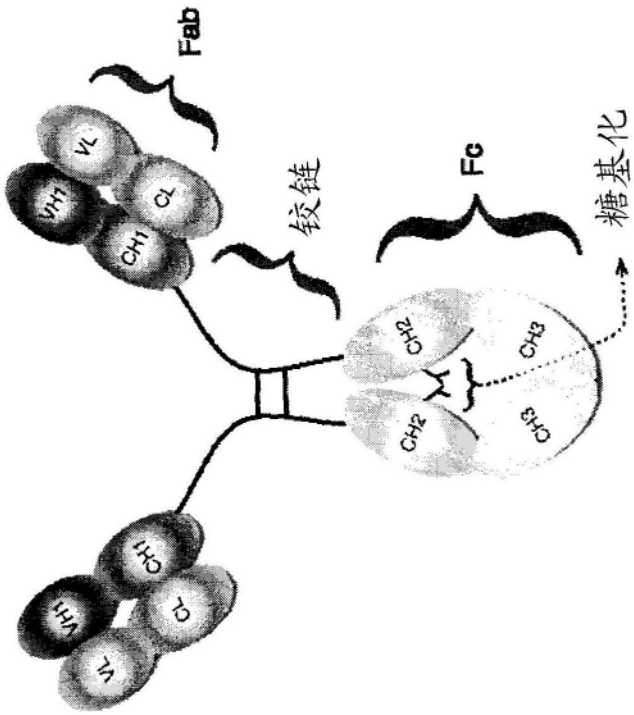


图14

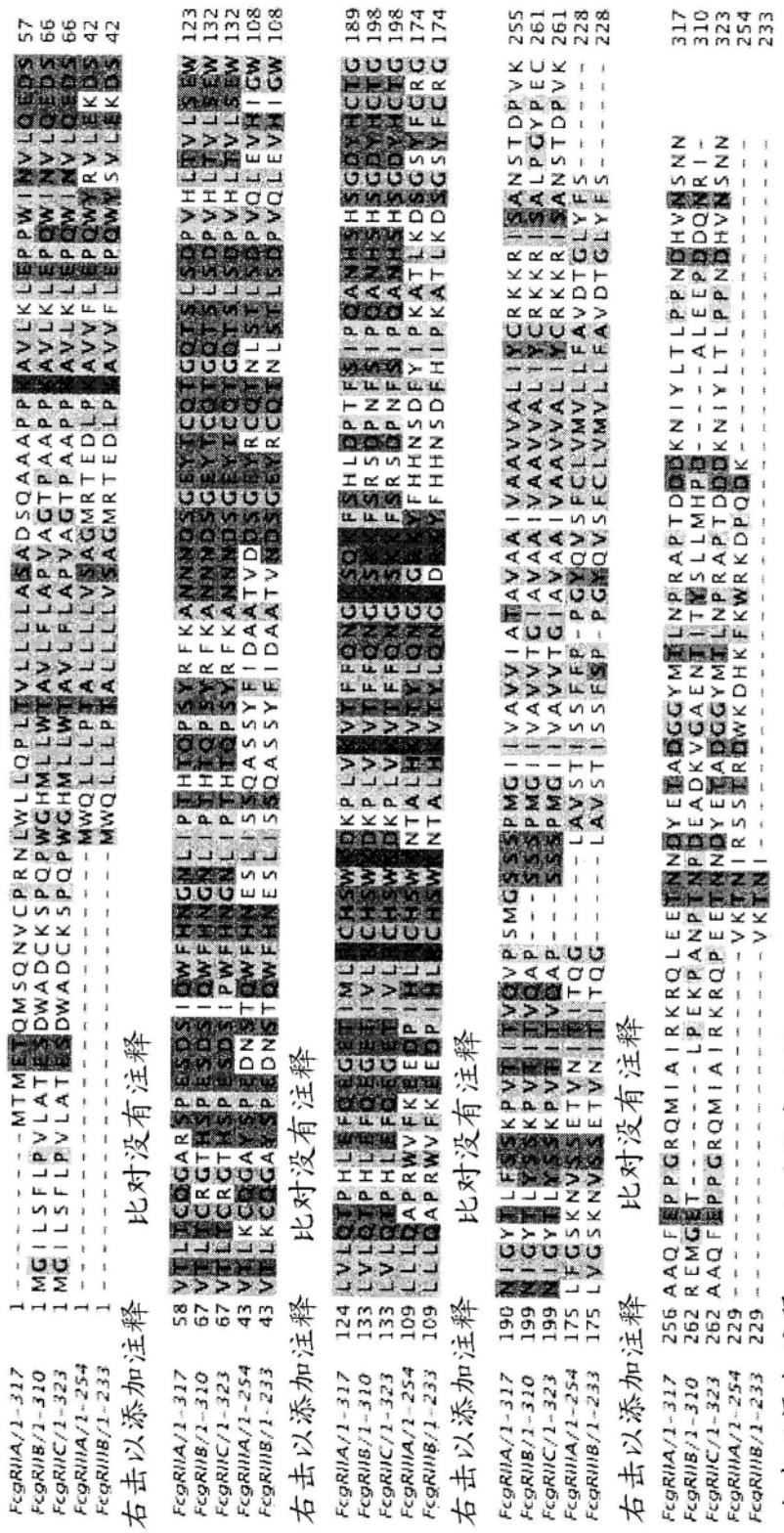

FcgRIIA/1-317
FcgRIIB/1-310
FcgRIIC/1-323
FcgRIIIA/1-254
FcgRIIIB/1-233
右击以添加注释
比对没有注释

图15

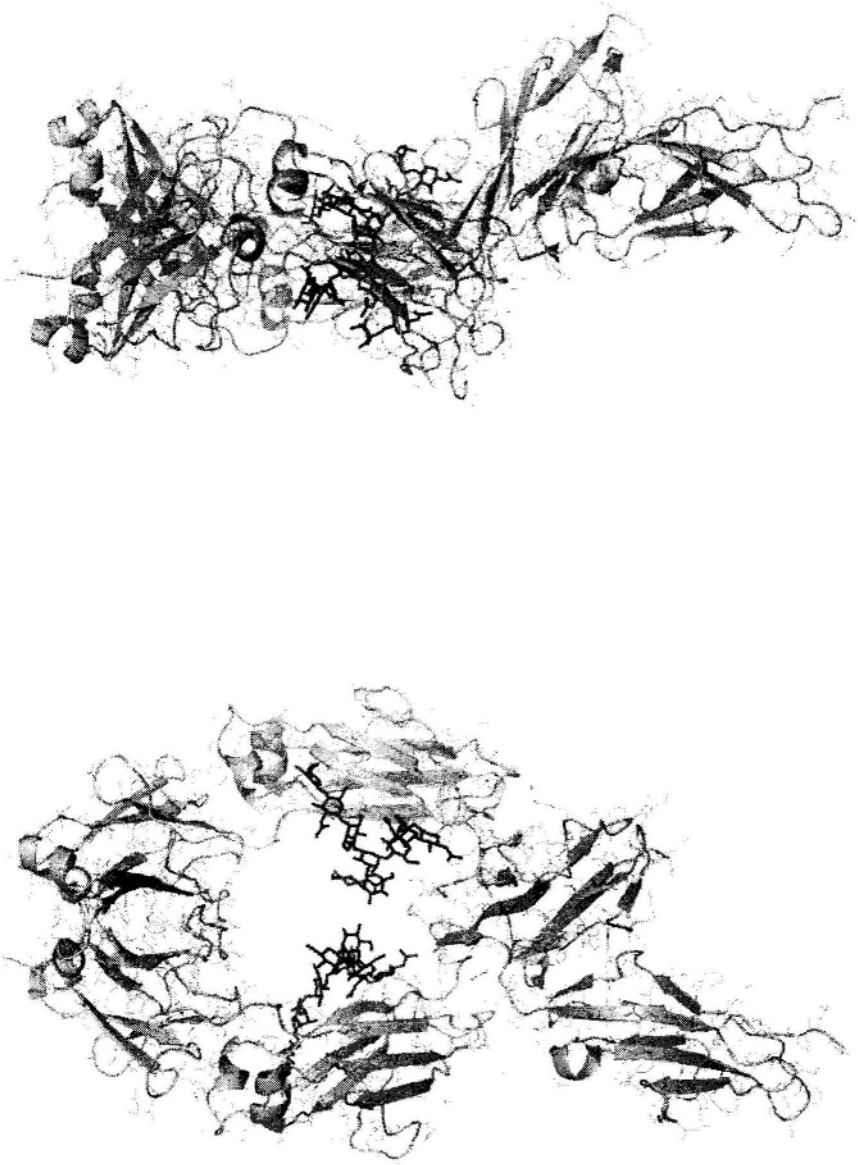


图16

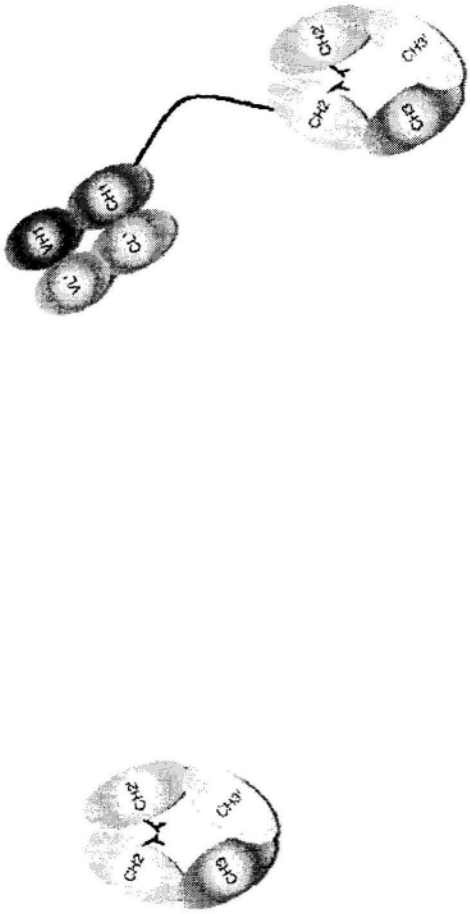
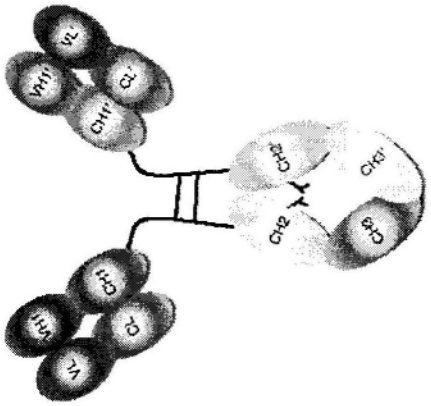


图17


VL
VH
CH1
CL
VH'
VL'
CH1'
CL'
CH2
CH2'
CH3
CH3'

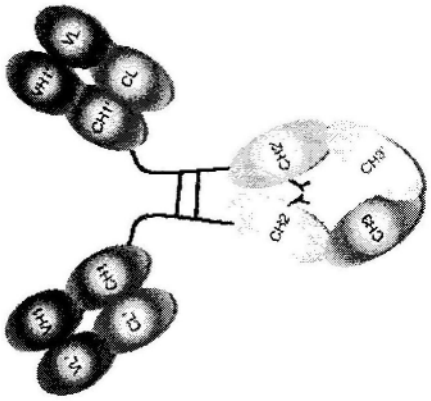
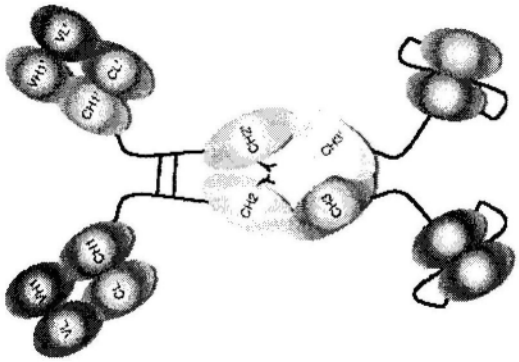

VL
VH
CH1
CL
VH'
VL'
CH1'
CL'
CH2
CH2'
CH3
CH3'

图18


VL
VH1
CL
CH1
CH2
CH2'
CH3
CH3'
CH1
VH1
VL

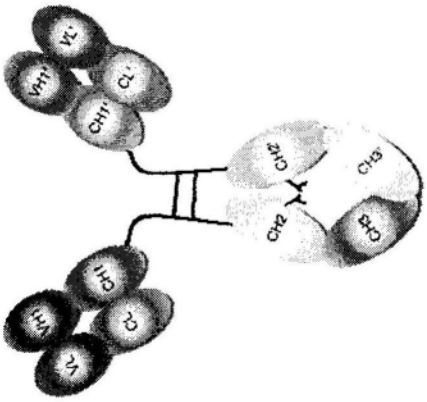

VL
VH1
CL
CH1
CH2
CH2'
CH3
CH3'
CH1
VH1
VL

图19

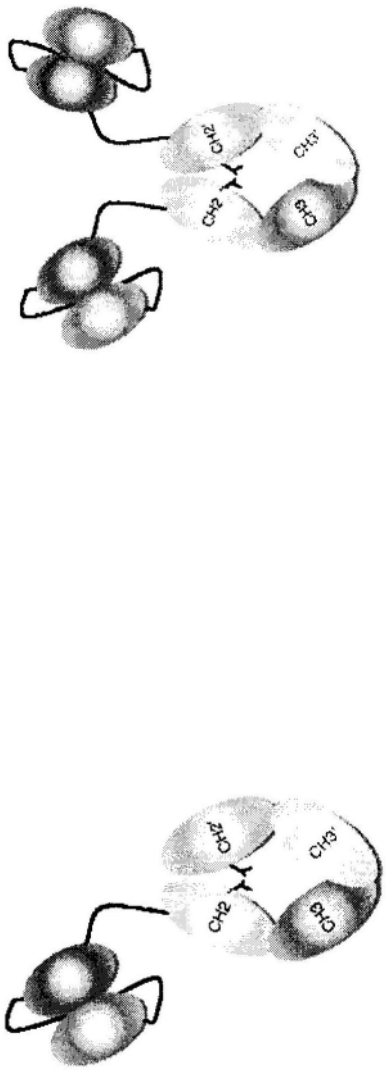
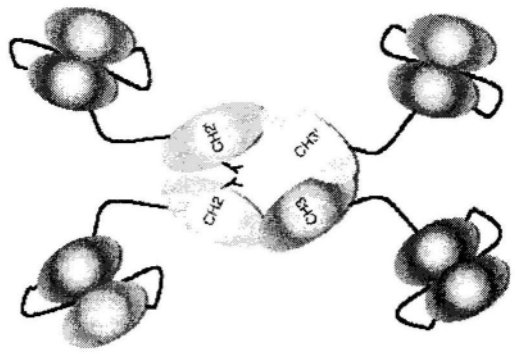


图20



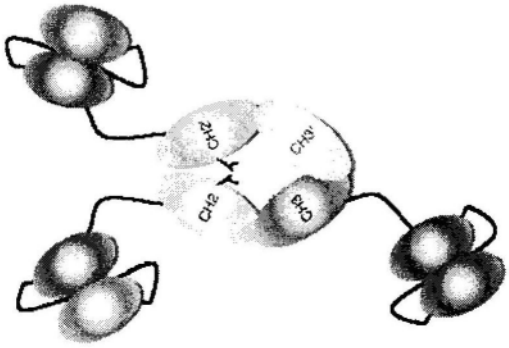


图21

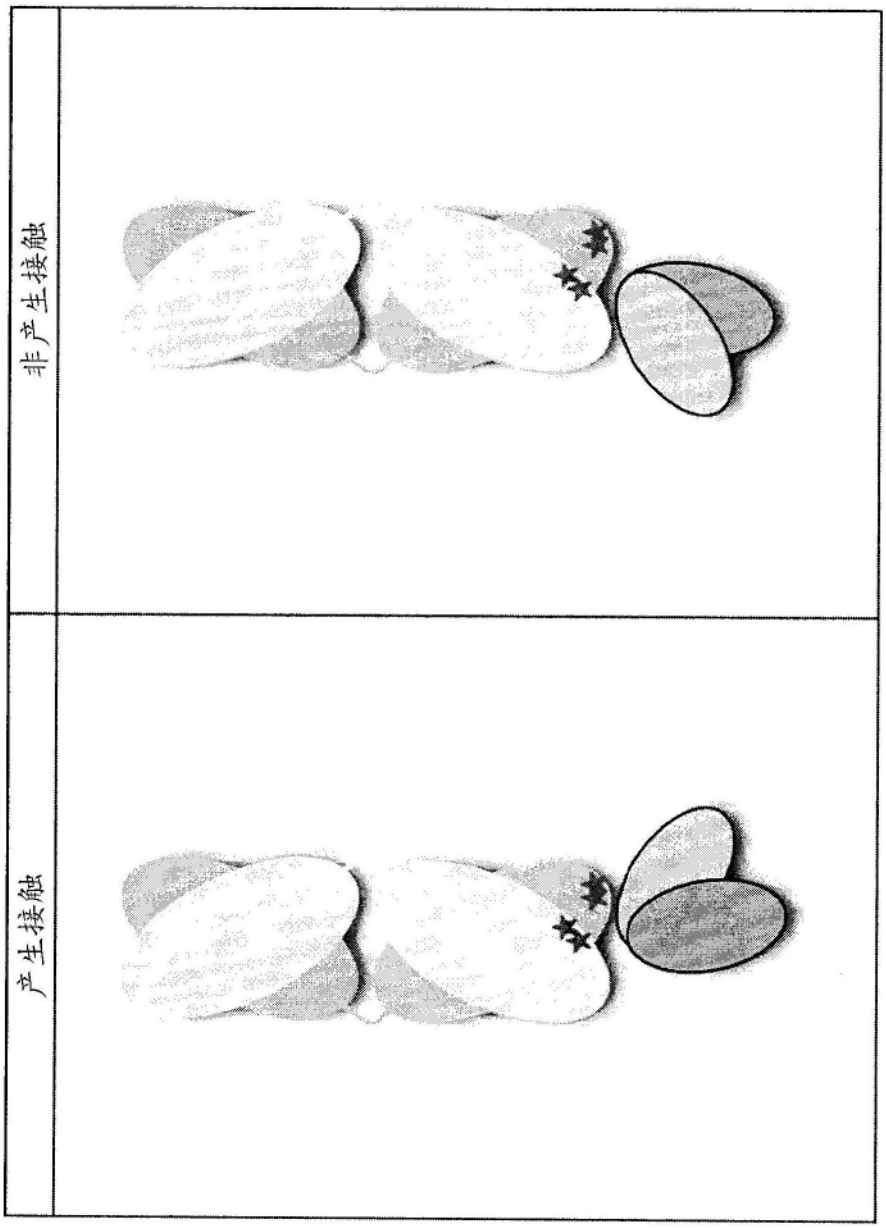
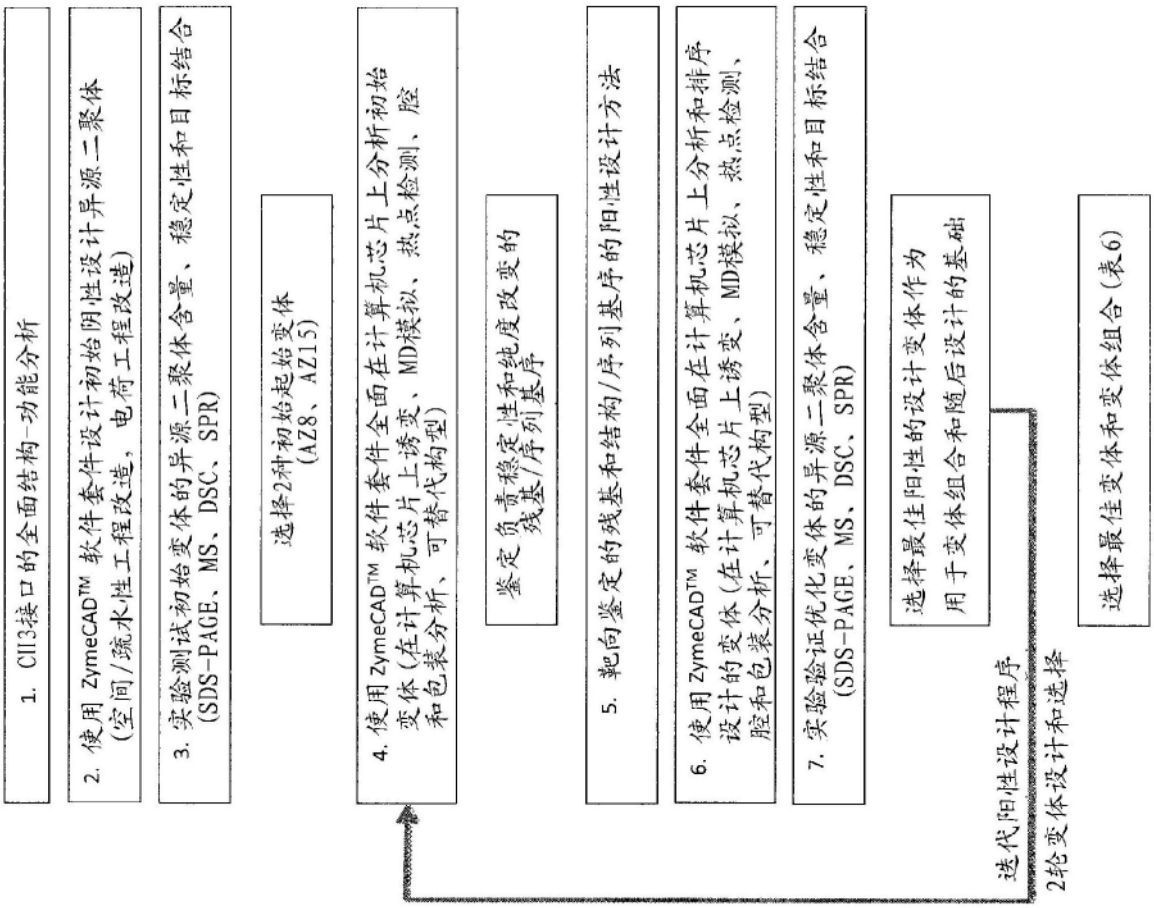


图22

亲本野生型重链IgG1序列

GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图23



异源二聚体Fc设计的迭代策略

图24

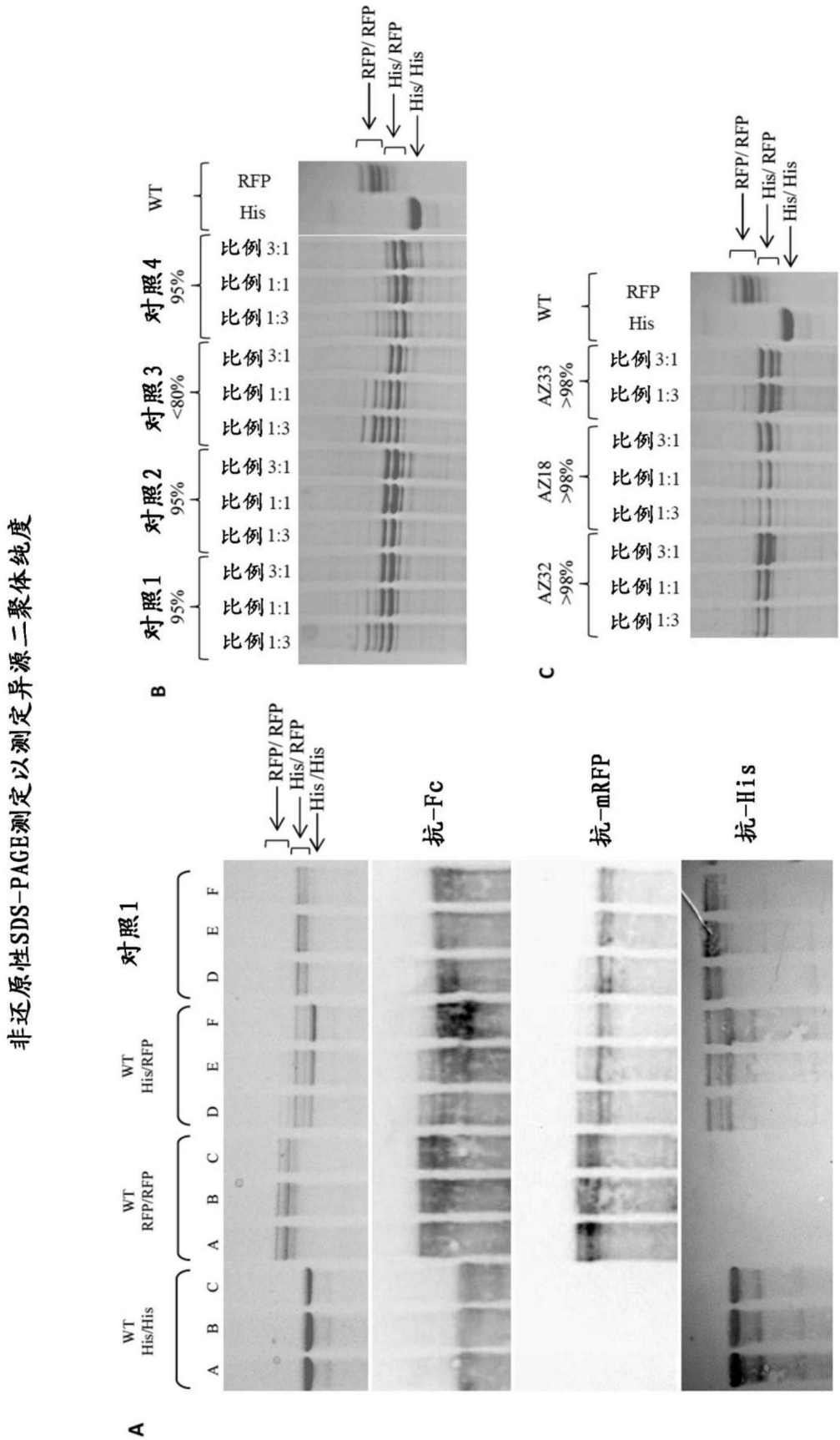

非还原性SDS-PAGE测定以测定异源二聚体纯度
A
WT His/His
WT RFP/RFP
WT His/RFP
对照1
A B C A B C D E F D E F
RFP/ RFP
His/ RFP
His /His
抗-Fc
抗-mRFP
抗-His
B
对照1 95%
对照2 95%
对照3 <80%
对照4 95%
WT
RFP
His
比例 3:1
比例 1:1
比例 1:3
RFP/ RFP
His/ RFP
His/ His
C
AZ32 >98%
AZ18 >98%
AZ33 >98%
WT
RFP
His
比例 3:1
比例 1:1
比例 1:3
RFP/ RFP
His/ RFP
His/ His

图25

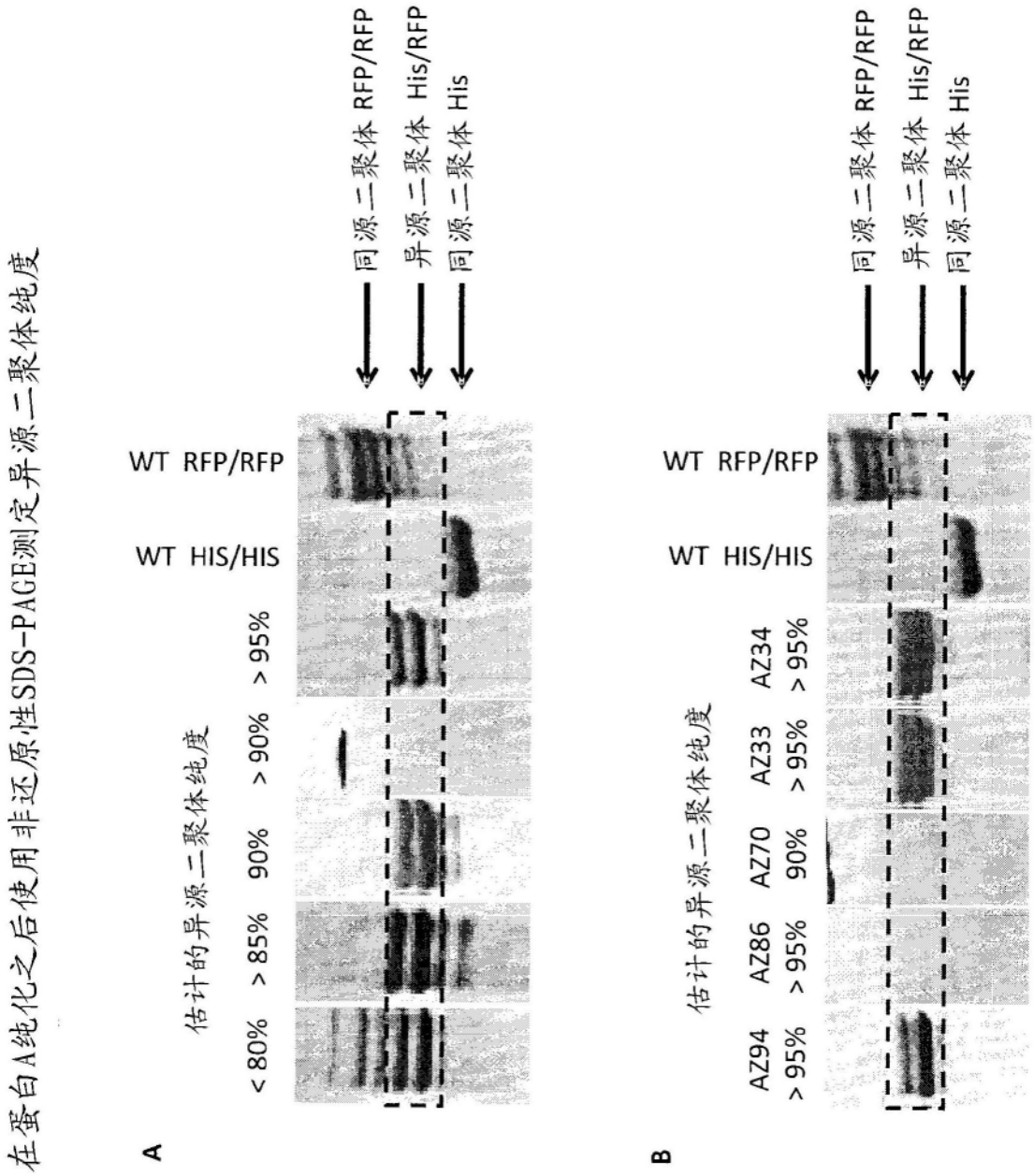

在蛋白A纯化之后使用非还原性SDS-PAGE测定异源二聚体纯度
A
WT RFP/RFP
WT HIS/HIS
估计的异源二聚体纯度
< 80%
> 85%
90%
> 90%
> 95%
同源二聚体 RFP/RFP
异源二聚体 His/RFP
同源二聚体 His
B
WT RFP/RFP
WT HIS/HIS
估计的异源二聚体纯度
AZ94
AZ86
AZ70
AZ33
AZ34
> 95%
> 95%
90%
> 95%
> 95%
同源二聚体 RFP/RFP
异源二聚体 His/RFP
同源二聚体 His

图26

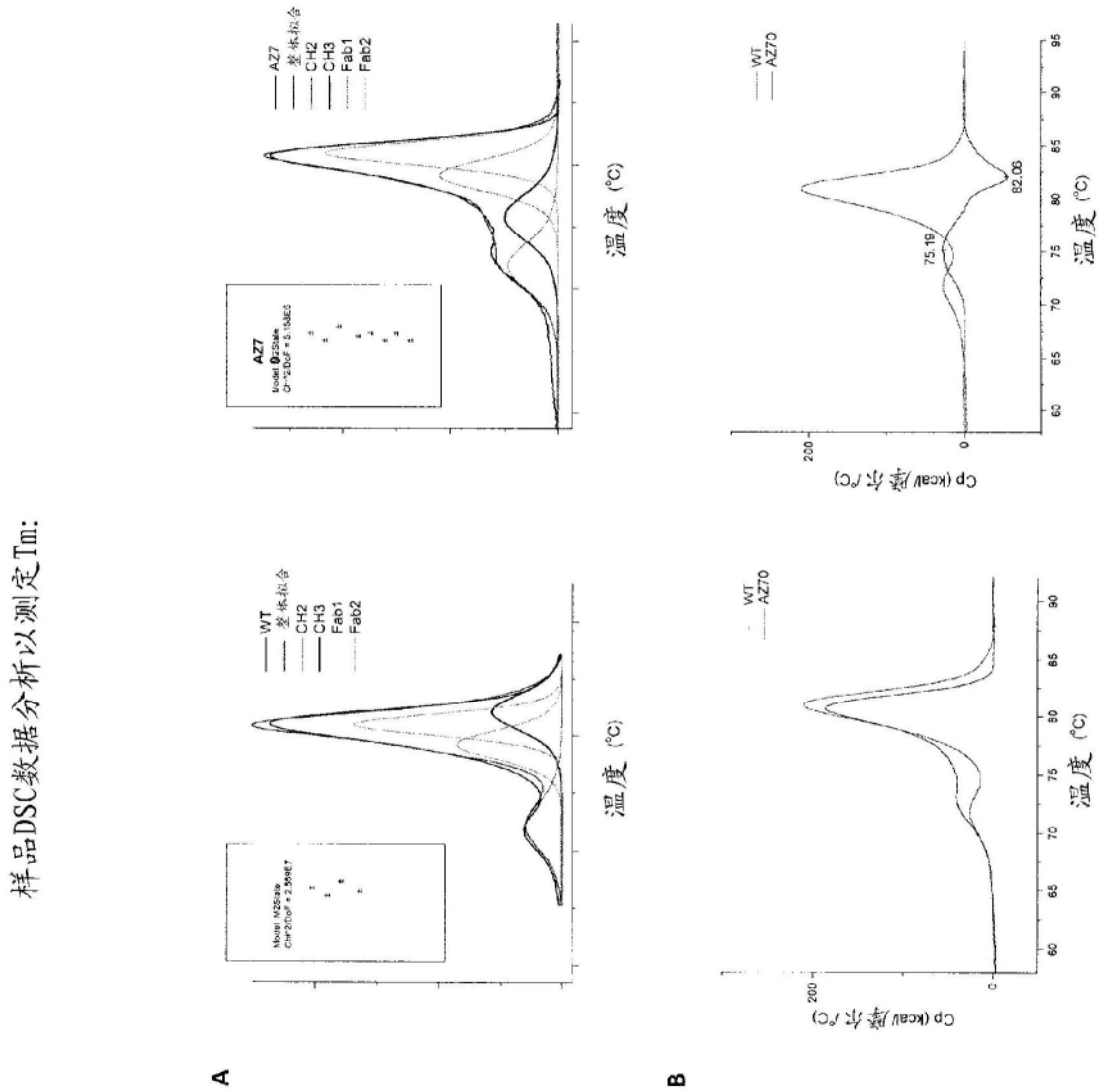

样品DSC数据分析以测定Tm:
A
B
WT
整体拟合
CH2
CH3
Fab1
Fab2
AZ7
AZ70
温度 (°C)
Cp (kcal/摩尔/°C)
75.19
82.06

图27

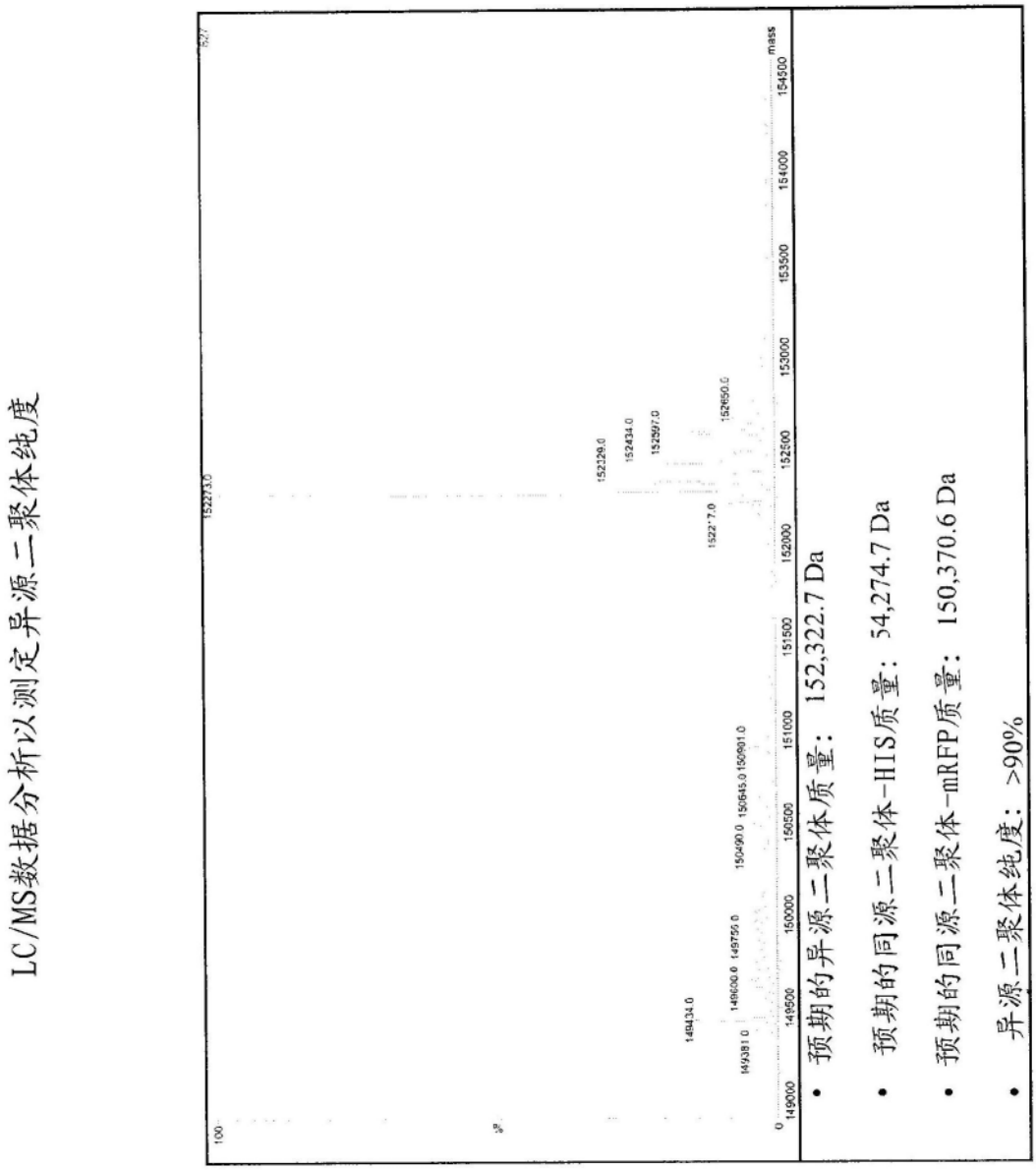

LC/MS数据分析以测定异源二聚体纯度
100
%
0
152273.0
152229.0
152434.0
152597.0
152650.0
152277.0
149434.0
149381.0
149600.0
149755.0
150490.0
150645.0
150901.0
149000
149500
150000
150500
151000
151500
152000
152500
153000
153500
154000
154500
mass
• 预期的异源二聚体质量：152,322.7 Da
• 预期的同源二聚体-HIS质量：54,274.7 Da
• 预期的同源二聚体-mRFP质量：150,370.6 Da
• 异源二聚体纯度：>90%

图28

在计算机芯片上分析初始阴性设计变体和独立阳性设计优化：支架1 - 疏水核心

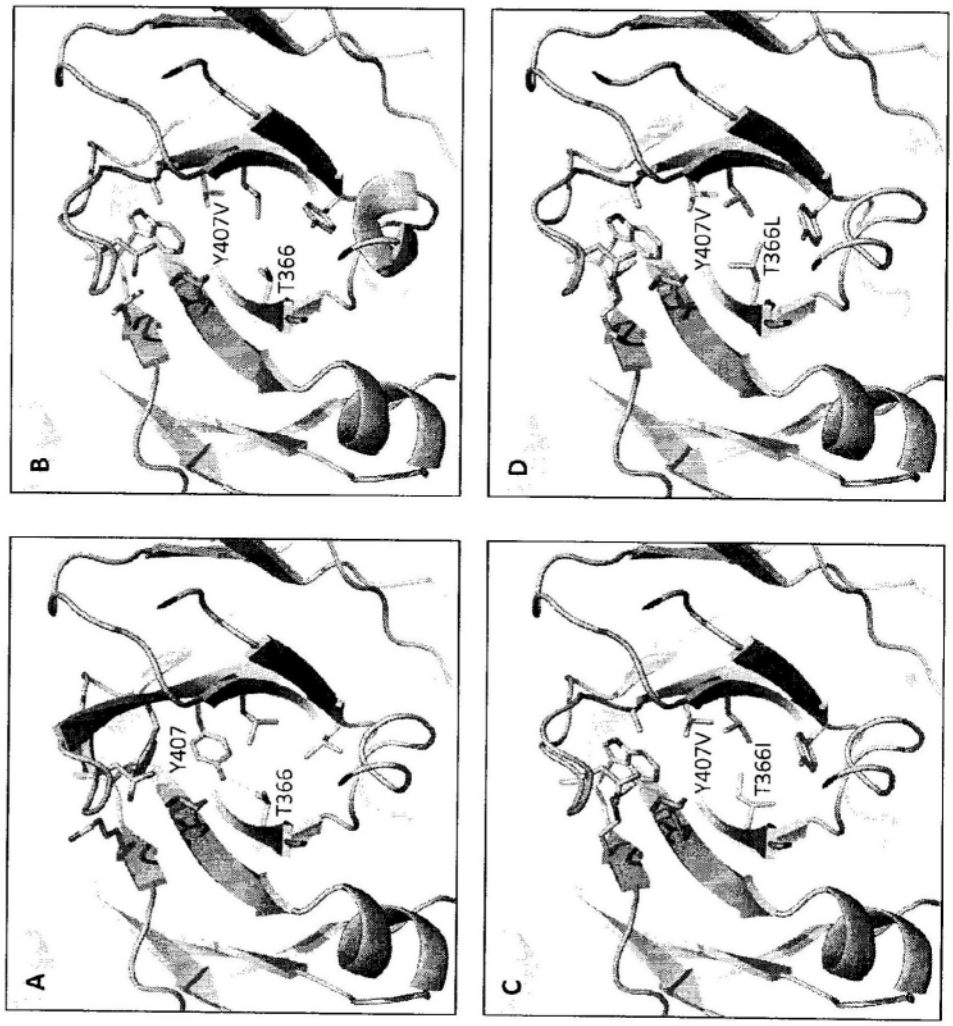


图29

在计算机芯片上分析初始阴性设计变体和独立阳性设计优化：支架1 - 稳定399-400环构型

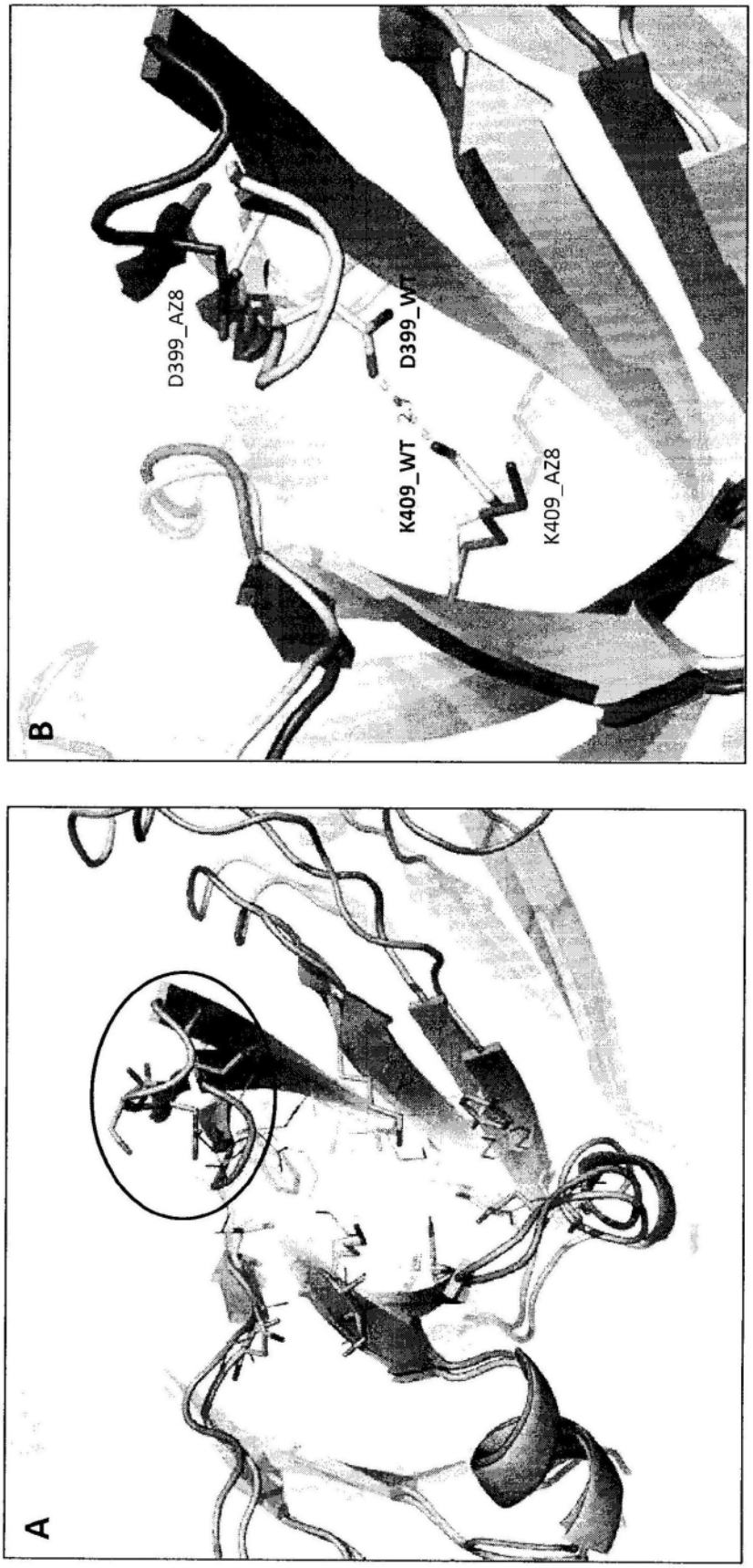


图30

在计算机芯片上分析初始阴性设计变体和独立阳性设计优化：支架1 - 稳定399-400环构型

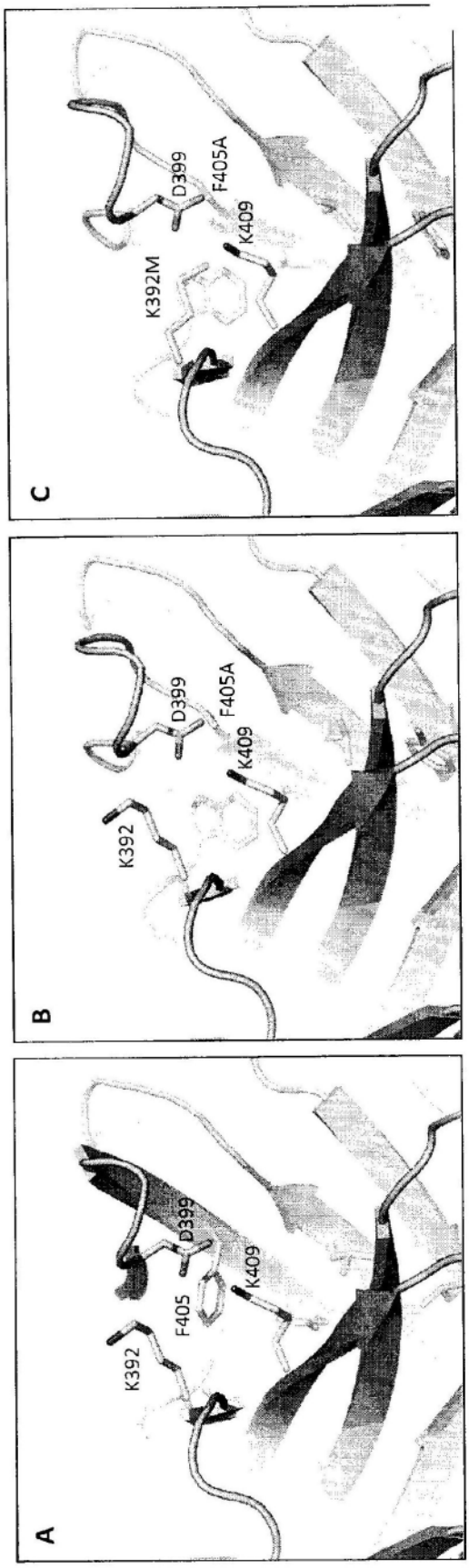


图31

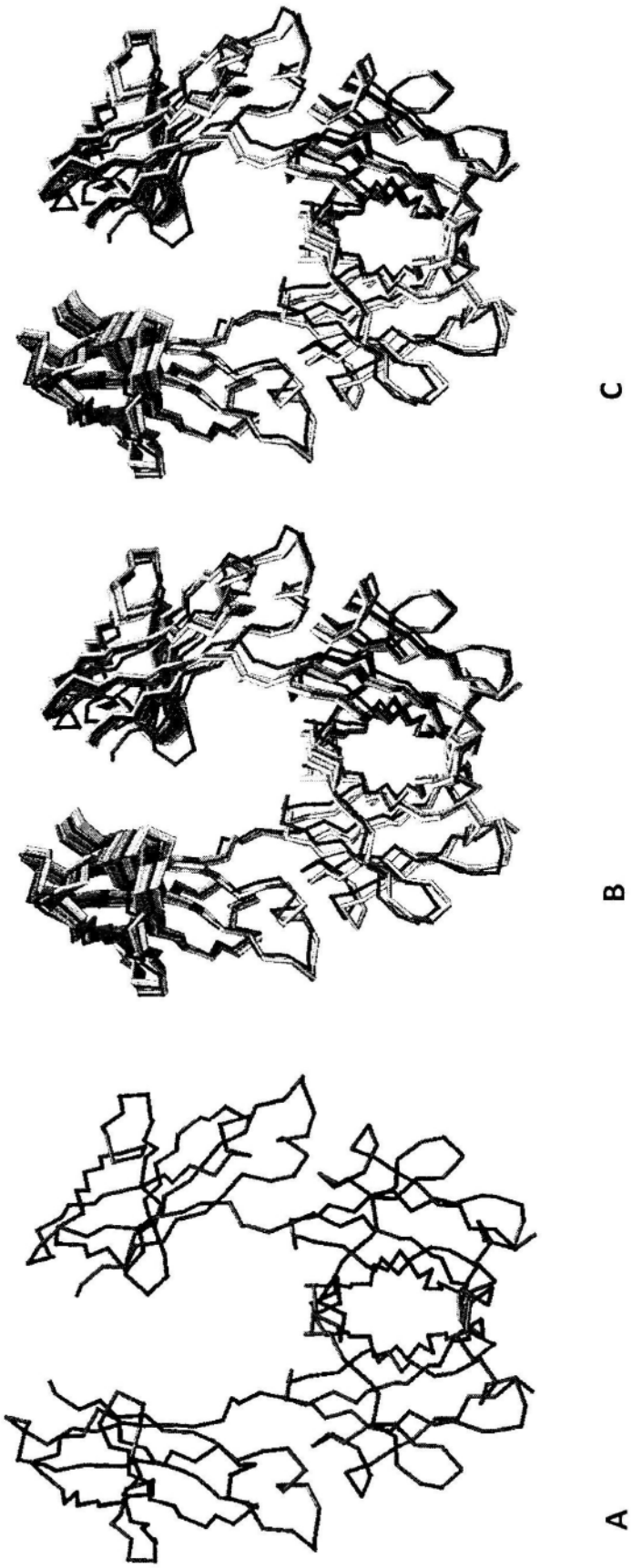


图32

在计算机芯片上分析初始阴性设计变体和独立阳性设计优化：支架2 - 疏水性包装

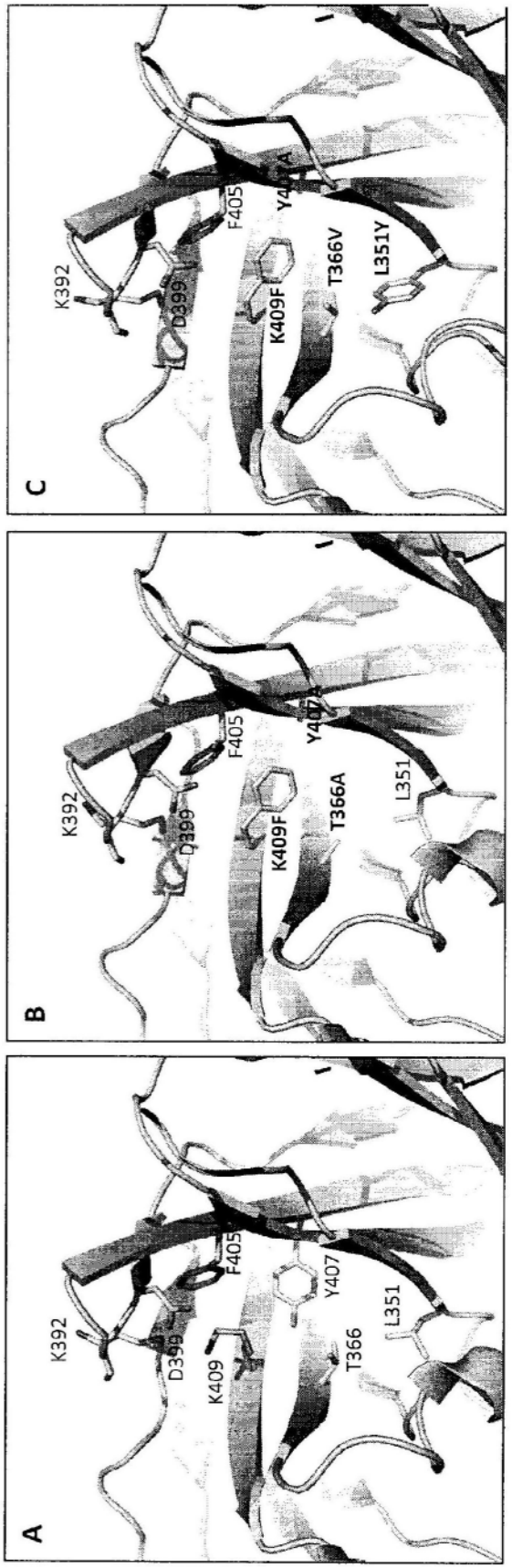


图33

在计算机芯片上分析初始阴性设计变体和独立阳性设计优化：支架2 - 稳定399-400环构型

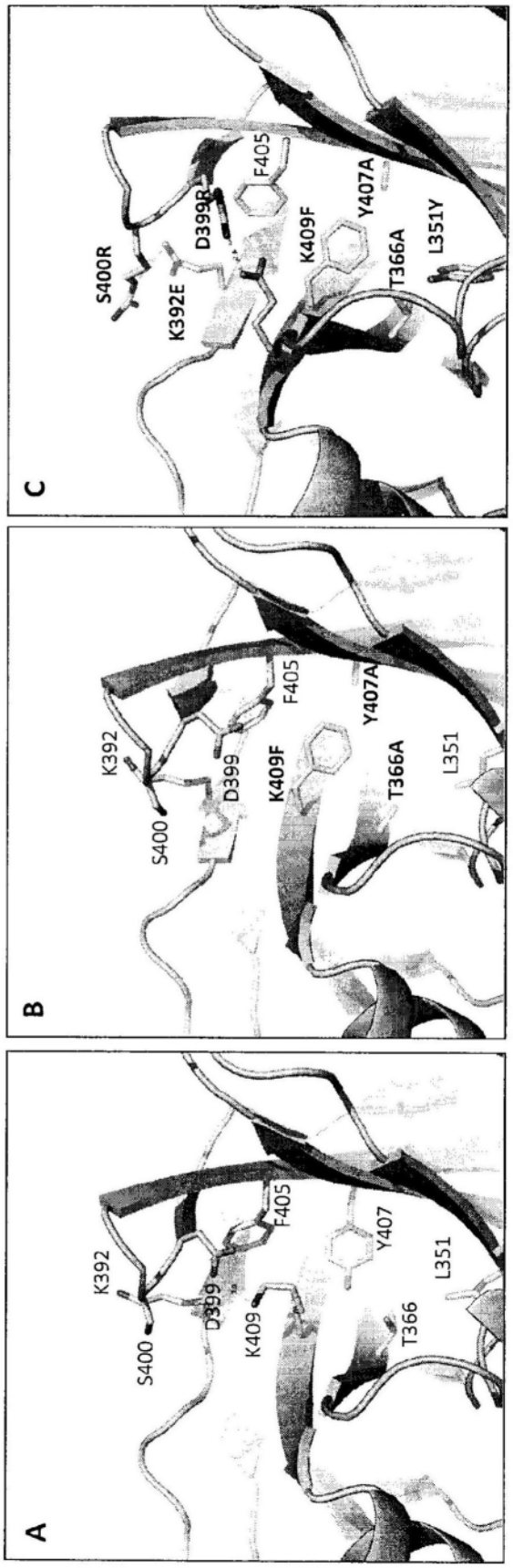


图34

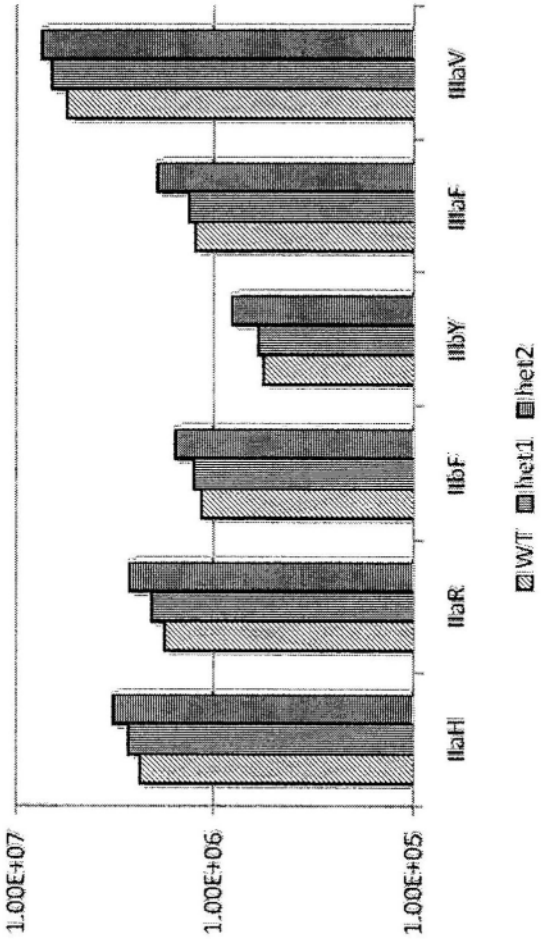

1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
IIaH
IIaR
IIbF
IIbY
IIaF
IIaV
WT
het1
het2

图35

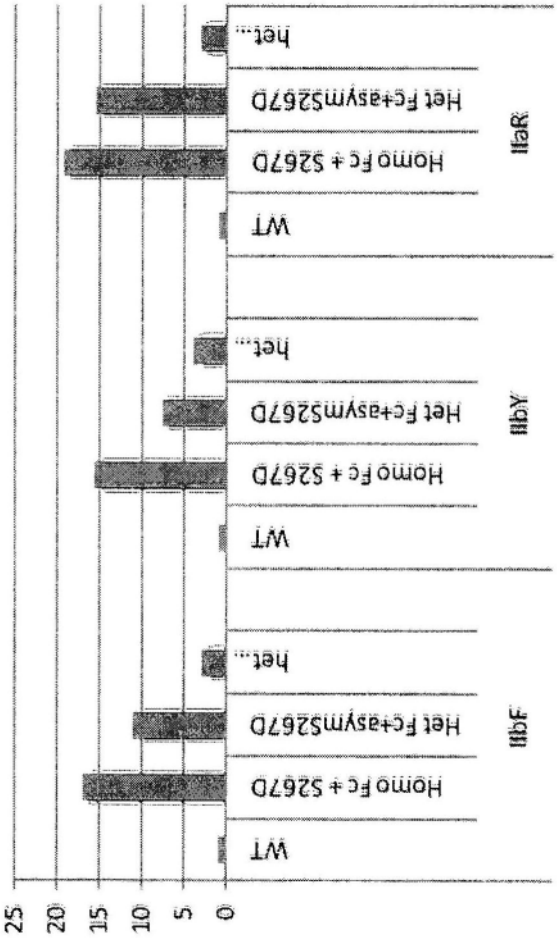

25
20
15
10
5
0
WT
Homo Fc + S267D
Het Fc+asymS267D
Het...
WT
Homo Fc + S267D
Het Fc+asymS267D
Het...
WT
Homo Fc + S267D
Het Fc+asymS267D
Het...
IIbF
IIbY
IIaR

图36A

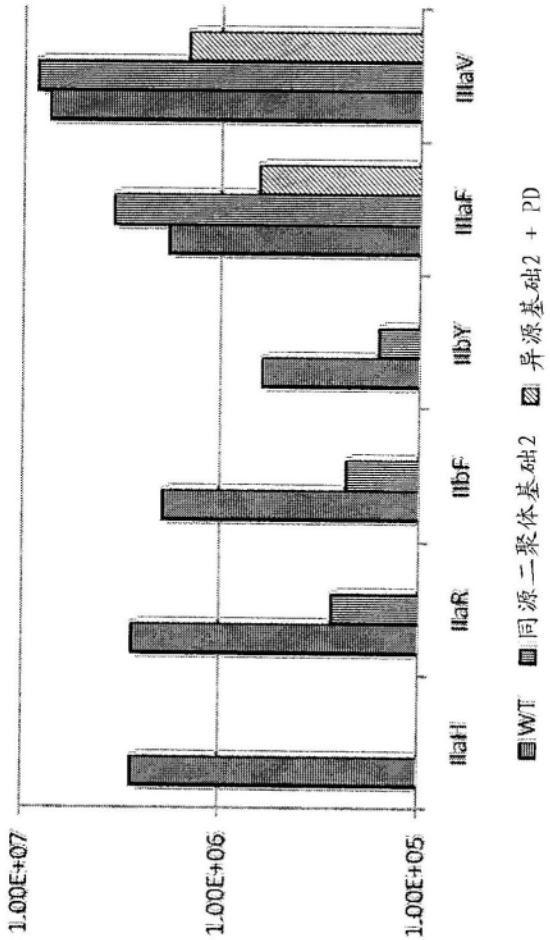

1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
IIaH
IIaR
IIbF
IIbY
IIaF
IIaV
WT
同源二聚体基础2
异源基础2 + PD

图36B

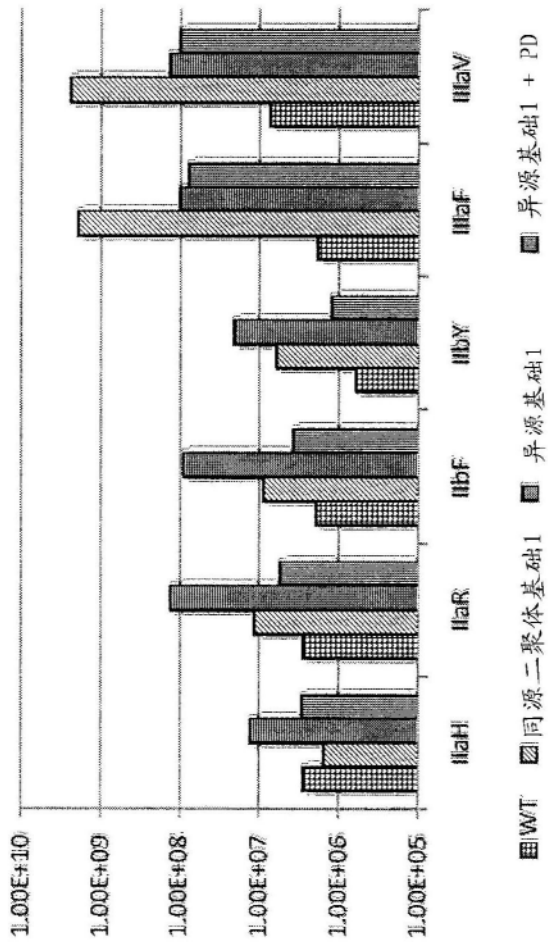

1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
IIaH
IIaR
IIbF
IIbY
IIaF
IIaV
W/T
同源二聚体基础1
异源基础1
异源基础1 + PD

图36C

表 6

变体	Fc突变链A	Fc突变链B
AZ133	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ134	Q347R_T350V_L351Y_F405A_Y407V	T350V_K360E_T366L_K392M_T394W_T411R
AZ135	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ136	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ137	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ138	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ139	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ140	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ141	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ142	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ143	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ144	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ145	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ146	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ147	L351L_F405T_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ148	L351L_F405T_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ149	L351L_F405T_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ150	L351L_F405T_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ151	L351L_F405T_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ152	L351L_F405T_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ153	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ154	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ155	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ156	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ157	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ158	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ159	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ160	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ161	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ162	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ163	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ164	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ165	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ166	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ167	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ168	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ169	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ170	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ171	L351Y_F405T_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ172	L351Y_F405T_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ173	L351Y_F405T_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ174	L351Y_F405T_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ175	L351Y_F405T_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ176	L351Y_F405T_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ177	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ178	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ179	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ180	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ181	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ182	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ183	Q347E_L351L_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ184	Q347E_L351L_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ185	Q347E_L351L_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ186	Q347E_L351L_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W

AZ187	Q347E_L351L_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ188	Q347E_L351L_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ189	Q347E_L351L_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ190	Q347E_L351L_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ191	Q347E_L351L_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ192	Q347E_L351L_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ193	Q347E_L351L_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ194	Q347E_L351L_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ195	Q347E_L351L_F405T_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ196	Q347E_L351L_F405T_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ197	Q347E_L351L_F405T_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ198	Q347E_L351L_F405T_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ199	Q347E_L351L_F405T_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ200	Q347E_L351L_F405T_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ201	Q347E_L351L_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ202	Q347E_L351L_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ203	Q347E_L351L_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ204	Q347E_L351L_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ205	Q347E_L351L_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ206	Q347E_L351L_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ207	Q347E_L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ208	Q347E_L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ209	Q347E_L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ210	Q347E_L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ211	Q347E_L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ212	Q347E_L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ213	Q347E_L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ214	Q347E_L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ215	Q347E_L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ216	Q347E_L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ217	Q347E_L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ218	Q347E_L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ219	Q347E_L351Y_F405T_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ220	Q347E_L351Y_F405T_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ221	Q347E_L351Y_F405T_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ222	Q347E_L351Y_F405T_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ223	Q347E_L351Y_F405T_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ224	Q347E_L351Y_F405T_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ225	Q347E_L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W
AZ226	Q347E_L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W
AZ227	Q347E_L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W
AZ228	Q347E_L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W
AZ229	Q347E_L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W
AZ230	Q347E_L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W
AZ231	Q347R_L351L_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ232	Q347R_L351L_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ233	Q347R_L351L_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ234	Q347R_L351L_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ235	Q347R_L351L_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ236	Q347R_L351L_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ237	Q347R_L351L_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ238	Q347R_L351L_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ239	Q347R_L351L_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ240	Q347R_L351L_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ241	Q347R_L351L_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ242	Q347R_L351L_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ243	Q347R_L351L_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ244	Q347R_L351L_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W

AZ245	Q347R_L351L_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ246	Q347R_L351L_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ247	Q347R_L351L_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ248	Q347R_L351L_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ249	Q347R_L351L_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ250	Q347R_L351L_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ251	Q347R_L351L_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ252	Q347R_L351L_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ253	Q347R_L351L_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ254	Q347R_L351L_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ255	Q347R_L351L_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ256	Q347R_L351L_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ257	Q347R_L351L_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ258	Q347R_L351L_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ259	Q347R_L351L_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ260	Q347R_L351L_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ261	Q347R_L351L_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ262	Q347R_L351L_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ263	Q347R_L351L_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ264	Q347R_L351L_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ265	Q347R_L351L_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ266	Q347R_L351L_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ267	Q347R_L351L_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ268	Q347R_L351L_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ269	Q347R_L351L_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ270	Q347R_L351L_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ271	Q347R_L351L_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ272	Q347R_L351L_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ273	Q347R_L351L_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ274	Q347R_L351L_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ275	Q347R_L351L_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ276	Q347R_L351L_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ277	Q347R_L351L_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ278	Q347R_L351L_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ279	Q347R_L351Y_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ280	Q347R_L351Y_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ281	Q347R_L351Y_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ282	Q347R_L351Y_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ283	Q347R_L351Y_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ284	Q347R_L351Y_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ285	Q347R_L351Y_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ286	Q347R_L351Y_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ287	Q347R_L351Y_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ288	Q347R_L351Y_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ289	Q347R_L351Y_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ290	Q347R_L351Y_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ291	Q347R_L351Y_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ292	Q347R_L351Y_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ293	Q347R_L351Y_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ294	Q347R_L351Y_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ295	Q347R_L351Y_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ296	Q347R_L351Y_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ297	Q347R_L351Y_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ298	Q347R_L351Y_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ299	Q347R_L351Y_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ300	Q347R_L351Y_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ301	Q347R_L351Y_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ302	Q347R_L351Y_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W

AZ303	Q347R_L351Y_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ304	Q347R_L351Y_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ305	Q347R_L351Y_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ306	Q347R_L351Y_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ307	Q347R_L351Y_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ308	Q347R_L351Y_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ309	Q347R_L351Y_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ310	Q347R_L351Y_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ311	Q347R_L351Y_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ312	Q347R_L351Y_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ313	Q347R_L351Y_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ314	Q347R_L351Y_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ315	Q347R_L351Y_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ316	Q347R_L351Y_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ317	Q347R_L351Y_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ318	Q347R_L351Y_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ319	Q347R_L351Y_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ320	Q347R_L351Y_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ321	Q347R_L351Y_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ322	Q347R_L351Y_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ323	Q347R_L351Y_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ324	Q347R_L351Y_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ325	Q347R_L351Y_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ326	Q347R_L351Y_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ327	Q347K_L351L_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ328	Q347K_L351L_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ329	Q347K_L351L_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ330	Q347K_L351L_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ331	Q347K_L351L_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ332	Q347K_L351L_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ333	Q347K_L351L_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ334	Q347K_L351L_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ335	Q347K_L351L_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ336	Q347K_L351L_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ337	Q347K_L351L_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ338	Q347K_L351L_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ339	Q347K_L351L_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ340	Q347K_L351L_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ341	Q347K_L351L_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ342	Q347K_L351L_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ343	Q347K_L351L_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ344	Q347K_L351L_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ345	Q347K_L351L_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ346	Q347K_L351L_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ347	Q347K_L351L_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ348	Q347K_L351L_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ349	Q347K_L351L_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ350	Q347K_L351L_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ351	Q347K_L351L_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ352	Q347K_L351L_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ353	Q347K_L351L_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ354	Q347K_L351L_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ355	Q347K_L351L_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ356	Q347K_L351L_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ357	Q347K_L351L_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ358	Q347K_L351L_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ359	Q347K_L351L_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ360	Q347K_L351L_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W

AZ361	Q347K_L351L_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ362	Q347K_L351L_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ363	Q347K_L351L_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ364	Q347K_L351L_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ365	Q347K_L351L_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ366	Q347K_L351L_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ367	Q347K_L351L_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ368	Q347K_L351L_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ369	Q347K_L351L_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ370	Q347K_L351L_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ371	Q347K_L351L_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ372	Q347K_L351L_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ373	Q347K_L351L_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ374	Q347K_L351L_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ375	Q347K_L351Y_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ376	Q347K_L351Y_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ377	Q347K_L351Y_F405A_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ378	Q347K_L351Y_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ379	Q347K_L351Y_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ380	Q347K_L351Y_F405A_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ381	Q347K_L351Y_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ382	Q347K_L351Y_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ383	Q347K_L351Y_F405A_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ384	Q347K_L351Y_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ385	Q347K_L351Y_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ386	Q347K_L351Y_F405A_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ387	Q347K_L351Y_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ388	Q347K_L351Y_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ389	Q347K_L351Y_F405S_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ390	Q347K_L351Y_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ391	Q347K_L351Y_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ392	Q347K_L351Y_F405S_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ393	Q347K_L351Y_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ394	Q347K_L351Y_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ395	Q347K_L351Y_F405S_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ396	Q347K_L351Y_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ397	Q347K_L351Y_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ398	Q347K_L351Y_F405S_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ399	Q347K_L351Y_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ400	Q347K_L351Y_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ401	Q347K_L351Y_F405T_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ402	Q347K_L351Y_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ403	Q347K_L351Y_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ404	Q347K_L351Y_F405T_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ405	Q347K_L351Y_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ406	Q347K_L351Y_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ407	Q347K_L351Y_F405T_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ408	Q347K_L351Y_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ409	Q347K_L351Y_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ410	Q347K_L351Y_F405T_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ411	Q347K_L351Y_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ412	Q347K_L351Y_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392M_T394W
AZ413	Q347K_L351Y_F405V_Y407I	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ414	Q347K_L351Y_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ415	Q347K_L351Y_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ416	Q347K_L351Y_F405V_Y407I	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ417	Q347K_L351Y_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392L_T394W
AZ418	Q347K_L351Y_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392M_T394W

AZ419	Q347K_L351Y_F405V_Y407V	K360D_T366L_K392F_T394W
AZ420	Q347K_L351Y_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392L_T394W
AZ421	Q347K_L351Y_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392M_T394W
AZ422	Q347K_L351Y_F405V_Y407V	K360E_T366L_K392F_T394W
AZ423	L351L_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ424	L351L_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ425	L351L_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ426	L351L_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ427	L351L_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ428	L351L_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ429	L351L_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ430	L351L_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ431	L351L_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ432	L351L_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ433	L351L_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ434	L351L_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ435	L351L_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ436	L351L_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ437	L351L_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ438	L351L_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ439	L351L_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ440	L351L_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ441	L351L_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ442	L351L_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ443	L351L_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ444	L351L_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ445	L351L_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ446	L351L_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ447	L351L_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ448	L351L_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ449	L351L_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ450	L351L_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ451	L351L_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ452	L351L_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ453	L351L_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ454	L351L_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ455	L351L_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ456	L351L_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ457	L351L_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ458	L351L_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ459	L351L_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ460	L351L_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ461	L351L_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ462	L351L_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ463	L351L_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ464	L351L_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ465	L351L_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ466	L351L_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ467	L351L_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ468	L351L_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ469	L351L_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ470	L351L_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ471	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ472	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ473	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ474	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ475	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ476	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W

AZ477	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ478	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ479	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ480	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ481	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ482	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ483	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ484	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ485	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ486	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ487	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ488	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ489	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ490	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ491	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ492	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ493	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ494	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ495	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ496	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ497	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ498	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ499	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ500	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ501	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ502	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ503	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ504	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ505	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ506	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ507	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ508	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ509	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ510	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ511	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ512	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ513	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ514	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ515	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ516	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ517	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ518	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ519	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ520	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ521	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ522	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ523	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ524	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ525	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ526	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ527	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ528	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ529	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ530	L351L_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ531	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ532	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ533	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ534	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K

AZ535	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ536	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ537	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ538	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ539	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ540	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ541	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ542	L351L_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ543	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ544	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ545	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ546	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ547	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ548	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ549	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ550	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ551	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ552	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ553	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ554	L351L_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ555	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ556	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ557	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ558	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ559	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ560	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ561	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ562	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ563	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ564	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ565	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ566	L351L_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ567	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ568	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ569	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ570	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ571	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ572	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ573	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ574	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ575	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ576	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ577	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ578	L351L_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ579	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ580	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ581	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ582	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ583	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ584	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ585	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ586	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ587	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ588	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ589	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ590	L351L_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ591	L351Y_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ592	L351Y_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W

AZ593	L351Y_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ594	L351Y_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ595	L351Y_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ596	L351Y_S400D_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ597	L351Y_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ598	L351Y_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ599	L351Y_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ600	L351Y_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ601	L351Y_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ602	L351Y_S400D_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ603	L351Y_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ604	L351Y_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ605	L351Y_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ606	L351Y_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ607	L351Y_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ608	L351Y_S400D_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ609	L351Y_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ610	L351Y_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ611	L351Y_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ612	L351Y_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ613	L351Y_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ614	L351Y_S400D_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ615	L351Y_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ616	L351Y_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ617	L351Y_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ618	L351Y_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ619	L351Y_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ620	L351Y_S400D_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ621	L351Y_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ622	L351Y_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ623	L351Y_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ624	L351Y_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ625	L351Y_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ626	L351Y_S400D_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ627	L351Y_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ628	L351Y_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ629	L351Y_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ630	L351Y_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ631	L351Y_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ632	L351Y_S400D_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ633	L351Y_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ634	L351Y_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ635	L351Y_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ636	L351Y_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ637	L351Y_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ638	L351Y_S400D_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ639	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ640	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ641	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ642	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ643	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ644	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ645	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ646	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ647	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ648	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ649	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ650	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W

AZ651	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ652	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ653	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ654	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ655	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ656	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ657	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ658	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ659	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ660	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ661	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ662	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ663	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ664	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ665	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ666	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ667	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ668	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ669	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ670	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ671	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ672	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ673	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ674	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ675	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ676	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ677	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ678	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ679	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ680	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ681	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W
AZ682	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W
AZ683	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W
AZ684	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W
AZ685	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W
AZ686	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W
AZ687	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ688	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ689	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ690	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ691	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ692	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ693	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ694	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ695	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ696	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ697	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ698	L351Y_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ699	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ700	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ701	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ702	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ703	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ704	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ705	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ706	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ707	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ708	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K

AZ709	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ710	L351Y_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ711	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ712	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ713	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ714	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ715	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ716	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ717	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ718	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ719	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ720	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ721	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ722	L351Y_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ723	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ724	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ725	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ726	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ727	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ728	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ729	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ730	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ731	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ732	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ733	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ734	L351Y_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ735	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ736	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ737	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ738	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ739	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ740	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ741	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ742	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ743	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ744	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ745	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ746	L351Y_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ747	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ748	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411K
AZ749	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ750	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411K
AZ751	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ752	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411K
AZ753	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ754	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411K
AZ755	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ756	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411K
AZ757	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ758	L351Y_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411K
AZ759	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ760	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ761	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ762	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ763	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ764	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ765	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ766	D399C_F405A_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409M_T411T

AZ767	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ768	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ769	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ770	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ771	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ772	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ773	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ774	D399C_F405A_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ775	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ776	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ777	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ778	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ779	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ780	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ781	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ782	D399C_F405S_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ783	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ784	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ785	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ786	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ787	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ788	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ789	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ790	D399C_F405S_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ791	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ792	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ793	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ794	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ795	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ796	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ797	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ798	D399C_F405V_Y407I	T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ799	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ800	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ801	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ802	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ803	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ804	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ805	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ806	D399C_F405V_Y407V	T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ807	L351L_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ808	L351L_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ809	L351L_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ810	L351L_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ811	L351L_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ812	L351L_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ813	L351L_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ814	L351L_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ815	L351L_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ816	L351L_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ817	L351L_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ818	L351L_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ819	L351L_D399R_F405M_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409V_T411E
AZ820	L351L_D399R_F405M_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409V_T411E
AZ821	L351L_D399R_F405M_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409V_T411E
AZ822	L351L_D399R_F405M_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409V_T411E
AZ823	L351L_D399R_F405M_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409V_T411E
AZ824	L351L_D399R_F405M_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409V_T411E

AZ825	L351L_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ826	L351L_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ827	L351L_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ828	L351L_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ829	L351L_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ830	L351L_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ831	L351L_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ832	L351L_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ833	L351L_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ834	L351L_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ835	L351L_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ836	L351L_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ837	L351L_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ838	L351L_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ839	L351L_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ840	L351L_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ841	L351L_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ842	L351L_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ843	L351L_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ844	L351L_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ845	L351L_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ846	L351L_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ847	L351L_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ848	L351L_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ849	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ850	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ851	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ852	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ853	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ854	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ855	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ856	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ857	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ858	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ859	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ860	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ861	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ862	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ863	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ864	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ865	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ866	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ867	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ868	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ869	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ870	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ871	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ872	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ873	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ874	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ875	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ876	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ877	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ878	L351L_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ879	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ880	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ881	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ882	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N

AZ883	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ884	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ885	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ886	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ887	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ888	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ889	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ890	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ891	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ892	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ893	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ894	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ895	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ896	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ897	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ898	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ899	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ900	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ901	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ902	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ903	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ904	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ905	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ906	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ907	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ908	L351L_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ909	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ910	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ911	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ912	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ913	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ914	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ915	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ916	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ917	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ918	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ919	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ920	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ921	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ922	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ923	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ924	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ925	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ926	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ927	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ928	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ929	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ930	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ931	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ932	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ933	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ934	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ935	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ936	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ937	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ938	L351L_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ939	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ940	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S

AZ941	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ942	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ943	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ944	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ945	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ946	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ947	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ948	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ949	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ950	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ951	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ952	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ953	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ954	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ955	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ956	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ957	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ958	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ959	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ960	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ961	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ962	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ963	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ964	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ965	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ966	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ967	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ968	L351L_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ969	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ970	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ971	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ972	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ973	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ974	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ975	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ976	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ977	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ978	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ979	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ980	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ981	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ982	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ983	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ984	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ985	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ986	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ987	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ988	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ989	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ990	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ991	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ992	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ993	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ994	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ995	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ996	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ997	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ998	L351L_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T

AZ999	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1000	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1001	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1002	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1003	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1004	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1005	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1006	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1007	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1008	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1009	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1010	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1011	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1012	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1013	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1014	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1015	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1016	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1017	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1018	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1019	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1020	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1021	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1022	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1023	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1024	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1025	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1026	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1027	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1028	L351L_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1029	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1030	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1031	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1032	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1033	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1034	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1035	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1036	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1037	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1038	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1039	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1040	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1041	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1042	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1043	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1044	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1045	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1046	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1047	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1048	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1049	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1050	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1051	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1052	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1053	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1054	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1055	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1056	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L

AZ1057	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1058	L351L_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1059	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1060	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1061	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1062	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1063	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1064	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1065	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1066	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1067	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1068	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1069	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1070	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1071	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1072	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1073	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1074	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1075	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1076	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1077	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1078	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1079	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1080	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1081	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1082	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1083	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1084	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1085	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1086	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1087	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1088	L351L_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1089	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1090	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1091	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1092	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1093	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1094	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1095	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1096	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1097	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1098	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1099	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1100	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1101	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1102	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1103	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1104	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1105	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1106	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1107	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1108	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1109	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1110	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1111	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1112	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1113	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1114	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L

AZ1115	L351L_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1116	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1117	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1118	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1119	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1120	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1121	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1122	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1123	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1124	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1125	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1126	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1127	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1128	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1129	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1130	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1131	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1132	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1133	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1134	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1135	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1136	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1137	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1138	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1139	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1140	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1141	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1142	L351L_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1143	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1144	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1145	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1146	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1147	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1148	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1149	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1150	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1151	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1152	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1153	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1154	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1155	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1156	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1157	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1158	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1159	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1160	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1161	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1162	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1163	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1164	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1165	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1166	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1167	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1168	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1169	L351L_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1170	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1171	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1172	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S

AZ1173	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1174	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1175	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1176	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1177	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1178	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1179	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1180	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1181	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1182	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1183	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1184	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1185	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1186	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1187	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1188	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1189	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1190	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1191	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1192	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1193	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1194	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1195	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1196	L351L_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1197	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1198	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1199	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1200	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1201	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1202	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1203	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1204	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1205	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1206	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1207	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1208	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1209	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1210	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1211	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1212	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1213	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1214	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1215	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1216	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1217	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1218	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1219	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1220	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1221	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1222	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1223	L351L_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1224	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1225	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1226	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1227	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1228	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1229	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1230	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N

AZ1231	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1232	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1233	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1234	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1235	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1236	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1237	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1238	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1239	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1240	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1241	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1242	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1243	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1244	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1245	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1246	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1247	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1248	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1249	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1250	L351L_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1251	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1252	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1253	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1254	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1255	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1256	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1257	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1258	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1259	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1260	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1261	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1262	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1263	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1264	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1265	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1266	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1267	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1268	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1269	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1270	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1271	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1272	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1273	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1274	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1275	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1276	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1277	L351L_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1278	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1279	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1280	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1281	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1282	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1283	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1284	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1285	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1286	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1287	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1288	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L

AZ1289	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1290	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1291	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1292	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1293	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1294	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1295	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1296	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1297	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1298	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1299	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1300	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1301	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1302	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1303	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1304	L351L_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1305	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1306	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1307	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1308	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1309	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1310	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1311	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1312	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1313	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1314	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1315	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1316	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1317	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1318	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1319	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1320	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1321	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1322	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1323	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1324	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1325	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1326	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1327	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1328	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1329	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1330	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1331	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1332	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1333	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1334	L351L_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1335	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1336	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1337	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1338	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1339	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1340	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1341	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1342	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1343	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1344	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1345	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1346	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T

AZ1347	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1348	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1349	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1350	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1351	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1352	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1353	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1354	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1355	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1356	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1357	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1358	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1359	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1360	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1361	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1362	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1363	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1364	L351L_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1365	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1366	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1367	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1368	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1369	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1370	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1371	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1372	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1373	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1374	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1375	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1376	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1377	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1378	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1379	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1380	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1381	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1382	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1383	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1384	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1385	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1386	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1387	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1388	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1389	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1390	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1391	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1392	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1393	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1394	L351L_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1395	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1396	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1397	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1398	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1399	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1400	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1401	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1402	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1403	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1404	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N

AZ1405	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1406	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1407	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1408	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1409	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1410	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1411	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1412	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1413	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1414	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1415	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1416	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1417	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1418	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1419	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1420	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1421	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1422	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1423	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1424	L351L_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1425	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1426	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1427	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1428	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1429	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1430	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1431	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1432	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1433	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1434	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1435	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1436	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1437	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1438	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1439	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1440	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1441	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1442	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1443	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1444	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1445	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1446	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1447	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1448	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1449	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1450	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1451	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1452	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1453	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1454	L351L_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1455	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1456	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1457	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1458	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1459	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1460	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1461	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1462	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S

AZ1463	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1464	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1465	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1466	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1467	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1468	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1469	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1470	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1471	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1472	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1473	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1474	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1475	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1476	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1477	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1478	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1479	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1480	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1481	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1482	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1483	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1484	L351L_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1485	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1486	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1487	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1488	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1489	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1490	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1491	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1492	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1493	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1494	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1495	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1496	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1497	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1498	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1499	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1500	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1501	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1502	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1503	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1504	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1505	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1506	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1507	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1508	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1509	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1510	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1511	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1512	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1513	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1514	L351L_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1515	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1516	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1517	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1518	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1519	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1520	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T

AZ1521	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1522	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1523	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1524	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1525	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1526	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1527	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1528	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1529	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1530	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1531	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1532	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1533	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1534	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1535	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1536	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1537	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1538	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1539	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1540	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1541	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1542	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1543	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1544	L351L_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1545	L351Y_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ1546	L351Y_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ1547	L351Y_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ1548	L351Y_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ1549	L351Y_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ1550	L351Y_D399R_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ1551	L351Y_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ1552	L351Y_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ1553	L351Y_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ1554	L351Y_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ1555	L351Y_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ1556	L351Y_D399R_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ1557	L351Y_D399R_F405M_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409V_T411E
AZ1558	L351Y_D399R_F405M_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409V_T411E
AZ1559	L351Y_D399R_F405M_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409V_T411E
AZ1560	L351Y_D399R_F405M_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409V_T411E
AZ1561	L351Y_D399R_F405M_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409V_T411E
AZ1562	L351Y_D399R_F405M_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409V_T411E
AZ1563	L351Y_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ1564	L351Y_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ1565	L351Y_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ1566	L351Y_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ1567	L351Y_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ1568	L351Y_D399R_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ1569	L351Y_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ1570	L351Y_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ1571	L351Y_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ1572	L351Y_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ1573	L351Y_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ1574	L351Y_D399R_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ1575	L351Y_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ1576	L351Y_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ1577	L351Y_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ1578	L351Y_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E

AZ1579	L351Y_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ1580	L351Y_D399R_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ1581	L351Y_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409L_T411E
AZ1582	L351Y_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411E
AZ1583	L351Y_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409L_T411E
AZ1584	L351Y_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411E
AZ1585	L351Y_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409L_T411E
AZ1586	L351Y_D399R_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411E
AZ1587	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1588	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1589	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1590	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1591	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1592	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1593	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1594	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1595	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1596	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1597	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1598	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1599	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1600	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1601	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1602	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1603	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1604	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1605	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1606	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1607	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1608	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1609	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1610	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1611	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1612	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1613	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1614	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1615	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1616	L351Y_S400R_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1617	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1618	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1619	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1620	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1621	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1622	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1623	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1624	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1625	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1626	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1627	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1628	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1629	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1630	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1631	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1632	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1633	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1634	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1635	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1636	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L

AZ1637	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1638	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1639	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1640	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1641	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1642	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1643	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1644	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1645	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1646	L351Y_S400R_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1647	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1648	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1649	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1650	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1651	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1652	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1653	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1654	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1655	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1656	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1657	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1658	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1659	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1660	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1661	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1662	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1663	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1664	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1665	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1666	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1667	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1668	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1669	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1670	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1671	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1672	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1673	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1674	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1675	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1676	L351Y_S400R_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1677	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1678	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1679	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1680	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1681	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1682	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1683	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1684	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1685	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1686	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1687	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1688	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1689	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1690	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1691	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1692	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1693	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1694	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T

AZ1695	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1696	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1697	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1698	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1699	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1700	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1701	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1702	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1703	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1704	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1705	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1706	L351Y_S400R_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1707	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1708	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1709	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1710	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1711	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1712	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1713	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1714	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1715	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1716	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1717	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1718	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1719	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1720	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1721	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1722	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1723	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1724	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1725	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1726	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1727	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1728	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1729	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1730	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1731	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1732	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1733	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1734	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1735	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1736	L351Y_S400R_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1737	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1738	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1739	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1740	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1741	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1742	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1743	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1744	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1745	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1746	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1747	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1748	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1749	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1750	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1751	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1752	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N

AZ1753	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1754	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1755	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1756	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1757	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1758	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1759	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1760	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1761	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1762	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1763	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1764	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1765	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1766	L351Y_S400R_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1767	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1768	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1769	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1770	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1771	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1772	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1773	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1774	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1775	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1776	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1777	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1778	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1779	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1780	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ1781	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1782	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1783	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1784	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1785	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1786	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1787	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1788	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1789	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1790	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1791	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1792	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1793	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1794	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1795	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1796	L351Y_S400R_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1797	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1798	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1799	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ1800	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1801	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1802	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ1803	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1804	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1805	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ1806	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ1807	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ1808	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ1809	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ1810	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S

AZ1811	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ1812	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ1813	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ1814	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ1815	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ1816	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ1817	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ1818	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ1819	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ1820	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ1821	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ1822	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ1823	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ1824	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ1825	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ1826	L351Y_S400R_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ1827	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1828	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1829	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1830	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1831	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1832	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1833	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1834	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1835	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1836	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1837	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1838	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1839	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1840	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1841	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1842	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1843	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1844	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1845	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1846	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1847	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1848	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1849	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1850	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1851	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1852	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1853	L351Y_S400E_F405A_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1854	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1855	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1856	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1857	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1858	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1859	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1860	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1861	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1862	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1863	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1864	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1865	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1866	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1867	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1868	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S

AZ1869	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1870	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1871	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1872	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1873	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1874	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1875	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1876	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1877	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1878	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1879	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1880	L351Y_S400E_F405A_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1881	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1882	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1883	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1884	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1885	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1886	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1887	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1888	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1889	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1890	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1891	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1892	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1893	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1894	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1895	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1896	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1897	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1898	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1899	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1900	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1901	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1902	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1903	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1904	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1905	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1906	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1907	L351Y_S400E_F405S_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1908	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1909	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1910	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1911	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1912	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1913	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1914	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1915	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1916	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1917	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1918	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1919	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1920	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1921	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1922	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1923	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1924	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1925	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1926	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N

AZ1927	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1928	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1929	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1930	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1931	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1932	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1933	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1934	L351Y_S400E_F405S_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1935	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1936	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1937	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1938	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1939	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1940	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1941	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1942	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1943	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1944	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1945	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1946	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1947	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1948	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1949	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1950	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1951	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1952	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1953	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1954	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1955	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1956	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1957	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ1958	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1959	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1960	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1961	L351Y_S400E_F405T_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1962	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1963	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1964	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1965	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1966	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1967	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1968	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1969	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1970	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1971	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1972	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ1973	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ1974	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ1975	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ1976	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ1977	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ1978	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ1979	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ1980	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ1981	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ1982	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ1983	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ1984	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L

AZ1985	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ1986	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ1987	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ1988	L351Y_S400E_F405T_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ1989	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ1990	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ1991	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ1992	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ1993	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ1994	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ1995	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ1996	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ1997	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ1998	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ1999	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ2000	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2001	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2002	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ2003	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2004	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2005	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ2006	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2007	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ2008	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ2009	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ2010	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ2011	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ2012	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ2013	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ2014	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ2015	L351Y_S400E_F405V_Y407I	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S
AZ2016	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411N
AZ2017	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411L
AZ2018	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392L_T394W_T411S
AZ2019	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411N
AZ2020	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411L
AZ2021	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392M_T394W_T411S
AZ2022	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411N
AZ2023	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411L
AZ2024	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390R_K392F_T394W_T411S
AZ2025	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2026	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411L
AZ2027	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2028	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2029	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411L
AZ2030	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2031	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2032	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411L
AZ2033	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2034	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411N
AZ2035	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411L
AZ2036	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392L_T394W_T411S
AZ2037	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411N
AZ2038	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411L
AZ2039	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392M_T394W_T411S
AZ2040	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411N
AZ2041	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411L
AZ2042	L351Y_S400E_F405V_Y407V	T366L_N390K_K392F_T394W_T411S

AZ2043	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2044	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2045	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2046	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2047	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2048	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2049	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2050	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2051	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2052	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2053	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2054	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2055	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2056	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2057	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2058	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2059	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2060	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2061	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ2062	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2063	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2064	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ2065	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2066	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ2067	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2068	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ2069	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2070	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ2071	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2072	L351Y_S400K_F405A_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2073	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2074	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2075	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2076	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2077	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2078	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2079	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2080	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2081	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2082	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2083	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2084	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2085	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2086	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2087	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2088	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2089	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2090	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2091	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ2092	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2093	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2094	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ2095	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2096	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ2097	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2098	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ2099	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2100	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L

AZ2101	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2102	L351Y_S400K_F405A_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2103	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2104	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2105	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2106	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2107	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2108	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2109	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2110	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2111	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2112	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2113	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2114	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2115	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2116	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2117	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2118	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2119	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2120	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2121	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ2122	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2123	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2124	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ2125	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2126	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ2127	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2128	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ2129	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2130	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ2131	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2132	L351Y_S400K_F405S_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2133	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2134	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2135	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2136	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2137	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2138	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2139	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2140	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2141	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2142	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2143	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2144	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2145	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2146	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2147	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2148	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2149	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2150	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2151	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ2152	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2153	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2154	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ2155	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2156	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ2157	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2158	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T

AZ2159	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2160	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ2161	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2162	L351Y_S400K_F405S_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2163	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2164	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2165	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2166	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2167	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2168	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2169	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2170	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2171	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2172	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2173	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2174	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2175	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2176	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2177	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2178	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2179	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2180	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2181	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ2182	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2183	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2184	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ2185	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2186	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ2187	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2188	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ2189	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2190	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ2191	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2192	L351Y_S400K_F405T_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2193	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2194	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2195	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2196	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2197	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2198	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2199	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2200	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2201	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2202	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2203	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2204	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2205	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2206	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2207	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2208	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2209	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2210	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2211	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390F_K392L_T394W_T411N
AZ2212	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2213	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2214	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ2215	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2216	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L

AZ2217	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2218	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ2219	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2220	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ2221	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2222	L351Y_S400K_F405T_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2223	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2224	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2225	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2226	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2227	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2228	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2229	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2230	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2231	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2232	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2233	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2234	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2235	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2236	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2237	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2238	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2239	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2240	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2241	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ2242	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2243	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2244	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T
AZ2245	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2246	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ2247	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2248	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ2249	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2250	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ2251	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2252	L351Y_S400K_F405V_Y407I	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2253	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411N
AZ2254	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411S
AZ2255	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392L_T394W_T411T
AZ2256	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411N
AZ2257	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411S
AZ2258	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392M_T394W_T411T
AZ2259	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411N
AZ2260	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411S
AZ2261	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390N_K392F_T394W_T411T
AZ2262	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411N
AZ2263	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411S
AZ2264	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392L_T394W_T411T
AZ2265	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411N
AZ2266	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411S
AZ2267	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392M_T394W_T411T
AZ2268	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411N
AZ2269	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411S
AZ2270	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390D_K392F_T394W_T411T
AZ2271	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411N
AZ2272	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411L
AZ2273	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411S
AZ2274	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392L_T394W_T411T

AZ2275	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411N
AZ2276	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411L
AZ2277	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411S
AZ2278	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392M_T394W_T411T
AZ2279	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411N
AZ2280	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411L
AZ2281	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411S
AZ2282	L351Y_S400K_F405V_Y407V	T366L_N390E_K392F_T394W_T411T
AZ2283	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ2284	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ2285	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ2286	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ2287	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ2288	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ2289	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ2290	Y349C_D399C_F405A_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ2291	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ2292	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ2293	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ2294	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ2295	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ2296	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ2297	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ2298	Y349C_D399C_F405A_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ2299	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ2300	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ2301	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ2302	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ2303	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ2304	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ2305	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ2306	Y349C_D399C_F405S_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ2307	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ2308	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ2309	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ2310	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ2311	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ2312	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ2313	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ2314	Y349C_D399C_F405S_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ2315	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ2316	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ2317	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ2318	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ2319	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ2320	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ2321	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ2322	Y349C_D399C_F405V_Y407I	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ2323	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411L
AZ2324	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409I_T411T
AZ2325	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411L
AZ2326	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409L_T411T
AZ2327	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411L
AZ2328	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409K_T411T
AZ2329	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411L
AZ2330	Y349C_D399C_F405V_Y407V	S354C_T366L_K392C_T394W_K409M_T411T
AZ2331	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2332	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R

AZ2333	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2334	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2335	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2336	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2337	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2338	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2339	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2340	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2341	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2342	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2343	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2344	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2345	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2346	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2347	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2348	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2349	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2350	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2351	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2352	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2353	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2354	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2355	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2356	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2357	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2358	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2359	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2360	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2361	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2362	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2363	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2364	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2365	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2366	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2367	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2368	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2369	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2370	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2371	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2372	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2373	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2374	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2375	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2376	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2377	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2378	L351L_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2379	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2380	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2381	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2382	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2383	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2384	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2385	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2386	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2387	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2388	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2389	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2390	L351L_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R

AZ2391	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2392	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2393	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2394	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2395	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2396	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2397	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2398	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2399	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2400	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2401	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2402	L351L_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2403	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2404	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2405	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2406	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2407	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2408	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2409	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2410	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2411	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2412	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2413	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2414	L351Y_K370T_G371D_F405A_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2415	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2416	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2417	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2418	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2419	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2420	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2421	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2422	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2423	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2424	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2425	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2426	L351Y_K370T_G371D_F405S_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2427	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2428	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2429	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2430	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2431	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2432	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407I	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R
AZ2433	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409L_T411R
AZ2434	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392L_T394W_K409M_T411R
AZ2435	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409L_T411R
AZ2436	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392M_T394W_K409M_T411R
AZ2437	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409L_T411R
AZ2438	L351Y_K370T_G371D_F405V_Y407V	E357Q_S364R_T366L_K392F_T394W_K409M_T411R

图37

表 7

变体	Fc突变链A	Fc突变链B
AZ2439	T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407A
AZ2440	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2441	T366I_K409F	L351Y_Y407A
AZ2442	T366I_K409F	L351Y_Y407I
AZ2443	T366I_K409F	L351Y_Y407V
AZ2444	T366M_K409F	L351Y_Y407A
AZ2445	T366M_K409F	L351Y_Y407I
AZ2446	T366M_K409F	L351Y_Y407V
AZ2447	T366V_K409F	L351Y_Y407A
AZ2448	T366V_K409F	L351Y_Y407I
AZ2449	T366V_K409F	L351Y_Y407V
AZ2450	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407A
AZ2451	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407I
AZ2452	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407L
AZ2453	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407M
AZ2454	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407V
AZ2455	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407A
AZ2456	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407I
AZ2457	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407L
AZ2458	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407M
AZ2459	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407V
AZ2460	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407A
AZ2461	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407I
AZ2462	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407L
AZ2463	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407M
AZ2464	T366I_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407V
AZ2465	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407A
AZ2466	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407I
AZ2467	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407L
AZ2468	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407M
AZ2469	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407V
AZ2470	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407A
AZ2471	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407I
AZ2472	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407L
AZ2473	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407M
AZ2474	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407V
AZ2475	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407A
AZ2476	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407I
AZ2477	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407L
AZ2478	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407M
AZ2479	T366I_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407V
AZ2480	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407A
AZ2481	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407I
AZ2482	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407L
AZ2483	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407M
AZ2484	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407V
AZ2485	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407A
AZ2486	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407I
AZ2487	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407L
AZ2488	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407M
AZ2489	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407V
AZ2490	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407A
AZ2491	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407I
AZ2492	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407L

AZ2493	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407M
AZ2494	T366M_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407V
AZ2495	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407A
AZ2496	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407I
AZ2497	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407L
AZ2498	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407M
AZ2499	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407V
AZ2500	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407A
AZ2501	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407I
AZ2502	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407L
AZ2503	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407M
AZ2504	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407V
AZ2505	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407A
AZ2506	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407I
AZ2507	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407L
AZ2508	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407M
AZ2509	T366M_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407V
AZ2510	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407A
AZ2511	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407I
AZ2512	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407L
AZ2513	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407M
AZ2514	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405L_Y407V
AZ2515	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407A
AZ2516	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407I
AZ2517	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407L
AZ2518	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407M
AZ2519	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405M_Y407V
AZ2520	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407A
AZ2521	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407I
AZ2522	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407L
AZ2523	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407M
AZ2524	T366V_T394S_K409W	L351Y_F405F_Y407V
AZ2525	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407A
AZ2526	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407I
AZ2527	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407L
AZ2528	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407M
AZ2529	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405L_Y407V
AZ2530	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407A
AZ2531	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407I
AZ2532	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407L
AZ2533	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407M
AZ2534	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405M_Y407V
AZ2535	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407A
AZ2536	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407I
AZ2537	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407L
AZ2538	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407M
AZ2539	T366V_T394V_K409W	L351Y_F405F_Y407V
AZ2540	T366I_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407A
AZ2541	T366I_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407I
AZ2542	T366I_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407V
AZ2543	T366I_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407A
AZ2544	T366I_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407I
AZ2545	T366I_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407V
AZ2546	T366I_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407A
AZ2547	T366I_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407I
AZ2548	T366I_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407V
AZ2549	T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407A
AZ2550	T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407I

AZ2551	T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407V
AZ2552	T366M_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407A
AZ2553	T366M_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407I
AZ2554	T366M_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407V
AZ2555	T366M_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407A
AZ2556	T366M_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407I
AZ2557	T366M_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407V
AZ2558	T366M_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407A
AZ2559	T366M_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407I
AZ2560	T366M_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407V
AZ2561	T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407A
AZ2562	T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407I
AZ2563	T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407V
AZ2564	T366V_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407A
AZ2565	T366V_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407I
AZ2566	T366V_K392C_K409F_T411I	L351Y_D399C_Y407V
AZ2567	T366V_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407A
AZ2568	T366V_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407I
AZ2569	T366V_K392C_K409F_T411L	L351Y_D399C_Y407V
AZ2570	T366V_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407A
AZ2571	T366V_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407I
AZ2572	T366V_K392C_K409F_T411T	L351Y_D399C_Y407V
AZ2573	T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407A
AZ2574	T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407I
AZ2575	T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_Y407V
AZ2576	T366I_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2577	T366I_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2578	T366I_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2579	T366I_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2580	T366I_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2581	T366I_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2582	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2583	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2584	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2585	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2586	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2587	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2588	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2589	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2590	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2591	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2592	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2593	T366I_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2594	T366I_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2595	T366I_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2596	T366I_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2597	T366I_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2598	T366I_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2599	T366I_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2600	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2601	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2602	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2603	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2604	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2605	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2606	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2607	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2608	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V

AZ2609	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2610	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2611	T366I_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2612	T366M_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2613	T366M_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2614	T366M_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2615	T366M_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2616	T366M_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2617	T366M_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2618	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2619	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2620	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2621	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2622	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2623	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2624	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2625	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2626	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2627	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2628	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2629	T366M_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2630	T366M_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2631	T366M_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2632	T366M_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2633	T366M_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2634	T366M_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2635	T366M_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2636	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2637	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2638	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2639	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2640	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2641	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2642	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2643	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2644	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2645	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2646	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2647	T366M_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2648	T366V_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2649	T366V_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2650	T366V_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2651	T366V_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2652	T366V_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2653	T366V_K392D_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2654	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2655	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2656	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2657	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2658	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2659	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2660	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2661	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2662	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2663	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2664	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2665	T366V_K392D_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2666	T366V_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407A

AZ2667	T366V_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2668	T366V_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2669	T366V_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2670	T366V_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2671	T366V_K392E_K409F_T411D	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2672	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2673	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2674	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2675	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2676	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2677	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2678	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2679	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2680	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2681	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407A
AZ2682	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407I
AZ2683	T366V_K392E_K409F_T411E	L351Y_D399K_S400S_Y407V
AZ2684	S354C_T366I_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2685	S354C_T366I_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2686	S354C_T366I_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2687	S354C_T366I_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2688	S354C_T366I_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2689	S354C_T366I_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2690	S354C_T366I_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2691	S354C_T366I_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2692	S354C_T366I_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2693	S354C_T366M_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2694	S354C_T366M_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2695	S354C_T366M_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2696	S354C_T366M_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2697	S354C_T366M_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2698	S354C_T366M_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2699	S354C_T366M_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2700	S354C_T366M_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2701	S354C_T366M_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2702	S354C_T366V_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2703	S354C_T366V_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2704	S354C_T366V_K392C_K409F_T411I	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2705	S354C_T366V_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2706	S354C_T366V_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2707	S354C_T366V_K392C_K409F_T411L	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2708	S354C_T366V_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407A
AZ2709	S354C_T366V_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407I
AZ2710	S354C_T366V_K392C_K409F_T411T	Y349C_L351Y_D399C_Y407V
AZ2711	Q362E_T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407A
AZ2712	Q362E_T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407I
AZ2713	Q362E_T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407V
AZ2714	Q362E_T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407A
AZ2715	Q362E_T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407I
AZ2716	Q362E_T366I_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407V
AZ2717	Q362E_T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407A
AZ2718	Q362E_T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407I
AZ2719	Q362E_T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407V
AZ2720	Q362E_T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407A
AZ2721	Q362E_T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407I
AZ2722	Q362E_T366M_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407V
AZ2723	Q362E_T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407A
AZ2724	Q362E_T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407I

AZ2725	Q362E_T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371G_D399R_Y407V
AZ2726	Q362E_T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407A
AZ2727	Q362E_T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407I
AZ2728	Q362E_T366V_K392L_K409F_T411E	L351Y_G371S_D399R_Y407V
AZ2729	T366I_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2730	T366I_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2731	T366I_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2732	T366I_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2733	T366I_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2734	T366I_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2735	T366I_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2736	T366I_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2737	T366I_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2738	T366I_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2739	T366I_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2740	T366I_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2741	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2742	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2743	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2744	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2745	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2746	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2747	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2748	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2749	T366I_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2750	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2751	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2752	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2753	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2754	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2755	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2756	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2757	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2758	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2759	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2760	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2761	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2762	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2763	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2764	T366I_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2765	T366I_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2766	T366I_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2767	T366I_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2768	T366I_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2769	T366I_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2770	T366I_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2771	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2772	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2773	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2774	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2775	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2776	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2777	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2778	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2779	T366I_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2780	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2781	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2782	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V

AZ2783	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2784	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2785	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2786	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2787	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2788	T366I_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2789	T366I_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2790	T366I_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2791	T366I_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2792	T366I_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2793	T366I_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2794	T366I_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2795	T366I_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2796	T366I_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2797	T366I_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2798	T366I_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2799	T366I_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2800	T366I_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2801	T366M_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2802	T366M_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2803	T366M_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2804	T366M_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2805	T366M_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2806	T366M_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2807	T366M_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2808	T366M_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2809	T366M_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2810	T366M_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2811	T366M_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2812	T366M_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2813	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2814	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2815	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2816	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2817	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2818	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2819	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2820	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2821	T366M_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2822	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2823	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2824	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2825	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2826	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2827	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2828	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2829	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2830	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2831	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2832	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2833	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2834	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2835	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2836	T366M_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2837	T366M_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2838	T366M_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2839	T366M_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2840	T366M_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A

AZ2841	T366M_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2842	T366M_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2843	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2844	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2845	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2846	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2847	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2848	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2849	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2850	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2851	T366M_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2852	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2853	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2854	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2855	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2856	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2857	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2858	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2859	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2860	T366M_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2861	T366M_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2862	T366M_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2863	T366M_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2864	T366M_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2865	T366M_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2866	T366M_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2867	T366M_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2868	T366M_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2869	T366M_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2870	T366M_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2871	T366M_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2872	T366M_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2873	T366V_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2874	T366V_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2875	T366V_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2876	T366V_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2877	T366V_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2878	T366V_N390R_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2879	T366V_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2880	T366V_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2881	T366V_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2882	T366V_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2883	T366V_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2884	T366V_N390R_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2885	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2886	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2887	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2888	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2889	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2890	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2891	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2892	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2893	T366V_N390N_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2894	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2895	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2896	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2897	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2898	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I

AZ2899	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2900	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2901	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2902	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2903	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2904	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2905	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2906	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2907	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2908	T366V_N390N_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2909	T366V_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2910	T366V_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2911	T366V_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2912	T366V_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2913	T366V_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2914	T366V_N390N_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2915	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2916	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2917	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2918	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2919	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2920	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2921	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2922	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2923	T366V_N390D_K392I_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2924	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407A
AZ2925	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407I
AZ2926	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400R_Y407V
AZ2927	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407A
AZ2928	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407I
AZ2929	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400K_Y407V
AZ2930	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407A
AZ2931	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407I
AZ2932	T366V_N390D_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400S_Y407V
AZ2933	T366V_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2934	T366V_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2935	T366V_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2936	T366V_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2937	T366V_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2938	T366V_N390K_K392L_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V
AZ2939	T366V_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407A
AZ2940	T366V_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407I
AZ2941	T366V_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400D_Y407V
AZ2942	T366V_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407A
AZ2943	T366V_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407I
AZ2944	T366V_N390K_K392K_K409F_T411E	L351Y_D399R_S400E_Y407V

图38